



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



TÜMÖR TANI VE İZLEMİ İÇİN DOLAŞIMDAKİ SERBEST DNA'NIN TAYİNİNE YÖNELİK SPESİFİK BİR BİYOSENSÖR SİSTEMİ GELİŞTİRİLMESİ

Doktora Tezi

Zihni Onur UYGUN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

İzmir
2020

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**TÜMÖR TANI VE İZLEMİ İÇİN DOLAŞIMDAKİ
SERBEST DNA'NIN TAYİNİNE YÖNELİK SPESİFİK
BİR BİYONSENSÖR SİSTEMİ GELİŞTİRİLMESİ**

Araş. Gör. Zihni Onur UYGUN

Danışman
Prof. Dr. Ferhan GİRĞİN SAĞIN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Doktora

İzmir
2020

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof. Dr. Ferhan GİRGİN SAĞIN

(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL

Üye : Prof. Dr. Dilek ODACI DEMİRKOL

Üye : Prof. Dr. Gül AKDOĞAN

Üye : Prof. Dr. Gülinnaz ERCAN

Üye : Prof. Dr. Yasemin AKÇAY

Doktora Tezinin kabul edildięi tarih: 28.12.2020

Önsöz

2010 yılında mezun olduğum Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü'nün son yılında yaptığım tez çalışması ile laboratuvarında çalışmayı, yeni fikirler, projeler geliştirmeyi sevdiğimi fark ettim. Lisans tez çalışmalarım sırasında akademik kariyere karar verdim. Olayların akışının beni biyosensörler alanına itmesi ve bu alanı kendime hobi edinmem ile biyokimya, elektrokimya, sensörler ve biyosensörler alanında kendimi geliştirmeye başladım. Lisans eğitimimden mezun olduktan sonra her konuda her alanda çalışma hevesimi bir kenara bırakarak, enerjimi bir noktada toplayarak başaramayacağım şey olmadığını gördüm. Yüksek lisans ve doktora eğitimlerim süresinde, yıllar geçtikçe, tecrübe kazandıkça, hayatın ne getireceğinin belli olmadığı, her şeyin insan için olduğu ve en önemlisi sabrın çok önemli olduğu gerçeklerini öğrendim. Akademik hayatın sadece laboratuvarında deney yapmak olmadığını da öğrendim, deneysel çalışmaların dışında kazanılan diğer deneyimler bence akademik hayatın asıl bileşenleridir. Farklı üniversitelerde farklı kişilerle çalıştıktan ve farklı çalışma stilleri gördükten sonra, akademik danışmanın vizyon sahibi olmasının, öğrencinin aradığı en önemli özellik olduğunu gördüm. Danışmanın bu vizyonu öğrenciye aşılamayı başarması ise en büyük öğretilerdir. Bundan sonraki akademik süreçte, kendi öğrencilerime de öğreteceğim en büyük öğreti bu olacaktır.

İzmir, 28.12.2020

Araş. Gör. Zihni Onur UYGUN

Babam Metin UYGUN ve
Ođlum Bora Metin UYGUN’a...



Özet

Tümör Tanı ve İzlemi İçin Dolaşımdaki Serbest DNA'nın Tayinine Yönelik Spesifik Bir Biyosensör Sistemi Geliştirilmesi

Dünya çapında ölüme yol açan nedenler arasında kanser, kalp hastalıklarından sonra ikinci sırayı almaktadır. Kanser tedavilerindeki önemli gelişmelere rağmen, morbidite ve mortalite hala çok yüksektir. Bu kapsamda, halihazırda kullanılan kan biyobelirteçleri yanı sıra "sıvı biyopsi" olarak tanımlanan ve tümör dokusundan salınan dolaşımdaki hücre dışı tümör DNA'sını (circulating tumor DNA-ctDNA) saptamaya yönelik kan tabanlı analizler noninvaziv, spesifik, pratik ve ekonomik olmaları nedeniyle son yıllarda ilgi çekmektedirler. Bu çalışmada ctDNA'nın doğrudan tespiti için, grafen oksit ekran baskılı elektrotlar (GPHOXE), biyolojik tanıma reseptörü olarak dCas9 proteinleri ve sgRNA ile modifiye edilmiştir. Biyosensörün temelinde yer alan diziye özgü tanımanın örnekte hedeflediği yapı ise, meme kanserinde en sık görülen tümöre bağlı mutasyon olan PIK3CA ekson 9 mutasyonudur. Geliştirilen sistemde, CRISPR-dCas9-sgRNA ile modifiye edilmiş elektrotların yüzeyinde bu mutasyonun varlığında gerçekleşen bağlanma ise, elektrokimyasal impedans spektroskopisi (Electrochemical Impedance Spectroscopy-EIS) ile analiz edilmiştir. Tek nükleotit uyumsuzluğu da dahil olmak üzere hedef mutasyon dışındaki ctDNA dizileri için son derece seçici özellik gösteren sistemin ölçüm süresi son derece hızlı (40 saniye) olarak saptanmıştır. Analiz, 120 bp ctDNA'lar için 2-20 nM arasında doğrusal saptama sınırlarında olup en düşük tespit limiti (LOD) 0,65 nM ve en düşük tayin limiti (LOQ) 1,92 nM olarak hesaplanmıştır. Gerçek kan örneklerinde seçicilik ve tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmış ve geri elde oranı % 96'dan yüksek olmuştur. Aynı metot, doğrulama amaçlı olarak altın elektrot ile de denenmiş ve ctDNA analizi başarı ile yapılabilmektedir. Sonuç olarak bu tez çalışmasında grafen oksit elektrotlarda geliştirilen ve altın elektrot ile doğrulama çalışmaları yapılan dCas9 temelli impedimetrik biyosensör sistemi, ctDNA ölçümünde yüksek seçicilik, hız, tekrar üretilebilirlik ve ekonomik olma avantajları sağlamaktadır. Ön çalışmaları sağlam verilerle kanıtlanmış olan bu düzeneğin geliştirilerek multipleks bir sistem çerçevesinde diğer önemli mutasyonlara yönelik olarak da uygulanması, kanserin erken teşhisinde umut verici bir alan olarak ortaya çıkmaktadır.

Anahtar Kelimeler; dCas9, CRISPR, sgRNA, biyosensör, impedans, kanser, ctDNA

Abstract

Development of a Specific Biosensor System for the Determination of Circulating Free DNA for Tumor Diagnosis and Monitoring

Among the causes of death worldwide, cancer is the second leading cause of death, following coronary diseases. Despite significant improvements in cancer treatments, morbidity and mortality rates are still very high. Thus, in addition to the currently used blood biomarkers, circulating extracellular tumor DNA (ctDNA), have attracted attention in recent years. These analysis are defined as "liquid biopsy" and their non-invasive, specific, practical and economical nature is well appreciated. There are increasing numbers of publications showing that ctDNA accurately demonstrates tumor burden and treatment response, reduces the need for harmful adjuvant chemotherapy, and allows recurrence to be detected more quickly. In this study, graphene oxide screen printed electrodes (GPHOXE) were modified with dCas9 proteins and sgRNA as biorecognition receptor for direct detection of ctDNA. The sequence-specific recognition targeted PIK3CA exon 9 mutation which is the most common tumor-related mutation in breast cancer. With electrodes modified with CRISPR-dCas9-sgRNA, the presence of the mutation was analyzed by EIS. The system is highly selective for the PIK3CA exon 9 mutation containing ctDNA and eliminates other mutations, including even single nucleotide mismatch. The measurement time is determined to be extremely fast (40 seconds). The analysis was carried out in a linear detection range between 2 and 20 nM for 120 bp ctDNAs. The lower limit of detection (LOD) was 0.65 nM and the lower limit of quantification (LOQ) was 1.92 nM. Selectivity and reproducibility studies were performed on real blood samples, and the recovery was higher than 96%. An alternative modification procedure was performed on gold electrodes for verification purposes and ctDNA analysis was successfully performed on this platform as well. In conclusion, the dCas9 based impedimetric biosensor system, which was developed on graphene oxide electrodes and verified with gold electrode, provided advantages like high selectivity, fast detection, reproducibility and economic efficiency in ctDNA analysis. The development of this novel biosensor, whose preliminary studies have been proven with solid data, and its application for other important mutations within the framework of a multiplex system, is a promising area in the early diagnosis of cancer.

Keywords; dCas9, CRISPR, sgRNA, biosensor, impedance, cancer, ctDNA



İçindekiler

Önsöz	II
Özet.....	IV
Abstract.....	V
İçindekiler	VII
Tablolar Dizini.....	VIII
Şekiller Dizini	IX
Kısaltma Listesi	XIII
Giriş	1
1.1. Araştırmanın Problemi.....	1
1.2. Araştırmanın Soruları	2
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	3
1.4. Araştırmanın Varsayımları.....	3
1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları	3
1.6. Araştırmanın Amacı	4
Genel Bilgiler	5
Gereç ve Yöntem	17
Bulgular.....	28
Tartışma	58
Sonuç ve Öneriler.....	70
Kaynaklar	72
Ekler	80
Teşekkür	89
Özgeçmiş	90

Tablolar Dizini

Tablo 1. Değişik tip meme kanserlerinde PIK3CA mutasyonlarının görülme sıklığının oranı (Kaynak: https://www.mycancergenome.org/content/disease/breast-cancer/pik3ca/)	21
--	----



Şekiller Dizini

Şekil 1. Standart biyopsi ile sıvı biyopsinin şematik olarak karşılaştırılması.....	7
Şekil 2. Randles devre şemasının gösterimi (elektrik akımı soldan sağa doğru gerçekleşmektedir). Modelde R1 yardımcı elektrot ile çalışma elektrotu arasında kalan çözelti direncini, R2 ise çalışma elektrotu yani kullanılan ana elektrotun yüzey direncini gösterir. W, Warburg impedansıdır, redoks probundan elektrot yüzeyine madde taşınımını temsil eder. C ise yüzeyin çift tabaka yük direncini gösterir. Impedans, bu devre modeli ile hesaplanmıştır.....	22
Şekil 3. CRISPR-dCas9 temelli biyosensörün şematik gösterimi. Elektrot yüzeyine immobilize edilen dCas9-sgRNA kompleksi DNA'yı bağladığında, impedans ölçümünde kullanılan redoks probunun elektrokimyasal dönüşümü azalır ve impedans artar.	26
Şekil 4. dCas9 biyosensör modifikasyon adımlarının CV ile gösterimi. Döngüsel voltammogramlarda yalın grafen oksit elektrot (GPHOXE) kırmızı renkle gösterilmiştir, elektrodun dCas9 ile modifiye (GPHOXE-dCas9) edildikten sonraki mavi CV pik akımında artış, pik potansiyelinde de değişimi göstermektedir. dCas9 üzerine bağlanan sgRNA (GPHOXE-dCas9-sgRNA) ile gösterilen turuncu renkli CV'de pik akımının azaldığı görülmektedir. Son aşamada ise, ctDNA bağlayan biyosensörde (yeşil renkli CV) yine pik akımında azalma gözlenmiştir. (Kırmızı CV: GPHOXE, mavi CV: GPHOXE-dCas9, turuncu CV: GPHOXE-dCas9-sgRNA, yeşil CV: GPHOXE-dCas9-sgRNA-ctDNA modifikasyonlarını ve analizlerini temsil etmektedir).	29
Şekil 5. dCas9 biyosensör modifikasyon adımlarının EIS ile gösterimi. Yalın elektrot (GPHOXE) (kırmızı renk) EIS bir sinüs eğrisi yani elektron transfer direnci (Ret) (yarım çember) ve devamında ise lineer hale gelme karakteristiği gösteren Warburg impedansı yani kütle taşınım impedansı görülmektedir. Elektrot daha sonra dCas9 ile modifiye edilince (mavi EIS) görülen Ret azalmıştır, Warburg direnci ise görülmemektedir. sgRNA eklenmesi ile (turuncu EIS) impedansta Ret artmış, sonrasında ctDNA eklenmesi ile dCas9-sgRNA-ctDNA etkileşimi sonucunda (yeşil EIS) bu artış daha da belirginleşmiştir. (Kırmızı EIS: GPHOXE, Mavi EIS: GPHOXE-dCas9, Turuncu EIS: GPHOXE-dCas9-sgRNA, Yeşil EIS: GPHOXE-dCas9-sgRNA-ctDNA modifikasyonlarını ve analizlerini temsil etmektedir).....	30

Şekil 6. Grafen oksit elektrotun atomik kuvvet mikroskobu ile gösterimi. Bu şekillerde elektrot yüzey alanının 20x20 µm alan taraması yansıtılmaktadır, görsellerin altında ve yanında bulunan skalalardan yüzey kalınlığı ölçülmektedir. Şekil 6a'da GPHOXE elektrotun maksimum yüzey kalınlığı 1731 nm olarak ölçülmüştür. Daha sonrasında dCas9 ile modifiye edilen elektrot yüzeyi (Şekil 6b) 2002,77 nm olarak hesaplanmıştır, yani modifikasyonu doğrulayan şekilde bir elektrot yüzey kalınlığı artışı söz konusudur. GPHOXE-dCas9 elektrot daha sonrasında sgRNA ile modifiye edildiğinde (Şekil 6c) elektrot yüzey kalınlığı 2230 nm olarak belirlenmiştir. GPHOXE-dCas9-sgRNA ile modifiye edilmiş biyosensöre ctDNA bağlandığında (Şekil 6d) ise yüzey kalınlığının maksimum yüksekliğe ulaşmış olduğu (3103,52 nm) görülmüştür. Sonuç olarak her başarılı modifikasyon tabakasında elektrot yüzeyi artmıştır. (a; GPHOXE, b; GPHOXE-dCas9, c; GPHOXE-dCas9-sgRNA, d; GPHOXE-dCas9-sgRNA-ctDNA)..... 32

Şekil 7. ctDNA ölçümü optimizasyonunun kronoimpedans ile gösterimi. PIK3CA ctDNA eklenmesi ile başlatılan ölçümde (7a) ilk 40 saniye boyunca lineer bir artış, sonrasında ise eğrinin plato çizdiği görülmektedir. Tek baz mutasyonu içeren ctDNA verisinde (7b) ise 200 saniye boyunca yavaş bir artış görülmektedir. Wild-type yani mutasyon içermeyen DNA örneğine karşı GPHOXE-dCas9-sgRNA biyosensörünün (7c) ve DNA içermeyen standart çözeltinin (7d) verdiği zamana bağlı impedans eğrilerinde ise bir artış söz konusu değildir. (a; ctDNA, b; tek nükleotid farklı ctDNA, c; wild-type DNA, d; DNA içermeyen standart örnekler) 34

Şekil 8. Döngüsel voltammogram ile gösterilen kalibrasyon grafiği (0-20 nM). En yüksek pik potansiyeline sahip CV, 2 nM ctDNA konsantrasyonu için elde edilen voltammogramdır. Konsantrasyon arttıkça pik akımı hem ileri, hem de geri taramada düşmektedir. Pik potansiyelinde değişme ise görülmemektedir. 36

Şekil 9. ctDNA biyosensörünün 0-20 nM aralığındaki impedans spektrumlarının birbiri üzerinde gösterimi. Bu impedans spektrumlarında görüldüğü gibi biyosensör yüzeyi ctDNA'yı bağladıkça impedans spektrumlarında da, ctDNA konsantrasyonundaki artış ile orantılı artış meydana gelmiştir..... 37

Şekil 10. ctDNA biyosensörünün 2 nM ile 20 nM arasındaki standart grafiği. y-ekseni Ret (ohm), x-ekseni ctDNA (nM) 39

Şekil 11. ctDNA biyosensörünün 2nM ile 30nM arasındaki standart grafiği y-ekseni Ret (ohm), x-ekseni ctDNA (nM) 41

Şekil 12. Kırmızı ile gösterilen EIS GPHOXE-dCas9-sgRNA elektrotu, siyah ile gösterilenler ise 2 nM ctDNA standartının tekrarlı ölçüm sonucunda elde edilen impedans değerleridir (n=5) 43

Şekil 13. ctDNA biyosensörünün oda sıcaklığında bekletildikten sonra t=0, 10, 20 ve 30. gün sonunda 2 nM ctDNA ölçümüne karşı verdiği impedans değerleri ile depo kararlılığının gösterimi. Siyah renkli impedans GPHOXE-dCas9-sgRNA elektrodu, kırmızı impedans t=0, mavi impedans 10. gün sonunda elde edilen impedansı, sarı 20. gün sonunda elde edilen impedans ölçümünü ve yeşil renkli impedans ise 30. gün sonunda elde edilen impedansı göstermektedir. Bekleme süresi arttıkça impedans azalmaktadır. 45

Şekil 14. ctDNA biyosensörünün +4°C’de bekletildikten sonra t=0, 10, 20 ve 30. gün sonunda 2 nM ctDNA ölçümüne karşı verdiği impedans değerleri ile depo kararlılığının gösterimi. Siyah renkli impedans GPHOXE-dCas9-sgRNA elektrotu, kırmızı impedans t=0, mavi impedans 10. gün sonunda elde edilen impedansı, sarı 20. gün sonunda elde edilen impedans ölçümünü ve yeşil renkli impedans ise 30. gün sonunda elde edilen impedansı göstermektedir. Oda sıcaklığına göre +4°C’de beklemenin neden olduğu impedans azalması daha azdır..... 46

Şekil 15. ctDNA biyosensörünün depo kararlılığının göreceli (%) olarak gösterimi. Kırmızı sütunlar t=0 anını, sarı sütunlar +4°C ve mavi sütunlar oda sıcaklığında inkübe edilen biyosensörün 10., 20. ve 30. gündeki impedans değişimlerini göstermektedir. 47

Şekil 16. Sistamin, glutaraldehit ve PAMAM-G5’in kimyasal gösterimi 48

Şekil 17. ctDNA biyosensör modifikasyon adımlarının CV ile gösterimi, a ile gösterilen şekil tüm modifikasyonu, b ile gösterilen ise a şeklinde ayrıntılı gösterilmeyen CV verilerini göstermektedir. Kırmızı ile gösterilen CV AuE’yi temsil etmektedir. Elektrodun Cys ile modifikasyonu (AuE-Cys) sonrasında pik akımında artış ve pik potansiyelinde değişim sarı renkli CV’de izlenmektedir. PAMAM ile modifiye edilen elektrodun (AuE-Cys-PAMAM) mavi olarak gösterilen CV’sinde ise pik akımında azalma gözlemlenmiştir, pik potansiyeli yine aynı düzleme gelmiştir. Bu işlemde sonra elektrot yüzeyi modifiye edildikçe, pik akımında azalma izlenmektedir: dCas9 ile modifiye edilen elektrot (AuE-Cys-PAMAM-dCas9) yeşil renkli CV’de, glutaraldehit ile aktifleştirilmiş uçların kapatılması için kullanılan glisinle elde edilen turuncu renkli CV, sgRNA ile kompleks oluşturan dCas9

elektrodunun açık mavi renkli CV ve en sonunda da ctDNA bağlayan elektrodun (AuE-Cys-PAMAM-sgRNA-ctDNA) siyah renkli CV olarak görülmektedir (Kırmızı: AuE, Sarı: AuE-Cys, Mavi: AuE-Cys-PAMAM, Yeşil: AuE-Cys-PAMAM-dCas9, Turuncu: AuE-Cys-PAMAM-dCas9 elektrotun glisin ile açığındaki PAMAM uçlarının bloke edilmesini, Açık mavi: AuE-Cys-PAMAM-dCas9-sgRNA, Siyah: AuE-Cys-PAMAM-sgRNA-ctDNA).	49
Şekil 18. ctDNA biyosensör modifikasyon adımlarının EIS ile gösterimi. (Kırmızı: AuE, Sarı: AuE-Cys, Mavi: AuE-Cys-PAMAM, Yeşil: AuE-Cys-PAMAM-dCas9, Turuncu: AuE-Cys-PAMAM-dCas9 elektrotun glisin ile açığındaki PAMAM uçlarının bloke edilmesini, Açık mavi: AuE-Cys-PAMAM-dCas9-sgRNA, Siyah: AuE-Cys-PAMAM-sgRNA-ctDNA). (a ile gösterilen EIS tüm modifikasyon adımlarının, b ile gösterilen EIS ise glisin, sgRNA ile modifikasyon ve biyosensörün ctDNA bağlamasının ayrıntılı gösterimidir).	51
Şekil 19. AuE-Cys-PAMAM-dCas9-sgRNA modifiyeli elektrotun ctDNA ölçümündeki süre optimizasyonunun kronoimpedimetrik olarak gösterilmesi	53
Şekil 20. 0, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 pM arasındaki ctDNA ölçümlerinin elektrokimyasal impedans spektroskopisi ile gösterimi.....	55
Şekil 21. ctDNA biyosensörünün 10-640 pM arasındaki ctDNA konsantrasyonlarına karşı verdiği impedans değerleriyle geliştirilen standart grafik. Grafiğin lineeritesini gösteren regresyon katsayısı (R^2) 0,9811 olarak hesaplanmıştır. Standart grafiğin denklemi $y = 110,85 x + 20477$ olarak belirlenmiştir. Grafik denkleminde y; ohm cinsinden impedans değerlerini, x ise pM cinsinden ctDNA miktarını belirtmektedir. 6 defa tekrarlanan standart grafiklerde ise $R^2 = 0,9811 \pm 0,0122$ olarak belirlenmiştir.	56

Kısaltma Listesi

Au	: Altın
AuNT	: Altın Nanotüp
ctDNA	: Dolaşımdaki tümör DNA'sı
CV	: Döngüsel Voltammetri
PIK3CA	: Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz katalitik altbirim alfa
dCas9	: Deaktive Cas9 (CRISPR associated protein 9)
CTC	: Dolaşımdaki tümör hücresi
DPV	: Diferansiyel puls voltammetrisi
EDC	: (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorür)
EIS	: Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi
GPHOXE	: Grafen Oksit Elektrot
NHS	: N-hidroksisükninimid
PAMAM	: Poliamidoamin
sgRNA	: Sentetik rehber RNA
RT-PCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

Giriş

1.1. Araştırmanın Problemi

Kanser ölüme yol açan nedenler arasında kalp hastalıklarından sonra ikinci sırayı almakta ve ülkemizde tüm ölümlerin yaklaşık % 21,3'ünü oluşturmaktadır. Onkolojik cerrahi, adjuvan sistemik tedavi ve hedefe yönelik tedaviler son 10 yılda kanserdeki iyileşme süreçlerini belirgin şekilde geliştirmiş olsa da birçok hasta hala tümör metastazı ve ilaç direnci yüzünden kaybedilmektedir. Bu konuda son yıllarda tanı ve izlemde kullanılan yenilikçi bir yaklaşım olan sıvı biyopsi de, hastanın kan örneği alınarak dolaşımdaki tümör hücreleri (CTC) ya da apoptotik veya nekrotik tümör hücrelerinden dolaşıma salınan DNA fragmanları incelenir. Kanser hastalarında, dolaşımdaki hücreden bağımsız bu tümör DNA'sındaki (circulating tumor DNA-ctDNA) düzey değişikliğinin tümör yükü, evre, vaskülarite, hücresel turnover ve tedaviye yanıt ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir. ctDNA analizi yalnız terapötik hedefleri belirlemede ve ilaç seçiminde değil, kullanılan ilaçların kanser hastalarında direnç mekanizmalarını ne şekilde değiştirdiği ve ne kadar etkili olduğu konusunda da bilgi vermektedir.

ctDNA'yı analiz eden klasik yöntemler arasında, kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (real-time polymerase chain reaction-RT-PCR), floresan ve spektrofotometrik tabanlı yaklaşımlar bulunmaktadır. Bu analizlerde primer denilen öncü DNA veya RNA dizileri kullanılarak hedef DNA veya RNA parçası çoğaltılır ve karşılıklı komplementer parçalar birleştirilir. Bu işlem RT-PCR ile gerçek zamanlı izlenebilir veya PCR ile elde edilen parçalar uygun boyalar ile boyanarak elektroforezle izlenerek belirlenebilir. Bu yöntemlerde örnek hazırlama gibi ön işlemler, sarf malzemesi/kimyasal kullanımı gibi ölçüm maliyetini arttıran noktalar, termal cycler gibi bazı alet gereklilikleri yanı sıra, uzun süren analiz süreci gibi dezavantajlar söz konusudur.

Günümüzde geliştirilen DNA biyosensörlerinde ise transdüser üzerine bağlanan ve hedef DNA dizisinin komplementerini içeren bir dizi bulunmaktadır. Analitte hedef DNA varlığı durumunda tek zincirli DNA'lar (ssDNA), transdüser üzerinde çift zincirli DNA (dsDNA) oluştururlar ve ölçüm gerçekleşir. Ancak çoğu zaman bu ikili zincir ile etkileşime giren bir elektrokimyasal molekül (label) kullanılarak ölçüm yapılır, ancak bu biyosensörlerde oluşan dsDNA'lar %100 baz eşlenmesi olmadığında

bile bağlanma göstererek yanlış pozitif sinyal verebilirler. Görüldüğü gibi bu analizlerin en önemli kısıtlılıkları da label-free olmamaları ve spesifikliklerinin az olmasıdır.

Mevcut yöntemlerin dezavantaj ve kısıtlılıkları göz önüne alındığında, ctDNA için kişiye özgü, spesifik, duyarlı ve daha düşük maliyetli bir analiz teknolojisi gerekliliği ortadadır.

Bu tez çalışmasında, tümör tanı ve izleminde kullanılmak üzere ctDNA ölçümü için elektrokimyasal impedans spektroskopisi temelli yeni bir DNA biyosensör sistemi geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu biyosensörün temel özelliği, ctDNA'yı spesifik olarak tanıyabilecek bir algılayıcı sistemin elektrot yüzeyine yerleştirilmesidir. Algılayıcı sistemde endonükleaz aktivitesi olmayan Cas9 (deactivated Cas9-dCas9) proteinleri ile fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik altbirim alfa (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha-PIK3CA) ekzon 9 mutasyonunu tanıyacak şekilde dizayn edilmiş sentetik rehber RNA (synthetic guide RNA-sgRNA) kullanılmıştır. Böylelikle geliştirilen yeni elektrotlarda, hedef ctDNA'ya doğrudan affinite temelli bağlanacak bir biyoreseptörle ölçümlerin daha spesifik, daha doğru ve daha hızlı olması hedeflenmiştir.

1.2. Araştırmanın Soruları

Bu tez çalışması aşağıdaki sorulara cevap aranması ile kurgulanmıştır.

- Kanser tanı ve izleminde yaşanan zorluklar nasıl aşılanır?
 - Kanser tanı ve izleminde sıvı biyopsinin yeri nedir?
 - Meme kanserinde ctDNA analizi mümkün müdür?
 - Meme kanserinde ctDNA ana tümörle aynı genetik özellikleri mi gösterir?
 - Meme kanserinde ctDNA'da hangi tip mutasyonlar fazla görülür?
 - PIK3CA mutasyonu olan hastalar ctDNA analiziyle saptanabilir mi?
- ctDNA analizi için yenilikçi, spesifik, doğru ve hızlı ölçüm yapan bir biyosensörler tasarlanabilir mi?
 - CRISPR-Cas9 teknolojisi ctDNA biyosensörü için biyotanıma ajanı olarak kullanılabilir mi?
 - Cas9 endonükleaz aktivitesi olmadan DNA ile etkileşime girer mi?
 - dCas9 ile yapılan çalışmalarda Cas9 aktivitesi nasıl gerçekleşir?
 - PIK3CA'ya uygun sgRNA sentezlenebilir mi?

- dCas9-sgRNA kompleksinin elektrot yüzeyine, tekrarlanabilir bir şekilde immobilize edilmesi için hangi elektrot tipi seçilmelidir?
- Bu immobilizasyon metoduyla ctDNA ölçümü için hangi elektrokimyasal yöntemler uygundur?
- Yukarıdaki çerçevede geliştirilen bir biyosensör;
 - ne kadar doğrulukta analiz yapabilir?
 - performans parametreleri nelerdir?
 - ölçüm süresi ne kadardır?
 - RT-PCR ile karşılaştırıldığında performansı nasıldır?

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Hipotez 1: CRISPR-dCas9 ile modifiye edilmiş elektrotların yardımıyla ctDNA analizini daha hızlı ve seçici şekilde gerçekleştirebilecek bir biyosensör tasarlanabilir.

Hipotez 0: PIK3CA mutasyonunu hedefleyen CRISPR-dCas9 ile modifiye edilmiş biyosensör sistemiyle tayin edilen ctDNA'lar belirlenebilir.

1.4. Araştırmanın Varsayımları

Bu araştırmada PIK3CA'nın en sık rastlanılan meme kanseri mutasyonu olduğu varsayılarak biyosensör tasarımında bu mutasyona yönelik DNA dizini kullanılmıştır. Araştırmada ayrıca ctDNA'ya spesifik dCas9-sgRNA'nın, elektropolimerizasyon ardı başarılı bir şekilde transdüser yüzeyine immobilize edileceği varsayılmıştır. Araştırma varsayımlarından bir diğeri, örnekteki hedef ctDNA'ların afinite temelli olarak biyotanıyıcıya bağlanmasıyla standart biyosensör prensiplerinin işleyeceği, yani yüzeyin elektriksel özelliklerinin değişeceği ve oluşacak anlamlı sinyallerin elektrokimyasal olarak ölçülebileceğidir.

1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları

- Tüm meme kanserli olgularda aynı mutasyonun bulunmaması dolayısıyla sınırlı sayıda hasta örneği ile çalışma durumunda olmak (hedef PIK3CA mutasyonu 100 hasta örneğinin sadece 19 tanesinde saptanmıştır),
- Araştırma ölçümleri çok hassas olduğundan, RNase-Free ve DNase-Free sarf malzemesi kullanımının gerekmesi,
- Biyosensörün tek bir kanser tipindeki tek mutasyona özgü geliştirilmiş olması,

- Araştırmanın yüksek bütçeli bir araştırma olması, dolayısıyla yaygın etki için benzer araştırmaların yapılmasının maliyetli olacağı gerçeği araştırmanın kısıtlılıklarındandır.

1.6. Araştırmanın Amacı

Bu araştırmada, kanser tanı - izleminde kullanılabilme potansiyeli olan ctDNA tayini için elektrokimyasal bir DNA biyosensörü geliştirilmesi amaçlanmıştır. Geliştirilen bu sistemin yenilikçi özelliği, meme kanserli hastalardan alınan örneklerde bulunan ctDNA'yı yüksek affinite ile bağlayacak bir biyotanıma ajanı kullanılmış olmasıdır. Bu ajan kan örneğindeki tümöral mutasyonu dizi spesifik olarak tanıyacak CRISPR-dCas9'dur. Genetik mühendisliğinde son yıllarda büyük bir ilgiyle kullanılan CRISPR-dCas9'un impedimetrik olarak biyosensör alanında ilk defa kullanılmasıyla, varolan DNA biyosensörlerinden daha hızlı ve spesifik bir sistem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Geliştirilen bu yeni DNA biyosensör sisteminde elektrokimyanın düşük maliyet ve hassas ölçüm özelliğiyle CRISPR teknolojisinin yüksek seçiciliğinin bir araya getirilmesi hedeflenmiştir.

Kanserli dokudan dolaşıma salınan hedef ctDNA'nın CRISPR-dCas9'a bağlanmasına dayalı bu yeni ölçüm sistemi ile varolanlardan çok daha spesifik, ayrı bir ön işleme gerek duymayan, pratik, düşük maliyetli ve hızlı bir biyobelirteç tayin yönteminin geliştirilmesi söz konusudur. Bu sistem ile özellikle ctDNA yüksekliği ile seyreden meme, akciğer, kolon, pankreas gibi doku tümörlerinin tanısında, prognoz tayininde, tedaviye yanıtın izlenmesinde ve metastaz gelişimini saptamada önemli bir biyobelirtecın klinik kullanım paneline girmesi için ilk adım atılmıştır. Bu spesifik biyosensör sisteminin *in vitro* diyagnostik bir ürün olarak ülkemize kazandırılması ile global pazarda Türkiye'nin bu alandaki payına önemli bir katma değer sağlanması da amaçlanmıştır.

Genel Bilgiler

Kanser, dünya çapında morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenleri arasında olup son 20 yılda kanser tanısı alan hasta sayısı %70 oranında artmıştır (<http://www.who.int/cancer/en/>). 2012 yılında yaklaşık 14 milyon olan yeni vaka sayısının önümüzdeki 20 yıl içinde 22 milyona yükselmesi beklenmektedir (Stewart, Wild, International Agency for Research on Cancer. ve World Health Organization., 2014). Gelişmiş cerrahi seçenekler, adjuvan sistemik tedavi ve hedefe yönelik moleküllerle kanser tedavisinde son 10 yılda belirgin ilerlemeler kaydedilmiş olsa da, birçok hasta hala radyoterapi/kemoterapiye karşı direnç ya da hastalığın kontrol altında tutulamaması sonucu gelişen metastazlar yüzünden kaybedilmektedir (Valastyan ve diğerleri, 2011). Bu paradoksu açıklamaya yönelik olarak öne sürülen ve son zamanların en çok ilgi çeken konularından biri olan klonal evrim teorisi, kanser hücrelerinin gelişmesinde ve ilerlemesinde süregelen genetik değişikliklere vurgu yapmaktadır (Nowell, 1976). Gerçekten de, kanser tanısı, tedaviye yanıtın takibi, kişiselleştirilmiş tedavi seçeneklerinin değerlendirilmesi gibi tanı ve izlemdeki birçok uygulama, tümör hücrelerinin morfolojik ve/veya genetik/epigenetik özelliklerinin tayini ile şekillenmektedir (Marusyk ve Polyak, 2010). Bu tez çalışmasında da, tümör hücrelerinden salınan ve tümörle benzer genetik/epigenetik değişiklikler taşıyan dolaşımdaki serbest tümör DNA'sının (circulating tumor DNA-ctDNA) spesifik tayinine yönelik elektrokimyasal tabanlı bir biyosensör sistemi geliştirilmesine odaklanılmıştır. Çalışmada yenilikçi bir yaklaşımla ctDNA'ya afinite gösteren ve spesifik olarak bağlanan bir biyomolekül kompleksi kullanılarak tümör tanı ve izleminde yeni açılımlar yaratabilecek potansiyele sahip non-invaziv, pratik, ekonomik ve seçici bir teknik geliştirilmiştir. Bu tez, yeni tekniğin *in-vitro* optimizasyon basamaklarını ve bu optimizasyonun gerçek örneklerle doğrulanmasını da içermektedir.

İlk kez 1976 yılında Nowell tarafından ortaya atılan ve Science dergisinde yayımlanan klonal evrim teorisine göre bir tümörün ortaya çıkışı ve ilerlemesi genellikle orijinal klonda, başta somatik mutasyonlar olmak üzere gelişen genetik değişikliklere ve dengesizliğe bağlıdır (Nowell, 1976). Tümör hücreleri, hücrel morfoloji, gen ekspresyonu, metabolizma, motilite, proliferasyon ve metastatik potansiyel de dâhil olmak üzere farklı morfolojik ve fenotipik özellikler gösterir (Marusyk ve Polyak, 2010). Bu genetik dengesizlik popülasyon içerisinde daha agresif

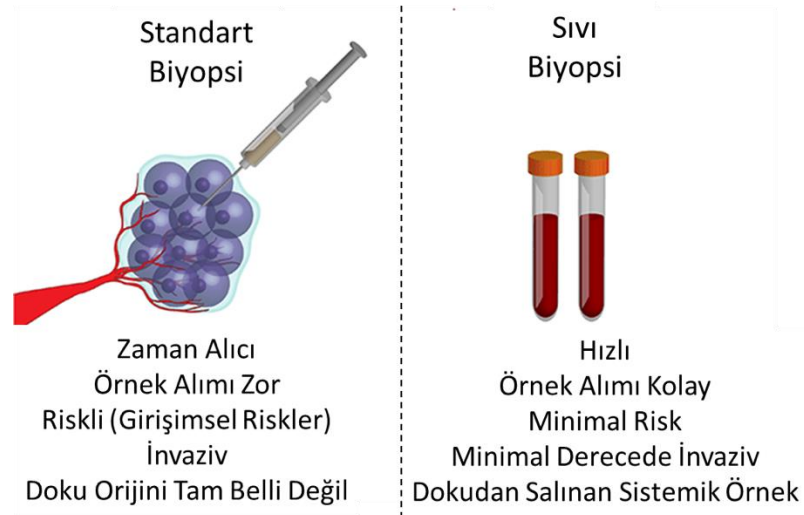
alt popölasyonların oluşmasına, çoğalmasına ve dolayısıyla da tümör içerisinde heterojeniteye (tümör içerisinde farklı mutasyonlara uğramış hücre grupları bulunması) sebep olur (Kang ve diğerleri, 2016). Çeşitli tedavi yöntemlerine karşı dayanıklı olan bu adaptif hücre klonlarının oluşumu kanserde etkili olabilecek tedavi stratejilerini tasarlamada önemli zorluklar ortaya koymaktadır (Marusyk ve Polyak, 2010). Örneğin, moleküler olarak hedeflenmiş kanser tedavileri, tümörün genomik olarak profillenmesini ve izlenmesini gerektirir, ancak geleneksel genom profillemeye yöntemleri kanser hücrelerinde meydana gelen somatik mutasyonların karakterizasyonu ve onların klonal doğasını anlamak için yeterli değildir. Bu amaca yönelik olarak, hücre popölasyonlarını DNA/RNA içeriği, yüzey antijenleri, canlılık gibi çeşitli özelliklerine göre incelememizi sağlayan akış sitometrisi ya da tümör hücrelerinin genomlarındaki DNA'nın bir kısmının mutasyon sonucu kopyalanması durumunu gösteren kopya sayısı varyantlarını analiz eden mikrodizi bazlı karşılaştırmalı genomik hibridizasyon analizleri ve yeni-nesil sekanslama yöntemleri kullanılması gerekir (Kang ve diğerleri, 2016).

Klonal evrim sadece tümörün gelişimiyle değil, aynı zamanda metastaz yoluyla ilerlemesinde de önemli rol oynar. Ruiz ve arkadaşları, primer tümörden (pankreas tümörü) ve bu tümörün sıçradığı organlardan (diyafram, akciğer, karaciğer) aldıkları biyopsi örneklerinde hem ortak bozukluklar (delesyon/amplifikasyon) hem de ortak olmayan genomik değişiklikler saptamışlardır (Ruiz ve diğerleri, 2011). Bu durum, metastaz gelişimi durumunda da, tümör hücrelerinde klonal evrimin devam ettiğini göstermekte ve tedaviye direnci açıklamaktadır.

Aslında, kanser tanı ve tedavisinde malign hücrelerin morfolojik ve/veya genetik/epigenetik özelliklerinin tayini amacıyla hücre temini, ulaşımı kolay bazı neoplazmlar (hematopoietik sistem kanserleri, cilt tümörleri...) dışında çoğu kez invaziv, morbidite riski yüksek, masraflı, zaman alıcı ve kolay tekrarlanabilir özellikte olmayan doku biyopsileri yoluyla olur (C. Bettgowda ve diğerleri, 2014). Ancak tümör kütesinin sadece bir bölümünü inceleyebilen doku biyopsisi yöntemleriyle bazı kanserleşmiş lezyonların gözden kaçması da söz konusu olabilir. Sonuçta, yukarıda bahsedilen ve doku biyopsisi gibi yöntemlerle yakalamanın oldukça zor olduğu intratümöral heterojenite nedeniyle kanser sistemik tedavileri başarısız olabilir. Bu dezavantajların yanı sıra biyopsilerin kanser ilerlemesini ve metastazını uyardığı yönündeki bulgular da göz önüne alındığında, kanser tanı ve izleminde kanser

hücrelerinin invaziv olmayan, komplikasyon riski düşük yöntemlerle temininin hem hasta, hem de hekim için çok cazip bir gereklilik olduğu ortaya çıkmaktadır (Kulaç, 2014). Bu doğrultuda, kanser hastalarının tanı ve izleminde serum tabanlı protein biyobelirteçler (örneğin, karsinoma antijen-125 (CA-125), karsinoembryonik antijen (CEA), ve prostat-spesifik antijen (PSA) kullanılsa da bu proteinlerin daha düşük düzeylerde de olsa kanser olmayan hastalarda da bulunması ya da düzeylerinin ileri evre kanser hastalarında bile bazen yükselmemesi gibi sensitivite ve spesifisite kısıtlılıkları nedeniyle sağlıklı birer biyobelirteç olarak tek başlarına kullanımları yeterli değildir (Yoshimasu ve diğerleri, 1999).

Kanser sürecinde uzak metastazların gelişimi için temel mekanizmanın hematolojik yayılım olduğu öngörüldüğünden sistemik tümör hücresi yayılımını saptamada kanser hastalarının kan örneklerinde yapılacak analizlerin arzu edilen bir yaklaşım olabileceği görülmektedir (Schwarzenbach, Hoon ve Pantel, 2011). Bu hedefe yönelik olarak 'sıvı biyopsi' olarak tanımlanan ve dolaşımdaki tümör hücreleri (circulating tumor cells-CTC), ctDNA ve hücre dışı diğer serbest nükleik asitler ile eksozomlar (Crowley, Di Nicolantonio, Loupakis ve Bardelli, 2013) gibi kan dolaşımındaki biyolojik belirteçlerin eldesini hedefleyen yöntemler son yılların büyük ilgi çeken araştırma konularındandır. Sıvı biyopsiler, doku biyopsilerinin yukarıda bahsedilen bazı dezavantajlarının (Şekil 1) üstesinden gelmek için tamamlayıcı biyobelirteçler olarak da değerlendirilmektedirler (Abbosh, Rosenberg ve Plimack, 2016; Lebofsky ve diğerleri, 2015; Schwarzenbach ve Pantel, 2015).



Şekil 1. Standart biyopsi ile sıvı biyopsinin şematik olarak karşılaştırılması

Kanser hastalarının periferik kanlarındaki CTC'ler, primer tümörden ya da metastazlardan kaynaklanabilir. Bu hücrelerin analizi, invaziv kanserin erken saptanmasında ve ileri kanser olgularının tedavisini yönlendirmede büyük fayda sağlamaktadır. Bunu destekleyen bir çalışma, metastatik meme kanseri olgularının periferik kanlarında, CTC'lerin otomatize şekilde zenginleştirilmesine ve immunohistokimyasal olarak tayinine izin veren CellSearch System (Veridex LLC, Warren, NJ, USA)'le yapılan bir çalışmada, CTC'lerin metastatik meme kanseri hastalarında önemli prognostik bilgi verdiğinin gösterilmesidir (Cristofanilli ve diğerleri, 2005).

Ayrıca, CTC'ler sağlam hücreleri morfolojik tanımlama için görsel örnek oluşturmada, metastatik süreç hakkında bilgi vermede, fonksiyonel çalışmalarda, DNA, RNA ve protein bazlı moleküler profillemeye gibi daha kapsamlı bilgilerde benzersiz fırsatlar da sağlarlar (Banys ve diğerleri, 2013). Yapılan çok sayıda çalışma dolaşımdaki tümör hücresi sayısının hastalık şiddeti (vücudun kanser yükü, ileri evre) ile ilişkisini göstermektedir. CTC izolasyon teknikleri, son yıllarda geliştirilen kompleks teknolojilerle sürekli olarak geliştirilmiş olsa da, CTC tanımlama ve karakterizasyonu hala teknik açıdan zorlayıcı olmaya devam etmektedir. CTC'lerin milyonlarca kan hücresinin arka planında olduğu düşünülürse bir tümör hücresinin dolaşımda ne kadar düşük konsantrasyonlarda olduğu anlaşılabilir. Özellikle, erken evre kanserli hastalar, aşırı derecede düşük CTC konsantrasyonuna sahiptir, bu nedenle CTC tayini için son derece hassas ve spesifik analitik yöntemlere, özenli ve kompleks konsantre etme adımlarına ve daha büyük kan hacmine ihtiyaç duyulmaktadır (Alix-Panabières ve Pantel, 2013; Pantel, Brakenhoff ve Brandt, 2008). Bütün bu zorlukların yanı sıra CTC'lerin yapısal olarak bozulmadan, yani intakt olarak elde edilmesi de büyük bir önem teşkil etmektedir. Henüz tüm dünya tarafından yaygın olarak kullanılan, kabul görmüş standart bir CTC tayin yöntemi bulunmamakla birlikte dolaşımdaki bu hücreleri boyut, yoğunluk, deformasyon özelliği veya elektrik yük gibi fiziksel özelliklerine göre ya da sitoplazmik membranlarında eksprese ettikleri antijenleri hedefleyen antikorlar kullanılması (immuno-selection) yoluyla biyolojik özelliklerine göre saptayan iki temel yaklaşım bulunmaktadır (Alix-Panabières ve diğerleri, 2014; Pantel ve diğerleri, 2010). Ancak bu yöntemler sonunda elde edilen karışımın içerisinde, kanser hücreleri yanı sıra başka hücreler de bulunabilir. Bu nedenle CTC'lerin saflaştırılması için kandan ayrıştırılan hücrelerin içerisinde malign

hücrelerin neredeyse 100% doğrulukla saptanacağı ikinci bir aşamaya ihtiyaç vardır. Bunun için hücrelerin morfolojik özelliklerine ek olarak immünolojik yöntemler (immünohistokimya, immünofloresan) kullanılabileceği gibi çeşitli moleküler yöntemler de (floresan in-situ hibridizasyon, PCR, sekanslama...) tercih edilebilmektedir (Kulaç, 2014). CTC'lerle ilgili önemli diğer noktalar da, testin yapılacağı zamanın (tanı anında, cerrahi öncesinde, tedavi sırasında...) ve test tekrar sayısının belirlenmesidir. Cerrahi işlem sırasında kana çok sayıda kanser hücresi hızla geçiş yaptığından ve hastaların bir kere taranması ile müteakip tarama arasında elde edilen sonuçların sensitivitesi arasında fark olabileceğinden klinik kullanımda bu noktalara dikkat edilmesi gereklidir.

Sıvı biyopsi kapsamında değerlendirilen diğer bir biyobelirteç olan hücre dışı nükleik asitler, hücre ya da hücre fragmanlarıyla ilişkilendirilmeyen küçük nükleik asitlerdir. CTC'lerle karşılaştırıldığında, ctDNA'nın izole edilmesi daha kolaydır ve tayin için daha duyarlı oldukları kabul görmektedir. Bu nedenle, CTC analizine bir alternatif olarak ctDNA, gelecek nesil analiz teknolojilerinin geliştirilmesi ile potansiyel olarak daha üstün genetik bilgi kaynağı sağlayabilmektedir (Kang ve diğerleri, 2016). Hücreden bağımsız bu nükleik asid parçaları ilk defa Mandel ve Metais tarafından 1948'de sağlıklı bireylerin kanlarında rapor edilmiştir (Mandel ve Metais, 1948). DNA fragmanları, hücresel döngü sırasında, lenfositlerin uyarılması gibi durumlarda ya da apoptotik ve nekrotik hücrelerin ölümü yoluyla kan dolaşımına bırakılabilirler. Normal fizyolojik koşullar altında, apoptotik ve nekrotik hücreler fagositler tarafından temizlenir ve hücre dışı DNA seviyeleri nispeten düşük görünürken bu temizleme mekanizmasının tümör kütesinde etkili olmadığı bilinmektedir (Jahr ve diğerleri, 2001; Mouliere ve diğerleri, 2011). Nitekim ctDNA düzeylerindeki yükselmenin, kanser hastalarının plazma ve serumunda sağlıklı kontrollere kıyasla daha fazla olduğunun saptanmasının ardından, ctDNA tayininin tanı amacıyla kullanılması gündeme gelmiştir (Leon, Shapiro, Sklaroff ve Yaros, 1977). Kanser hastalarında ctDNA düzeyleri % 0,01 - % 90'ın üzerinde bir orana kadar geniş bir yelpazede değişkenlik gösterir, bu durum muhtemelen tümör yükü, evre, vaskülarite, hücresel turnover ve tedaviye yanıt ile ilişkilidir (Anker, Mulcahy, Chen ve Stroun, 1999; Delgado ve diğerleri, 2013; Diehl ve diğerleri, 2008; Gormally, Caboux, Vineis ve Hainaut, 2007; Schwarzenbach ve diğerleri, 2009; Stroun ve diğerleri, 1989). Malign durumlarda, dolaşıma ctDNA'ların salınması, tümör hücresi

apoptoz/nekrozu, dolaşımdaki CTC'lerin apoptoz/lizisi ve/veya tümör hücrelerinden aktif salınım şeklinde olabilir (Friel, Corcoran, Crown ve O'Driscoll, 2010a). Kanser genom sekanslama çalışmalarından sağlanan bilgi ve birikimlerle, kanserin başlama ve gelişiminde somatik genetik değişikliklerin (tek-baz substitisyonları, insersiyonlar, delesyonlar, translokasyonlar, vb.) önemi ortaya konduktan sonra tümör hücrelerinden salınan ve benzer genetik değişiklikleri taşıyan bu yeni biyobelirtecin, minimal bir invazivlikle elde edilebilmesi, tümör tanı ve izleminde giderek önem kazanmasına yol açmaktadır.

Temelde ctDNA parçaları genomik bilgi olarak, nokta mutasyonlar (EGFR ve KRAS), yeniden düzenlenmiş genomik diziler, kopya sayısı varyasyonları, mikrosatellit instabilitesi, amplifiye diziler, heterozigotize kaybı ve DNA metilasyonunu içerir (Marzese, Hirose ve Hoon, 2013). Bu nedenle, ctDNA'yı kullanarak yapılacak kan bazlı tümör genotipleme analizlerinin kişiselleştirilmiş kanser tedavisine yön vermede büyük yarar sağlanacağı öngörülmektedir. Son yıllarda terapötik hedeflerin veya ilaçların seçimlerinde önemli tamamlayıcı bilgiler sağlayan bu biyobelirteç, kullanılan ilaçların kanser hastalarında direnç mekanizmalarını ne şekilde değiştirdiği ve ne kadar etkili olduğu konusunda da bilgi vermektedir (Kohler ve diğerleri, 2009). CTC analizine alternatif olarak, potansiyel üstünlüğe sahip bir genetik bilgi kaynağı olan ctDNA'nın izole edilmesi CTC'lere göre daha kolaydır ve bu parçalar algılama için daha duyarlıdır. Günümüzde CTC'ler ve ctDNA ayrı ayrı avantajlara sahip olsalar da kanser biyobelirteci olarak tamamlayıcı rollere de sahip olabilirler. Bu amaca uygun olarak yakın zamanda meme kanserli olgularda yapılmış bir çalışmada iki molekül birlikte tayin edilmiş ve hastalarda ctDNA düzeylerinin kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğu ($p<0.001$) görülmüştür. Yine bu çalışmada ctDNA düzeyleri ile CTC sayısının korele olduğu ($r = 0.418$, $p<0.001$) saptanmıştır (Van der Auwera ve diğerleri, 2009).

Hücre dışı DNA'yı analiz eden klasik yöntemler arasında, kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (real time polymerase chain reaction-RT-PCR) tabanlı, floresan bazlı ve spektrofotometrik tabanlı yaklaşımlar bulunmaktadır (Leary ve diğerleri, 2010, 2012). Daha yakın zamanda, ctDNA'daki jenerik değişikliklerin tanımlanmasını iyileştirmek için çeşitli dijital genomik yöntemler de geliştirilmiştir. Dijital PCR, paralel PCR için damla tabanlı sistemler, mikrokapsüllü platformlar yanında BEAMing (boncuklar, emülsiyonlar, amplifikasyon ve manyetik) adı verilen

bir yaklaşımla düşük alel fraksiyonlarındaki ctDNA'daki nokta mutasyonlarını tespit etmek için hassas bir araç olarak ortaya çıkmıştır (Diehl ve diğerleri, 2008; Dressman, Yan, Traverso, Kinzler ve Vogelstein, 2003; Higgins ve diğerleri, 2012). Günümüzde plazma DNA analizinde yeni nesil dizileme teknolojileri uygulanmaktadır. Bu yüksek verimli, düşük maliyetli dizileme teknolojileri geniş genomik bölgelerdeki yaygın ctDNA değişikliklerini tanımlar. TamSeq SafeSeq ve Ion-AmpliSeq™ gibi PCR esaslı derin dizilim ve CAPP-Seq gibi öz erişime dayalı derin diziliş de dahil olmak üzere, plazma DNA'daki belirlenmiş genomik bölgelerin analizinde hedeflenmiş derin dizilim yaklaşımları kullanılabilmektedir (Chetan Bettegowda ve diğerleri, 2014; Carreira ve diğerleri, 2014; Kinde, Wu, Papadopoulos, Kinzler ve Vogelstein, 2011; Rothé ve diğerleri, 2014). Bu yöntemlerin hepsi de örnek hazırlama adımı içermektedir.

Bu tez çalışmasında yukarıda belirtilen şekilde hali hazırda uygulanan plazmadan ctDNA eldesi ve ardışık dizileme teknolojileriyle genomik profillemesi yapılması değil, doğrudan plazmadaki ctDNA dizi farklılıklarını hedef alacak spesifik ve yenilikçi bir ölçüm yöntemi sunulmaktadır. Özellikle yüksek düzeyde ctDNA salınımı ile karakterize, ileri evre kanser olgularında var olan genetik farklılıklar böyle bir ölçüm sisteminin geliştirilmesine olanak tanımıştır. Böylelikle kanser tanı ve izleminde doku biyopsilerinin dezavantajlarını taşımayacak şekilde, minimal invaziv bir yöntemle elde edilecek kan örneklerindeki ctDNA'ların, taşıdıkları genetik değişikliklere afinite gösteren bir sistemle tayin edilmeleri mümkün kılınmıştır. Geliştirilen bu özgün sistem son derece seçici bir ölçüm olanağı sunmanın yanında, hızlı, pratik ve düşük maliyetli olma özelliği taşıyan bir biyosensör sistemidir.

Biyosensörler, bir biyolojik algılayıcı yani sadece analit molekülüne afinite gösteren enzim, reseptör, antikor, DNA veya protein molekülünün bir fizikokimyasal iletici (transdüser) üzerine immobilizasyonu ile geliştirilen analiz sistemleridir (Turner, 1987). Bu biyolojik algılayıcı ile analit molekülü arasındaki etkileşimin sonucunda ortaya çıkan sinyaller transdüser tarafından analiz sistemine iletilir ve analitin konsantrasyonuna veya varlığına bağlı oluşan sinyalin analizi ile ölçüm gerçekleştirilir. Biyosensörler üzerlerindeki biyoalgılayıcıya göre katalitik veya afinite temelli olabilmektedir (Ronkainen, Halsall ve Heineman, 2010). Katalitik ya da afinite temelli biyosensörler, transdüser tipine göre elektrokimyasal, optik veya piezoelektrik temelli olabilir. Analiz sırasında oluşan fizikokimyasal değişimlerden açığa çıkan

sinyaller elektrokimyasal ise transdüser tipi elektriksel sinyalleri algılayıcı tiptedir. Örneğin bir enzim bir substratı dönüştürdüğünde elektroaktif ürünler oluşturuyor veya elektrot yüzeyinin yük dağılımına bağlı iletkenlik değişiyorsa, bu değişimler elektrokimyasal olarak ölçülebilir. Aynı şekilde oluşan ürün optik olarak ışık soğuran veya emisyon yapan bir ürün ise optik biyosensör veya direk kuartz kristaller ile kütle ölçümü gerekiyorsa piezoelektrik biyosensörler olarak adlandırılmaktadır. Bu yöntemler içerisinde girişime en az açık ve en pratik olan, ayrıca hemen hemen her tipteki madde ortamı içerisinde ölçüm olanağı sağlayan ve daha düşük maliyetli olan sistemler, elektrokimyasal temelli biyosensör sistemleridir. Bu avantajlarından dolayı elektrokimyasal temelli biyosensör sistemleri, günümüzde bilimsel çalışmalarda da en fazla tercih edilen sistemlerdir (Wang, 2008). Ayrıca küçük ve taşınabilir olacak şekilde tasarlanabilmeleri sonucu bu sistemler kişisel kullanıma uygun olarak geliştirilebilmekte ve geniş bir alanda kullanılabilme potansiyeli taşımaktadır. Katalitik temelli biyosensör sistemlerinde bir enzim, analit molekülünü enzimatik olarak parçalar ve açığa çıkan ikincil moleküller üzerinden veya bu ikincil molekülleri ölçülebilir hale getirebilen üçüncül moleküller üzerinden ölçüm gerçekleştirilir. Afinite temelli biyosensörlerde ise biyotanıma ajanı ve analitin birbirine bağlanmasının ölçülmesi söz konusudur. Örneğin, antijen-antikor, DNA-DNA, protein-DNA veya protein-ligand bağlanma derecesinin ölçülmesi üzerinden analiz gerçekleştirilmektedir (Degefa ve Kwak, 2008; Katz ve Willner, 2003; Uygun ve diğerleri, 2018). Afinite temelli biyosensörlerde ölçüm temeli yüzeye bağlanan moleküllerin ölçülmesi olduğundan, bu etkileşimi ölçebilecek herhangi bir elektrokimyasal metod işlev görebilmektedir. Bunlar arasında da elektrokimyasal impedans spektroskopisi öne çıkmaktadır, çünkü bu yöntemle ikincil bir moleküle gereksinim duymadan sadece biyotanıma molekülü ile analit molekülü arasındaki bağlanma ölçülebilmekte ve yöntem işaretçi moleküle gereksinimi ortadan kaldırmaktadır (label-free) (Ertuğrul ve Uygun, 2016).

İmpedans (Z veya R) veya elektrokimyasal impedans spektroskopisi (electrochemical impedans spectrometry-EIS) elektrolit-elektrot arayüzünün incelenmesinde, kütle transfer oranlarının ölçülmesinde ve elektrot reaksiyonlarının analizinde kullanılan etkili bir ölçüm tekniğidir (Ertuğrul Uygun and Uygun 2013; Katz and Willner 2003). Belli potansiyelde, belirlenen iki frekans arasında elektrotun elektron transfer rezistansını ölçme temeline dayanan bu son derece duyarlı ölçüm

yöntemi sayesinde elektroaktif olmayan büyük kütledeki proteinler, antijenler çok geniş tayin aralıklarında ve çok düşük tayin sınırında bile ölçülebilmektedir (Uygun ve Sezgintürk, 2011). Yöntemde ikincil bir moleküle gerek duyulmaması, sadece iki yapı arasındaki etkileşimin ölçülmesi sayesinde diğer elektrokimyasal yöntemlere göre çok daha pratik bir şekilde tayinler yapılmaktadır.

Yukarıda da bahsedildiği gibi, biyosensör sistemlerinde biyolojik kaynaklı biyomoleküller; yani enzimler, DNA'lar, peptidler, RNA'lar gibi birçok biyolojik molekül kullanılabilir. Bu projenin en yenilikçi ve özgün yanı da, hedef ctDNA'yı bağlayabilmek için ctDNA'daki belirli bir genetik diziyi (projede hedef alınan dizi kanser gelişiminde rol oynayan özel bir mutasyondur) spesifik olarak bağlayacak bir protein-RNA kompleksi olan CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) / Cas9 (CRISPR associated system 9) protein kompleksinin biyotanıma ajanı olarak kullanılmasıdır. Böylelikle, ön işlem yapmaya gerek olmadan, tümöre özgü genetik mutasyonu taşıyan plazmadaki ctDNA'ların spesifik olarak dCas9'a bağlanmasına ve ardından EIS ile ölçümlerinin hızlı ve pratik olarak yapılmasına olanak veren bir biyosensör sistemi geliştirilmiştir.

CRISPR, ilk olarak 1987 yılında E.coli bakterisinde saptanan ve DNA'da yaklaşık 35 baz çifti uzunluğunda bir dizinin belirli aralıklarla 4-5 sefer tekrar etmesiyle oluşan 'düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri'dir (Ishino, Shinagawa, Makino, Amemura ve Nakata, 1987). 1990'larda genom dizileme teknolojilerinin gelişmesi ile bahsi geçen tekrarların başka birçok bakteri ve arkede ortaya çıkması, ardından 2005 yılında CRISPR kümelerinin aslında edinilmiş (adaptif) bir immun sistem yanıtı olduğunun öne sürülmesi bu alandaki çalışmaları hızlandırmıştır. Bu araştırmalar, gerçekten de bakterilerin, saldırısından kurtulmayı başardıkları virüslerin DNA'larından parçaları, kendi DNA'larına ekleyerek bu sayede aynı virüsün sonraki saldırılarından korunmayı sağlayan bir savunma sistemine sahip olduğunu göstermiştir. Bu yanıtta, plazmid DNA yapısındaki bu tekrarlayıcı palindromik birimlere, daha önceden yabancı DNA'ya (virüs ya da plazmid) maruz kalma sonucu ortaya çıkan kısa, 'spacer' denen DNA segmentleri (faj enfeksiyonuna daha sonra savunma sağlanabilmesi için) eklenmekte ve küçük cas (CRISPR-associated system) gen kümeleri de bu CRISPR sekanslarına komşu olarak yer almaktadır. CRISPR ile ilişkili proteinlerin genetik bilgisini içeren Cas promotor bölgesi, Cas proteininin hedef DNA'ya spesifik yönelmesini sağlayacak olan ve

hedef DNA dizisinin eşleniğini içeren bir yönlendirici RNA (guide RNA-gRNA), endonükleaz ve helikazdan oluşan çok alt birimli kompleks bir proteini sentezler (Lintner ve diğerleri, 2011; Wiedenheft ve diğerleri, 2011). Bu sayede, ‘spacer’ sekansı barındıran RNA, Cas proteinlerinin hedef ekzojen DNA’yı tanımasına ve endonükleaz aktivitesi ile kesmesine yardımcı olarak faz DNA’yı parçalamakta ve DNA enfeksiyonunu engellemektedir. Kısaca Cas promotor bölgesinin görevi, plazmid DNA dizisindeki ‘spacer’ DNA’nın işlenmesini ve olası yeni faj enfeksiyonunda önlem alınabilmesini sağlamaktır.

2013’den bu yana ise, CRISPR/Cas9 sistemiyle gRNA dizisinin canlı sistemin kendisi tarafından değil de, spesifik DNA bölgesi hedeflenerek in vitro olarak üretimi ile her DNA dizisine müdahale edilebilme potansiyelinin ortaya çıkması özellikle gen mühendisliğinde çok geniş araştırma alanlarının gelişmesine neden olmuştur. Bu sistemde, sentetik gRNA ve onunla kompleks oluşturmuş Cas9 nükleazı ile hedef hücrenin genomu son derece spesifik bir şekilde hedeflenen bölgeden kesilebilmekte, böylece uzaklaştırılmak istenen genler uzaklaştırılabilmekte ve/veya yeni genler eklenebilmektedir. CRISPR/Cas9 ile aynı anda birden fazla gen lokusuna müdahale, gen modifikasyonu ve genomik görüntüleme yapılması da mümkündür. Bu şekilde tasarlanan CRISPR/Cas genom düzenleme teknikleri tıpta ve zirai alanda (tohum zenginleştirme/çoğaltma) yaygın kullanım potansiyeline sahip olmaları nedeniyle de 2015 yılında American Academy of Advancement of Science (AAAS) tarafından yılın buluşu olarak değerlendirilmişlerdir (“<http://www.sciencemag.org/news/2015/12/and-science-s-breakthrough-year>”, 2015).

Cas9 proteini üzerinde bulunan gRNA sayesinde istenilen her DNA dizisinin hedeflenebilmesi, dolayısıyla CRISPR/Cas9’un çift zincirli DNA’yı helikaz ile ayırarak üzerindeki gRNA’nın bu ayrılmış DNA’ya komplementer olacak şekilde eşlenerek bağlanmasının son derece spesifik olması bu tez çalışmasının temel noktasını oluşturmaktadır. Çalışma bu spesifik bağlanmadan yola çıkarak özgün bir biyosensör sisteminin geliştirilmesini ve bu sistemle ctDNA analizinin label-free, hızlı, spesifik ve duyarlı bir şekilde başarıyla gerçekleştirilmesini kapsamaktadır.

Cas9 proteininin önemli katalitik bölümleri mutasyona uğratarak, DNA’yı kesen kısımların inaktive edilmesi ile endonükleaz aktivitesi olmayan modifiye edilmiş Cas9 versiyonları da üretilebilmektedir. Katalitik olarak inaktive edilmiş bu Cas9 proteinleri (deactivated Cas9, dCas9) DNA hidrolizine etki etmezler, yani hedef

DNA'yı kesmeden sadece spesifik DNA bölgesine bağlanarak gen transkripsiyon sürecine fiziksel olarak müdahale ederler (Shalem, Sanjana ve Zhang, 2015). Bu şekilde transkripsiyon inhibisyonu veya aktivasyonuna aracılık eden faktörlerle füzyon proteinleri olarak gen ekspresyonunu kontrol etmek için kullanılabilirler. Bu çalışmada da, dCas9 kullanılarak modifiye edilmiş, sgRNA-dCas9 biyoreseptörünün biyosensör yüzeyinde hedef DNA'yı yakalaması ancak dCas9'un endonükleaz aktivitesi olmaması nedeniyle hedef DNA'yı parçalamayarak afinite temelli bir bağlanmaya yol açması hedeflenmiştir.

Tez çalışmasının ana amacı bu spesifik ve yenilikçi biyosensör sisteminin geliştirilmesi olmakla birlikte sistemin *in vitro* doğrulama çalışmaları ardından *in-vivo* örneklerde de tayinlerin yapılması hedeflenmiştir. Bunun için ctDNA düzeylerinin yüksek olduğu bilinen ileri evre meme kanseri olgularının örnekleri kullanılmıştır.

Meme kanseri, kadınlarda en sık rastlanılan kanser tipi olup akciğer kanserinden sonra kanserle ilişkili kadın ölümlerinin temel nedenidir (Higgins ve diğerleri, 2012). Meme kanserine bağlı ölümlerin büyük bir çoğunluğu ise rekürren metastatik hastalık sonucu gerçekleşmektedir. Meme kanseri tanısı genellikle hastanın memesinde bir kitleyi fark etmesi ya da kontrol mamografi sırasında tesadüfen kitlenin bulunması yoluyla olsa da kesin tanı doku biyopsisiyle konur. Sonuçta, tanısal kan testleri olmadığı için, ister benign, ister malign bir kitle ile başvuran hastaların hemen hepsine biyopsi uygulanır. Bu da aslında öncelik verilmesi gereken meme kanserli olgularda çoğu zaman gereksiz gecikmelere, benign kitlesi olan olgularda gereksiz endişelere ve klinik uygulamalara ve genel sağlık sistemine gereksiz bir ek yüke neden olur (Campbell ve Ramsey, 2009). Biyopsi dokusunda yapılan gen ekspresyon analizleri, tedavi seçenekleri için yol gösterici olsa da, meme kanserinin olabildiğince erken tanısı, prognozunun tayini, terapiye yanıtın öngörülerek tedaviye devam edilmesi gereken ve gerekmeyen olguların belirlenebilmesi, neoadjuvant tedavilerden yarar görecektiklerinin yanıt verecekleri en uygun tedaviyi almaları gibi kararlarda kullanılabilecek biyobelirteç panellerine büyük ihtiyaç vardır. Şüphesiz ki, meme kanseri tanısında yardımcı olacak minimal invazivliğe sahip kan testleri meme kanseri ön tanısıyla yönlendirilen hastaların zamanında tanı almalarını sağlayacak ve bireye özgü hastalık yönetimine olanak vererek hastaların yaşam kalitesinin artmasına ve yaşam süresinin uzamasına yol açacaktır (Friel, Corcoran, Crown ve O'Driscoll, 2010b).

Meme kanseri heterojenitesi iyi tanımlanmış bir malign durum olup tek bir biyolojik belirtecin tam ve doğru olarak tanıyı kesinleştirmesi olası değildir. Moleküler profillemdeki son gelişmeler meme kanseri tümör hücrelerinin ve ilişkili genlerin tayininde belli yüzey biyobelirteçlerinin ve gen ekspresyon paternlerinin kullanılabilmesine olanak tanımıştır. Meme kanserinden kaynaklanan ölümlerin doku biyopsisi veya tümör rezeksiyonu ardından dolaşıma salınan CTC'ler ve ctDNA'ların yol açabildiği rekürren metastatik hastalık sonucu olduğu dikkate alındığında, kanser tanı ve izleminde invazivliği minimal bir tayin yönteminin klinik olarak çok avantajlı olacağı aşîkârdır (Higgins ve diğerleri, 2012; Van der Auwera ve diğerleri, 2009). Bunun yanı sıra, böyle bir yöntem, artmış kanser riski olan olguların taranarak erken tanı almalarına neden olabilecek bir potansiyele de sahiptir.

Meme kanserinde erken metastatik hastalığın tayininde, spesifik hücre yüzey belirteçlerinin ekspresyonuna bağlı CTC analizi, üzerinde çok araştırmaların yapıldığı bir alandır, ancak CTC'lerin heterojen özellikleri nedeniyle uygun bir tanı yönteminin geliştirilmesi oldukça zorlu gözükmetedir. Benzer şekilde meme kanserinde biyobelirteç olarak kullanılan 8 temel protein (izlem ve takip için kullanılan CA 15-3, CA 27-29 ve karsinoembryonik antijen (CEA), tedavi planlama için kullanılan ER, PR ve HER-2, rekürrens riskini öngörmek için kullanılan ürokinaz plazminojen aktivatör (uPA) ve plazminojen aktivatör inhibitörü 1 (PAI)-1) (Friel ve diğerleri, 2010a) bulunmasına rağmen yine de arzu edilen tanı ve izlem düzeylerine erişilememiştir.

Bilindiği gibi kanser tanı ve izleminde kullanılmak üzere bir biyobelirtecin geliştirilmesi başlıca 5 aşamada olur: 1) preklinik araştırma çalışmaları, 2) klinik analiz geliştirilmesi, 3) retrospektif longitudinal kayıt çalışmaları, 4) prospektif tarama çalışmaları, 5) tarama çalışmalarının hastalık yükünü azaltmadaki rolünü ortaya koyan kanser kontrol çalışmaları. Bu tez çalışması da, preklinik bir araştırma çalışması kapsamında olup, ileri evre meme kanserli olguların kan örneklerinde bulunan ctDNA'daki tümöre özgü epigenetik değişiklikler üzerinden yeni ve özgün bir biyosensör sistemi geliştirilmesini hedeflemektedir. Bu amaca yönelik olarak tümör tanı ve izleminde biyotanıma ajanı olarak yepyeni bir sistem olan CRISPR/dCas9 kullanılmış, ctDNA'ya spesifik bağlanan elektrokimyasal tabanlı bir afinite biyosensörü geliştirilmiş, böylelikle yukarda bahsedilen biyobelirteç geliştirme fazlarından klinik analiz geliştirilmesine olanak tanıma potansiyeli olan bir süreç başlatılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma, 01.05.2018 ile 14.03.2020 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi (EÜTF), Tıbbi Biyokimya AD Araştırma Laboratuvarında yürütülmüştür.

Kimyasal Sarf Malzemeler ve Çözeltilerin Hazırlanışı

Bu çalışma kapsamında kullanılan aşağıdaki kimyasallar; analitik grade olup Merck firmasından temin edilmiştir (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya).

- Potasyum hegzasiyanoferrat (III) ($K_3Fe(CN)_6$)
- Potasyum hegzasiyanoferrat (II) trihidrat ($K_4Fe(CN)_6$)
- Potasyum klorür (KCl)
- Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)
- Poliamidoamin 5. nesil (PAMAM-G5) dendrimer (%5'lik metanolde amin ile modifiye edilmiş etilen diamin çekirdekli olarak temin edilmiştir).
- Sistamin (Cys)
- N-hidroksisüksinimid (NHS)
- N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilendiaminkarbodiimid hidroklorür (EDC)
- 4-(2-Hidroksietil) piperazin-1-etansülfonik asit (HEPES)
- Glutaraldehit (%25)
- MS grade absolü etanol
- MS grade metanol
- Sülfürik Asit %98 (H_2SO_4)

Çözeltiler

- Fosfat Tampon: 50 mM KH_2PO_4 (toplamda 500 mL), NaOH ile titre edilerek, pH metrede pH= 6,8; 7; 7,4 olacak şekilde farklı pH'larda hazırlanmıştır.
- HEPES tampon: 50 mM HEPES (toplamda 100 mL), pH metrede pH=6,5 olacak şekilde hazırlanmıştır.
- Redoks Probu: 5 mM $K_4Fe(CN)_6$, 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 100 mM KCl ve 50 mM KH_2PO_4 karıştırılarak NaOH ile pH'sı pH metrede 7'ye ayarlanarak 500 mL olacak şekilde hazırlanmıştır.
- PAMAM-G5 çözeltisi: PAMAM çözeltisi 1 mM olacak şekilde pH=6,8 fosfat tamponu içerisinde stoktan seyreltilerek hazırlanmıştır.
- Sistamin Çözeltisi: 100 mM olacak şekilde 30 mL saf etanol içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

- EDC ve NHS çözeltileri: Her seferinde taze olarak son hacmi 1 mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Karışım halindeki konsantrasyon 4 mM EDC (Stok:8 mM) ve 1 mM NHS (Stok:2 mM) olacak şekilde, öncelikle ayrı ayrı hazırlanmış, kullanım anında aynı orada birleştirilmişlerdir.
- Glutaraldehit çözeltisi: Saf su içerisinde, % 25'lik stok çözeltiden % 5'lik olarak 10 mL olacak şekilde hazırlanmıştır.
- Sülfürik asit çözeltisi (2 M): %98'lik sülfürik asit çözeltisi 17,822 M olduğundan bu çözeltiden 8,911 kat su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.
- Yapay plazma: 4,5 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 1,6 mM MgCl₂, 2,5 mM üre, 0,1% serum albumini ve 145 mM NaCl içeren fosfat tamponu (pH=7,4).

dCas9, sgRNA ve ctDNA Çözeltilerinin Hazırlanması

Bu aşamada kullanılan tüm otomatik pipet uçları DNaz ve RNAaz free olarak temin edilmiş ve kullanılmıştır.

- dCas9 proteinleri (K140-ABM) Abm Good firmasından (Applied Biological Materials Inc. (Abm), Richmond, BC, V6V 2J5, Kanada) satın alınmıştır. dCas9 proteinleri firma tarafından gönderilen stok çözeltisi içerisinde çözölmüştür (10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 300 mM NaCl, and %50 (v/v) Gliserol). Bu çözelti 500 nM derişimde olacak şekilde 50µL'lik porsiyonlar halinde -20°C'de saklanmıştır.
- sgRNA'lar hedef PIK3CA ekzon 9 mutasyonuna spesifik olarak tasarlanmış şekilde Synthego firmasından (Synthego, U.S.A.) satın alınmıştır. sgRNA temel sekansı başında bulunan Nüklotid (N) kısımları ise hedef DNA dizisini (bizim çalışmamızda PIK3CA mutasyonu) hedeflemektedir.
- sgRNA stok porsiyonları 500 nM olacak şekilde 20 µL olarak porsiyonlanmıştır.

sgRNA Sekansı

5'NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA
AAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU
GCUUUU-3'

PIK3CA'daki somatik mutasyonlar, farklı ülkelerde farklı oranlarda tanımlansa da mutasyonların çoğunluğu PIK3CA'nın helikal alanında (ekzon 9) bulunmaktadır (Board ve diğerleri, 2010). Bu bilgi ışığında geliştirilen hedef ctDNA dizisi üzerindeki aşağıdaki mutasyonlar yer almaktadır.

Ekzon 9: G1633A, C1616G, A1634C, G1624A ***

*** Buradaki gösterimde, ilk harf yani G, C veya A mutant olmayan bazı, aradaki numara ise bu bazın bulunduğu baz dizisindeki sırasını ve numaradan sonra gelen baz kısaltması ise mutasyonda buraya gelen bazı göstermektedir ($N_1(\text{numara})N_2$ gösterimi gen dizisindeki bazların birbiri ile değişimini, (numara) da o bazın yer aldığı yeri göstermektedir).

- Hedef ctDNA dizileri ise Metabion firmasından (Metabion AGG, Planegg, Almanya) temin edilmiştir. ctDNA olarak kullanılan hedef DNA dizisi CCAGAGGGGAAAAATATGACA(N_{100}) olarak belirlenmiştir. Bu dizi hedef mutasyonların olduğu dizidir.
- ctDNA stok porsiyonları 500 nM olacak şekilde 20 µL olarak porsiyonlanmıştır.

Cihazlar

- Biyosensör geliştirilmesinde kullanılan üçlü elektrot sistemi olarak yüzey baskılı elektrotlar (screen printed electrodes, SPE) kullanılmıştır. Üçlü elektrot sisteminde, çalışma elektrotu Grafen oksit ekran baskılı elektrot (110-GPHOX) ve altın yüzey baskılı elektrot (DRP-250AT) elektrotlar Dropsens firmasından tedarik edilmiştir (Metrohm Dropsens, Oviedo, İspanya). Yardımcı elektrot olarak bu sistemin üzerinde platin elektrot ve referans elektrot olarak gümüş/gümüş körür (Ag/AgCl) elektrodu kullanılmıştır.
- Palmsens 3 potansiyostat (PalmSens B.V., Houten, Hollanda) kullanılmıştır. Döngüsel voltammetri (CV) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) ölçümleri bu cihaz ile gerçekleştirilmiştir. Bu cihazın bilgisayar ara yüzü olarak PSTrace 5.7 programı kullanılmıştır.
- Yüzey görüntülemesi için kullanılan atomik kuvvet mikroskobu (Atomic Force Microscope-AFM) ise ezAFM Nanomagnetics firmasından (NanoMagnetics Instruments Ltd. Ankara, Türkiye) temin edilmiştir.

Yöntem

Sağlıklı ve Hasta Örneklerinin Toplanması

Çalışmanın Etik Kurul onayı, EÜTF Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 26.12.2016 tarihli ve 16-12.1/48 no'lu kararı ile alınmıştır. Daha önce uzman hekim tarafından, histopatoloji değerlendirmesiyle meme kanseri teşhisi konmuş, EÜTF Genel Cerrahi Kliniği tarafından izlem altında olan ve değişik hastalık evrelerinde olmasına rağmen son 3 ayda radyoterapi veya kemoterapi görmemiş kişiler çalışma

konusunda bilgilendirilmişler, çalışmaya katılmayı kabul edenler (n=100) Gönüllü Olur formunu imzaladıktan sonra çalışmaya dahil edilmişlerdir.

Sağlıklı olgular ise gönüllü ve ulaşabildiğimiz sağlık çalışanlarından seçilmiştir, ayrıntılı anamnezde aşağıdaki dışlama kriterlerini taşımayan olgular (n=20) Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu'nu imzalamaları ardından çalışmaya alınmışlardır.

Dışlama Kriterleri

- Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu'nu imzalamayanlar
- Trombotik veya hematolojik hastalığı olanlar
- Meme kanseri dışında tümörü olanlar
- Trombosit fonksiyonunu bozan herhangi bir ilaç kullananlar
- Bilinen renal veya hepatik yetmezliği olanlar
- Kronik hastalığı olanlar
- Düzenli alkol kullananlar
- Kalp yetmezliği öyküsü olanlar
- Hipertansiyon dışında bilinen aterosklerotik bir hastalığı (geçirilmiş MI, SVO, renal arter stenozu...) olanlar
- Hemoglobın düzeylerinde düşüklük olanlar (hemoglobın<11,5 g/dl)

Hastaların kilo, boy ölçümleri, ilaç-alkol-sigara kullanımları, varsa diğer komorbiditeleri, kanser biyobelirteç test sonuçları ve tümöre ait immünohistokimyasal analiz sonuçları da her bir olgunun Bilgi Formu'na eklenmiştir.

Tüm olgulardan (20 sağlıklı gönüllü ve önceden histopatolojik olarak meme kanseri teşhisi konmuş farklı evrelerde bulunan 100 gönüllü hasta) bir kez, K₂EDTA içeren (mor kapaklı) tüplere intravenöz (2-3 cc) kan örneği alınmıştır. Bu tüpler 4 000 x rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra plazma ikiye ayrılarak, iki farklı örnek olarak, PCR ve Biyosensör analizi için -80°C'de saklanmıştır.

Biyosensörün Geliştirilmesi

Tasarlanan biyosensör sisteminde, elektrotların hazırlanması projemizin en özgün ve yenilikçi yanıdır. Burada biyotanıma reseptörü olarak kullanılan dCas9 protein kompleksi; Cas9'dan farklı olarak endonükleaz aktivitesi içermemekte, ancak üzerinde ctDNA'yı seçici bir şekilde bağlayacak yönlendirici bir molekül olan sgRNA'yı bulundurmaktadır. Bu dCas9-sgRNA kompleksinin elektrot üzerine sağlıklı

bir şekilde immobilizasyonunun sağlanması için elektrot iletkenliği ve yüzeyi de göz önüne alınarak izlenecek adımlar aşağıda belirtilmiştir.

Çalışmada kullanılan sentetik sgRNA'nın belirlenmesinde meme kanserli olgularda görülen PIK3CA geni üzerindeki mutasyonlar temel alınmıştır. Bu mutasyonların seçilmesinin sebebi ise, PIK3CA mutasyonlarının meme tümörlerinde en yaygın görülen mutasyonlardan olmasıdır (Tablo 1).

Tablo 1. Değişik tip meme kanserlerinde PIK3CA mutasyonlarının görülme sıklığının oranı (Kaynak: <https://www.mycancergenome.org/content/disease/breast-cancer/pik3ca/>)

Gen Mutasyonu	İnvaziv Meme Kanseri	Hormon Reseptör Pozitif (ER+ ve/veya PR+) İnvaziv Meme Kanseri	HER2 Pozitif İnvaziv Meme Kanseri	Üçlü-Negatif İnvaziv Meme Kanseri
PIK3CA	%26 (Saal ve diğerleri, 2005; Stemke-Hale ve diğerleri, 2008)	%34,5 (Saal ve diğerleri, 2005; Stemke-Hale ve diğerleri, 2008)	%22-31 (Saal ve diğerleri, 2005; Stemke-Hale ve diğerleri, 2008)	%8,3 (Stemke-Hale ve diğerleri, 2008)

2016 yılında Nature'da yayımlanan ve 2433 meme kanserli olgunun genetik profillemesini değerlendiren bir çalışmaya göre olguların % 40,1'inde PIK3CA mutasyonları görülmektedir (Pereira ve diğerleri, 2016). PIK3CA'daki somatik mutasyonlar, farklı ülkelerde farklı oranlarda tanımlansa da mutasyonların çoğunluğunun PIK3CA'nın helikal alanında (ekzon 9) ve kinaz alanında (ekson 20) olduğu görülmektedir (Board ve diğerleri, 2010):

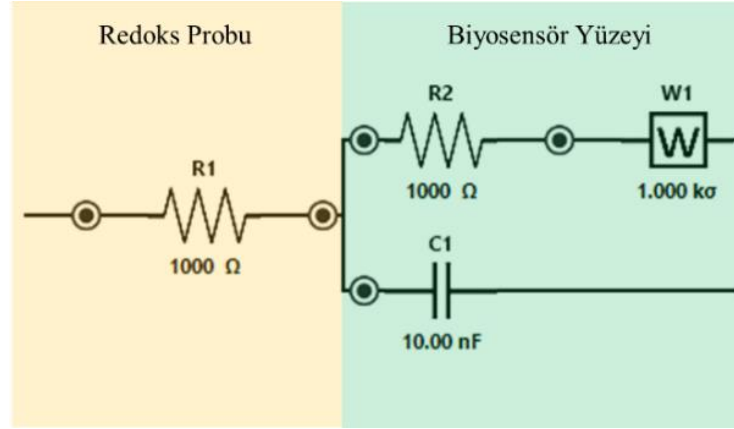
Exon 9: G1633A, C1616G, A1634C, G1624A

Exon 20: A3140G, A3140G, C3075T (Silent mutasyon)

Çalışmanın gerçekleştirilmesinde, çalışma elektrotunun türü, immobilizasyon çalışması için ana noktayı oluşturmaktadır. Bu nedenle dCas9-sgRNA biyotanıma ajanının impedimetrik olarak da doğrulanması için altın ve grafen oksit elektrotlar seçilmiştir.

Biyosensör tasarımında temel amaç dCas9-sgRNA kompleksinin bağlanması için, aktif uçlar oluşturularak elektrotların yüzeyinin uygun hale getirilmesidir. Bunun için elektrotlar öncelikle saf su ile yıkanarak yüzeylerindeki kirlilikler uzaklaştırılmıştır. Sonrasında azot gazı altında kurutulan elektrotlar, redoks probu içerisine yerleştirilerek EIS ve CV ölçümü ile elektrokimyasal yüzey karakterizasyonu yapılmıştır.

EIS için elde edilen impedans eğrileri PStace 5.7 yazılımı ile analiz edilerek hesaplanmıştır. Elektrokimyasal devre modeli olarak Randles devre modeli kullanılmıştır. Bu devre modeli Şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2. Randles devre şemasının gösterimi (elektrik akımı soldan sağa doğru gerçekleşmektedir). Modelde R1 yardımcı elektrot ile çalışma elektrotu arasında kalan çözelti direncini, R2 ise çalışma elektrotu yani kullanılan ana elektrotun yüzey direncini gösterir. W, Warburg impedansıdır, redoks probundan elektrot yüzeyine madde taşınımını temsil eder. C ise yüzeyin çift tabaka yük direncini gösterir. Impedans, bu devre modeli ile hesaplanmıştır.

EIS parametreleri olarak grafen oksit elektrot için 2.000 Hz ile 0,05 Hz arasında, altın elektrot için ise 10.000 Hz ile 0,05 Hz arasında frekans taraması yapılması aşamasında her iki elektrota 180 mV potansiyel (direct current-DC) uygulanmıştır. Frekans oluşturabilmek için alternatif akım (alternative current-AC) potansiyeli 10 mV olarak belirlenmiştir. EIS birimi ise ohm’dur.

EIS ile elde edilen veriler, Nyquist Plot şeklinde elde edilmiş ve EIS verisinin hesaplanması için devre şeması $R(C(RW))$ kullanılmıştır (Şekil 2.) (Uygun ve Ertuğrul Uygun, 2014).

CV ölçümleri ise -0,2 ile 0,5 V arasında 100 mV/sn tarama hızında gerçekleştirilmiştir.

Elektrotlar modifiye edilmeden elde edilen EIS ve CV verileri yalın elektrot sinyali olarak belirlenerek immobilizasyonun izlenmesi için bir baseline oluşturulmuştur.

A. Grafen oksit elektrot (GPHOXE) tasarımı (GPHOXE-dCas9-sgRNA modifiyeli elektrot)

- Elektrot yüzeyinde grafen oksit tabakaları bulunmaktadır. Grafen oksit tabakası üzerinde bulunan hidroksil (-OH) ve karboksil (-COOH) gruplarının aktiflenmesi ile immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Grafen oksit elektrotlar öncelikle içerisinde 2 M H_2SO_4 bulunan

çözeltiye daldırılmıştır. Ardından elektrotlara 150 saniye boyunca 1,6 V potansiyel uygulanarak Grafen-karbon tabaka aktiflenmiştir. Aktiflenen elektrot yüzeyine 50 µL EDC/NHS çözeltisi damlatılarak 1 saat nemli ortamda oda sıcaklığında bekletildikten sonra elektrot yıkanmış, ardından azot gazı akışı altında kurutularak dCas9-gRNA immobilizasyonuna hazır hale getirilmiştir.

- b) 500 nM olacak şekilde hazırlanan dCas9 çözeltisinden 50 µL elektrot yüzeyine damlatılarak nemli ortamda oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilerek immobilize edilmiş, ardından EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. Ardından elektrot yıkanıp kurutulmuştur. Sonrasında 10 µL 500 nM sgRNA çözeltisi GPHOXE/dCas9 modifiye elektrot üzerine damlatılarak 37°C'de, 1 saat bekletilmiştir, dCas9-sgRNA kompleksi oluşuktan sonra bağlanmayan sgRNA saf su ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Ardından, yüzeyin EIS ve CV ölçümleri alınarak sgRNA bağlanması elektrokimyasal olarak izlenmiştir. Böylelikle GPHOXE/dCas9-sgRNA biyosensörü ctDNA için ölçüme hazır hale getirilmiştir.
- c) Biyosensörün modifikasyon adımlarını doğrulamak için atomik kuvvet mikroskobu ile her modifikasyon için yüzey görüntüsü, yüzey histogramı ve yüzey kalınlığı belirlenmiştir.

B. Altın elektrot (AuE) tasarımı (Doğrulama amaçlı: AuE/SAM/PAMAM-dCas9-sgRNA modifiyeli elektrot)

- a) Elektrot yüzeyi kendi kendine düzenlenen tek tabaka (self-assembly monolayer; SAM) ile modifiye edilmiştir. SAM materyali olarak sistamin kullanılarak bu işlem gerçekleştirilmiştir. Altın elektrotlar bu çözeltinin içerisinde 1 saat bekletilmiştir. Bu işlemten sonra AuE sırasıyla etanol ve su ile yıkanarak bağlanmamış Cys'nin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Azot gazı ile kurutulan AuE yüzeyinde, EIS ve CV ile immobilizasyon tabakaları (SAM) kontrol edilmiştir.
- b) SAM modifiyeli AuE/Cys elektrotun yüzey alanını artırmak için elektrot amin uçlu poliamidoamin (PAMAM; 5. nesil G5) ile modifiye edilmiştir. Ancak bu işlemden önce Cys ile modifiye edilen elektrotların üzerine 50 µL %5 glutaraldehit içeren sulu çözelti

damlatılarak 30 dakika bekletilmiş ve PAMAM bağlanması için aktif aldehit uçları oluşturulmuştur. Sonrasında elektrot saf su ile nazikçe yıkanmış ve azot gazı ile kurutulmuştur.

- c) Elektrotların üzerine 20 μ L, 1 mM PAMAM içeren (pH=6,8) çözelti damlatılarak bekletilmiş, sonrasında elektrotlar saf su ile yıkanarak kurutulduktan sonra EIS ve CV ile karakterize edilmiştir. Ardından 50 μ L %5 glutaraldehit içeren sulu çözelti damlatılarak 30 dakika bekletilen elektrotlar böylece dCas9-gRNA immobilizasyonuna hazır hale gelmişlerdir.
- d) Bu işlemler sonucunda aminotiyofenol ve PAMAM ile modifiye Au elektrot hazırlanmıştır: AuE/Cys/PAMAM
- e) Bir sonraki adımda da dCas9 ve sgRNA kompleksinin elektrot yüzeyine immobilizasyonu ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir (Storici, 2014). 500 nM olacak şekilde hazırlanan dCas9 çözeltisinden 50 μ L elektrot yüzeyine damlatılarak bir gece nemli ortamda +4°C’de inkübe edilerek immobilize edilmiş, ardından EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. Ardından elektrot yıkanıp azot gazı ile kurutulmuştur. Sonrasında 10 μ L 500 nM sgRNA çözeltisi AuE/Cys/PAMAM/dCas9 modifiye elektrot üzerine damlatılarak 37°C’de 1 saat bekletilmiştir, dCas9-sgRNA kompleksi oluşuktan sonra bağlanmayan sgRNA saf su ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Ardından, yüzeyin EIS ve CV ölçümleri alınarak sgRNA bağlanması elektrokimyasal olarak izlenmiştir. Böylelikle AuE/Cys/PAMAM/dCas9-sgRNA biyosensörü ctDNA için ölçüme hazır hale getirilmiştir.

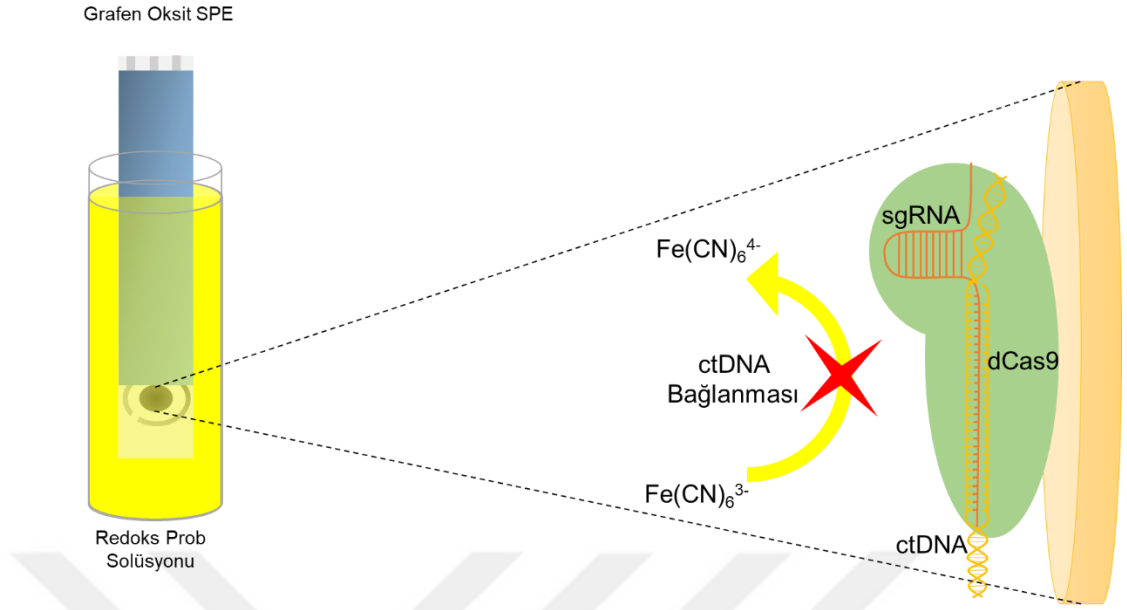
ctDNA’nın Elektrokimyasal olarak ölçülmesi

ctDNA olarak elde edilen DNA dizileri 120 baz çifti olacak şekilde ticari olarak satın alınmıştır. Bu ctDNA dizilerinin farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak dCas9-sgRNA ile modifiye edilmiş elektrot yüzeyine damlatılması ile ölçüm gerçekleştirilmiştir. ctDNA ile dCas9 üzerindeki konjugasyon bu bağlanma üzerinden izlenmiştir (Şekil 3).

ctDNA bağlanma süresi 120 bp DNA için kronoimpedimetrik olarak izlenmiştir. Kronoimpedans ölçümünde, elektrot yatay bir pozisyona getirilerek, üzerine 120 bp 20nM ctDNA damlatılmıştır, ardından, kronoimpedimetrik ölçüm

potansiyostat ile başlatılmıştır. Kronoimpedans koşulları; 200 Hz 100 mV koşullarında gerçekleştirilmiştir. Kronoimpedans eğrilerinde artış eğimini kaybedene kadar ölçüm sürmüştür ve ölçüm zamanı olarak başlangıç anından itibaren eğrinin lineer olduğu maksimum nokta ctDNA ölçüm zamanı olarak seçilmiştir.

- a. Bu ilk aşamalardan sonra kalibrasyon grafiğinin çizimi için, dCas9-sgRNA ile modifiye edilmiş elektrotların üzerine farklı konsantrasyonlarda ctDNA dizileri damlatılmıştır. Bu damlatma işleminden sonra elektrot 37°C’de bekletilerek ctDNA ile dCas9-sgRNA bağlanması işlemi yapılarak EIS ve CV ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Standart grafiğinde dikkat edilen konu bu işlemin, yani artan konsantrasyonlarda ctDNA eklenmesi sürdükçe elektrotun verdiği EIS (artış) ve CV (azalış) piklerinin değişmesidir, bu değişme durana kadar yani plato eldesine kadar işlem devam etmiş ve böylelikle linearite belirlenmiştir. Standart grafik her elektrot için birden fazla çizilerek, tekrar üretilebilirlik, regresyon katsayısı ve tekrarlanabilirlik bu eğriler ile hesaplanmıştır. Standart grafikte y ekseninde impedans (ohm), x ekseninde ise ctDNA konsantrasyonu grafiğe yerleştirilerek Excel programında standart eğrileri üretilmiştir.
- b. Bu işlemten sonra sağlıklı kişilerden kan örneklerinin içerisine miktarı bilinen ctDNA örnekleri katılarak EIS ve CV ölçümleri denenmiştir. EIS ve CV sonuçları ile standart ctDNA çözeltilerinden elde edilen veriler karşılaştırılarak matriks etkisinin ölçümlerde ne derece etkili olduğu bulunmuştur.



Şekil 3. CRISPR-dCas9 temelli biyosensörün şematik gösterimi. Elektrot yüzeyine immobilize edilen dCas9-sgRNA kompleksi DNA'yı bağladığında, impedans ölçümünde kullanılan redoks probunun elektrokimyasal dönüşümü azalır ve impedans artar.

Biyosensör optimizasyon çalışmaları

Optimizasyon çalışmalarının ilk aşamasında geliştirilen tüm biyosensörlerin modifikasyon adımları, ctDNA'ya karşı verdikleri sinyaller (EIS) ve plazma içerisine eklenen ctDNA'ya karşı elde edilen EIS verilerinden yola çıkılarak, optimum modifikasyon zamanı ve modifikasyon materyallerinin konsantrasyonu belirlenmiştir. Tekrar üretilebilirlik, tekrarlanabilirlik ve depo kararlılığı (her üç işlem de yapay plazmada denenmiştir). Tekrar üretilebilirlik optimizasyonu ise aynı yöntem ile 9 farklı biyosensörün standart grafiklerinin elde edilmesi ile gerçekleştirilmiştir.

Elektrot, yani üretilmiş biyosensör, oda sıcaklığında ve +4°C'de 10, 20 ve 30 gün süreyle saklandıktan sonra 2 nM ctDNA konsantrasyonuna karşı verdiği EIS değerleri t=0 anına göre karşılaştırılarak sinyaldeki azalma rölatif olarak verilmiş ve böylelikle depo kararlılığı belirlenmiştir.

Geliştirilen biyosensör sisteminin LOD ve LOQ değerleri de belirlenmiştir. LOD için en düşük konsantrasyonun, yani 2 nM ctDNA konsantrasyon sinyalinin standart sapmasının (S) standart grafiğin eğimine (m) oranının 3,3 ile çarpılması, LOQ'da da bu oranın 10 ile çarpılması söz konusudur (Eşitlik 1 ve 2).

$$LOD = 3,3 \left(\frac{S}{m} \right) \quad \text{Eşitlik 1. LOD değerinin Hesaplanması}$$

$$LOQ = 10 \left(\frac{s}{m} \right) \quad \text{Eşitlik 2. LOQ değerinin hesaplanması}$$

Atomik Kuvvet Mikroskobu ile Yüzey Analizi

Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) bir yüzeyin topografik olarak görüntülenmesini sağlayan bir cihazdır. Bu cihaz içerisinde bir manivela ve bu manivelanın ucunda ise sivri bir uç bulunmaktadır. Bu uç yüzeye bir atom kadar yaklaşabilecek pozisyona gelince, yüzey ile bu uç arasında bir etkileşim olarak manivelanın pozisyonu değişir. Bu değişim manivelanın diğer yüzeyine yansıtılan lazer ışığında değişimler yaratarak yüzeyin taramalı olarak topografik görüntüsünü oluşturur.

Bu tez çalışmasında da yüzey modifikasyonları elektrokimyasal yöntemler dışında, AFM ile de karakterize edilmiştir. Burada Nanomagnetics firmasından temin edilen, ezAFM cihazı ile karakterizasyon gerçekleştirilmiştir. AFM görüntülemeye parametreler aşağıdaki gibi kullanılmıştır:

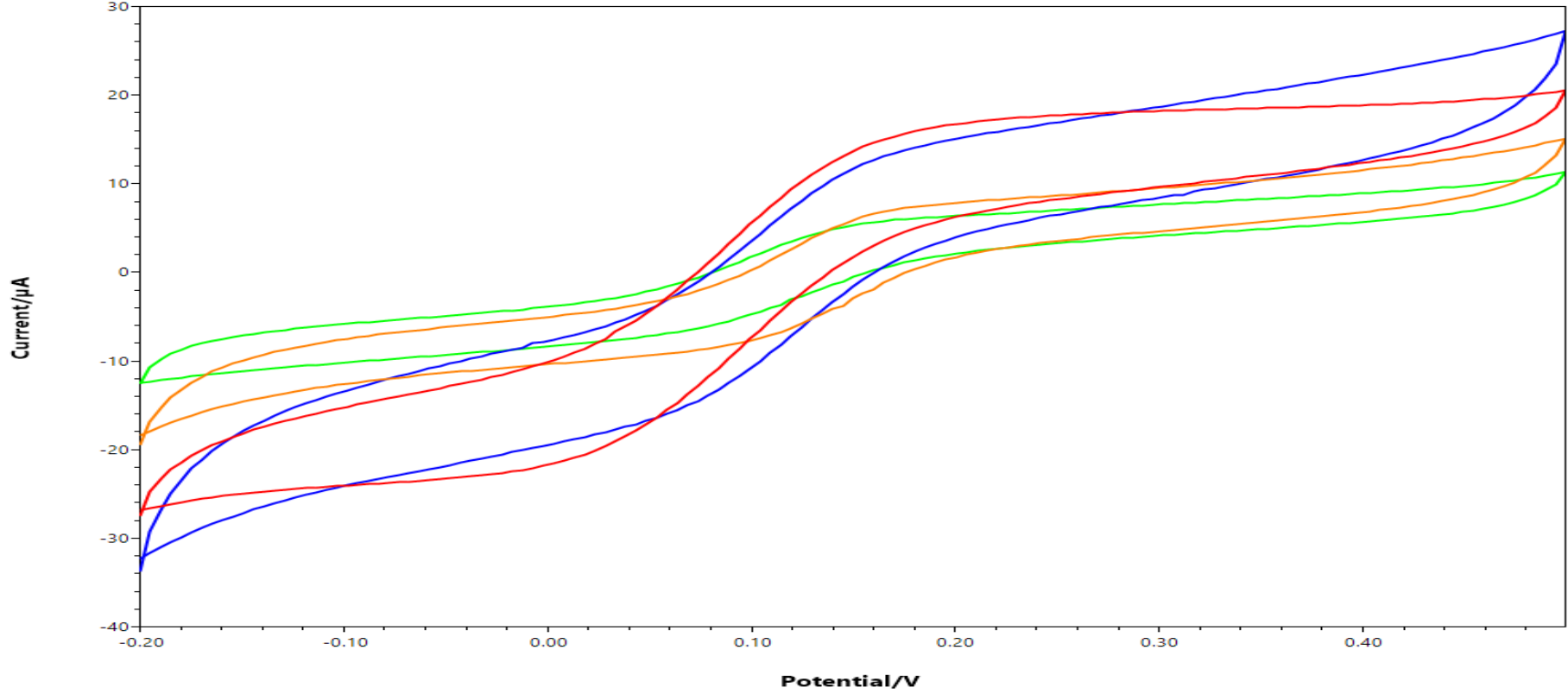
- Mod : Tapping (Hafifçe vurma) modu
- Çözünürlük (piksel) : 256 x 256
- Yazılım : Image Analyzer
- Manivela (Cantilever) : ACLA (silikon, piramid şekilli)
- Titreşim genliği : 1 V_{RMS}
- Serbest titreşim genliği : 2 V_{RMS}
- Mikroskop : ezAFM

Bulgular

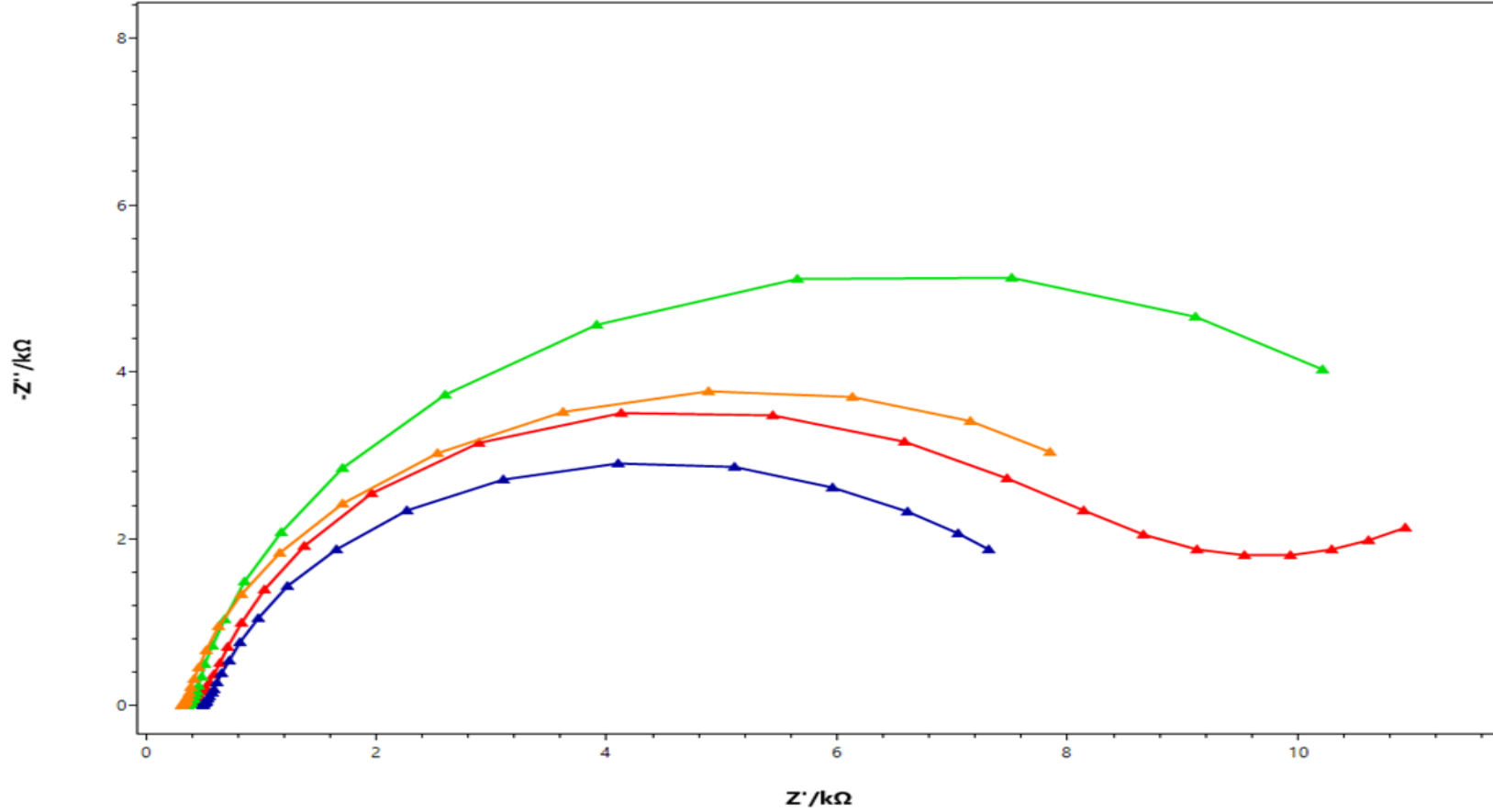
Grafen oksit elektrot ile hazırlanan CRISPR-dCas9 biyosensörü altın elektrot üzerinde farklı bir immobilizasyon metodu ile de geliştirilmiş ve sonuçlar karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Grafen Oksit Elektrot (Uygun, Yeniay ve Girgin Sağın, 2020)

Grafen oksit elektrodun modifikasyonu öncesinde dCas9 ve üzerine bağlanacak sgRNA süreleri optimize edilmiştir. dCas9 inkübasyonunda en fazla azalma 2 saat süresi sonunda olmuş, 2 saatten sonra impedansta azalma görülmemiştir. sgRNA inkübasyonunda ise, önceki çalışmalarda (Deng, Shi, Tjian, Lionnet ve Singer, 2015) 10 dakikada bağlanma süresi bildirildiğinden, maksimum bağlanma süresi olarak bir saat seçilmiştir. Bu süreler sonrasında ise elektrot modifiye edilmiştir, karakterizasyonda CV bulguları Şekil 4'te, EIS bulguları da Şekil 5'te gösterilmiştir (Şekil 4 ve 5).



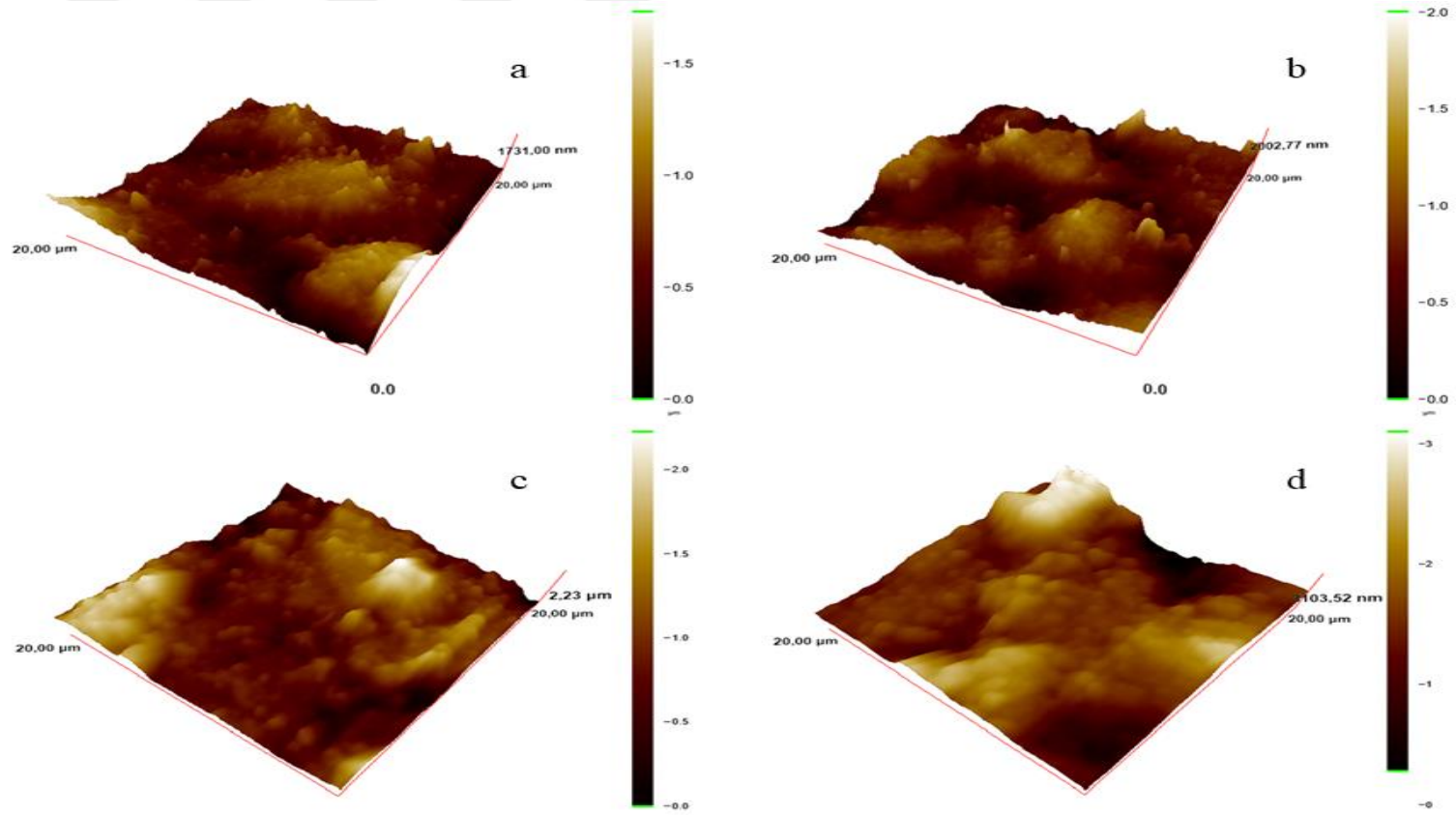
Şekil 4. dCas9 biyosensör modifikasyon adımlarının CV ile gösterimi. Döngüsel voltammogramlarda yalın grafen oksit elektrot (GPHOXE) kırmızı renkle gösterilmiştir, elektrodun dCas9 ile modifiye (GPHOXE-dCas9) edildikten sonraki mavi CV pik akımında artış, pik potansiyelinde de değişimi göstermektedir. dCas9 üzerine bağlanan sgRNA (GPHOXE-dCas9-sgRNA) ile gösterilen turuncu renkli CV’de pik akımının azaldığı görülmektedir. Son aşamada ise, ctDNA bağlayan biyosensörde (yeşil renkli CV) yine pik akımında azalma gözlenmiştir. (Kırmızı CV: GPHOXE, mavi CV: GPHOXE-dCas9, turuncu CV: GPHOXE-dCas9-sgRNA, yeşil CV: GPHOXE-dCas9-sgRNA-ctDNA modifikasyonlarını ve analizlerini temsil etmektedir).



Şekil 5. dCas9 biyosensör modifikasyon adımlarının EIS ile gösterimi. Yalın elektrot (GPHOXE) (kırmızı renk) EIS bir sinüs eğrisi yani elektron transfer direnci (Ret) (yarım çember) ve devamında ise lineer hale gelme karakteristiği gösteren Warburg impedansı yani kütle taşınım impedansı görülmektedir. Elektrot daha sonra dCas9 ile modifiye edilince (mavi EIS) görülen Ret azalmıştır, Warburg direnci ise görülmemektedir. sgRNA eklenmesi ile (turuncu EIS) impedansta Ret artmış, sonrasında ctDNA eklenmesi ile dCas9-sgRNA-ctDNA etkileşimi sonucunda (yeşil EIS) bu artış daha da belirginleşmiştir. (Kırmızı EIS: GPHOXE, Mavi EIS: GPHOXE-dCas9, Turuncu EIS: GPHOXE-dCas9-sgRNA, Yeşil EIS: GPHOXE-dCas9-sgRNA-ctDNA modifikasyonlarını ve analizlerini temsil etmektedir)

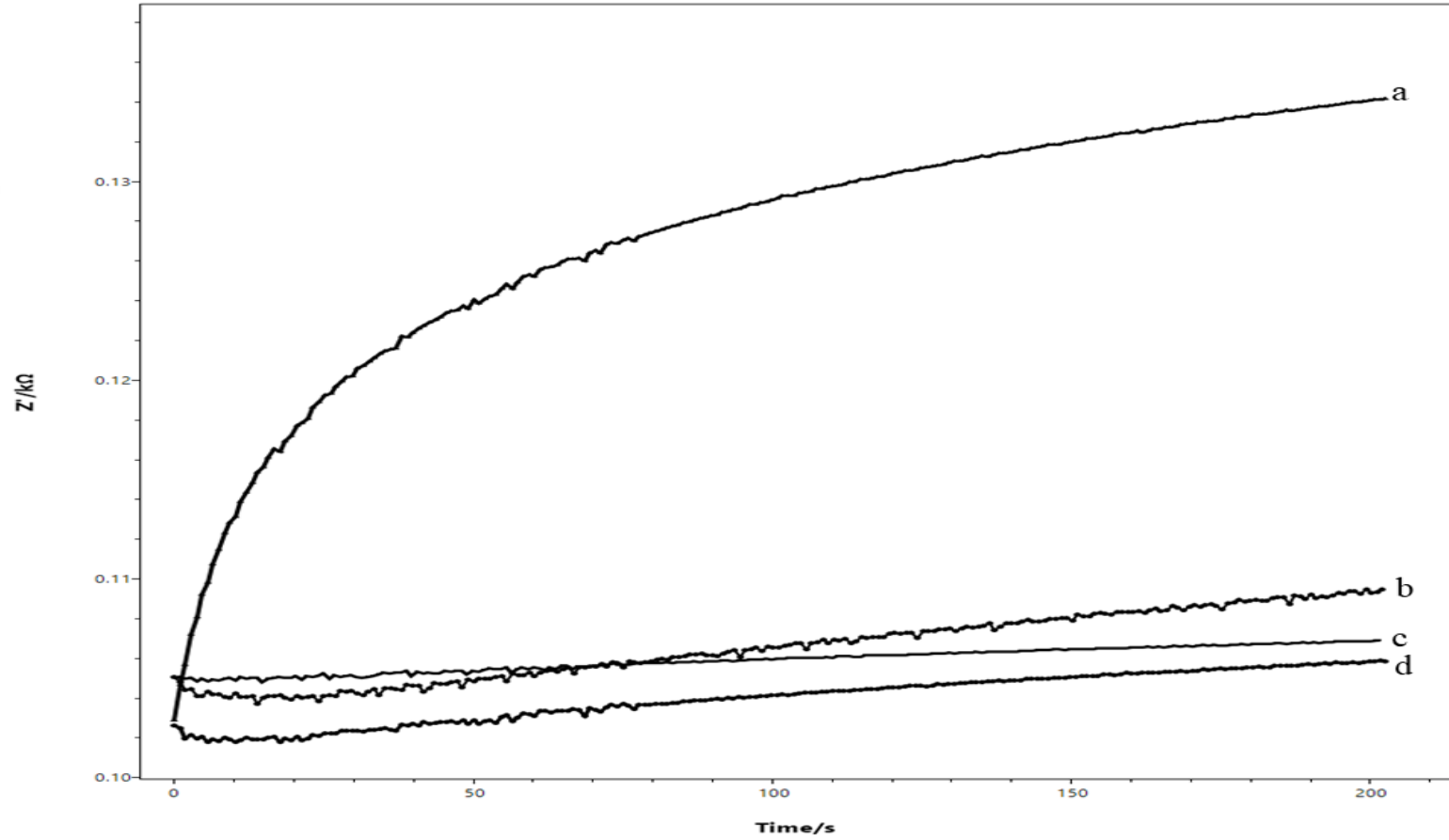
Elektrodun modifikasyon adımlarını doğrulamak için CV ve EIS yanısıra üçüncü yöntem olarak atomik kuvvet mikroskopunda elektrodun incelenmesi gerçekleştirilmiştir (Şekil 6).





Şekil 6. Grafen oksit elektrotun atomik kuvvet mikroskobu ile gösterimi. Bu şekillerde elektrot yüzey alanının 20x20 μm alan taraması yansıtılmaktadır, görsellerin altında ve yanında bulunan skalalardan yüzey kalınlığı ölçülmektedir. Şekil 6a'da GPHOXE elektrotun maksimum yüzey kalınlığı 1731 nm olarak ölçülmüştür. Daha sonrasında dCas9 ile modifiye edilen elektrot yüzeyi (Şekil 6b) 2002,77 nm olarak hesaplanmıştır, yani modifikasyonu doğrulayan şekilde bir elektrot yüzey kalınlığı artışı söz konusudur. GPHOXE-dCas9 elektrot daha sonrasında sgRNA ile modifiye edildiğinde (Şekil 6c) elektrot yüzey kalınlığı 2230 nm olarak belirlenmiştir. GPHOXE-dCas9-sgRNA ile modifiye edilmiş biyosensöre ctDNA bağlandığında (Şekil 6d) ise yüzey kalınlığının maksimum yüksekliğe ulaşıp olduğu (3103,52 nm) görülmüştür. Sonuç olarak her başarılı modifikasyon tabakasında elektrot yüzeyi artmıştır. (a; GPHOXE, b; GPHOXE-dCas9, c; GPHOXE-dCas9-sgRNA, d; GPHOXE-dCas9-sgRNA-ctDNA).

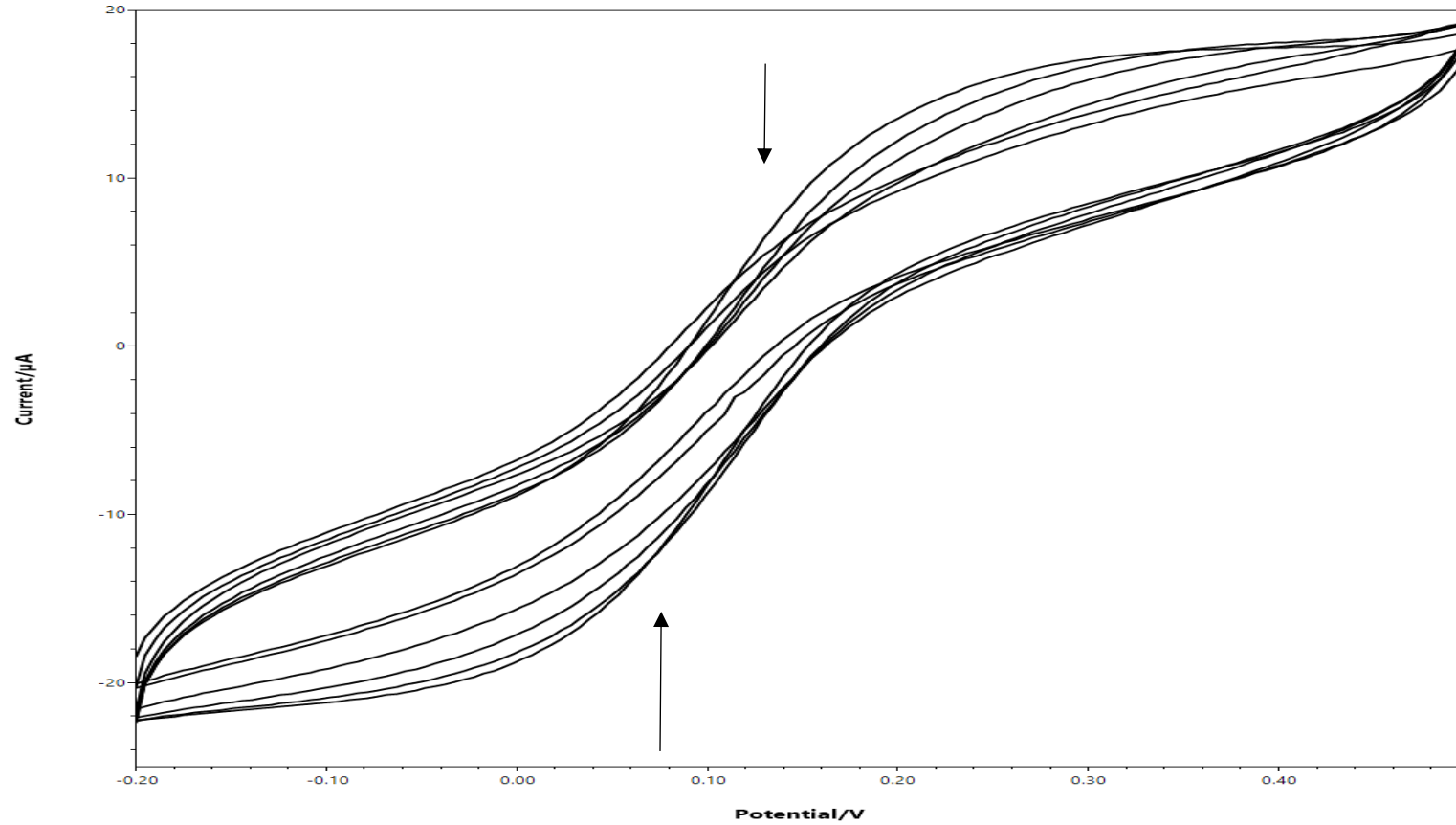
Elektrot yüzeyine bağlanan dCas9 ile sgRNA optimizasyonundan sonra elektrot yüzeyine ctDNA bağlanma süresi ve biyosensörün seçiciliği test edilmiştir. Buna göre, 120 baz çifti uzunluğundaki 20 nM ctDNA, sadece bir bazı farklı ctDNA, PIK3CA mutasyonu olmayan DNA ve ctDNA içermeyen standart çözeltiler elektrot yüzeyine damlatıldıktan sonra kronoimpedimetrik ölçüm başlatılmıştır. 200 Hz büyüklüğünde bir frekans ve 100 mV potansiyel uygulanarak gerçekleştirilen ölçüm sonuçları Şekil 7’de verilmiştir (Şekil 7). Bu kronoimpedimetrik ölçüm sonuçlarına göre biyosensörün seçiciliği net bir şekilde gösterilmiştir, çünkü PIK3CA mutasyonu olmamış DNA ve ctDNA içermeyen standart çözeltilerin impedans eğrisinde bir artış saptanmamıştır. Sadece bir bazı farklı ctDNA’da ise 200 sn boyunca çok sınırlı bir artış bulunmaktadır, buna karşın PIK3CA ctDNA ölçümü çok bariz bir lineer artışı göstermektedir. Bu eğrilerden elde edilen verilere göre, ctDNA analiz süresi 40 saniye olarak seçilmiş ve kalibrasyon grafiği bu şekilde hazırlanmıştır.



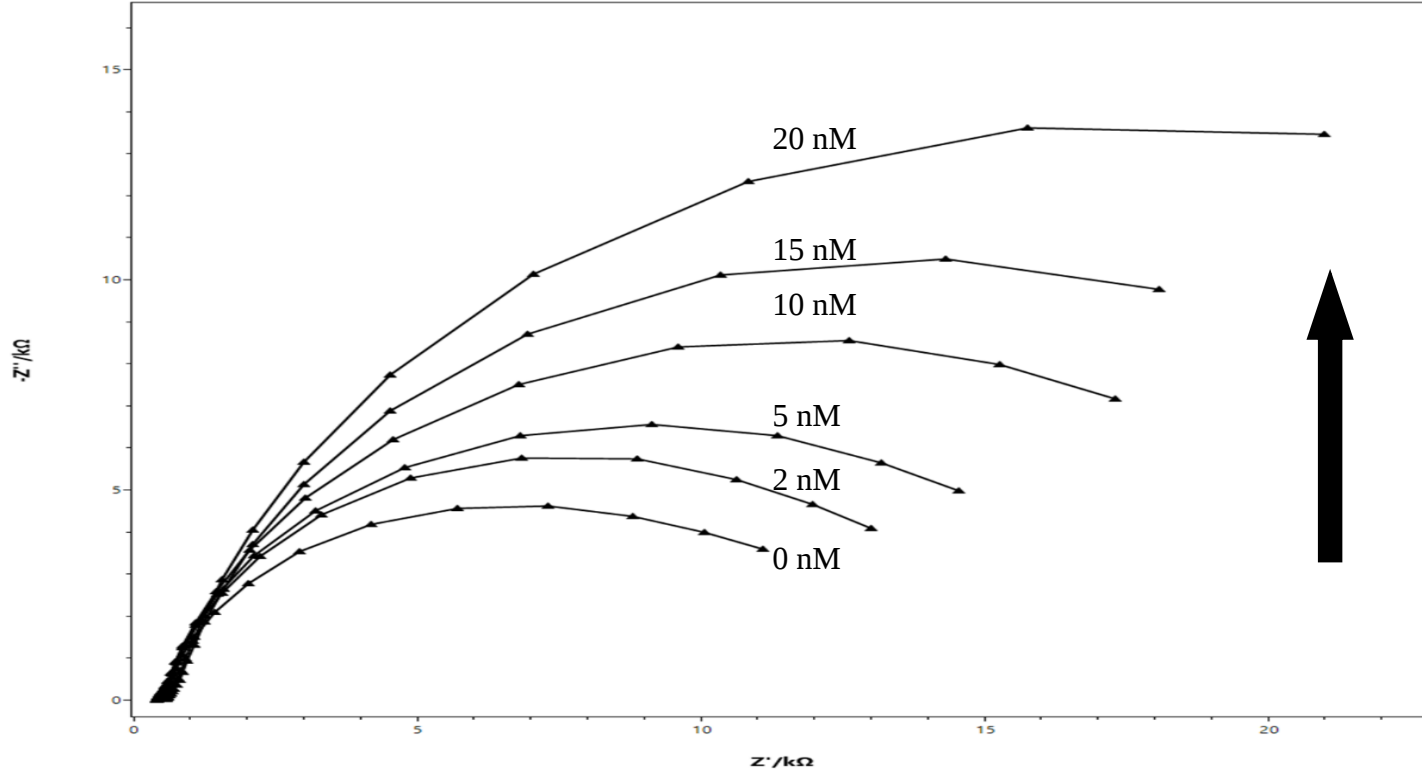
Şekil 7. ctDNA ölçümü optimizasyonunun kronoimpedans ile gösterimi. PIK3CA ctDNA eklenmesi ile başlatılan ölçümde (7a) ilk 40 saniye boyunca lineer bir artış, sonrasında ise eğrinin plato çizdiği görülmektedir. Tek baz mutasyonu içeren ctDNA verisinde (7b) ise 200 saniye boyunca yavaş bir artış görülmektedir. Wild-type yani mutasyon içermeyen DNA örneğine karşı GPHOXE-dCas9-sgRNA biyosensörünün (7c) ve DNA içermeyen standart çözeltinin (7d) verdiği zamana bağlı impedans eğrilerinde ise bir artış söz konusu değildir. (a; ctDNA, b; tek nükleotid farklı ctDNA, c; wild-type DNA, d; DNA içermeyen standart örnekler)

ctDNA inkübasyon süresi bu şekilde belirlendikten sonra GPHOXE-dCas9-sgRNA elektrot üzerine 10 μ L ctDNA damlatılmıştır. Sonrasında elektrot yıkanmış ve redoks probunda döngüsel voltammetri (Şekil 8) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (Şekil 9) gerçekleştirilmiştir. Ardından, elde edilen impedans değerleri (Şekil 9) Randles devre modeline göre hesaplanarak kalibrasyon grafiği çizilmiştir (Şekil 10). Burada lineer kalibrasyon aralığı 120 baz çiftlik ctDNA dizisi için 2-20 nM olup konsantrasyonlar sırasıyla 2, 5, 10, 15 ve 20 nM'dır.



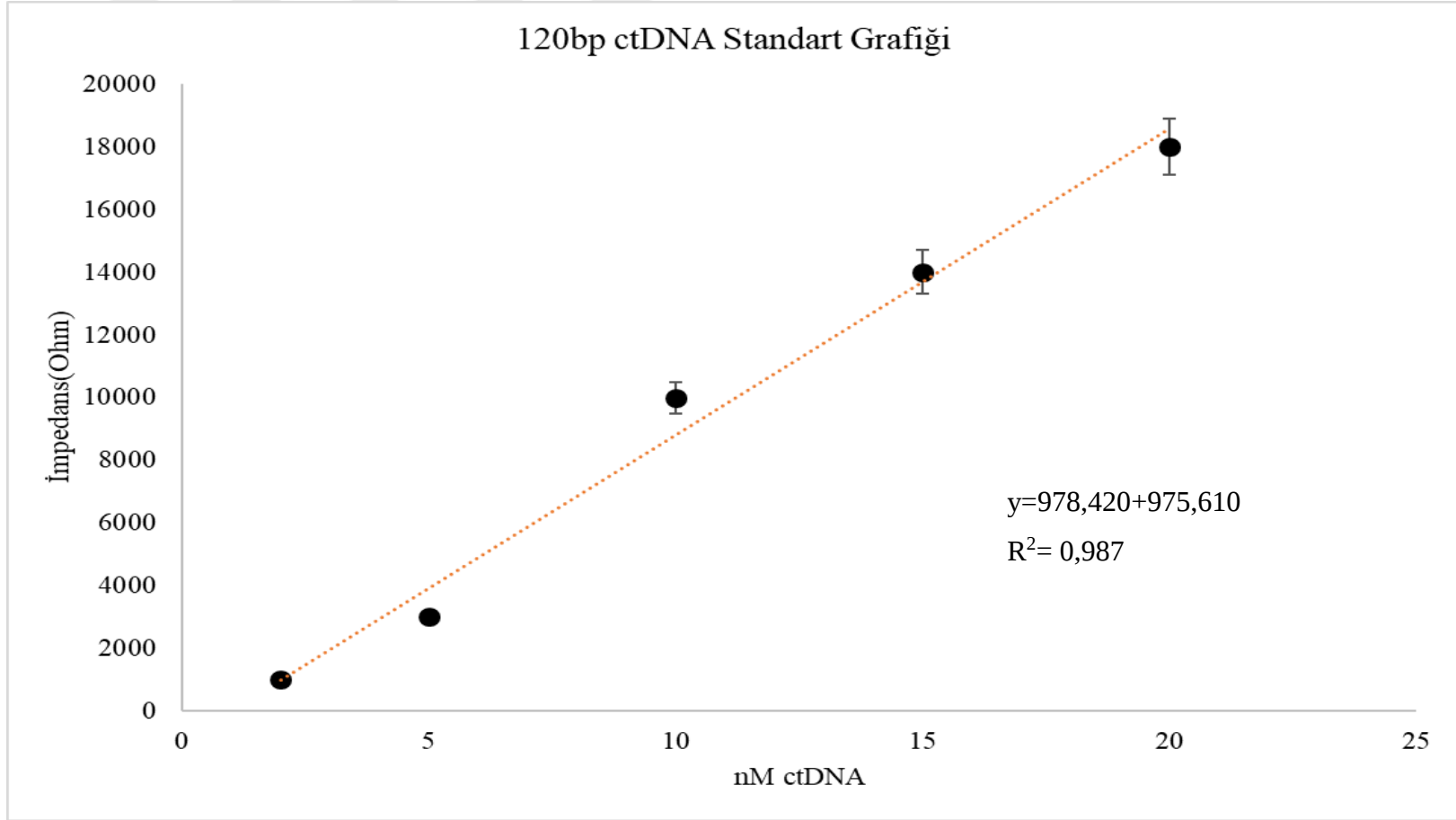


Şekil 8. Döngüsel voltammogram ile gösterilen kalibrasyon grafiği (0-20 nM). En yüksek pik potansiyeline sahip CV, 2 nM ctDNA konsantrasyonu için elde edilen voltammogramdır. Konsantrasyon arttıkça pik akımı hem ileri, hem de geri taramada düşmektedir. Pik potansiyelinde değişme ise görülmemektedir.



Şekil 9. ctDNA biyosensörünün 0-20 nM aralığındaki impedans spektrumlarının birbiri üzerinde gösterimi. Bu impedans spektrumlarında görüldüğü gibi biyosensör yüzeyi ctDNA'yı bağladıkça impedans spektrumlarında da, ctDNA konsantrasyonundaki artış ile orantılı artış meydana gelmiştir.

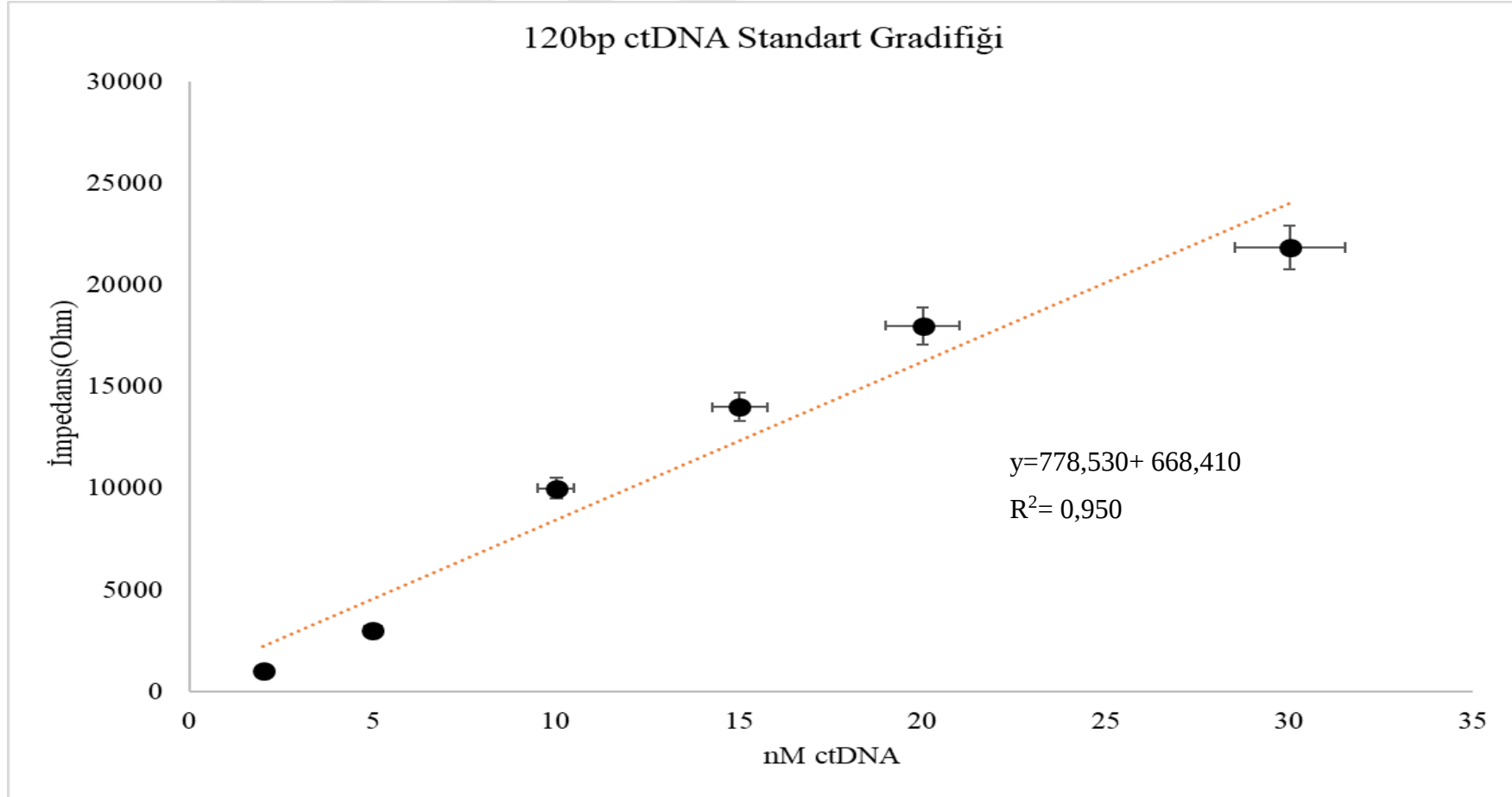
Şekil 9’da, X ekseninde gösterilen ohm birimi cinsinden impedans değerleri ctDNA konsantrasyon değerlerine karşı grafiğe geçirilerek standart grafik çizilmiştir (Şekil 10). Tekrar üretilebilirlik ve tekrarlanabilirlik özelliklerinin de hesaplanabilmesi için kalibrasyon grafiği aynı metotla dokuz defa hazırlanmıştır. Standart grafik çizilirken kullanılan Ret değerleri olarak ctDNA konsantrasyonuna karşı verilen impedans değerleri (Ret[ctDNA]) GPHOXE-dCas9-sgRNA biyosensörünün verdiği impedans değerlerinden (Ret[GPHOXE-dCas9-sgRNA]) çıkarılarak ΔRet olarak verilmiştir ($\Delta\text{Ret} = (\text{Ret}[\text{ctDNA}] - \text{Ret}[\text{GPHOXE-dCas9-sgRNA}])$). Standart grafiğinin eğri denklemi ise $y = 978,420x - 975,610$ olarak belirlenmiştir. Burada y değeri ohm cinsinden impedans değerini, x ise ctDNA konsantrasyonunun nM cinsinden değerini vermektedir. Grafiğin regresyon katsayısı ise (R^2) standart sapma (S) ile birlikte $0,987 \pm 0,004$ ($n=9$) olarak hesaplanmıştır. Grafiklerin eğimlerinin (m) de ortalaması alınarak $978,420 \pm 0,110$ bulunmuştur. R^2 aynı zamanda elektrotun yeniden üretilebilirliğini de göstermektedir.



Şekil 10. ctDNA biyosensörünün 2 nM ile 20 nM arasındaki standart grafiği. y-ekseni Ret (ohm), x-ekseni ctDNA (nM)

Şekil 11’de ise 20 nM konsantrasyon ötesinde de değerler işlenmiştir, ancak burada 20 nM derişiminden sonra linearitenin kaybolduğu görölmektedir. Dolayısıyla maksimum tayin sınırı 20 nM olarak belirtilmiştir (Şekil 11).

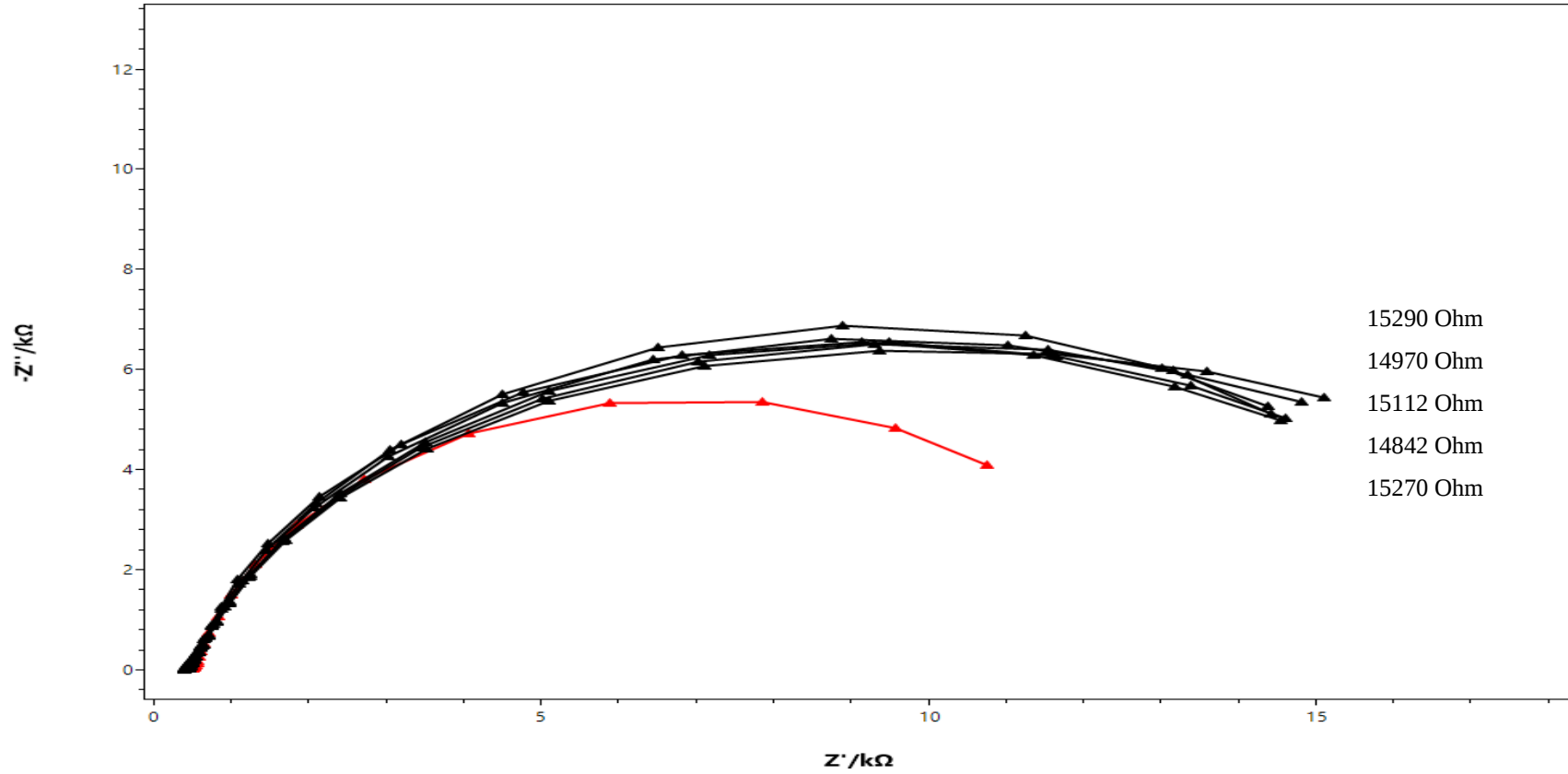




Şekil 11. ctDNA biyosensörünün 2nM ile 30nM arasındaki standart grafiği y-ekseni Ret (ohm), x-ekseni ctDNA (nM)

Standart grafiğın belirlenmesinden sonra, biyosensörün saptama sınırları, yani en düşük tayin limiti (LOD) ile en düşük tayin sınırı (LOQ) matematiksel olarak hesaplanarak test edilmiştir. 2 nM derişimdeki ctDNA konsantrasyonu 5 defa plazmaya eklenerek (standart grafiklerden bağımsız olarak) ölçülmüştür (Şekil 12). Elde edilen impedans değeriindeki standart sapma 192,720 ohm olarak bulunmuştur. Formülde standart grafiğı eğimi ortalaması olarak (m) 978,420 kullanılmıştır. Buna göre LOD için (3,3 S/m) formülü olarak hesaplanan değeri 0,650 nM, LOQ için (10 S/m) formülü olarak hesaplanan değeri ise 1,970 nM'dır.



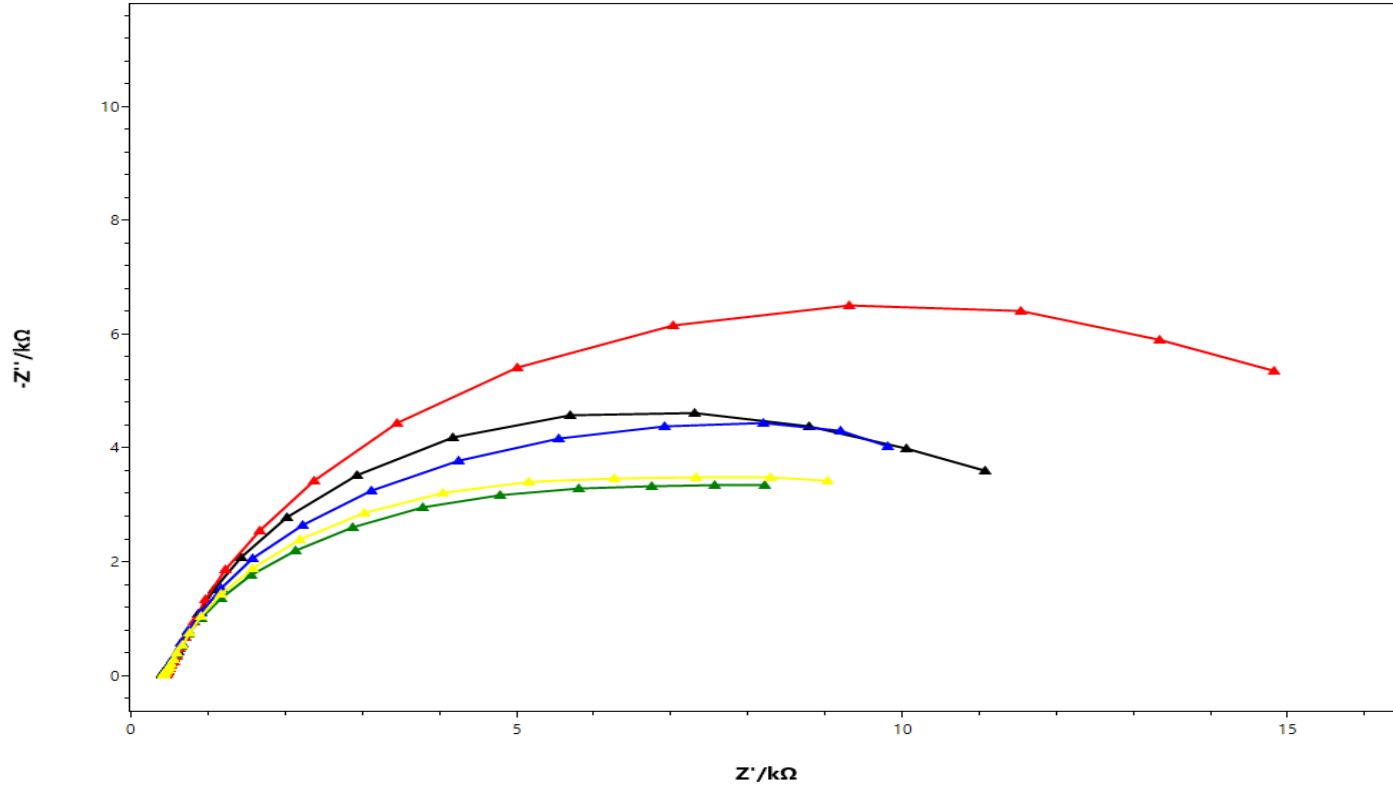


Şekil 12. Kırmızı ile gösterilen EIS GPHOXE-dCas9-sgRNA elektrotu, siyah ile gösterilenler ise 2 nM ctDNA standartının tekrarlı ölçüm sonucunda elde edilen impedans değerleridir (n=5) .

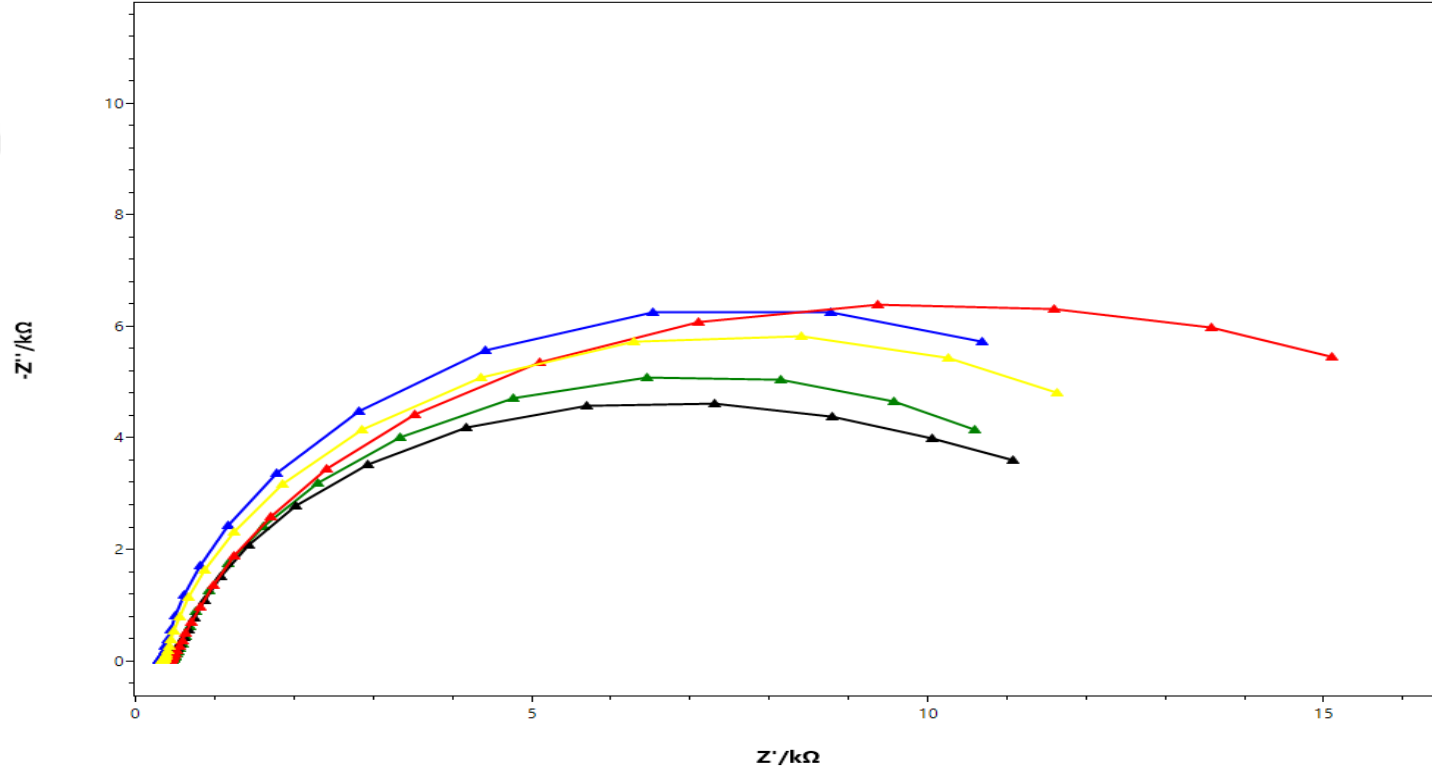
Tekrarlanabilirlik testleri, gerçek örneklerde 2 farklı plazmada gerçekleştirilmiştir. 9 nM ve 17 nM olarak bilinen standart katma ile elde edilen kan örnekleri kullanılmış ve biyosensör ile her örnek 3 farklı biyosensör ile üçer kez test edilmiştir. Bu ölçümlerin sonunda 9 nM'lık örnek $8,430 \pm 0,210$ nM, 17 nM'lık örnek ise $16,830 \pm 0,350$ nM olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar, ctDNA seviyelerinin % 96'dan fazla doğrulukla tespit edilebildiğini göstermiştir.

Geri eldenin belirlenmesi için ise hasta olmayan gerçek kan örneğine 15 nM olacak şekilde 120 bp standart ctDNA eklenmiştir. Biyosensör 15 nM ctDNA ölçümünde (n=4) % 96,53 geri elde potansiyeline ulaşmıştır (Ortalama: $14,480 \pm 0,160$ nM). Plazma matriksinin etkisi ise % 3,47 olarak hesaplanmıştır.

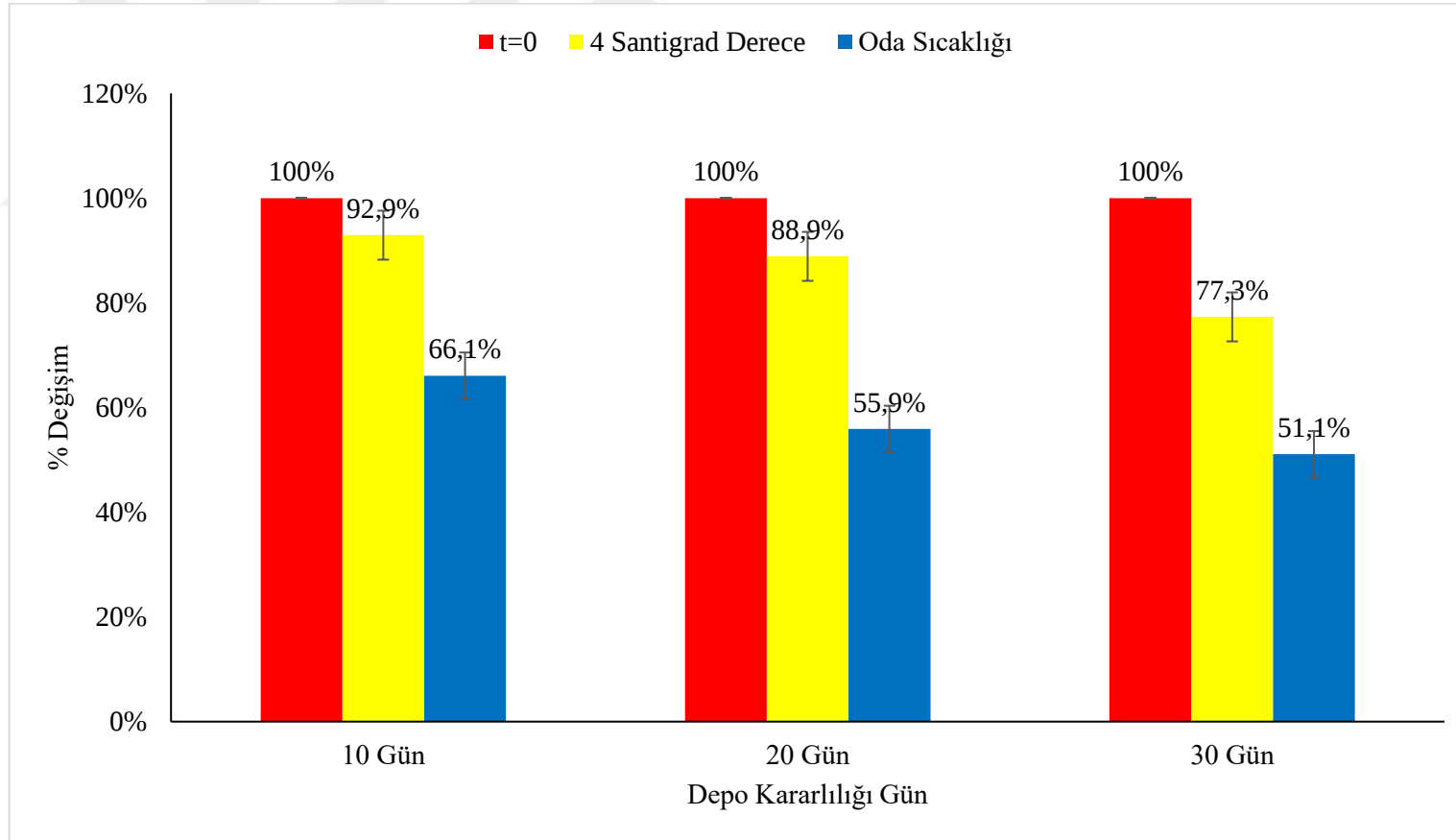
Depo kararlılığının belirlenmesi için, GPHOXE-dCas9-sgRNA ile modifiye edilmiş biyosensör oda sıcaklığında ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10, 20 ve 30 gün süreyle ($37,5^{\circ}\text{C}$ 'de sıcak su geçirilen izole bir ortam içerisindeki nemli ortamda) saklandıktan sonra 2 nM ctDNA konsantrasyonuna karşı verdiği EIS değerleri $t=0$ anına göre karşılaştırılmış ve sinyaldeki azalma rölatif olarak belirlenmiştir (Şekil 13, 14 ve 15).



Şekil 13. ctDNA biyosensörünün oda sıcaklığında bekletildikten sonra t=0, 10, 20 ve 30. gün sonunda 2 nM ctDNA ölçümüne karşı verdiği impedans değerleri ile depo kararlılığının gösterimi. Siyah renkli impedans GPHOXE-dCas9-sgRNA elektrodu, kırmızı impedans t=0, mavi impedans 10. gün sonunda elde edilen impedansı, sarı 20. gün sonunda elde edilen impedans ölçümünü ve yeşil renkli impedans ise 30. gün sonunda elde edilen impedansı göstermektedir. Bekleme süresi arttıkça impedans azalmaktadır.



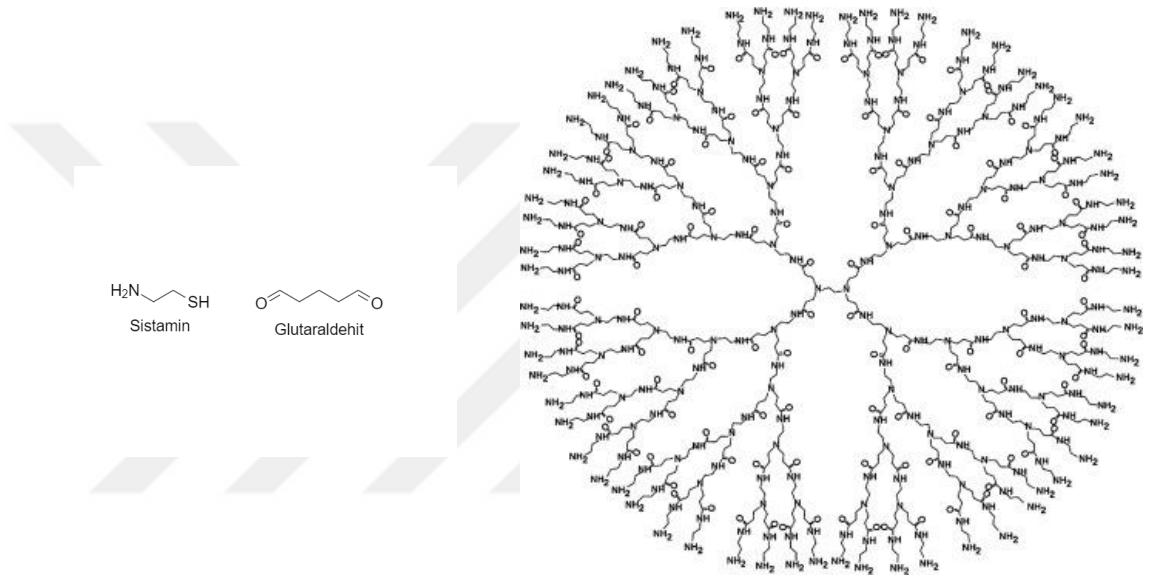
Şekil 14. ctDNA biyosensörünün +4°C’de bekletildikten sonra t=0, 10, 20 ve 30. gün sonunda 2 nM ctDNA ölçümüne karşı verdiği impedans değerleri ile depo kararlılığının gösterimi. Siyah renkli impedans GPHOXE-dCas9-sgRNA elektrotu, kırmızı impedans t=0, mavi impedans 10. gün sonunda elde edilen impedansı, sarı 20. gün sonunda elde edilen impedans ölçümünü ve yeşil renkli impedans ise 30. gün sonunda elde edilen impedansı göstermektedir. Oda sıcaklığına göre +4°C’de beklemenin neden olduğu impedans azalması daha azdır.



Şekil 15. ctDNA biyosensörünün depo kararlılığının göreceli (%) olarak gösterimi. Kırmızı sütunlar $t=0$ anını, sarı sütunlar $+4^{\circ}\text{C}$ ve mavi sütunlar oda sıcaklığında inkübe edilen biyosensörün 10., 20. ve 30. gündeki impedans değişimlerini göstermektedir.

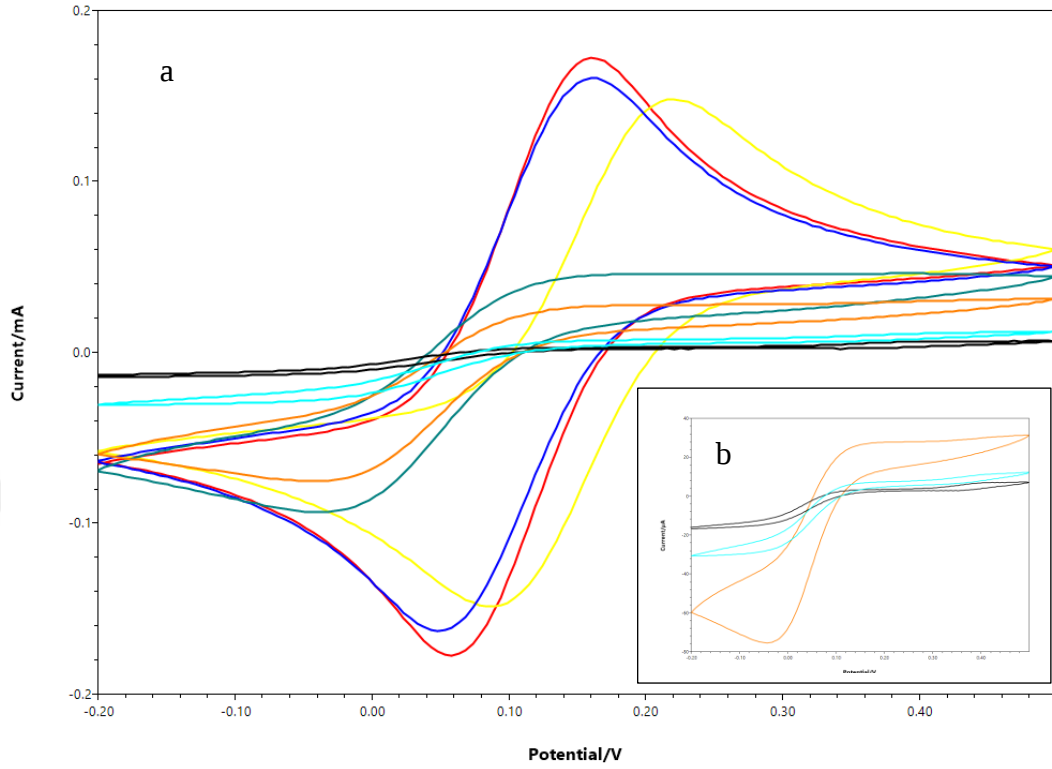
Altın Elektrot (dCas9-sgRNA Modifiyeli Biyosensörün Çalışırılığının Doğrulanması)

Altın elektrot ile gerçekleştirilen metotta ise grafen oksit metoduna alternatif farklı bir immobilizasyon denenerek, yine dCas9-sgRNA ile modifiye edilmiş farklı bir biyosensör geliştirilmiştir. Burada amaç grafen oksit metodunu doğrulamaktır. Bu nedenle yapılan işlemlerle, modifikasyon, standart grafik çizimi, tekrar üretilebilirlik, seçicilik ve performans parametreleri belirlenmiştir. Altın elektrot ve immobilizasyon için kullanılan materyallerin kimyasal yapısı Şekil 16’da gösterilmiştir.



Şekil 16. Sistamin, glutaraldehit ve PAMAM-G5’in kimyasal gösterimi

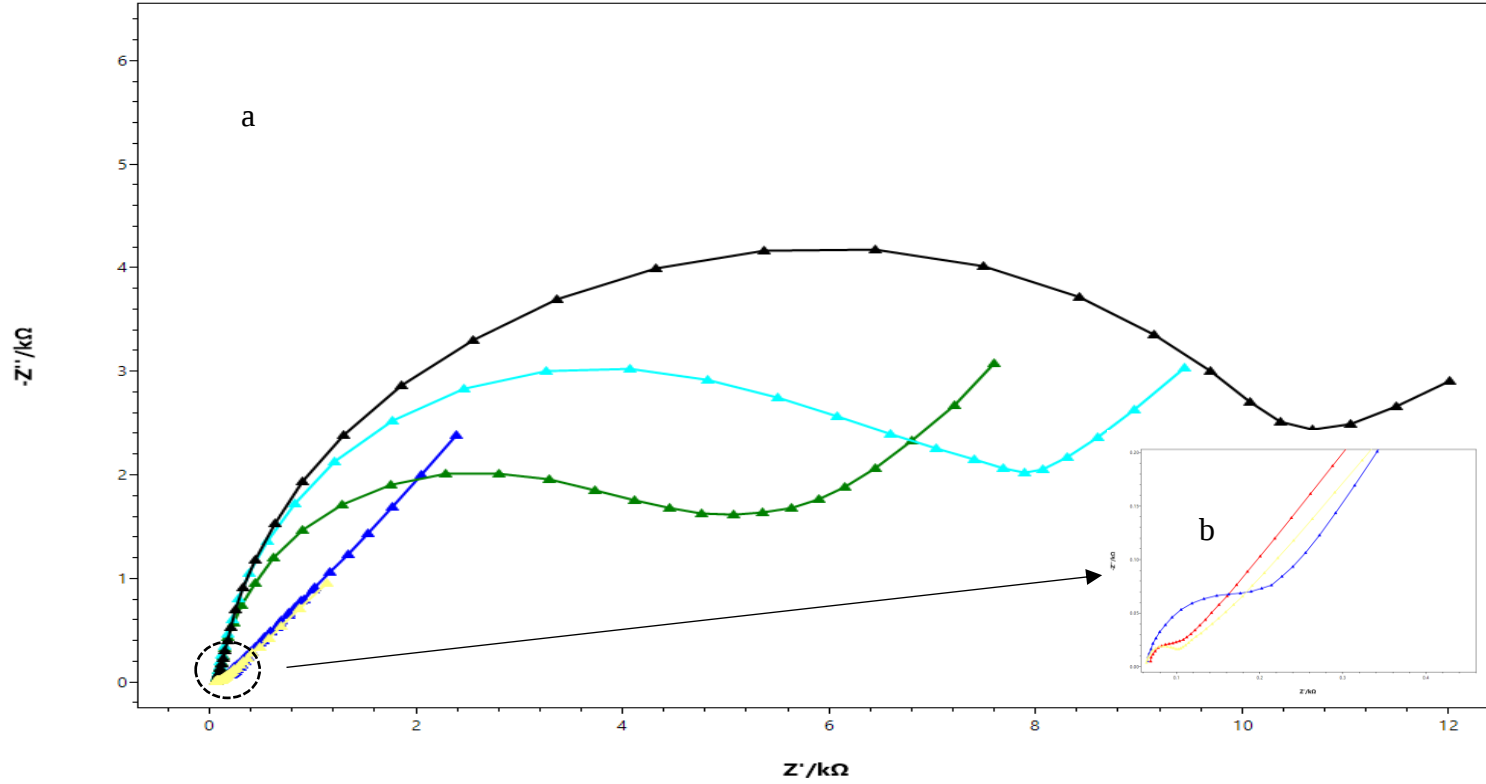
Altın elektrot (AuE) önce 100 mM sistamin (Cys) çözeltisi içerisinde iki saat bekletilerek, kendi kendine düzenlenen tek tabakalar oluşturulmuştur (AuE-Cys). Ardından PAMAM bağlanması için elektrot önce 30 dakika, % 5’lik glutaraldehit çözeltisinde sonrasında 1 saat PAMAM (AuE-Cys-PAMAM) çözeltisinde inkübe edilmiştir. PAMAM uçlarının dCas9 bağlaması için % 5’lik glutaraldehit içerisinde 30 dakika bekletildikten sonra elektrot $+4^\circ\text{C}$ ’de gece boyu dCas9 ile inkübe edilmiştir (AuE-Cys-PAMAM-dCas9). Sonrasında bu elektrot yüzeyine pH=7,4 fosfat tamponu içerisinde 1 M glisin amino asiti damlatılarak dCas9 bağlamamış aktif PAMAM uçları glisin ile bloke edilmiştir. Ardından AuE-Cys-PAMAM-dCas9 elektrot üzerine sgRNA damlatılarak ctDNA ölçümü için biyosensör hazır hale getirilmiştir. Tüm bu immobilizasyonu adımları Şekil 17 ve Şekil 18’de gösterilmiş ve işlemler redoks probu içinde CV (Şekil 17) ve EIS (Şekil 18) ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 17. ctDNA biyosensör modifikasyon adımlarının CV ile gösterimi, a ile gösterilen şekil tüm modifikasyonu, b ile gösterilen ise a şeklinde ayrıntılı gösterilmeyen CV verilerini göstermektedir. Kırmızı ile gösterilen CV AuE'yi temsil etmektedir. Elektrodun Cys ile modifikasyonu (AuE-Cys) sonrasında pik akımında artış ve pik potansiyelinde değişim sarı renkli CV'de izlenmektedir. PAMAM ile modifiye edilen elektrodun (AuE-Cys-PAMAM) mavi olarak gösterilen CV'sinde ise pik akımında azalma gözlemlenmiştir, pik potansiyeli yine aynı düzleme gelmiştir. Bu işlemten sonra elektrot yüzeyi modifiye edildikçe, pik akımında azalma izlenmektedir: dCas9 ile modifiye edilen elektrot (AuE-Cys-PAMAM-dCas9) yeşil renkli CV'de, glutaraldehit ile aktifleştirilmiş uçların kapatılması için kullanılan glisinle elde edilen turuncu renkli CV, sgRNA ile kompleks oluşturan dCas9 elektrodunun açık mavi renkli CV ve en sonunda da ctDNA bağlayan elektrodun (AuE-Cys-PAMAM-sgRNA-ctDNA) siyah renkli CV olarak görülmektedir (Kırmızı: AuE, Sarı: AuE-Cys, Mavi: AuE-Cys-PAMAM, Yeşil: AuE-Cys-PAMAM-dCas9, Turuncu: AuE-Cys-PAMAM-dCas9 elektrotun glisin ile açığındaki PAMAM uçlarının bloke edilmesini, Açık mavi: AuE-Cys-PAMAM-dCas9-sgRNA, Siyah: AuE-Cys-PAMAM-sgRNA-ctDNA).

Şekil 18’de ise yukarıda belirtilen modifikasyon adımlarının EIS ile gösterimi verilmiştir. Görüldüğü gibi, AuE sistemin ile kaplandığında impedans değeri düşmektedir. Ardından PAMAM ile modifiye edilen AuE-Cys elektrotta impedans bir miktar artmakta, fakat baskın bir Warburg impedansı görülmektedir. dCas9, sgRNA ile modifikasyon sonucunda ve ctDNA’nın dCas9-sgRNA üzerine bağlanması ile impedans artışları sırasıyla, yeşil, açık mavi ve siyah olarak görülmektedir.

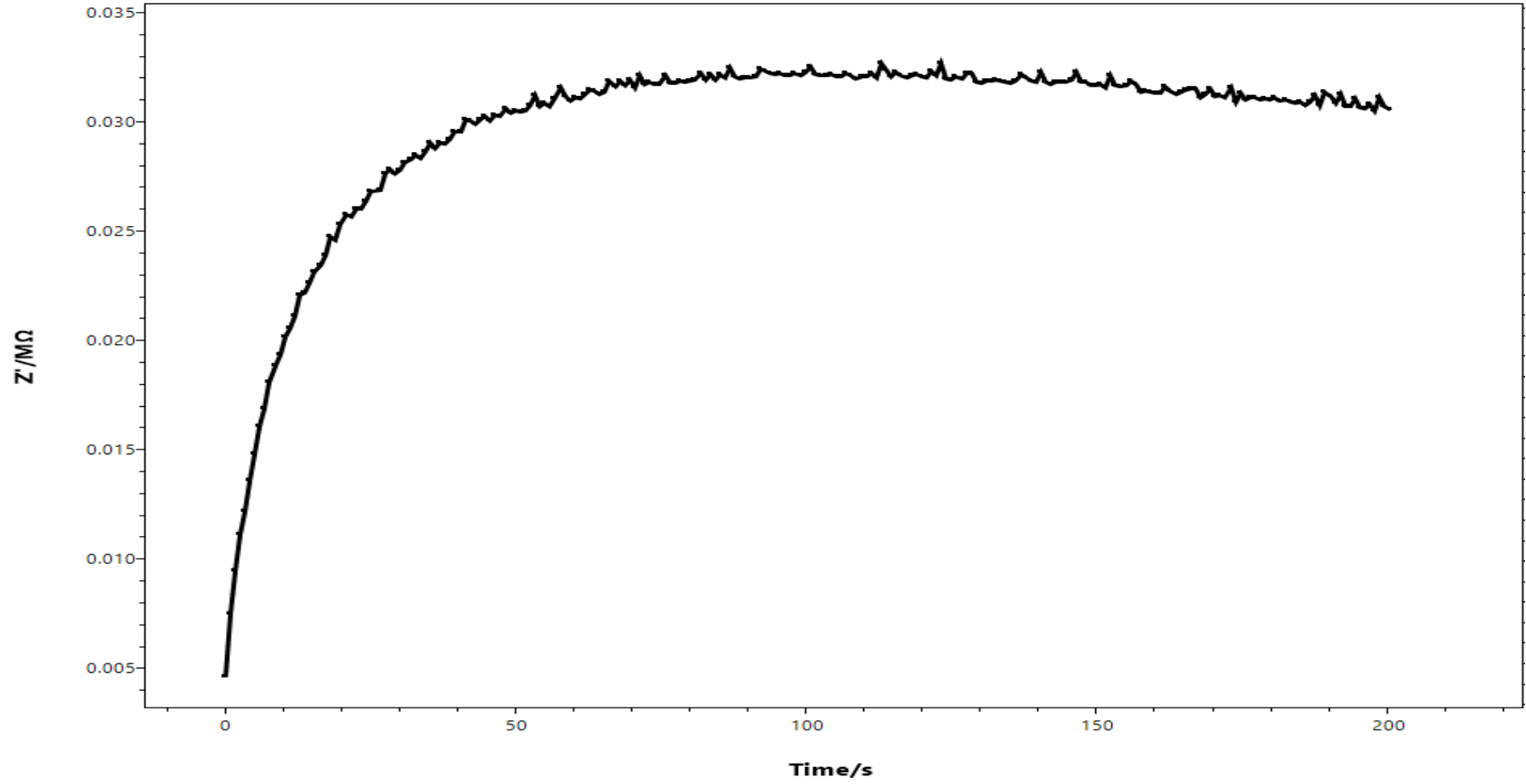




Şekil 18. ctDNA biyosensör modifikasyon adımlarının EIS ile gösterimi. (Kırmızı: AuE, Sarı: AuE-Cys, Mavi: AuE-Cys-PAMAM, Yeşil: AuE-Cys-PAMAM-dCas9, Turuncu: AuE-Cys-PAMAM-dCas9 elektrotun glisin ile açığındaki PAMAM uçlarının bloke edilmesini, Açık mavi: AuE-Cys-PAMAM-dCas9-sgRNA, Siyah: AuE-Cys-PAMAM-sgRNA-ctDNA). (a ile gösterilen EIS tüm modifikasyon adımlarının, b ile gösterilen EIS ise glisin, sgRNA ile modifikasyon ve biyosensörün ctDNA bağlamasının ayrıntılı gösterimidir).

Geliştirilen biyosensörün ctDNA bağlama süresi kronoimpedimetrik olarak test edilmiş ve Şekil 19’da gösterilmiştir. Artış hızı yaklaşık 25 saniye boyunca lineer seyretmiş, sonrasında ise yavaşlamıştır. Bu veriler doğrultusunda inkübasyon süresi 25 saniye olarak seçilmiştir.

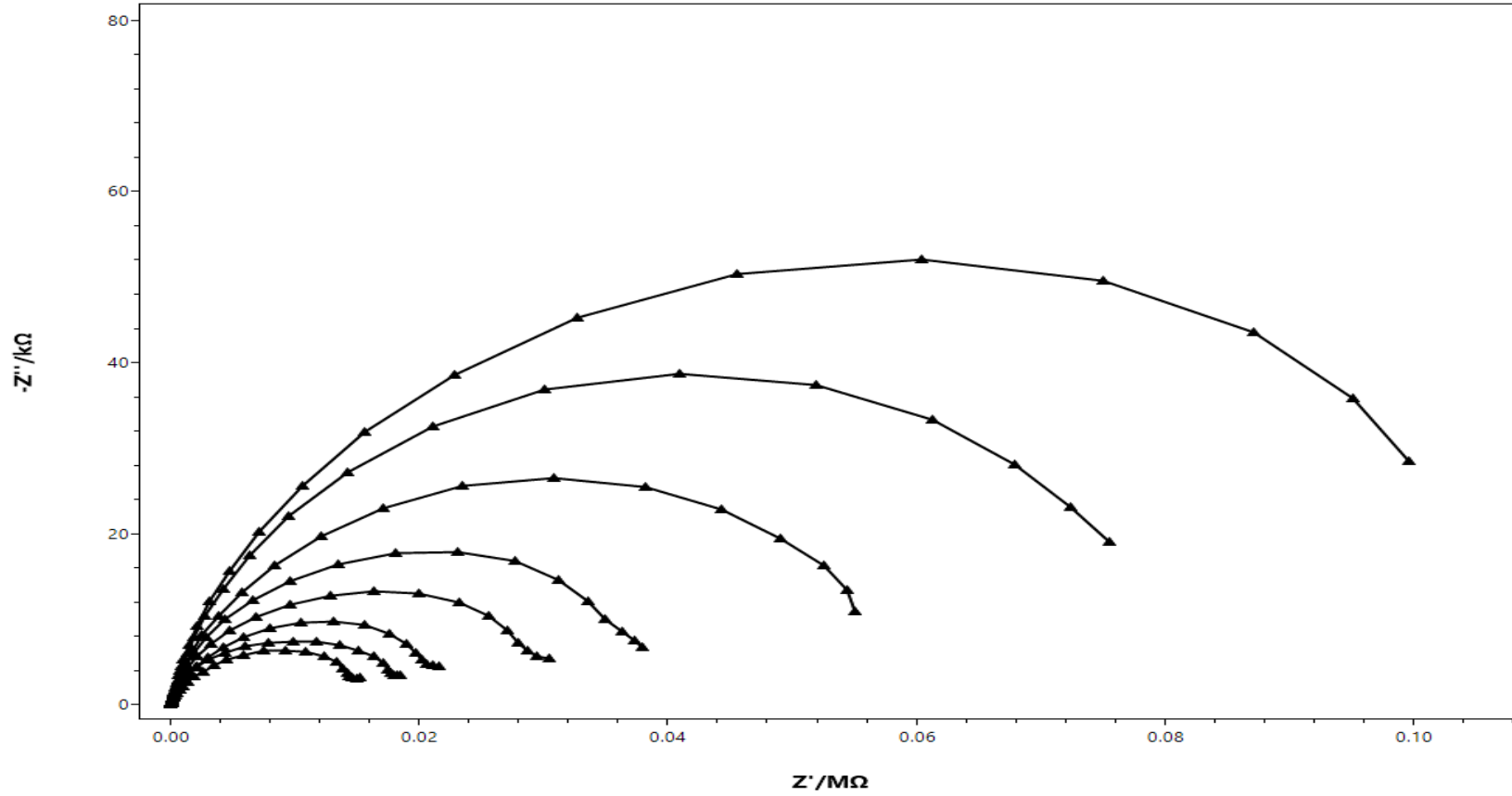




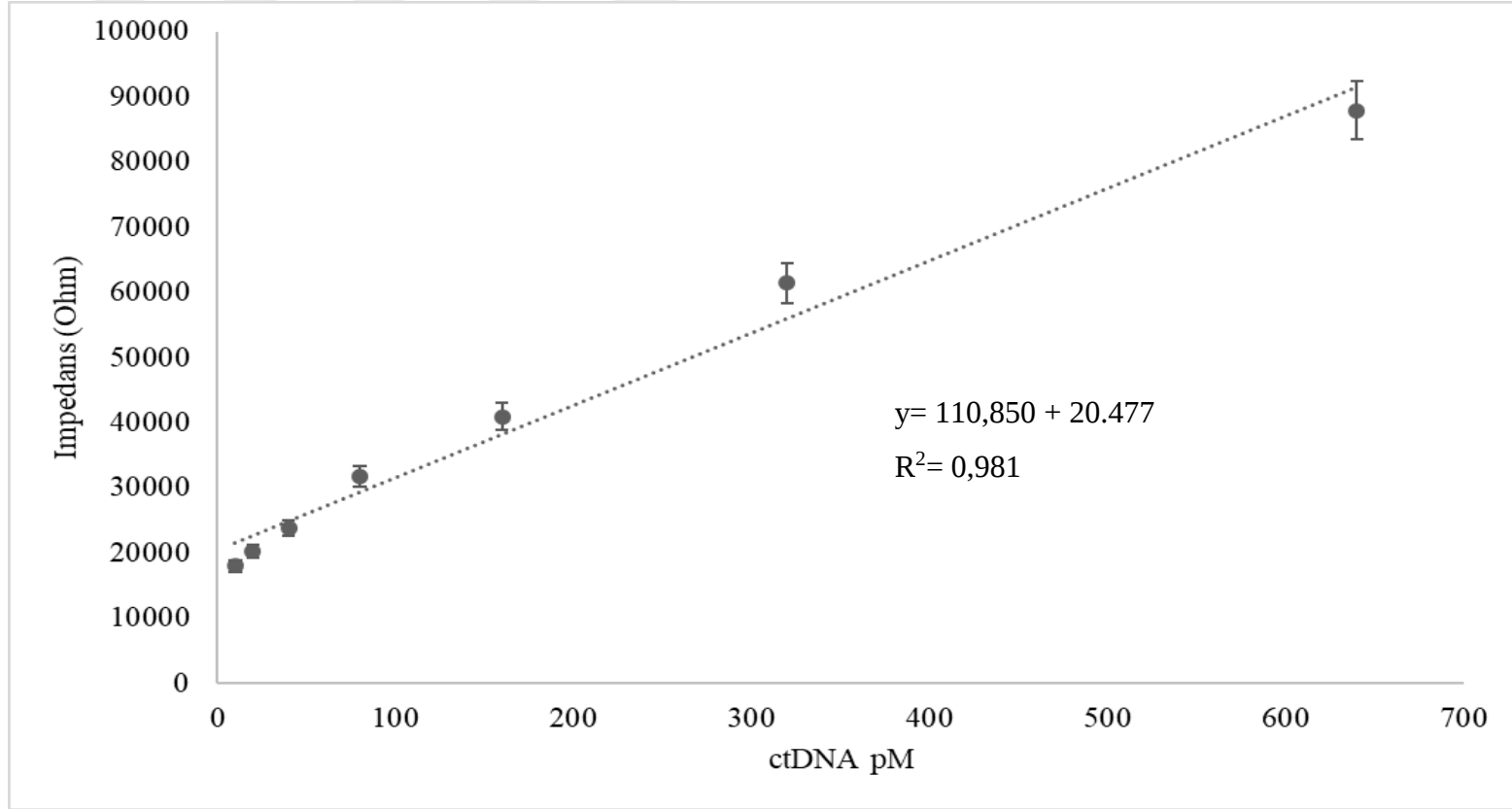
Şekil 19. AuE-Cys-PAMAM-dCas9-sgRNA modifiyeli elektrotun ctDNA ölçümündeki süre optimizasyonunun kronoimpedimetrik olarak gösterilmesi

Ölçüm zamanının belirlenmesinden sonra ise, ctDNA biyosensörünün lineer çalışma aralığı belirlenmiştir. Buna göre 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 pikomolar (pM) ctDNA standartları eklenmiş elektrot yüzeyindeki impedans verileri CV ve EIS (Şekil 20) ile elde edilmiş, EIS verileri standart konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek standart grafik (Şekil 21) çizilmiştir. Konsantrasyonla zamana bağlı impedans değerlerinde korele bir şekilde artış meydana geldiği, 640 pM derişimden sonra ise linearitenin düştüğü gözlemlenmiştir.

Şekil 19'da görülen EIS verileri altın elektrotun modifiye edilmesinden sonra elde edilen impedimetrik ctDNA ölçümünü göstermiştir. Burada 10 ile 640 pM arasında bir lineer artış gözlemlenmiştir. İmpedans verileri daha elde edilen impedans eğrileri ve yüzey modifikasyonu göz önüne alındığında Randles devre modelindeki (Şekil 2) kapasitif devre elemanı (C), sabit faz elementi olarak değiştirilip buna (Uygun ve Ertuğrul Uygun, 2014) göre hesaplanarak standart grafik elde edilmiştir.



Şekil 20. 0, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 pM arasındaki ctDNA ölçümlerinin elektrokimyasal impedans spektroskopisi ile gösterimi



Şekil 21. ctDNA biyosensörünün 10-640 pM arasındaki ctDNA konsantrasyonlarına karşı verdiği impedans değerleriyle geliştirilen standart grafik. Grafiğin lineeritesini gösteren regresyon katsayısı (R^2) 0,981 olarak hesaplanmıştır. Standart grafiğin denklemi $y = 110,850x + 20477$ olarak belirlenmiştir. Grafik denkleminde y; ohm cinsinden impedans değerlerini, x ise pM cinsinden ctDNA miktarını belirtmektedir. 6 defa tekrarlanan standart grafiklerde ise $R^2 = 0,981 \pm 0,012$ olarak belirlenmiştir.

Standart grafiğin belirlenmesinden sonra, biyosensörün saptama sınırları, yani en düşük tayin limiti (LOD) ile en düşük tayin sınırı (LOQ) matematiksel olarak hesaplanarak test edilmiştir. 10 pM derişimdeki ctDNA konsantrasyonunun plazmaya eklenerek, standart grafiklerden bağımsız olarak 5 kez ölçülmesi ile elde edilen impedans değerlerindeki standart sapma $\pm 275,100$ ohm olarak bulunmuştur. Formülde standart grafiğin eğimi (m) olarak 110,850 kullanılmıştır. Buna göre LOD için (3,3 S/m) hesaplanan değer 8,190 pM, LOQ için (10 S/m) hesaplanan değer ise 24,800 pM olarak bulunmuştur.

Tekrarlanabilirlik testleri ise 2 farklı gerçek örnekte yapılmıştır. 120,00 pM ve 300 pM olarak bilinen kan örneklerinin her biri 3 farklı biyosensör ile üçer kere test edilmiştir. İlk örneğin $120,00 \pm 1,97$ pM, ikinci örneğin ise $300,00 \pm 9,830$ pM olarak tespit edilen sonuçları güvenilir bir tekrarlanabilirlik verisidir.

Bu sonuçlar grafen oksit elektrotun çalışma sonuçları ile kıyaslanarak tartışma kısmında verilmiştir.

Tartışma

Bu tez çalışmasında; ctDNA'nın spesifik tayinine yönelik yeni bir elektrokimyasal biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Elektrot yüzeyindeki biyoalgılayıcının label-free olması, yani immobilizasyonda hedef molekül olan ctDNA'yı doğrudan tanıyabilecek dCas9-sgRNA'nın algılayıcı sistem olarak grafen oksit elektrot yüzeyine yerleştirilmesi sistemin en önemli özelliğidir. Bu şekilde doğrudan affinite temelli bir sistem geliştirildiğinden kanser tanı ve izleminde daha spesifik ve hızlı ölçüm gerçekleştirilebilecek bir prototip ortaya çıkarılmıştır. ctDNA tayini için geliştirilen bu sistem, yine çalışma kapsamında dCas9-sgRNA ile modifiye edilmiş altın elektrot biyosensörü geliştirilerek doğrulanmıştır. Her iki elektrodun modifikasyon, standart grafik çizimi, tekrar üretilebilirlik, seçicilik, kararlılık ve performans parametreleri de belirlenmiştir.

Çalışmada modifikasyon ve biyosensör karakterizasyon aşamalarında CV ve EIS kullanılmıştır. Bu iki yöntemden, CV'nin çalışmada kullanılmasının nedeni, nicel sonuçlar elde etmekten çok uygulanan yöntemlerin nitel olarak incelenmesi, modifikasyon adımlarının karşılaştırılması ve EIS'in doğrulanması amaçlıdır. CV, bir çözelti içerisindeki indirgenen veya yükseltgenen türlerin varlığının belirlenmesi için kullanılmaktadır. Bu indirgenme ve yükseltgenme ise tamamen elektrotun materyali ile karakterizedir. Örneğin bir demir iyonunun altın bir yüzeyde indirgenme potansiyeli ile karbon yüzeyde indirgenme potansiyelleri farklı olmaktadır. Çözeltideki indirgenen veya yükseltgenen türün elektrot yüzeyine hareketi ise çözelti içindeki difüzyon hızına bağlıdır. Bu potansiyellerde indirgenen veya yükseltgenen tür, elektrotun yüzey kalınlığının arttığı durumlarda pik akımını da değiştirmektedir. Pik akımının yüksekliği bazı redoks probu çözeltilerinde ise özel bir duruma bağlıdır. Eğer ki, yüzey ile redoks probu ters yük ile yüklüyse (- ve +, veya + ve -) redoks probu difüzyon ile birlikte bir elektriksel migrasyon ile yüzeye çekilebilir. Bu durumda pik akımı artar. Eğer yüzey ve redoks probu aynı yükteyse bu sefer de redoks probu yüzeyden itilir ve pik akımı azalır (Ertuğrul ve Uygun, 2016). CV'nin bu söz konusu özelliğinden ötürü, tez çalışmasında da biyosensör geliştirme aşamalarında pik akımı ve pik potansiyelinin değişimi başarılı olarak saptanmıştır. CV'de, pik potansiyelinin değişmesi elektrot yüzeyinin kaplanmasını göstermektedir. Örneğin altın elektrot yüzeyi bir materyal ile kaplandığında artık o elektrot, altın bir elektrot karakteri

göstermemekte, dolayısıyla indirgenme ve yükseltgenme potansiyeli ile birlikte pik akımı da değişmektedir.

EIS ise hem ctDNA biyosensörlerinin modifikasyon adımlarının nicel olarak incelenmesi, hem de ctDNA ölçümü için elde edilen impedans değerlerinden ctDNA miktarının belirlenmesi için bu tez çalışmasında kullanılmıştır. EIS'in gerçekleştirilmesi de tıpkı CV gibi bir redoks probu içerisinde gerçekleştirilir. Elektrot yüzeyi ile redoks probu arasındaki etkileşim CV'de olduğu gibi EIS'de de geçerlidir. Burada ters yük impedansı azaltır, benzer yük ise impedansı artırır. İmpedans olarak ölçülen, yüzeyde dönüşüme uğrayan redoks probundan açığa çıkan elektronların yüzeyi geçerek analizöre ulaşırken karşılaştıkları direnç, yani elektron transfer direncidir (Ret). Ret ölçümü de ctDNA'nın elektrot yüzeyine bağlanması ile orantılı olarak artmaktadır. Ret değerinin belirlenmesi için, elde edilen impedans karakteristiğine bakılarak, elektrot yüzey bileşiminin de göz önüne alındığı bir elektriksel devre modeli çizilir ve bu devre modeli üzerine impedans eğrisi "fit" edildiğinde Ret hesaplanır. Bu şekilde konsantrasyona karşı direnç hesaplanarak ölçüm gerçekleştirilebilir.

Geliştirilen iki biyosensörün, genel hatlarının anlatıldığı bu kısımda, modifikasyon aşamaları bu verilen bilgilere göre yorumlanmıştır.

İlk olarak grafen elektrot ile gerçekleştirilen biyosensör çalışmasında, grafen oksit üzerindeki hidroksil ve karboksil grupları öncelikle EDC, sonrasında da NHS ile aktive edilmiştir. Karbodiimid yapısının en yakındaki amino grubuna bağlanacak kadar aktif olması prensibi ile dCas9 enzimleri de elektrot üzerine kovalent bağlanmıştır (Şekil 4 ve 5). Grafen oksit pH=7'de hazırlanan redoks probu çözeltisi içerisinde negatif yüklü bir elektrot tabakası oluşturmaktadır. Bu nedenle Grafen oksite bağlanan dCas9 çoğu negatif yüklü grubu kapattığından impedansta azalma görülmektedir. Aynı zamanda dCas9 proteinlerinin pozitif yüklü olması da bu azalmanın etkeni arasında yer almaktadır ((Sun ve diğerleri, 2015) İmpedans eğrisi incelendiğinde tek bir sinüzoidal yarım halka karakteristiği görülmesi yüzeyde sadece dCas9 tabakasının bulunduğunu, redoks probu ile doğrudan etkileşimde olabilecek grafen oksit yüzey olmadığını elektrokimyasal olarak da teyit eden bir bulgudur. Bu bulgu elektrotun dCas9 ile immobilizasyonunda başarılı olduğunu doğrulamaktadır. CV piklerinde görülen artış da impedanstaki azalmayla korele olduğundan immobilizasyon sürecinin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği söylenebilir.

Çalışmanın özgün bir yanı, GPHOXE elektrot üzerine başarılı bir şekilde immobilize edilen bu dCas9 enzimlerinin daha sonra hedef ctDNA'yı bağlayabilmesi için sgRNA ile modifiye edilmesi işlemidir. sgRNA sentetik bir gRNA'dır, biyolojik sistemlerde crRNA ve tracrRNA şeklinde bulunmaktadır, fakat *in-vitro* çalışmalarda kullanılmak üzere bu iki ayrı RNA'nın birlikte kompleks oluşturma sorunu olabileceğinden sgRNA tek zincir halinde sentezlenmiştir. dCas9 üzerine bağlanma 1 saat ile sınırlanmıştır, birçok çalışmada en fazla 30 dakikada dCas9-sgRNA kompleksi oluşmaktadır. Bununla birlikte ilginç bir özellik, sgRNA'nın, üzerindeki negatif yüklü fosfat grupları nedeniyle grafen oksit yüzey tarafından itilmesidir. Bu da sgRNA'nın dCas9 yerine yüzeye bağlanmasının önüne geçmektedir. Böylelikle, sgRNA elektrot yüzeyinde tek hedefi olan dCas9 üzerine bağlanarak hedef ctDNA dizisini bağlamak üzere kompleksleşir. Elektrokimyasal olarak bu durum CV pik akımında azalma ve EIS eğrilerinde artış ile gösterilmektedir. sgRNA'nın hem dCas9 üzerine bağlanması, hem de negatif yüklerden dolayı yüzey tarafından itilmesiyle bu elektrokimyasal sonuçlar ortaya çıkar. Bu önemli bulguları elde etmek için sgRNA modifikasyon aşamasında kritik bir nokta, tüm malzemelerin RNaz ve DNaz içermeyen özellikte olmasıdır. Bu tez çalışmasındaki labortauvar ayağının en çok özen isteyen noktası da bu kısım olmuştur.

Grafen oksit yüzeyin başarılı immobilizasyonu ve modifikasyonların gerçekleşmiş olması, üçüncü bir metot olarak atomik kuvvet mikroskobu kullanılmasıyla doğrulanmıştır. AFM genel olarak ucunda tek bir atom bulunan bir iğnenin yüzeye Van der Waals kuvvetinin izin vereceği kadar yaklaşması ve yüzeyi taraması prensibine göre çalışır. Elde edilen görüntüler yüzey kalınlığını ve yüzeyin üç boyutlu yapısını ortaya çıkarmaktadır. Çalışmamızın sonuçları her immobilizasyon aşamasında yüzey kalınlığı artışını, yani yüzeye bağlanmanın gerçekleştiğini göstermiştir.

Çalışma amacı olarak saptanan hedef ctDNA tayini için, başarıyla modifiye edilen grafen oksit elektrot üzerindeki dCas9-sgRNA kompleksinin endonükleaz aktivitesi olmadan sadece ctDNA'yı bağlayarak etkileşime girmesi planlanmıştır. Her ne kadar enzimatik (helikaz) bir reaksiyon ile ctDNA yüzeye bağlanıyor olsa da, hedef molekül bağlanma sonrası biyokimyasal olarak değişim göstermediğinden, tez çalışmasında üretilen bu biyosensör tipi afinite temelli olarak tanımlanmıştır.

ctDNA tayininde inkübasyon sürecini belirlemede kullandığımız kronoimpedimetrik ölçüm ise, modifikasyon adımlarından sonra elde edilen ctDNA bağlama verisinin analiziyle gerçekleştirilmiştir. Kronoimpedimetrik ölçümde, enzimatik (dCas9'un helikaz aktivitesi) bir reaksiyonla ctDNA bağlanmasının hızlı olduğu görülmektedir, bu da afinite temelli sensör sistemlerinde enzimlerin ne kadar hızlı çalışabildiğini göstermektedir. Biyosensör sisteminde elde edilen ve 40 saniye olarak belirlenen ölçüm süresi şimdiye kadar yayınlanmış hiçbir ctDNA ölçüm sisteminde elde edilmemiştir. Bu hız klinik kullanım için önemli bir bulgudur.

Biyosensör üzerinde ctDNA bağlanma hızının lineer olarak artışının görüldüğü süre olan 40 sn, inkübasyon süresi olarak seçilmiştir. Bu ölçüm süresi ctDNA ve biyosensör yüzeyine bağlanmış dCas9-sgRNA miktarıyla ters orantılıdır, yani ctDNA miktarı arttıkça bağlanma hızı artar, fakat ctDNA ölçüm süresi azalır, aynı şekilde yüzeyde daha fazla miktarda dCas9-sgRNA immobilize edilmesi ctDNA bağlama hızını artırmaktadır. Bu nedenle ctDNA ölçüm hızı biyosensörün yüzey alanı ve immobilize edilen biyotanıma ajanı ile doğru orantılıdır. Tek nükleotid farklı ctDNA kullanıldığında elde edilen sinyal değerlendirildiğinde ise yavaş da olsa bir artışın olduğu görülmektedir. dCas9 kullanılan çalışmalarda yanlış baz eşleşmesi de görülmektedir. Bu yanlış eşleşme özellikle biyosensör sistemimizde de yanlış pozitif sinyal oluşturma olasılığı da göstermekteydi, ancak kronoimpedimetrik ölçümde, dCas9 ile farklı DNA arasındaki etkileşim sterik etkiden dolayı uzun sürdüğünden ve bizim sistemimizde 40 saniyede alınan ölçüm alınabildiğinden, olası yanlış pozitif sinyalin görülmesi de bertaraf edilmiştir. Ölçüm süresi daha uzun olsaydı, yanlış pozitif sinyal görülebilecek ve biyosensörün seçiciliği sorgulanabilecekti.

Hatami ve arkadaşlarının (Hatami, Ragheb, Jalali, Tabrizi ve Shamsipur, 2020) gerçekleştirdiği ve yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada, mikobakteri tüberkülozunun (TB) hassas tespiti için basit ve düşük maliyetli elektrokimyasal bir DNA biyosensörü geliştirilmiştir. Bu tasarımda, tiyol ile modifiye edilmiş mikobakteri DNA'sının (prob DNA) immobilize edilmesi için çinko oksit (ZnO) ve altın nanopartiküllerin (AuNP'ler) nanokompozitleri kullanılmıştır. ZnO, camı bir karbon elektrot üzerinde, $Zn(NO_3)_2$ çözeltisinin ~ 1.0 V'de (Ag / AgCl'ye karşı) elektrolizi ile kaplanmış, daha sonra AuNP'ler $HAuCl_4$ çözeltisi içerisinde <0.4 V'de potansiyel uygulanarak, ikinci katman olarak elektrokimyasal olarak biriktirilmişlerdir. Tiyollenmiş prob DNA'sı daha sonra AuNP'lere kovalent olarak bağlanmıştır (SAM).

Hibridizasyon deneylerinde hedef DNA için 2,5-250 pM konsantrasyon aralığında ve 1,8 pM saptama sınırı (LOD) içinde doğrusal bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Yöntem seçiciliğinde ise çift baz uyumsuzluğu (DMM), üç baz uyumsuzluğu (TMM) veya tamamlayıcı olmayan (NCMM) DNA parçaları (her biri 100 pM) olan örnek çözeltiler elektroda uygulanmıştır. Bu DNA örneklerine karşılık gelen akım değerleri, tamamen eşleştirilmiş DNA'nın (hedef) % 48.8 (DMM), % 27.0 (TMM) ve % 4.93 (NCMM) oranında çok yüksek oranda yanlış pozitif sinyal vermesine neden olmuştur. CRISPR/Cas9'un tanı için kullanılmasını içeren çalışmalarda yanlış eşleşme ile farklı bölgeye bağlanma görülebilmektedir, bu durum aslında biyosensör sisteminin seçiciliğini azaltan bir durumdur. Geliştirdiğimiz sistemde ise çok önemli bir avantaj olan ölçüm zamanının 40 saniye olması söz konusudur. Dolayısıyla, 40 saniye sonunda asıl hedefe bağlanan dCas9-sgRNA ile farklı bir diziye bağlanan biyoreseptörün bağlanma hızı farkı ile seçicilik artırılmış olur. Geliştirilen biyosensörün ölçüm hızı eğer daha uzun süre olsaydı, seçiciliğinin de daha düşük olabileceği öne sürülebilirdi, ancak 40 saniye içinde yapılan bu ölçüm ile yanlış pozitif sinyal söz konusu olmamaktadır.

Nguyen ve Sim (Nguyen ve Sim, 2015) lokalize yüzey plazmon rezonansı (localized surface plasmon resonance-LSPR) ve AuNP birleştirerek, tümör spesifik mutasyonların (E542K ve E545K) ultra duyarlı tespiti ve PIK3CA geninin ctDNA'sının metilasyonunun tayini için bir biyosensör geliştirmişlerdir. Bu tasarımda peptit nükleik asitleri (PNA), 69 baz çifti içeren bu PIK3CA ctDNA'yı yakalamak için bir prob olarak kullanılmıştır, yani biyotanıma ajanı PNA'dır. PNA-AuNP'lerin 200 fM ctDNA'ya karşı oluşturdukları sinyalde, 4.3 nm LSPR-pik kayması görülmüştür. Bu çalışmadaki sistem ile hassasiyet dört katına kadar artmıştır (-50 fM). Bu sistemde akış üzerine kurulu rezonans sinyaller, örnek sisteme verildikten 30 dakika sonra sinyal oluşturmuşlardır.

Huang ve çalışma arkadaşlarının geliştirdiği (Huang ve diğerleri, 2020) bir çalışmada, PIK3CA E545K ctDNA'nın basit bir işlemle hassas ve spesifik tespiti için yuva hibridizasyon zincir reaksiyonuna dayanan yeni bir elektrokimyasal biyosensör tasarlanmıştır. Yuva hibridizasyon zinciri reaksiyonu, iki sınıf iyi tasarlanmış DNA probu tarafından bir araya getirilen ve karmaşık bir DNA yapısının oluşumuna yol açan iki dambıl şeklindeki DNA biriminin hibridizasyonu ile başlatılmıştır. Amplifiye hibridizasyon zinciri reaksiyon ürünleri, hedef ctDNA'nın mevcudiyetinde, hedef

ctDNA tarafından yakalanarak elektrokimyasal sinyalin artışına neden olmuştur. Optimal koşullar altında, geliştirilen biyosensör, 5 pM ila 0,5 nM doğrusal aralığı ve 3 pM saptama sınırı ile hedef ctDNA'nın saptanması için iyi bir analitik performans sergilemiştir. Ölçüm süresi olarak, DPV sinyallerinin elde edilmesi için 10-50 dakika arasında bir süre öngörülmüştür.

Çalışmamızda grafen oksit yüzeye immobilize edilen dCas9-sgRNA biyotanıma ajanının lineer çalışma aralığı olarak son derece dar görünen bir aralık, yani 2-20 nM arası, belirlenmiştir. Bunun nedeni şudur: Biyosensör sistemlerinde duyarlılık, tekrarlanabilirlik ve lineer çalışma aralığı, kullanılan elektrota uygulanan immobilizasyon yöntemine bağlıdır. dCas9 proteinleri, çalışmada kullanılan grafen oksit yüzeylerdeki grafen tabakalarının uç bölgelerinde bulunan oksitlenmiş kısımlardan bağlanırlar ve belli bir bağlama oranı sınırı içerirler. Bu bağlama oranı ise lineer aralığı dar olarak tutmaktadır, ancak lineer çalışma aralığındaki doğrusallık oldukça yüksek düzeyde, yani 0,9869 olarak, belirlenmiştir.

Grafen elektrot ile elde edilen grafiğin regresyon katsayısı ise (R^2) standart sapma (S) ile birlikte $0,9869 \pm 0,0042$ ($n=9$) olarak hesaplanmıştır. Grafiklerin eğimlerinin (m) de ortalaması alınarak $978,42 \pm 0,11$ bulunmuştur. R^2 aynı zamanda elektrotun yeniden üretilebilirliğini de göstermektedir, % 0,49 sapma ile elektrotun yeniden üretilebilirliğinin son derece yüksek olduğu görülmektedir. Yeniden üretilebilirlik, kişisel kullanıma uygun test formülasyonunda son derece önemli bir parametredir.

Standart grafiğin belirlenmesinden sonra, biyosensörün saptama sınırları, yani en düşük tayin limiti (LOD) ile en düşük tayin sınırı (LOQ) matematiksel olarak hesaplanarak test edilmiştir. Buna göre LOD için ($3,3 S/m$) formülü olarak hesaplanan değer 0,65 nM, LOQ için ($10 S/m$) formülü olarak hesaplanan değer ise 1,97 nM olarak hesaplanmıştır. LOQ değerinin standart grafiğin başlangıç noktası olan 2 nM derişime yakın olması da matematiksel olarak biyosensörün en düşük ölçebildiği sınırı da doğrulamaktadır. En düşük tayin sınırı olan LOD ise 0,65 nM olarak ölçülmüştür, ancak bu değer benzer metotların en düşük tayin sınırından daha yüksektir. Biyosensör sistemleri geliştirilirken yapılan optimizasyon çalışmalarının bir parçası olan LOD ve LOQ bir ölçüm sisteminin performansını göstermektedir. Matematiksel doğrulama olan bu iki değerde LOQ standart grafiğin başlangıç noktasının ne kadar sapma ile

deneyssel olarak doğru bulunduğunu göstermektedir. LOD ise teorik olarak ölçülebilen en düşük noktayı göstermektedir.

DNA ölçümü için geliştirilen biyosensör ve sensör sistemlerinin tasarımında genellikle DNA üzerine bağlanan ikincil bir işaretçi (label) kullanılır. Bu işaretçi DNA'nın belli bir bölgesine bağlanarak elektriksel veya optik bir sinyal oluşturur, dolayısıyla DNA tayini bu ikincil işaretçi sinyalinin ölçülmesi üzerinden yapılır. Başka DNA tabanlı ölçüm sistemlerinde ise DNA iki zincire ayrılır ve tek zincirli DNA elektrot üzerine immobilize edilir. Immobilize edilen DNA komplementer olanı ile eşleşme yaptığında ise ölçüm gerçekleştirilebilir. Kısaca, ölçülmesi istenen DNA için ya işaretçi (label) kullanılır, ya da DNA öncelikle denatüre edilir ve sonrasında ölçüm gerçekleştirilir. Burada çoğunlukla yanlış eşleşme olması veya adsorpsiyon ile yanlış pozitif sinyaller oluşması söz konusu olabilir. Bu çalışmada ise işaretçi olmayan (label-free) ve ikincil bir moleküle ihtiyaç duymayan bir sistemle doğrudan ölçüm gerçekleştirilebilmektedir. Bu avantajlar, geliştirilen sistemi diğer biyosensör sistemlerine göre öne çıkarmaktadır.

Shariati ve çalışma arkadaşlarının geliştirdiği benzer ilkeli bir sistemde (Shariati, Ghorbani, Sasanpour ve Karimizefreh, 2019) işaretçi olmadan (label-free) altın nanotüplere (AuNT) modifiye edilmiş insan papilloma virüsü (HPV) kullanılarak impedimetrik bir DNA biyosensörü geliştirilmiştir. Bu biyosensörde, modifiye elektrot olarak AuNT'ler nano-gözenekli polikarbonat (AuNTs-PC) üzerine immobilize edilmiştir. Tek zincirli DNA (ss-DNA) probu, AuNTs-PC elektrotuna kovalent olarak immobilize edilmiştir. Biyosensör, HPV DNA hibridizasyon saptamasını 0,01 pM ile 1 mM doğrusal aralıkta gerçekleştirmiş ve 1 fM'lık bir saptama limitine (LOD) ulaşmıştır. Sistem ölçüm süresi 6 saat olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda, gerçek örnek denemelerinde 2 farklı kan plazma örneğinde tekrarlanabilirlik testleri yapılmıştır. Sonuçlar, ctDNA seviyelerinin %96'dan fazla doğrulukla tespit edilebildiğini göstermiştir ki bu, biyosensör sisteminin seçiciliğinin de oldukça yüksek olduğunu kanıtlar.

Geliştirilen biyosensörün seçiciliği ilk 40 saniye için yüksek olmakla birlikte daha uzun süreli ölçümlerde seçicilik çalışmaları üzerinden konuşmak belirsizdir. Hajian ve arkadaşları (Hajian ve diğerleri, 2019) CRISPR–Chip olarak adlandırılan ve dCas9 temelli grafen transistörler ile bir biyosensör geliştirmişlerdir. Bu sistemde mavi floresan proteini ifade eden HEK293T hücre dizilerinden toplanan DNA örneklerinin

ve Duchenne kas distrofisi olan kişilerde yaygın olarak silinen eksonlarda iki farklı mutasyona sahip DNA klinik örneklerinin analizi için CRISPR–Chip'i kullanılmıştır. Hedef geni içeren genomik DNA'nın mevcudiyetinde, CRISPR-Chip 15 dakika içinde 1.7 fM hassasiyetle ve amplifikasyona ihtiyaç duymadan, hedef sekansı olmayan örneklerle göre çıkış sinyalinde önemli bir artış meydana getirmiştir.

DNA biyosensör sistemlerinde seçicilik önemli bir parametredir ve dCas9 bu seçiciliği çok ileri bir seviyeye taşımıştır.

Geri eldeyi belirlemek için, hasta olmayan gerçek sağlıklı gönüllü plazma örneklerine 15 nM, 120 bp standart ctDNA eklenmiştir. Biyosensör 15nM ctDNA ölçümünde (n=4) %96,53 geri elde potansiyeline ulaşmıştır (Ortalama: 14.48 ± 0.16 nM). Plazma matriksinin etkisi ise %3,47 olarak hesaplanmıştır. Matriks etkisi biyosensör sinyalini düşürmektedir, yapılan ölçümlerde de gerçek örnek durumunda sinyaldeki bu azalma görülmektedir. Bu azalma da, biyosensör yüzeyindeki biyotanıma ajanının optimum çalışma tamponu yerine plazma örneğinin içeriğinden etkilendiğini göstermektedir. Fakat sistemin %3,47 gibi bir sapma göstermesi de ctDNA ölçümünde oldukça etkili olduğunu kanıtlamaktadır.

Son optimizasyon olan depo kararlılığı ölçümünde ise biyosensör +4°C ve oda sıcaklığında bekletilerek 10, 20 ve 30 gün sonrasında elde edilen sinyaller kıyaslanmış ve optimum saklama koşulları belirlenmiştir. Biyosensör sisteminin bir RNA içermesi nedeniyle RNaz enzimlerinin yüzeyi parçalaması veya elektrot yüzeyinde uzunca bekleme sonunda küçük çatlaklar (pin holes) oluşmasıyla gelişen aktivite kaybı sonucunda biyosensörün ctDNA ölçümü etkilenmiştir. Maksimum saklama koşulu +4°C'de 10 gün olarak belirlenmiştir.

dCas9-sgRNA, ctDNA'yı geri dönüşümsüz olarak bağlamaktadır. 8 M üre kullanılarak ayırma işlemi gerçekleştirilmesi denenmiş, fakat elektrot sinyalinde anlamsız ve yorumlanması imkânsız (yüzey yapısının bozulması vb.) değişimler olduğundan biyosensör sistemi tek kullanımlık olarak belirlenmiştir.

Altın elektrot ile geliştirilen dCas9-sgRNA ile modifiye edilen biyosensör sistemi ise tamamen grafen oksit metoduna alternatif bir metot olarak geliştirilmiştir. Bu metodun amacı grafen oksit ile üretilen sistemin alternatif immobilizasyon yöntemi varlığında işleyip işlemediğini, kısaca kontrolünü sağlamaktır.

Altın (Au) inert bir metaldir ve elektrokimyasal sistemlerde akımdan etkilenmesi zor olduğu için tercih edilir. Bu özelliği, yani inert doğası, yüzeyinde

kovalent bir immobilizasyon tabakasının geliştirilmesi gereken biyosensör sistemlerinde dikkate alınması gerekli olan bir özelliktir. Altın elektrotlarda, immobilizasyon için sıklıkla bir fonksiyonel grubun kendi kendine oluşturulabildiği yapılar, özellikle alkantiyoller kullanılır. Bu materyaller bir hidrokarbon zincir, bu zincirin bir ucunda –SH, diğer ucunda ise karboksil, amin, siyanür, hidroksil vs. gibi fonksiyonel gruplar içerir. Alkantiyoller altın elektrot ile inkübe edildiğinde kendi kendine düzenlenen tek tabakalar (self-assembly monolayer, SAM) oluştururlar. Söz konusu SAM tabaka oluşumunda Au-S bağı hiçbir kimyasal işleme gerek kalmadan kolayca oluşabildiğinden kolay ve kovalent bir immobilizasyon yöntemi olarak tercih edilmektedir. Her ne kadar farklı SAM materyalleri bulunsada, bu çalışmada kısa zincirli, hızlı bir şekilde elektrotu modifiye edebilen ve aktif amin grupları bulunduran sistamin (Cys) molekülü kullanılmış ve Cys-altın elektrot bağlanması CV ve EIS ile karakterize edilmiştir. Bu bağlanmada Cys'in SH grubu altına bağlanmakta, diğer amin grubu ise açıkta kalarak uygun bir aktif grup oluşturabilmektedir. Açıkta kalan bu amin grubu pH=7'de pozitif yükle yüklenerek CV ve EIS ölçümlerinin yapıldığı redoks probunu yüzeye migrasyonla çeker. Sonuçta, bu çekim difüzyon ile yüzeyde dönüşen redoks probundan daha fazla elektrokimyasal olarak dönüşüme ve fazladan akım oluşmasına neden olur. Sonuçta CV pik akımında artış görülür ve EIS (Ret) azalır. Sinüzoidal eğri ile birlikte grafen oksit elektrottan farklı olarak burada bir de lineer olarak artan bir eğri görülür ki bu eğri Warburg impedansını, yani kütle taşınım transferini temsil eder. Bu da fazla miktarda redoks probunun yüzeye ilerlediğini gösterir. Normal şartlarda, redoks probu kullanılmadan yapılan çalışmada, Ret sinyalinin artması gerekirken, altının yüzey karakteristiğinden ötürü Ret sinyali üzerine Warburg sinyali baskın görüldüğünden Ret düşük görülür.

Aktif amin uçları oluşan altın elektrotta (AuE-Cys) yüzey alanının artırılması çalışması ile grafen oksit elektrotta bahsedilen, duyarlılığın artırılması ve geniş lineer aralığın elde edilmesi için PAMAM dendrimeri kullanılmıştır. PAMAM, Au-Cys yüzeye bir çapraz bağlayıcı olan glutaraldehit ile bağlanmıştır. Bu çapraz bağlayıcı iki amin arasında kovalent bağ ile bir köprü oluşturarak bağlama gerçekleştirir. PAMAM bağlanması sonucunda, AuE üzerinde bir sistamin ile bir aktif amin grubu varken, AuE-Cys elektrotun PAMAM ile modifikasyonu sonucunda 64 adet (bir tanesi sistamine bağlı) aktif amin ucu oluşturulabilmektedir. Bu da biyotanıma ajanı olan dCas9'un bağlanmasını kolaylaştırmakta, ayrıca daha fazla dCas9 bağlanması ile

duyarlılığın ve lineer ölçüm aralığının da artırılmasını sağlamaktadır. PAMAM immobilizasyonunda da, molekül aynı sistamin gibi pozitif yüklü olduğundan redoks probunu çekilmesine neden olmaktadır. Normal şartlarda PAMAM gibi büyük bir moleküle göre düşünüldüğünde, önemli derecede azalma beklenen CV pik akımında neredeyse göz ardı edilebilir çok az bir azalma, impedansta da çok az bir artış söz konusu olmuştur.

dCas9 bağlanması için de yine AuE-Cys-PAMAM elektrotun aktif amin uçları glutaraldehit ile aktive edilerek dCas9 sistemi elektrot yüzeyine bağlanmıştır. Beklenildiği üzere, pozitif yüklü olması gereken amin uçları dCas9 proteinlerine bağlandığından redoks probunu migrasyon ile çekebilme kabiliyetini yitirdiği için CV pik akımı azalmış, EIS (Ret) artmıştır. Bu durum beklenen bir durumdur ve dCas9 proteinlerinin bağlandığını göstermektedir. dCas9 proteinlerinin aktif olarak bağlanmadığı glutaraldehit ile aktifleştirilmiş PAMAM-NH₂ uçları ise glisin ile bloke edilmiş, böylelikle olası dCas9 dışı yanlış sgRNA'nın yüzeye bağlanmasının önüne geçilmiştir. AuE-Cys-PAMAM-dCas9 elektrodun sgRNA ile modifiye edilmesiyle CV pik akımında azalma ve elektron transfer direncinde (Ret) artış görülmüştür. Bu artış hem sgRNA üzerindeki negatif yükün redoks probunu itmesinin, hem de yüzeye bağlanmanın gerçekleştiğinin göstergesidir.

Altın elektrotunda yapılan performans testleri sonucunda, PAMAM ile yüzey alanı artırılan biyosensörün hem lineer aralık, hem de duyarlılık konusunda grafen oksit elektrottan daha başarılı sonuç verdiği görülmüştür. Bu da biyosensörlerde yüzey alanı ile performans arasındaki orantıyı doğrulayan bir bulgudur. Lineer ölçüm aralığı 10-640 pM arasında olan elektrotta, linearite grafen oksit elektrota göre daha düşüktür. Bunun nedeni ise katman katman oluşturulan altın elektrot yüzeyinde, katmanların değişkenliği yani katman bağlanmasındaki değişkenlik olabilir. Altın elektrot modifikasyonunun daha duyarlı olmasının nedeni ise yüzey alanının arttırılmış ve dCas9 proteinlerinin grafen oksit yüzeyden daha fazla bağlanmış olmasıdır. Altın elektrotta kronoimpedimetrik olarak saptanan ctDNA bağlanma süresi ise 25 saniye olarak belirlenmiştir, bu da grafen oksit metoduna göre daha fazla dCas9 bağlanmasının bir göstergesidir. Altın elektrotla hazırlanmış biyosensörün 10-640 pM arasındaki konsantrasyonlara karşılık impedans verileriyle standart grafiği de çizilmiştir. Bu grafikte, grafiğin lineeritesini gösteren regresyon katsayısı (R^2) 0,9811, grafiğin denklemi ise $y = 110,85 x + 20.477$ olarak belirlenmiştir. Grafik denkleminde

y; ohm cinsinden impedans değerlerini, x ise pM cinsinden ctDNA miktarını belirtmektedir. Altı defa tekrarlanan standart grafiklerde $R^2 = 0,9811 \pm 0,0122$ olarak belirlenmiştir ki bu da elektrotun tekrar üretilebilirliğinin grafen oksit elektrotu göre daha düşük olduğunu göstermektedir. Bu durum tabaka sayısı ve immobilizasyonu aşamalarının fazlalığından kaynaklanmaktadır.

Standart grafiğin belirlenmesinden sonra, biyosensörün saptama sınırları, yani en düşük tayin limiti (LOD) ile en düşük tayin sınırı (LOQ) matematiksel olarak hesaplanarak test edilmiştir. 10 pM derişimdeki ctDNA konsantrasyonunun plazmaya eklenerek, standart grafiklerden bağımsız olarak ölçülmesi ile, 5 defa elde edilen impedans değerlerindeki standart sapma $\pm 275,10$ ohm olarak bulunmuştur. Standart grafiğin eğimi (m) olarak 110,85 kullanılmıştır. Buna göre LOD için (3,3 S/m) formülü olarak hesaplanan değer 8,19 pM, LOQ için (10 S/m) formülü olarak hesaplanan değer ise 24,82 pM'dir. Lineer olarak biyosensörün ölçebileceği en düşük tayin sınırı 24,82 pM olarak hesaplanmıştır. Böylelikle, 8,19 pM en düşük tayin limitine ulaşmış olan elektrotun, grafen temelli biyosensörümüz ile karşılaştırıldığında, yüzey alanının artırılması ile daha da düşük tayin sınırlarına ulaşılabilirliği de gösterilmiştir.

Gerçek örneklerde 2 farklı kan örneği plazmasında tekrarlanabilirlik testleri yapılmıştır. 120 pM ve 300 pM olarak eklenmiş olan kan örnekleri üçer farklı biyosensör ile üçer kere test edilmiştir. İlk örnek $120 \pm 1,97$ pM, ikinci örnek $300 \pm 9,83$ pM olarak tespit edilmiştir. Görüldüğü gibi ölçümde elde edilen sinyal sapması, 300 pM için yaklaşık %3 olmaktadır.

Altın elektrot ile üretilen biyosensör sistemi ile yapılan çalışmalarda, grafen oksit ile yapılan ana çalışma metodu doğrulanmıştır. Her ne kadar altın elektrot ile yapılan çalışma daha duyarlı ve liner aralığı daha geniş olsa da, grafen yüzeyin kararlılığı, grafen oksit ile üretilen biyosensörün tekrarlanabilirliğinin, tekrar üretilebilirliğinin daha iyi olması önemli artılardır.

Sonuç olarak, grafen oksit ve altın elektrot ile gerçekleştirilen dCas9 temelli impedimetrik biyosensör sistemimizin, ctDNA ölçümü ile benzer DNA ölçüm biyosensörleri ile karşılaştırıldığında hız, tekrar üretilebilirlik ve seçicilik avantajları sağladığı görülmektedir.



Sonuç ve Öneriler

Bu tez çalışmasında, CRISPR-dCas9 sistemi kullanılarak kanda sirküle olan tümör DNA'larının analizinin, daha spesifik, daha hızlı ve daha seçici bir şekilde gerçekleştirilebildiği bir biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Örnek grup olarak seçilen meme kanserinde en sık rastlanılan PIK3CA ekson 9 mutasyonlarının tespiti için geliştirilen bu label-free, CRISPR-dCas9 modifiye impedimetrik biyosensörle ilgili sonuçlar, literatürde bu konuda yayınlanan ilk çalışma olarak yer almıştır.

Malignite durumlarında ctDNA düzeyleri %0,01-90 arasında değişir, bu değişkenlik tümör yükü, evresi, vaskülaritesi, hücresel turnover ve tedaviye yanıt ile ilişkilidir. Bütün bu faktörlerden dolayı, DNA düzeylerinin standart bir aralığı bulunmasa da ctDNA'nın saptanması son yıllarda kritik öneme sahip bir konu olarak gündemdedir.

Bilindiği gibi, biyosensör sistemlerinde kullanılan elektrot tipleri immobilizasyonun stratejik temelini oluşturmaktadır. Çalışmamızda grafen oksit temelli elektrotların kullanımı ile yeniden üretilebilirlik ve tekrarlanabilirlik özellikleri başarılı sonuçlar vermiştir.

DNA, yapısındaki dört bazın farklı sıralardaki tekrarları ile oluşan son derece büyük, fakat elektrokimyasal biyosensör sistemleri için ölçümü son derece zorlu bir biyomoleküldür. Bazlar arasındaki etkileşim çoğu zaman yanlış pozitif sinyal verdiği gibi, guanin bazının elektrokimyasal özelliğinden ötürü de yanlış sinyal ortaya çıkabilir. Bu nedenle yüksek veya dalgalanan elektrik akımı uygulamak yerine düşük akımda elektrot yüzeyindeki impedansın ölçülmesi, DNA-biyosensör yüzeyi arasındaki ilişkiyi ve bağlanma kinetiğini algılayabilmemizi sağlayabilmektedir. Çalışmamızda da, yenilikçi bir impedimetrik ölçüm ile hedef ctDNA analizi yapabilecek bir biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Gerçek kan örneklerine standartlar eklenerek de ctDNA'nın tespiti ayrıca gerçekleştirilmiştir.

Yüksek seçicilik (tanımlayıcı olmayan diğer DNA ile impedans eğrilerinde artış saptanmamıştır) ve yüksek doğruluk (% 96'dan fazla) ve ultra hızlı algılama süresi (40 saniye) çalışmada üretilen yeni form bir sıvı biyopsinin en önemli özellikleridir. Geliştirilen CRISPR/dCas9 destekli biyosensör sisteminde, en sık rastlanılan mutant DNA dizisini hedefleyen, duyarlılığı yüksek, ölçüm süresi çok kısa bir düzenek söz konusudur.

Ön çalışmaları sağlam verilerle kanıtlanmış olan bu düzeneğin geliştirilerek multipleks bir sistem çerçevesinde diğer önemli mutasyonlara yönelik olarak da uygulanması, kanserin erken teşhisinde umut verici bir alan olarak ortaya çıkmaktadır.



Kaynaklar

- Abbosh, P. H., Rosenberg, J. E. ve Plimack, E. R. (2016). Circulating biomarkers to guide systemic therapy for urothelial carcinoma. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 34(11), 502–509. doi:10.1016/j.urolonc.2016.08.019
- Alix-Panabières, C. ve Pantel, K. (2013). Circulating Tumor Cells: Liquid Biopsy of Cancer. *Clinical Chemistry*, 59(1).
- Alix-Panabières, C., Pantel, K., Vona, G., Sabile, A., Louha, M., Sitruk, V., ... Hynes, R. O. (2014). Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision. *Lab Chip*, 14(1), 57–62. doi:10.1039/C3LC50644D
- Anker, P., Mulcahy, H., Chen, X. Q. ve Stroun, M. (1999). Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer metastasis reviews*, 18(1), 65–73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10505546> adresinden erişildi.
- Banys, M., Müller, V., Melcher, C., Aktas, B., Kasimir-Bauer, S., Hagenbeck, C., ... Fehm, T. (2013). Circulating tumor cells in breast cancer. *Clinica Chimica Acta*, 423(3), 39–45. doi:10.1016/j.cca.2013.03.029
- Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, R. J., Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N., ... Diaz, L. A. (2014). Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Science Translational Medicine*, 6(224), 224ra24-224ra24. doi:10.1126/scitranslmed.3007094
- Bettegowda, Chetan, Sausen, M., Leary, R. J., Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N., ... Diaz, L. a. (2014). Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Science translational ...*, 6(224), 224ra24. doi:10.1126/scitranslmed.3007094.Detection
- Board, R. E., Wardley, A. M., Dixon, J. M., Armstrong, A. C., Howell, S., Renshaw, L., ... Dive, C. (2010). Detection of PIK3CA mutations in circulating free DNA in patients with breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 120(2), 461–467. doi:10.1007/s10549-010-0747-9
- Campbell, J. D. ve Ramsey, S. D. (2009). The costs of treating breast cancer in the US: a synthesis of published evidence. *Pharmacoeconomics*, 27(3), 199–209. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19354340> adresinden erişildi.
- Carreira, S., Romanel, A., Goodall, J., Grist, E., Ferraldeschi, R., Miranda, S., ...

- Attard, G. (2014). Tumor clone dynamics in lethal prostate cancer. *Science Translational Medicine*, 6(254).
- Cristofanilli, M., Budd, G. T., Ellis, M. J., Stopeck, A., Matera, J., Miller, M. C., ... Hayes, D. F. (2005). Presence of circulating tumor cells (CTC) in metastatic breast cancer (MBC) predicts rapid progression and poor prognosis. *Journal of Clinical Oncology*, 23(16_suppl), 524. doi:10.1200/jco.2005.23.16_suppl.524
- Crowley, E., Di Nicolantonio, F., Loupakis, F. ve Bardelli, A. (2013). Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nature reviews. Clinical oncology*, 10(8). doi:10.1038/nrclinonc.2013.110
- Degefa, T. H. ve Kwak, J. (2008). Electrochemical impedance sensing of DNA at PNA self assembled monolayer. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 612(1), 37–41. doi:10.1016/j.jelechem.2007.09.004
- Delgado, P. O., Alves, B. C. A., de Sousa Gehrke, F., Kuniyoshi, R. K., Wroclavski, M. L., Del Giglio, A. ve Fonseca, F. L. A. (2013). Characterization of cell-free circulating DNA in plasma in patients with prostate cancer. *Tumor Biology*, 34(2), 983–986. doi:10.1007/s13277-012-0634-6
- Deng, W., Shi, X., Tjian, R., Lionnet, T. ve Singer, R. H. (2015). CASFISH: CRISPR/Cas9-mediated in situ labeling of genomic loci in fixed cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(38), 11870–11875. doi:10.1073/pnas.1515692112
- Diehl, F., Schmidt, K., Choti, M. A., Romans, K., Goodman, S., Li, M., ... Diaz Jr, L. A. (2008). Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature Medicine*, 14(9), 985–990. doi:10.1038/nm.1789
- Dressman, D., Yan, H., Traverso, G., Kinzler, K. W. ve Vogelstein, B. (2003). Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(15), 8817–22. doi:10.1073/pnas.1133470100
- Ertuğrul, H. D. ve Uygun, Z. O. (2016). Impedimetric Biosensors for Label-Free and Enzymless Detection. *Intech, i(tourism)*, 13. doi:http://dx.doi.org/10.5772/57353
- Friel, A. M., Corcoran, C., Crown, J. ve O'Driscoll, L. (2010a). Relevance of circulating tumor cells, extracellular nucleic acids, and exosomes in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 123(3), 613–625. doi:10.1007/s10549-

- Friel, A. M., Corcoran, C., Crown, J. ve O'Driscoll, L. (2010b). Relevance of circulating tumor cells, extracellular nucleic acids, and exosomes in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 123(3), 613–625. doi:10.1007/s10549-010-0980-2
- Gormally, E., Caboux, E., Vineis, P. ve Hainaut, P. (2007). Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: Practical aspects and biological significance. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 635(2), 105–117. doi:10.1016/j.mrrev.2006.11.002
- Hajian, R., Balderston, S., Tran, T., deBoer, T., Etienne, J., Sandhu, M., ... Aran, K. (2019). Detection of unamplified target genes via CRISPR–Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor. *Nature Biomedical Engineering*, 3(6), 427–437. doi:10.1038/s41551-019-0371-x
- Hatami, Z., Ragheb, E., Jalali, F., Tabrizi, M. A. ve Shamsipur, M. (2020). Zinc oxide-gold nanocomposite as a proper platform for label-free DNA biosensor. *Bioelectrochemistry*, 133, 107458. doi:10.1016/j.bioelechem.2020.107458
- Higgins, M. J., Jelovac, D., Barnathan, E., Blair, B., Slater, S., Powers, P., ... Park, B. H. (2012). Detection of Tumor PIK3CA Status in Metastatic Breast Cancer Using Peripheral Blood. *Clinical Cancer Research*, 18(12).
<http://www.sciencemag.org/news/2015/12/and-science-s-breakthrough-year>. (2015). 4 Ocak 2017 tarihinde <http://www.sciencemag.org/news/2015/12/and-science-s-breakthrough-year> adresinden erişildi.
- Huang, Y. F., Tao, M. L., Luo, S. H., Zhang, Y., Situ, B., Ye, X. Y., ... Zheng, L. (2020). A novel nest hybridization chain reaction based electrochemical assay for sensitive detection of circulating tumor DNA. *Analytica Chimica Acta*, 1107, 40–47. doi:10.1016/j.aca.2020.02.006
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. ve Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, 169(12), 5429–33.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3316184> adresinden erişildi.
- Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F. O., Hesch, R. D. ve Knippers, R. (2001). DNA fragments in the blood plasma of cancer patients:

- quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer research*, 61(4), 1659–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11245480> adresinden erişildi.
- Kang, Q., Henry, N. L., Paoletti, C., Jiang, H., Vats, P., Chinnaiyan, A. M., ... Tewari, M. (2016). Comparative analysis of circulating tumor DNA stability In K3EDTA, Streck, and CellSave blood collection tubes. *Clinical Biochemistry*, 49(18), 1354–1360. doi:10.1016/j.clinbiochem.2016.03.012
- Katz, E. ve Willner, I. (2003). Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric Immunosensors, DNA-Sensors, and Enzyme Biosensors. *Electroanalysis*, 15(11), 913–947. doi:10.1002/elan.200390114
- Kinde, I., Wu, J., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W. ve Vogelstein, B. (2011). Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(23), 9530–5. doi:10.1073/pnas.1105422108
- Kohler, C., Radpour, R., Barekati, Z., Asadollahi, R., Bitzer, J., Wight, E., ... Zhong, X. Y. (2009). Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. *Molecular cancer*, 8, 105. doi:10.1186/1476-4598-8-105
- Kulaç, İ. (2014). Sıvı Biyopsi: Dolaşımdaki Tümör Hücreleri Kavramı ve Prostat Kanseri Hastalarının Takip/Tedavisindeki Önemi Summary Özet. *Üroonkoloji Bülteni Bulletin of Urooncology*, 1313. doi:10.4274/uob.159
- Leary, R. J., Kinde, I., Diehl, F., Schmidt, K., Clouser, C., Duncan, C., ... Velculescu, V. E. (2010). Development of Personalized Tumor Biomarkers Using Massively Parallel Sequencing. *Science Translational Medicine*, 2(20).
- Leary, R. J., Sausen, M., Kinde, I., Papadopoulos, N., Carpten, J. D., Craig, D., ... Velculescu, V. E. (2012). Detection of chromosomal alterations in the circulation of cancer patients with whole-genome sequencing. *Science translational medicine*, 4(162), 162ra154. doi:10.1126/scitranslmed.3004742
- Lebofsky, R., Decraene, C., Bernard, V., Kamal, M., Blin, A., Leroy, Q., ... Pierga, J.-Y. (2015). Circulating tumor DNA as a non-invasive substitute to metastasis biopsy for tumor genotyping and personalized medicine in a prospective trial across all tumor types. *Molecular Oncology*, 9(4), 783–790.

doi:10.1016/j.molonc.2014.12.003

- Leon, S. A., Shapiro, B., Sklaroff, D. M. ve Yaros, M. J. (1977). Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer research*, 37(3), 646–50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/837366> adresinden erişildi.
- Lintner, N. G., Kerou, M., Brumfield, S. K., Graham, S., Liu, H., Naismith, J. H., ... Lawrence, C. M. (2011). Structural and Functional Characterization of an Archaeal Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR)-associated Complex for Antiviral Defense (CASCADE). *Journal of Biological Chemistry*, 286(24), 21643–21656. doi:10.1074/jbc.M111.238485
- Mandel, P. ve Metais, P. (1948). Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales*, 142(3–4), 241–3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18875018> adresinden erişildi.
- Marusyk, A. ve Polyak, K. (2010). Tumor heterogeneity: Causes and consequences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1805(1), 105–117. doi:10.1016/j.bbcan.2009.11.002
- Marzese, D. M., Hirose, H. ve Hoon, D. S. B. (2013). Diagnostic and prognostic value of circulating tumor-related DNA in cancer patients. *Expert review of molecular diagnostics*, 13(8), 827–44. doi:10.1586/14737159.2013.845088
- Mouliere, F., Robert, B., Arnau Peyrotte, E., Del Rio, M., Ychou, M., Molina, F., ... Hammond, E. (2011). High Fragmentation Characterizes Tumour-Derived Circulating DNA. *PLoS ONE*, 6(9), e23418. doi:10.1371/journal.pone.0023418
- Nguyen, A. H. ve Sim, S. J. (2015). Nanoplasmonic biosensor: Detection and amplification of dual bio-signatures of circulating tumor DNA. *Biosensors and Bioelectronics*, 67, 443–449. doi:10.1016/j.bios.2014.09.003
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science (New York, N.Y.)*, 194(4260), 23–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/959840> adresinden erişildi.
- Pantel, K., Alix-Panabières, C., Riethdorf, S., al., et, Pantel, K., al., et, ... al., et. (2010). Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends in molecular medicine*, 16(9), 398–406. doi:10.1016/j.molmed.2010.07.001
- Pantel, K., Brakenhoff, R. H. ve Brandt, B. (2008). Detection, clinical relevance and

- specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nature Reviews Cancer*, 8(5), 329–340. doi:10.1038/nrc2375
- Pereira, B., Chin, S.-F., Rueda, O. M., Vollan, H.-K. M., Provenzano, E., Bardwell, H. A., ... Mermel, C. H. (2016). The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes. *Nature Communications*, 7, 11479. doi:10.1038/ncomms11479
- Ronkainen, N. J., Halsall, H. B. ve Heineman, W. R. (2010). Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, 39(5), 1747. doi:10.1039/b714449k
- Rothé, F., Laes, J.-F., Lambrechts, D., Smeets, D., Vincent, D., Maetens, M., ... Ignatiadis, M. (2014). Plasma circulating tumor DNA as an alternative to metastatic biopsies for mutational analysis in breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 25(10), 1959–65. doi:10.1093/annonc/mdu288
- Ruiz, C., Lenkiewicz, E., Evers, L., Holley, T., Robeson, A., Kiefer, J., ... Barrett, M. T. (2011). Advancing a clinically relevant perspective of the clonal nature of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(29), 12054–9. doi:10.1073/pnas.1104009108
- Saal, L. H., Holm, K., Maurer, M., Memeo, L., Su, T., Wang, X., ... Parsons, R. (2005). PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer research*, 65(7), 2554–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3913
- Schwarzenbach, H., Alix-Panabières, C., Müller, I., Letang, N., Vendrell, J.-P., Rebillard, X. ve Pantel, K. (2009). Cell-free Tumor DNA in Blood Plasma As a Marker for Circulating Tumor Cells in Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*, 15(3).
- Schwarzenbach, H., Hoon, D. S. B. ve Pantel, K. (2011). Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews Cancer*, 11(6), 426–437. doi:10.1038/nrc3066
- Schwarzenbach, H. ve Pantel, K. (2015). Circulating DNA as biomarker in breast cancer. *Breast Cancer Research*, 17(1), 136. doi:10.1186/s13058-015-0645-5
- Shalem, O., Sanjana, N. E. ve Zhang, F. (2015). High-throughput functional genomics using CRISPR–Cas9. *Nature Reviews Genetics*, 16(5), 299–311.

doi:10.1038/nrg3899

- Shariati, M., Ghorbani, M., Sasanpour, P. ve Karimizefreh, A. (2019). An ultrasensitive label free human papilloma virus DNA biosensor using gold nanotubes based on nanoporous polycarbonate in electrical alignment. *Analytica Chimica Acta*, 1048, 31–41. doi:10.1016/j.aca.2018.09.062
- Stemke-Hale, K., Gonzalez-Angulo, A. M., Lluch, A., Neve, R. M., Kuo, W.-L., Davies, M., ... Hennessy, B. T. (2008). An Integrative Genomic and Proteomic Analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT Mutations in Breast Cancer. *Cancer Research*, 68(15), 6084–6091. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6854
- Stewart, B. W., Wild, C., International Agency for Research on Cancer. ve World Health Organization. (2014). *World cancer report 2014*. International Agency for Research on Cancer.
- Storici, F. (2014). *Gene Correction: Methods and Protocols*. Springer Protocols (C. 1114). doi:10.1007/978-1-62703-761-7
- Stroun, M., Anker, P., Maurice, P., Lyautey, J., Lederrey, C. ve Beljanski, M. (1989). Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology*, 46(5), 318–22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2779946> adresinden erişildi.
- Sun, W., Ji, W., Hall, J. M., Hu, Q., Wang, C., Beisel, C. L. ve Gu, Z. (2015). Self-Assembled DNA Nanoclews for the Efficient Delivery of CRISPR-Cas9 for Genome Editing. *Angewandte Chemie - International Edition*, 54(41), 12029–12033. doi:10.1002/anie.201506030
- Turner, A. P. F. (1987). *Biosensors : Fundamentals and Applications*. Oxford University Press.
- Uygun, Z. O. ve Ertuğrul Uygun, H. D. (2014). A short footnote: Circuit design for faradaic impedimetric sensors and biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 202, 448–453. doi:10.1016/j.snb.2014.05.029
- Uygun, Z. O., Şahin, Ç., Yılmaz, M., Akçay, Y., Akdemir, A. ve Sağın, F. (2018). Fullerene-PAMAM(G5) composite modified impedimetric biosensor to detect Fetuin-A in real blood samples. *Analytical Biochemistry*, 542, 11–15. doi:10.1016/J.AB.2017.11.007
- Uygun, Z. O. ve Sezgintürk, M. K. (2011). A novel, ultra sensible biosensor built by layer-by-layer covalent attachment of a receptor for diagnosis of tumor growth.

- Analytica Chimica Acta*, 706(2), 343–348. doi:10.1016/J.ACA.2011.08.044
- Uygun, Z. O., Yeniay, L. ve Girgin Sağın, F. (2020). CRISPR-dCas9 powered impedimetric biosensor for label-free detection of circulating tumor DNAs. *Analytica Chimica Acta*. doi:10.1016/j.aca.2020.04.009
- Valastyan, S., Weinberg, R. A., Aguirre-Ghiso, J. A., Al-Mehdi, A. B., Tozawa, K., Fisher, A. B., ... Massagué, J. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147(2), 275–92. doi:10.1016/j.cell.2011.09.024
- Van der Auwera, I., Elst, H. J., Van Laere, S. J., Maes, H., Huget, P., van Dam, P., ... Dirix, L. Y. (2009). The presence of circulating total DNA and methylated genes is associated with circulating tumour cells in blood from breast cancer patients. *British Journal of Cancer*, 100(8), 1277–1286. doi:10.1038/sj.bjc.6605013
- Wang, J. (2008). Electrochemical Glucose Biosensors. *Chemical Reviews*, 108(2), 814–825. doi:10.1021/cr068123a
- Wiedenheft, B., van Duijn, E., Bultema, J. B., Waghmare, S. P., Zhou, K., Barendregt, A., ... Doudna, J. A. (2011). RNA-guided complex from a bacterial immune system enhances target recognition through seed sequence interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(25), 10092–10097. doi:10.1073/pnas.1102716108
- Yoshimasu, T., Maebeya, S., Suzuma, T., Bessho, T., Tanino, H., Arimoto, J., ... Naito, Y. (1999). Disappearance curves for tumor markers after resection of intrathoracic malignancies. *The International journal of biological markers*, 14(2), 99–105. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10399629> adresinden erişildi.

Ekler

EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. Erzene Ankara Cad. 35100 Bornova / İZMİR Tel: 0 232 390 4219 - 373 78 81 Fax: 0232 390 21 34 e-mail: aetikk@mail.ege.edu.tr www.aek.med.ege.edu.tr				
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ				
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Tümör Tanı ve İzlemi İçin Dolayımındaki Serbest DNA'nın Tayinine Yönelik Spesifik Bir Biyosensör Sistemi Geliştirilmesi		
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Ferhan GİRGIN SAĞIN		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyokimya		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı		
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-		
	DESTEKLEYİCİ	Tübitak		
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. kaynaklardan destek alanlar için)	-		
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-		
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1 ☐ FAZ 2 ☐ FAZ 3 ☐ FAZ 4 ☐ Gözlemsel İlaç Çalışması ☐ Tıbbi Cihaz Klinik Araştırması ☐ İn Vitro Tıbbi Tanı Cihazları ile Yapılan Performans Değerlendirme Çalışmaları ☐ İlaç Dışı Klinik Araştırma ☒ Diğer ise belirtiniz		
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐ ULUSAL ☒ ULUSLARARASI ☐			
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	08.12.2016	-	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	08.12.2016	-	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	22.12.2016	1.1	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒ imza tarihi: 22.12.2016		
	Diğer	☒ Duyuru Örneği		
KARAR BİLGİLERİ	Karar Nu: 16-12.1/48	Tarih: 26.12.2016		
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak Kurulumuzca incelenmiş, araştırma giderlerinin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda araştırmaya başlanmasının etik açıdan uygun bulunduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.			
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU				
ÇALIŞMA ESASI		İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu, Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği		
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. Ayşenur OKTAY		
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*) Kabılım (**)
Prof. Dr. Ayşenur OKTAY Başkan	Radyodiyagnostik	EÜ. Tıp Fakültesi Radyoloji AD	K	☐ E ☒ H ☒ E ☐ H
Prof. Dr. Aytül ÖNAL Başkan Yardımcısı	Tıbbi Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	☐ E ☒ H ☒ E ☐ H
Prof. Dr. Suna TOKSAVUL Üye	Protetik Diş Tedavisi	E.Ü. Diş Hek. Fakültesi Protetik Diş Tedavisi AD.	K	☐ E ☒ H ☒ E ☐ H
Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ayşenur OKTAY		İMZA	Araştırma Başvurusu Onay Belgesi	Belge Kodu
				Rev. Tarihi / No.su:
				Sayfa
				22
				28.09.2011/05
				1/2



ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

KARAR BİLGİLERİ		Karar Nu : 16-12.1/48				
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Sarenur GÖKBEN Üye	Çocuk Nörolojisi	EÜ. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	880100
Prof. Dr. Abdullah SAYINER Üye	Göğüs Hastalıkları	EÜ. Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları AD.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	Alman
Prof. Dr. Bülent SEMERCİ Üye	Üroloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Üroloji AD.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Süheyla ALTUĞ ÖZSOY Üye	Halk Sağlığı Hemşireliği	EÜ. Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği AD.	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Murat PEHLİVAN Üye	Biyofizik	E.Ü. Tıp Fakültesi Biyofizik AD.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Çağatay ÜSTÜN Üye	Tıp Tarihi ve Etik	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik AD.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Şafak TANER Üye	Halk Sağlığı	E. Ü. Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Doç. Dr. Ayşe EROL Üye	Tıbbi Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Yard. Doç. Dr. Gülsün AYGÖRMEZ UGURLUBAY Üye	Ceza Hukuku	Serbest	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Uzm. Ecz. Ebru BEDİR Üye	Eczacı	E.U. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Uzm. Dr. Özlem EKER Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Serbest	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Fatma BÜYÜKAKKUŞ Üye	Ziraat Mühendisi	Emekli	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI

* Araştırma ile İlişki

** Toplantıda Bulunma

ASLI GİBİDİR

Sumru PEŞCİOĞLU
EÜTF Klinik Araştırmaları
Etik Kurulu Sekreteri

Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ayşenur OKTAY	İMZA 	Araştırma Başvurusu Onay Belgesi	Belge Kodu 22	Rev. Tarihi / No.su: 28.09.2011/05	Sayfa 2/2
--	----------	----------------------------------	------------------	---------------------------------------	--------------

Araştırmanın Adı: Tümör tanı ve izlemi için dolaşımdaki serbest DNA'nın tayinine yönelik spesifik bir biyosensör sistemi geliştirilmesi

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (FORM 17)

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.

ÇALIŞMANIN AMACI NEDİR?

Bu çalışmanın amacı, kanser hastalarında kanda dolaşan hücre, protein veya DNA moleküllerinin DNA düzeyinde ölçülmesi, yani kanser tanısı, teşhisi ve tedavisi için yeni bir ölçüm sistemi geliştirilmesidir. Bu sistemde kanda DNA seviyelerinin ölçülmesi için yeni bir elektriksel ölçüm sistemi kullanılacaktır. Bu ölçüm sistemi biyosensör sistemi olarak adlandırılacak ve geliştirilecek ölçüm materyallerinin üzerine tutturulan biyomoleküller ile kanser hastalarından alınan kan ile DNA molekülleri elektriksel bir yöntem ile ölçülecektir.

KATILMA KOŞULLARI NEDİR?

Bu çalışmaya katılma koşulları, herhangi bir kanser türü hastalığı teşhisi konulan hasta veya sağlıklı kişiler sadece kan kaynağı olarak kullanılacaktır ve hastalar Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi' üzerinden yapılacak duyuru ile bu çalışmaya katılabileceklerdir.

NASIL BİR UYGULAMA YAPILACAKTIR?

Çalışmada bakılacak olan DNA düzeyleri için sizden 2-3 mililitre olacak şekilde intravenöz yolla kan örnekleri damardan alınacaktır. Sonrasında ise size herhangi bir işlem uygulanmayacaktır. Kan örnekleri laboratuvarında tarafımızdan analizlenecektir.

SORUMLULUKLARIM NEDİR?

Hekiminizin sizin için yaptığı tavsiyelere uymadığınız durumlarda araştırmacı sizi uygulama dışı bırakabilir.

KATILIMCI SAYISI NEDİR?

Araştırmada yer alacak gönüllülerin sayısı 120 kişidir.

KATILIMIM NE KADAR SÜRECEKTİR?

Araştırma sürecinde kan verme süreciniz ve sizden tekrar kan alınması için çağırılmanız haricinde hastaneye gelmeniz gerekmemektedir.

ÇALIŞMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI YARAR NEDİR?

Sizin bu çalışmaya olan katkınız sayesinde ileride kanser olan hastalar için, DNA düzeyinde yapılacak ölçümler sayesinde kanseri önceden belirlemek ve hastalığı erken seviyelerde ortadan kaldırmak mümkün olabilecektir.

ÇALIŞMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI RİSKLER NEDİR?

Hastalarda sadece kan alma anında acı ve kan alınan yerde hafif morarmaların dışında bir risk beklenmemektedir.

ARAŞTIRMA SÜRECİNDE BİRLİKTE KULLANILMASININ SAKINCALI OLDUĞU BİLİLEN İLAÇLAR/BESİNLER NELERDİR?

Çalışma süresince birlikte kullanımının sakıncalı olduğu ilaç ve besinler yoktur.

HANGİ KOŞULLARDA ARAŞTIRMA DIŞI BIRAKILABİLİRİM?

İsteğiniz ile araştırma dışı kalabilirsiniz.

DİĞER TEDAVİLER NELERDİR?

Bu tanının tedavisinde uygulanabilecek ek/ özel uygulama bulunmamaktadır.

ARAŞTIRMA SÜRESİNCE ÇIKABİLECEK SORUNLAR İÇİN KİMİ ARAMALIYIM?

Tarih/ Versiyon: 08.12.2016

İlaç Dışı Çalışmalar İçin Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	Belge Kodu Form 17	Rev. Tarihi / No.su: 03.11.2010/EUTF00	Sayfa 1/3
---	-----------------------	---	--------------

Araştırmanın Adı: Tümör tanı ve izlemi için dolaşımdaki serbest DNA'nın tayinine yönelik spesifik bir biyosensör sistemi geliştirilmesi

Uygulama süresi boyunca araştırma hakkında ek bilgi almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun ya da diğer rahatsızlıklarınız için 02323903699 no' lu telefondan Dr. Levent YENİAY'a başvurabilirsiniz.

ÇALIŞMA KAPSAMINDAKİ GİDERLER KARŞILANACAK MIDIR?

Araştırma kapsamında yapılacak her tür tetkik, fizik muayene ve diğer araştırma masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir.

ÇALIŞMAYI DESTEKLEYEN KURUM VAR MIDIR?

Çalışma TÜBİTAK-1001 programı kapsamında desteklenmektedir.

ÇALIŞMAYA KATILMAM NEDENİYLE HERHANGİ BİR ÖDEME YAPILACAK MIDIR?

Bu araştırmada yer almanızla ilişkili size herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

ARAŞTIRMAYA KATILMAYI KABUL ETMEMEM VEYA ARAŞTIRMADAN AYRILMAM DURUMUNDA NE YAPMAM GEREKİR?

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; reddetme veya vazgeçme durumunda bile sonraki bakımınız garanti altına alınacaktır. Araştırmacı; çalışma programını aksatmanız, tetkik ve tahlilleri yaptırmayı kabul etmemeniz, işlemlerle ilgili bir yan etkiye maruz kalmanız durumunda isteğiniz dışında ancak bilginiz dahilinde sizi araştırmadan çıkarabilir. Bu durumda da sonraki bakımınız garanti altına alınacaktır.

Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilir.

KATILMAMA İLİŞKİN BİLGİLER KONUSUNDA GİZLİLİK SAĞLANABİLECEK MIDİR?

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlanırsa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz. Ancak çıkan sonuçların tedaviniz ile şu anda bir ilişkisi olmadığı unutulmamalıdır. Tüm çalışma sonuçlarının bilimsel ortamda yayınlanması sırasında hastaların kimlikleri gizli tutularak bilgi ve bulgularından yararlanılacaktır.

Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren 2 sayfalık metni okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırmaya yürütücüsüne yetki veriyorum ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Bu formu imzalamakla yerel yasaların bana sağladığı hakları kaybetmeyeceğimi biliyorum.

Bu formun imzalı ve tarihli bir kopyası bana verildi.

GONULLUNUN		IMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

Tarih/ Versiyon: 08.12.2016

İlaç Dışı Çalışmalar İçin Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	Belge Kodu Form 17	Rev. Tarihi / No.su: 03.11.2010/EUTF00	Sayfa 2/3
---	-----------------------	---	--------------

Araştırmanın Adı: Tümör tanı ve izlemi için dolaşımdaki serbest DNA'nın tayinine yönelik spesifik bir biyosensör sistemi geliştirilmesi

VELAYET VEYA VESAYET ALTINDA BULUNANLAR İÇİN VELİ VEYA VASİNİN		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

ARAŞTIRMA EKİBİNDE YER ALAN VE YETKİN BİR ARAŞTIRMACININ		İMZASI
ADI & SOYADI		
TARİH		

GEREKTİĞİ DURUMLARDA TANIK		İMZASI
ADI & SOYADI		
GÖREVİ		
TARİH		

Tarih/ Versiyon: 08.12.2016

İlaç Dışı Çalışmalar İçin Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	Belge Kodu Form 17	Rev. Tarihi / No.su: 03.11.2010/EUTF00	Sayfa 3/3
---	-----------------------	---	--------------

TÜMÖR TANI VE İZLEMİ İÇİN DOLAŞIMDAKİ SERBEST DNA'NIN TAYİNİNE YÖNELİK SPESİFİK BİR BİYOSENSÖR SİSTEMİ GELİŞTİRİLMESİ	
OLGU KAYIT FORMU 22 ARALIK 2016 / Versiyon 1.1	
OLGU NO	: __ __ __ __

BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR	
BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR ALINDI MI?	☐ EVET ☐ HAYIR
BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR ALINMA TARİHİ	__ __ / __ __ / __ __ g g a a y y
ÇALIŞMAYA UYGUNLUK	
HASTA ÇALIŞMA İÇİN UYGUN MU?	☐ EVET, KİŞİ ÇALIŞMA İÇİN UYGUN ☐ HAYIR, KİŞİ ÇALIŞMA İÇİN UYGUN DEĞİL

OLGU NO	I _ II _ III _ IV _
TARİH	I _ II _ III _ / I _ II _ III _ / I _ II _ III _

ÇALIŞMAYA ALINMA KRİTERLERİ Hastanın çalışmaya alınabilmesi için bütün alınma kriterleri için EVET işaretlenmelidir.	EVET	HAYIR
18-100 yaş arası kadın sağlıklı kişi	☐	☐
Kanser tanısı konmuş	☐	☐
ÇALIŞMAYA ALINMAMA KRİTERLERİ Hastanın çalışmaya alınabilmesi için bütün alınmama kriterleri için HAYIR işaretlenmelidir.	EVET	HAYIR
Son 3 hafta içinde antibiyotik, vb ilaç alınıcı	☐	☐
Son 3 gün içinde sigara-alkol kullanımı	☐	☐
Trombotik veya hematolojik hastalık olması	☐	☐
Trombosit fonksiyonunu bozan herhangi bir ilaç kullanması	☐	☐
Bilinen renal veya hepatik yetmezlik olması	☐	☐
Kronik infeksiyon gibi kronik bir hastalık olması	☐	☐
Alkol kullanıyor olmak	☐	☐
Kalp yetmezliği öyküsü olması	☐	☐
Erkeklerde Hg<12,5g/dl, kadınlarda Hg<11,5 g/dl olması	☐	☐
Hipertansiyon dışında bilinen aterosklerotik bir hastalığının (geçirilmiş MI,SVO., renal arter stenozu...)olması	☐	☐

Teşekkür

Akademik hayatımın olgunlaşmasına sağladığı ve hayatıma kattığı vizyon ve bakış açısından ötürü danışmanım Prof. Dr. Ferhan SAĞIN’a,

Maddi ve manevi olarak desteğini esirgemeyen aileme,

Tez projeme yaptığı katkılardan ötürü, Prof. Dr. Dilek ODACI DEMİRKOL ve Doç. Dr. Levent YENİAY’a,

Bir üyesi olmaktan her zaman mutluluk duyduğum Ege Üniversitesi’ne

Tez projemi 217S353 numaralı TÜBİTAK-1001 projesi ve TÜBİTAK-BİDEB 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı ile maddi olarak destekleyen TÜBİTAK’a,

Teşekkür ederim.

İzmir, 28.12.2020

Zihni Onur UYGUN

Özgeçmiş

ZİHNİ ONUR UYGUN

Ege University, Faculty of
Medicine
Department of Medical
Biochemistry
Bornova İzmir 35100
TURKEY

+905065210009
onur_uygun@hotmail.com
<https://www.linkedin.com/in/zihnionuruygun/>

Positions

Research Assistant in Ege University since 2014
Founder: Denosens Biotechnology (Start-Up) 2016-2018

Experimental and Instrumental Skills

Biochemistry, Biosensor, Analytical Chemistry, Electrochemistry, Mobile phone based point-of-care diagnostic device, POCTs and Patient interface designs, HPLC, Tandem Mass Spectrometry, Spectrophotometry, ELISA.

EDUCATION

Bachelor's Degree

Ege University
Biochemistry 2005-2010
Degree: 3.07/4.00 Good

Master of Science

Onsekiz Mart University
Analytical Chemistry 2010-2012
Degree: 3.67/4.00 Very Good

Thesis: Development of electrochemical impedance-based sensor for the detection of pesticides type organophosphate(Published)

Master of Science

Ege University
Medical Biochemistry 2014-2016
Degree: 3.54/4.00 Very Good

Thesis: Development of molecularly imprinted chromatographic column material for glycosaminoglycan detection in urine (Published)

Philosophy of Doctorate

Ege University
Medical Biochemistry 2016-2020
Degree: 3.86
PhD candidate

Thesis: Development of a specific biosensor system for the determination of circulating free DNA for tumor diagnosis and monitoring (Published)

AWARDS and BURSARIES

1. 20th FEBS Young Scientists' Forum (YSF) Bursary Lovran, Croatia, 30 June - 3 July 2021.
2. 27th Balkan Clinical Laboratory Federation (BCLF) and the 30th National TBS: Poster Award Winner
 - Ultrasensitive Blood Sugar Monitoring by Mobile Phone Integrated, Reusable BorA-MeTiN Composite Sensors
3. Çanakkale Project Challenge: 1st Place Çanakkale Special Award \$ 7 000
 - Point-of-care environmental pollution sensor design by using mobile phone as detector
4. Turkish Electro Technology Exporters' Association (TET): Smart Health and Medical 3rd Place Project Grant 2017, \$ 2 500
 - Reusable glucose monitoring sensor compatible to mobile phones
5. TUBITAK-2211C (Scientific and Technological Research Council of Turkey) Domestic Priority Fields PhD Degree Program Monthly Bursary April 2017-continuing
 - Biosensors and bioelectronics field
6. Royal Academy of Engineering-UK, Leaders in Innovation Programme, 6 Months, 2017
7. TUBITAK (Scientific and Technological Research Council of Turkey), 2150218 Young Entrepreneurship Program Award 16 Months, \$ 40 000
 - Development of fully reusable glucose monitoring sensor technology
8. TUBITAK (Scientific and Technological Research Council of Turkey), 2238-University Innovation Contest-Finalist (2016)
 - Smart water pollutant sensors
9. FEBS Young Lecturer Bursary, FEBS Education Workshop / Young Lecturer Bursary, 30-31 March 2015, Cambridge UK
10. 9th International Electrochemistry Meeting in Turkey, 2011, 3rd Place Poster Award
 - VEGF detection in blood by impedimetric biosensors
11. TUBITAK (Scientific and Technological Research Council of Turkey) 109T172 Project Grant, 10 Months
 - Development of cancer biomarker biosensors

PUBLICATIONS

Duygu Harmancı, **Zihni Onur Uygun**, Ayşe Koçak, Cenk Demirdöver, Ferhan Sağın, Gül Akdoğan. Rapid Fibroblast Cell Culture Characterization with Impedimetric Label-free Heat Shock Protein - 47 Biosensor. *Electroanalysis* October 2020, Volume 32, Issue 10, pp 2310-2315. DOI:10.1002/elan.202060264.

Zihni Onur Uygun, Levent Yeniay, Ferhan Girgin Sağın. CRISPR-dCas9 powered impedimetric biosensor for label-free detection of circulating tumor DNAs. *Analytica Chimica Acta* Volume 1121, 18 July 2020 Pages 35-41. DOI: 10.1016/j.aca.2020.04.009.

Hilmiye Deniz Ertuğrul Uygun, **Zihni Onur Uygun**, Erhan Canbay, Ferhan Girgin Sağın, Ebru Sezer. Non-invasive cortisol detection in saliva by using molecularly cortisol imprinted fullerene-acrylamide modified screen printed electrodes. *Talanta*, Volume 206, 1 January 2020, Article 120225. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.120225.

Zihni Onur Uygun, Hilmiye Deniz Ertuğrul Uygun. A Novel Chronoimpedimetric Glucose Sensor in Real Blood Samples Modified by Glucose-Imprinted Pyrrole-Aminophenylboronic Acid Modified Screen Printed Electrode. *Electroanalysis* 2020, 32, 226–229. DOI: 10.1002/elan.201900537.

Zihni Onur Uygun, Burcu Okutucu, Şükriye Hacikara, Ferhan Sağın. Development of molecularly imprinted Acrylamide-Acrylamido phenylboronic acid copolymer microbeads for selective glycosaminoglycan separation in children urine. *Turk J Biochem* 2019. DOI: 10.1515/tjb-2018-0413.

Zihni Onur Uygun, Çağdaş Şahin, Merve Yılmaz, Yasemin Akçay, Ali Akdemir, Ferhan Sağın, Fullerene-PAMAM(G5) composite modified impedimetric biosensor to detect Fetuin-A in real blood samples. *Analytical Biochemistry*. Volume 542, 1 February 2018, Pages 11-15.

Niousha Kazemzadehshar, **Zihni Onur Uygun**, Hadi Sagin, Ferhan Sagin, Scientometric analysis of the last decade's postgraduate theses in the subject area of biochemistry in Turkey: evidence from Turkish Higher Education Council's Theses Database, *The FEBS Journal* 283 (Suppl. 1) (2016) pp 276 DOI: 10.1111/febs.13808

Zihni Onur Uygun, Hilmiye Deniz Ertuğrul Uygun, A short footnote: Circuit design for faradaic impedimetric sensors and biosensors *Sensors and Actuators:B*, 202, 2014, pp. 448-453.

Zihni Onur Uygun, Yusuf Dilgin, A novel impedimetric sensor based on molecularly imprinted polypyrrole modified pencil graphite electrode for the trace level determination of Chlorpyrifos, *Sensors and Actuators:B*, 188, 2013, pp. 78-84.

Mustafa Kemal Sezgintürk, **Zihni Onur Uygun**, An Impedimetric VEGF Biosensor Based PAMAM/Cysteamine Modified Gold Electrodes for Monitoring of Tumor Growth. *Analytical Biochemistry*, 423, 2, 2012, pp. 277-285.

Zihni Onur Uygun, Mustafa Kemal Sezgintürk, A novel, ultra-sensible biosensor built by layer-by-layer covalent attachment of a receptor for diagnosis of tumor growth, *Analytica Chimica Acta*, 706, 2, 2011, pp.343-348.



BOOK PUBLICATIONS

Chapter: Zihni Onur Uygun, Hilmiye Deniz Ertuğrul Uygun, Ferhan Sağın. Biosensor - Current and Novel Strategies for Biosensing: Nucleic acids based electrochemical biosensor technology. ISBN 978-1-83962-438-4, IntechOpen - 2020.

Chapter: Hilmiye Deniz ERTUĞRUL UYGUN, Zihni Onur UYGUN Smart Nanosystems for Biomedicine, Optoelectronics and Catalysis: Fullerene Based Sensor and Biosensor Technologies. ISBN 978-1-83880-254-7, IntechOpen - 2020

Chapter: Zihni Onur Uygun, Burcu Okutucu, Nanomaterials: Fundamentals and Applications: Sythesis and Characterization of Nanomaterials. pp. 85. ISBN: 978-975-491-474-0, Palme Kitabevi - 2018.

Chapter: Zihni Onur Uygun, Burcu Okutucu, Nanomaterials: Fundamentals and Applications: Biomedical Applications of Nanomaterials. pp. 103. ISBN: 978-975-491-474-0, Palme Kitabevi - 2018.

Chapter: Zihni Onur Uygun, Hilmiye Deniz Ertuğrul Uygun, Nihal Ermiş, Erhan Canbay, Biosensors-Micro and Nanoscale Applications: Molecularly Imprinted Sensors – New Sensing Technologies, pp. 85-108. ISBN 978-953-51-2173-2. InTech - 2015.

Chapter: Hilmiye Deniz Ertuğrul, Zihni Onur Uygun, State of the Art in Biosensors – General Aspects: Impedimetric Biosensors for Label-free and Enzymless Detection. pp. 179-196 ISBN 978-953-51-1004-0. InTech - 2013

Chapter: Zihni Onur Uygun, Mustafa Kemal Sezgintürk, Biosensors - Emerging Materials and Applications: Biosensors for Cancer Biomarkers, pp. 499-544. ISBN 978-953-307-328-6, InTech, 2011.

MEMBERSHIP, EDITORSHIP and REVIEWERSHIP

The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC), Committee on Mobile Health and Bioengineering in Laboratory Medicine (C-MHBLM) Corresponding Member since 2018.

International Journal of Environmental Analytical Chemistry (Print ISSN: 0306-7319 Online ISSN: 1029-0397) as Reviewer since 2014.

FEBS Advanced Lecture Course: 360 LYSOSOME: from function to genomics, from function to disease as Editor 2014.

Turkish Journal of Biochemistry as Technical-Language Editor, 2016-continuing

Bioelectrochemistry (ISSN: 1567-5394) as Reviewer since 2015

PRESENTATIONS

Oral Presentations

Zihni Onur Uygun, Hilmiye Deniz Ertuğrul Uygun, Sinem Nur Şengöz Coşkun, Yasemin Akçay, Şevki Çetinkalp, Ferhan Sağın. Development and validation of a biosensor for measurement of serum hypoxia-inducible factor-1. XXVII. Balkan Clinical Laboratory Federation Meeting BCLF 2019, XXX. National Congress of the Turkish Biochemical Society TBS 2019 27-31 October 2019, Antalya, Turkey.

Zihni Onur Uygun, Hilmiye Deniz Ertuğrul Uygun, Ferhan Sağın, Diyabet İzleminde Biyobelirteç Tayin Modifikasyonu: Yeniden Kullanılabilir, Yeni Nesil Glukoz Ölçüm Stripleri. II. Türkiye in vitro Diyagnostik Sempozyumu. 10-12 May 2017. İzmir, Turkey

Zihni Onur Uygun, Hilmiye Deniz Ertuğrul Uygun, Bilimin Ürüne Dönüşmesinde Bir Şirketleşme Öyküsü: Denosens Start-Up. II. Türkiye in vitro Diyagnostik Sempozyumu. 10-12 May 2017. İzmir, Turkey

Zihni Onur Uygun, Yusuf Dilgin, Low Cost and Highly Selective Electrochemical Imprinted Sensor for Pesticide, Chlorpyrifos, Detection. XXIII International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics Malmoe, Sweden from 14-18 June, 2015.

Poster Presentations

Zihni Onur Uygun, Hilmiye Deniz Ertuğrul Uygun, Ferhan Sağın. Ultrasensitive blood sugar monitoring by mobile phone integrated, reusable BorA-MeTiN composite sensors. XXVII. Balkan Clinical Laboratory Federation Meeting BCLF 2019, XXX. National Congress of the Turkish Biochemical Society TBS 2019 27-31 October 2019, Antalya, Turkey.

Zihni Onur Uygun. Direct mobile phone integrated new generation blood glucose monitoring strips. 19-23 MAY 23rd IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Barcelone, Spain. Clinica Chimica Acta, Volume 493, Supplement 1, Pages S1-S776 (June 2019). DOI: 10.1016/j.cca.2019.03.080

Zihni Onur Uygun, Ferhan Sağın, Burcu Okutucu, Sukriye Hacikara, Development of a biomimetic affinity column coupled to tandem mass spectrometry by molecular imprinting for specific glycosaminoglycan separation from urine. The FEBS Journal 283 (Suppl. 1) (2016) pp 314 DOI: 10.1111/febs.13808

Zihni Onur Uygun, Ferhan Girgin Sağın, Benefits and satisfaction with mentor relationships - evaluations based on postgraduate molecular life sciences' student perception. Turkish Journal of Biochemistry, 2015; 40 (S1).

Elif Burcu Bahadır, **Zihni Onur Uygun**, Mustafa Kemal Sezgintürk, VEGF-Receptor based Biosensor for Tumor Growth Diagnosis: A new immobilization

design by SAM of Mercaptoundecanoic acid, 27 July- 2 June 2011, 25th National Chemistry Congress in Turkey.

Mustafa Kemal Sezgintürk, **Zihni Onur Uygun**, A novel, ultra-sensible biosensor built by layer-by-layer covalent attachment of a receptor for diagnosis of tumor growth. August 26-30 2012, 4th EuCheMS Chemistry Congress Prague, Czech Republic.

Niousha Kazemzadeh Afshar, **Zihni Onur Uygun**, Ferhan Sağın, Scientometric analysis of the last decade spostgraduate theses in the subject area ofbiochemistry in Turkey evidence from Turkish Higher Education Council s Theses Database. 41st FEBS Congress. 4-7 September 2016, Çeşme, İzmir, Turkey.

Zihni Onur Uygun, Ferhan G. Sağın, Beneficiency and Satisfaction From Mentor Through Postgraduate Student Perception: Impact of Expectations And Quality-Quantity of Mentor-Student Relationship, A Joint Biochemical Society and FEBS Workshop-Enhancing Molecular Science Education March 30-31 2015, Gonville&Caius College, Cambridge, UK.

Zihni Onur Uygun, Ferhan Sağın, Burcu Okutucu, Şükriye Hacıkara, Development of a biomimetic affinity columncoupled to tandem mass spectrometry bymolecular imprinting for specificglycosaminoglycan separation from urine. 41st FEBS Congress. 4-7 September 2016, Çeşme, İzmir, Turkey.

Zihni Onur Uygun, Mustafa Kemal Sezgintürk, A Biosensor based on Electrochemical Impedance Spectroscopy for Analysis of Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF-Receptor for Immobilization by PAMAM Dendrimers, 25-29 September 2011, 9th International Electrochemistry Meeting in Turkey.

Zihni Onur Uygun, Yusuf Dilgin, Molecularly Imprinted Polypyrrole Modified Impedimetric Sensor for Chlorpyrifos Detection. 1-6 October 2012, 26th National Chemistry Congress (International Participation).