

# TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

ÜNİVERSİTE VE ÜZERİ SEVİYESİ SEVİYESİ FİKİR

KATEGORİSİ

TAKIM ADI

Neo-DiagnoKit

PROJE ADI

Kanser Hücreleri Tarafından Ekspres Edilen Proteinlerin (Neoantijenler) Aptamer Esaslı Biyosensör Teknolojisi ile Deteksiyonu Prensibine Dayanan Hızlı ve Yenilikçi “Kanser Tanı Yöntemi”

BAŞVURU ID

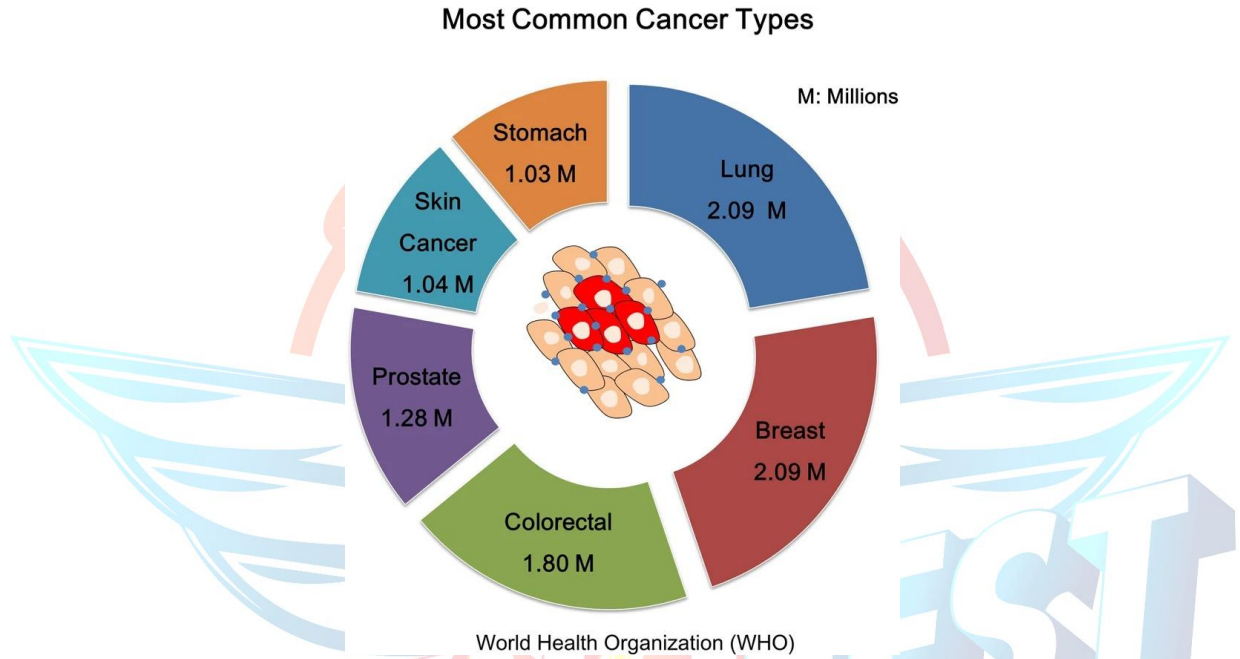
#411860

## İçindekiler

<b>1. Proje Özeti (Proje Tanımı)</b> .....	3
<b>2. Problem/Sorun</b> .....	5
<b>3. Çözüm</b> .....	6
<b>4. Yöntem</b> .....	6
4.1 . Public Neoantigen Sekanslarının Belirlenmesi.....	6
4.2 . SELEX Yöntemi ile Aptamer Sentezi.....	7
4.3 P-GR Nanosheet Yapılarının Hazırlanması.....	8
4.4 GR/AuNPs Kompozitlerinin Hazırlanması.....	9
4.5 . Elde Edilen Grafen Yapılarının Karakterizasyonu.....	9
4.6 . Altın Nanoçubuklarının Sentezi.....	10
4.7 . Altın Nanopartikül Karakterizasyonu.....	11
4.8 Sentezlenen Aptamerlerin Biyosensör Yüzeyine Entegrasyonu ve Biyosensör Sisteminin Hazırlanması.....	11
4.8.1. Grafen Yüzeyin Fonksiyonelleştirilmesi.....	12
4.9. Biyosensör Sisteminin Test Edilmesi.....	12
<b>5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü</b> .....	12
<b>6. Uygulanabilirlik</b> .....	12
<b>7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması</b> .....	13
<b>8. Proje Fikrinin Hedef Kitleleri (Kullanıcılar)</b> .....	13
<b>9. Riskler</b> .....	14
<b>10. Kaynaklar</b> .....	16

## 1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

Kanser, mutasyonlar sonucu hücrelerin kontrolsüz bölünmesine sebep olan ve böylece dokuların işlevini bozan, bu hücrelerin başka organlara göç etmesiyle başka organlara da zarar veren, sağlık sistemine önemli bir yük getiren ölümcül ve genetik bir hastalıktır. Dünyada, 2020 yılında 19,3 milyon yeni vaka bildirildiği ve 10 milyon kişinin de kanser nedeniyle hayatını kaybettiği bilinmektedir [1]. Türkiye’ de ise aynı yıl 233 834 kişiye kanser tanısı konurken, kansere bağlı can kaybı ise 126 335 kişidir [2]. Kanser hastalığının erken teşhisiyle, sağ kalım süresi ve tedavisi arasında oldukça önemli bir pozitif korelasyon vardır. Erken teşhis edilen ve hızlıca tedaviye başlanan kanser hastalarının hayatta kalma oranı %92’ye ulaşabilmektedir [3].



**Şekil1.** Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre dünya üzerinde en sık rastlanan kanser türleri ve kişi sayısı.

Aptamerler, yüksek özgüllükte ve yüksek afiniteyle hedef moleküle bağlanabilen, rastgele DNA oligonükleotitlerinden sentezlenen oligomerlerdir. Kendilerine özgü üç boyutlu konformasyonları ve geniş bağlanma yüzeyine sahip olması yüksek afinite sahibi olmasının temel nedenidir [4]. Antikorlara göre daha kararlı bir yapıya sahip olmaları, sinyalleri daha kolay şekilde sayısallaştırabilmesi, sentezlenmesi nispeten daha kolay ve daha düşük maliyette olması lab-on-a-chip teknolojisini kullanan araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiştir [5]. Ayrıca yüksek üretim verimi, immobilizasyon kolaylığı ve yüksek seçicilik özelliklerine de sahiptir [6]. Bu tip avantajlarının bulunması sebebiyle teşhis ve terapötik alanında dikkat çekici hale getirmiştir Kanser biyobelirteçlerinin tayini son yıllarda ana odak noktası haline geldi. Belli kanser türüne özgü biyomarkerları belirlemek, hastalığın teşhisini kolaylaştırmasının yanı sıra hastalığın seyrinin ve nüksetmesinin de takibini sağlamayı kolaylaştırmaktadır [7]. Ayrıca tek bir biyobelirtece bakmak kanser teşhisini zorlaştırmanın yanı sıra yanlış değerlendirilmesine de yol açabilmektedir. Bu sebepten dolayı literatürden belirlenecek olan public neoantijenlerden en yaygın olanlar belirlenerek sistem oluşturulacaktır.

**Tablo1.** Antikor ve aptamer özelliklerini karşılaştırılması

Özellikleri	Aptamerler	Antikorlar
Temel Kompozisyon	Nükleotitler (A,G,T/U,C)	Aminoasitler
Moleküler Ağırlık	Küçük (~6-30kDa)	(~150-180 kDa)
Sentez Zamanı	1 saat – 1 ay	Birkaç Ay (~6ay)
Kalite Kontrol (Parti Varyasyonları)	Düşük	Yüksek
İstikrar	Çok Kararlı	Sıcaklık ve pH Değişikliklerine Duyarlı
Hedef	Geniş Hedef Yelpazesi	İmmünojenik Moleküller
Hedefe Yakınlık	$K_d \sim 10^{-10} - 10^{-7}$ M	$K_d \sim 10^{-10} - 10^{-7}$ M
Özgüllük	Yüksek	Yüksek
Toksosite	Gözlenmedi	Bağışıklık Reaksiyonları
Kimyasal Modifikasyonlar	Kolay ve Çok Çeşitli Modifikasyonlar	Zor ve Sınırlı Değişkenler
Depolanması	Ortam Sıcaklığında Kararlı	Düşük Sıcaklıkta Kararlı
Sentez	Laboratuvar Ortamında	Canlılarda
Maliyet	Ucuz	Masraflı

Bu projenin amacı kanser hastalarını erken teşhis edebilmek ve erken tedavi uygulama yolunu açmaktır. Bu sayede kanserle mücadele eden hastaların gerek psikolojik açıdan gerekse fiziksel sağlık açısından en az hasarla tedavisini yapmak mümkün olacaktır. Bu projenin hedefi kanserin erken teşhisinde kullanılacak aynı anda birkaç biyobelirtece bağlanabilen konjuge aptamer temelli floresan biyosensör geliştirmektir. Kanser teşhisini güçlendirebilmek adına aynı anda farklı parametreleri değerlendirebilmek hızlanma ve doğruluk açısından önemlidir [8]. Son zamanlarda yapılan çalışmalar da bu yönde evrilmiştir.

Çoğu kanser türünde TP53 geninin mutasyona uğradığı ya da işlevini kaybettiği görülmüştür. TP53 geni tümör baskılayıcı protein olarak bilinen p53 proteinini üretmek için gerekli kodları barındırmaktadır. TP53 molekülü DNA hasarına sahip olan hücreyi G1 evresinde durdurarak DNA hasarının onarılmasını sağlamakla görevlidir. DNA onarıldığı takdirde hücre bölünmesine devam etmektedir. Ancak hasarın onarılmaması durumunda TP53 hücreyi apoptoza zorlamaktadır (kontrollü hücre ölümü) [9]. Yapılan araştırmalarda en sık mutasyona uğrayan genin TP53 olduğu bulunmuştur ayrıca birçok kanser türünde bu genin mutasyona uğradığı görülmüştür [10]. Literatürde mutasyona uğrayan TP53 geninin eksprese ettiği protein sekansları mevcuttur. Önerilen bu projede ise belirlenen neoantijenleri ve kanser proteinlerini tespit edebilecek aptamer tabanlı grafen based biyosensör üretilecektir. Üretilen biyosensör kuyucuklu sisteme sahip olacak ve her bir kuyucuğa bir aptamer yerleştirilecektir. Aptamerler neoantijeni tanıdığı ve bağlandığı takdirde floresan ışık yayacaktır. Ancak bu ışık gözle görülemeyecektir. Bu yüzden görüntüleme için hem floresan mikroskop hem de konfokal mikroskop ile görüntülenecektir.



## 2. Problem/Sorun

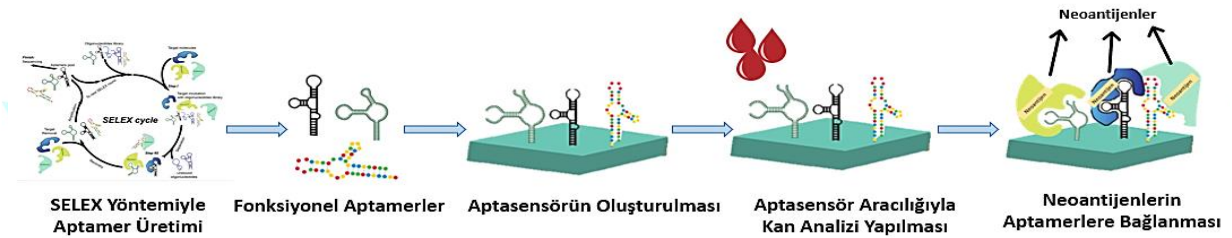
Kanser bilindiği üzere çağımızın en büyük sağlık sorunlarının başında gelmektedir. Kanser sebebiyle birçok insan hayatını kaybetmektedir. Kanser en kesin çözümünün erken teşhis olduğu aşikardır. Kanser tedavisi edilememesinin başlıca sebeplerinden biri de teşhis için geç kalınması ve kanserin diğer organlara da sıçrayarak yayılımına devam etmesidir. Günümüzde kullanılan kemoterapi ilaçları da hastaları oldukça yıpratmaktadır.

Kanser başlıca sebepleri olarak; stres, hava kirliliği, sigara/alkol ve radyasyon örnek verilebilir. Günümüzde her evde tablet, telefon, bilgisayar ve televizyon gibi birçok elektronik alet bulunmaktadır. Bu sebeple artık insanlar daha fazla radyasyona maruz kalmaktadır. Sürekli yeni fabrikaların açılması ya da egzoz gazları gibi birçok etken her geçen gün havayı kirletmeye devam etmektedir. Soluduğumuz hava da kalitesiz olduğu takdirde sağlığımızı tehlikeye atmaktadır. Sigara ve alkol kullanımının ise reşit olma yaşı olan 18 yaşının bile altına düşmektedir. 2021 yılında yapılan bir çalışmadan alınan verilere göre lise öğrencileri arasında hayatında en az bir kere tütün kullanım yaygınlığı %37, alkol kullanım yaygınlığı ise %51,2 olarak belirtilmektedir [11]. Ülkemizde genç yaşta sigara ve alkol kullanımını bile bu denli fazla iken ülke nüfusumuzun da kansere yakalanma olasılığı bu verilerle orantılıdır. Dünya genelinde de kanser hastalığı verileri oldukça yüksektir. Uluslararası kanser araştırmaları ajansı (IARC) tarafından 2020 yılında yayınlanan verilere göre tahmini olarak belirtilen yılda 19,3 milyon yeni vaka sayısı bildirilirken 10 milyon kansere bağlı ölüm gerçekleşmiştir. Dünyayı kasıp kavuran ve 17 Kasım 2019 tarihinde Çin'in Hubei bölgesinin başkenti olan Vuhan'da ortaya çıkan Covid-19 (Koronavirüs) pandemisinde bile şimdiye kadar toplam vaka sayısı 514 milyon iken vefat sayısı 6,24 milyondur. Bu verileri kanser vakalarıyla karşılaştırdığımızda, kanserin küresel boyutta ne kadar büyük bir sağlık problemi olduğu gözler önüne serilmektedir. Kanser erken teşhisi tedavi için büyük önem arz etmektedir. Kanser ilk evrelerde gösterdiği belirtiler ise hastalar tarafından fark edilememektedir. Fark edildiğinde ise genellikle tedavi için çok geç kalınmış olmakta ya da tedavi sürecini oldukça uzatacak ve zorlaştıracak evredeyken fark edilmektedir. Kanser belirtileri genellikle güçlü ağrılar, açıklanamayan kilo kaybı, vücudun belli bölgelerinde hissedilen kitleler olmaktadır. Bu belirtilerle hekime danışıldığında birçok test yapılarak teşhis koyulabilmektedir. Ancak bazı hastalarda hekimlerin gözden kaçırdığı durumlar meydana gelebilmektedir. İlerleyen zamanda ise kanser oldukça ilerledikten sonra fark edilebilmektedir. Teşhis etmenin zor olduğu bu hastalık için erken teşhisi kolaylaştıracak bir proje önerisi sunmaktayız.

Günümüzde bazı biyoteknoloji şirketlerinin kanser aşuları üzerinde çalışmalar yaptığı bilinmektedir. Hepimizin pandemi dolayısıyla tanıdığı Uğur Şahin ve Özlem Türeci'nin Biontech firması bünyesinde kanser aşuları üzerinde çalışmalar yaptığını bilmekteyiz. Üretilen bu aşular kişiye özel neoantijenleri tespit ederek yine kişiye özel aşı tasarlanması hedeflenmektedir. Bu projede sunduğumuz fikirde yayınlanmış public neoantijenleri tanıyacak biyosensör sistemi geliştirmeyi hedeflemekteyiz. Yeterli destek alınıp proje gerçek hayata geçirildiği takdirde kanser aşularının üretimine yardımcı olabileceğini hatta yerli ve milli imkanlarla kendi kanser aşımızı üretebilecek firmalara destek olabileceğimizi düşünmekteyiz.

### 3. Çözüm

Günümüzün global çapta en büyük sağlık sorunu olan kanser hastalığıyla savaşmanın en önemli yolu şüphesiz erken teşhistir. Bu proje kapsamında kanseri en erken evrede, henüz tümör oluşumu başlamamışken tespit edebilmeyi hedeflemektedir. Kanserli hücreler normal vücut hücrelerinden farklı olarak çeşitli sebeplerden dolayı mutasyona uğramış hücrelerdir. Bu sebepten dolayı hücrelerde genetik bazı değişiklikler meydana gelmektedir. Bu değişiklikler de sentezlenen proteinlerinin yanlış olmasına ve işlevini yitirmiş olmasına sebebiyet vermektedir. Bu şekilde üretilmiş bozuk proteinlere ‘neoantijen’ adı verilmektedir. Literatürde shared public neoantijen olarak neoantijen sekansları yer almaktadır. Neoantijenler sağlıklı hücreler tarafından eksprese edilmezler. Kanser teşhisi için kullanılacak spesifik bir biyobelirteç oldukları düşünülmektedir. Projede aptamer temelli biyosensör sistemi tasarlanmaktadır. Aptamerler hedef moleküle oldukça spesifik şekilde bağlanabilen kendine özgü üç boyutlu yapıya sahiptirler. Geniş bağlanma yüzeyine sahip olduklarından dolayı hedef moleküle bağlanmaları daha efektif olmaktadır.



Şekil 2. Proje proses şeması.

Shared public neoantijen sekansları kullanılarak, aptamerler sentezlenecektir. Aptamerler biyosensör yüzeyine yerleştirilecek ve sensör sistemi kurulacaktır. Ardından kanser şüphesi taşıyan kişiden alınan kan sensöre aktarılacak. Neoantijenle aptamer bağlanması durumunda sensör sinyal oluşturacaktır. Bu sayede kişinin neoantijen taşıdığı anlaşılacaktır. Henüz tümör dahi oluşmamışken kişinin kanser tehlikesiyle karşı karşıya olduğu görülmüş olacak ve takibe alınacaktır. Daha sonrasında hızlıca başlayan tedavi süreciyle beraber, insanlar mental ve fiziksel olarak en minimal düzeyde hasarla kanseri yenmiş olacaktır. Bu projenin bir diğer avantajı ise kanser şüphesiyle hastanelere başvuran kişilere birçok test uygulanmaktadır. Bu testlerin sonuçları incelenirken bazı durumlarda hekimlerin gözünden kaçabilmektedir. Bu projenin hayata geçirilmesi durumunda gözden kaçırılan kanser hastalarının sayısının da azalacağını düşünmekteyiz.

### 4. Yöntem

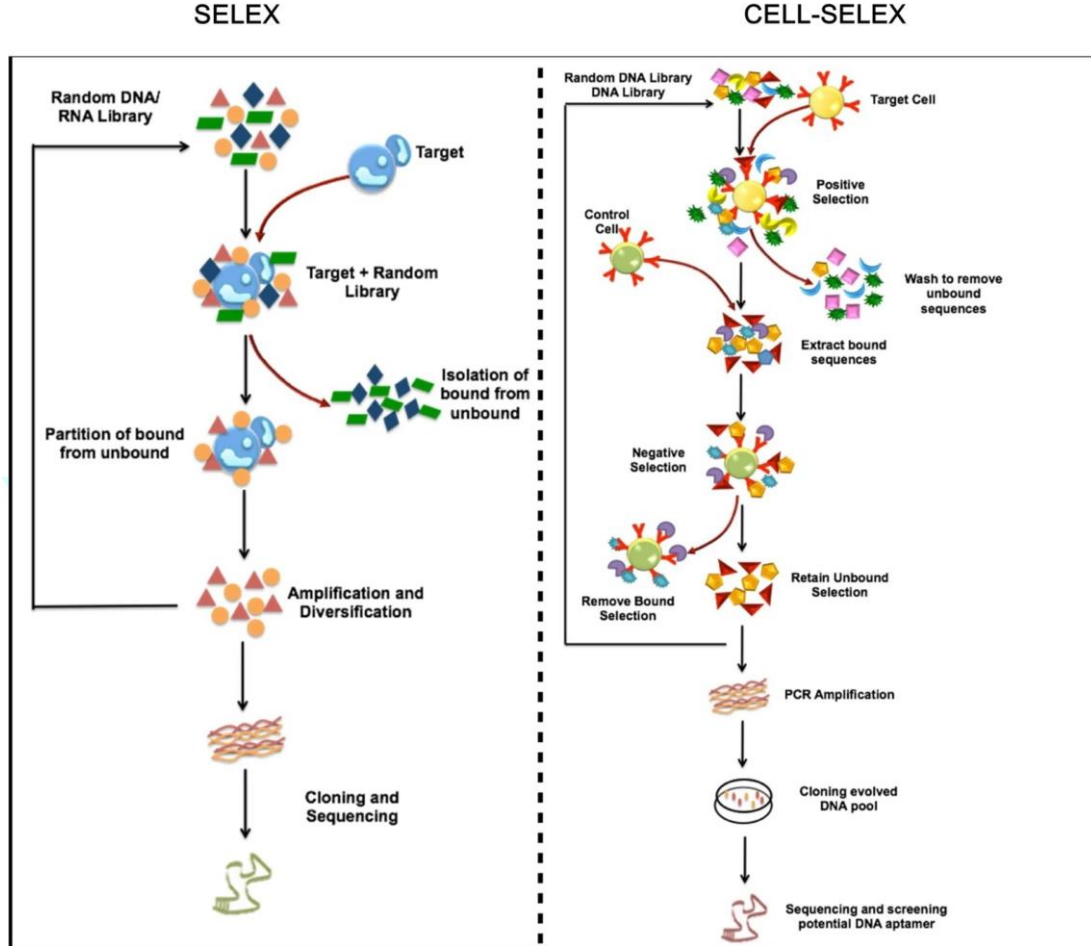
#### 4.1. Public neoantigen sekanslarının belirlenmesi

Neoantijenler normal hücreler tarafından eksprese edilmediği ve sadece tümörlü hücreler tarafından eksprese edildiği için kanser araştırmaları için önemli hedeflerdir. Yeni nesil dizileme (Next-Generation Sequencing -NGS) sayesinde neoantijenler maliyeti daha düşük ve hızlı bir şekilde sekanslanabilmektedir [12]. Sunulan projede shared public neoantijen sekansları literatürden alınacaktır. Ayrıca kullanılacak olan mutasyona uğramış olan TP53 geninden sekanslanan proteinler de tümör biyobelirteçleridir. Gen sekans database'leri mevcuttur. OMIX

ve GEO Database'leri kullanılacaktır.

#### 4.2.SELEX yöntemi ile aptamer sentezi

Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) yöntemi kullanılarak aptamer sentez edilecektir.



Şekil 3: Aptamer üretiminin SELEX ve hücre-SELEX tarafından şematik gösterimi.

Başlangıçta ticari olarak elde edilen ve yaklaşık olarak  $10^{13}$ - $10^{14}$  tane farklı dizi çeşidi içeren ssDNA kütüphanesi ile bu proje için belirlenen hedef molekül public neoantijenlerle birlikte inkübe edilir [13]. İlk aşamada her biri farklı dizilimlerinden dolayı farklı üç boyutlu şekle sahip olan yapıların neoantijenlere bağlanması beklenecektir [14]. Daha sonrasında bağlanmayan diziler yıkama tamponu ile yıkılarak istenilen aptamer dizileri saflaştırılacaktır. Kullanılacak olan yıkama tamponu  $\text{CaCl}_2$ 'li Dulbecco fosfatlı tampon salini 5 mM  $\text{MgCl}_2$  ve 4,5 g/L glukoz içereceği düşünülmektedir [15]. Literatürde bu işlem 5-12 kez arasında tekrarlanmaktadır. Yüksek afiniteye sahip aptamer sentezlemek için, aptamer kütüphanesini geliştirmek ve amplifikasyon turlarının sayısını arttırmak gerekir [16]. Bu sebepten dolayı yapılacak olan bu çalışmada amplifikasyon turları 12 kez tekrarlanması düşünülmektedir.



### 4.3. GR nanosheet yapılarının hazırlanması

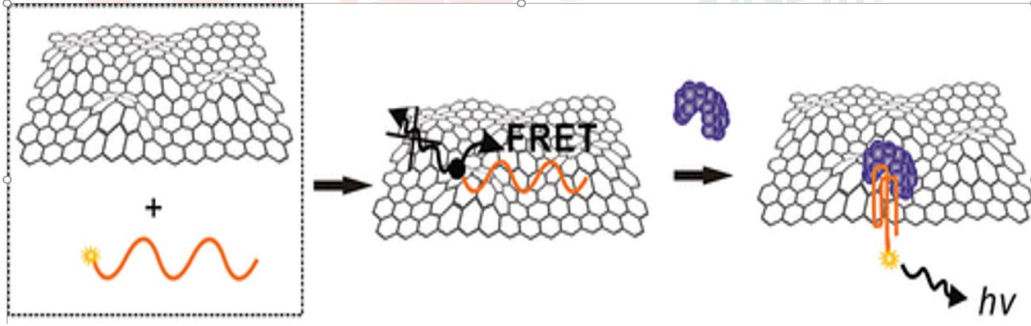
İlk olarak, GO, çoğunlukla bilinen ve költ sentez yöntemi olarak bilinen geleneksel Hummers yöntemi yerine modifiye edilmiş Hummers yöntemiyle doğal grafit tozundan sentezi gerçekleştirilecektir. Genel olarak, önceden oksitlenmiş grafit tozları, karıştırma altında kademeli olarak Potasyum permanganat ( $\text{KMnO}_4$ ) tuzu ilavesiyle  $0^\circ\text{C}$ 'de konsantre Sülfürik(VI) asit ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) konulacaktır. Karışım reaksiyona girmesi için  $35^\circ\text{C}$ 'de birkaç saat inkübe edilecektir ve deiyonize su ile bir buz banyosunda kademeli/aşamalı olarak seyreltilme işlemi gerçekleştirilecektir. Ardından  $\text{H}_2\text{O}_2$  eklenerek, karışım yeniden seyreltilenecektir. Bulunan karışım, parlak sarı rengine dönüştüğünde süzme işlemi gerçekleştirilecektir ve HCl sulu solüsyonu ve süzülen kısımda kalan pelet deiyonize su ile yıkanacaktır. Elde edilen grafit oksit tozu, grafit oksit dispersiyonu içinde diyaliz edilecektir. Daha sonrasında hazırlanan GO, metal iyonlarını ve asidi tamamen uzaklaştırmak amacıyla 7 gün boyunca diyalize tabi tutulacaktır. Hepimizin bildiği üzere biyolojik materyallerle veya dokuyla etkileştirilecek herhangi bir malzemenin kimyasal olarak toksik olmaması gerekmektedir. Bu sebeple diyaliz kullanılarak numunede kimyasal reaksiyondan kaynaklı oluşabilecek herhangi bir kontaminasyonu önlemek oldukça önemlidir.

Bu sebeple uzun süreli diyaliz ile ortamda toksik etki yaratacak kimyasal veya reaksiyon ürünleri uzaklaştırılacaktır. Grafit oksit, çoğu grafit oksidin tek katmanlı grafen okside pul pul dökülmesini sağlamak için yaklaşık 2 saat sonikasyon altında bekletilecektir. Elde edilen homojen sarı tek katmanlı grafen oksit çözeltisi, oksijenli grupları çıkarmak için hidrazin kullanılarak indirgenme reaksiyonu gerçekleştirilecektir. Siyah çökeltiler yıkanılacak ve genellikle suda çözünmeyen grafen olarak kurutulacaktır.

SDBS (Sodium dodecylbenzenesulfonate -  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{Na}$ ) dağılmış grafen (SDBS-grafen) sulu çözeltisini hazırlamak için, grafene SDBS eklenilecek ve yaklaşık 2 saat sonikasyona maruz bırakılacaktır. 1 mg/mL'ye kadar stabil SDBS-grafen sulu çözeltisi bu şekilde edilebilecektir. SDBS-grafen (ağırlık) oranı oldukça önemlidir bu sebeple bu oranı 1 ila 15 aralığında optimize edilecek ve çalışmalar gerçekleştirilecektir. SDBS'nin mükemmel biyoyumluluğu, sulu bir ortamda biyoalgılama uygulamalarında SDBS-grafen için çeşitli olanaklar sağlayacaktır.

Bu prosedürün işlememesi durumunda alternatif bir yöntem olarak, literatürde bulunan çalışmalardan yola çıkarak, PDDA (Polidialildimetilamonyum Klorür) varlığında GO'nun bir pul gibi P-GR nano-tabakaları, pul dökülmesi/yerinde azaltılması yöntemi gözlemlenmiştir. Çalışmamızda pul dökülmesi/yerinde azaltılması yoluyla hazırlanacaktır. Bu yöntemde ilk olarak, %0.5 GO çözeltisine (100 mL) %20 PDDA (0,5 mL) çözeltisi ilave edilecektir ve 30 dakika karıştırılması sağlanacaktır. Karışma işleminin sonrasında, %80 hidrazin hidrat (0.5 mL) ilave edilecektir ve 24 saat (Overnight) süre ile  $90^\circ\text{C}$ 'de karıştırmaya devam edilecektir. Reaksiyon sonunda son işlem olarak, siyah P-GR nano tabakaları süzülerek ve damıtılmış su ile yıkanarak elde edilebilecektir ve daha sonra hafif sonikasyondan sonra su içinde kolayca yeniden dağıtılarak siyah bir süspansiyon ( $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) elde edilecektir.





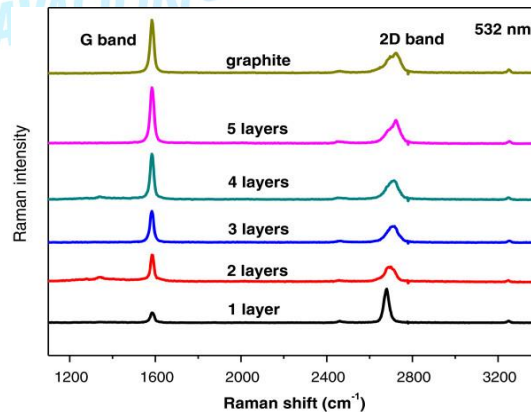
Şekil 4. Elde edilmesi hedeflenen grafen sheetlerin gösterimi

#### 4.4. GR/AuNPs kompozitlerinin hazırlanması

P-GR/AuNPs kompozitleri, kloroaurik asidin sodyum sitrat ile kendiliğinden kimyasal indirgenmesi yoluyla P-GR nano tabakalarının yüzeyinin AuNP'ler ile etkileştirilmesi sağlanacaktır. İlk olarak 85 mL süspansiyona ( $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) 5 mL 30 mM kloroaurik asit solüsyonu karıştırılarak eklenilecektir. Daha sonra, karışım suyun kaynama noktasına kadar ısıtıldığında, iyice karıştırılmış karışıma 10 mL 20 g/L sodyum sitrat ilave edilecektir. Elektrostatik etkileşime 10 dakika boyunca maruz bırakılan numuneler, sitrat etkileşimli AuNP'lerin, GR nano tabakalarının yüzeyine hızlı bir şekilde yapışması beklenmektedir. Kalan siyah çökelti, santrifüjleme ile toplanacak ve daha sonra 6 kez etanol solüsyonu ile durulanmalıdır. Son olarak, elde edilen yapılar karakterizasyon prosesi için oda sıcaklığında kurutulacaktır.

#### 4.5. Elde edilen grafen yapılarının karakterasyonu

Grafeni yüzeyi karakterize etmek veya yüzeyindeki fonksiyonel grupların ve morfolojik değişikliklerin varlığını belirlemek için Raman Spektroskopisi, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), x-ışını Kırınım (XRD), x-ışını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) kullanılabilir. Yüksek lisans çalışmamdan örnek verecek olursam; Raman spektroskopisinde grafen yapısının sahip olduğu kendine özgü tepe noktaları (G,2D) bulunmaktadır. Buradan grafen yüzeyi hakkında ve grafenin tabaka sayısı hakkında veya fonksiyonel gruplar hakkında bilgi sahibi olmamız mümkündür.



Şekil 5. Karbon temelli malzemelerin Raman Spektroskopisi sonuçlarının gösterimi

#### 4.6. Altın nanoçubukların sentezi

Proje olarak sunulan çalışmada altın partikül sentezi için bulunan kimyasal, termal, elektrokimyasal ve sonokimyasal yöntemler üzerine düşünülerek, dezavantajları ve avantajları tartışılarak altın naopartiküllerin üretimi için, seed aracılı büyüme yöntemi tercih edilmiştir. Altın nanoçubuk yapılarının boyutları çalışmamız için oldukça önemli olduğundan, altın nanorodları 1.5 ila 5 en boy oranlarıyla sentezlemek için farklı modifikasyonlar uygulanmıştır: (1) seed oluşum aşamasında gümüş sitratın CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide) molekülleri ile değiştirilmesi;

(2) kontrollü en ve boy oranlarıyla nanorodları büyütmek için büyüme çözeltisinin gümüş içeriğinin ayarlanması.

Aptamer based bir biyosensör sistemi tasarlanacağından ve hedef molekülle neo-antijenler olması nedeniyle kullanılacak altın nanoçubukların boyutlarının ayarlanabilmesi bizim alacağımız sonuçların değerlendirilmesinde oldukça önemli bir parametredir.

Gümüş sitrat kullanımı ve içeriği bilindiği üzere canlı organizmalar için toksik bir etki yaratmaktadır. Bu yüzden ortamdaki gümüş sitratın uzaklaştırılması gerekmektedir. Ayrıca bu şekilde altın nanoçubuk üretimi ile birçok dezavantaj tolere edilebilmektedir. Büyüme süresini arttırarak veya büyüme çözeltisine nanorod çözeltisi aşamalı olarak eklenmesiyle uzun nanorodların üretimi sağlanabilmektedir. Bu yöntem ile parametreler değiştirilerek arzu edilen boyutta altın nanopartikül üretimi mümkündür. Altın nanorodların üretimi gerçekleştirildikten sonra santrifüj işlemi yapılması gerekmektedir ve santrifüj süresi üretilen nanorodun boyutuna göre karar verilmelidir. Böylelikle bir surfaktan olan CTAB'ın ortamdaki uzaklaştırılması gerçekleştirilecektir.

#### 4.7. Altın nanopartikül karakterizasyonu

Altın nanoçubuk yapılarının karakterizasyonu için LSPR (Localized Surface Plasmon Rezonans) analizi nanoçubuk yapısının boyutunun tespitinde kullanılacak bir karakterizasyon yöntemi olabilir ancak sadece LSPR altın nanoçubuklarının tespitinde yeterli olmayacaktır. LSPR analizi, gelen ışığın elektromanyetiği ile uyarılan metalnanoparçacıklarda iletim bandı elektronlarının kolektif bir salınımıdır. Altın nanoçubuğun oluşturulduğu solüsyonu lamel üzerine koyarak LSPR da verdiği tepe noktasına bağlı olarak altın nanoçubuğun boyutu hakkında bilgi verdiği için değerlendirilebilmesine olanak sunmaktadır. Ayrıca altın nanoçubukların boyutunu anlayabilmek sebebiyle hem analitik hemde görsel sonuçlar sunan TEM (Transmission electron microscopy) ve SEM (Scanning electron microscopy) yöntemlerinin kullanılması gerekmektedir [14].

#### 4.8. Sentezlenen aptamerlerin biyosensör yüzeyine entegrasyonu ve biyosensör sisteminin hazırlanması

Grafenin modifikasyonu genellikle uygun işlevselleştirme yolları kullanılarak oksijenasyon, hidrojenasyon ve florlama içermektedir. Grafen yapının yüzey işlevselleştirilmesi, öncelikle kovalent veya kovalent olmayan yaklaşım kullanılarak gerçekleştirilebilir. Kovalent yaklaşımda, grafen yapının yüzeyinde bulunan oksijen içeren gruplar (-O, -OH ve -OOH),

eklenecek diğer polimerler, moleküller, biyolojik varlıklar ve nanopartiküller ile kovalent bağlar oluştururken, kovalent olmayan işlevselleştirme de genellikle, yüzeyin yüksek elektronegatifliği nedeniyle meydana gelen hidrojen bağlarını veya elektrostatik etkileşimleri içermektedir. Ve ayrıca karbon bazlı grafen yapısına hidrofilik özellik kazandırmaktadır. Grafen based yapıların, proteinler veya DNA ile kovalent olmayan işlevselleştirilmesi de biyotanıma için oldukça önemlidir. Grafen,  $sp^2$ 'ye bağlı C atomlarından oluştuğu için kimyasal olarak doymamıştır ve diğer türlere kovalent olarak bağlanabilir ve  $sp^3$  hibridizasyonuna dönüşebilmektedir. Bu durum bize fonksiyonelleştirilebilmesi için bir alternatif sunmaktadır. Çalışmada Non-kovalent fonksiyonelleştirme tercih edilecektir. Kovalent fonksiyonelleştirme işleminin tercih edilmemesi şu şekilde açıklanabilir;

- Eylemsiz grafitik yapılar, grafenin oksidasyonu ile değiştirilebilir, bu da karboksil ve karbonil fonksiyonel gruplarının yoğunluğunda bir artışa neden olur, ancak bu yöntem grafenin özelliklerini büyük ölçüde değiştirir. Bu gruplar daha sonra amin fonksiyonel grupları aracılığıyla çeşitli biyomoleküllerle işlevselleştirilme imkanı sunmaktadır.
- Bununla birlikte, oksidasyon öncesi bir adım olan serbest radikal ekleme reaksiyonunun yokluğunda, elektronik özellikler grafit yüzeyin kovalent modifikasyonundan çok fazla etkilenmez.

Kovalent olmayan yaklaşım, grafeni uygun fonksiyonel gruplarla değiştirir, ancak orijinal özelliklerini etkilemez. Aptamerlerin pirimidik ve purik bazlarının uygun  $\pi$ - $\pi$  istifleme etkileşimleri yoluyla C-C altıgen grafen ağı üzerindeki fiziksel adsorpsiyonu, grafen bazlı aptasensörler oluşturmanın en umut verici ve daha basit yoludur. Kovalent olmayan yöntemle fonksiyonelleştirilmiş yüzey, zayıf van der Waals veya aromatik moleküller arasındaki  $\pi$ - $\pi$  etkileşimleri içermektedir. Bu nedenle, grafenin kovalent olmayan işlevselleştirilmesi,  $\pi$ -konjuge yapısını bozmamaktadır ve sonuç olarak mükemmel fiziksel özelliklerinin korunmasına yardımcı olmaktadır. Fiziksel adsorpsiyon ile aptamerleri bağlamak için modifiye edilmiş bir grafen elektrotun kullanımı da mümkündür. Diğer bir yaklaşım olarak, grafenin kovalent olmayan işlevselleştirilmesi için  $\pi$ - $\pi$  istifleme etkileşimi yoluyla grafen üzerinde güçlü bir şekilde adsorbe olan poliaromatik hidrokarbonlar kullanılabilir. Örneğin, piren bütirik asidin kullanılması, dört aromatik halkanın  $\pi$ - $\pi$  istiflenmesiyle sağlam ve kararlı bir işlevselleştirme ile sonuçlanırken, biyomoleküllerin amin fonksiyonel grupları aracılığıyla ek kovalent işlevselleştirilmesi, terminal asit gruplarında gerçekleştirilebilmesine izin vermektedir. Bu protokol, temel grafitik özellikleri değiştirmeden kovalent modifikasyonun avantajlarını sunmaktadır. Ayrıca, elektrostatik adsorpsiyon genellikle aptamerlerin dönüştürücüler üzerine montajı için kullanılması da mümkündür. Dahası, Graphene based malzemelere dayalı aptamer biyosensing sisteminin hazırlanması için fosforamidat ve amid reaksiyonları da kullanılmaktadır.

Grafen bazlı malzemelerin (G, GO ve rGO) algılama kapasitesi, işlevselleştirme yoluyla da kolayca kontrol edilebilir. Çeşitli fonksiyonel gruplar ve atomlar ile grafenin kimyasal katkılanması genellikle optik, elektrokimyasal ve elektriksel özelliklerinde bir değişiklikle sonuçlanmaktadır. Danışmanı olarak bulunduğum bu projede, yüksek lisans sürecimde biyosensör oluşturmak adına çalıştığım projede grafen yüzeyin non-kovalent olarak fonksiyonelleştirilmesi ve yüzey ile biyolojik materyallerle yüzeylerin etkileştirilmesi üzerine çeşitli çalışmalar gerçekleştirdiğim için yüzey fonksiyonelleştirmede optimizasyon olarak elimizde belirli datalar bulunmaktadır.



#### 4.8.1. Grafen yüzeyin fonksiyonelleştirilmesi

Bu çalışmada elde edilen grafen yüzeyler PBA piren bütirik asid ile etkileştirilecektir çünkü grafen yüzeylere herhangi bir molekül ile etkileşim sağlayabilmesi için yüzeyin bir kimyasal bağlayıcı ile etkileştirilerek modifikasyonunun yapılması gerekmektedir. Grafen yüzeylerin fonksiyonelleştirilmesi için 4-(1-Pyrenyl)-Butirik asit (PBA), farklı solventler (metanol, etanol, dimetilformaldehit (DMF), çözülecektir. Ardından 24 saat inkübasyona bırakılacaktır. İnkübasyon süresinin ardından yüzeyler birkaç kez ilgili solvent sistemi ile yıkandı. PBA'nın grafen yüzeyine bağlanması hem Raman spektroskopisi hem de X-ışını Fotoelektron spektroskopisi (XPS) ile analiz edildi. Çünkü; PBA raman spektroskopisinde  $1041\text{ cm}^{-1}$  'de bağlandığı yapıda özel bir boyun yapısı oluşturmaktadır. Buradan da PBA'nın yüzeye bağlanması hakkında yorum yapılabilecektir. Oluşturulacak sistemin EDC-NHS biyokonjugasyonu ile etkileşim sağlanarak biyomolekülün bağlanabilmesi için karboksil veya amin uçları oluşturulabilmektedir. Oluşturulan uçlarla kısa fragmentler olan aptamerler yüzeye etkileştirilebilir.

#### 4.9. Biyosensör sisteminin test edilmesi

Biyosensör sisteminin test edilmesi için tümör hücresi oluşmaya başlamış bir canlıdan alınan kana ihtiyaç vardır. Kanser çalışmalarında tümör oluşturmak için nude fareler kullanılmaktadır [15]. Nude farelere ticari olarak satılan kanser hücreleri deri altından enjekte edilir. Yapılmak istenilen çalışmaya göre enjekte edilecek tümör hücresi sayısı değişmektedir. Örneğin 3 milyon kanser hücresi enjekte edilen farede tümör oluşumu daha geç gözlemlenirken 10 milyon hücre enjekte edilen farelerde tümör daha erken belirginleşmektedir. Ancak fazla tümör hücresi verilen farelerde ölüm ihtimali yüksektir. Bu sebepten dolayı optimizasyon işleminden sonra enjekte edilecek hücre sayısı belirlenecektir. Bunun yanı sıra kanser hastası bireylerden kan örnekleri toplanabilir. Her iki durum için de etik kurul onay belgesi alınması gerekmektedir.

#### 5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

Kanser teşhisinin hastayı yoran bir süreç olduğu bilinmektedir. Bu sürecin kısaltılması hastanın fiziksel ve mental sağlığına olumlu yönde etkisi olacaktır. Önerilen bu projede kişide kanser oluşumunun olup olmadığı konusunda dakikalar içerisinde bir geri dönüt alınabilecek sistem geliştirilecektir. Neoantijenler üzerinde birçok araştırma yapılmaktadır ve kanser aşuları çalışmalarlarıyla oldukça popüler hale gelmiştir. Yapılan kanser aşuları çalışmalarında kişide bulunan neoantijenleri tespit edip kişiye özel aşı hazırlanması hedeflenmektedir [18,19,20]. Bu < sistem geliştirilip neoantijenlerin türünün de tespit edilmesi halinde aşı çalışmaları için de oldukça yararlı olacağını düşünmekteyiz. Yapılan literatür taramasında genellikle immünoterapi için neoantijenlerin kullanıldığı görülmüştür. Kanser teşhisi için neoantijenleri tanıyacak bir aptamer temelli bir biyosensör sisteminin olduğu tespit edilmemiştir.

#### 6. Uygulanabilirlik

Günümüz şartlarında hava kirliliği, radyasyona maruz kalma, stres herkesin ortak problemi haline gelmiştir. Bu sebepten dolayı herkes kanser şüphesi taşımaktadır. Kanser bu denli büyük



bir sorunken kullanım kolaylığı ve hızlı tanı kitlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca hekimlerin de gözden kaçırma riskini azaltmak hedeflenmektedir. Sunulan bu projede üretilecek olan biyosensörün herhangi bir in vivo kullanımı olmamasından dolayı insanlar üzerinde herhangi bir toksik etkisi bulunmayacaktır. Sadece kanser şüphesi taşıyan insanlardan kan alınacak ve sisteme aktarılacaktır. Yakın akrabalar arasında ve ailesinde kanser öyküsü taşıyan, yoğun stres altında çalışan ve çalışma ortamında toz, radyasyon vb. dış etmenler bulunan insanlar yüksek risk gruplarıdır. Ayrıca daha öncesinde kanser geçmişine sahip kişiler de tekrar nüksetme tehlikesiyle karşı karşıyadır. Bu projenin asıl amacı bu durumlara sahip kişilerin kanser taramasını en kolay ve en hızlı şekilde yapılmasını sağlamaktır. Kısacası kanser şüphesi taşıyan herkesin kullanımına uygundur.

Yeteri destek alınması durumunda optimizasyon işlemleri tamamlanarak piyasa sürülebilecek bir ürün haline getirilmesi hedeflenmektedir.

## 7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

Proje zaman planlanması Tablo1’de gösterilmiştir.

**Tablo1.**İş-Zaman planlama tablosu

İş Tanımı	Kimler Tarafından Yapılacağı	AYLAR												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Proje yönetimi	Gözde YEŞİLTAS	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Problemlerin belirlenmesi	Gözde YEŞİLTAS Hatice ÖZTEKİN	X	X											
Hipotez oluşturulması	Gözde YEŞİLTAS Hatice ÖZTEKİN		X	X										
Genel literatür taraması	Gözde YEŞİLTAS Hatice ÖZTEKİN		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Biyosensör oluşturmak için literatür taraması	Gözde YEŞİLTAS Hatice ÖZTEKİN								X	X	X	X	X	
Rapor yazım aşaması	Gözde YEŞİLTAS Hatice ÖZTEKİN											X	X	X

İstinye Üniversitesi Rektör Yar. Prof. Dr. Engin Ulukaya ve ekibinden aptamer dizaynı konusunda fikir desteği alınmıştır.

## 8. Proje Fikrinin Hedef Kitlesi (Kullanıcılar)

Projede sunulan fikir kanserin erken teşhis edebilecek bir sistemi anlatmaktadır. Böyle bir ürünün hedef kitlesi olarak kanser şüphesi taşıyan bireyler söylenebilir. Hayat öyküsünde kansere yakalanmış ve daha sonrasında atlatmış kişilerde sıklıkla hastalığın tekrar nüksettiği görülmektedir. Yıl bazında belli aralıklarla, üretilecek olan biyosensör yardımıyla kolay bir şekilde test edilme şansı doğacaktır. Kişiden alınan kan yoluyla hızlı ve pratik bir şekilde test

yapılabilecektir. Bu durumda kişinin günlük yaşamını etkileyecek ya da uzun süren testlere maruz kalmayacaktır. Kanser teşhisi için nükleer taramalar ve MR görüntüleme gibi teknikler kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemler radyasyon yaymasından dolayı hamileler ya da hamilelik şüphesi taşıyan kadınlar üzerinde kullanılamamaktadır. Üretilecek olan biyosensör radyasyon ya da herhangi başka bir tehlike arz etmediği için herkes tarafından kullanımına uygun olacaktır. Ayrıca kanserin genetik bir hastalık olduğu bilinmektedir. Yakın akrabalar arasında kanser geçmişi olan bireylerin de kontrollerini yaptırması gerekmektedir. Kanser bir diğer yaygın sebebi ise strestir. Stresli bir işe sahip olan ya da günlük yaşamında yoğun stres yaşayan bireylerin de kanser kontrolünü yaptırması gerekmektedir. Bu tip öykülere sahip bireylerin gönül rahatlığıyla kullanabileceği, herhangi bir risk taşımayan, hızlı ve pratik bir teşhis önerisi sunmaktayız.

## 9. Riskler

Projemizde oluşabilecek riskler ve B planı Tablo2’ de gösterilmiştir. Projenin risk matrisi Tablo3’te gösterilmiştir.

**Tablo2.** Projede oluşabilecek riskler ve belirlenen B planları

Riskler	B Planı
<p>Neoantijenlerin fazlaca mutasyona uğraması ve birçoğunun kişiye özel olması</p> <p>Olasılık: <b>yüksek (4)</b></p> <p>Etki: <b>yüksek (4)</b></p> <p>Risk: <b>yüksek (16)</b></p>	<p>Böyle bir duruma B planı olarak, kullanılacak olan hedef molekül sayılarının artırılması, hastalarda çok sıklıkla karşılaşılan neoantijenlerin tespit edilerek bunların kullanılması ayrıca kanser proteinlerini en yüksek frekansta karşılaşılanların tespit ederek bunların hedef molekül olarak belirlenmesi.</p>
<p>Mevcut şartlarda SELEX yönteminin yapılamaması dolayısıyla da aptamerlerin dizaynının sağlanamaması</p> <p>Olasılık: <b>düşük (2)</b></p> <p>Etki: <b>orta (3)</b></p> <p>Risk: <b>düşük (skor:6)</b></p>	<p>Ülkemizde de aptamer dizaynı yapabilen çalışma grupları mevcuttur. Bu gruplarla iletişim halinde olarak oralardan satın alınabilir.</p> <p>Ayrıca AMSBIO [21] gibi yurt dışında bulunan şirketlerden satın alınabilir.</p>
<p>Floresan ışık yayarak sinyal oluşturacak şekilde tasarlanan biyosensör sistemi, optimizasyon işlemleri sonucunda efektif olmaması</p> <p>Olasılık: <b>düşük (2)</b></p>	<p>Böyle bir durumda biyosensör dizaynı için farklı bir yöntem düşünülmektedir. Bu yöntemde biyosensör sisteminde manyetik alan oluşturmak için alt kısmına mıktanılar yerleştirilecek ve floresan etki gösterecek olan moleküller yerine demir ya da ferittin</p>

Etki: orta (3)	gibi manyetik nanopartiküller kullanılacaktır. Kullanılan bu nanopartiküller manyetik alan sayesinde yüzeyde durabilecektir. Biyosensör sinyalleri ise elektriksel sinyallere dönüştürülerek analiz edilmesi sağlanacaktır.
Risk: düşük (skor:6)	

Tablo3. Risk skor tablosu

RİSK SKORU	ŞİDDET				
	İHTİMAL	1 (çok hafif)	2 (hafif)	3 (orta derece)	4 (ciddi)
1 (Çok Küçük)	Anlamsız 1	Düşük 2	Düşük 3	Düşük 4	Düşük 5
2 (Küçük)	Düşük 2	Düşük 4	Düşük 6	Orta 8	Orta 10
3 (Orta Derece)	Düşük 3	Düşük 6	Orta 9	Orta 12	Yüksek 15
4 (Yüksek)	Düşük 4	Orta 8	Orta 12	Yüksek 16	Yüksek 20
5 (Çok Yüksek)	Düşük 5	Orta 10	Yüksek 15	Yüksek 20	Tolere Edilemez 25

Tablo 2’de riskler ve B planları gösterilmiştir ve risk skor tablosuna göre değerlendirilmiştir. İlk risk olarak Projede bulunan en önemli risk bazı neoantijenlerin kişiye özgü olması ve mustasyonlara maruz kalmasıdır. Projede kullanılacak olan aptamer sekansları shared public neoantijenlere göre dizayn edilecektir. Biyosensörün kanseri doğru teşhis edebilmesi ve yanlış negatif sonuç vermemesi için mümkün olduğunca fazla sayıda neoantijen kullanılması gerekmektedir. Projede kullanılacak olan neoantijen sekansları birçok kişide ortak olarak ortaya çıkan ve public olarak nitelendirilen sekanslar kullanılacaktır. Bu duruma B planı olarak ülke içerisinde en fazla görülen mutasyonlar ve sekanslamalar tespit edilmesi gerekmektedir.

Mevcut şartlarda SELEX yönteminin uygulanamaması durumunda AMSBIO [21] gibi yurt dışında bulunan şirketlerden satın alınabilir.

Floresan ışık yayarak sinyal oluşturacak şekilde tasarlanan biyosensör sistemi, optimizasyon işlemleri sonucunda efektif olmaması durumunda biyosensör dizaynı için farklı bir yöntem düşünülmektedir. Bu yöntemde biyosensör sisteminde manyetik alan oluşturmak için alt kısmına miktanslar yerleştirilecek ve floresan etki gösterecek olan moleküller yerine demir ya da feritin gibi manyetik nanopartiküller kullanılacaktır. Kullanılan bu nanopartiküller manyetik alan sayesinde yüzeyde durabilecektir. Biyosensör sinyalleri ise elektriksel sinyallere dönüştürülerek analiz edilmesi sağlanacaktır.

## 10. Proje Ekibi

**Tablo4:** Proje ekibini ve takımdaki yerlerini gösterir tablo

Ad-Soyad	Bölüm	Durumu	Takımdaki Yeri
Ar. Gör. Gözde YEŞİLTAŞ	Biyomühendislik	Araştırma Görevlisi	Danışman
Hatice ÖZTEKİN	Biyomühendislik	Lisans 2.sınıf Öğrencisi	Takım Kaptanı

## 11. Kaynaklar

- [1] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [2] <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf> son erişim tarihi 05.05.2022
- [3] Liu, Y., & Wang, M. (2011). *Zhongguo fei ai za zhi = Chinese journal of lung cancer*, 14(5), 429–434. <https://doi.org/10.3779/j.issn.1009-3419.2011.05.097>
- [4] Bayraç, A., T. & Kandemir, B., B., (2018), Domuz Jelatinine Özgü DNA Aptamerlerinin Seçilimi ve Karakterizasyonu, Süleyman Demirel Üniveritesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 22(2), pp:774-778, DOI: 10.19113/sdufbed.88900
- [5] Forouzanfar, S., Alam, F., Pala, N., & Wang, C. (2020). A review of electrochemical aptasensors for label-free cancer diagnosis. *Journal of The Electrochemical Society*, 167(6), 067511.
- [6] Forouzanfar, S., Alam, F., Pala, N., & Wang, C. (2020). Highly sensitive label-free electrochemical aptasensors based on photoresist derived carbon for cancer biomarker detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 170, 112598.
- [7] Chatterjee, S. K., & Zetter, B. R. (2005). Cancer biomarkers: knowing the present and predicting the future.
- [8] Liu, Y., & Wang, M. (2011). *Zhongguo fei ai za zhi = Chinese journal of lung cancer*, 14(5), 429–434. <https://doi.org/10.3779/j.issn.1009-3419.2011.05.09>
- [9] GÜLSAR, M. G., ÖZDEMİR, H. N., ÇEVİKER, K., BAĞCI, Ö., TATAR, B., YAZKAN, R., & ERDEMOĞLU, E. (2016). TÜMOROGENEZDE P53 GENİ VE GENETİK TEDAVİ YAKLAŞIMLARI. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*, 4(2), 133-135.
- [10] Kandoth, C., McLellan, M. D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J. F., Wyczalkowski, M. A., Leiserson, M., Miller, C. A., Welch, J. S., Walter, M. J., Wendl, M. C., Ley, T. J., Wilson, R. K., Raphael, B. J., & Ding, L. (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, 502(7471), 333–339. <https://doi.org/10.1038/nature12634>
- [11] Şirin, H., & Uzun, M. E. (2021). Madde Kullanım Bozukluğu Tanısıyla ÇEMATEM’de Tedavi Gören Ergen Hastaların Sosyodemografik ve Klinik Özellikleri: Bursa Örnekleme. *Türk J Child Adolesc Ment Health*, 28(2), 151-158.



- [12] Li, L., Goedegebuure, S. P., & Gillanders, W. E. (2017). Preclinical and clinical development of neoantigen vaccines. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 28(suppl\_12), xii11–xii17. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx681>
- [13] Fellows, T., , Ho, L., , Flanagan, S., , Fogel, R., , Ojo, D., , & Limson, J., (2020). Gold nanoparticle-streptavidin conjugates for rapid and efficient screening of aptamer function in lateral flow sensors using novel CD4-binding aptamers identified through Crossover-SELEX. *The Analyst*, 145(15), 5180–5193. <https://doi.org/10.1039/d0an00634c> <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf>
- [14] Bayat, P., Nosrati, R., Alibolandi, M., Rafatpanah, H., Abnous, K., Khedri, M., & Ramezani, M. (2018). SELEX methods on the road to protein targeting with nucleic acid aptamers. *Biochimie*, 154, 132–155. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.09.001> [5] Bayraç, A. T. & Kandemir, B., B., (2018), Domuz Jelatinine Özgü DNA Aptamerlerinin Seçilimi ve Karakterizasyonu, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 22(2), pp:774-778, DOI: 10.19113/sdufbed.88900
- [14] Bayraç, A. T., & Kandemir, B. B. (2018). Domuz Jelatinine Özgü DNA Aptamerlerinin Seçilimi ve Karakterizasyonu. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 22(2), 774-778.
- [15] Kinghorn, A. B., Fraser, L. A., Lang, S., Shiu, S., & Tanner, J. A. (2017). Aptamer Bioinformatics. *International journal of molecular sciences*, 18(12), 2516. <https://doi.org/10.3390/ijms18122516>
- [16] ZEYBEK, Ü. KANSER ARAŞTIRMALARI VE DENEYSEL MODELLER. *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 3(5).
- [17] Forouzanfar, S., Pala, N., & Wang, C. (2022). In-Situ Integration of 3D C-MEMS Microelectrodes with Bipolar Exfoliated Graphene for Label-Free Electrochemical Cancer Biomarkers Aptasensor. *Micromachines*, 13(1), 104. <https://doi.org/10.3390/mi13010104>
- [18] Pavelić K. (2021). PERSONALIZED NEOANTIGEN VACCINE AGAINST CANCER. *Psychiatria Danubina*, 33(Suppl 3), S331–S335.
- [19] Cafri, G., Gartner, J. J., Zaks, T., Hopson, K., Levin, N., Paria, B. C., Parkhurst, M. R., Yossef, R., Lowery, F. J., Jafferji, M. S., Prickett, T. D., Goff, S. L., McGowan, C. T., Seitter, S., Shindorf, M. L., Parikh, A., Chatani, P. D., Robbins, P. F., & Rosenberg, S. A. (2020). mRNA vaccine-induced neoantigen-specific T cell immunity in patients with gastrointestinal cancer. *The Journal of clinical investigation*, 130(11), 5976–5988. <https://doi.org/10.1172/JCI134915>
- [20] Salomon, N., Vascotto, F., Selmi, A., Vormehr, M., Quinkhardt, J., Bukur, T., Schrörs, B., Löewer, M., Diken, M., Türeci, Ö., Sahin, U., & Kreiter, S. (2020). A liposomal RNA vaccine inducing neoantigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells augments the antitumor activity of local radiotherapy in mice. *Oncoimmunology*, 9(1), 1771925. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1771925>
- [21] <https://www.amsbio.com/aptamer-design-and-synthesis/> son erişim tarihi 08.05.2022