

Epigenetik Biyosensörler ve Kanser

Epigenetic Biosensors and Cancer

 Semra DEMOKAN^a

^aİstanbul Üniversitesi
Onkoloji Enstitüsü,
Temel Onkoloji ABD,
İstanbul, Türkiye

Yazışma Adresi/Correspondence:

Semra DEMOKAN
İstanbul Üniversitesi
Onkoloji Enstitüsü,
Temel Onkoloji ABD,
İstanbul, Türkiye
demokan@istanbul.edu.tr

ÖZET Kanser, hem genetik hem de epigenetik değişikliklerin gözlemlendiği kalıtsal etmenlere bağlı olduğu kadar çevresel faktörlerle de ilişkili multifaktöriyel bir hastalıktır. DNA dizisi üzerinde meydana gelen genetik değişimlerden farklı olarak epigenetik değişiklikler, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde gözlenen kalıtsal ve geri dönüşümlü değişimler olarak tanımlanmaktadır. DNA metilasyonu başta olmak üzere histon protein modifikasyonları, kromatin yeniden düzenlenmesi ve miRNA regülasyonu epigenetik mekanizmaları oluşturmaktadır. Karsinogenez sürecinde rol oynayan epigenetik mekanizmaları aydınlatmaya yönelik yapılan çalışmalar hastalığın erken tanı ve tedavisinde oldukça önemli bir yere sahiptir. Kanserde epigenetik-tabanlı biyobelirteçlerin araştırılmasına yönelik geliştirilen mikroarray, real-time PCR, pyrosequencing, ELISA, ChIP qPCR, nCounter nanostring analizi, yeni nesil dizileme gibi biyosensör tabanlı teknolojiler giderek önem kazanmaktadır. Bu bölümde, biyosensörler ve alt tipleri tanımlanıp çalışma prensiplerinden bahsedilerek kanserde epigenetik mekanizmaların rolünün araştırılmasında kullanılan biyosensör tabanlı teknikler hakkında genel bilgi verilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Biyosensör; kanser; biyomarker; epigenetik

ABSTRACT Cancer is a multifactorial disease associated with both genetic and epigenetic changes, as well as hereditary and environmental factors. Unlike genetic changes that occur on the DNA sequence, epigenetic changes are defined as hereditary and reversible changes observed in the regulation of gene expression.² Histone protein modifications, DNA methylation, chromatin remodelling and miRNA regulation constitute epigenetic mechanisms. Studies to elucidate the epigenetic mechanisms involved in the carcinogenesis process have a very important place in the early diagnosis and treatment of this disease. Biosensor-based technologies such as microarray, real-time PCR, pyrosequencing, ELISA, ChIP qPCR, nCounter nanostring analysis, next-generation sequencing, which were developed to investigate epigenetic mechanisms are increasingly gaining importance. In this section, biosensors and their subtypes are defined and their working principles are mentioned, and general information about biosensor-based techniques used in investigating the role of epigenetic mechanisms in cancer is given.

Keywords: Biosensor; cancer; biomarker; epigenetics

DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, kromozomun yeniden düzenlenmesi ve RNA interferans aracılığı ile gen ekspresyonunu kontrol eden epigenetik mekanizmaların etkileri karsinogenezin erken aşamalarından itibaren gözlenir.¹⁻³ Bu nedenle epigenetik temelli biyobelirteçlerin keşfedilmesi kanserin erken tanısında oldukça önemli bir yere sahiptir.⁴ Epigenetik biyobelirteçlerin araştırılmasında yararlanılan biyosensörlerin tanımlanması, anlaşılması ve geliştirilmesi kanser epigenetiği alanındaki araştırmaların geleceği açısından vazgeçilmez niteliktedir.

BİYOSENSÖRLER

Biyosensörler, maddelerin konsantrasyonunu ve biyolojik olarak incelenen parametreleri belirlemek için biyolojik sinyali elektrik sinyaline dönüştürerek maddenin tanınmasını ve ölçülebilir olmasını sağlayan analitik cihazlardır.⁵⁻⁸

KAYNAK GÖSTERMEK İÇİN:

Demokan S. Epigenetik biyosensörler ve kanser. Koçdor H, Pabuççuoğlu A, Zihnioğlu F, Sağın F, editörler. Sağlık Bioteknolojisi. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2022. p.103-12.

BİYOSENSÖR ALT TIPLERİ

Biyosensörler, dönüştürücü “trandüser” tiplerine göre optik (emilim, yüzey plazmon rezonans, kemiluminesans, bioluminesans, floresan ve optik fiber), elektrokimyasal (voltametri, amperometrik, potansiyometrik, iletken, kapasitif ve impedans), kütle tabanlı ve elektrik tabanlı (piezoelektrik, kuartz kristal mikrobalsan, akustik, kalorimetrik ve manyetik) olarak sınıflandırılmaktadır.^{9,10} Ayrıca, biyosensörler, antikor/antijen, nükleik asit, enzimatik, hücre (mikroorganizma, protein gibi) ve biyomimetik malzemelerle etkileşime dayanarak biyoreseptör tipine göre de sınıflandırılmaktadır.¹¹

Biyosensörler tespit yöntemleri ilkelerine göre ayırma ve analitik teknikler dahil yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve kapiler elektroforezi, biyolojik tanıma analizi, metilasyona özgü amplifikasyon, yeni nesil dizileme, metilasyon gen çipi ve haritası ve biyosensör bazlı tayin yöntemleri olmak üzere altı farklı alt gruba ayrılmaktadır. Günümüzde PCR, mikroarrayler ve DNA dizilimi, metilasyon biyobelirteçlerini belirlemek ve keşfetmek için kullanılan başlıca biyosensör tabanlı cihazlardır.¹²

Kanserin tanı ve prognozunda kullanılan analitlerin (biyobelirteçler) tanınması ve tespitinde biyosensörlerin etkili cihazlardan biri olduğu bilinmektedir. Biyosensörlerin uygulamalı tekniklerle, DNA değişikliklerinin kolay ve hızlı bir şekilde algılanması sağlanır.¹³

Son zamanlarda biyosensörlerin nanobiyoteknoloji açısından geliştirilmesine yönelik yapılan çalışmalar, başta sitozin modifikasyonlarının belirlenmesi olmak üzere doku ve vücut sıvılarında (tükürük, plazma, serum, idrar, semen) epigenetik değişikliklerin tanınması için oldukça önemli olduğunu göstermiştir.¹⁴

EPİGENETİK-BİYOSENSÖR İLİŞKİSİ

DNA METİLYASYONU

Tümör baskılayıcı genlerin promoter bölgelerinde yer alan CpG adacıklarındaki sitozin nükleotidlerinin 5' karbon atomuna DNA metiltransferazlar yardımı ile metil grubunun bağlanmasıyla gerçekleşen geri dönüşümlü kimyasal bir olaydır.¹⁵ Tümör hücrelerinde hem tümör baskılayıcı genlerin promoter bölgesinde gözlenen hipermetilasyon ile işlevsiz hale getirilmeleri hem de onkogenlerin tüm genomunda hipometilasyon ile aktiflenmesi gözlenmektedir. Genellikle metastatik dokularda ve primer tümörlerde tespit edilen hipometilasyon, onkogenlerin ekspresyonunu artırır, transkripsiyonu aktive eder ve genom stabilitesini değiştirir.¹⁶ CpG bakımından zengin genomik bölgelerin hi-

permetilasyonu, DNA metiltransferazlarının değiştirilmiş aktivitesi ile oluşur ve 5-metilsitozin oluşturmak üzere bir guaninden önce gelen sitozinlere bir metil grubunun eklenmesini içerir.¹⁷ DNA metilasyonu kanserin ilk aşamalarından itibaren gözlenen fizyolojik bir olay olduğu için erken tanıda önemli bir yere sahiptir. Bu nedenle, kanserin tanı, tedavi ve prognozunda kullanılacak olan biyobelirteçlerin keşfedilmesinde özellikle DNA metilasyonuna yönelik çalışmalar oldukça önemlidir. DNA metilasyonunun tespitinde kullanılan konvansiyonel tekniklerin uygulanması DNA metilasyon paternlerinin haritalanmasında etkili olmakla birlikte temel hem de klinik araştırmalarda çok önemli bilgiler elde edilmesini sağlamaktadır. DNA metilasyon varlığını belirlemede; Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC), Yüksek Performanslı Kapiler Elektroforez (High-Performance Capillary Electrophoresis, HPCE), Sssl Testi (Sssl Assay), Gen Spesifik Metilasyona Özgü PCR (Gene Specific Methylation-Specific PCR, MSP-PCR), Metil-Duyarlı Restriksiyon Enzimi PCR (Methyl-Sensitive Restriction Enzyme PCR, MSRE-PCR), MethylLight, Pyrosequencing, Metilasyon Duyarlı Tek Nükleotid Primer Uzatma (Methylation-Sensitive Single Nucleotide Primer Extension, MS-SNuPE), Kombine Bisülfid Restriksiyon Analizi (Combined Bisulfite Restriction Analysis, COBRA), Metilasyona Duyarlı-Yüksek Çözünürlüklü Erimel (Methylation Sensitive-High Resolution Melting, MS-HRM), Metilasyona Özgü Multipleks Ligasyona Bağımlı Prob Amplifikasyonu (Methylation-Specific Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification, MS-MLPA), Kütle ARRAY EpiTYPER (Mass ARRAY EpiTYPER), Restriksiyon Landmark Genomik Tarama (Restriction Landmark Genomic Scanning, RLGS), Diferansiyel Metilasyon Hibridizasyonu (Differential Methylation Hybridization, DMH), Metillenmiş DNA İmmünopresipitasyon ve Mikroarray Çip (Methylated DNA Immunoprecipitation and Microarray Chip, MeDIPchip), Bead Array (Illumina), Tüm Genom Bisülfid Sekanslama (Whole-Genome Bisulfite Sequencing), Tek Molekül Gerçek Zamanlı Dizileme (Single Molecule Real Time (SMRT) sequencing), Metil-Cap dizileme teknikleri kullanılmaktadır.¹¹ Bu teknikler DNA metilasyonunun tanımlanmasında oldukça etkilidir ve minimal invaziv prosedürler kullanılarak toplanan çok çeşitli biyolojik numunede de metilasyonun tespit edilmesini olanaklı kılmaktadır.¹⁸ Buna karşılık bu teknikler büyük miktarda DNA ve/veya radyoaktif etiketleme gerektirdiğinden DNA hasarı sebebi ile yanlış pozitif sonuçların alınması ve PCR amplifikasyonunda replikasyon hatalarına yol açması gibi çeşitli dezavantajları bulunmaktadır.⁴ Ayrıca

kullanılan bu teknikler 5-metilsitozin ile 5-hidroksimetilsitozin, 5-formilsitozin ve 5-karboksiliktosin gibi diğer sitozin modifikasyonlarının ayırt edilememesine de neden olmaktadır.^{19,20}

Geleneksel yöntemlerin DNA metilasyonunun tespiti için yetersiz kalması metilasyonu tanımaya spesifik biyosensör çalışmalarına hız kazandırmıştır. DNA metilasyon tespiti için biyosensörler dönüştürücü tipine göre, elektrokimyasal (amperometrik ve potansiyometrik), optik (kolorimetrik, floresan, lüminesans ve interferometrik), kütle bazlı (piezoelektrik ve akustik dalga) ve kalorimetrik olmak üzere dört ana sınıfa ayrılmaktadır.^{21,22}

Elektrokimyasal Tabanlı Biyosensörler

Elektrokimyasal yöntemler, yüksek performanslı biyosensörlerin geliştirilmesi için elektrokimyasal dönüştürücülerin duyarlılığını, tanıma öğeleri olan yüksek özgüllüğe sahip biyomoleküller ile birleştiren değerli analiz araçlarıdır. Elektrokimyasal biyosensörler, sinyal tespitine göre amperometri, voltametri, potansiyometri, impedometri ve iletkenometri olarak beş ana sınıftan oluşmaktadır.²³

Metillenmiş DNA ve DNA metiltransferaz (MTaz) aktivitesini izlemek için kullanılan etiketli ve etiketsiz algılama olmak üzere iki elektrokimyasal yöntem formatı vardır.²⁴ Altın nanopartiküller, elektroaktif etiket (ferrosen asetik asit ve metilen) ve grafene dayalı etiketler gibi nanomateryaller, DNA metilasyonunu saptama araştırmalarında kullanılmaktadır. Metillenmiş DNA varlığında endonükleaz ayrılmasından (Dpn I) ve negatif yüklü bir indium kalay oksit (ITO) mikroelektrotunda etiketli fragmanların birikmesinden sonra bir elektrokimyasal tepki üretilmektedir. MTaz inhibitörlerinin ilaç taraması alanında kullanılmasının yanında klinik DNA metilasyon analizi için de kullanılması önerilmektedir.²⁵ Bir başka çalışmada ise metillenmiş DNA, MTaz aktivitesi ve bunun inhibitörlerinin tespiti için hassas ve seçici altın nanopartikül ve elektrokimyasal tabanlı biyosensör olarak tasarlanmıştır.²⁶

Etiketli algılamaya benzer yaklaşımlar kullanılarak, sırasıyla MTaz aktivitesini ve MTaz aktivitesi ile DNA metilasyonunu değerlendirmek için “sinyal açık” ve “sinyal kapalı” etiketsiz algılama stratejileri kullanılmaktadır. Bu biyosensörler prob immobilizasyonu, tamamlayıcı DNA ile hibridizasyon, Dam MTaz ile metilasyon ve Dpn I ile kesim uygulamalarını kullanır.²⁷

Bunlara ek olarak çeşitli elektrot tiplerine göre elektrokimyasal yöntemler geliştirilmiştir.

Perde baskılı altın elektrotlar (Screen-printed gold electrodes, SPE-Au), basit, düşük maliyeti ve tek kulla-

nımlık potansiyeli nedeniyle, metilasyon tespitinde kullanılan biyosensör tabanlı cihazlardan biridir. eMethylsorb, SPE-Au temelli bir platform olup DNA-altın afinitesine göre DNA metilasyon seviyesini belirlemek için tasarlanmıştır. Bisülfid muamelesi ve asimetric PCR, adenin ve guanin içeren metillenmiş ve metillenmemiş ssDNA'ları tespit edilebilmektedir.²⁸

Karbon film modifiyeli elektrot (overoxidized polypyrrole/MWNT), elektron siklotron rezonans nanokarbon, MWCNT- β -siklodekstrin gibi karbon bazlı elektrotlar, geniş potansiyelleri, yüksek elektrot saflığı, geniş aktif yüzey alanı ve düşük arka plan akımlarını içeren çeşitli elektrokatalitik aktivite avantajlarına sahiptir. Bu teknikte, bisülfid reaksiyonu veya etiketlenmesi olmadan, hem 5-metilsitozinin hem de sitozinin oksidasyon akımları arasındaki farklar ölçülmektedir.²⁹

Metillenmiş p53 gen analizi için yakalama probu olarak PNA (Peptide Nucleic Acid), elektroaktif gösterge ([Ru(NH₃)₆]³⁺) ve elektron transferinin artırıcısı olarak bir elektrot üzerindeki bir AuNP filmi kullanılarak ultra-duyarlı biyosensör geliştirilmiştir. Bisülfid muamelesinden sonra, tamamlayıcı PNA probu ile metillenmiş DNA gözlenirken metillenmemiş DNA varlığında hibridizasyon reaksiyonu gerçekleşmediği için DNA gözlenmez.³⁰

DNA'da metillenmiş sitozinin varlığını belirlemek için osmiyum tetroksitin kullanıldığı oksidasyon temelli biyosensörler kullanılır. Oksidasyon, stabil bir metilsitozin glikol-osmat-bipiridin kompleksi oluşumuna yol açar, böylece metillenmiş ve modifiye edilmemiş DNA arasında net bir ayırım yapılmasını sağlar. Kompleksin içindeki floresan etiketi, serbest moleküllerden çok daha düşük bir floresan emisyonuna sahiptir. Bu metodolojinin uygulanması, p53 dizisindeki metilsitozini tanımlamak için kullanılmıştır.³¹ Bu yöntemin dezavantajı, timinin osmiyum oksidasyonuna duyarlı olabilmesi ve hatalı pozitif sonuçlar vermesidir.

Elektrik Tabanlı Biyosensörler

Elektrik tabanlı biyosensörler, proteinler ve oligonükleotitler gibi biyomoleküllerin etiketsiz, hassas ve hızlı izlenmesi için başka bir yaklaşım sunar.³² Bu yöntem, bir kanal boyunca analitin bağlanmasından kaynaklanan iletkenlik, direnç veya empedans değişikliklerinin ölçülmesine dayanır. Elektrokimyasal tekniğin aksine, elektriksel algılama, herhangi bir elektroaktif madde kullanılmadan biyobelirteçlerin doğrudan tespitine izin verir.³³ Metillenmiş DNA'yı saptamak için kullanılan alan etkili transistörleri (Field Effect Transistors, FET'ler) ve nanopor analizlerini içeren iki farklı elektriksel algılama şekli vardır.^{34,35}

Alan Etkili Transistörler (FET)

FET, hedef ve reseptör elektrotlarına sahip yarı iletken kanaldan oluşan bir transistör türüdür. FET'in işlevi ölçülen akımı değiştirmek veya iletken kanalın voltajını ve iletkenliğini değiştirerek kazanç veya amplifikasyona yol açmaktır. FET biyosensörleri, bu transistör fonksiyonelliğini kullanarak, FET kanalının yüzeyindeki reseptörler ve hedefler arasındaki etkileşimleri analit konsantrasyonu ile doğrusal veya doğrusal olmayan ilişkili elektrik sinyallerine dönüştürür.³⁶

Nanoporlar

Yalıtım membranına gömülü nano ölçekli kanallar (nanoporlar), DNA, RNA protein, iyon ve ilaç molekülü de dahil olmak üzere çeşitli elektriksel biyomoleküllerin etiketsiz ve hızlı tespiti için yeni bir nanosensör sınıfını oluşturmaktadır. Biyolojik ve katı hale spesifik olmak üzere nanopor teknolojileri iki türe ayrılmaktadır. Biyolojik nanoporlar, a-Hemolislin (a-HL), Mycobacteria smegmatisporin A (MspA) ve bakteriyofaj phi29 (phi29) gibi protein kanallarına; lipit iki tabakalı veya katı hal nanoporlar, silikon nitrür (SiN_x) SiO₂, SiC, Al₂O₃ veya grafen yapıları membranlara gömülü halde bulunmaktadır.³⁷

Optik Tabanlı Biyosensörler

Optik biyosensörler, reseptör ve hedef moleküller arasındaki bağlanma olayına yanıt olarak belirli dalga boylarında ışığın emilmesi, yansıtılması ve yayılması gibi optik özelliklerin değişikliğini ölçen güçlü bir analiz cihazıdır.³⁸ Bu biyosensörler, transdüksiyon tipine göre kolorimetri, luminesans, floresan, yüzey plazmon rezonansı (Surface Plasmon Resonance, SPR) ve yüzeyle geliştirilmiş Raman saçılması (Surface-Enhanced Raman Scattering, SERS) olmak üzere beş ayrı sınıfa ayrılabilir.³⁹

Floresan

Floresan temelli analizler, yüksek hassasiyete ve seçiciliğe sahip optik yöntemlerdir. Floresan tespitinde, florofor molekülleri, elektromanyetik radyasyonun belirli bir dalga boyu tarafından uyarılır ve optik dönüştürücü tarafından dalga boyu kayan dalga ışığının yoğunluğu tespit edilir.⁴⁰

Floresan temelli biyosensörler için üç farklı yaklaşım vardır.⁴¹ İlk yaklaşım, bağlama olaylarından önce ve sonra hedeflerin doğrudan tespitidir. İkinci yaklaşım, organik boyalar ve nanopartiküller (kuantum noktaları, boya katkılı silika nanopartiküller) dahil olmak üzere floresan etiketleme reaktifleri ekleyerek hedef analitlerin dolaylı tespitidir.⁴²

Üçüncü yaklaşım ise floresan rezonans enerji transferidir (FRET). FRET, genellikle iki florofor birbirine (10-100) yakın olduğunda ve donörün emisyon spektrumunun alıcının uyarma spektrumuyla kesiştiği durumlarda meydana gelen ışısız bir enerji transfer şeklidir. Enerji aktarım hızı, donör ve alıcı çiftlerinin uzaklığına, spektral örtüşme derecesine, FRET çiftlerinin dipol açısal yönelimine ve donörün kuantum verimine bağlıdır. FRET, biyomoleküllerin konformasyonel değişikliklerinin araştırılması, moleküller arası etkileşimlerin izlenmesi, nükleik asit analizi ve enzim aktivitesinin test edilmesi dahil olmak üzere çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır.⁴³

DNA metilasyonu ve MTaz aktivitesinin tespiti için son zamanlarda altın nanorodlara, quantum dotlara (QD) ve polimerlere dayanan bir dizi nano-FRET sistemi geliştirilmiştir.⁴⁴ Ayrıca, MSP'nin nanoteknoloji varyantı olan MS-qFRET, yüksek MSP özgülüğü ile QD-FRET teknolojisinin yüksek duyarlılığı ve sadeliğini kullanarak metilasyonun hassas, kantitatif tespitini olanaklı kılmaktadır.⁴⁵

Ek olarak, DNA metilasyonunun tespiti için katyonik konjuge polimer (Cationic Conjugated Polymer, CCP) bazlı FRET tekniği de kullanılmıştır. CCP bazlı FRET tekniği kullanılarak over kanserinde metillenmiş RASSF1A, OPCML ve HOXA9 gibi hedef biyobelirteçlerin tespit edildiği bildirilmiştir.⁴⁶

Kolorimetre

Kolorimetrik biyosensörler, renk sinyalinin yoğunluğundaki değişikliklerden yararlanarak yarı kantitatif ölçümlerin çıplak gözle bile okunabilmesi nedeniyle basit, düşük maliyetli ve optik temelli cihazlardır.⁴⁷ Manyetik mikroforların kullanımına dayanan kolorimetrik analiz ile 80 fmol'a kadar metillenmiş DNA, altın nanopartikül agregasyonunu oluşturarak kırmızıdan maviye renk değişimi olarak gözlenmektedir.⁴⁸

Floresan ve DABCYL grupları (floresan emisyonu söndürücüsü) ile etiketlenmiş oligonükleotit problemleri tasarlanarak metillenmiş sitozinin tespiti sağlanmaktadır.⁴⁹ Modifiye edilmemiş sitozin varlığında floroserin-etiketli oligonükleotitleri ayırmak için endonükleaz (HhaI) kullanılmaktadır.⁵⁰ DNA'da 5-metilsitozinin tespiti, hedef DNA'ya spesifik tamamlayıcı dizi taşıyan DNA çipi üzerine biyotin ile etiketlenmiş metil-CpG bağlayıcı proteinin uygulanmasıyla sağlanmaktadır.⁵¹ Metillenmiş CpG adası ile DNA duplekslerine bağlanan biyotin proteini daha sonra etiketli streptavidin ile belirlenmektedir. Floresan ve kolorimetrik saptama için sırasıyla Cy3 ve eozin ile hazırlanan konjugatlar kullanılarak kırmızı renkte çip görüntüleri elde edilmektedir.⁵² Mikroarray yapısındaki biyosensör

tasarımı ile hedef geni veya gen panelinin incelenmesi ve kişiselleştirmesi bu yöntemin avantajları arasında yer almaktadır.⁵³

Yüzey Plazmon Rezonansı (SPR)

SPR temelli tespit, genellikle altın veya gümüş metalik yapıların ve dielektrik malzemenin ara yüzeyinde meydana gelen iletken elektronların toplu salınımindaki değişikliklerin izlenme prensibine dayanmaktadır.³⁸ SPR biyosensörlerinde, antikor, oligonükleotit ve aptamer gibi moleküller metal yüzey üzerinde immobilize edilmektedir. SPR, nükleik asit, protein ve yüksek hassasiyetli epigenetik biyobelirteçlerin tespiti için de oldukça uygun yöntemdir.³⁹ APC ve MGMT gibi metillenmiş biyobelirteçlerin doğrudan tespiti için SPR sensör çipi kullanılmaktadır. Biyotiniye edilmiş problemler önce bir streptavidin ile modifiye edilmiş düzlemsel SPR sensör çipine konjuge edilmektedir. Ardından tamamlayıcı hedef DNA ile hibridizasyon yapılarak metillenmiş DNA etkileşimi ile kırılma indisi artırılarak hedef analitlerin tespiti sağlanmaktadır.⁵⁴

Yüzeyi-Geliştirilmiş Raman Saçılması (SERS)

Raman spektroskopisi ışığın esnek olmayan malzemeden saçılmasından kaynaklanan dalga boyu kayan ışığın tespitine dayanmaktadır. Biyomoleküller durumunda, karmaşık bir parmak izi spektrumu, molekülün fonksiyonel grup kompozisyonuna özel titreşim bandlarının kombinasyonundan kaynaklanır.⁵⁵

Nanopartiküller

Metal nanopartikül, karbon bazlı nano yapı, yarı iletken ve manyetik nanopartikül gibi maddeleri içeren çeşitli nanomalzemeler, dönüştürücüler olarak biyosensör uygulamalarına entegre edilmektedir. Bu inorganik malzemeler, algılama sistemlerinin stabilitesini ve sinyal gücünü arttırmakta ve bu da tekrarlanabilirlikte gelişmelere yol açmaktadır. DNA metilasyon durumunun belirlenmesi için altın veya gümüş gibi metal nanopartiküllerin uygulaması da bulunmaktadır.⁵⁶ Altın nanopartiküller, kolorimetrik biyosensörler için optik özelliğe sahiptir. Anyonik polimerlerin varlığında, nanopartiküllerin toplanmasının baskılandığı ve çözeltinin renginin kırmızıdan maviye değiştiği çalışmalarda bildirilmektedir.⁵⁷ Bir çalışmada, tümör baskılayıcı gen olan *APC (Adenomatous Poliposis Coli)* geninin promoter bölgesinde DNA metilasyonunun tanımlanması bu yöntem ile gerçekleştirilmiştir.⁵⁸ DNA metilasyonunun saptanmasında gümüş nanopartiküller de kullanılmaktadır. Gümüş nanopartiküller, sitozin bakımından zengin DNA iplikçikleri de dahil olmak üzere çeşitli DNA dizileri için

spesifik spektral tepkiler göstermektedir.^{59,60} Nanopartiküllerin, metillenmemiş DNA varlığında yoğun kırmızı floresan ışımaya gerçekleştirdiğini, metillenmiş DNA ile etkileşim sonrasında ise floresan ışımının gerçekleşmediği bildirilmektedir.⁶¹ Yüksek konsantrasyonda metillenmiş DNA, gümüş nanopartiküllere maruz kaldığında pembe-den sarıya renk değişimi gözlenmektedir.^{62,63} Serum örneklerinde ise DNA metilasyon durumunun belirlenmesinde gümüş nanopartiküllerin kullanılabilirliği de olasıdır.⁶⁴

Nanoteknoloji tabanlı algılama yöntemleri, klinik teşhislerin duyarlılık, seçicilik ve maliyet etkinliği açısından taleplerinin karşılanmasında büyük umut vaat etmektedir.⁶⁵ Nanomalzemeler, algılama sistemlerinin stabilitesini ve sinyal gücünü artırabilir ve bu da tekrarlanabilirlikte gelişmelere yol açmaktadır. DNA metilasyon tespitinde yukarıda bahsedilen biyosensör tabanlı cihazların mikrofluidik sistemlere dahil edilmesi de mümkündür. Mikrofluidik cihazlar, geleneksel yöntemlere kıyasla “doğal” laminar akış, akışkan hacim ve akış parametrelerinin hassas kontrolü, düşük test numunesi ve reaktif tüketimi, cihazlarla verimli sıvı etkileşimi için yüksek yüzey/hacim oranı ile azaltılmış reaksiyon süresi gibi birçok avantaj sunmaktadır.⁶⁶ Lokus-spesifik DNA metilasyonunun tespiti için mikrofluidik çip, ligaz zincir reaksiyonu (LCR) amplifikasyonunu DNA-bazlı elektrokimyasal analiz ile birleştiren basit bir mikroaracı olarak geliştirilmiştir. Böylece, hem kanser hücre soylarında hem de serum örneklerinde metile DNA ölçümünü sağlamaktadır. Mikrofluidik cihazların doğruluğu floresan ve yeni nesil dizileme yaklaşımları ile test edilmekle birlikte mevcut teknolojilere karşı alternatif olarak görülmektedir.²⁸

HİSTON MODİFİKASYONU

Kromatin ile ilişkili histon proteinlerinin, asetilasyon, metilasyon, ubikitinasyon, fosforilasyon, snitrozilasyon ve sumolasyon gibi çeşitli mekanizmalar ile gen transkripsiyonunun düzenlenmesine histon modifikasyonu denilmektedir.¹⁷ Normal bir hücre karsinojenlere maruz kaldığında meydana gelen epigenetik değişiklikler kromatin yapısında farklılıklara yol açarak kanserleşmeye neden olur.⁶⁷

Histonlar küçük, bazik proteinlerdir ve hücre çekirdeğinin DNA'sına iyonik bağlarla bağlanırlar. Histon modifikasyonları serin ve treoninin fosforilasyonu, lizin asetilasyonu veya ubikitinasyonu, argininin ayrılması (sit-rülinasyon), cis-prolin ve diğerlerinin trans-izomerizasyonu, post-translasyonel modifikasyonlar gibi birçok değişikliği içermektedir.⁶⁸ En çok rastlanılan histon modi-

fikasyonları asetilasyon ve metilasyondur.⁶⁹ Histon asetilasyonu etkisi transkripsiyonel aktivasyon üzerinde etkilidir. Histon proteinlerinin terminal uçlarındaki lizin kalıntılarının asetilasyonu gen ifadesinin artmasına, deasetilasyonu ise gen ifadesinin azalmasına neden olmaktadır. Ancak histon metilasyonunun etkisi, gerçekleştiği amino asitin türüne ve histon kuyruğundaki lokalizasyona bağlı olarak değişir. Histonların metilasyonu, proteinlerin amino asit kalıntılarına bağlı olarak farklı transkripsiyonel sonuçlara neden olur. Histon 3'ün lizin 27'sine üç metil grubunun eklenmesi gen ifadesini baskımlarken, histon 3 içindeki lizin 4'ün metilasyonu gen ifadesini artırmaktadır.⁷⁰ Bu modifikasyonların bazıları, tek başlarına veya kombinasyon halinde, kanser başta olmak üzere, nörogelişimsel bozukluklar ve otoimmün hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların patogeneğinde de rol almaktadır. Bu nedenle, histon modifikasyonlarının tespiti, tıbbi araştırmalar ve klinik uygulamalar için oldukça önemlidir.⁷¹

Histon Modifikasyonu İlişkili Biyosensörler

Histon modifikasyonlarının analizi için kullanılan konvansiyonel yöntemler arasında peptid ve protein dizi bazlı analizler (peptide and protein array-based assays) ve afinite veya kimyasal zenginleştirme ile birleştirilmiş kütle spektrometrisi (affinity or chemical enrichment coupled with mass spectrometry) olmak üzere iki ana proteomik yöntem kullanılmaktadır.^{72,73} Mikroarraylerin hızlı ve esnek olma gibi yüksek verimli uygulamalar için avantajları bulunmaktadır. Modifiye peptid problemleri ile birçok farklı analit hızlı bir şekilde test edilip bağlanma afiniteleri ve özgüllüğü yarı kantitatif olarak belirlenebilir. Kütle spektroskopisi yöntemi, histonların hızlı, kantitatif ve kalitatif analizini sağlar.⁷⁴

Histonların gen ekspresyonunun düzenlenmesindeki önemi, histon modifikasyonlarını tanımlamaya yönelik prob ve sensörlerin geliştirilmesine neden oldu. Floresan problemleri histon tanıma ve belirleme için kullanılmaktadır.⁷⁵ Floresan sensörü ve histonlarla supramoleküler bir kompleks oluşturup karboksifenilfloron floresanla söndürülerek histonların tayini sağlanmaktadır.⁷⁶ Asetilasyon gibi bazı histon modifikasyonlarının belirlenmesi için de asidik ve hidrofobik histon sensörlerinin kombinasyonu kullanılmaktadır. Asetilasyon, bazikliği ve hidrofilitiyi artırarak histonların DNA ile daha yakın ve güçlü etkileşimlerle gen ekspresyonunun baskılanmasına neden olmaktadır.^{70,77} Histon metilasyonlarının tespiti ise daha karmaşık süreçler içermektedir. Histonların metilasyon analizinde, anti-histon antikoru (histon 3) ve hedef histon modifikasyonuna spesifik antikoru (histon 3'ün dokuz lizin trimetilasyonu) birleştiren oligonükleotit fonksiyonlu altın nanoparçacık-

lardan oluşan optik immünosensörler kullanılmaktadır.⁴⁸ Bir diğer önemli histon modifikasyonu sitrülinsiyondur. Sitrülinsiyon histonların pozitif yüklerini ortadan kaldırdığından, bu modifikasyon histonlarla DNA arasındaki etkileşimi zayıflatabilir. Sitrülinin etiketlenmesi için floresan problemleri kullanılmaktadır.⁷⁸

Sekar ve ark. tarafından histon metilasyonunun *in vivo* görüntülenmesi için biyoluminesans sensörü oluşturulmuştur.⁷⁹ Biyoluminesans sensörleri epigenetik değişikliklerin tespiti için yaygın olarak kullanılmaktadır.^{79,80} Klasik floresanın aksine biyoluminesans sensörler, hücrelerin içine yerleştirilmeyip sadece gen ekspresyonundaki değişikliklerin tespitini sağlamaktadır.⁸¹ Bu yaklaşım, hücrelerde ve dokularda arka plan floresan etkinin azalması ile yüksek hassasiyetin oluşmasına yol açar. Ek olarak, sinyalin kaynağı sürekli olarak hücreler tarafından üretildiğinden, bu yöntem aynı numunelerin tekrar tekrar görüntülenmesini sağlar.⁸² Aynı numunenin tekrar görüntülenmesi, veri değişkenliğini ve dolayısıyla *in vivo* çalışmalar için gerekli deney hayvanlarının sayısını önemli ölçüde azaltır. Biyosensörlerin tasarımları, hedef histon için spesifik bağlanma alanını ya da lusiferaz floresan proteinleri gibi biyoluminesans emisyonu ile enzim üreten DNA yapısı motifinin kombinasyonlarına göre gerçekleştirilmektedir.⁸³

Lusiferaz, oksilusiferin üreten bir enzim olup ışık yayan, oldukça kararsız bir bileşiktir.⁸⁴ Lusiferaz, düşük miktarda veya yüksek verimli bir şekilde hücre lizatları, canlı hücreler ve hayvanlarda olduğu gibi birçok farklı ortamda da kullanılabilir. DNA modifikasyonlarının tespiti için lusiferaz biyosensörleri oldukça önemlidir.⁸⁵ Canlı sistemlerdeki proteinin post-translasyonel modifikasyonları, lusiferaz biyoluminesans sensörleri ile incelenmektedir.⁸⁶ Bu amaçla, spesifik bağlanma alanını lusiferaz ile birleştiren füzyon proteinleri kullanılabilir. Protein sensörünün bağlanma alanının hedef yapı motifi ile etkileşime girdiği, protein konformasyonunun iki yarım lusiferazı bir araya getiren ve enzimatik aktivitesini yeniden oluşturan değişim olduğu gözlemlenebilir. Sekar ve ark. *in vivo* görüntüleme ile histon 3'ün lizin 9 ve 27 metilasyonları için lusiferaz sensörleri geliştirmiştir.⁷³ Bu sensörlerin, histon metiltansferazların inhibitörlerinin geliştirilmesi ve araştırılmasında çok perspektif araçlar olarak kullanılmasının etkili olabileceğini açıkça göstermiştir. Histon modifikasyonu (histon 4'ün lizin 12'nin asetilasyonu) analizi için histon ve tanıma proteini (bromodomain proteini) sırasıyla sarı floresan proteini ve siyah floresan proteinleri ile etkileşime girerek floresan rezonans enerji transferi yardımıyla biyoluminesans tayini gerçekleştirebilir.⁸⁷ Benzer şekilde, diğer protein modifikasyonlarını (fosforilasyon, ubikitinasyon

vb.) görüntülemek için de biyoluminesans teknikleri kullanılmaktadır.^{43,88}

miRNA İlişkili Biyosensörler

miRNA, erken aşamalarda kanser tespiti için ideal bir biyobelirteç olarak kabul edilir. Kodlanmayan, evrimsel olarak korunmuş ve genomun transkripsiyon sonrası gen düzenleyicileri olan mikroRNA'lar (miRNA'lar), karsinogenez mekanizmasındaki etkin rolleri nedeniyle oldukça önemli epigenetik regülatörlerdir.⁶⁷ Northern blotting, kantitatif gerçek zamanlı PCR (QRT-PCR) ve mikroarray dahil miRNA'ların tespitinde kullanılan birçok yöntem bulunmaktadır.^{89,90}

Elektrokimyasal biyosensörler, basit, hızlı ve güvenilir bir algılama sağlayabilmeleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. miRNA biyosensöründe, transdüksiyon elementi, altın, camsı karbon, indiyum kalay oksit (ITO), grafit gibi çeşitli materyaller de olabilir ve ayrıca bu malzemelerin çeşitli nanopartikül ve/veya nanotüplerle modifikasyonları olabilir. miRNA'ların elektrokimyasal tespitindeki temel prensip, tamamlayıcı prob ve hedef miRNA dizileri arasındaki hibridizasyon üzerine, elektrot özelliklerinde veya elektroaktif bileşik redoks sinyalindeki değişiklikleri ölçmektir.⁹¹

Amperometride, mevcut ölçümler zamana göre sabit potansiyel değerinde yapılırken, amperometrik veya voltametrik ölçümlere dayanan miRNA tespiti için tasarlanan elektrokimyasal biyosensörler, hedef miRNA'nın hibridizasyonu üzerine mevcut tamamlayıcı değişimlerle akımın değişimini hedeflemektedir. İmpedimetrik biyosensörler, elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), nano yapı oluşumu, biyofonksiyonelleşme ve hibridizasyon gibi modifikasyon işlemleri sırasında önemli bilgiler sağlayan iyi kurulmuş, kullanışlı bir tekniktir. Buna ek olarak, elektrokimyasal reaksiyon mekanizmalarının ve yüzey adsorpsiyonunun araştırılması için güçlü bir araçtır.⁹²

Elektrokimyasal algılama, miRNA algılama alanına düşük maliyetli, sağlam, güvenilir, kullanımı kolay, ultra hassas algılama limitleriyle tasarlanmasına izin verdiği için kolaylık ve avantaj getirmektedir. Nanopartiküllerin büyük yüzey-hacim oranlarının üstün özelliklerine sahip olması, mükemmel iletkenlik özellikleri, daha hassas ve net biyosensörler oluşturmaya imkan tanımaktadır.⁹³

SONUÇ

Kanser, gün geçtikçe artan insidansı ile birlikte dünyada görülen ölümlerin en önemli ikinci nedenidir. Biyosensör-

ler, biyobelirteçlerin yüksek özgüllük ve duyarlılıkta tespit edilmesine olanak tanınması ile kanserin erken tanı, prognoz ve survi takip sistemleri olarak kullanılması oldukça yararlıdır. Kanserin erken tanısında kullanılacak olan biyobelirteçlerin keşfedilmesinde özellikle epigenetik değişikliklerin tespitine yönelik çalışmalar oldukça önem kazanmaktadır.

Günümüzde PCR, mikroarrayler ve DNA dizilimi metilasyon biyobelirteçlerinin belirlenmesi ve keşfedilmesinde kullanılan başlıca araçlardır. Bununla birlikte, bu prosedürler laboratuvar temelli, karmaşık, zaman alıcı olması ile birlikte hem analiz hem de yorumlama için pahalı araçlar ve operatörler gerektirir. Ayrıca, bu yöntemlerin klinik uygulamalardaki ilerlemelere de fayda sağlayacağı düşünülmektedir. Bu nedenle, daha geniş uygulama alanları için, biyolojik sıvılarda çok düşük konsantrasyonda bile metillenmiş biyobelirteçlerin tespiti kullanımı kolay ve hassas teknikleri gerektirmektedir. DNA metilasyon tespiti için yeni sensör tasarımları üretmek için yapılan araştırmalara rağmen, zorlukları ve kısıtlamaları bulunmaktadır. İlk olarak, idrar, serum ve kan dahil olmak üzere karmaşık biyolojik sıvılarda hedef analitleri tespit etmek için etkili sensörlerin geliştirilmesi bir sorun olmaya devam etmektedir. İkincisi, nanomalzemelerin DNA metilasyon tespiti için ideal POC (point-of-care) biyosensör sistemlerinin çip üzerinde gerçek laboratuvar sistemlerine entegrasyonu sadece ileri teknolojiyi değil, aynı zamanda multidisipliner araştırmaları gerektirmektedir. Son olarak, DNA metilasyon deneylerinin klinik kullanımlı sensör cihazlarına dayalı cihazlara çevrilmesi, karmaşık, hızlı ve akışkan sistemlerinin geliştirilmesini gerektirecektir. Bu tür sistemler sadece POC'yi değil aynı zamanda erken teşhisin yapılmasını da sağlar.¹²

Nanobiyoteknoloji konusuna da dahil olan biyosensörlerin, kanserin erken ve doğru tanısının konmasında önemi gittikçe artmaktadır. Epigenetik alandaki çalışmalarda önemi oldukça yüksek olan biyosensörlerin kullanımı ve yüksek verim/hassasiyetle analizlerin gerçekleştirilmesiyle kanserin diagnostik/prognostik açıdan daha iyi anlaşılmasına ve tedavilerin geliştirilmesine yardımcı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca, kanserlerin doğru teşhisi için aynı anda birkaç biyobelirteç tespiti gerekmektedir. Biyosensörlerin geliştirilmesine yönelik artan çalışmalara rağmen yeniden kullanılabilirlik, stabilite ve biyolojik sıvılarla uyumluluk da dahil olmak üzere çeşitli özelliklerinin geliştirilmesine halen ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Tsai HC, Baylin SB. Cancer epigenetics: linking basic biology to clinical medicine. *Cell Res.* 2011;21(3):502-17. doi: 10.1038/cr.2011.24.
2. Jablonka E, Lamb MJ. The changing concept of epigenetics. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;981:82-96. doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04913.x.
3. Pogribny IP, Ross SA, Tryndyak VP, Pogribna M, Poirier LA, Karpinets TV. Histone H3 lysine 9 and H4 lysine 20 trimethylation and the expression of Suv4-20h2 and Suv-39h1 histone methyltransferases in hepatocarcinogenesis induced by methyl deficiency in rats. *Carcinogenesis.* 2006;27(6):1180-6. doi: 10.1093/carcin/bgi364.
4. Olkhov-Mitsel E, Bapat B. Strategies for discovery and validation of methylated and hydroxymethylated DNA biomarkers. *Cancer Med.* 2012;1(2):237-60. doi: 10.1002/cam4.22.
5. Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Carvalho B, Wu H, Brandenburg SA, Jeddeloh JA, et al. Comprehensive high-throughput arrays for relative methylation (CHARM). *Genome Res.* 2008;18(5):780-90. doi: 10.1101/gr.7301508.
6. Ibrahim AE, Thorne NP, Baird K, Barbosa-Morais NL, Tavaré S, Collins VP, et al. MMass: an optimized array-based method for assessing CpG island methylation. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(20):e136. doi: 10.1093/nar/gkl551.
7. Kurdyukov S, Bullock M. DNA methylation analysis: choosing the right method. *Biology (Basel).* 2016;5(1):3. doi: 10.3390/biology5010003.
8. Coulet PR. What is a biosensor? In: Blum LJ, Coulet PR, eds. *Biosensor Principles and Applications*. 1st ed. New York: Marcel Dekker Inc; 1991. p.1-6.
9. Gutés A, Céspedes F, Alegret S, del Valle M. Determination of phenolic compounds by a polyphenol oxidase amperometric biosensor and artificial neural network analysis. *Biosens Bioelectron.* 2005;20(8):1668-73. doi: 10.1016/j.bios.2004.07.026.
10. Li Y. Biosensors. Hardware, in *CIGR Handbook of Agricultural Engineering Volume VI Information Technology*. Michigan, USA: ASABE; 2006. p.52-93.
11. Sohrabi N, Valizadeh A, Farkhani SM, Akbarzadeh A. Basics of DNA biosensors and cancer diagnosis. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2016;44(2):654-63. doi: 10.3109/21691401.2014.976707.
12. Syedmoradi L, Esmaili F, Norton ML. Towards DNA methylation detection using biosensors. *Analyst.* 2016;141(21):5922-43. doi: 10.1039/c6an01649a.
13. Tothill IE. Biosensors for cancer markers diagnosis. *Semin Cell Dev Biol.* 2009;20(1):55-62. doi: 10.1016/j.semcdb.2009.01.015.
14. Jianrong C, Yuqing M, Nongyue H, Xiaohua W, Sijiao L. Nanotechnology and biosensors. *Biotechnol Adv.* 2004;22(7):505-18. doi: 10.1016/j.biotechadv.2004.03.004.
15. Havas K, Whitehouse I, Owen-Hughes T. ATP-dependent chromatin remodeling activities. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(5-6):673-82. doi: 10.1007/pl00000891.
16. Esteller M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Br J Cancer.* 2006;94(2):179-83. doi: 10.1038/sj.bjc.6602918.
17. Jeddeloh JA, Stokes TL, Richards EJ. Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nat Genet.* 1999;22(1):94-7. doi: 10.1038/8803.
18. Meyers RA *Epigenetic Regulation and Epigenomics*. Vol. 2. 1st ed. New York: John Wiley & Sons; 2012.
19. Globisch D, Münzel M, Müller M, Michalakakis S, Wagner M, Koch S, et al. Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS One.* 2010;5(12):e15367. doi: 10.1371/journal.pone.0015367.
20. Wang L, Zhou Y, Xu L, Xiao R, Lu X, Chen L, et al. Molecular basis for 5-carboxycytosine recognition by RNA polymerase II elongation complex. *Nature.* 2015;523(7562):621-5. doi: 10.1038/nature14482.
21. Turner AP. Biosensors: sense and sensibility. *Chem Soc Rev.* 2013;42(8):3184-96. doi: 10.1039/c3cs35528d.
22. Shen L, Waterland RA. Methods of DNA methylation analysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2007;10(5):576-81. doi: 10.1097/MCO.0b013e3282bf6f43.
23. Ronkainen NJ, Halsall HB, Heineman WR. Electrochemical biosensors. *Chem Soc Rev.* 2010;39(5):1747-63. doi: 10.1039/b714449k.
24. Dai Z, Cai T, Zhu W, Gao X, Zou X. Simultaneous profiling of multiple gene-methylation loci by electrochemical methylation-specific ligase detection reaction. *Chemical Communications.* 2013;49(19):1939-41.
25. Poh WJ, Wee CP, Gao Z. DNA methyltransferase activity assays: advances and challenges. *Theranostics.* 2016;6(3):369-91. doi: 10.7150/thno.13438.
26. Wei X, Ma X, Sun JJ, Lin Z, Guo L, Qiu B, et al. DNA methylation detection and inhibitor screening based on the discrimination of the aggregation of long and short DNA on a negatively charged indium tin oxide microelectrode. *Anal Chem.* 2014;86(7):3563-7. doi: 10.1021/ac500101t.
27. Wang GL, Zhou LY, Luo HQ, Li NB. Electrochemical strategy for sensing DNA methylation and DNA methyltransferase activity. *Anal Chim Acta.* 2013;768:76-81. doi: 10.1016/j.aca.2013.01.026.
28. Koo KM, Sina AA, Carrascosa LG, Shiddiky MJ, Trau M. eMethylorb: rapid quantification of DNA methylation in cancer cells on screen-printed gold electrodes. *Analyst.* 2014;139(23):6178-84. doi: 10.1039/c4an01641f.
29. Goto K, Kato D, Sekioka N, Ueda A, Hirono S, Niwa O. Direct electrochemical detection of DNA methylation for retinoblastoma and CpG fragments using a nanocarbon film. *Anal Biochem.* 2010;405(1):59-66. doi: 10.1016/j.ab.2010.06.004.
30. Wang P, Wu H, Dai Z, Zou X. Picomolar level profiling of the methylation status of the p53 tumor suppressor gene by a label-free electrochemical biosensor. *Chem Commun (Camb).* 2012;48(87):10754-6. doi: 10.1039/c2cc35615e.
31. Tanaka K, Tainaka K, Kamei T, Okamoto A. Direct labeling of 5-methylcytosine and its applications. *J Am Chem Soc.* 2007;129(17):5612-20. doi: 10.1021/ja068660c.
32. Luo X, Davis JJ. Electrical biosensors and the label free detection of protein disease biomarkers. *Chem Soc Rev.* 2013;42(13):5944-62. doi: 10.1039/c3cs60077g.
33. Fu D, Li LJ. Label-free electrical detection of DNA hybridization using carbon nanotubes and graphene. *Nano Rev.* 2010;1. doi: 10.3402/nano.v1i0.5354.
34. Mishra NN, Maki WC, Cameron E, Nelson R, Winterrowd P, Rastogi SK, Filanoski B, Maki GK. Ultra-sensitive detection of bacterial toxin with silicon nanowire transistor. *Lab Chip.* 2008;8(6):868-71. doi: 10.1039/b802036a.
35. Shim J, Humphreys GI, Venkatesan BM, Munz JM, Zou X, Sathe C, et al. Detection and quantification of methylation in DNA using solid-state nanopores. *Sci Rep.* 2013;3:1389. doi: 10.1038/srep01389.
36. Makowski MS, Ivanisevic A. Molecular analysis of blood with micro-/nanoscale field-effect-transistor biosensors. *Small.* 2011;7(14):1863-75. doi: 10.1002/sml.201100211.

37. Feng Y, Zhang Y, Ying C, Wang D, Du C. Nanopore-based fourth-generation DNA sequencing technology. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015;13(1):4-16. doi: 10.1016/j.gpb.2015.01.009. Erratum in: *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015;13(6):383. Erratum in: *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015;13(3):200-1. Erratum in: *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015;13(6):383.
38. Fan X, White IM, Shopova SI, Zhu H, Suter JD, Sun Y. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: a review. *Anal Chim Acta*. 2008;620(1-2):8-26. doi: 10.1016/j.aca.2008.05.022.
39. Velasco-Garcia MN. Optical biosensors for probing at the cellular level: a review of recent progress and future prospects. *Semin Cell Dev Biol*. 2009;20(1):27-33. doi: 10.1016/j.semdb.2009.01.013.
40. Yao J, Yang M, Duan Y. Chemistry, biology, and medicine of fluorescent nanomaterials and related systems: new insights into biosensing, bioimaging, genomics, diagnostics, and therapy. *Chem Rev*. 2014;114(12):6130-78. doi: 10.1021/cr200359p.
41. Zhong W. Nanomaterials in fluorescence-based biosensing. *Anal Bioanal Chem*. 2009;394(1):47-59. doi: 10.1007/s00216-009-2643-x.
42. Li B, Yu Q, Duan Y. Fluorescent labels in biosensors for pathogen detection. *Crit Rev Biotechnol*. 2015;35(1):82-93. doi: 10.3109/07388551.2013.804487.
43. Chen G, Song F, Xiong X, Peng X. Fluorescent nanosensors based on fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2013;52(33):11228-45. <https://doi.org/10.1021/ie303485n>.
44. Wang GL, Luo HQ, Li NB. Gold nanorods-based FRET assay for ultra-sensitive detection of DNA methylation and DNA methyltransferase activity. *Analyst*. 2014;139(18):4572-7. DOI:10.1039/c4an00206g.
45. Pisanic TR 2nd, Zhang Y, Wang TH. Quantum dots in diagnostics and detection: principles and paradigms. *Analyst*. 2014;139(12):2968-81. doi: 10.1039/c4an00294f.
46. Feng F, Liu L, Wang S. Fluorescent conjugated polymer-based FRET technique for detection of DNA methylation of cancer cells. *Nat Protoc*. 2010;5(7):1255-64. doi: 10.1038/nprot.2010.79.
47. Wee EJ, Ngo TH, Trau M. Colorimetric detection of both total genomic and loci-specific DNA methylation from limited DNA inputs. *Clin Epigenetics*. 2015;7(1):65. doi: 10.1186/s13148-015-0100-6.
48. Ge C, Yu L, Fang Z, Zeng L. An enhanced strip biosensor for rapid and sensitive detection of histone methylation. *Anal Chem*. 2013;85(19):9343-9. doi: 10.1021/ac402202x.
49. Yamada H, Tanabe K, Nishimoto S. Fluorometric identification of 5-methylcytosine modification in DNA: combination of photosensitized oxidation and invasive cleavage. *Bioconjug Chem*. 2008;19(1):20-3. doi: 10.1021/bc7003318
50. Okamoto A, Tanabe K, Saito I. Site-specific discrimination of Cytosine and 5-methylcytosine in duplex DNA by Peptide nucleic acids. *J Am Chem Soc*. 2002;124(35):10262-3. doi: 10.1021/ja0264955.
51. Heimer BW, Shatova TA, Lee JK, Kaastrup K, Sikes HD. Evaluating the sensitivity of hybridization-based epigenotyping using a methyl binding-domain protein. *Analyst*. 2014;139:3695-701.
52. Kejik Z, Kaplánek R, Havlík M, Bríza T, Jakubek M, Králová J, et al. Optical probes and sensors as perspective tools in epigenetics. *Bioorg Med Chem*. 2017;25(8):2295-306. doi: 10.1016/j.bmc.2017.01.011.
53. Hawk RM, Armani AM. Label free detection of 5-hydroxymethylcytosine within CpG islands using optical sensors. *Biosens Bioelectron*. 2015;65:198-203. doi: 10.1016/j.bios.2014.10.041.
54. Yu Y, Blair S, Gillespie D, Jensen R, Myszká D, Bradan AH, et al. Direct DNA methylation profiling using methyl binding domain proteins. *Anal Chem*. 2010;82(12):5012-9. doi: 10.1021/ac1010316.
55. Kneipp J, Kneipp H, Kneipp K. SERS—a single-molecule and nanoscale tool for bioanalytics. *Chem Soc Rev*. 2008;37(5):1052-60. doi: 10.1039/b708459p.
56. Lee KS, El-Sayed MA. Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging: sensitivity of plasmon response to size, shape, and metal composition. *J Phys Chem B*. 2006;110(39):19220-5. doi: 10.1021/jp062536y.
57. Jena BK, Raj CR. Optical sensing of biomedically important polyionic drugs using nano-sized gold particles. *Biosens Bioelectron*. 2008;23(8):1285-90. doi: 10.1016/j.bios.2007.11.014.
58. Ge C, Fang Z, Chen J, Liu J, Lu X, Zeng L. A simple colorimetric detection of DNA methylation. *Analyst*. 2012;137(9):2032-5. doi: 10.1039/c2an35043b.
59. Díez I, Pusa M, Kulmala S, Jiang H, Walther A, Goldmann AS, et al. Color tunability and electrochemiluminescence of silver nanoclusters. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2009;48(12):2122-5. doi: 10.1002/anie.200806210.
60. Shen Z, Duan HW, Frey H. Water-soluble fluorescent Ag nanoclusters obtained from multiarm star poly(acrylic acid) as "molecular hydrogen" templates. *Adv Mater (Weinheim, Ger)*. 2007;19:349-52.
61. Vosch T, Antoku Y, Hsiang JC, Richards CI, Gonzalez JI, Dickson RM. Strongly emissive individual DNA-encapsulated Ag nanoclusters as single-molecule fluorophores. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(31):12616-21. doi: 10.1073/pnas.0610677104.
62. Zhang JG, Xu SQ, Kumacheva E. Photogeneration of fluorescent silver nanoclusters in polymer microgels. *Adv Mater (Weinheim, Ger)*. 2005;17:2336-40. DOI:10.1002/adma.200501062.
63. Zhang LB, Wang EK. Metal nanoclusters: new fluorescent probes for sensors and bioimaging. *Nano Today*. 2014;9(1):132-57. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2014.02.010>.
64. Dadmehr M, Hosseini M, Hosseinkhani S, Reza Ganjali M, Sheikhnajad R. Label free colorimetric and fluorimetric direct detection of methylated DNA based on silver nanoclusters for cancer early diagnosis. *Biosens Bioelectron*. 2015;73:108-13. doi: 10.1016/j.bios.2015.05.062.
65. Holzinger M, Le Goff A, Cosnier S. Nanomaterials for biosensing applications: a review. *Front Chem*. 2014;2:63. doi: 10.3389/fchem.2014.00063.
66. Choi S, Goryll M, Sin LYM, Wong PK, Chae J. Microfluidic-based biosensors toward point-of-care detection of nucleic acids and proteins. *Microfluid Nanofluidics*. 2011;10(2):231-47. doi: 10.1007/s10404-010-0638-8.
67. Chen CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med*. 2005;353(17):1768-71. doi: 10.1056/NEJMp058190.
68. Sadakierska-Chudy A, Filip M. A comprehensive view of the epigenetic landscape. Part II: Histone post-translational modification, nucleosome level, and chromatin regulation by ncRNAs. *Neurotox Res*. 2015;27(2):172-97. doi: 10.1007/s12640-014-9508-6.
69. Galvani A, Thiriet C. Nucleosome dancing at the tempo of histone tail acetylation. *Genes (Basel)*. 2015;6(3):607-21. doi: 10.3390/genes6030607.
70. Kondo Y, Shen L, Cheng AS, Ahmed S, Bumber Y, Charo C, et al. Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nat Genet*. 2008;40(6):741-50. doi: 10.1038/ng.159.
71. Jeffries MA, Sawalha AH. Autoimmune disease in the epigenetic era: how has epigenetics changed our understanding of disease and how can we expect the field to evolve? *Expert Rev Clin Immunol*. 2015;11(1):45-58. doi: 10.1586/1744666X.2015.994507.
72. Moore KE, Gozani O. An unexpected journey: lysine methylation across the proteome. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1839(12):1395-403. doi: 10.1016/j.bbaggm.2014.02.008.

73. Amaya M, Baer A, Voss K, Campbell C, Mueller C, Bailey C, et al. Proteomic strategies for the discovery of novel diagnostic and therapeutic targets for infectious diseases. *Pathog Dis*. 2014;71(2):177-89. doi: 10.1111/2049-632X.12150.
74. Chae YK, Gonzalez-Angulo AM. Implications of functional proteomics in breast cancer. *Oncologist*. 2014;19(4):328-35. doi: 10.1634/theoncologist.2013-0437.
75. Sun PF, Lu XM, Fan QL, Zhang Z, Song W, Li B, et al. Water-soluble iridium(III)-containing conjugated polyelectrolytes with weakened energy transfer properties for multicolor protein sensing applications. *Macromolecules*. 2011;44:8763-70. <https://doi.org/10.1021/ma201614z>.
76. Miyachi K, Hoshino M, Kadobayashi H, Moriyama K, Asano M, Yamaguchi T, et al. Fluorophotometric determination of histone with 3,4,5,6-tetrafluoro-2-carboxyphenylfluorone-manganese(II) complex and its characterization. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2013;61(4):379-83. doi: 10.1248/cpb.c12-00852.
77. Vallianatos CN, Iwase S. Disrupted intricacy of histone H3K4 methylation in neurodevelopmental disorders. *Epigenomics*. 2015;7(3):503-19. doi: 10.2217/epi.15.1.
78. Bicker KL, Subramanian V, Chumanevich AA, Hofseth LJ, Thompson PR. Seeing citrulline: development of a phenylglyoxal-based probe to visualize protein citrullination. *J Am Chem Soc*. 2012;134(41):17015-8. doi: 10.1021/ja308871v.
79. Sekar TV, Foygel K, Devulapally R, Paulmurugan R. Degron protease blockade sensor to image epigenetic histone protein methylation in cells and living animals. *ACS Chem Biol*. 2015;10(1):165-74. doi: 10.1021/cb5008037.
80. Minaker SA, Daze KD, Ma MC, Hof F. Antibody-free reading of the histone code using a simple chemical sensor array. *J Am Chem Soc*. 2012;134(28):11674-80. doi: 10.1021/ja303465x.
81. Hayashida O, Ogawa N, Uchiyama M. Surface recognition and fluorescence sensing of histone by dansyl-appended cyclophane-based resorcinarene trimer. *J Am Chem Soc*. 2007;129(44):13698-705. doi: 10.1021/ja074906h.
82. Sanchez OF, Williamson D, Cai L, Yuan C. A sensitive protein-based sensor for quantifying histone acetylation levels. *Talanta*. 2015;140:212-8. doi: 10.1016/j.talanta.2015.03.046.
83. Tabet S, Douglas SF, Daze KD, Garnett GA, Allen KJ, Abrioux EM, et al. Synthetic trimethyllysine receptors that bind histone 3, trimethyllysine 27 (H3K27me3) and disrupt its interaction with the epigenetic reader protein CBX7. *Bioorg Med Chem*. 2013;21(22):7004-10. doi: 10.1016/j.bmc.2013.09.024.
84. Badran AH, Furman JL, Ma AS, Comi TJ, Porter JR, Ghosh I. Evaluating the global CpG methylation status of native DNA utilizing a bipartite split-luciferase sensor. *Anal Chem*. 2011;83(18):7151-7. doi: 10.1021/ac2015239.
85. Huang X, Narayanaswamy R, Fenn K, Szpakowski S, Sasaki C, Costa J, et al. Sequence-specific biosensors report drug-induced changes in epigenetic silencing in living cells. *DNA Cell Biol*. 2012;31 Suppl 1(Suppl 1):S2-10. doi: 10.1089/dna.2011.1537.
86. Lake MC, Aboagye EO. Luciferase fragment complementation imaging in preclinical cancer studies. *Oncoscience*. 2014;1(5):310-25. doi: 10.18632/oncoscience.45.
87. Kanno T, Kanno Y, Siegel RM, Jang MK, Lenardo MJ, Ozato K. Selective recognition of acetylated histones by bromodomain proteins visualized in living cells. *Mol Cell*. 2004;13(1):33-43. doi: 10.1016/s1097-2765(03)00482-9.
88. Spotts JM, Dolmetsch RE, Greenberg ME. Time-lapse imaging of a dynamic phosphorylation-dependent protein-protein interaction in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(23):15142-7. doi: 10.1073/pnas.232565699.
89. Hurley J, Roberts D, Bond A, Keys D, Chen C. Stem-loop RT-qPCR for microRNA expression profiling. *Methods Mol Biol*. 2012;822:33-52. doi: 10.1007/978-1-61779-427-8_3.
90. Eminaga S, Christodoulou DC, Vigneault F, Church GM, Seidman JG. Quantification of microRNA expression with next-generation sequencing. *Curr Protoc Mol Biol*. 2013; Chapter 4:Unit 4.17. doi: 10.1002/0471142727.mb0417s103.
91. Azimzadeh M, Rahaie M, Nasirizadeh N, Daneshpour M, Naderi-Manesh H. Electrochemical miRNA biosensors: the benefits of nanotechnology. *Nanomedicine Research Journal*. 2017;2(1):36-48. Doi: 10.22034/NMRJ.2017.23336
92. Lisdat F, Schäfer D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. *Anal Bioanal Chem*. 2008;391(5):1555-67. doi: 10.1007/s00216-008-1970-7.
93. Jolly P, Batistuti MR, Miodek A, Zhuravski P, Mulato M, Lindsay MA, ET AL. Corrigendum: Highly sensitive dual mode electrochemical platform for microRNA detection. *Sci Rep*. 2017;7:41110. doi: 10.1038/srep41110. Erratum for: *Sci Rep*. 2016;6:36719.