

**OTOANTİKOR PROTEİN KİNAZ -2 (PAK-2)'NİN ANALİZİ
İÇİN TEK KULLANIMLIK BİYOALGILAMA
SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE GERÇEK
ÖRNEKLERE UYGULANMASI**

Nergiz YILMAZ

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

2016

**T.C.
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ**

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**OTOANTİKOR PROTEİN KİNAZ -2 (PAK-2)'NİN ANALİZİ İÇİN TEK
KULLANIMLIK BİYOAGILAMA SİSTEMLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ VE GERÇEK ÖRNEKLERE UYGULANMASI**

Nergiz YILMAZ

KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

TEKİRDAĞ-2016

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK danışmanlığında, Nergiz YILMAZ tarafından hazırlanan ‘Otoantikör Protein Kinaz -2 (PAK-2)’nin Analizi İçin Tek Kullanımlık Biyosalgılama Sistemlerinin Geliştirilmesi ve Gerçek Örneklerle Uygulanması’ isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK *İmza :*

Jüri Üyesi :Yrd. Doç. Dr. Özgür ÖZAY *İmza:*

Jüri Üyesi :Yrd.Doç.Dr Funda ÖZTÜRK *İmza:*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

OTOANTİKOR PROTEİN KİNAZ -2 (PAK-2)'NİN ANALİZİ İÇİN TEK KULLANIMLIK BİYOAGILAMA SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE GERÇEK ÖRNEKLERE UYGULANMASI

Nergiz YILMAZ

Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

Bu tez çalışmasında, meme kanseri, baş-boyun kanseri, akciğer kanseri ve mide kanseri gibi birçok kanser hastalığında rastlanan PAK-2 (p21-Activated Kinase 2) kanser antijeni kullanılarak hassas, seçici ve tek kullanımlık bir biyosensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. İlk olarak tek kullanımlık indiyum tin oksit (ITO) PET elektrot yüzeyine 3-glisidooksipropiltrimetoksisilan ile kendiliğinden oluşan mono tabaka (SAM) oluşturuldu. Gerçekleştirilen çalışmalar sırasın PAK-2'nin ITO elektrot yüzeyine bağlanması döngüsel voltametri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi ile incelenmiştir. Oluşturulan biyosensörün başarılı sonuçlar vermesi için tüm adımlar optimize edilmiştir ve ideal tayin aralıkları belirlenmiştir. Belirlenen inkübasyon süresi ve konsantrasyonlarda en iyi şekilde elektrot yüzeyine bağlanma gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: PAK-2, kanser biyomarkerları, biyosensör, tek kullanımlık biyosensör sistemleri, ITO-Pet elektrot

2016, 50 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

**DEVELOPMENT OF SINGLE-USE BIOSENSING SYSTEM FOR THE ANALYSIS OF
AUTOANTIBODY PROTEIN KINASES 2 (PAK-2) AND ITS APPLICATIONS TO THE
REAL SAMPLES**

Nergiz YILMAZ

Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

In this study, it is aimed to develop a sensitive, selective and disposable biosensor using PAK-2 (p21-Activated Kinase 2) cancer antigen which is expressed in many cancer types such as breast cancer, head and neck cancer, lung cancer and stomach cancer . A self-assembled monolayer was formed by (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane on ITO-PET surface. Cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) techniques were applied to characterize the immobilization process and to detect. To achieve sensitive biosensor system all parameters were optimized.

Keywords: PAK-2, cancer biomarkers, biosensor, disposable biosensor systems, ITO-Pet electrode

2016, 50 pages

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLO DİZİNİ	vi
ŞEKİL DİZİNİ	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	ix
TEŞEKKÜR	x
1.GİRİŞ	1
2. KAYNAKSAL TEMELLER	2
2.1 Kanser Biyokimyası.....	2
2.2 Kanser Biyomarkerları.....	7
2.3 PAK-2	9
2.4 3-Glisidoksipropiltrimetoksisilan (3- GPTMS).....	10
2.5 Biyosensörler	10
2.5.1 Biyoreseptörler	11
2.5.2 Biyokatalitik esaslı biyosensörler	11
2.5.3 Biyoaffinite esaslı biyosensörler.....	11
2.5.4 İleticiler (Transduserler)	12
2.5.5 İmmünosensörler ve immünosensörlerin sınıflandırılması.....	13
2.5.6 Elektrokimyasal immünosensörler.....	14
2.5.7 Antikorlar.....	15
2.5.7.1 Antikor-Antijen bağlanma gücü.....	16
3. MATERYAL ve YÖNTEM	18
3.1 Materyal.....	18
3.2 Elektrokimyasal Ölçümler.....	18
3.3. Ölçüm Prosedürleri.....	18
3.4. İmmobilizasyon basamakları.....	19
3.4.1. OH tabakası oluşturma.....	19

3.4.2.Uygulanan işlemler ve koşulları.....	19
3.4.3 İmmobilizasyon sonrası PAK2.....	20
3.5 Optimizasyon basamakları.....	20
3.5.1.3-glisioksipropiltrimetoksisilan (3-GPTMS) konsantrasyon optimizasyonu.....	20
3.5.2 Anti-PAK2 konsantrasyon optimizasyonu.....	20
3.5.3Anti-PAK2 inkübasyon süresi optimizasyonu.....	20
3.5.4. PAK2 inkübasyon süresi optimizasyonu.....	21
3.6. Karakterizasyon çalışmaları.....	21
3.6.1 İdeal tayin aralığının belirlenmesi.....	21
3.6.2 Tekrarlanabilirlik.....	21
3.6.3. Tekrar üretilebilirlik.....	21
3.6.4. Geliştirilen biyosensörün depo ömrü.....	22
3.6.5. Rejenerasyon.....	22
3.6.6. İdeal tayin aralığının SWV ölçümleri.....	22
3.6.7. Sabit frekansta PAK2 bağlantısı.....	23
3.6.8. Serum örneklerinde PAK2 tayini.....	23
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	24
4.1.PAK2 Biyosensörünün İmmobilizasyonu.....	24
4.2. Optimizasyon Basamaklarının Bulguları.....	26
4.2.1 3-glisioksipropiltrimetoksisilan (3-GPTMS) konsantrasyon bulguları.....	26
4.2.2. AntiPAK2 konsantrasyonu optimizasyon bulguları.....	28
4.2.3.AntiPAK2 inkübasyon süresi optimizasyonu bulguları.....	30
4.2.4.PAK2 inkübasyon süre optimizasyonu bulguları.....	32
4.3. Karakterizasyon çalışmaları.....	34
4.3.1 Kalibrasyon Grafiği.....	34
4.3.2.Tekrarlanabilirlik bulguları.....	36
4.3.3. Tekrar üretilebilirlik bulguları.....	37
4.3.4. Geliştirilen Biyosensörün Depo Ömrü Bulguları.....	38
4.3.5. Rejenerasyon Bulguları.....	39
4.3.6. Kare dalga voltametri (SWV)	40
4.3.7. Sabit Frekans ile Ölçüm Bulguları	41
4.3.8. Biyosensörün SEM Görüntüleri	42
4.3.9.Serum örnekleri ile Çalışma bulguları.....	43

5. SONUÇ	45
6. KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	50

TABLO DİZİNİ

Tablo.1 İdeal Biyomarkerın özellikleri	7
Tablo.2Kanser tayininde kullanılan antikor bazlı biyomarker türlerine örnekler.....	8
Tablo.3 Farklı 3-GPTMS konsantrasyonu ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrilerinin sonuçları.....	27
Tablo.4 Farklı antiPAK2 konsantrasyonu ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrilerinin sonuçları.....	29
Tablo-5 Farklı antiPAK2 inkübasyon süreleri ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrilerinin sonuçları.....	31
Tablo-6 Farklı PAK2 inkübasyon süreleri ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrilerinin sonuçları.....	33
Tablo-7 Tekrar üretilebilirlik çalışmalarının standart eğri değerleri.....	38
Tablo-8 Geliştirilen biyosensör ile, 8 sağlıklı bireyin kan serumunda, PAK2 konsantrasyon tayininden elde edilen, PAK2 konsantrasyon (pg/mL) sonuçları.....	44

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil.1 DNA Onarım Fonksiyonları	2
Şekil.2 Hücre siklusunun şematik görünümü	4
Şekil.3 Kanser oluşumu mekanizması.....	5
Şekil.4Biyosensörlerin genel çalışma mekanizması.....	11
Şekil.5 Biyosensör tasarımında kullanılan iletim sistemleri.....	12
Şekil.6İmmünoensörlerin çalışma prensibinin şematik gösterimi.....	15
Şekil.7 IgG molekülünün şematik gösterimi.....	16
Şekil.8 Antijen-Antikor bağlanmasında etkili olan kuvvetler.....	17
Şekil.9 Şematik olarak ITO-Pet elektrot yüzeyinde gerçekleştirilen işlemler.....	25
Şekil.10 İmmobilizasyon adımlarına ait CV ve EIS eğrileri.....	26
Şekil.11 Farklı 3-GPTMS konsantrasyonları.....	27
Şekil.12 %0,5'lik 3-GPTMS ile hazırlanan ITO-Pet elektrot biyosensör sistemlerinin farklı PAK2 konsantrasyonlardaki EIS ve CV ölçümleri.....	28
Şekil.13 Farklı antiPAK2 konsantrasyonları.....	29
Şekil.14 3,75ng/mL antiPAK2 ile hazırlanan ITO-Pet elektrot biyosensör sistemlerinin farklı PAK2 konsantrasyonlardaki EIS ve CV ölçümleri.....	30
Şekil.15 Farklı antiPAK2 inkübasyon süreleri.....	31
Şekil.16 45 dakika antiPAK2 ile hazırlanan ITO-Pet elektrot biyosensör sistemlerinin farklı PAK2 konsantrasyonlardaki EIS ve CV ölçümleri.....	32
Şekil.17 Farklı PAK2 inkübasyon süreleri.....	33
Şekil.18 30 dakika PAK2 ile hazırlanan ITO-Pet elektrot biyosensör sistemlerinin farklı PAK2 konsantrasyonlardaki EIS ve CV ölçümleri.....	34
Şekil.19 Optimum koşullar altında belirlenen kalibrasyon grafiği.....	35
Şekil.20 ITO-Pet elektrot biyosensör sistemlerinin farklı PAK2 konsantrasyonlardaki EIS ve CV ölçümleri	36
Şekil.21 Tekrar üretilebilirlik çalışmalarının standart eğrileri.....	37

Şekil.22 Haftalık depo ömrü.....	39
Şekil.23 Rejenerasyon çalışmasının sonuçlarının grafikteki görünümü.....	40
Şekil.24 SWV sonuçlarından elde edilen standart grafik.....	40
Şekil.25 Belirlenen tayin aralığının SWV ile ölçümleri.....	41
Şekil.26 Sabit frekansta biyosensör yüzeyine PAK-2 bağlanışının ölçümleri: mavi; sabit frekans ölçümü, kırmızı; faz açısı ölçümü.....	42
Şekil.27 SEM cihazı ile Biyosensörün Yüzeyindeki 3-GPTMS, AntiPAK2, BSA ve PAK2 Görüntüleri.....	43

KISALTMALAR DİZİNİ

BSA	: Bovine albümin serum
3-GPTMS	: 3- glisidooksipropiltrimetoksisilan
CV	: Döngüsel voltametri
EIS	: İmpedans spektroskopisi
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$: Ferri-Ferrosiyonür çözeltisi
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
ITO-PET	: İndiyum tin oksit polietilen elektrot
PAK-2	: Protein Kinaz -2
NH_4OH	: Amonyum hidroksit
SAM	: Kendiliğinden oluşan monotabaka
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SWV	: Karedalga voltametrisi

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım ve tez hazırlama sırasında bilgi ve tecrübeleriyle bana her konuda yardımcı olan danışman hocam Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK'e,

Maddi manevi her türlü desteęi hiçbir zaman benden esirgemeyen, mutluluęumun ve gururumun sebebi sevgili aileme,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını ve bilgisini esirgemeyen arkadaşım Burçak DEMİRBAKAN, Burcu ÖZCAN, Münteha Nur SONUÇ ve tüm çalışma arkadaşlarıma,

Bu araştırma kapsamında kullanılan tüm kimyasal, cihaz ve donanım, **113 Z 678** numaralı **TÜBİTAK** projesi tarafından sağlanmıştır. Katkılarından dolayı **TÜBİTAK**'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

1. GİRİŞ

Yaşamımızı sürdürebilmemiz için hücrelerimizin sürekli yenilenmesi gerekir. Yaşam süresini dolduran hücreler vücuttan atılırlarken yerlerine yenileri gelir. Bu denge genlerin kontrolü altındadır. Bazı genler hücrelerin bölünüp çoğalmasını sağlarken, bazıları da aşırı hücre üremesini önlerler (**Aliustaoğlu 2009**).

Kanser, hücrelerde DNA'nın hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalmasdır (**Abalı 2014**). Tüm kanserler, DNA dizisindeki birtakım anormalliklerle oluşmaktadır. Kanserlerin %10- 15 inin, kalıtsal olduğu yani ebeveynlerden gelen genlerle aktarıldığı, geriye kalan %85-90' lık kısmını ise yaşam boyunca canlı hücrelerdeki DNA'nın, mutajenlere maruz kalması, hücre DNA'sındaki hafif progressif değişiklikler ve replikasyonda hatalar oluşması ile şekillendiği düşünülmektedir. Bazen oluşan bu mutasyonlardan biri, içinde bulunduğu hücrenin büyümesini ve bu hücreden türeyen bir kanser klonunun oluşmasını sağlar (**Yokuş 2012**).

Kanser, günümüzde tüm dünya ülkeleri için büyük sorun teşkil eden hastalıkların başında gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) bağlı Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumunun (IARC) 2030 yılı için öngörüsü, kanserin ölüm nedenleri arasında birinci sırada olacağı yönündedir (**Tekin 2011**).

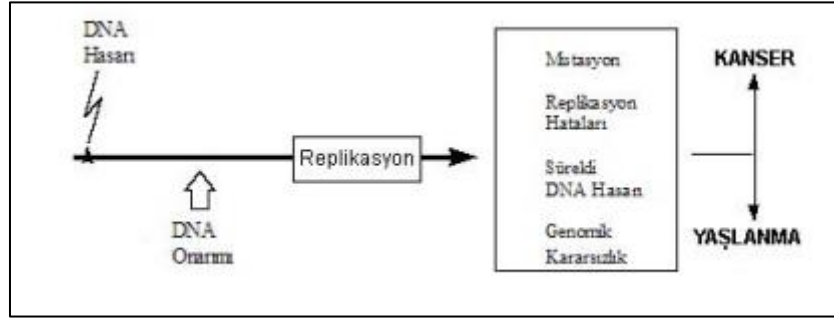
Yapılan bilimsel çalışmalarla kanserin teşhis oranı durmadan artmaktadır. Bu durum, kanserin kazanılabilir bir savaş olması yönünde ümit vericidir. Kanser tanı ve tedavisinde, kanser biyomarkerlerinin kullanımı ile spesifik biyosensörler geliştirilmiştir.

Bu tez çalışmasında, meme kanseri, baş-boyun kanseri, akciğer kanseri ve mide kanseri gibi birçok kanser hastalığında rastlanan PAK-2 (p21-Activated kinase 2) kanser antijenini kullanarak hassas, seçici ve tek kullanımlık bir biyosensör geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAKSAL TEMELLER

2.1. Kansere Biyokimyası

Tüm organizmalar (bakteri, maya, drosophila, balıklar ve insanlar dahil), hücreleri çevresel hasarlara karşı korumak amacıyla DNA onarım mekanizması içerirler. DNA onarımı, hücre ölümünü, mutasyonu, replikasyon hatalarını, DNA hasarının devamlılığını ve genomik kararsızlığı azaltan bütün işlemlerde kullanılır. Bütün bu işlemlerde görülen herhangi bir anormallik kansere ve yaşlanmaya yol açar. Farklı biyokimyasal stratejileri kullanan birçok mekanizma DNA hasarının birçok şeklini onarır. DNA onarım genleri, genomun önemli bir bölümünden sorumludur.



Şekil.1 DNA Onarım Fonksiyonları(Kantarıcı ve ark.2006)

Mutasyon genetik materyaldeki kalıtsal değişikliklerdir. Bu değişiklik gamet hücrelerinde ya da somatik hücrelerde olabilir. Gamet hücrelerindeki, sonraki nesillere aktarıldığı için, somatik hücrelerdeki, kansere neden olabildiği için önemlidir (Kantarıcı ve ark.2006).

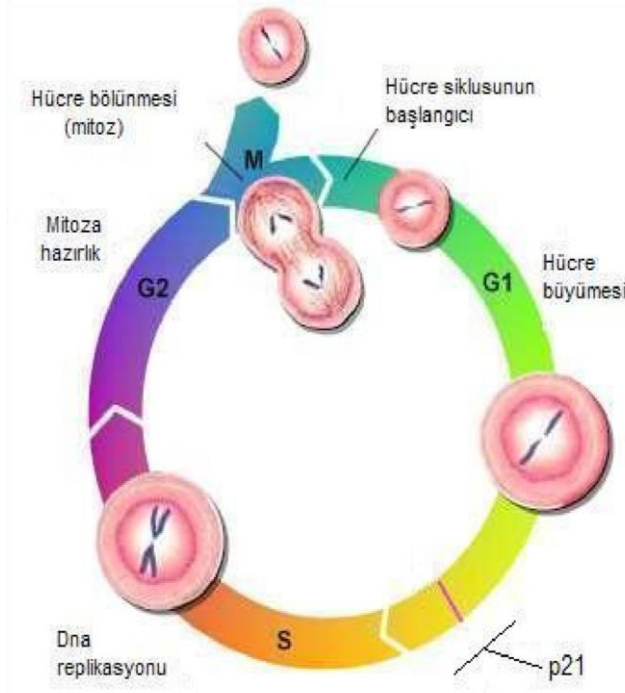
Kanserlerin yalnızca %1'i genetik taşıyım ile oluşur. Kalıtım ile edinilen bazı genlerdeki bozukluklar özellikle çocukluk çağındaki kanserleri oluşturur. Fakat BRCA1 ve BRCA2 gibi genlerdeki bozukluklar, ileri yaşlarda kanser oluşumuna sebebiyet verebilir. Örneğin bu mutasyonlu genlere sahip kadınlarda göğüs kanseri riskinin normal popülasyona göre %80 arttığı gözlenmiştir. Yaşamsal fonksiyonlar için gerekli olan kimyasallar, genlerdeki kodlara göre sentezlenir ve metabolik faaliyetlerde kullanılır. Bu faaliyetler sonucu ortaya çıkan çoğu kimyasal, vücudu korumak için vücuttan atılır (detoksifikasyon). Bu metabolik tepkimeler sonucu oluşan bazı kimyasallar, DNA hasarına neden olarak kanseri tetikleyebilir. Metabolik faaliyet hızına ve ortaya çıkan metabolik ürünün veya kimyasalın kanserojen olup olmamasına göre kanser riski artar veya azalır. Kanserlerin geriye kalan %99'luk oranı insanların yeme

içme alışkanlıkları, çalışma şartları, yaşam ortamları, maruz kaldıkları doğal veya yapay radyasyon ve kanserojen kimyasallara bağlıdır. Bunlar çevresel kanser risk faktörleri olarak adlandırılır.

Nöronlar ve kas hücreleri gibi bazı hücreler belirli bir yaştan itibaren sayıca sabit kalırlar. Boyutları büyüyebilir veya diğer hücrelerle olan bağlantı sayıları artabilir; fakat hücre sayıları değişmez. Kanser oluşumları genelde böyle sabit dokularda değil de hücrelerin sürekli yenilendiği dinamik dokularda gelişir.

Mitotik hücre bölünmeleri, somatik hücrelerde (vücut hücreleri) gerçekleşen, bölünme sonucunda genetik bilgileri ana hücrenin aynısı olan iki yeni hücrenin oluştuğu bölünmelerdir. Mitotik bölünmenin interfaz evresinin S fazında DNA dublikasyonu gerçekleşerek genetik materyal iki katına çıkar. DNA dublikasyonu ve rekombinasyonu esnasında çeşitli sebeplerle mutasyonlar ve hatalar meydana gelebilir. Çoğu mutasyon ve hata, anlık olarak hücrenin ölümüyle elimine edilir. Ancak gerçekleşen mutasyonlar bazı durumlarda somatik hücrelere yaşamsal avantaj sağlar ve bu mutasyonlar mitotik bölünmeler ile yeni (progen) hücrelere aktarılır. Progen hücrelerden bazıları mutasyon sayesinde ortam şartlarına daha uygun adaptasyon sağlar ve taşıdığı mutasyonu mitotik bölünmeler ile çoğaltır. Eğer bu mutasyonlu genler, hücrelerin anormal çoğalmasına sebebiyet veriyorsa, kanser genleri olarak adlandırılırlar (**Tekin 2011**).

Hücre siklusu sürekli olarak bölünen bir hücrede birbirini izleyen iki mitoz arasındaki süreci kapsar ve dört fazdan oluşur. G_1 - S- G_2 fazları üç basamaklı interfaz evresidir ve bu fazı izleyen dördüncü ve son basamak M fazıdır. G_0 fazı, vücuttaki hücrelerin büyük çoğunluğunun bulunduğu dinlenme evresi olarak isimlendirilen evredir. Uygun uyaranlar olduğunda hücreler G_1 evresine geçerek döngüye katılırlar.



Şekil.2 Hücre siklusunun şematik görünümü(Aslan 2008)

G₁ fazı: RNA ve protein sentezinin yapıldığı ve hücre siklusunun en uzun süren evresi olan G₁ fazının süresi, hücre tipine, hücrenin organizmadaki rolüne ve çevresel koşullara göre farklılık gösterebilir.

S fazı: 7-8 saat süren bu fazda DNA sentezi başlatılır. RNA ve protein sentezi de devam eder.

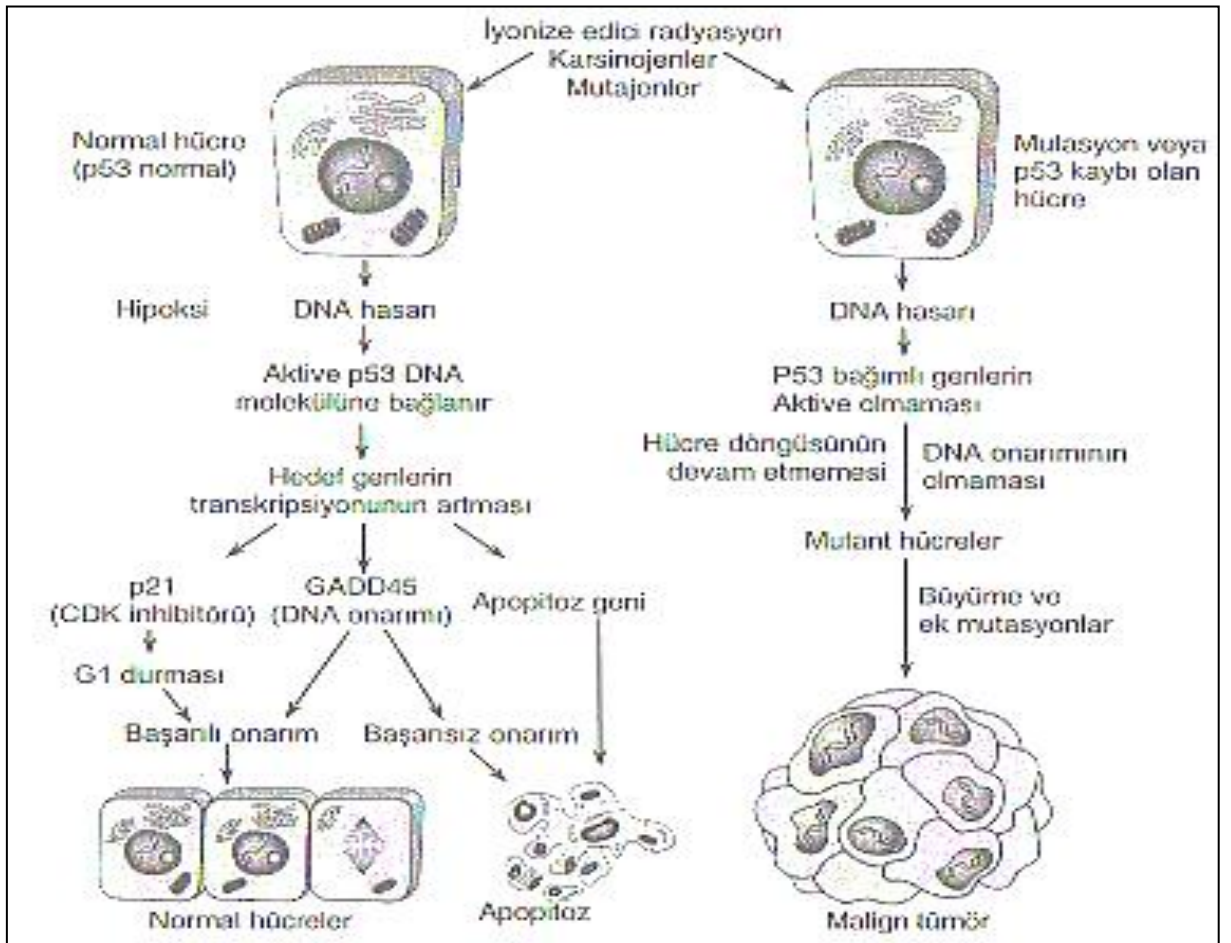
G₂ fazı: Bu faz boyunca hücrelerde DNA tamiri yapılır ve hücre mitoze hazırlanır. Eğer replike olmamış veya hasarlı DNA saptanırsa, G₂ fazında gecikme meydana gelerek bu hasar onarılmaya çalışılır. Bu kontrol noktasındaki enzimlerde oluşabilecek defektler kansere neden olabilir. Bu fazın süresi 1-6 saattir.

M fazı: 1-2 saat süren mitozun olduğu fazdır. Mitoz, hücrenin çekirdek ve sitoplazmasının bölünmesini içeren kısa bir zaman dilimidir ve iki hücre oluşmasıyla sonlanır.

Çok hücreli organizmaların gelişimi için hücre proliferasyonunun düzenli olarak kontrol edilmesi gerekmektedir. Hücre siklusu düzenlenmesi Cdk ve çeşitli düzenleyici proteinler aracılığı ile sağlanır. Siklinler, hücre siklusunun sistematik biçimde işlevini sürdürmesini sağlayan proteinlerdir. DNA sentezinin öncesinde uyarılmaya başlarlar ve artış gösterirler. Aktif Cdk kompleksinin sentezi ve inhibisyonu CdkI ile de düzenlenir. Cdk aktivitesi düzenli olarak kontrol edilmez ise bu durum artmış hücre çoğalmasına ve genomik instabiliteye neden olur ve bu da hücrenin ölümsüzlük kazanması veya

kanserleşmesi ile sonuçlanır. Hücre siklusunda Cdk'ların aktivitesini düzenleyen ve negatif kontrolünden sorumlu olan Cdk'lari 1993-1995 yıllarında tanımlanmışlardır. Cdk'lari; INK4 ve Cip/Kip olmak üzere iki alt sınıfa ayrılırlar. Her bir sınıf üyesinin inhibisyon hedefleri farklıdır. INK4 sınıf üyeleri p15, p16, p18 ve p19, Cip/Kip protein ailesi ise p21cip, p27 kip ve p57 kip2'den oluşur. DNA hasarı sonucu, Cdk inhibitörü p21' in transkripsiyonunu aktive eden p53 uyarılır. p21, siklin-Cdk komplekslerinin genel bir inhibitörüdür ve PCNA'ya bağlanarak DNA replikasyonunu inhibe eder. Böylece hücre siklusu durdurularak, hasarlı DNA'nın replike olmadan önce onarılması için gerekli zaman sağlanır (Aslan 2008)

Normalde hücre bölünmesini baskılayan proteinleri (p15, p16, p21, p27 gibi CDK inhibitörü proteinler) kodlayan ve tümör baskılayıcı genler olarak tanımlanan genlerin (antionkojenler) birinde veya birkaçındaki mutasyon da tümör oluşumuna neden olmaktadır. Apoptozu düzenleyen genlerin mutasyonu da neoplastik hücre birikimine yani kansere yol açmaktadır(Altınışık 2009).



Şekil.3 Kanser oluşumu mekanizması (Altınışık 2009)

Tümörlerden oluşturulmuş hücre kültürlerinde normal dokulardan oluşturulmuş hücre kültürlerinden farklı özellikler gözlenir. Bu hücre kültürü için transforme olmuş tanımlanır. Transforme bir hücre daha az kısıtlı şartlarda büyür, genellikle sert bir zemine tutunma ihtiyacı duymaz, bu nedenle yuvarlak şekilli görülür. Serum ihtiyaçları azalmıştır ve zeminde tek tabaka oluşturmak yerine fokus adı verilen kitlesel bir yapı gösterirler. Uygun deney hayvanlarına enjekte edildiklerinde tümörleri indüklerler. Böylece hücrelere transformasyon ve ölümsüzlük özelliği sağlayan zincirleme değişiklikler hayvanlarda tümörlerin oluşturulmasına olanak tanır.

Bazı olaylar normal hücreleri transforme hücrelere dönüştürür ve tümör oluşumuna dahil olan süreçler için model oluşturur. Kanser oluşumu için genellikle birçok genetik değişiklik gerekmektedir. Bazı nadir olgularda kansere eğilim mendel kalıtımı ile kalıtılır. Kanser oluşumu için her ne kadar ilave değişimler gerekli olsa da tek bir genetik değişiklik önemli ve gerekli bir bileşendir. Karsinogen adı verilen birçok ajan hücrelerin transformasyon sıklığını artırır. Bazen bu karsinogenler tümör gelişiminde “başlatıcı” ve “teşvik edici” olmak üzere ikiye ayrılırlar. Bu da kanserde farklı evrelerin varlığına işaret etmektedir. Karsinogenler epigenetik değişikliklere veya (daha sık) direkt ya da indirekt olarak hücre genotipinin değişmesine neden olurlar. Mutasyonları durumunda transformasyona sebep olan iki gen sınıfı vardır: Onkogenler öncelikle virüslerin sahip olduğu ve hedef hücrelerde transformasyona sebep olan genler olarak tanımlanmıştır. Viral onkogenlerin normal hücrelerde fonksiyon yapan hücresel benzerleri mevcuttur. Protoonkogen adı verilen bu hücresel genlerin mutasyonları veya anormal aktivasyonları tümör gelişimi ile ilişkilidir. Şimdiye kadar 100 onkogen tanımlanmıştır (**Kasap ve ark. 2003**).

2.2. Kanser Biyomarkerları

Kanser, heterojen bir hastalıktır. Aynı tip kanserler arasında, tümör ve metastaz odağı arasında hatta tek bir tümörü meydana getiren hücreler arasında moleküler heterojenlikler bulunmaktadır. Dolayısıyla kullanılan tüm tedaviler, sınırlı hasta alt popülasyonlarında ve hastalığın belirli evrelerinde etkilidir. Tanı ve tedavinin tek bir platformda birleştirilmesi sayesinde önce her bir tümördeki hücresel fenotipler karakterize edilip ardından hedefe yönelik tedavi uygulanabilir. Bu şekilde, genel tedaviler yerine kişiselleştirilmiş tedaviler uygulanarak tedavilerin etkinliği artırılabilir (**Oylar 2011**).

Biyomarkerlar, vücut sıvılarında veya dokularda bulunan ve kimyasal bir sürecin indikatörü görevi gören biyolojik moleküllerdir. Belirli bir enzim veya hormon

konsantrasyonu veya biyolojik bir maddenin varlığı biyomarkere örnek olarak gösterilebilir. Ayrıca biyomarkerlar hastalık riski, psikiyatrik bozukluklar, çevre etkileri ve metabolik süreç gibi sağlık durumlarını değerlendiren bir göstergedir.

Genel olarak biyomarkerlar, normal biyolojik ve patolojik süreçlerin ve tedaviye yönelik girişimlere verilen farmakolojik yanıtların indikatörleri olarak nesnel bir şekilde ölçülüp değerlendirilebilmelidir. Biyomarkerlar, hücrenin normal ve patolojik işlerini değerlendirebilen, vücut sıvılarında, dokularda ve bütün organlarda ölçülebilir miktarda bulunan, aynı zamanda tedaviye yanıt olarak miktarında değişiklik gösteren moleküllerdir **(Sharafi ve ark. 2010)**.

Biyomarker bir hastalığın teşhisinde önemli bilgiler verirken, hastalığın seyrini göstermede etkisiz kalabilir. Örneğin prostat kanserinde kullanılan Prostat Spesifik Antijen (PSA) teşhis için önemli bir parametredir, fakat hastalığın takibi için uygun bir marker değildir. Benzer şekilde ovaryum kansinomlarında kullanılan karsinoembriyonik antijen, teşhis için önemli bir gösterge olmamakla birlikte hastalığın takibinde iyi bir biyomarkerdir **(Köse 2013)**.

Tablo.1 İdeal Biyomarkerın özellikleri **(KÖSE 2013)**

<ul style="list-style-type: none"><input type="checkbox"/> Ait olduğu sistemin dışındaki bozukluklardan etkilenmemeli.<input type="checkbox"/> Analizi pahalı donanımlar gerektirmemeli.<input type="checkbox"/> Biyomarkerın sonuçları kolaylıkla yorumlanabilmeli.<input type="checkbox"/> Genel popülasyonda miktarı yaygın bir varyasyon göstermemeli.<input type="checkbox"/> Hastalığın durumu için kesin, hassas ve spesifik olmalı.<input type="checkbox"/> Ölçümü pratik ve kolay, düzeyleri hastalığın evreleri ile uyumlu olmalı.<input type="checkbox"/> Vücut doku ve sıvılarından uygun, güvenilir miktarda temin edilmeli.

Kimyasal bileşiğin kendisi (ana bileşik), metaboliti veya metabolitleri, ara ürünler, proteinler, eksozomlar ve enzimler biyomarker olarak kullanılmaktadır.

Tablo.2 Kanser tayininde kullanılan antikor bazlı biyomarker türlerine örnekler(**Mishra 2010; Bhatt ve ark. 2010**)

ATM, p53	Akciğer, baş ve boyun kanserleri
CYP1A1, RAD1, BRCA1 ve BRCA2	Meme kanseri
PGS2	Akciğer kanseri
PSA (Prostat Spesifik Antijen)	Prostat kanseri
p16, p14, APC, TIMP-3	Böbrek kanseri
Kanser antijeni 125 (CA125)	Yumurtalık kanseri
Thyroglobulin (Tg)	Tiroid kanseri
Kanser antijeni 19-9 (CA 19-9)	Mesane kanseri
Heat shock proteins (HSPs) (Isı şok proteinleri) Hsp27; Hsp70	Mide, rahim, mesane, prostat kanserleri

Tümör belirteçleri, ilgili tümör veya doku tarafından suprafizyolojik düzeylerde üretilen, biyokimyasal veya immünokimyasal yöntemlerle hastanın doku, kan veya diğer vücut sıvılarında kantitatif ölçümleri yapılabilen hormon, enzim, metabolit, immunoglobulin, veya protein yapısında maddelerdir. Ayrıca tümörle ilişkili antijenler, onkogen ve onkogen ürünlerini de içerebilir. İdeal bir tümör belirteci yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olmalı, tümör henüz küçük iken veya hasta asemptomatik iken tümörün tanınmasına ve küratif tedavinin yapılabilmesine olanak sağlamalıdır (**Üstüner ve ark. 2004**).

Tümör belirteçleri kan veya dokuda bulunan, kanserin davranışı veya varlığı ile ilgili bilgi sağlayan moleküllerdir. Biyomarkerlar habis dokuyu normal dokudan veya bir maligniteyi diğerinden ayıran, ya da bir tümör tipi içerisindeki farklı davranış paternleri gibi çeşitli özelliklerden kaynaklanırlar. Tümör belirteçleri DNA, RNA, protein, hücre veya doku düzeyinde tayin edilebilir. Son yıllarda giderek popüler hale gelen mikroRNA'lar (miRNA) gibi RNA- bazlı belirteçler ise bir mesajın aşırı veya baskılanmış ekspresyonunu tespit edebilir. Kanser için ideal belirteç pozitifliği sadece kanser hastasında saptanan, dolayısıyla

kanserin evresi ve tedavi yanıtı ile ilişkili olabilecek moleküle işaret eder (**Kılıç ve ark. 2011**).

Her ne kadar tümör belirteçlerinin yüksek düzeyleri malinitelerde görülse de birçok hormonal ve metabolik değişiklik durumunda ve benin hastalıklarda rastlanabilir. Bazen de bir tümör ileri evreye kadar ilişkili olduğu maddeyi üretmeyebilir. Bir madde tek bir tümör tipine spesifik olmayabilir. Ancak doku tanısı konmuş bir malinitenin izlenmesinde, tedavi seçimi ve tahmininde yarar sağlarlar (**Erdenen 2007**).

Kanser teşhisinde yararlanılan biyomarker hassas, seçici ve duyarlı olmalıdır. Bu çalışma esnasında kullanılan PAK-2 (protein activated kinases 2) ile hassas, duyarlı ve seçici bir biyosensör elde edilmesi amaçlanmıştır.

2.3. PAK-2

Hücre yaşamını ve hücre ölümünü düzenleyen birçok farklı sinyal molekülleri arasında p21-aktive edilmiş protein kinazlar (PAKs) vardır. p21-aktive edilmiş protein kinazlar (PAKs), p21 G proteinlerinden Rac ya da Cdc42 bağlanması ile aktive edilmiş serin/tiroin ailesidir (**Jakobi 2003**). Cdc42 ve Rac kanser yayılımı ile ilgili süreçleri ve hücre göçünü düzenlerler.

PAK ailesi hücre canlılığı, hareketliliği ve gen düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır ve böylece PAK ailesi tümör ilerlemesi sırasında kritik bir sinyal nodülü teşkil etmektedir (**Gururaj ve ark. 2004**).

p21-aktive edilmiş protein kinazlar PAK-1,PAK-2, PAK-3, PAK-4, PAK-5 ve PAK-6 olmak üzere altı üyesi vardır. PAK aile üyeleri kendi yapısal ve biyokimyasal farklılıkları dayalı iki gruba kategorize edilir: *Grup I*; PAK-1,PAK-2, PAK-3; *Grup II*; PAK-4, PAK-5 ve PAK-6 (**Tse 2014**). Grup I PAKlar için hedeflenen serin (S) de bulunan RRRRRSWYFG aminoasit motifidir. Grup I PAKlar fosfo alıcı serinden sonra büyük hidrofobik kalıntıları tercih eder. Grup II PAKlar da dizi RRRRRSWASP şeklindedir ve serinden önceki arjinin (R) serisi ile Grup I'e benzer. Grup I tarafından tercih edilen hidrofobik kalıntılara karşı, Grup II PAKlar alanini +2 de ve serini +3 olarak tercih etmektedir. Bu fosforilasyon motiflerinin tespiti, yeni alt tabakaların tanımlanması için önemlidir (**Kosoff 2015**).

PAK-1, beyin, kas, dalak ve meme bezinde bulunmaktadır. PAK-2, bütün dokularda bulunurken PAK-3 ve PAK-5 özellikle beyinde bulunmaktadır. PAK-4, prostat, testis ve kolonda, PAK-6 ise çeşitli dokularla birlikte prostatta bulunmaktadır (**Kumar 2003**).

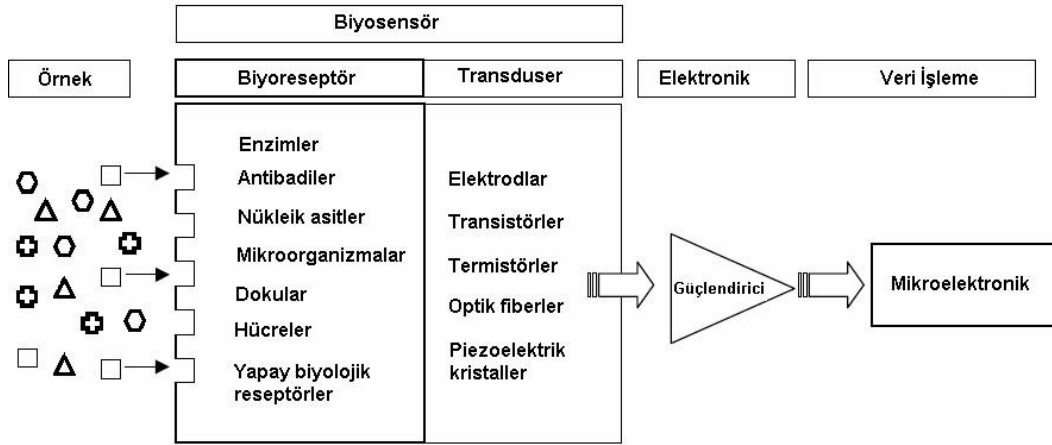
2.4. 3-Glisidooksipropiltrimetoksisilan (3- GPTMS)

Silika jel, iç bölgeye siloksan grupları (Si-O-Si) ve yüzeyde dağıtılan silanol grupları (Si-OH) içeren amorf bir inorganik polimerdir. Silika jelin inorganik veya organik fonksiyonel gruplar ile modifikasyonu, birçok uygulama imkânı nedeniyle kayda değer bir ilgi konusu olmuştur. Yüzey modifikasyonları, genellikle silanizasyon ile uygun bir organosilan ajan kullanılarak gerçekleştirilir. En çok uygulanan organo-fonksiyonel alkoksilanlardan biri 3-glisidooksipropiltrimetoksisilan (3- GPTMS) 'dir. Epoksi grupları, enzim ve proteinlerin kovalent bağlanması için uygundur. Epoksi grupları tarafından oluşturulan O-C ve N-C bağları son derece kararlıdır, böylece epoksi içeren polimerler enzim ve proteinlerin immobilizasyonu için kullanılabilir (**Park ve ark. 2003**).

2.5. Biyosensörler

Biyosensörler, analiz edilecek madde ile seçimli bir şekilde etkileşime giren biyoaktif bir bileşenin, bu madde ile etkileşimi sonucu ortaya çıkardığı sinyalin, ileten bir iletici sistemle birleştirilmesi ve bu etkileşim ürünlerinin bir ölçüm sistemi ile ölçülmesi olarak tanımlanabilir. Daha genel bir ifade ile bir biyosensör; biyolojik bir ajanla birleştirilmiş olan fiziko-kimyasal detektördür ve bu yapı istenilen ürünün analizi amacıyla kullanılmaktadır (**Bulut 2011**)

Bir biyosensör, biyolojik algılayıcı elementin seçiciliği ile hedef analitin konsantrasyonuyla orantılı olarak sinyal üreten transduserin kombinesinden oluşan bir cihazdır. Bu sinyal proton konsantrasyonundaki değişimden, amonyak ve oksijen gibi gazların salınması yada yükseltgenmesi, ışık emisyonu, absorpsiyon yada reflektans, ısı emisyonu, kütle değişimi ve bunun gibi değişimlerden kaynaklanır. Sinyal transduser yardımıyla akım, potansiyel, sıcaklık değişimi, ışığın absorpsiyonu, yada elektrokimyasal, termal, optik olarak yada piezoelektrik anlamda kütle artışıyla ölçülebilir forma dönüştürülür. Sinyal ayrıca ileriki analizler için güçlendirilebilir, işlenebilir yada depolanabilir. Prensipite herhangi bir reseptör herhangi bir transduserle birleştirilip işleyen bir biyosensör üretilebilir (**Aykut 2006**).



Şekil.4 Biyosensörlerin genel çalışma mekanizması (Aykut 2006)

2.5.1 Biyoreseptörler

Biyosensörlerin yapısında görev alan biyoreseptörler, biyosensör teknolojisinde spesifikliğin anahtarıdır ve analitlerin ilgili kısımlarının sensöre bağlanmasından sorumludur. Biyoreseptörler farklı formlarda olabilirler ve biyosensörler kullanılarak analiz edilen çok sayıda farklı analit kadar yine çok sayıda farklı biyoreseptör vardır. Bu biyoreseptörler başlıca; antikor/antijen, enzimler, nükleik asitler/DNA, hüresel yapılar/hücreler olmak üzere sınıflandırılır (Vo-Dihn ve Cullum 2000). En yaygın kullanılan biyoreseptörler enzimler ve antikorlardır.

Biyosensörler, biyokatalitik esaslı ve biyoafinite esaslı olmak üzere kullanılan biyoreseptör türüne göre iki şekilde gruplandırılabilir (Thevenot 1999).

2.5.2Biyokatalitik esaslı biyosensörler

Biyokatalitik esaslı biyosensörler, makromoleküller tarafından biyosensörün biyolojik ortamında katalizlenen bir reaksiyon temeline dayanmaktadır ve sensör yüzeyinde bulunan biyokatalizör sayesinde substratın sürekli bir tüketimi sağlanmaktadır. Biyokatalitik biyoreseptörlere, örnek olarak enzimler, hücreler ve dokular gösterilebilir (Thevenot 1999).

2.5.3 Biyoaffinite esaslı biyosensörler

Biyoaffinite esaslı biyosensörler ise makromoleküller ile analitin etkileşmesiyle gerçekleşen biyosensörlerdir. Bu etkileşim sonucu bir dengeye ulaşılır ve analit, kendisiyle kompleks oluşturan immobilize materyal ile doyurulur ve daha fazla tüketilmez (**Thevenot 1999**). Biyoaffinite esaslı biyosensörlere antikorlar/antijenler ve reseptör hücreler örnek gösterilebilir. Antijen/antikor çiftinin biyoreseptör olarak kullanıldığı biyosensörler “**immunosensör**” olarak adlandırılır. İmmunosensörlerde yüzeye immobilize edilmiş spesifik bir antikora, antijenin (analit) bağlanır ve bunun sonucu immünokimyasal bir reaksiyon meydana gelir. Oluşan bu reaksiyon son derece spesifik bir reaksiyondur. Gerçekleşen reaksiyonda bağlanma ve çekim sabiti çok büyük olması sebebiyle sistemler ya tersinir değildir (tek kullanımlık biyosensörler) ya da gerekli tampon çözeltilerin kullanılmasıyla kompleksin çözünmesi sistemin tekrar kullanımını sağlayabilir (**Thevenot 1999**).

2.5.4 İleticiler (Transduserler)

Biyoaktif tabakada meydana gelen reaksiyon ileticiler ile tayin edilebilir bir sinyale dönüşür. İmmobilizasyon için çevirici yüzey uygun olmalıdır. Analiti izlemek için sadece çevirici yeterli değildir. Çevirici analit konsantrasyonunun azalması veya ürün oluşumu gibi biyokimyasal olayları algılar. Çevirici ile sıcaklık veya kütle değişimi, potansiyel değişimi, ışığın ürün veya analit tarafından yayılması, ışığın absorbe edilmesi, elektron transferi gibi olaylar belirlenebilir (**Hou 2005**).

Transduser	Sinyal çıktısı
Elektrokimyasal <i>Amperometri</i> <i>Potansiyometri</i> <i>Kondüktometrik/impedimetrik</i>	<i>Akım</i> <i>Voltaaj</i> <i>İletkenlik/İmpedans</i>
Optik <i>Kolorimetrik</i> <i>Lüminesans</i> <i>Floresans</i> <i>Yüzey plazmon rezonans</i>	<i>Renk</i> <i>Işık şiddeti</i> <i>Işık şiddeti</i> <i>Işık şiddeti</i>
Kalorimetrik <i>Termistör (sıcaklık duyarlı sensör)</i>	<i>Sıcaklık</i>
Kütle <i>Piezoelektrik</i> <i>Quartz kristal mikrobals</i>	<i>Frekans değişimi</i> <i>Frekans değişim</i>
Manyetik <i>Paramanyetizm</i>	<i>Manyetik alan</i>

Şekil.5 Biyosensör tasarımında kullanılan iletim sistemleri(**Derkuş 2012**)

Elektrokimyasal biyosensörler, potansiyometrik, amperometrik ve kondüktometrik olarak sınıflandırılabilir (**Derkuş 2012**).

Potansiyometrik biyosensörlerde, elektrot potansiyelinin belirlenmesi doğrudan analit konsantrasyonunu tanımlamaktadır. pH veya tek değerli iyonlara duyarlı cam elektrotlar, anyon veya katyonlara duyarlı iyon seçici elektrotlar potansiyometrik biyosensörlerde kullanılan temel sensörlerdir. Amperometri genel anlamda belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümü esasına dayanır. Söz konusu akım yoğunluğu çalışma elektrodunda yükseltgenen ya da indirgenen elektroaktif türlerin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak tanımlanır. İkinci elektrot referans elektrot olarak iş görür. İlgili türlerin konsantrasyonlarının belirlenmesinde akım yoğunluklarından yararlanır. Kondüktometrik biyosensörlerde; elektriksel alanın varlığında bir çözeltide elektrik yükü, iyonlar tarafından taşınır. Çözeltinin iletkenliği çözeltideki tüm iyonik türlerin katkısıyla oluşur. Optik biyosensörler iletici sistem olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntemle uygun bir molekülün immobilize edilmesiyle hazırlanan aygıtlardır. Etkileşim sonucu meydana gelen kimyasal ya da fizikokimyasal bir değişimin ölçümünü esas alır. Örneğin optik lifin üzerine enzim immobilizasyonu ile hazırlanan enzim sensörleri, absorpsiyon, floresans, biyoluminesans gibi temel ilkeler çerçevesinde çalışır. Piezoelektrik sensörler en genel anlamda karakteristik rezonans frekansındaki farklanmayı belirleyerek bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütlelerinin ölçülmesi esasına göre çalışan gravimetrik aygıtlardır. Sensörün seçiciliği, kristal yüzeyindeki madde ile spesifik etkileşime sahip analitin birikimiyle ilişkilidir. Sensör yüzeyinde bir madde adsorblandığı veya biriktiği zaman piezoelektrik kristalin rezonans frekansındaki değişimin ölçülmesiyle sonuca ulaşılır. Termal biyosensörler (kalorimetrik) enzim termistörleri ya da entalpimetrik enzim sensörleri olarak da adlandırılırlar. Temel ilkesi, bir enzimatik reaksiyondaki entalpi değişiminden yararlanarak substrat konsantrasyonunun belirlenmesidir (**Derkuş 2012**).

2.5.5 İmmünosensörler ve immünosensörlerin sınıflandırılması

İmmünosensörler, uygun antijen ile antikorun kompleks oluşumu için immünoaktif maddelerin kullanıldığı bir biyosensör tipidir ve bu durumda gerçekleşen antikor-antijen reaksiyonu son derece seçicidir (**Parkinson ve Pejcic 2005**).

Klasik immünotest yaklaşımı ile immünosensör teknolojisi ortaya çıkmıştır. İmmünosensörler antijen veya antikorların sensör yüzeyine immobilizasyonu ile üretilir.

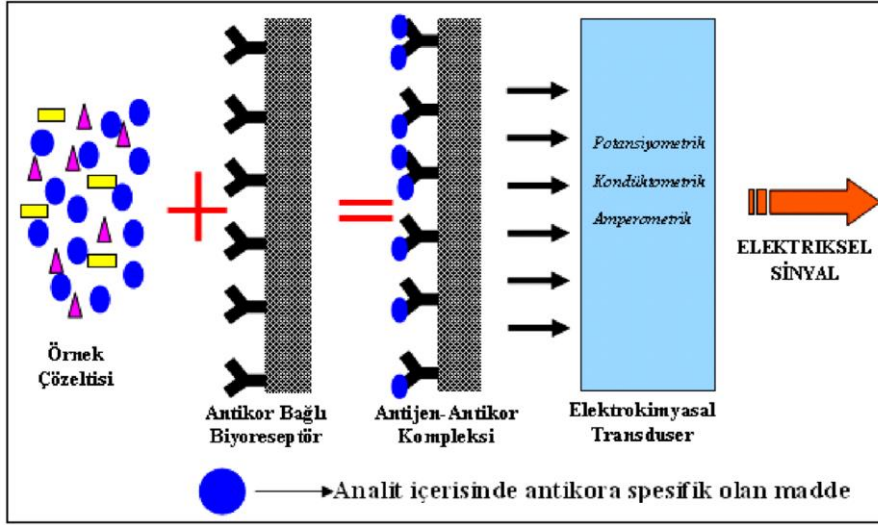
Üretilen immünosensörler ölçüm prensibine göre sınıflandırılırlar. Elektrokimyasal (potansiyometrik, amperometrik, kondüktometrik), optik, piezoelektrik, akustik ve termometrik duyar elementler immunosensörler için sensör platformları olarak kullanılır. Çoğu immünosensör optik ya da elektrokimyasal esastır. Belirlenecek elektrokimyasal immünosensörler, elektroaktif işaretleyiciler kullanılarak ya da enzim işaretleme yoluyla yapılmaktadır. Ölçüm prensibine göre sınıflandırılan immünosensörler doğrudan ve doğrudan olmayan şekilde sınıflandırılmaktadır (**Martin 2001**). Sinyalde fiziksel değişim meydana getiren antikor-antijen kompleksi oluşturmak için tasarlanan immünosensörler doğrudan immünosensörlerdir. Doğrudan immünosensör yapımı için elektrotlar, membranlar, piezoelektrik materyaller veya optikçe aktif yüzey materyalleri yeterli duyarlılıktadır. Çözeltide bulunan analit ve duyarlı matriks üzerinde bulunan antikor ya da antijen komplementeri ile etkileşir. Oluşan immünokompleks formu, analitin ölçülmesine olanak sağlayan membran potansiyeli, elektrot potansiyeli, gerçek piezofrekans veya optik özellikler gibi yüzeyin fiziksel özelliklerini değiştirir. Ayrıca yüzeyde moleküllerin spesifik olmayan adsorpsiyonundan kaynaklanan potansiyel problemleri de mevcuttur (**Martin 2001**).

Doğrudan olmayan immünosensörler ise, antikor ya da antijene konjuge edilen işaretleyiciler ile bağlanma olayının gözlenebilmesi esasına dayanır. Doğrudan olmayan immünosensörlerde enzimler, elektrokimyasal aktif moleküller ve lipozomlar işaretleyici olarak kullanılarak yüksek duyarlılıkta iletim sağlanır (**Martin 2001**). Sensörlerin tersinmez özellikte olması immünosensörlerde karşılaşılan yaygın bir durumdur. Sensörlerin tersinmez olması sebebiyle bir immünosensör çoğunlukla tek bir kez kullanılabilir. Yenilenebilir sensör yüzeyinin geliştirilmesi yönünde çalışılmaktadır (**Parkinson ve Pejic 2004**).

2.5.6 Elektrokimyasal immünosensörler

Biyoreseptör tabakada, antikorların immobilize olduğu elektrokimyasal bir immünosensör sisteminde, örnek çözeltisi içerisinde, immobilize antikorlara spesifik olan antijen yanında spesifik olmayan başka maddeler de vardır. Kompleks oluşumu reaksiyonu, biyoreseptör tabakada antikorlar ve sadece bu antikorlara spesifik olan antijenler arasında gerçekleşir. Kompleks oluşumundan dolayı, biyoreseptör tabakada, bağlanma olmadan önceki durum ile bağlanma olduktan sonraki durum arasında bir değişiklik meydana gelir.

Bu değişim elektrokimyasal iletici tarafından ölçülebilir sinyal haline getirilir ve değerlendirilir (Derkuş 2012)..



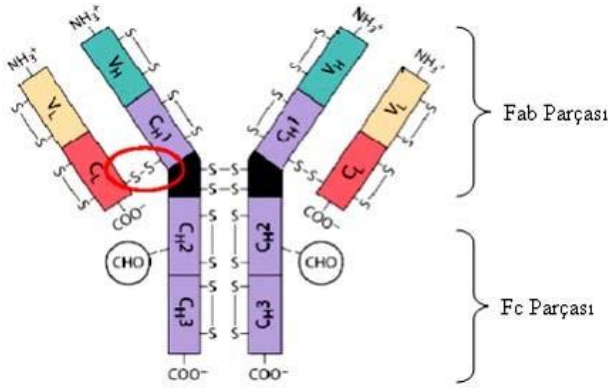
Şekil.6 İmmünoensörlerin çalışma prensibinin şematik gösterimi (Derkuş 2012).

2.5.7 Antikorlar

Antikor, “Ab” ile simgelenen ve spesifik bir antijeni tanıma özelliği kazanmış olan biyomoleküldür. Antijen ise vücut tarafından yabancı olarak tanınan ve immün yanıtı neden olan moleküler maddedir. Antijen “Ag” ile simgelenir. Serum proteinlerinin globuler-globulin kesiminde bulunan proteinler immüno globulinlerdir. Toplam plazma proteinlerinin % 20’sini oluştururlar. İmmüno globulinler beş ana gruba ayrılır. Bunlar immüno globulin G (IgG), immüno globulin M (IgM), immüno globulin A (IgA), immüno globulin D (IgD), immüno globulin E (IgE) şeklindedir. Serumdaki immüno globulinlerin yaklaşık % 80’ini IgG oluşturur ve virüslerle savaşta ön planda rol alır (Kılıçturgay 2003). Bu immüno globulinler aminoasit bileşimi, yük, boyut ve karbonhidrat içeriği açısından farklı olan glikoproteinlerle ilgilidir (Martin 2001). İmmüno globulin molekülü, ağır ve hafif zincirlerden oluşan Fab (antigen binding fragments) parçasından, antijenle spesifik olarak birleşir. Antikoru antijen ile birleştiği yüzeyin büyüklüğü, 8-12 aminoasit veya 3-6 glikoz molekülük bir determinant grubunu kavrayacak kadardır. Antikoru antijen ile birleştiği bu bölge “paratop” olarak adlandırılır (Derkuş 2012).

V: değişken, C: sabit bölgeleri tanımlar. Her bölge zincirin bir globuler bölgesidir ve yaklaşık 108- 110 aminoasitten oluşur. IgG molekülü iki hafif (L), iki ağır (H) zincirden

oluşur. Hafif zincirler iki globüler bölge içerirken ağır zincirler bir değişken globüler bölge yanında 3 sabit globüler bölge içerir. IgG molekülünün ağırlığı 150 kD'dur (**Derkuş 2012**).



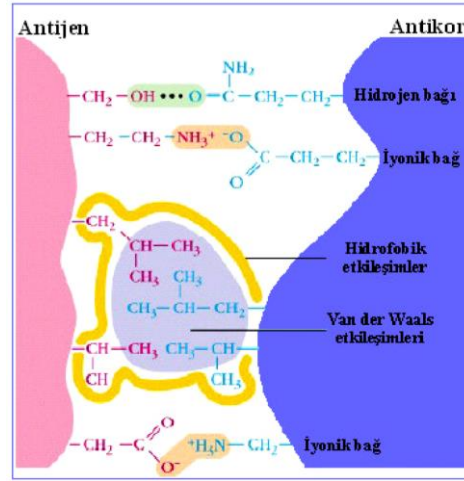
Şekil.7 IgG molekülünün şematik gösterimi (**Derkuş 2012**).

Antikorlar girişim etkileri varlığında uygun bir antijenin tanınmasına imkân veren yüksek derecede spesifikliğe sahip olduğundan, biyolojik tanıma elementi olarak çok fazla tercih edilir. Antikorlar, düşük molekül ağırlıklı haptenlerden bakteri gibi büyük hacimli maddelere kadar geniş bir alanda antijeni tanıma yeteneğine sahiptir (**Derkuş 2012**).

Antijenlerin spesifik bölgeleri yani epitop ya da antijenik determinant bölgeleri bu immün cevaba neden olur. Uygun antikor için bağlanma bölgesi olarak epitop görev yapar. Aynı antijene cevap veren heterojen antikorlar poliklonal olarak adlandırılır. Homojen antikorların büyük bir miktarının üretilmesi için monoklonal antikor teknolojisi olarak sağlar. Bu homojen antikorlar, bir antijenin aynı epitopuna cevap verirler. Monoklonal antikorlar, verilen bir antijen için, aynı afinite ve spesifikliğe sahiptir. Normal koşullarda, monoklonal antikorlar, poliklonal antikorlardan daha yüksek bir spesifikliğe sahip olmalarına rağmen düşük afinite gösterirler. Bununla birlikte, poliklonal antikorların yüksek heterojen doğası büyük bir dezavantajdır (**Martin 2001**).

2.5.7.1 Antikor-Antijen bağlanma gücü

Herhangi bir biyomoleküler reaksiyon boyunca var olan kuvvetler antikor ve antijen arasındaki etkileşimin kararlılığını sağlamaktan sorumludur. Bu kuvvetler; hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler, Van der Waals etkileşimleri ve hidrofobik etkileşimlerdir.



Şekil.8 Antijen-Antikor bağlanmasında etkili olan kuvvetler (Derkuş 2012).

Elektrostatik etkileşimler, polaritesi yüksek moleküller arasında dipol-dipol etkileşimleri veya yüklü moleküller arasında ya itici ya da çekici kuvvetler olabilirler (Derkuş 2012).

Proteinlerde polipeptit omurgasının karbonil grupları ve polar aminler kalıcı dipollere yol açar. Ayrıca polar ve yüklü zincir bölgeleri dipollere katkıda bulunur. Hidrojen bağları elektrostatik etkileşimlerin bir alt grubu olarak düşünülür. Hidrojen bağları elektronegatifliği yüksek bir proton alıcı üzerindeki bağlanmamış bir çift elektron ile elektronegatifliği yüksek bir proton verici arasında meydana gelir. Amin grupları proton verici olarak görev yapar ve karbonil grupları bir proton alıcı olarak iş görür. Bu hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimler bağlanmanın gücüne katkıda bulunurlar ve sulu çözeltide bu etkileşimler, moleküller arası kararlılık için oldukça fazla katkıya sahiptirler (Martin 2001). Van der Waals kuvvetleri, elektrostatik etkileşimlerden daha zayıf dipoller arasında meydana gelir. Yakın moleküllerin elektrik alanları bu kuvvetlerden sorumlu geçici dipollerin oluşumuna sebep olur. Bu etkileşimler kısmen zayıf olmasına rağmen, birçok etkileşimden meydana geldiği için toplam bağlanma şiddetinin % 50'sini oluşturabilir (Martin 2001).

Hidrofohik etkileşimler, polar olmayan moleküller ve su arasında meydana gelen itici güçlerdir. Termodinamik kararlılığın sağlanmasında, polar olmayan bölgeler entropinin etkisiyle bir reaksiyon bölgesinde bulunuyorsa, moleküller arası kararlılığın ve bağlanma şiddetinin artmasına yol açarlar (Derkuş 2012).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Deneyler esnasında kullanılan tüm reaktifler, PAK2 Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA)’ den alınmıştır. PAK-2 ve antiPAK-2’nin tüm seyreltme işlemleri pH 7.4’ te 50 mM olarak hazırlanan fosfat tamponu ile gerçekleştirilmiştir ve belli konsantrasyonda seyreltme işleminden sonra porsiyonlama yapılarak -20°C’ de saklanmıştır. Çalışma elektrodu olarak ITO-PET kullanılmıştır. Referans elektrot olarak, KCl ile doygunlaşmış Ag/AgCl elektrot kullanılmıştır. Yardımcı elektrot olarak 10 mm uzunluğunda platin tel kullanılmıştır. Referans ve yardımcı elektrotlar iBAS, Warwickshire, UK firmasından getirilmiştir. ITO-PET çalışma elektrodu Sigma-Aldrich’ den getirilmiştir. Ölçümler için, döngüsel voltametri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi yazılımı olan Echem Analyst içeren (Gamry Instruments, Warminster, USA) bir bilgisayara bağlı Gamry Potentiostat/Galvanostat, Reference 600 (Gamry Instruments, Warminster, USA) cihazı kullanılmıştır.

3.2. Elektrokimyasal Ölçümler

Elektrotlar temizlendikten sonra OH tabakası oluşturulmuştur ve OH tabakası oluşumundan sonra bütün immobilizasyon işlemleri ve optimizasyon adımlarının takibi için döngüsel voltametri (CV) ve impedans spektroskopisinden (EIS) yararlanılmıştır. Ölçümler 0.1 M KCl içeren ve ölçüm için redoks probu sunan 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1) çözeltisi içinde gerçekleştirilmiştir. CV’de potansiyel aralığı -0,5 - 1 V arasında (adım büyüklüğü: 10 mV, tarama hızı: 100 mV/s) seçilmiştir. Elektrokimyasal impedans ölçümleri ise 10 mV alternatif akımda gerçekleştirilmiştir. İmpedans spektrumları 10.000 – 0.05 Hz aralığındadır.

3.3. Ölçüm Prosedürleri

Elektrot yüzeyine anti-PAK2’nin bağlanması gerçekleştirildikten sonra, anti-PAK2’nin bağlanmadığı kısımlara BSA (bovine serum albümin) ajanının bağlanmasıyla biyosensör sistemi tamamlanmıştır. Son işlem olarak PAK2’nin elektrot yüzeyine bağlanma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bağlanma işlemi 30 dakika, oda sıcaklığında ve karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Her elektrot, farklı 100 µL’lik PAK2 konsantrasyonuna daldırılarak

inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Her elektrotun, fiziksel olarak absorblanmış PAK2'yi uzaklaştırmak amaçlı ultra saf su ile yıkanarak, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ redoks probu içeren çözeltinin bulunduğu hücre içerisinde CV ve EIS ölçümleri alınmıştır.

3.4. İmmobilizasyon Basamakları

3.4.1. OH tabakası oluşturma

Elektrotlar üzerindeki ilk işlem elektrotların temizlenmesi işlemidir. Elektrotları temizlemek için her elektrot ultrasonik banyoda 10'ar dakika aseton, sabun çözeltisi ve ultra saf su içerisinde ayrı ayrı işlem görmüştür. İlk ve belki de en önemli adım ITO yüzeyinin temizlenmesidir, çünkü ITO'nun daha sonraki modifikasyonu kesinlikle bu temizleme prosedürü olmadan gerçekleştirilememektedir. Temizleme aşaması ile ITO yüzeyinden organik kirletici maddeleri uzaklaştırılır ve bu kirletici maddelerin ortadan kaldırılmasıyla iletkenlik artırılır. Bununla birlikte, temizleme aşamasından sonra immobilizasyona devam etmek mümkün olmuştur.

Temizliği sağlanan elektrotlar yüzeyinde aktif $-\text{OH}$ uçları elde etmek amaçlı 90 dakika oda sıcaklığında OH karışımı ile inkübe edilmiştir. Her elektrot için ayrı ayrı hazırlanan OH karışımı için %94'lük NH_4OH (amonyum hidroksit), %99'lük H_2O_2 (hidrojen peroksit) ve ultra saf su kullanılmıştır.

3.4.2. Uygulanan işlemler ve koşulları

Her bir ITO-PET elektrot OH tabakası oluşturulduktan sonra, kendiliğinden oluşan monotabaka(SAM) oluşturmak için toluen ve 3- glisidooksipropiltrimetoksisilan (3-GPTMS) çözeltisi ile elektrotlar gece boyu, oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Elektrot yüzeyine SAM tabakası oluştuktan sonra anti-PAK2'nin kovalent immobilizasyonu için oda sıcaklığında ve karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Tasarlanan biyosensörde, anti-PAK2 immobilizasyonundan sonra elektrot yüzeyinde spesifik olmayan bağlanmayı önlemek için açık uçları bloklama ajanı olan %0,5'lik BSA proteini kullanılmıştır. Elektrotlar oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 1 saat boyunca inkübe edilmiştir.

Her işlem basamağının sonrasında elektrotlar ultra saf su ile yıkanarak argon gazı ile kurutulmuştur. İmmobilizasyon basamaklarının her bir aşaması EIS ve CV ölçümleri alınarak kontrol edilmiştir.

3.4.3 İmmobilizasyon sonrası PAK2

Gerçekleştirilen immobilizasyon işlemlerinden sonra elektrotlar farklı konsantrasyonlardaki PAK2 antijeninde inkübasyona bırakılmıştır ve sonucu EIS ve CV ölçümleri alınarak kontrol edilmiştir.

3.5 Optimizasyon basamakları

3.5.1. 3-glisidooksipropiltrimetoksisilan (3-GPTMS) konsantrasyon optimizasyonu

3-GPTMS konsantrasyon optimizasyonu için 3 farklı konsantrasyon ile biyosensör oluşumu denenmiştir. Bu 3 farklı çalışmada diğer şartlar aynı tutularak sadece 3-GPTMS konsantrasyonu değiştirilmiştir. Optimizasyon için kullanılan 3-GPTMS konsantrasyonları; %0,1'lik, %0,5'lik ve %1'lik olarak seçilmiştir. Her bir deneme sonucu EIS ve CV ölçümleri ile kontrol edilmiştir.

3.5.2. Anti-PAK2 konsantrasyon optimizasyonu

Anti-PAK2 konsantrasyon optimizasyonu için 3 farklı konsantrasyon ile biyosensör oluşumu denenmiştir. Bu 3 farklı çalışmada diğer şartlar aynı tutularak sadece anti-PAK2 konsantrasyonları değiştirilmiştir. Optimizasyon için kullanılan anti-PAK2 konsantrasyonları; 18,75ng/mL, 3,75ng/mL ve 0,75ng/mL'dir. Her bir deneme sonucu EIS ve CV ölçümleri ile kontrol edilmiştir. Gerçekleştirilen ölçümler sonrası en iyi bağlanmanın gerçekleştiği konsantrasyon belirlenmiştir. Belirlenen konsantrasyon çalışmanın geri kalan kısmında kullanılmıştır.

3.5.3 Anti-PAK2 inkübasyon süresi optimizasyonu

Anti-PAK2 inkübasyon süresi optimizasyonu için 3 farklı zaman dilimi ile biyosensör oluşumu denenmiştir. Bu 3 farklı çalışmada diğer şartlar aynı tutularak sadece anti-PAK2'nin inkübasyona süresi değiştirilmiştir. Optimizasyon için kullanılan inkübasyona süreleri; 30 dakika, 45 dakika, 60 dakikadır. Her bir deneme sonucu EIS ve CV ölçümleri ile kontrol edilmiştir. Anti-PAK2 inkübasyon süre optimizasyonunun yapılma amacı, ne kadar sürede en iyi şekilde bağlanabildiğini ve daha sonra antijen bağlama kapasitesinin ne kadar

sürede daha fazla olacağını görmektir. Belirlenen Anti-PAK2 inkübasyon süresi çalışmanın geri kalan kısmında kullanılmıştır.

3.5.4. PAK2 inkübasyon süresi optimizasyonu

PAK2 inkübasyon süresi optimizasyonu için 3 farklı zaman dilimi ile biyosensör sistemleri geliştirilmiştir. Her bir çalışmada 9 elektrot kullanılmıştır ve tüm immobilizasyon basamakları aynıdır. Optimizasyon için değiştirilen PAK2 inkübasyon süreleri; 30 dakika, 45 dakika, 60 dakikadır. Yapılan bu optimizasyon çalışması sonrasında, elde edilen veriler değerlendirilerek en uygun inkübasyon süresine karar verilmiştir.

3.6. Karakterizasyon Çalışmaları

3.6.1 İdeal tayin aralığının belirlenmesi

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucu ideal tayin aralığı belirlenmiştir. Gerçekleştirilen çalışma sonucu, biyosensörün belirlenen şartlar altında hangi tayin aralığında PAK2'yi bağlayabildiği gözlenmiştir. 9 farklı PAK2 konsantrasyonunun kullanılması ile belirlenen tayin aralığı, çalışmanın kalan tüm kısmında kullanılmıştır.

3.6.2 Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik çalışmalarında, tüm biyosensör sistemlerine aynı konsantrasyondaki PAK2 uygulanmıştır. Bu çalışmada tayin aralığında çizilen grafik esas alınmıştır ve burada kullanılan PAK2 konsantrasyonları arasından 0,06 pg/mL seçilmiştir. Seçilen bu konsantrasyon ile 20 adet biyosensör geliştirilerek çalışmanın tekrarlanabilirliği teyit edilmiştir ve ölçümler sonucu gerekli hesaplamalar yapılarak standart sapma, varyasyon katsayısı hesaplanmıştır.

3.6.3. Tekrar üretilebilirlik

Tekrar üretilebilirlik çalışmalarında, her birinde 9 elektrot bulunan ve en son belirlenen tayin aralığındaki konsantrasyonlara sahip PAK2 ile muamele edilen 10 farklı

uygulama gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen 10 uygulama da aynı biyosensör sisteminin, aynı tayin aralığını belirleyebilme kararlılığı ölçülerek EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. Bu çalışmada tayin aralığında çizilen grafik esas alınmıştır.

3.6.4. Geliştirilen biyosensörün depo ömrü

7 hafta boyunca ve +4°C saklama koşullarında gerçekleştirilen deneyde 7 farklı elektrot kullanılmıştır. Kullanılan her bir elektrot üzerine optimum koşullarda immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir ve her aşamada EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. Gerçekleştirilen bu çalışmadaki amaç biyosensörün ideal ve geleceğe yönelik olduğunu teyit etmektir. İlk elektrot 0,06 pg/mL konsantrasyona sahip PAK2 ile muamele edilerek ölçüm sonucu kaydedilmiştir. Her hafta aynı konsantrasyon ile farklı bir elektrodun EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. Bu işlem 7 haftada gerçekleştirilmiş ve elektrotların depo ömrü çıkan EIS Rct sonuçları esas alınarak hesaplanmıştır. Depo hesaplamalarında, tayin aralığında çizilen grafiğin denklem değerleri esas alınmıştır.

3.6.5. Rejenerasyon

Rejenerasyon işlemi, üzerinde immobilizasyon basamakları tamamlanmış tek bir biyosensör üzerinde gerçekleştirilmiştir. Biyosensör ilk olarak 30 dakika 0,06 pg/mL PAK2 ile inkübe edilmiş ve EIS ölçümleri alınmıştır. Daha sonra 10 mM HCl asit çözeltisinin içerisinde 5 dakika bekletildikten sonra EIS ölçümü alınmış ve sonrasında 30 dakika 0,06 pg/mL PAK2 ile inkübe edilmiştir. Bu işlem 8 defa tekrarlanmıştır.

Rejenerasyon işleminin amacı, biyosensörün bağladığı PAK2 proteinini yüzeyden kopararak, tekrar tekrar PAK2 proteinini bağlayabildiğini gözlemleyebilmektir.

3.6.6. İdeal tayin aralığının SWV ölçümleri

En uygun tayin aralığı CV, EIS ölçümleri alınarak sonuç elde edilmesine rağmen SWV ölçümleri ile tayin aralığının idealliği teyit edilmiştir. Diğer ölçümlerle farklı olarak, sadece BSA ve PAK2 inkübasyonundan sonra SWV (kare dalga voltametri)

ölçümü alınmıştır. Sonuçlar PAK2 ile BSA, SWV ölçümleri sonuçlarının farkı alınarak hesaplanmıştır. SWV ile sadece 1 çalışma yapılmıştır ve bu çalışmada 8 biyosensör sisteminin BSA ve PAK2 ile inkübasyonu sonucu ölçüm alınmıştır.

3.6.7. Sabit frekansta PAK2 bağlantısı

Anti-PAK2 temelli PAK2 biyosensör yüzeyinde meydana gelen zamana bağlı değişiklikleri açıklığa kavuşturabilmek için single frequency tekniği kullanıldı. Zamana karşı sabit bir frekansın ölçümüne dayanan bu yöntem sayesinde zaman dilimlerinde ve toplam zamanda meydana gelen impedans değişimleri değerlendirildi. Ayrıca anti-PAK2–PAK2 kinetik bağlanmasıyla ilgili olarak elde edilen kronoamperometrik ölçüm sayesinde değerlendirme yapıldı.

3.6.8. Serum örneklerinden PAK2 tayini

Tez çalışmasının son aşamasında, geliştirilen PAK2 biyosensörü gerçek serum örneklerine uygulanmıştır. 8 farklı bireyin kan örneklerinden elde edilen serumlarda ölçülen PAK2'ye ait bulgular değerlendirilmiştir.

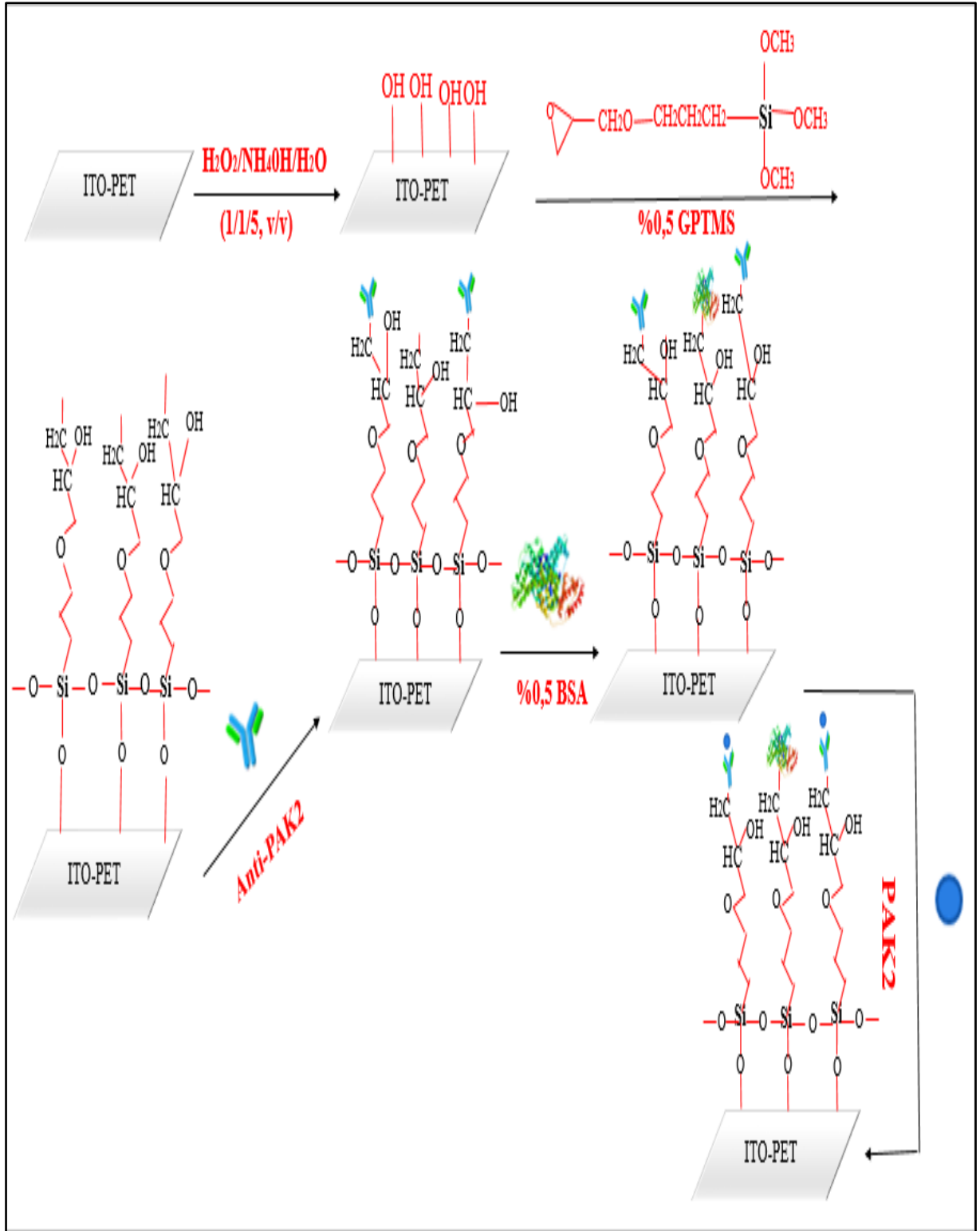
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. PAK2 Biyosensörünün İmmobilizasyonu

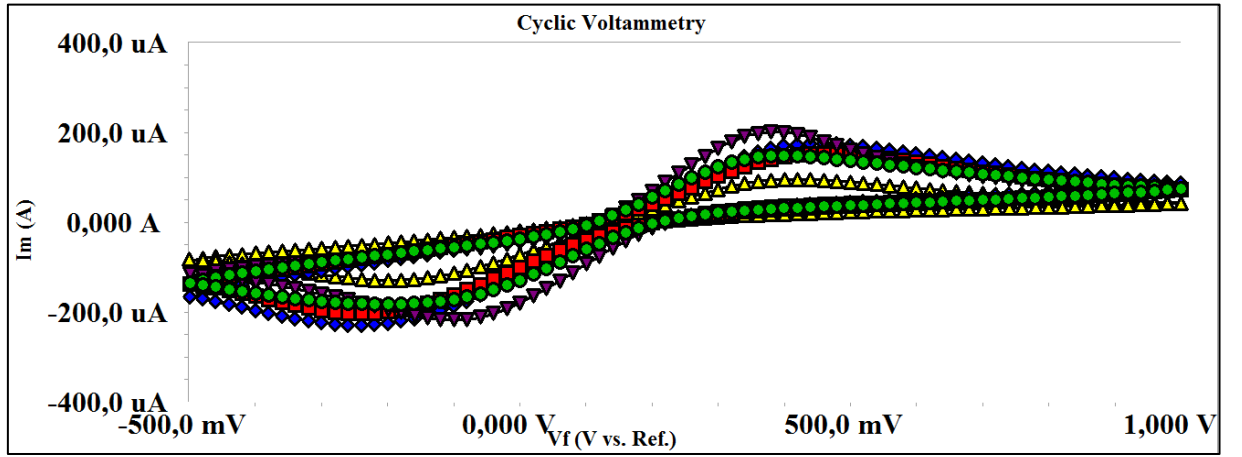
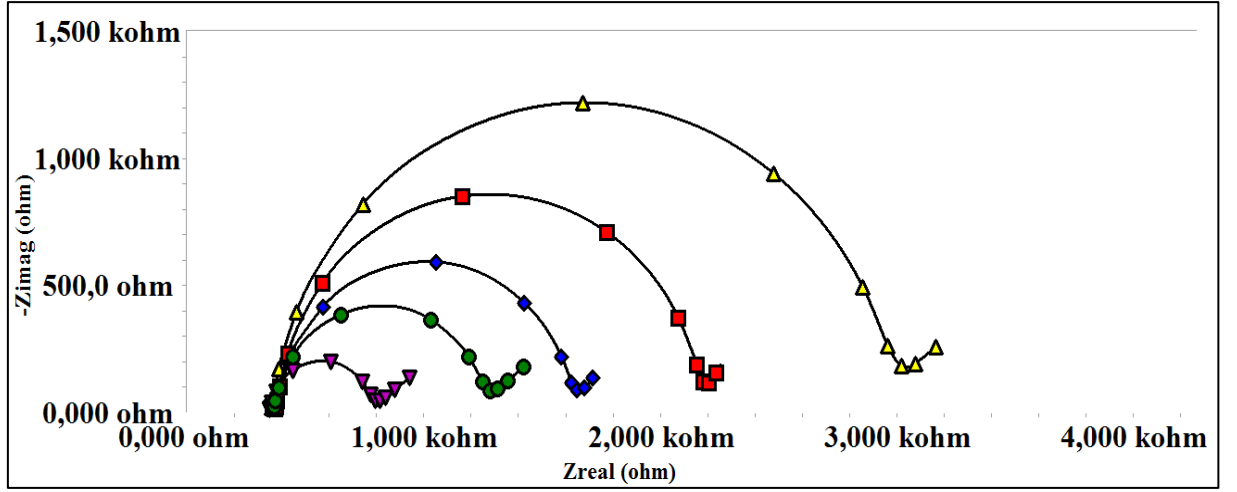
İmmobilizasyon basamakları, gerçekleştirilen optimizasyon aşamaları sonucunda belirlenerek ideal bir elektrokimyasal biyosensör sistemi geliştirilmesi için son derece önemlidir.

İlk olarak ITO-PET elektrot 1 cm^2 yüzey alanına sahip olacak şekilde kesilmiştir. Kesilen elektrotların yüzeyini temizlemek için ultrasonik banyoda ayrı ayrı 10'ar dakika boyunca aseton, sabun ve ultra saf su içerisinde işlem görmüştür. Temizlenen elektrotların yüzeyinde aktif $-\text{OH}$ uçları elde etmek amacıyla, elektrotlar 90 dakika boyunca oda sıcaklığında $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile inkübe edilmiştir. Böylece elektrot yüzeyinde $-\text{OH}$ grupları oluşturularak elektrot yüzeyi iletken hale getirilmiştir ve immobilizasyon işlemi için artık hazırdır. Epoksi silan olan 3-GPTMS ile iletken hale gelen elektrot yüzeyinde SAM tabakası oluşturulmuştur. Yapısal olarak yönlendirilmiş SAM, tekrarlanabilir ve kolaylıkla hazırlanabilir. Bu çalışmaya ait olan SAM optimizasyonu çalışmasının sonucunda konsantrasyon %0,5'lik 3-GPTMS olarak kararlaştırılmıştır. 3-GPTMS ile gece boyu inkübasyona bırakılan elektrot yüzeyinde optimizasyon sonucu belirlenen bu konsantrasyonda en iyi bağlanma gözlenmiştir ve Si-O-Si bağlanması ile uzun-esnek-kararlı bağlar oluşmuştur. SAM tabakası oluşturulduktan sonra anti-PAK 2 antikoru immobilize edilmiş. SAM tabakası ile antikor olarak kullanılan anti-PAK2 tabakası arasında kovalent bağ gerçekleşmiştir ve sonucunda yalıtkanlık artmıştır. Daha sonra açıkta kalan uçları, antikorun bağlayamadığı uçları, bloke etmek içinde bloklayıcı ajan olarak %0,5'lik BSA proteini kullanılmıştır. Son olarak elektrotlar farklı konsantrasyondaki PAK2 antijeni ile inkübe edilerek immobilizasyon tamamlanmıştır. Yapılan optimizasyon çalışmaları ile konsantrasyon ve inkübasyon süreleri belirlenmiştir. Belirlenen konsantrasyon ve inkübasyon süreleri çalışmanın tamamını da uygulanmıştır. Her immobilizasyon basamağının ardından EIS ve CV ölçümleri alınarak işlemin doğruluğu kontrol edilmiştir (Şekil.10).

Elektrot yüzeyinde gerçekleştirilen tüm immobilizasyon basamakları ve PAK2 antijeninin biyosensöre bağlanması Şekil.9'da gösterilmiştir.



Şekil.9. Şematik olarak ITO-PET elektrot yüzeyinde gerçekleştirilen işlemleri



Şekil.10 İmmobilizasyon adımlarına ait CV ve EIS eğrileri. mor (-▼-▼-) ITO/OH; yeşil (-●-●-) ITO/OH/3-GPTMS; mavi (-◆-◆-) ITO/OH/3-GPTMS/Anti-PAK2; kırmızı (-■-■-) ITO/OH/3-GPTMS/Anti-PAK2/BSA; sarı (-▲-▲-) ITO/OH/3-GPTMS/Anti-PAK2/BSA/PAK2

4.2. Optimizasyon Basamaklarının Bulguları

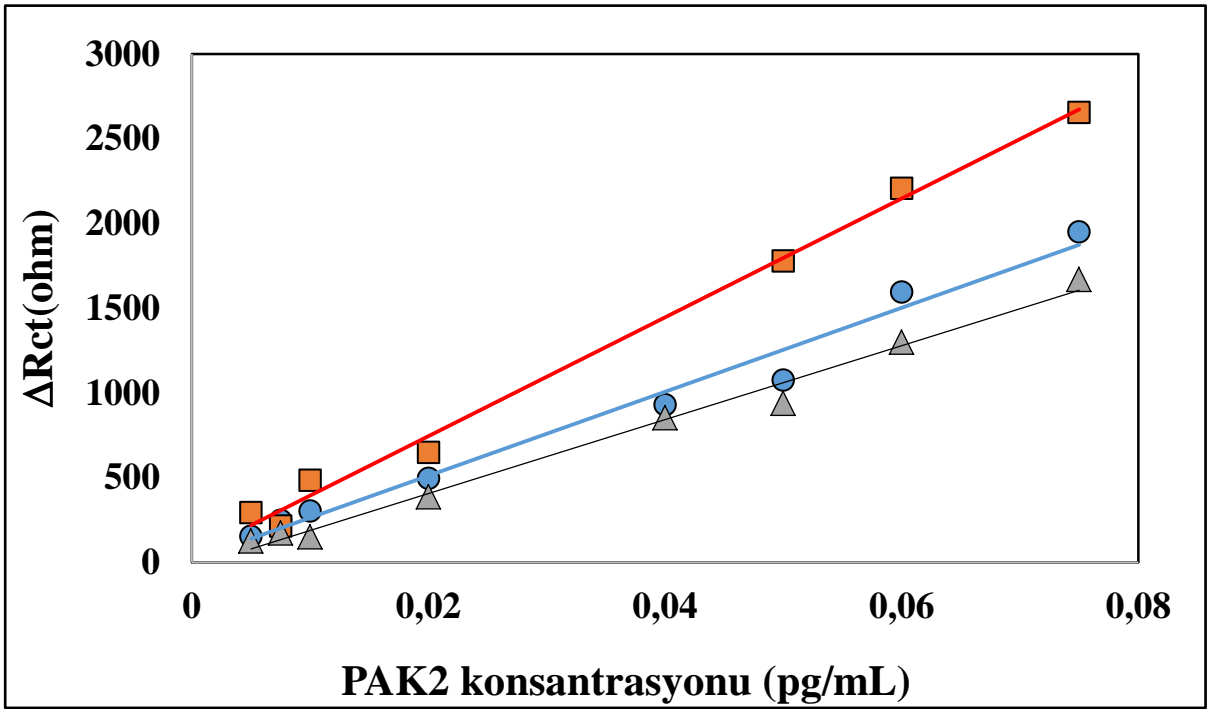
4.2.1 3-glisidoksipropiltrimetoksisilan (3-GPTMS) konsantrasyon bulguları

Elektrot yüzeyine bağlanmanın en iyi gerçekleştiği konsantrasyondaki 3-GPTMS'nin belirlenebilmesi için %0,01'lik, %0,5'lik ve %1'lik olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda SAMs optimizasyonu yapılmıştır. Gerçekleştirilen bu çalışma da elektrotlar gece boyunca 3-GPTMS ile inkübe edilmiştir. 8 elektrot sistemi geliştirilerek yapılan bu üç farklı çalışmanın karşılaştırılması sonucunda %0,5'lik 3-GPTMS konsantrasyonunun ideal SAM tabakası oluşturmak için en uygun konsantrasyon olduğu gözlenmiştir. Optimizasyon sırasında yapılan

her çalışmada 8 elektrot sistemi geliştirilmiş ve farklı PAK2 konsantrasyonu (0,005-0,075 pg/mL) ile inkübe edilerek sonuçlar elde edilmiştir. Şekil.11’de görüldüğü gibi verilen lineer grafik BSA ve PAK2’ye ait Rct değerlerinin farkı hesaplanarak elde edilmiştir.

%0,5’lik 3-GPTMS konsantrasyonu ile hazırlanan 8 elektroda farklı konsantrasyonlarda PAK2 bağlanmasından sonra alınan EIS ve CV ölçüm sonuçları Şekil.12 ‘de gösterilmiştir. Her bir elektrot kendi BSA ölçümü ile kıyaslanarak sonuçlar elde edilmiş ve grafiğe yansıtılmıştır.

Farklı 3-GPTMS konsantrasyonu ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre çizilen kalibrasyon grafikleri şekil 11’de, grafik denklemleri ve R² değerleri Tablo 3’ de gösterilmiştir.

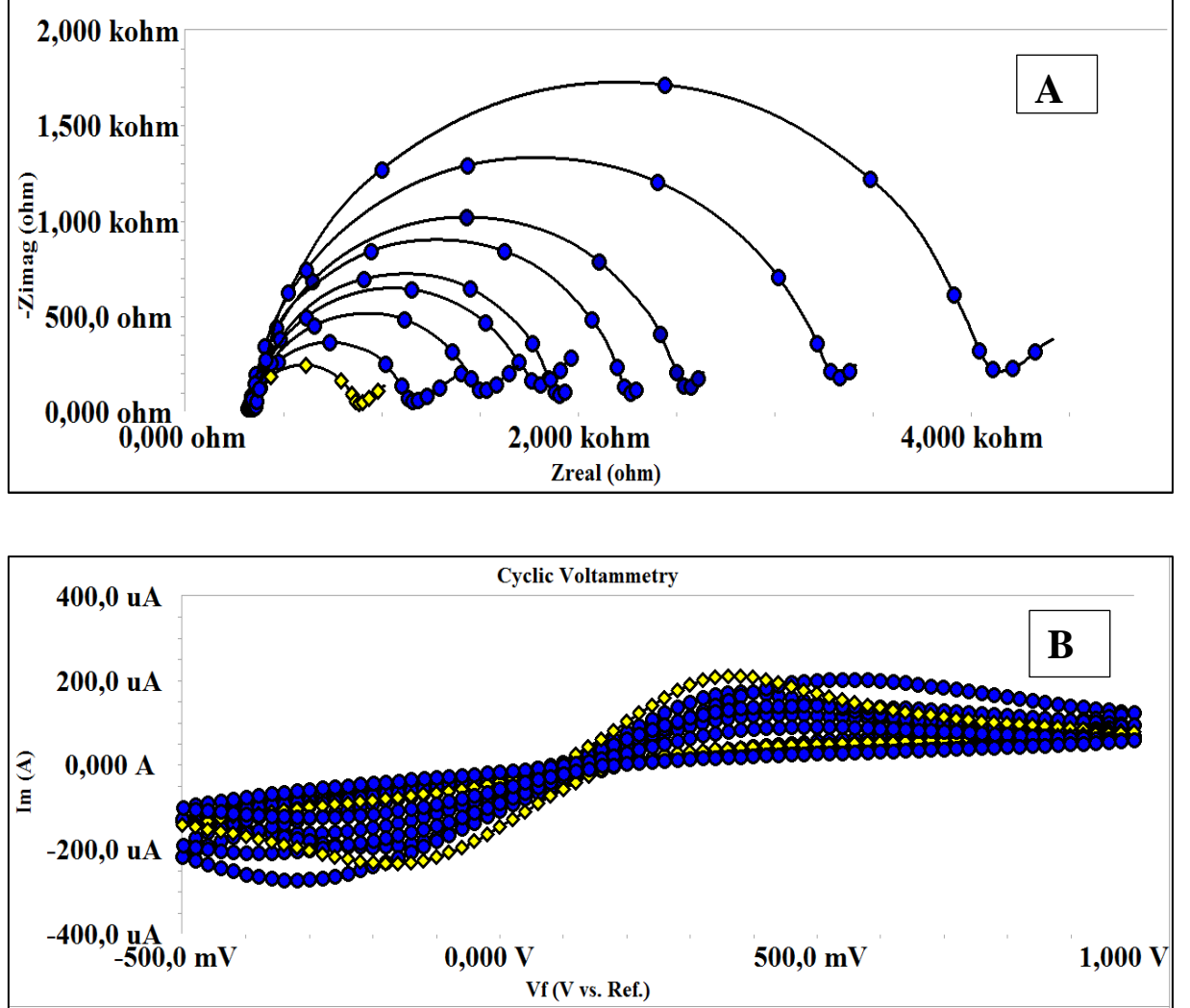


Şekil.11 Farklı 3-GPTMS konsantrasyonları (▲%0,1’lik, ■%0,5’lik, ●%1’lik) ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrileri

Tablo.3 Farklı 3-GPTMS konsantrasyonu ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrilerinin sonuçları

3-GPTMS kons.	Grafik denklemleri	Eğim Çizgisi R ² Değeri
%0,01’lik 3-GPTMS	$y = 21813x - 29,807$	$R^2 = 0,9896$
%0,5’lik 3-GPTMS	$y = 35031x + 44,777$	$R^2 = 0,9941$
%1’lik 3-GPTMS	$y = 24745x + 17,082$	$R^2 = 0,9816$

% 0,5'lik 3-GPTMS konsantrasyonu kullanıldığında elde edilen sinyallerin %1'lik ve % 0,1'lik 3-GPTMS sonucu elde edilen sinyallerden yüksek olmasından dolayı ideal konsantrasyon olarak %0,5 olarak kabul edilmiş ve çalışmanın diğer kısımlarında bu konsantrasyon kullanılmıştır.



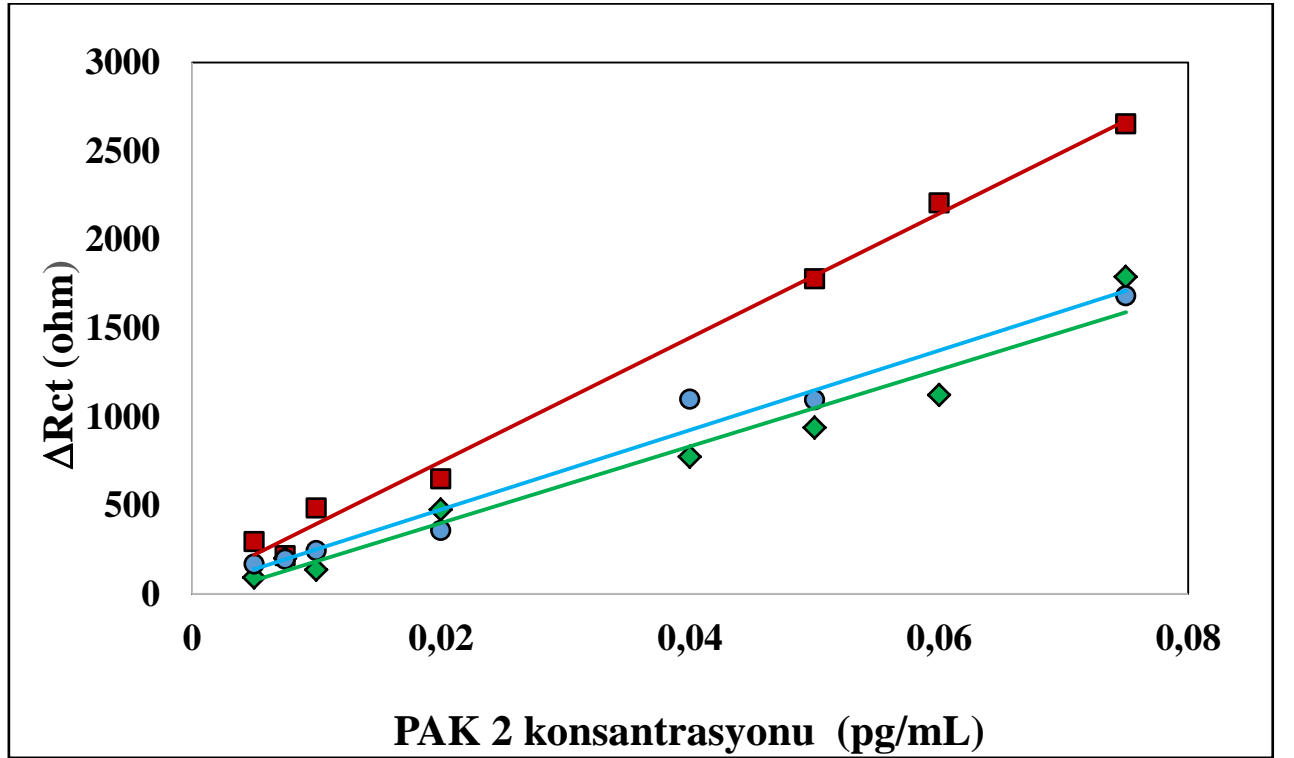
Şekil.12 %0,5'lik 3-GPTMS ile hazırlanan ITO-PET elektrot biyosensör sistemlerinin farklı PAK2 konsantrasyonlardaki (A) EIS ve (B) CV ölçümleri : (-◆-◆-) sarı, BSA ölçümü; (-●-●-) mavi, 0,005-0,075pg/mL PAK2 ölçümleri

Geliştirilen biyosensörde, seçilen optimum 3-GPTMS konsantrasyonuna ait EIS spektrumları (A) ve CV voltamogramları(B) Şekil12 'de verilmiştir.

4.2.2. AntiPAK2 konsantrasyonu optimizasyon bulguları

Bu aşamada 0,75 ng/mL, 3,75 ng/mL ve 18,75 ng/mL olmak üzere 3 farklı antiPAK2 konsantrasyonu kullanılması ile elde edilen sonuçlarda 3,75ng/mL anti-PAK2

konsantrasyonun immobilizasyon basamağı için en uygun konsantrasyon olduğu belirlenmiştir. Şekil.13'teki grafik, 3,75ng/mL anti-PAK2 konsantrasyonunda bağlanmanın en iyi şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Antikoru bağlayamadığı uçları doldurmak amacıyla kullanılan bloklayıcı ajan olan BSA ile 1 saat inkübe edilmiştir. AntiPAK2 konsantrasyonu optimizasyonunun son aşaması olarak yapılan ve çalışmada gerçekleştirilen her üç aşamada da kullanılan 8 farklı elektrot yüzeyi farklı PAK2 konsantrasyonları (0,005-0,075 pg/mL) ile inkübe edilerek EIS ölçümleri alınmıştır. Şekil.13'de verilen lineer grafik BSA ve PAK2'ye ait Rct değerlerinin farkı hesaplanarak elde edilmiştir.

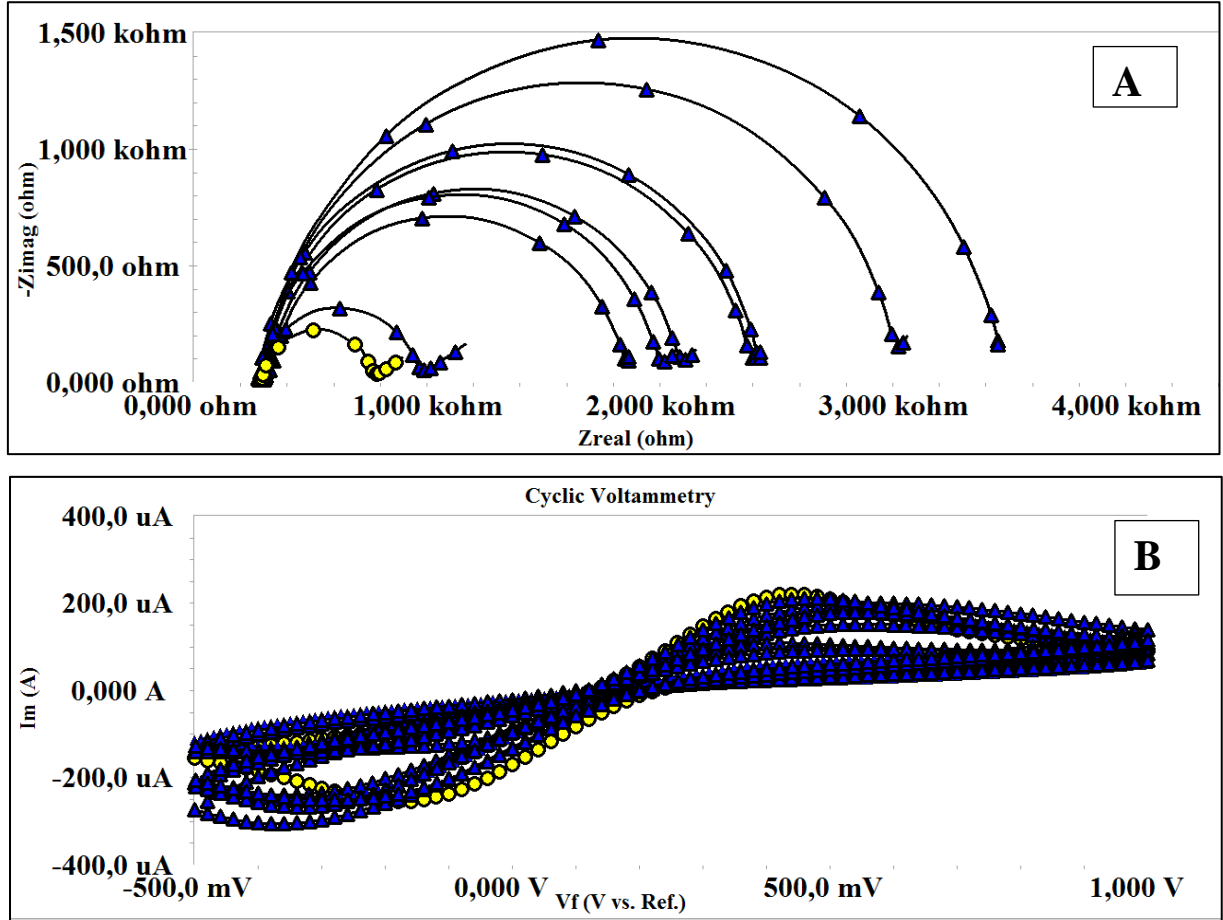


Şekil.13 Farklı antiPAK2 konsantrasyonları (●ANTI-PAK2:0,75ng/mL,■ANTI-PAK2:3,75ng/mL,◆ANTI-PAK2:18,75ng/mL) ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrileri

Tablo.4 Farklı antiPAK2 konsantrasyonu ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrilerinin sonuçları

AntiPAK2 Konst.	Grafik denklemi	Eğim Çizgisi R ² Değeri
0,75ng/mL antiPAK2	$y = 22441x + 27,208$	$R^2 = 0,9773$
3,75ng/mL antiPAK2	$y = 35031x + 44,777$	$R^2 = 0,9941$
18,75ng/mL antiPAK2	$y = 21631x - 31,896$	$R^2 = 0,963$

3,75ng/mL antiPAK2 konsantrasyonu kullanıldığında elde edilen sinyallerin, 0,75ng/mL antiPAK2 ve 18,75ng/mL antiPAK2 konsantrasyonlarının kullanılmasıyla elde edilen sinyallerden yüksek olmasından dolayı ideal konsantrasyon olarak 3,75 ng/mL anti-PAK2 kabul edilmiştir ve 3,75 ng/mL de en iyi şekilde bağlanma gözlenmiştir.



Şekil.14 3,75ng/mL antiPAK2 ile hazırlanan ITO-Pet elektrot biyosensör sistemlerinin farklı PAK2 konsantrasyonlardaki (A)EIS ve (B)CV ölçümleri : (-●-●-) sarı, BSA ölçümü; (-▲-▲-) mavi, 0,005-0,075pg/mL PAK2 ölçümleri

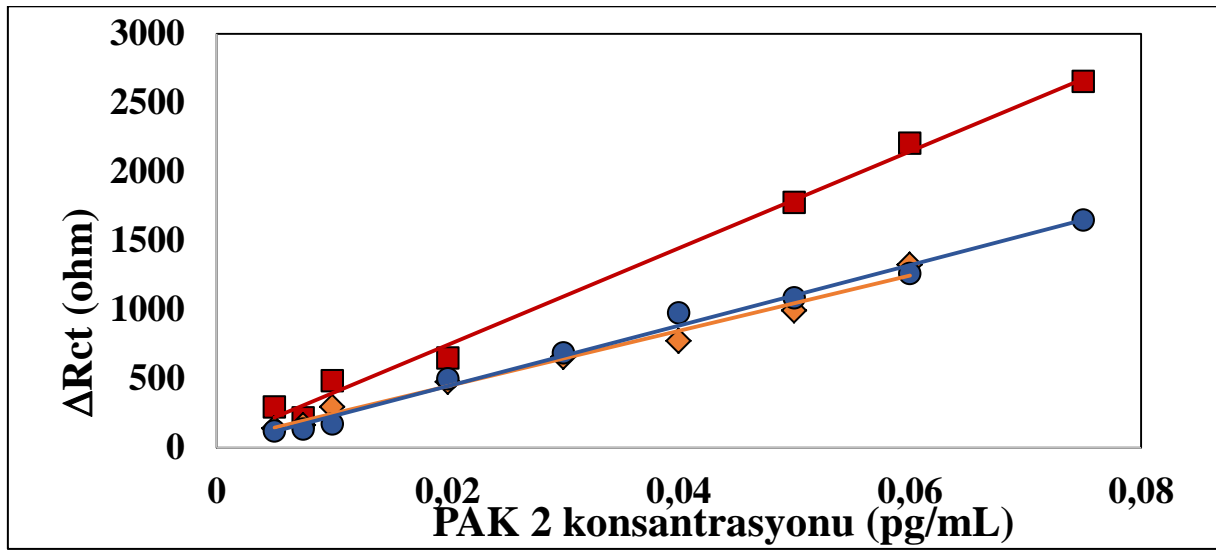
Geliştirilen biyosensörde, seçilen optimum anti-PAK2 konsantrasyonuna ait EIS spektrumları (A) ve CV voltamogramları(B) Şekil14'te verilmiştir.

4.2.3. AntiPAK2 inkübasyon süresi optimizasyonu bulguları

AntiPAK2 inkübasyon süresi optimizasyonu için 30 dakika, 45 dakika, 60 dakika olmak üzere 3 farklı inkübasyon süresi denenmiştir. Bu sürelerin denenmesindeki amaç en verimli ve immobilizasyonun gerçekleştiği inkübasyon süresini belirlemektir. Gerçekleştirilen

bu çalışmalar sırasında her elektrot aşama aralarında ultra saf su ile yıkanmıştır ve argon gazı ile tamamen kurutulduktan sonra farklı PAK2 konsantrasyonu (0,005-0,075 pg/mL) ile inkübe edilerek EIS ölçümleri alınmıştır. Alınan ölçümler sonucu çizilen grafik Şekil.15'te verilmiştir ve verilen lineer grafik BSA ve PAK2'ye ait Rct değerlerinin farkı hesaplanarak elde edilmiştir.

Şekil 15, kısa süre olarak denenen 30 dakikada antikorun yüzeye yeterince bağlanmadığını ve uzun süre olarak denenen 60 dakikada ise protein-protein etkileşimlerinden kaynaklı bozulmalar meydana geldiğini bunun sonucunda sinyal artışını olumsuz yönde etkilendiğini göstermektedir.



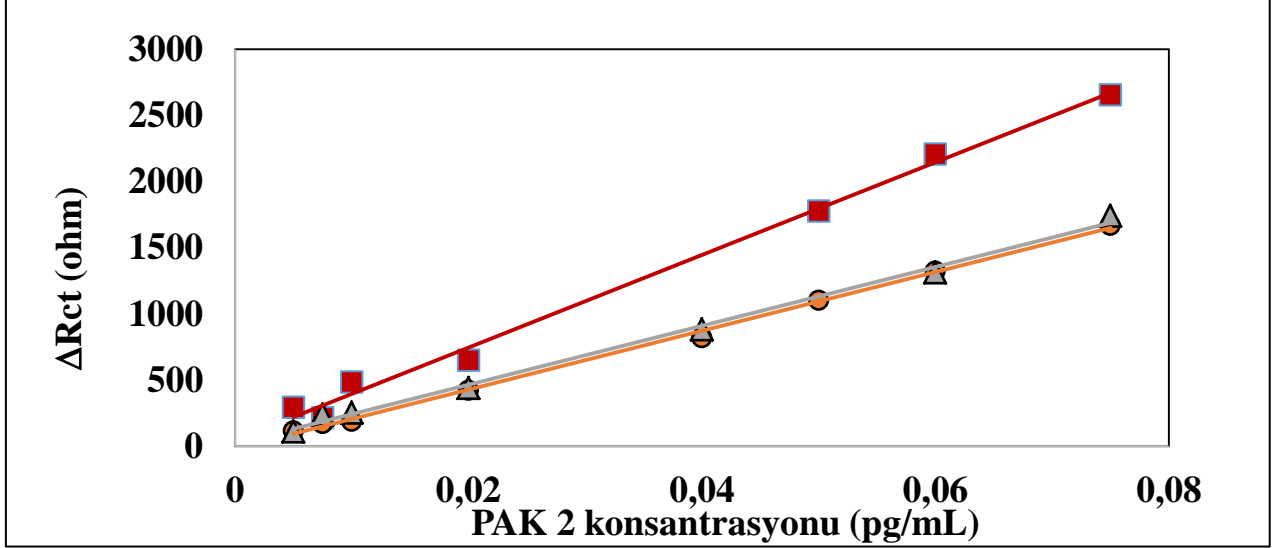
Şekil.15 Farklı antiPAK2 inkübasyon süreleri (●30 dk, ■45 dk, ◆60 dk) ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrileri

Tablo-5 Farklı antiPAK2 inkübasyon süreleri ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrilerinin sonuçları

AntiPAK2 inkübasyon süresi	Grafik denklemi	Eğim Çizgisi R ² Değeri
30 dakika	$y = 21920x + 7,5278$	$R^2 = 0,9916$
45 dakika	$y = 35031x + 44,777$	$R^2 = 0,9941$
60 dakika	$y = 20069x + 44,2$	$R^2 = 0,9848$

Denenen 3 farklı inkübasyon sürelerine ait kalibrasyon grafiklerinde de görüldüğü gibi elektrotların 45 dakika boyunca anti-PAK2 ile inkübasyona bırakılması sonucunda elde edilen

Gerçekleştirilen denemelerin verilerine bağlı olarak şekil 17’de gösterilen grafik elde edilmiştir. Optimizasyon sırasında 8 farklı elektrot farklı PAK2 konsantrasyonları ile (0,005-0,075 pg/mL) inkübe edilerek EIS ölçümleri alınmıştır. Şekil.17’de verilen lineer grafik BSA ve PAK2’ye ait Rct değerlerinin farkı hesaplanarak elde edilmiştir.

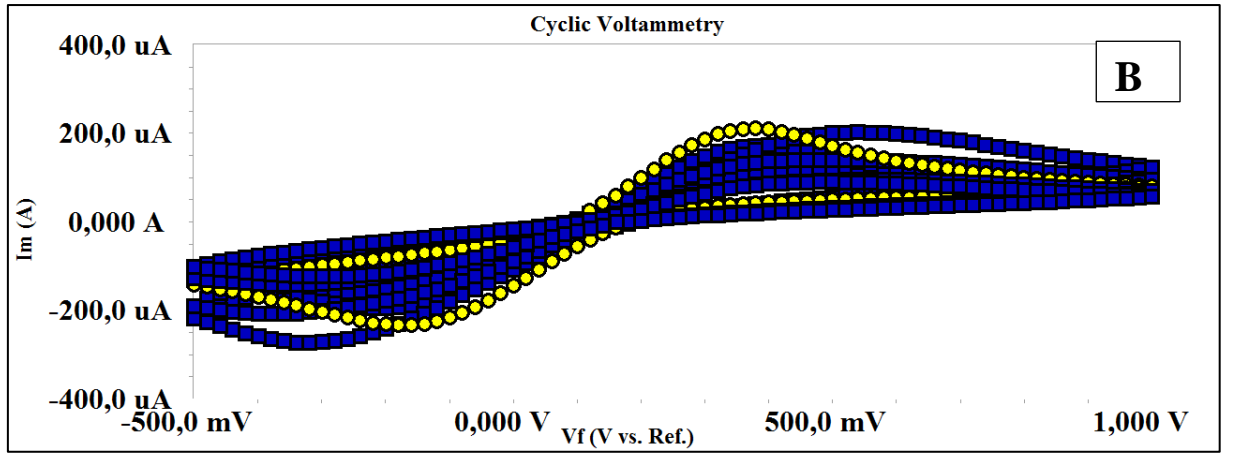
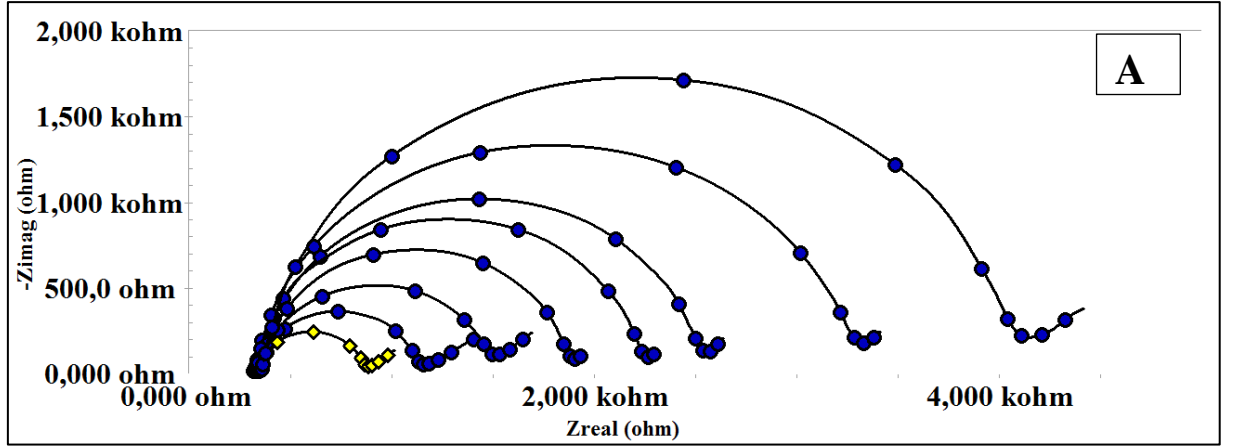


Şekil.17 Farklı PAK2 inkübasyon süreleri(■30dk, ▲60dk, ●45dk) ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrileri

Tablo-6 Farklı PAK2 inkübasyon süreleri ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrilerinin sonuçları

PAK2 inkübasyon süresi	Grafik denklemi	Eğim Çizgisi R ² Değeri
30 dakika	$y = 35031x + 44,777$	$R^2 = 0,9941$
45 dakika	$y = 22228x - 17,386$	$R^2 = 0,9982$
60 dakika	$y = 22288x + 18,043$	$R^2 = 0,9961$

Yapılan 3 çalışmanın sonucunda çizilen grafikte de görüldüğü gibi PAK2 ‘nin 30 dakika inkübasyon süresi sonucunda elde edilen sinyallerin 45 dakika ve 60 dakika inkübasyon sürelerinde elde edilen sinyallerden yüksek ve düzenli sinyaller olmasından dolayı ideal PAK2 inkübasyon süresi olarak 30 dakika seçilmiştir.



Şekil.18 30 dakika PAK2 ile hazırlanan ITO-Pet elektrot biyosensör sistemlerinin farklı PAK2 konsantrasyonlardaki (A)EIS ve (B)CV ölçümleri : (-●-●-) sarı, BSA ölçümü; (-■-■-) mavi, 0,005-0,075pg/mL PAK2 ölçümleri

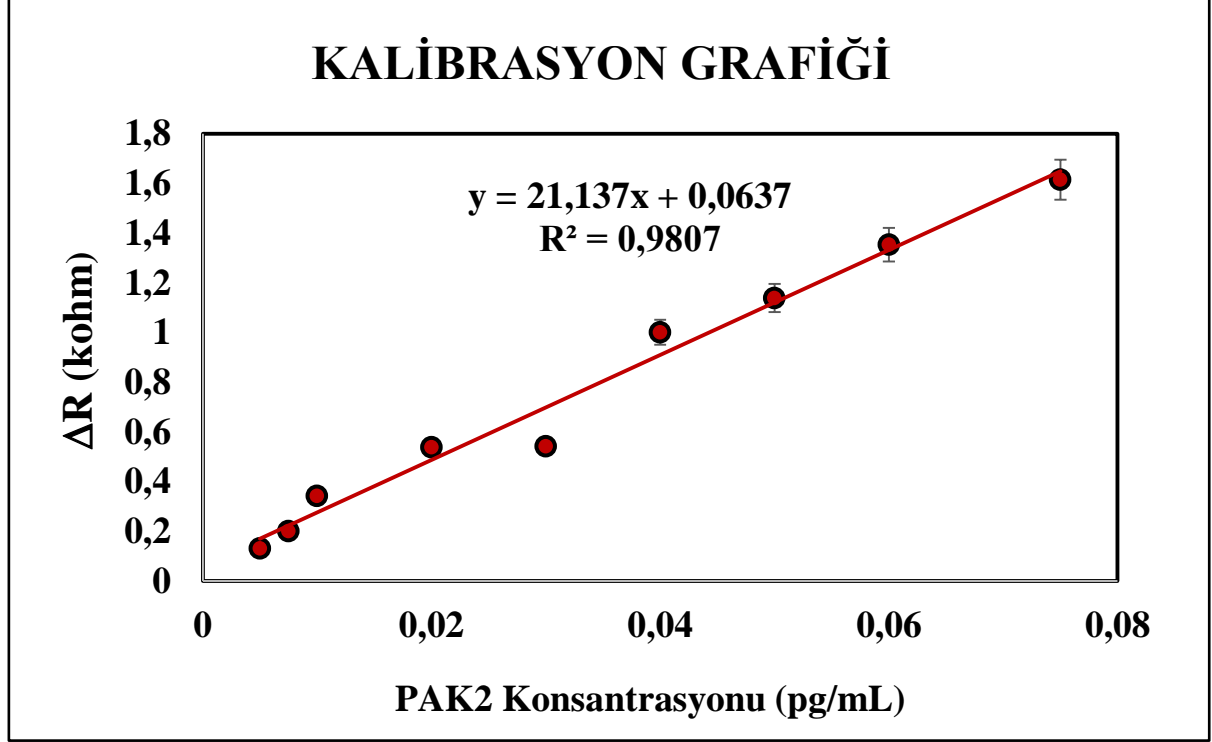
Geliştirilen biyosensörde, seçilen optimum PAK2 inkübasyon süresine ait EIS spektrumları (A) ve CV voltamogramları(B) Şekil18’de verilmiştir.

4.3. Karakterizasyon Çalışmaları

4.3.1 Kalibrasyon Grafiği

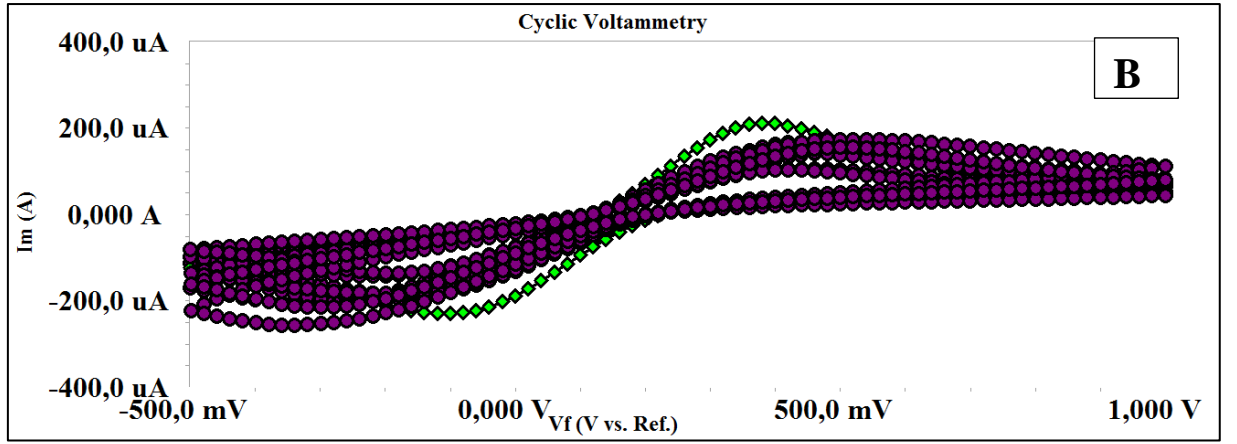
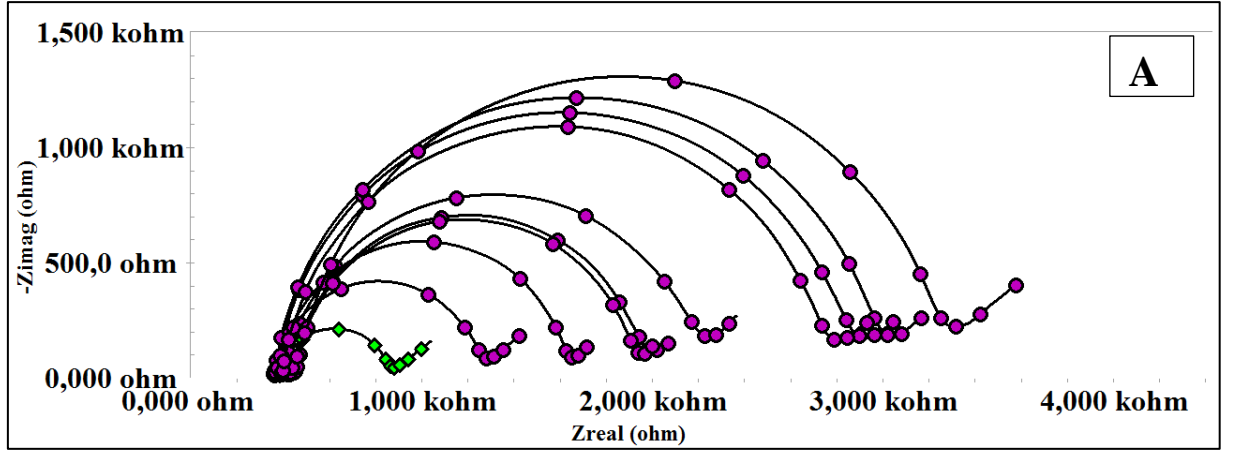
Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen optimum immobilizasyon koşullarında en uygun tayin aralığı belirlenmiştir. Optimum koşullarda hazırlanan biyosensörün kalibrasyon grafiği şekil 19’da gösterilmiştir. Kalibrasyon grafiğinde de görüldüğü gibi lineer aralık 0,005-0,075 pg/mL olarak belirlenmiştir. Artan PAK2

konsantrasyonlarına ait impedans eğrileri ve CV voltammogramları şekil.20’de gösterilmiştir. LOD değeri ($3 \times s/m$) $4,184 \times 10^{-4}$ pg/mL, LOQ değeri ($10 \times s/m$) $1,39 \times 10^{-3}$ pg/mL olarak hesaplanmıştır.



Şekil.19 Optimum koşullar altında belirlenen kalibrasyon grafiği

İdeal tayin aralığı belirlendikten sonra; tekrar üretilebilirlik, tekrarlanabilirlik, kare dalga voltametri, gerçek serum örnekleri, rejenerasyon çalışmaları bu tayin aralığına göre çalışılmıştır.



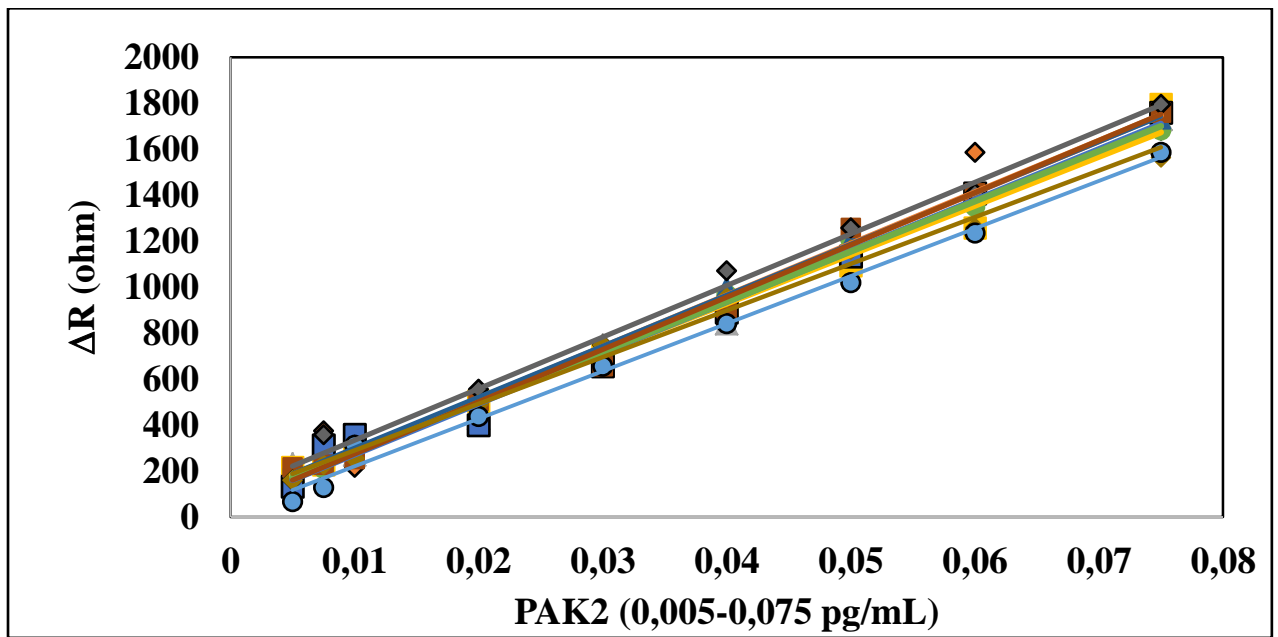
Şekil.20 ITO-PET elektrot biyosensör sistemlerinin farklı PAK2 konsantrasyonlardaki (A)EIS ve (B)CV ölçümleri : (-♦-♦-)yeşil, BSA ölçümü; (-●-●-)mor, 0,005-0,075pg/mL PAK2 ölçümleri

4.3.2. Tekrarlanabilirlik bulguları

İdeal bir biyosensörün en önemli özelliklerinden biri tekrarlanabilir olmasıdır. Gerçekleştirilen bu tekrarlanabilirlik çalışmasında belirlenen optimum koşullar altında, 20 farklı elektroda aynı immobilizasyon işlemleri gerçekleştirilmiş ve her bir sensör 0.06 pg/mL PAK2 konsantrasyonu ile inkübe edilmiştir. Her bir biyosensörün EIS ölçümlerinden elde edilen Rct değerlerinden yararlanılarak kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve birbirine oldukça yakın sinyaller elde edildiği görülmüştür. Tekrarlanabilirlik sonuçlarına göre standart sapma değeri $\pm 0,002948$ pg/mL, ortalama değer 0,061444 pg/mL ve varyasyon katsayısı %4,798 olarak hesaplanmıştır. Bu durum, biyosensörün aynı standart PAK2 çözeltisi konsantrasyonu için tekrarlanabilir sonuçlar verdiğini net bir şekilde göstermektedir.

4.3.3. Tekrar üretilebilirlik bulguları

İdeal bir biyosensörün tekrarlanabilirlik kadar önemli bir diğer özelliği de tekrar üretilebilir olmasıdır. Bu çalışma, her birinde 9 elektrot ile yapılan sensör sistemlerinin defalarca tekrarlanarak doğru, güvenilir ve aynı standartta tekrar tekrar üretilebilir olmasıdır. Bunun üzerine gerçekleştirilen 10 farklı çalışmanın sonunda çizilen grafikler şekil-21’de gösterilmektedir. Oluşan sinyallerin ve her bir standart grafiğin eğimlerinin birbirine çok yakın olmasıyla çalışmanın doğruluğu ve biyosensörün tekrar aynı şekilde geliştirilebileceği kanıtlanmıştır. Yapılan her bir çalışmanın standart grafiği verileri tablo-7’de gösterilmektedir.



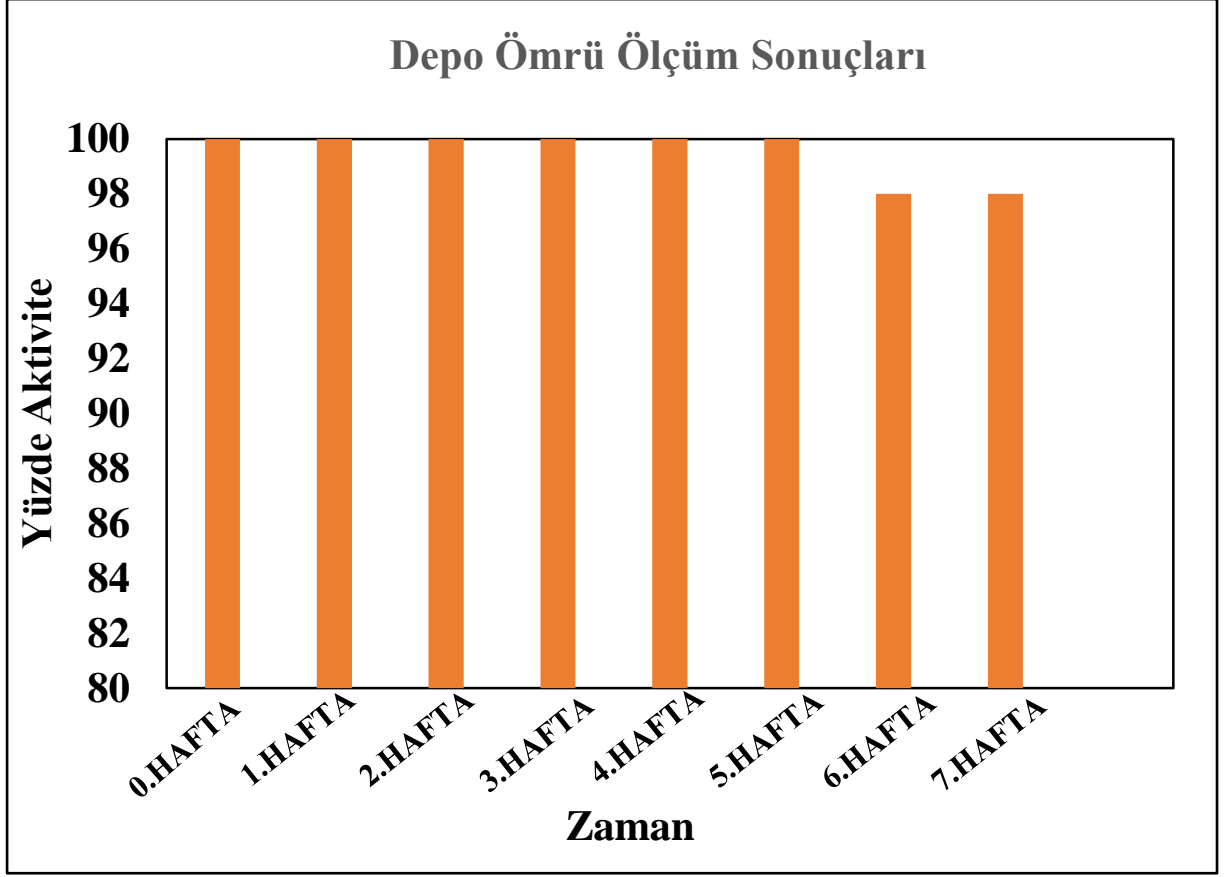
Şekil.21 Tekrar üretilebilirlik çalışmalarının standart eğrileri

Tablo-7 Tekrar üretilebilirlik çalışmalarının standart eğri değerleri

STANDART EĞRİ TÜRÜ	GRAFİK DENKLEMİ	GRAFİĞİN R ² DEĞERİ	TAYİN ARALIĞI
Tekrar üretilebilirlik 1	$y = 20696x + 13,555$	$R^2 = 0,9931$	0,005-0,075 pg/mL
Tekrar üretilebilirlik 2	$y = 22439x + 66,278$	$R^2 = 0,9679$	0,005-0,075 pg/mL
Tekrar üretilebilirlik 3	$y = 21813x + 66,74$	$R^2 = 0,9904$	0,005-0,075 pg/mL
Tekrar üretilebilirlik 4	$y = 21280x + 78,128$	$R^2 = 0,9869$	0,005-0,075 pg/mL
Tekrar üretilebilirlik 5	$y = 22126x + 51,386$	$R^2 = 0,9856$	0,005-0,075 pg/mL
Tekrar üretilebilirlik 6	$y = 21841x + 63,269$	$R^2 = 0,9974$	0,005-0,075 pg/mL
Tekrar üretilebilirlik 7	$y = 22203x + 77,745$	$R^2 = 0,9979$	0,005-0,075 pg/mL
Tekrar üretilebilirlik 8	$y = 22756x + 46,118$	$R^2 = 0,9935$	0,005-0,075 pg/mL
Tekrar üretilebilirlik 9	$y = 22452x + 109,29$	$R^2 = 0,9925$	0,005-0,075 pg/mL
Tekrar üretilebilirlik 10	$y = 20309x + 85,841$	$R^2 = 0,9923$	0,005-0,075 pg/mL

4.3.4. Geliştirilen biyosensörün depo ömrü bulguları

Bir biyosensörün depo ömrü önemlidir. Bu sebeple gerçekleştirilen biyosensörün depo ömrünü görebilmek adına 8 farklı sensör ile 0.hafta, 1.hafta, 2.hafta, 3.hafta, 4.hafta, 5.hafta, 6.hafta ve 7 hafta olmak üzere 7 haftalık bir çalışma yapılmıştır. Anti-PAK2 ve BSA ile inkübe edilen 8 elektrot +4⁰C kapalı ve karanlık ortamda saklanmıştır. 0.haftadan itibaren yani depo gününün başladığı günden itibaren sırasıyla her hafta birin 0,06 pg/mL PAK2 inkübe edilmesi ile elde edilen sonuçlar doğrultusunda şekil 22’de gösterilen grafik elde edilmiştir. Grafik için elde edilen, yani 0.haftadan itibaren antijen olan 0,06 pg/mL PAK2’nin eklenmesi ile EIS ölçümlerinin lineer denklem olan $y = 21137x + 63,652$ denklemine göre sonuçları hesaplanmıştır. Hesaplanan depo ömrü sonucunda çalışılan biyosensörün 7 haftalık depo ömrüne sahip olduğu ve ilk haftadaki PAK2 ölçümlerine göre %2’lik kayıp olduğu gözlemlenmiştir.

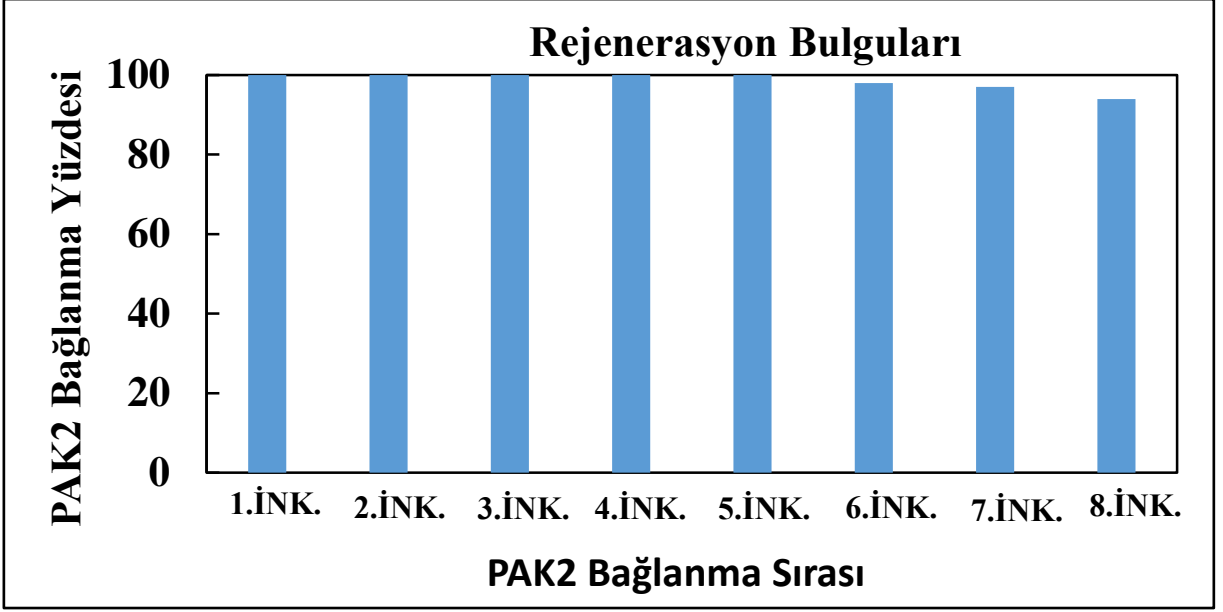


Şekil.22 PAK2 biyosensörünün depo ömrü

4.3.5. Rejenerasyon bulguları

Geliştirilen biyosensör tek kullanımlık olmasının aksine 8 defa PAK2'nin elektrot yüzeyine bağlanıp, sonra 10mM HCL asit çözeltisi ile rejenere edilmesi ile rejenerasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Tek kullanımlık olan tek bir biyosensörün 8 defa PAK2 ölçümünde kullanılabilirdiği ispatlanmıştır. Kullanılan 10mM HCL asit çözeltisi ile rejenere edilen sensörler 7 defa rejenere olarak 8 defa PAK2 bağlanmıştır. 8. bağlamada elektrot yüzeyinde bozulmalar meydana gelmiştir. Yapılan çalışmanın sonuçları şekil-23'te gösterilmiştir.

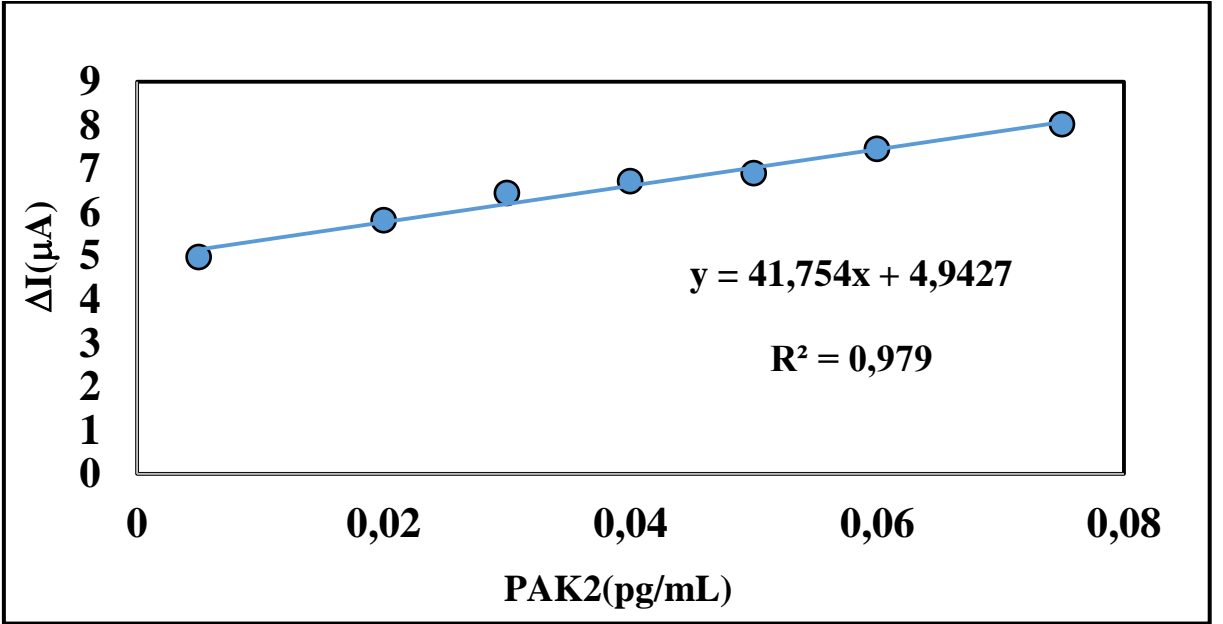
Gerçekleştirilen rejenerasyon işleminde elektrodun tekrar tekrar kullanılabilir olması ve çıkan verimli yüksek sonuçlar, tek bir elektrot ile birçok kez ölçüm alınabilen yüksek kararlılığa sahip bir biyosensör geliştirildiğini ispatlamıştır.



Şekil.23 Rejenerasyon çalışmasının sonuçlarının grafikteki görünümü

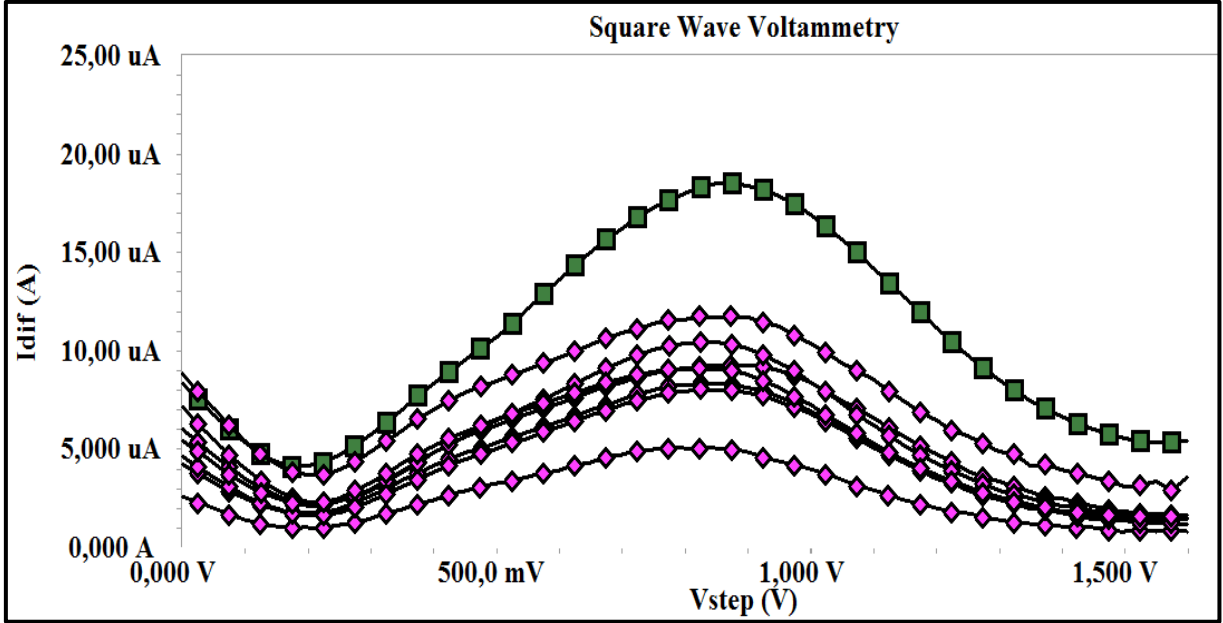
4.3.6. Kare dalga voltametri (SWV)

Geliştirilen sensörün diğer voltametrik tekniklere de yanıt verebildiğini görmek için karedalga voltametri ile bir çalışma gerçekleştirilmiştir. SWV ölçümü alınan 7 elektrot BSA ve PAK2 ile inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon sonucu her bir elektrodun kendi BSA pikleri ile PAK2 pikleri arasındaki fark ele alınmış ve şekil 24'teki grafik elde edilmiştir.



Şekil.24 SWV sonuçlarından elde edilen standart grafik

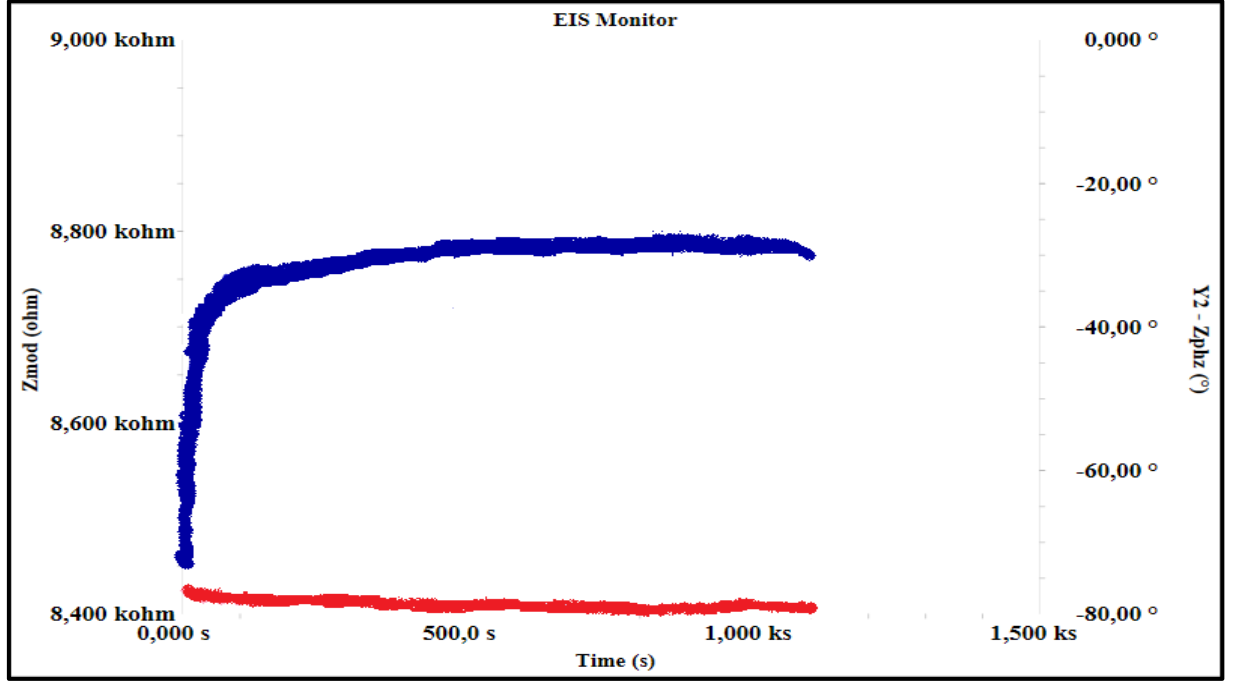
0,005-0,075 pg/mL tayin aralığındaki PAK2 ölçümüne ait kare dalga voltammogramlarının kalibrasyon grafiği Şekil 25'te gösterilmektedir. SWV ölçümlerinde artan PAK2 konsantrasyonları ile pik akımlarında azalmalar görülmüştür. Bu durum da doğrusal olarak artan akım farkı ile birlikte daha fazla PAK2 proteinin yüzeye bağlandığını göstermiştir.



Şekil.25 Belirlenen tayin aralığının SWV ile ölçümleri: (-■-■-) yeşil: BSA ölçümü, (-◆-◆-) pembe: 0,005-0,075 pg/mL PAK2 ölçümleri.

4.3.7. Sabit Frekans ile Ölçüm Bulguları

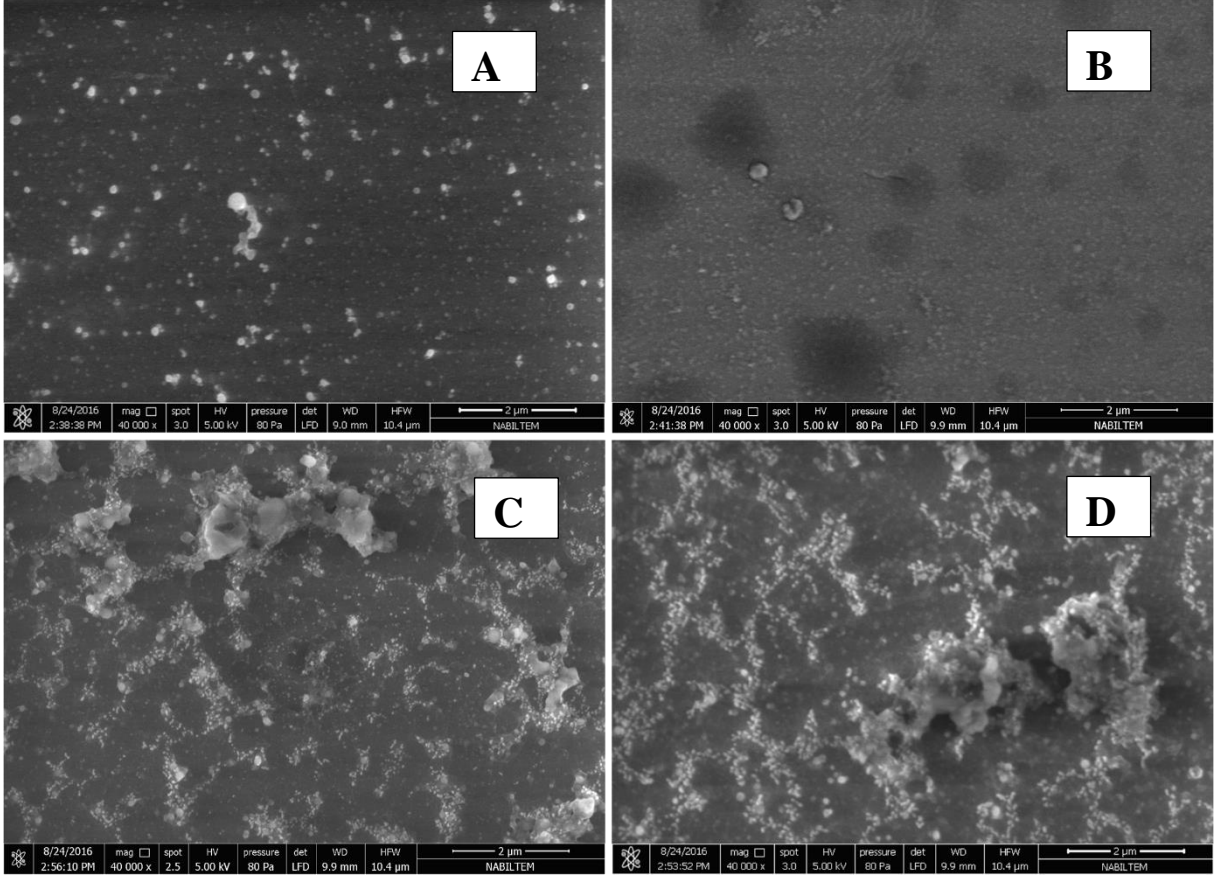
Sabit frekanslı çalışmanın amacı, PAK2'nin biyosensör yüzeyine zamanla bağlanış sinyallerini anlık görüntüleyebilmektir. Sabit frekans ölçümü için 10Hz frekansı seçilmiş ve 0,06 pg/mL konsantrasyonuna sahip PAK2 çözeltisinde ölçüm alınmıştır. 30 dakika ölçüm alınarak PAK2'nin biyosensör üzerine bağlanışı takip edilmiştir. PAK2 biyosensörüne ait Sabit frekanstaki impedans ölçümü şekil 26'da verilmiştir.



Şekil.26 Sabit frekansta biyosensör yüzeyine PAK-2 bağlanışının ölçümleri: mavi; sabit frekans ölçümü, kırmızı; faz açısı ölçümü.

4.3.8. Biyosensörün SEM Görüntüleri

Biyosensörün yüzeyine immobilize edilen 3-GPTMS, antiPAK2, BSA ve PAK2'nin SEM cihazı ile görüntüleri alındı ve görüntüler şekil 27'de gösterilmektedir. A'da 3-GPTMS ile elektrot yüzeyinde oluşturulan SAMs tabakası görülmektedir. B'de SAMs üzerine anti-PAK2'nin immobilize oluşu görülmektedir. C' de SAMs ve anti-PAK2 üzerine bloklayıcı ajan olan BSA'nın immobilize oluşu görülmektedir. D'de ise PAK-2 antijeninin eklenmesi ile immobilizasyon işleminin tamamlanmış hali görülmektedir.



Şekil.27 SEM cihazı ile biyosensörün yüzeyindeki 3-GPTMS, antiPAK2, BSA ve PAK2 görüntüleri: (A),ITO/ OH/ 3-GPTMS ; (B), ITO/OH/3-GPTMS/AntiPAK2 ; (C), ITO/OH/3-GPTMS/Anti-PAK2/BSA ; (D), ITO/OH/3-GPTMS/Anti-PAK2/BSA/ PAK2

4.3.9. Serum örnekleri ile Çalışma bulguları

Sağlıklı bireylerin kanında bulunan PAK2 konsantrasyon değeri 0-1,2 ng/mL aralığındadır. Buna karşılık olarak 8 farklı bireyden alınmış olan serum örnekleri PAK2 tayini için hazırlanmıştır. Bu aşamada her bir bireyden alınan serum örnekleri gerekli seyreltme işlemleri yapılarak elektrotlara uygulandı. Bunun sonucunda kalibrasyon grafiğine ait lineer denklem kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır ve yapılan hesaplamalar sonucu elde edilen her bir bireyin kan serumundaki PAK2 değerleri tablo 8’de verilmiştir. Sonuçlarda da görüldüğü üzere başarılı sonuçlar elde edilmiştir ve biyosensör PAK2 antijenini bağlamıştır.

Tablo-8 Geliştirilen biyosensör ile, 8 sağlıklı bireyin kan serumunda, PAK2 konsantrasyon tayininden elde edilen, PAK2 konsantrasyon (ng/mL) sonuçları

Birey	PAK2 Konsantrasyonu (ng/mL)	Sağlıklı Bireylerin Kan Serumlarında Bulunan PAK2 konsantrasyonu
1.BİREY	0,6	0-1,2 ng/mL
2.BİREY	0,64	0-1,2 ng/mL
3.BİREY	0,647	0-1,2 ng/mL
4.BİREY	0,734	0-1,2 ng/mL
5.BİREY	0,742	0-1,2 ng/mL
6.BİREY	0,629	0-1,2 ng/mL
7.BİREY	0,691	0-1,2 ng/mL
8.BİREY	0,678	0-1,2 ng/mL

5. SONUÇ

DNA'daki hasar sonucu meydana gelen kanser ölüm nedenlerinin baş sıralarında yer almakta olan karmaşık ve önemli bir hastalıktır. Tedavisinde kullanılan yöntemlerin etkileri, tedavinin başarısını ve etkinliğini azaltmaktadır. Hastalığın erken teşhisi tedavisi için önemlidir. Ancak uygulanan geleneksel tanı yöntemleri ile kanserin erken teşhis edilmesi güçtür. Bunun üzerine son yıllarda yapılan çalışmalar kanserin oluşumu ve gelişimi ile ilgili biyokimyasal ve moleküler düzeyde yeni katkılar sağlamıştır. Biyosensörlerin, klinik teşhis, ilaç üretimi, tıbbi uygulamalar, süreç denetleme, biyoreaktörler, tıbbi uygulamalar gibi alanlarda yaygın olarak kullanımı söz konusudur. Biyosensörler bugün için medikal tanı ve teşhis alanında kullanılmaktadır. Biyosensörler, örnek alımı ve sonuç verme arasındaki süreyi oldukça kısaltmaktadırlar.

Bu tez çalışmasında, meme kanseri, baş-boyun kanseri, akciğer kanseri ve mide kanseri gibi birçok kanser hastalığında rastlanan PAK-2 (p21-Activated kinase 2) kanser antijenine yönelik hassas, seçici ve tek kullanımlık bir biyosensör oluşturulmuştur. Burada PAK2'nin döngüsel voltametri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi ile immobilizasyon adımları ve elektrot yüzeyine bağlanması incelenmiştir. Bu bağlanmanın en iyi şekilde gerçekleşmesi adına yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda SAM %0,5'lik 3-GPTMS olarak belirlenmiştir. Bunun dışında kullanılan anti-PAK2 konsantrasyonu 3,75ng/mL şeklindedir. İnkübasyon süre optimizasyonlarının sonucunda ise, anti-PAK2'nin yüzeye 45dakikda, PAK-2'nin ise 30dakikada yüzeye daha verimli ve yüksek sinyaller vererek bağlandığı görülmüştür. Bu belirlenen süre ve konsantrasyonlarda en iyi şekilde elektrot yüzeyine immobilizasyon gerçekleştirilmiştir ve bu kriterler ile uzun depo ömrüne sahip, tekrar üretilebilir, tekrarlanabilir, hassas ve ekonomik tek kullanımlık bir biyosensör geliştirilmiştir. Gerçek serum örnekleri ile yapılan çalışma sonucunun olumlu olması biyosensörün duyarlı ve hassas olduğunun kanıtıdır.

KAYNAKLAR

Abalı,Hüseyin2014.www.medikalonkolog.com/wp-content/uploads/2014/04/Kanser-nedir.pdf. Erişim Tarihi: 10.10.2016

Aliustaoğlu, Mehmet 2009. <http://www.klinikgelisim.org.tr/eskisayi/2009>,

"Temel Kanser Fizyopatolojisi." Erişim Tarihi: 10.10.2016

Altınışik, Mustafa 2009. 'KANSERİN MOLEKÜLER TEMELİ- ONKOGENLER' Erişim Tarihi: 10.10.2016

Aslan, Canan 2008. 'Hormonların Endometriyum Hücrelerinde Hücre Proliferasyonunu Düzenleyen Mekanizmalar Üzerine Etkileri'. İstanbul Bilim Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Aykut, Umut 2006. 'Biyosensörler ve Gıdalarda Kullanımı' Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi 2006 (3) 51-59

Bhatt, Anant Narayan ve ark. 2010. 'Cancer biomarkers - Current perspectives' Indian Journal of Medical Research;Aug2010, Vol. 132 Issue 2, p129

Bulut, Y. 2011. 'Biyosensörlerin Tanımı ve Biyosensörlere Genel Bakış' Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ. 6th International Advanced Technologies Symposium (IATS'11), 16-18 May 2011

Derkuş, Burak 2012. 'Anti-miyelin Temelli Protein Tayini İçin İmpedimetrik İmmüno-sensör Geliştirilmesi' Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Erdenen, Füsün 2007. <http://www.istanbulmedicaljournal.org/sayilar/36/buyuk/15-19.pdf> İstanbul Tıp Dergisi 2007;4-49-5215-19 Erişim Tarihi:10.10.2016

Gururaj, Anupama E ve ark. 2004. <http://breast-cancer-research.com/content/7/1/5> 'p21-activated kinase signaling in breast cancer' Department of Molecular and Cellular Oncology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA Vol 7 No 1

- Hou, M. Y. 2005. Eleboration Et Characterisation de Biofilms Pour Micro et Nanobiocapteurs Olfactifs, cegly.ec-lyon.fr/IMG/pdf/These_Yanxia_Hou_2005.pdf
- Jakobi, Rolf ve ark. 2003. 'Caspase-activated PAK-2 Is Regulated by Subcellular Targeting and Proteasomal Degradation' Department of Biochemistry, Kansas City University of Medicine and Biosciences, 1750 Independence Ave, Kansas City, MO64106.
- Kantarıcı, Gülten ve ark. 2006. <http://dergiler.ankara.edu.tr/> Ankara Ecz. Fak. Derg. 35 (2) 149 - 170 , 2006 Erişim Tarihi: 15.10.2016
- Kasap, Mülkiye 2003. <http://cu.dergipark.gov.tr/> ARŞİV 2003; 12: 328 Erişim Tarihi: 15.10.2016
- Kılıç, Leyla ve ark. 2011. http://www.klinikgelisim.org.tr/kg_243/1.pdf Erişim Tarihi: 15.10.2016
- Kılıçturgay, K. 2003. 'İmmünoloji' Ankara, KILIÇTURGAY, K., İmmünolojiye Giriş. Güneş ve Nobel Tıp Kitabevleri, 3. Baskı. pp.71-73.
- Kosoff, Rachel E. 2015. 'p-21 activated kinase 2: Signal Transduction in mast cells, megakaryocytes and in vivo homeostasis'. *Publicly Accessible Penn Dissertations*. Paper 1077.
- Köse, Serkan İrfan 2013. 'Biyomarkerlar ve Klinik Kullanımları' *Biyomarkerlar ve Klinik Kullanımları Dicle Üniv Vet Fak Derg* 2013:2(1):30-37
- Kumar, Rakesh ve ark. 2003. 'p21-activated kinases in human cancer' Department of Molecular and Cellular Oncology, Unit 108, The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, 1515 Holcombe Blvd., Houston, Texas 77030. *Cancer and Metastasis Reviews* 22:385–393, 2003
- Martin, E.J. 2001. Composite Films for Modifying Evanescent Wave Characteristics in Long-Period Grating, Master's Thesis, http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-02172001_014116/unrestricted/JEMartinETD.pdf

Mishra, Alok 2010. 'Cancer Biomarkers: Are We Ready for the Prime Time?' *Cancer* 2010,2,190-208; doi:10.3390/cancers2010190 *cancers* ISSN 2072-6694
www.mdpi.com/journal/cancers

Oylar, Ömer 2011. 'Kanserin Teşhisinde ve Tedavisinde Nanoteknolojinin Önemi' *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, Cilt 16, Sayı 1, 2011 Erişim Tarihi: 15.10.2016

Parkinson, G. and Pejčić, B. 2005. 'Using Biosensors Detect Emerging Infectious Diseases' Nanochemistry Research Institute, Curtin University of Technology Perth, Western Australia, Prepared for the Australian Biosecurity Cooperative Research Centre, Final Report.

Park, Seung Won, Jeewon Lee, Suk In Hong, Seung Wook Kim 2003.' Enhancement of stability of GL-7-ACA acylase immobilized on silica gel modified by epoxide silanization. *Process Biochemistry* 39 (2003) 359/366

Sharafi, Parisa ve ark. 2010. 'Biyobelirteçler ve Lizozomal Depo Hastalıkları' *Hacettepe Tıp Dergisi* 2010; 41:142-146

Tekin, İsmail 2011. 'Kanserin Teşhisinde ve Tedavisinde Nanoteknolojinin Önemi' *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, Cilt 16, Sayı 1, 2011 Erişim Tarihi: 15.10.2016

Thevenot D.R., Toth K., Durst R.A., Wilson G.S Electrochemical Biosensors: Recommended Definition and Classification, *Pure. Appl. Chem.* 1999, 7, 2333–2348.

Tse, Yuk Ting 2014. 'The role of p21-activated kinases in hepatocellular carcinoma metastasis' *The role of p21-activated kinases in hepatocellular carcinoma metastasis. Journal of Molecular Signaling.* 2014;9:Art. 7. DOI: <http://doi.org/10.1186/1750-2187-9-7>

Üstüner, Işık ve ark. 2004. <http://dergiler.ankara.edu.tr/dergiler/36/200/1629.pdf> ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ MECMUASI Cilt 57, Sayı 4, 2004 239-248

Vo-Dinh T, Cullum B.: Biosensors and biochips: Advances in biological and medical diagnostics Fresenius J. Anal. Chem., 2000, 366, 540–551

Yokuş, Beran 2012. <http://www.dicle.edu.tr/bolum/Muh/veteriner/dergi/> Kanser Biyokimyası Dicle Üniv Vet Fak Derg 2012: 1(2): 7-18

ÖZGEÇMİŞ

Nergiz YILMAZ, 1988 yılında Tekirdağ/Merkez’de dünyaya gelmiştir. 1994-1999 yılları arasında Cumhuriyet İlköğretim Okulu’nda ilköğretim eğitimini tamamlamış, 2002-2005 yılları arasında Namık Kemal Lisesi’nde lise öğrenimini bitirmiştir. 2009-2014 yıllarında Dumlupınar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Anabilim Dalı’nda lisan eğitimini tamamlamış, 2015 yılında Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başlamıştır