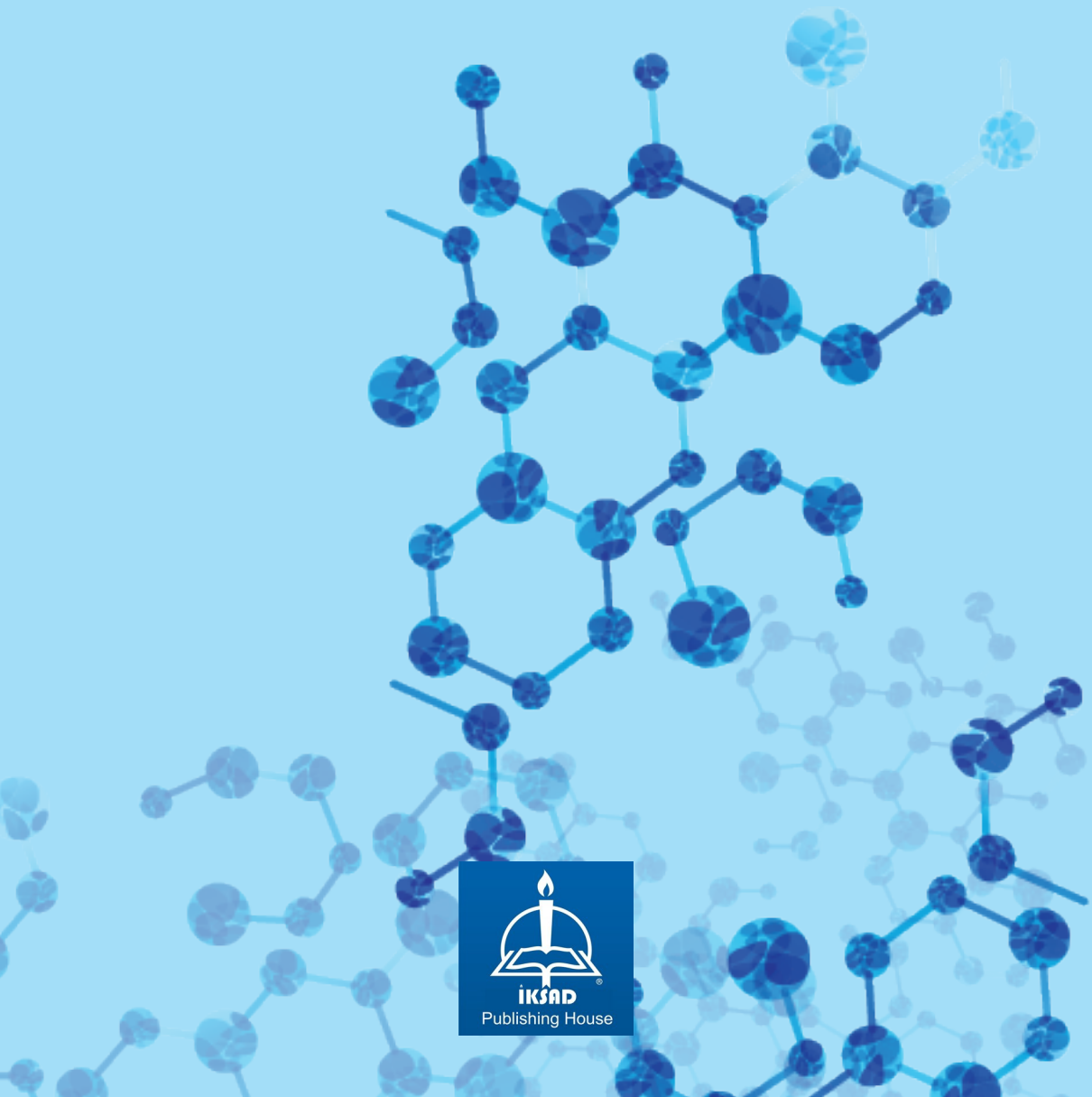
MOLEKÜLER BİYOLOJİDE SON GELİŞMELER

EDİTÖR
Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN



İKSAD
Publishing House

MOLEKÜLER BİYOLOJİDE

SON GELİŞMELER

EDİTÖR
Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN

YAZARLAR
Prof. Dr. Esra KÜPELİ AKKOL
Prof. Dr. E. Sümer ARAS
Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN
Prof. Dr. İlker BÜYÜK
Prof. Dr. Şule COŞKUN CEVHER
Doç. Dr. Deniz AYGÖREN ULUER
Doç. Dr. Funda ÖZBEK
Doç. Dr. Mustafa Türker DUMAN
Dr. Öğr. Üyesi Betül AYDIN
Dr. Öğr. Üyesi Esra GÖKÇE GÜNDÜZER
Dr. Öğr. Üyesi Fahriye ÖCAL ÖZDAMAR
Dr. Öğr. Üyesi Gökçen BAYSAL FURTANA
Öğr. Gör. Dr. Tuğba ERTUĞRUL
Arş. Gör. Elif Naz GÜRSOY
Arş. Gör. Kübra ŞENER
Arş. Gör. Recep ÇELİK
Yük. Biyomüh. Aybüke OKAY
Biyolog Bilgehan MİLLİDERE
Büşra BÖREKCİ
Büşra KARPUZ AĞÖREN
Sema Nur AĞARAN



Copyright © 2024 by iksad publishing house
All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, distributed or transmitted in any form or by
any means, including photocopying, recording or other electronic or mechanical methods, without the prior written permission of the publisher, except in the case of brief quotations embodied in critical reviews and certain other noncommercial uses permitted by copyright law. Institution of Economic Development and Social Researches Publications®
(The Licence Number of Publicator: 2014/31220)
TÜRKİYE TR: +90 342 606 06 75
USA: +1 631 685 0 853
E mail: iksadyayinevi@gmail.com
www.iksadyayinevi.com

It is responsibility of the author to abide by the publishing ethics rules.
Iksad Publications – 2024©

ISBN: 978-625-367-762-6
Cover Design: İbrahim KAYA
July / 2024
Ankara / Türkiye
Size = 16 x 24 cm

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ……...…1

BÖLÜM 1
STRES FAKTÖRLERİNE KARŞI BİTKİLERİN MOLEKÜLER CEVAPLARI
Dr. Öğr. Üyesi Gökçen BAYSAL FURTANA
Dr Öğr. Üyesi Fahriye ÖCAL ÖZDAMAR…….……3

BÖLÜM 2
DNA ORİGAMİ
Dr. Öğr. Üyesi Betül AYDIN……..…..27

BÖLÜM 3
KANSER AŞILARI: KANSER İMMÜNOTERAPİSİNDE YENİ BİR HAZİNE
Biyolog Bilgehan MİLLİDERE……59

BÖLÜM 4
AKCİĞER KANSERİNDE BİYOBELİRTEÇ OLARAK MİRNA'LAR
Dr. Öğr. Üyesi Esra GÖKÇE GÜNDÜZER
Sema Nur AĞARAN…….……..125

BÖLÜM 5
BİTKİSEL ANKSİYOLİTİKLERE MOLEKÜLER DÜZEYDE BAKIŞ
Büşra KARPUZ AĞÖREN
Prof. Dr. Esra KÜPELİ AKKOL…….…153

BÖLÜM 6
PALİNOLOJİK ÇALIŞMALARA MOLEKÜLER YAKLAŞIMLAR
Doç. Dr. Funda ÖZBEK……..……185

BÖLÜM 7
EKSOZOMLAR VE KULLANIM ALANLARI
Arş. Gör. Recep ÇELİK
Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN……...…….219

BÖLÜM 8
TARIMSAL BİYOİNFORMATİK: SÜRDÜRÜLEBİLİR VE İKLİM DEĞİŞİKLİĞİYLE BAŞA ÇIKMA YOLUNDA STRATEJİK GELİŞMELER
Yük. Biyomüh. Aybüke OKAY
Prof. Dr. E. Sümer ARAS
Prof. Dr. İlker BÜYÜK……233

BÖLÜM 9
MOLEKÜLER TEKNİKLERLE BİTKİ SİSTEMATİĞİNDE DEVRİM
Doç. Dr. Deniz AYGÖREN ULUER
Öğr. Gör. Dr. Tuğba ERTUĞRUL……..……281

BÖLÜM 10
MULTİFAKTÖRİYEL KALITIMLI HASTALIKLARA BİR MODEL: ALZHEIMER HASTALIĞI
Doç. Dr. Mustafa Türker DUMAN……..309

BÖLÜM 11
SİRTUİNLERİN NÖRODEJENERATİF HASTALIKLARLA OLAN İLİŞKİSİ
Arş. Gör. Elif Naz GÜRSOY
Arş. Gör. Kübra ŞENER
Büşra BÖREKCİ
Prof. Dr. Şule COŞKUN CEVHER…….323

ÖNSÖZ

Moleküler Biyoloji son dönemlerde yeni gelişmeleri bünyesine katarak ilerleyen, farklı bilim disiplinleri ile ilişkilendirilen, ilişikte olduğu farklı bilimsel alanların çalışmalarını destekleyen, Desteklediği bu bilimsel alanlar ile ilgili son gelişmeleri takip eden çok önemli bir bilim dalı haline gelmiştir. Buradan hareketle, farklı bilim dalları da, Moleküler Biyoloji alanındaki son gelişmeleri takip ederek kendi çalışma disiplinlerinde bu alandaki yeni gelişmeleri bünyesine hızlı şekilde katmıştır. Moleküler Biyolojideki son gelişmelerin ışığındaki bu önemli ilerleyişi, farklı bilimsel alanlardaki temel konular ile Moleküler Biyoloji arasındaki son gelişmelerin ilişkinin ortaya konulması hazırlanan bu kitabın temel hedefi olmuştur. Ayrıca, Moleküler Biyolojideki yeni ve güncel konuların ortaya konulması ve bunların bir araya getirilmesi de bu kitabın, yenilikçi ve güncel yaklaşımını ortaya koymuştur. Böylece kitap bölümlerinde, her bilimsel farklı alan kendi içinde tek bir bakış açısıyla değerlendirilmemiş, Moleküler Biyoloji temeliyle bu alanlara ait konuların yeni yaklaşımları da ortaya konulmuştur. Kitap içeriğinde yer alan farklı bölümler, o alandaki akademik araştırıcılar ve uzmanları tarafından yazılmıştır. Bu kitap bölümleri, kendi alanlarında yetkin ve uzman kişiler tarafından yazılmış olup, tüm kitap bölümleri güncel literatür kaynaklarına dayandırılarak yazılmıştır. Kitap içeriğinde yer verilen konular, Moleküler Biyolojideki son gelişmeleri kapsayacak yeni ve farklı bakış açısı kazandıran orijinal konuların olmasına da ayrıca özen gösterilmiştir. Tüm bunlarla beraber bu kitabı, merhume annem Naime Taştan ve merhum babam Hüseyin Taştan'a ithaf ettiğimi de belirtmek isterim. Ayrıca, bu kitabın hazırlanmasında desteği olan tüm akademik, uzman çalışma arkadaşlarıma ve aileme de teşekkür ve minnettarlığımı da ifade etmek isterim.

28.06.2024

Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN [1]

[1] Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı

BÖLÜM 1

STRES FAKTÖRLERİNE KARŞI BİTKİLERİN MOLEKÜLER CEVAPLARI

Dr. Öğr. Üyesi Gökçen BAYSAL FURTANA[2]
Dr. Öğr. Üyesi Fahriye ÖCAL ÖZDAMAR[3]

DOI: https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.12707194

[2] Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Teknikokullar, ANKARA. gbaysal@gazi.edu.tr Orcid ID: 0000-0001-6931-2430
[3] Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Teknikokullar, ANKARA. fahriyeocal@gazi.edu.tr Orcid ID: 0000-0003-0584-2242

GİRİŞ

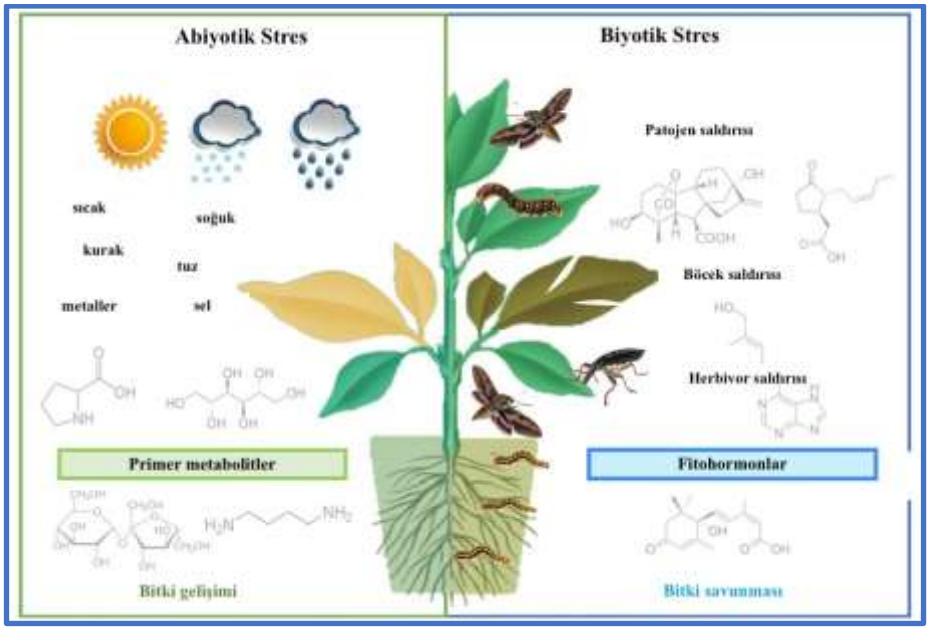
Gıda, ilaç ve enerji kaynağı olarak büyük öneme sahip olan bitkiler bulundukları çevre içerisinde zaman zaman farklı abiyotik ve biyotik stres faktörleriyle karşı karşıya kalabilmektedirler. Yapılan pek çok araştırmaya göre, dünya nüfusunun 2050 yılına kadar 10,9 milyarı aşacağı ve bu durumun da gıda talebinin bölgesel ihtiyaçlara göre %50'den %70'e kadar artacağı öngörülmektedir [1, 2]. Son yıllarda tüm dünyayı etkisi altına alan küresel ısınma ve iklim değişikliği; buzulların erimesi, kuraklık, sel, heyelan gibi birçok felaketi de beraberinde getirmektedir. Bu olayların sonucunda ortaya çıkan çevre kirliliği, kuraklık, tuzluluk gibi biyotik ve abiyotik stresler tüm canlıları olumsuz etkileyerek ekosistemin dengesini bozmaktadır. İklim değişikliğinin yanı sıra antropojenik faaliyetler ve doğal kaynakların tükenmesi/tüketilmesi, tarımsal sürdürülebilirlik açısından kritik zorluklara neden olmaktadır. Bu durum ürün verimini ve kalitesini doğrudan etkileyerek gıda güvenliği açısından da tehdit oluşturmaktadır.

Bitkiler için stres, bir bitkinin belirli olumsuz koşullar altında ideal olmayan bir şekilde büyümesi durumudur. Bu durum bitkinin tolere edebileceği sınırı aştığında, büyüme eksikliğine, ürün veriminde kayıplara ve bitkinin ölümüne neden olabilmektedir. Bitkilerin çoğunlukla karşı karşıya olduğu biyotik ve abiyotik stres faktörleri; ışık, sıcaklık, kuraklık, tuzluluk, patojenler, tarımda kullanılan kimyasallar, hava, toprak ve su kirleticileridir [3]. Büyüme ve gelişmenin farklı dönemlerinde bu stres faktörlerinin herhangi birine veya birkaçına maruz kalan bitkilerde, stresin süresine ve şiddetine bağlı olarak fizyolojik aktivitelerde bozulmalar gerçekleşmektedir. Bu bozulmalar sonucunda pek çok bitkide ürün kalitesinde düşüş, verimde azalma ve kayıplar olmaktadır. Nüfus artışı, küresel ısınma ve iklim değişikliği ile etkisi ve çeşitliliği artan tüm stres faktörlerine karşı bitkiler tarafından geliştirilen hayatta kalma stratejilerinin aydınlatılması oldukça önemlidir. Bu mekanizmaların bilinmesi özellikle ekonomik olarak önemi olan bitkilerde

verim kayıplarının azaltılması ve yüksek verimli çeşitlerin geliştirilmesi için kritik öneme sahipitir [4]. Bu nedenle son yıllarda strese maruz kalan bitkilerde fizyolojik değişikliklerin aydınlatılmasına yönelik yapılan çalışmalar ile birlikte bitkiler tarafından moleküler düzeyde verilen cevabın belirlemesini hedef alan (Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Enzim Bağlantılı İmmüno-Sorbent Testi (ELISA), immünofloresan görüntüleme, akış sitometrisi, DNA mikrodizileri vb.) araştırmalar da yapılmaktadır.

1. Bitkilerde Stres

Doğaları gereği sesil yaşayan organizmalar olan bitkiler, sürekli olarak çeşitli çevresel olumsuzluklarla karşı karşıyadır. Üretimi ve verimi tehdit eden bu etkenler bitkiler için stres faktörleridir. Kaynağına bağlı olarak biyotik (bakteriler, virüsler, parazitler, böcekler vb. nedeniyle oluşan) ve abiyotik (sıcaklık, kuraklık, tuzluluk, radyasyon, besin eksikliği vb. faktörlerden kaynaklanan) olarak sınıflandırılan stres faktörlerine karşı bitkiler hayatta kalabilmek için farklı karakteristik özellikler geliştirmektedirler (Şekil 1). Bir organizmanın şiddetli strese dayanabilmesini sağlayan biyolojik bir süreç olan adaptasyon; olumsuz çevre koşullarına maruz kalan bitkilerde yapısal, fizyolojik, biyokimyasal, moleküler ve davranışsal mekanizmalar ile gerçekleştirilmektedir.



Şekil 1. Bitki büyümesini ve gelişimini olumsuz yönde etkileyen abiyotik ve/veya biyotik strese karşı bitki tepkilerinin altında yatan metabolik mekanizmalar (Jorge ve ark. [5]'dan tercüme edilerek alınmıştır.)

Bitkiler stres etkeni olarak algıladıkları abiyotik tüm çevresel faktörlere karşı geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz birçok cevap geliştirerek hayatta kalmaya çalışmaktadır. Stres koşullarından kaçınmak veya bunlara direnmek için mekanizmalar geliştirmiştir. Geliştirilen cevaplar stres faktörü/lerinin kaynağına, şiddetine ve bitkinin genetik özelliklerine göre değişiklik göstermektedir. Bu sayede hayatta kalmak için yaşadıkları çevrede maruz kaldıkları stres faktörlerine karşı uyum sağlayabilmektedirler.

Son yıllarda hızla değişen çevresel koşulların bitkiler üzerinde olumsuz etkileri olduğu, bu durumun da verimi, büyüme-gelişmeyi ve nesillerinin sağlıklı bir şekilde devam etmesini olumsuz şekilde etkilediği göz ardı edilemeyecek bir gerçektir [6, 7]. Özellikle son yarım yüzyılda pek çok bilim insanının odak noktası haline gelmiştir. Artan gıda talebi, bitkisel üretimde gözlenen azalmanın nedenlerinin araştırılmasını kaçınılmaz hale getirmektedir.

Bu konuda 80'li yılların başında yapılan çalışmalarda, çevresel faktörlerin üretimi %70'e kadar azaltabileceği öngörülmüştür [8]. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından 2007 yılında yayınlanan rapora göre dünyadaki karasal alanların sadece %3,5'inin herhangi bir çevresel tehditten etkilenmediği bildirilmiştir [8, 9, 10]. Benzer bir sonuç, FAO raporlarına dayanılarak yapılan hesaplamalara göre, tarım arazilerinin yaklaşık %96,5'inin abiyotik streslerden etkilendiği şeklinde Cramer ve ark. [11] tarafından da belirtilmiştir. Artan gıda talebini karşılamak için bu kayıpları azaltmak kritik öneme sahiptir [12]. Bu nedenle, hayatları boyunca yaşadıkları ekosistemde birçok stres faktörü ile karşı karşıya olan bitkilerin, stresle ilişkili mekanizmaların, sinyal yollarının ve tolerans mekanizmalarının aydınlatılması oldukça önemlidir.

2. Stres Etkenlerine Karşı Bitkilerin Cevapları

Bitkiler yaşadıkları ortamda değişen çevre koşullarını algılayabilirler, bu durumu kontrol edebilir ve hayatlarını sürdürebilir veya bu durumdan kaçabilirler. Çevresel uyaranları ve/veya stres etkenlerini algılamaları, çeşitli moleküller ve bunların sinyal yolları aracılığıyla gerçekleşir.

Bitkilerin antioksidan metabolizmaları, maruz kaldıkları stres/ler durumda oluşan peroksidasyondan olumsuz yönde etkilenmektedir. Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi kuraklığa karşı bitki tarafından oluşturulan cevapta önemli rol oynamaktadır. Örneğin, tuzluluk stresi etkisiyle bitkide kök yüzeyinde, iç dokular ve hücrelerdeki gen ekspresyon modeli değişmektedir. Tuza aşırı duyarlı (SOS) sinyal yolları, hücre sinyalini düzenleyen SOS1, SOS2 ve SOS3 proteinlerini içermektedir [13]. Değişen iklim koşulları ile birlikte sıcaklık stresi, bitkiler için önemli bir stres faktörü haline gelmiştir. Yapılan pek çok çalışmada, artan sıcaklığın, tohum çimlenmesinden solunuma kadar pek çok farklı gelişim aşamasında değişen fitohormon seviyeleri, oluşan metabolitler, ısı şok proteini ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ve

ekspresyonu ile bitkide fizyolojik, biyokimyasal, genetik ve morfo-anatomik değişikliklere neden olduğu rapor edilmiştir. Sıcaklık stresiyle mücadele eden bitkilerde, membran geçirgenliği, stabilitesi ile kalsiyuma bağımlı protein kinaz (CDPK) basamaklarının ve mitojenle aktifleşen protein kinazın (MAPK) indüksiyonu desteklenmektedir [14]. Sinyallerin oluşturulmasında fitohormonların önemi, G-proteinleri, transkripsiyon faktörleri (TF'ler) ve protein anahtarları gibi kinazlar aracılığıyla gen ekspresyon profilinin çıkarılması ile belirlenmiştir. [15].

Bitki stres tepkilerinde yer alan genlerin tanımlanmasında başarılı bir şekilde kullanılan genom kısmı DNA ekstraksiyonu, amplifikasyonu, dizilimi gibi dizileme teknolojileri kullanılarak belirlenmiştir ve bu teknikler strese toleransı arttıracak şekilde geliştirilerek kullanılmaktadır [2]. Yüksek verimli yöntemlerden yararlanan genomik yaklaşımlar, tek bir genin keşfinden binlerce genin keşfine doğru çarpıcı bir değişimine yol açmıştır. Abiyotik strese maruz kalan farklı bitkilerden oluşturulan cDNA kütüphanelerinden eksprese edilmiş dizi etiketlerinin (Expressed Sequence Tags-EST) üretimi, gen tanımlaması için yararlı bir kaynak sağlamaktadır. Ek olarak, mikrodiziler ile ifade profili oluşturma, rastgele ve hedefli mutajenez, tamamlama ve promoter yakalama stratejileri gibi teknikler kullanılarak, strese yanıt veren ana gen havuzlarını tanımlamak mümkündür ve bu da strese yanıt veren genlerin fonksiyonel karakterizasyonunu ve stres tolerans mekanizmalarını anlamak için önemli ipuçları sunmaktadır [16].

Bitkiler, çeşitli savunma tepkilerini aktive etmek için bir sinyal molekülü olarak reaktif oksijen türlerini (ROS) kullanmaktadır. Stres durumunda farklı organellerde ROS seviyeleri artmaktadır. Üretilen ROS türevlerinin ortadan kaldırılması, katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR), karotenoidler ve fenolikler yardımıyla olmaktadır [17]. Çeşitli çalışmalar, ROS'un konsantrasyonuna bağlı olarak bitkilere hem faydalı hem de zararlı olabileceğini göstermiştir. Düşük

konsantrasyonlarda ROS, bitki hücrelerindeki sinyal yanıtlarını düzenleyen bir haberci görevi görürken, yüksek konsantrasyonlar hasara neden olmaktadır. Bu durumda bitki genleri abiyotik strese tepki olarak aktive olur. ROS seviyelerini dengelemek için bitkiler bir taraftan fizyolojik değişikliklere uğrarken, diğer taraftan da mitojenle aktifleşen protein kinazlardan (MAPK'ler) gelen sinyalleri ileterek stres sinyal yolunda gen ekspresyonunun indüklenmesini sağlamaktadırlar. MAPK sinyalleme kademesinin aktivasyonu, detoks antioksidan sistemi tarafından H^+ seviyesini ayarlamaktadır [18]. ROS'lar ayrıca fosfatlar ve ısı şok faktörleri gibi redoksa duyarlı proteinleri de değiştirmektedir. *Arabidopsis thaliana'*da HSFA1B'nin ifadesi, H_20_2 sinyal yolları yoluyla bitkinin kuraklığa ve bakteriyel enfeksiyona karşı direncini artırmıştır. Farklı transkripsiyon faktörleri ile, çeşitli abiyotik stres etkenlerine yanıt olarak ROS ile ilişkili savunma genlerinin düzenlendiği bilinmektedir. *Arabidopsis thaliana* ile yapılan çalışmada ZAT10, abiyotik stres altında ROS genlerinin hem baskılayıcısı hem de indükleyicisi olarak görev yaparken; ZAT6, ROS ve SA ile ilişkili gen ekspresyonunu düzenleyerek abiyotik streslere ve biyotik enfeksiyonlara karşı direncin pozitif düzenleyicisi olarak etki göstermektedir [19].

Düşük sıcaklıklara maruz kalan bitkilerde ROS üretiminin arttığı, ancak bu soğuk koşullarda çok uzun süre kalındığında biriken ROS'un fazlasının etkili bir şekilde ortadan kaldıramayabildiği, bu durumunda da zarın kendine özgü özelliklerinin yanı sıra proteinlerinin, lipitlerinin ve DNA'nın da zarar görmesine yol açabildiği bilinmektedir. Bu gibi olumsuz durumlar ile mücadele etmek için bitkilerde ROS üretim seviyelerini kontrol edecek ve fazlalıkları detoksifiye edecek bir antioksidan savunma sistemi bulunmaktadır [20]. Bitki içindeki her hücresel bölmenin kendi ROS homeostazisi vardır [21]. Ayrıca, ROS birikimi abiyotik strese alışma sürecinde anahtar rol oynayan farklı bitki hormonlarının dengesini de etkileyebilmektedir. Oksin hormonunda ROS kaynaklı olarak ortaya çıkan değişim, oksin taşıyıcılarını kodlayan gen

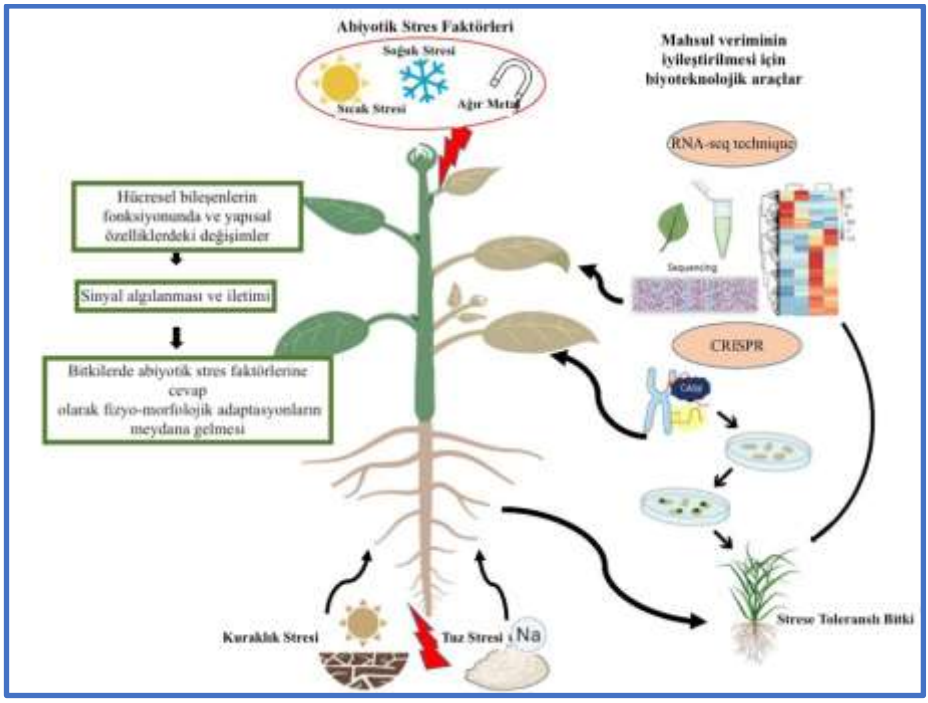
ekspresyonundaki değişime bağlı olarak oksijen aracılı sinyallemede azalmaya neden olmaktadır. Öte yandan, GA sinyallemesinin hücresel homeostaziyi kontrol ederek stres toleransını düzenlediği görülmüştür [22]. Örneğin, mısırda su eksikliğinin, yaprağın GA içeriğinde azalmaya neden olduğu, bu durumda DELLA aktivitesinin arttığı, sonuç olarakta strese maruz kalan bitkinin hayatta kalma şansının arttığı bildirilmiştir [23]. Biyoteknolojik tekniklerdeki ilerlemeler, gün geçtikçe ROS'un sinyallemedeki rolünün daha iyi anlaşılmasına olanak tanımakta ve zorlu çevre koşulları altında hayatını sürdürmek durumunda olan bitkilerde verimliliği artırmak için yeni stratejilerin geliştirilmesini sağlamaktadır [24].

Stres faktörlerinin [25]; metabolik toksisiteye, membran düzensizliğine, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna, fotosentezin baskılanmasına neden olduğu bilinmektedir. Strese maruz kalan bitkilere gen transferi ile, ozmoprotektan birikimini, şaperon oluşumunu, süperoksit radikal temizleme mekanizmalarını ve iyonların taşıyıcı sistemler yoluyla dışlanmasını veya bölümlenmesini kontrol eden moleküler süreçleri değiştirmek mümkün olmaktadır. SAGE, MPSS, dizi bazlı transkript profil oluşturma teknolojileri ve kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) yöntemleri, farklı gelişim aşamalarında strese maruz kalan bitki dokulardaki binlerce genin yüksek verimli ekspresyonunu değerlendirmemize olanak tanımaktadır. EST bazlı cDNA dizileri yardımıyla, gen ekspresyon kalıplarının ve fonksiyonlarının stres toleransıyla ilişkisi açıklanabilir. cDNA makrodizileri kullanan gen ekspresyon profili, stres tolerans mekanizmalarıyla ilgili daha fazla sayıda yolun tanımlanmasına olanak tanımaktadır [16]. Hedef genomun düzenlenmesi için kolay, hızlı, ucuz ve etkili bir sistem sağlayan üç model mevcuttur. Bunlar; düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR), transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleazlar (transcription activator-like effector nucleases-TALEN) ve çinko parmak nükleazları (zinc finger nucleases-ZFN)'dır. Son

zamanlarda CRISPR-Cas9 teknolojisi, bitki hücrelerinde özellikle biyotik strese karşı yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 2). Bu teknik, belirli gen dizilerini hedef alarak biyotik stres direncini aydınlatmaktadır [12].

Doğada bulundukları ortamlara bağlı olarak aynı anda birden fazla stres faktörünün etkisine maruz kalan bitkilerde tepkiler moleküler, biyokimyasal, fizyolojik ve yapısal düzeylerde gerçekleşmektedir. Özellikle çoklu strese maruz kalan bitkiler tarafından oluşturulan yanıtın temelinde değişen metabolik kodlama tarafından takip edilen spesifik gen ekspresyonunun modüle edilmesi yatmaktadır; dolayısıyla bir bitkinin maruz kaldığı stres/lere karşı geliştirdiği tepki modelini bulmak gerçekten zor bir iştir [26, 27].

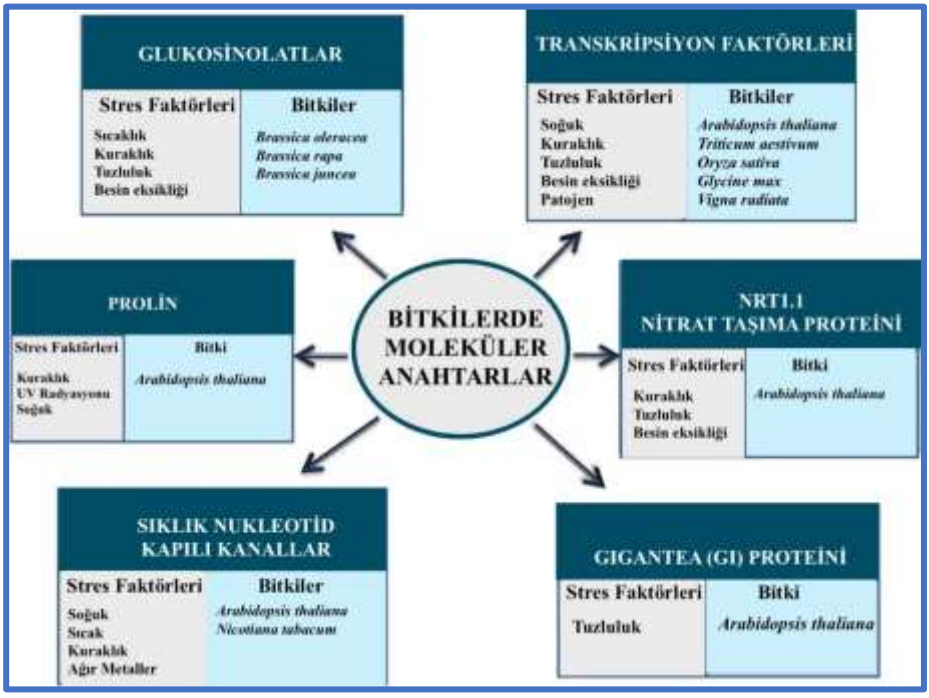
Stres/lerin etkileri, DNA'dan başlayan değişikliğin tüm hücreye, bitkiye veya tüm alana yönelik yansıması şeklinde ortaya çıkmaktadır. Abiyotik strese karşı oluşturulan cevap, stres sinyalinin bitki tarafından nasıl algıladığına bağlı olarak değişmektedir. Stres bitkilerde sinyalleme basamaklarının başlatılmasına ve direnç genlerinin uyarılmasına yol açmaktadır. Bu nedenle bitkilerde stresin aydınlatılması ile ilgili yapılan son dönemdeki araştırmalar, hücre, doku ve organ düzeyinde moleküller hakkında bilgi sağlayan pek çok tekniği de kapsayacak şekilde ilerlemektedir. [2, 27, 28]. Örneğin, RNA-seq ve CRISPR-cas9 gibi teknikler ile stres durumda toleransı sağlayan hedef genlerin küresel ölçekte belirlenmesi, bu genlerin strese hassas bitkilerde toleransın artırılması için kullanılmasında ve strese dayanıklı çeşitler geliştirmesine yardımcı olmada oldukça faydalı olmaktadır [29].



Şekil 2. Başlıca abiyotik streslerin ve bitkilerin bu strese direnmesine yardımcı olacak biyoteknolojik araçların şematik sunumu koşullar.(Imran ve ark. [29]'dan tercüme edilerek alınmıştır.)

Hem biyotik hem de abiyotik stres faktörleriyle mücadele etmek için bitkiler, farklı moleküler anahtarlar tarafından kontrol edilen çeşitli doğal adaptasyon mekanizmalarına sahiptir. Bu anahtarlar, iki veya daha fazla kararlı durum arasında geçiş yaparak uyarlanabilir mekanizmaları aktive etmek için bir dizi olayı tetikleyen moleküllerdir. Moleküller, pH, ışık, sıcaklık, elektrik akımı, mikro-ortamdaki değişiklikler gibi çevresel uyaranlara yanıt olarak veya iyonların ve diğer ligandların varlığında durumlar arasında yer değiştirebilir. Proteinler, strese duyarlı gen ekspresyonunu değiştiren birincil moleküler anahtarlardır. Bitkilerde sinyal iletimini düzenleyen GIGANTEA (GI) proteini [30], prolin [31], rho proteini [32], NRT1.1 benzeri nitrat taşıma proteini [33] moleküler anahtarlara örnek olarak verilmektedir [7]. Transkripsiyon faktörleri

[34, 35, 36], GORK kanallar [37], siklik nükleotit kapılı kanallar [38], glukozinolatlar [39] ve hücre dışı ATP [40] ise gen ekspresyon mekanizmalarını düzenleyerek bitkinin strese karşı oluşturduğu adaptasyon mekanizmasının kontrolüne yardımcı olmaktadırlar (Şekil 3). Strese duyarlı genlerin farklı moleküler anahtarlar tarafından diferansiyel düzenlenmesi, çoklu stres toleransını geliştirmektedir.



Şekil 3. Farklı moleküller "moleküler anahtar" görevi görerek farklı bitki türlerinde çeşitli stres koşullarına yanıt olarak adaptif mekanizmaları tetiklemektedir.(Debnath ve ark. [7]'dan tercüme edilerek alınmıştır)

Bitki NRT1.1 proteini, hem yüksek hem de düşük afinite fonksiyonlarına sahip ilk nitrat taşıyıcısıdır ve bu özelliği sayesinde bitkide strese karşı cevap oluşumunu teşvik etmektedir. Bir sinyal molekülü olan NRT1.1 proteini, stresli koşullarda hayatta kalmak için gerekli olan fizyolojik süreçleri de düzenlemektedir. [33]. Bu proteinin çeşitli streslere karşı bitkide direnci

artırabildiği, kuraklık stresine maruziyette ABA'nın NRT1.1 kaynaklı NO_3 taşınmasının düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynadığı, ayrıca NRT1.1'in NO_3'e bağımlı Na^+ taşınımını düzenleyerek tuz stresine karşı direnç kazandırdığı bildirilmiştir [33]. Jian ve arkadaşları [41] tarafından yapılan çalışmada, NRT1.1'in yüksek düzeyde Cd toleransı sağladığı ortaya konmuştur. NRT1.1'in ekspresyonu, K^+'un kök epidermisinden alınımı ve kökten gövdeye taşınımı için gereklidir.

Transkripsiyon faktörleri (TF'ler), dizilerinde bazı küçük değişiklikler yaparak veya hedef dizilerini değiştirerek bitkideki düzenleyici gen ağını, fizyolojik olayları ve hatta bitkinin morfolojisini değiştirebilmektedir. Ayrıca birçok bitki türünde soğuk, kuraklık, tuzluluk, besin eksikliği gibi abiyotik ve biyotik stres faktörlerine karşı mücadeleye yardımcı olurlar [34, 35]. Nükleer lokalizasyon sinyali, oligomerizasyon bölgesi, DNA bağlanma alanı ve transkripsiyonel düzenleyici yapı dahil olmak üzere dört fonksiyonel alana sahip olan TF'ler, DNA bağlanma alanlarına göre gruplandırılmaktadırlar [34]. bZIP (temel bölge/lösin fermuarı) TF grubu ökaryotlarda yaygın olarak ifade edilir ve absisik asit (ABA)'e bağımlı aşağı akış genlerinin ekspresyonunu düzenlemektedir. *ZmbZIP4*'ün aşırı ifadesinin mısırda kuraklık toleransını artırdığı [34]; *bZIP13* geninin pirinçte soğuk stresine toleransı sağladığı; *asbZIP* geninin de biberde ABA sentezini artırarak kuraklık toleransında anahtar rol oynadığı bildirilmiştir [42]. APETALA2/ETİLEN CEVAP Elemanı Bağlama Faktörleri (AP2/ERF), iyi bilinen diğer bir transkripsiyon faktörüdür. Dehidrasyona duyarlı element bağlayıcı protein (DREB), AP2/ERF transkripsiyon faktörünün beş ana alt gruptan biridir. *ZmDREB2A*'nın *Arabidopsis thaliana*'da ABA'ya bağımlı genleri düzenleyerek hem kuraklık hem de ısı toleransını artırdığı bildirilmiştir [7]. NAC adı verilen transkripsiyon faktörü, hücre bölünmesinde, sürgünde apikal meristemin gelişiminde, abiyotik ve biyotik stres cevaplarında önemli rol oynamaktadır. *ZmNAC111* mısırda, *ZnSNAC1 Arabidopsis thaliana*'da, SNAC3 pirinçte kuraklık toleransını

arttırmaktadır [34]. *SINAC35*'in tütünde, *TaNAC29*'un buğdayda, ZmNAC55'in mısırda ve SbNAC1'in sorgumda tuz ve/veya kuraklık toleransını desteklediği, *PbeNAC1*'in de *Pyrus betulifolia*'da (huş yapraklı armut) kuraklık ve soğuğa toleransı desteklediği bildirilmiştir [43]. Çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik süreçlerin transkripsiyonunda ve modülasyonunda önemli bir rol oynayan MYB proteinleri, en büyük TF gruplarından biridir. Soya fasulyesinde kuraklık, tuzluluk gibi abiyotik stres faktörlerine yanıt olarak *GmMYB84* geninin ifade edildiği, bunun da kuraklık stresi altında hayatta kalma oranını arttırdığı bildirilmiştir [43]. Ayrıca, MtMYB3 ve *MtMYB61* genlerinin *Medicago tarantula*'da soğuğa toleransı, MtMYBS1'in de *Arabidopsis thaliana*'da tuz ve kuraklığa toleransı artırdığı ortaya konmuştur [44]. Diğer bir transkripsiyon faktör grubu olan WRKY, çoğunlukla yüksek bitkilerde bulunur. ZmWRKY58'in sinyal yollarına katılarak hücre zarı bütünlüğünü koruduğu ve kuraklığa toleransı kolaylaştırdığı; hormon sinyal yollarını aktive edip, savunmayla ilgili genlerin transkripsiyon seviyesini değiştirerek bitki savunmasında da rol oynadığı bildirilmiştir [34]. GhWRKY68 ve GhWRKY41'in fizyolojik aktiviteleri indükleyerek pamukta kuraklık ve tuz stresi toleransını düzenlediği ifade edilmiştir [43]. Bitkilerde çeşitli biyolojik süreçleri ve abiyotik stres tepkilerini düzenleyen bHLH transkripsiyon faktöründen olan *AtbHLH112*'nin aşırı ekspresyonunun, bitkilerde prolin seviyelerini artırarak kuraklığa, tuzluluğa, sıcağa, soğuğa ve diğer stres faktörlerine karşı direnç göstermelerine yardımcı olduğu bildirilmiştir [43].

Döngüsel nükleotid kapılı kanallar (Cyclic nucleotide-gated channels (CNGC'ler)), hücreler arası konsantrasyonu, membran potansiyelini ve iyon konsantrasyonunu etkileyen moleküler bir anahtar olarak tanımlanmıştır. *Nicotiana tabacum*'da soğuk stresinin (1-2 gün boyunca 4 °C'ye maruziyet) *NtabCNGC* geninin; *Arabidopsis thaliana*'da tuz stresinin AtCNGC19 ve AtCNGC20 genlerinin ekspresyonunu arttırdığı ve CNGC'lerin bitki

savunmasında önemli rol oynadığı bildirilmiştir. [38, 45]. Ayrıca CNGC'ler bitki büyüme ve gelişme süreçlerine de katkıda bulunmaktadır. Örneğin, *Arabidopsis thaliana*'da strese maruziyette *AtTCNGC3*'ün tohum çimlenmesini desteklediği, *AtCNGC18* ve *AtCNGC16* genlerinin de polen ucunun büyümesinde ve polen verimliliğinde rol oynadığı Jha ve arkadaşları [46] tarafından bildirilmiştir.

Tuzluluk, kuraklık, sıcaklık ve besin eksikliğine yanıt olarak oluşturulan ve ikincil metabolit olan glukozinolatlar, oksidatif stres, ara reaksiyonlar vb. içeren ikincil metabolizmayı değiştirir [39]. Özellikle Brassicaceae familyasındaki bitkilerde tuzluluk, kuraklık, sıcaklık ve besin eksikliğine yanıt olarak oluşturulan, kükürt ve nitrojen içeren ikincil metabolit olan glukozinolatlar, hem biyotik hem de abiyotik streslere karşı cevabın oluşturulmasında teşvik edici özelliğe sahiptir. *Brassica rapa*'da (hardal) artan sıcaklığın glukozinolat seviyelerinin yükselmesine neden olduğu; *Brassica oleracea*'da ise glukozinolat düzeyinin gündüzleri azalırken geceleri yükseldiği; strese maruziyet süresi ve şiddeti ile bitkinin gelişim aşamasına bağlı olarak biriken glukozinolat miktarlarının değiştiği bildirilmektedir [39]. Normal koşullar altında kimyasal olarak stabil olan glukosinolatlar, ancak bitki dokuları ve hücreleri hasar gördüğünde mirosinaz enzimi tarafından hidrolize edilirler ve sonuçta izotiyosiyanatlar, nitriller, tiyosiyanatlar gibi çeşitli bozunma ürünleri oluşur. Bu ürünler arasında yer alan izotiyosiyanatların da patojenlere karşı bitki savunmasında rol oynadığı bildirilmektedir [39]. Yapılan çeşitli çalışmalar ışık [47], sıcaklık [48] tuzluluk [49-53] ve kuraklık [54, 55] gibi çevresel stres faktörlerinin glukozinolat kompozisyonunu değiştirebileceğini göstermektedir.

3. Sonuç

Nüfus yoğunluğunun gün geçtikçe artması ve ekilebilir arazilerin azalması ile birlikte, iklim değişikliği etkisiyle ortaya çıkan pek çok stres

etmenine bağlı ürün kayıplarının da artıyor olması insanlığın yeterli ve sağlıklı beslenmesinin önünde büyük bir engeldir. Bu nedenle stres faktörlerine karşı dayanıklı türlerin sahip olduğu savunma mekanizmalarının anlaşılabilmesi ve çeşitli teknolojik yöntemler kullanılarak özellikle ürün kayıplarının en aza indirilmesi oldukça önemlidir. Strese dayanıklı ürünler geliştirmek, insanların sağlıklı şekilde beslenme ihtiyacını sağlayabilmesi için bir avantajdır. Yapılan çalışmalar çeşitli moleküllerin, bitkilerin strese cevap genlerini ve metabolik yollarını aktive ederek strese tepki mekanizmalarını güçlendirebildiğini ortaya koymaktadır. Bozulan ve bitkide strese neden olan çevre koşullarına verilen fizyolojik tepkileri anlamak, ürün kalite ve verimliliğini artırmak ayrıca çiçeklenme ve meyvelenme zamanını da koordine etmek için hayati önem taşımaktadır. Biyotik ve abiyotik stresin yönetilmesi, strese dayanıklı ve/veya duyarlı özelliklerin belirlenmesi son on yılda küresel ekosistem için ciddi bir tehdit haline gelen iklim değişikliğinin etkileri ile mücadele edebilmek için oldukça önemlidir. Transkripsiyon faktörleri ile strese bağlı genler arasındaki düzenleme ile birlikte, farklı sinyal bileşenleri ve yolları arasındaki ilişkiyi açıklayabilmek, strese dayanıklı transgenik bitkiler geliştirebilmek için gereklidir. Çok sayıda çalışma transkripsiyon faktörleri, GI proteinleri, Rho proteinleri ve siklik nükleotid kapılı kanal proteinleri dahil olmak üzere farklı moleküllerin ve glukozinolatlar gibi ikincil metabolitlerin kritik rollerini ortaya koymuştur. Bu moleküllerin, özellikle tarımsal amaçla üretimi yapılan bitkilerde adaptif yolları aktive ederek moleküler anahtar görevi gördüğü; tek bir moleküler anahtarın birden fazla stres ağını düzenleyebildiği gibi, çoklu anahtarların da bitkilerde tek bir strese karşı cevabı düzenleyebilme yeteneğine sahip olduğu vurgulanmaktadır. Genom düzenleme, RNAi ve revers genetik gibi teknikleri kullanarak, istenmeyen moleküler anahtarlar ortadan kaldırılabilirken, istenen özellikleri ifade etmek ve bitkilerde strese karşı dayanıklılığı artırmak için de uygun aleller sisteme dahil edilebilir. Yapılan bu çalışmalar hedeflenen hücresel süreçlerin araştırılmasına ve kontrol edilmesine

yardımcı olabilmekte, aynı zamanda da stres faktörlerine karşı dayanıklı bitkilerin üretilmesine olanak sağlamaktadır. Bu nedenle, moleküler düzenleyici yollar, sinyal basamakları ve bunların çeşitli stres koşulları altında hayatını devam ettirmeye çalışan bitkilerdeki etkileri üzerine daha fazla araştırma yapılması, değişen ve zorlaşan şartlara rağmen sürdürülebilir tarımda daha çok verim elde etmek adına hayati önem taşımaktadır.

KAYNAKÇA

1- Duro, J.A., Lauk, C., Kastner, T., Erb, K.H., Haberl, H. (2020). Global inequalities in food consumption, cropland demand and land-use efficiency: a decomposition analysis, Global Environ. Change. 64, 102124.

2- Gupta, S., Kaur, R., Sharma, T., Bhardwaj, A., Sharma, S., Sohal, J.S., Singh, S.V.(2023). Multi-omics approaches for understanding stressor-induced physiological changes in plants: An updated overview. Physiological and Molecular Plant Pathology. 126,102047. Doi:10.1016/j.pmpp.2023.102047.

3- Presti, D.L., Di Tocco, J., Massaroni, C., Cimini, S., De Gara, L., Singh, S., Cinti, S. (2022). Current understanding, challenges and perspective on portable systems applied to plant monitoring and precision agriculture. Biosens. Bioelectron. 115005.

4- Galieni, A., D'Ascenzo, N., Stagnari, F., Pagnani, G., Xie, Q., Pisante, M. (2021). Past and Future of Plant Stress Detection: An Overview From Remote Sensing to Positron Emission Tomography. Front Plant Sci. 11:609155. Doi: 10.3389/fpls.2020.609155.

5- Jorge, T.F., Mata, A.M.T., António, C. (2016). Mass spectrometry as a quantitative tool in plant metabolomics. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 374(2079), 20150370. Doi:10.1098/rsta.2015.0370

6- Liu, X., Zhou, Y., Xiao, J., Bao, F. (2018). Effects of chilling on the structure, function and development of chloroplasts. Front Plant Sci. 9:1715. Doi:10.3389/fpls.2018.01715

7- Debnath, T., Dhar, D.G., Dhar, P. (2023). Molecular switches in plant stress adaptation. Mol Biol Rep. 51(1):20. Doi: 10.1007/s11033-023-09051-7.

8- Boyer, J.S. (1982). Plant productivity and environment. Science. 218, 443–448.

9- Velthuizen, H., Huddleston, B., Fischer, G., Salvatore, M., Ataman, E., Nachtergaele, F.O., et al. (2007). Mapping biophysical factors that influence agricultural production and rural vulnerability. Environment and Natural Resources Series No. 11, Rome: FAO, 2007.

10- Büyük, İ., Aydın, S. S., Aras, S. (2012). Bitkilerin Stres Koşullarına Verdiği Moleküler Cevaplar. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi. 69(2), 97-110. Doi: 10.5505/TurkHijyen.2012.40316

11- Cramer, G.R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., Shinozaki, K. (2011). Effects of abiotic stress on plants: A systems biology perspective. BMC Plant Biol. 11, 163.

12- Razzaq A, Wani SH, Saleem F, Yu M, Zhou M, Shabala S. (2021). Rewilding crops for climate resilience: economic analysis and de novo domestication strategies. J Exp Bot. 72(18):6123-6139. Doi: 10.1093/jxb/erab276. PMID: 34114599.

13- Matysik, J., Alia, A., Bhalu, B., Mohanty, P. (2002). Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. Curr. Sci. 525–532.

14- Wahid, A., Galani, S., Ashraf, M., Foolad, M. (2007). Heat tolerance in plants: an overview. Environ. Exp. Bot. 61(3):199–223.

15- Souza, Rd., Ambrosini, A., Passaglia, L.M. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. Genet. Mol. Biol. 38 (2015) 401–419.

16- Sreenivasulu, N., Sopory, S.K., Kishor, P.K. (2007). Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. Gene. 388 (1–2):1–13.

17- Noctor, G., Foyer, C.H. (1998). ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping active oxygen under control. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 49:249–279. Doi: 10.1146/ annurev.arplant.49.1.249

18- Nadarajah, K.K. (2020). ROS Homeostasis in abiotic stress tolerance in plants. Int J Mol Sci. 21(15):5208. Doi: 10.3390/ ijms21155208

19- Perez, I.B., Brown, P.J. (2014). The role of ROS signaling in cross-tolerance from model to crop. Front Plant Sci. 5:754. Doi: 10.3389/fpls.2014.00754

20- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. Journal of Botany. 1–26. Doi: 10.1155/2012/217037

21- Choudhury, F.K., Rivero, R.M., Blumwald, E., Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. The Plant Journal. 90(5):856–867. Doi: 10.1111/tpj.13299

22- Miller, G., Shulaev, V., Mittler, R. (2008). Reactive oxygen signaling and abiotic stress. Physiol Plant. 133(3):481–489. Doi: 10.1111/j.1399-3054.2008.01090.x

23- Wang, C., Yang, A., Yin, H., Zhang, J. (2008). Influence of water stress on endogenous hormone contents and cell damage of maize seedlings. J Integr Plant Biol. 50(4):427. Doi: 10.1111/j.1774-7909.2008.00638.x

24- Sewelam, N., Kazan, K., Schenk, P.M. (2016). Global plant stress signaling: reactive oxygen species at the cross-road. Front Plant Sci. 7:187. Doi: 10.3389/fpls.2016.00187

25- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., Bohnert, H.J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity, Annu. Rev. Plant Biol. 51(1):463–499.

26- Meena, K.K., Sorty, A.M., Bitla, U.M., Choudhary, K., Gupta, P., Pareek, A., Minhas, P. S. (2017). Abiotic stress responses and microbe-mediated mitigation in plants: the omics strategies, Front. Plant Sci. 8:172.

27- Turhan, E., Asgher, M. (2024). Editorial: The contribution of molecular priming to abiotic stress tolerance in plants. Front. Plant Sci. 14:1352312. doi: 10.3389/fpls.2023.1352312

28- Fukushima, A., Kusano, M., Redestig, H., Arita, M., Saito, K. (2009). Integrated omics approaches in plant systems biology. Curr. Opin. Chem. Biol. 13(5–6):532–538.

29- Imran, Q.M., Falak, N., Hussain, A., Mun, B.-G., Yun, B.-W. (2021). Abiotic stress in plants; stress perception to molecular response and role of biotechnological tools in stress resistance. Agronomy. 11, 1579. Doi: 10.3390/agronomy11081579

30- Park, H.J., Kim, W.Y., Yun, D.J. (2016). A new insight of salt stress signaling in plant. Mol Cells. 39(6):447–459. Doi: 10.14348/molcells.2016.0083

31- Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S.K., Becker, D.F. (2013). Proline mechanisms of stress survival. Antioxid Redox Signal. 19(9):998–1011. Doi: 10.1089/ars.2012.5074

32- Berken, A. (2006). ROPs in the spotlight of plant signal transduction. Cell Mol Life Sci. 63(21):2446–2459. Doi: 10.1007/s00018-006-6197-1

33- Fang, X.Z., Fang, S.Q., Ye, Z.Q., Liu, D., Zhao, K.L., Jin, C.W. (2021). NRT1.1 dual-affinity nitrate transport/signalling and its roles in plant abiotic stress resistance. Front Plant Sci. 12:715694. Doi: 10.3389/ fpls.2021.715694

34- Leng, P., Zhao, J. (2020). Transcription factors as molecular switches to regulate drought adaptation in maize. Theor Appl Genet. 133(5):1455–1465. Doi: 10.1007/s00122-019-03494-y

35- Maurya, J.P., Triozzi, P.M., Bhalerao, R.P., Perales, M. (2018). Environmentally sensitive molecular switches drive poplar phenology. Front Plant Sci. 9:1873. Doi: 10.3389/fpls.2018.01873

36- Joshi, R., Wani, S.H., Singh, B., Bohra, A., Dar, Z.A., Lone, A.A., Pareek, A., Singla-Pareek, S.L. (2016). Transcription factors and plants response to drought stress: current understanding and future directions. Front Plant Sci. 7:1029. Doi: 10.3389/ fpls.2016.01029

37- Adem, G.D., Chen, G., Shabala, L., Chen, Z.H., Shabala, S. (2020). GORK Channel: a Master switch of Plant Metabolism? Trends Plant Sci. 25(5):434– 445. Doi: 10.1016/j.tplants.2019.12.012

38- Duszyn, M., Świeżawska, B., Szmidt-Jaworska, A., Jaworski, K. (2019). Cyclic nucleotide gated channels (CNGCs) in plant signalling-current knowledge and perspectives. J Plant Physiol. 241:153035. Doi: 10.1016/j.jplph.2019.153035

39- Del Carmen Martínez-Ballesta, M., Moreno, D.A., Carvajal, M., (2013). The physiological importance of glucosinolates on plant response to abiotic stress in *Brassica*. Int J Mol Sci. 14(6):11607– 11625. Doi: 10.3390/ijms140611607

40- Perrone, A., Martinelli, F. (2020). Plant stress biology in epigenomic era. Plant Sci. 294:110376. Doi: 10.1016/j. plantsci.2019.110376

41- Jian, S., Luo, J., Liao, Q., Liu, Q., Guan, C., Zhang, Z. (2019). NRT1.1 regulates nitrate allocation and cadmium tolerance in *Arabidopsis*. Front Plant Sci. 10:384. Doi: 10.3389/fpls.2019.00384

42- Gai, W.X., Ma, X., Qiao, Y.M., Shi, B.H., Haq, S., Li, Q.H., Wei, A.M., Liu, K.K., Gong, Z.H. (2020). Characterization of the bZIP transcription factor family in pepper (*Capsicum annuum* L.): *CabZIP25* positively modulates the salt tolerance. Front Plant Sci 11:139. Doi: 10.3389/fpls.2020.00139

43- Khan, S.A., Li, M.Z., Wang, S.M., Yin, H.J. (2018). Revisiting the role of plant transcription factors in the battle against abiotic stress. Int J Mol Sci. 19(6):1634. Doi: 10.3390/ijms19061634

44- Zhang, Z., Hu, X., Zhang, Y., Yin, H.J. (2016). Opposing control by transcription factors MYB61 and MYB3 increases freezing tolerance by relieving C-Repeat binding factor suppression. Plant Physiol. 172(2):1306–1323. Doi: 10.1104/pp.16.00051

45- Dietrich, P., Moeder, W., Yoshioka, K. (2020). Plant Cyclic Nucleotide-Gated Channels: New insights on their functions and regulation. Plant Physiology. 184(1):27–38. Doi:10.1104/pp.20.00425

46- Jha, S.K., Sharma, M., Pandey, G.K. (2016). Role of cyclic nucleotide gated channels in stress management in plants. Curr Genomics. 17(4):315–329. Doi: 10.2174/1389202917666160331202125

47- Engelen-Eigles, G., Holden, G., Cohen, J.D., Gardner, G. (2006). The effect of temperature, photoperiod, and light quality on gluconasturtiin concentration in watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.). J. Agric. Food Chem. 54, 328–334.

48- Velasco, P., Cartea, M.E., Gonzalez, C., Vilar, M., Ordas, A. (2007). Factors affecting the glucosinolate content of kale (*Brassica oleracea* acephala group). J. Agric. Food Chem. 55, 955–962.

49- Qasim, M., Ashraf, M., Ashraf, M.Y., Rehman, S.U., Rha, E.S. (2003). Salt induced changes in two canola cultivars differing in salt tolerance. Biol. Plantarum. 46, 629–632.

50- López-Berenguer, C., Martínez-Ballesta, M.C., Moreno, D.A., Carvajal, M., García-Viguera, C. (2009). Growing hardier crops for better health: Salinity tolerance and the nutritional value of broccoli. J. Agric. Food Chem. 57, 572–578.

51- López-Berenguer, C., Martínez-Ballesta, M.C., García-Viguera, C., Carvajal, M. (2008). Leaf water balance mediated by aquaporins under salt stress and associated glucosinolate synthesis in broccoli. Plant Sci. 174, 321–328.

52- Yuan, G.F., Wang, X.P., Guo, R.F., Wang, Q.M. (2010). Effect of salt stress on phenolic compounds, glucosinolates, myrosinase and antioxidant activity in radish sprouts. Food Chem. 121, 1014–1019.

53- Pang, Q., Guo, J., Chen, S., Chen, Y., Zhang, L., Fei, M., Jin, S., Li, M., Wang, Y., Yan, X. (2012). Effect of salt treatment on the glucosinolate-myrosinase system in *Thellungiella salsuginea*. Plant Soil. 355, 363–374.

54- Gardner, G., (2002). The Center for Plants and Human Health: An Interdisciplinary Approach. NABC Report on Foods for Health: Integrating Agriculture, Medicine and Food for Future Health. In *National Agricultural Biotechnology Council*; Eaglesham, A., Carlson, C., Hardy, R.W.F., Eds.; USG Publishers: Ithaca, NY, USA, 2002; pp. 299–308.

55- Radovich, T.J.K., Kleinhenz, M.D., Streeter, J.G., (2005). Irrigation timing relative to head development influences yield components, sugar levels, and glucosinolate concentrations in cabbage. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 130, 943–949.

BÖLÜM 2

DNA ORİGAMİ

Dr. Öğr. Üyesi Betül AYDIN[4]

DOI: https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.12707204

[4] Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye. barslan@gazi.edu.tr, ORCID ID: 0000-0002-9092-1350

GİRİŞ

DNA origami, olağanüstü hassasiyet ve karmaşıklığa sahip nano ölçekli yapıların mühendisliğine yönelik devrim niteliğinde bir yaklaşımı temsil etmektedir. Paul Rothemund'un 2006 yılında öncülük ettiği bu yenilikçi teknik, uzun tek sarmallı DNA moleküllerini nanometre ölçeğinde karmaşık şekillere ve yapılara katlamak için DNA baz eşleşmesinin programlanabilirliğinden ve özgüllüğünden yararlanmaktadır (Kuzuya ve Ohya, 2014). DNA origamisi özünde, DNA moleküllerinin tamamlayıcı baz eşleştirme etkileşimleri yoluyla kendi kendine bir araya gelme konusundaki olağanüstü yeteneğine dayanmaktadır. Araştırmacılar, uzun, tek sarmallı bir DNA molekülü olan bir DNA iskelesini (DNA scaffold) ve zımba (staples) adı verilen bir dizi daha kısa DNA sarmalını dikkatlice tasarlayarak, karmaşık nano yapıların montajını benzeri görülmemiş bir kontrol ve doğrulukla programlayabilmektedirler (Lim ve Montague-Cardoso, 2021). Tasarım süreci, tipik olarak bir bakteriyofaj genomundan türetilen veya de novo sentezlenen hassas bir şekilde tasarlanmış bir DNA dizisi olan bir iskelenin oluşturulmasıyla başlamaktadır. Bu iskele, DNA origami yapısının omurgası olarak hizmet etmekte ve istenen şekil veya desenin montajı için bir şablon sağlamaktadır (Bush vd., 2020). İskelenin tamamlayıcısı, iskele boyunca belirli bölgelere hibridize olmak üzere tasarlanmış kısa sentetik DNA oligonükleotidleri olan zımba telleridir. Bu zımbaların stratejik olarak yerleştirilmesiyle araştırmacılar, iskelenin basit çokgenlerden dünyanın nano ölçekli haritaları gibi daha karmaşık yapılara kadar karmaşık üç boyutlu şekillere katlanmasını belirleyebilmektedir (Zhou vd., 2021). Montaj sürecinin kendisi oldukça basittir ve iskelenin istenen konfigürasyona katlanmasına rehberlik etmek için DNA baz eşleşmesi ilkelerine dayanmaktadır. Araştırmacılar, iskele ve zımbaları denatüre etmek için DNA karışımını ısıtarak ve ardından bağlanmaya izin vermek için kademeli olarak soğutarak, kendi kendine montaj sürecini başlatabilir ve istenen DNA origami yapılarının oluşumunu tetikleyebilirler (Kuzuya ve

Komiyama, 2010). DNA origami yapıları bir araya getirildikten sonra, atomik kuvvet mikroskobu (AFM) veya transmisyon elektron mikroskobu (TEM) gibi gelişmiş görüntüleme teknikleri kullanılarak görselleştirilebilir ve karakterize edilebilir. Bu teknikler, araştırmacıların DNA nanoyapılarının boyutunu, şeklini ve yapısal bütünlüğünü nanometre çözünürlükle doğrulamalarını sağlar (Chen vd., 2023; Natarajan vd., 2023). DNA origamisinin en dikkat çekici yönlerinden biri çok yönlülüğü ve ölçeklenebilirliğidir. Araştırmacılar, sadece iskele dizisini ve zımba tasarımını değiştirerek basit iki boyutlu çokgenlerden karmaşık üç boyutlu nesnelere kadar çok çeşitli şekiller ve yapılar tasarlayabilir ve bir araya getirebilir. Dahası, DNA origaminin ölçeklenebilirliği, diğer nanofabrikasyon teknikleriyle elde edilmesi zor bir başarı olan hassas uzaysal kontrol ile büyük ölçekli dizilerin ve hiyerarşik düzeneklerin oluşturulmasına olanak tanır (Islam vd., 2021).

Özetle DNA origami, nano ölçekli yapıların benzersiz bir hassasiyet ve karmaşıklıkla tasarlanması için güçlü bir platform sunmaktadır. Araştırmacılar, DNA baz eşleşmesinin programlanabilirliğinden ve özgüllüğünden yararlanarak, nanoelektronik ve biyotıptan malzeme bilimine ve ötesine kadar çeşitli işlevlere ve uygulamalara sahip özel yapım nano yapılar tasarlayabilir ve bir araya getirebilirler. Bu bölümün ilerleyen kısımlarında DNA origamisinin ilkeleri, yöntemleri, uygulamaları ve gelecekteki beklentileri daha derinlemesine incelenerek moleküler nanoteknoloji alanındaki dönüştürücü potansiyeli vurgulanacaktır.

1. TASARIM İLKELERİ VE YÖNTEMLERİ

DNA origami yapılarının tasarlanması yaratıcılık, hesaplamalı modelleme ve deneysel doğrulamanın dikkatli bir dengesini gerektirmektedir. Süreç, araştırmacıların hassas şekillere ve işlevlere sahip nano yapılar tasarlamalarını sağlayan birkaç temel ilke ve yöntemi içermektedir. DNA nanoyapısının genel boyutunu, şeklini ve kararlılığını belirlediği için iskele dizisinin seçimi kritiktir. Dikkate alınması gereken faktörler arasında sekans

uzunluğu, GC içeriği ve katlanmayı engelleyebilecek potansiyel ikincil yapılar bulunmaktadır.

1.1. İskele Tasarımı

Tasarım süreci, iskele olarak bilinen uzun tek sarmallı bir DNA molekülünün seçilmesi veya sentezlenmesiyle başlar. Tipik olarak, iskele bir bakteriyofaj genomundan türetilir veya de novo sentezlenir ve DNA origami yapısının omurgası olarak hizmet eder. DNA origami için iskeleler, işlevsel bir genin tamamlayıcı sense ve antisens ipliklerinin iki DNA origami monomerine katlanması ve hibridize edilmesiyle oluşturulmaktadır (Wu vd., 2023). DNA origami montajında geleneksel yöntemlerin sınırlamalarının üstesinden gelme konusunda özel uzunluklara ve dizilere sahip DNA iskeleleri üretmek için ölçeklenebilir yöntemler geliştirilmiştir (Bush vd., 2020).

1.2. Zımba İpliği Tasarımı

İskele dizisi oluşturulduktan sonra, araştırmacılar zımba iplikleri adı verilen bir dizi daha kısa DNA oligonükleotidi tasarlar. DNA origamisindeki zımba iplikleri, uzun, tek sarmallı bir DNA iskelesini işbirliği içinde tasarlanmış nano yapılara katlar. Bu zımbalar, iskele boyunca belirli bölgelere hibridize olacak ve katlanmasını istenen şekle veya desene yönlendirecek şekilde tasarlanmaktadır (He vd., 2020). Zımba ipliği tasarımı, dizi uzunluğu, erime sıcaklığı (Tm) ve iskele ile dizi tamamlayıcılığı gibi faktörlerin dikkatlice değerlendirilmesini içermektedir (Zhou vd., 2021). caDNAno ve Tiamat gibi hesaplama araçları ve algoritmaları, istenen özellikleri karşılayan zımba dizilerinin tasarlanmasına yardımcı olabilmektedir (Babatunde vd., 2023).

1.3. Bilgisayarlı Modelleme

Hesaplamalı modelleme, DNA origami yapılarının tasarımında ve görselleştirilmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Araştırmacılar, DNA moleküllerinin belirli şekillere ve konfigürasyonlara katlanmasını tasarlamak

ve simüle etmek için Cadnano, Tiamat, CanDo, vHelix ve NUPACK gibi özel yazılım araçları kullanmaktadır. Bu yazılım araçları, araştırmacıların iskele ve zımba telleri arasındaki etkileşimleri tahmin etmelerine, verimli katlama için zımba yerleşimini optimize etmelerine ve ortaya çıkan DNA origami yapılarının termodinamik kararlılığını simüle etmelerine olanak tanımaktadır (Glaser vd, 2021).

1.4. Deneysel Montaj

Elde iskele dizisi ve zımba tasarımları varken, araştırmacılar DNA origami yapılarını laboratuvarda bir araya getirmeye devam ederler. Montaj işlemi tipik olarak, iskele DNA'sının tamponlu bir çözelti içinde tasarlanmış zımba iplikleri seti ile karıştırılmasını içermektedir (Gambietz vd., 2023). DNA karışımı daha sonra kontrollü bir termal soğuma işlemine tabi tutulur; burada sıcaklık, temel ipliklerin iskeleye hibridizasyonunu kolaylaştırmak ve DNA origami yapısının katlanmasını teşvik etmek için kademeli olarak düşürülür (Cao vd., 2020; Cumberworth vd., 2022). Tampon bileşimi, sıcaklık artış hızı ve soğuma süresi gibi deneysel koşulların optimize edilmesi, uygun şekilde katlanmış DNA nanoyapılarından yüksek verim elde etmek için kritik öneme sahiptir (Wang vd., 2022).

1.5. Doğrulama ve Karakterizasyon

DNA origami yapıları bir araya getirildikten sonra atomik kuvvet mikroskobu (AFM), transmisyon elektron mikroskobu (TEM) veya tek moleküllü floresan mikroskobu gibi gelişmiş görüntüleme teknikleri kullanılarak karakterize edilir. Bu teknikler, araştırmacıların DNA nanoyapılarının boyutunu, şeklini ve yapısal bütünlüğünü nanometre çözünürlükte görselleştirip doğrulamasına olanak tanıyarak tasarım ve montaj sürecinin temel doğrulamasını sağlar (Scheckenbach vd., 2020).

Özetle, DNA origami yapılarının tasarlanması, bilgisayarlı modelleme, deneysel montaj ve titiz doğrulamanın bir kombinasyonunu içerir.

Araştırmacılar, iskele ve zımba dizilerini dikkatlice tasarlayarak, deneysel koşulları optimize ederek ve tasarım ve simülasyon için hesaplama araçlarından yararlanarak, çok çeşitli uygulamalar için hassas şekillere ve işlevlere sahip özel yapım DNA nano yapıları tasarlayabilirler.

2. KARAKTERİZASYON TEKNİKLERİ

DNA origami yapılarının karakterize edilmesi, boyutlarının, şekillerinin, yapısal bütünlüklerinin ve işlevselleştirilmelerinin doğrulanması için gereklidir. DNA nanoyapılarını yüksek çözünürlük ve hassasiyetle görselleştirmek ve karakterize etmek için çeşitli gelişmiş görüntüleme ve analitik teknikler kullanılmaktadır.

2.1. Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM)

AFM, DNA origami yapılarının nanometre ölçeğinde yüksek çözünürlüklü görselleştirilmesine olanak tanıyan güçlü bir görüntüleme tekniğidir (Chen vd., 2020). AFM'de keskin bir prob, bir numunenin yüzeyini tarayarak yükseklikteki değişimleri tespit etmekte ve topografik bir görüntü oluşturmaktadır (Rosenhek-Goldian ve Cohen, 2023). AFM, DNA nanoyapılarının boyutu, şekli ve yüzey morfolojisi hakkında ayrıntılı bilgi sağlayarak araştırmacıların yapısal bütünlüklerini ve tekdüzeliklerini değerlendirmelerine olanak tanımaktadır (Green vd., 2021).

2.2. Geçirimli Elektron Mikroskopisi (TEM)

TEM, DNA origami yapılarını nanometre çözünürlükle görselleştirmek için yaygın olarak kullanılan bir başka görüntüleme tekniğidir (Gür vd., 2021; Trofymchuk vd., 2023). TEM'de bir elektron demeti ince bir numuneden geçirilmekte ve elde edilen elektron mikrografı numunenin morfolojisi ve yapısı hakkında ayrıntılı bilgi sağlamaktadır (Franken vd., 2020). TEM, DNA origami düzeneklerinin iç yapısını incelemek ve çaprazlama noktaları ve sarmal

düzenlemeler gibi ayrıntıları görselleştirmek için özellikle yararlıdır (Kabiri vd., 2019).

2.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

TEM'e çok benzeyen SEM, TEM'den farklı bir görüntüleme geometrisine sahip bir tekniktir. SEM'de, odaklanmış bir elektron demeti bir numunenin yüzeyini taramakta ve ortaya çıkan elektron mikrografı numunenin yüzey morfolojisi ve topografisi hakkında bilgi sağlamaktadır (Walter vd, 2021). SEM, DNA origami yapılarının genel şeklini ve boyutunu daha büyük ölçekte görselleştirmek için kullanışlıdır ve AFM ve TEM gibi diğer görüntüleme tekniklerini tamamlamaktadır (Sun vd., 2020; Wang vd., 2021).

2.4. Floresan Mikroskobu

Floresan mikroskobu floresan boyalar veya biyomoleküller ile etiketlenmiş DNA origami yapılarını görselleştirmek için kullanılır. Araştırmacılar, DNA nanoyapılarının belirli bölgelerine floresan etiketler ekleyerek, bunların uzamsal dağılımını ve etkileşimlerini yüksek hassasiyet ve özgüllükle görselleştirebilirler (Williams vd., 2020).

Toplam iç yansıma floresan mikroskobu (TIRF) veya süper çözünürlüklü mikroskopi (örneğin STED, PALM, STORM) gibi tek moleküllü floresan mikroskopi teknikleri, araştırmacıların tek tek DNA origami yapılarını görselleştirmelerini ve tek molekül düzeyinde dinamik süreçleri incelemelerini sağlar (Bui vd., 2018; Wang vd., 2018; Chen vd., 2020; Yardimci vd., 2020).

2.5. Jel Elektroforezi

Jel elektroforezi, DNA moleküllerini boyutlarına ve yüklerine göre ayırmak ve analiz etmek için yaygın olarak kullanılan analitik bir tekniktir (Green ve Sambrook, 2019). Agaroz veya poliakrilamid jel matrisleri, DNA origami yapılarını boyutlarına, şekillerine ve konformasyonlarına göre ayırmak için kullanılır. Jel elektroforezi, DNA origami düzeneklerinin saflığı, verimi ve

yapısal bütünlüğünün yanı sıra farklı deneysel koşullar altında hareketlilikleri ve elektroforetik davranışları hakkında nitel ve nicel bilgiler sağlayabilir (Sheheade vd., 2019).

2.6. Dinamik Işık Saçılımı (DLS)

DLS, çözeltideki DNA origami yapılarının boyut dağılımını ve hidrodinamik özelliklerini ölçmek için kullanılan bir tekniktir (Glatter, 2018). DLS, parçacıkların Brownian hareketinin neden olduğu ışık saçılma yoğunluğundaki dalgalanmaları analiz ederek, çözeltideki DNA nanoyapılarının boyutu, polidispersitesi ve stabilitesi hakkında bilgi sağlayabilir. DLS, DNA origami düzeneklerinin dinamik davranışını karakterize etmek ve farklı çevresel koşullar altında kararlılıklarını ve toplanma durumlarını değerlendirmek için özellikle yararlıdır (Yuan vd., 2024).

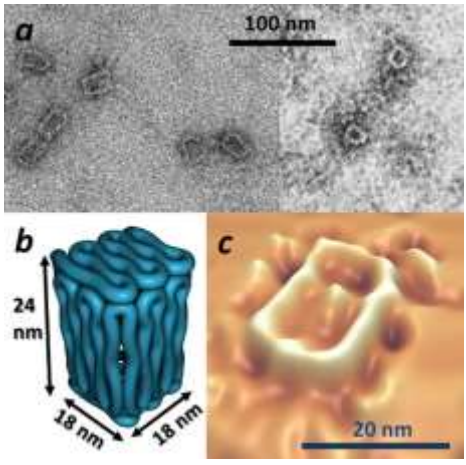
Özetle, DNA origami yapılarını karakterize etmek ve özelliklerini ve işlevlerini doğrulamak için gelişmiş görüntüleme, spektroskopik ve analitik tekniklerin bir kombinasyonu kullanılmaktadır. Araştırmacılar bu karakterizasyon tekniklerinden yararlanarak DNA nanoyapılarının yapı-işlev ilişkileri hakkında bilgi edinebilir ve biyotıp, nanoelektronik ve malzeme bilimindeki çeşitli uygulamalar için DNA nanoteknolojisi alanını ilerletebilirler.

3. GELİŞMİŞ DNA ORİGAMİ YAPILARI

DNA origami, hassas şekillere, boyutlara ve işlevlere sahip nano ölçekli yapıların tasarımında ve montajında benzersiz bir çok yönlülük sunmaktadır. Araştırmacılar, basit çokgenlerin ve temel şekillerin ötesinde, nanoteknoloji, biyotıp ve malzeme bilimindeki çeşitli uygulamalar için giderek daha karmaşık mimarilere ve işlevlere sahip gelişmiş DNA origami yapıları geliştirmişlerdir. Bu farklı DNA origami yapılarından bazıları aşağıda özetlenmektedir.

3.1. 3D DNA Origami Yapıları

İlk DNA origami tasarımları öncelikle iki boyutlu (2D) yapılara odaklanırken, araştırmacılar üç boyutlu (3D) DNA origami mimarileri üretme konusunda önemli ilerleme kaydetmişlerdir. Bu yapılar arasında nanoboxlar, nanotüpler, polihedralar ve hatta polihedronlar ve nanorobotlar gibi karmaşık 3D şekiller bulunmaktadır (Zadegan vd., 2012; Zhou vd., 2023). 3D DNA origami yapıları, işlevselleştirme için artan yüzey alanı, gelişmiş yapısal kararlılık ve ilaç dağıtımı, nano reaktörler ve nano ölçekli montaj uygulamaları için konuk moleküllerin gelişmiş kapsüllenmesi gibi benzersiz avantajlar sunmaktadır (Parikka vd., 2023). Zadegan ve arkadaşlarının 2012 yılında sentezledikleri 18 x 18 x 24 nm^3 boyutlarındaki DNA kutusu origamisinin TEM görüntüsü örnek olarak Şekil 1'de gösterilmektedir.



Şekil 1: DNA kutusu origamisinin TEM görüntüsü. (a) DNA kutusu origami parçacıklarının örneklerini gösteren yakınlaştırılmış mikrograf. Sol panelde yapının uzun kenarlarında yer alan parçacıklar gösterilmektedir. Sağ panel, kutunun kapağında veya tabanında bulunan bazı parçacıkları temsil etmektedir. (b) Yapının grafik modeli. (c) DNA kutusu çerçevesinin daha iyi algılanması için alanın keskinleştirildiği ve ortalamasının alındığı rastgele seçilmiş bir parçacığın görüntü işlenmiş gösterimi. Bu görüntü yapının yüksekliğini (3. boyut) göstermez ve çerçevenin yansıtılan alanları 2D TEM görüntüsünden parçacık çerçevesinin sinyal yoğunluğuna göre hesaplanır. (Zadegan vd., 2012).

3.2. DNA Origami Nanorobotlar

DNA origami nanorobotlar, belirli görevleri veya işlevleri yüksek hassasiyet ve kontrolle yerine getirebilen programlanabilir nano ölçekli cihazlardır. Bu nanorobotlar tipik olarak pH değişiklikleri, sıcaklık değişimleri veya belirli moleküler sinyaller gibi harici uyaranlara yanıt verecek ve önceden tanımlanmış görevleri otonom olarak veya harici rehberlik altında yürütecek şekilde tasarlanmıştır (Siti vd., 2023). DNA origami nanorobotlara örnek olarak moleküler yürüteçler, kargo dağıtım sistemleri, mantık kapıları ve mekanik hareketler yapabilen veya nano ölçekte hesaplama görevlerini yerine getirebilen moleküler makineler verilebilir (Liu vd., 2021; Pitikultham vd., 2021; Büber vd., 2023).

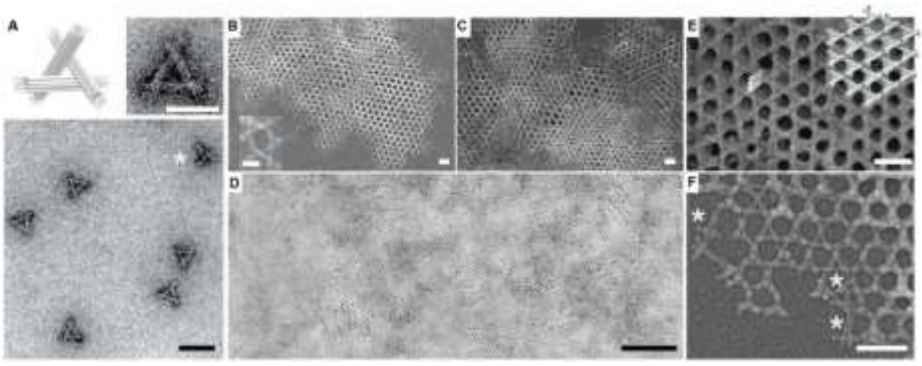
3.3. Fonksiyonelleştirilmiş DNA Origami Yapıları

DNA origami yapılarının işlevselleştirilmesi, DNA nanoyapıları üzerindeki belirli bölgelere nanopartiküller, proteinler, enzimler veya küçük moleküller gibi ek bileşenlerin eklenmesini içermektedir (Oktay vd., 2023). Bu işlevsel bileşenler, DNA origami düzeneklerine katalitik aktivite, optik özellikler veya hedeflenen bağlanma yetenekleri gibi yeni işlevler kazandırmaktadır (Hellmeier vd., 2021). İşlevselleştirilmiş DNA origami yapıları, biyoalgılama, ilaç dağıtımı, moleküler görüntüleme ve sinerjik özelliklere sahip hibrit malzemelerin nano ölçekte montajı gibi çeşitli uygulamalara sahiptir (Chen vd., 2021; Dai vd., 2021; Zhao vd., 2021).

3.4. DNA Origami Dizileri ve Kafesleri

DNA origami dizileri ve kafesleri, birden fazla DNA origami yapısının kontrollü aralık ve yönelimle düzenli desenler veya ağlar halinde organize edilmiş düzenlemeleridir (Julin vd., 2022). Bu diziler nanoparçacıklar, kuantum noktaları veya biyomoleküller gibi diğer nanomalzemelerin yüksek hassasiyet ve yoğunlukta düzenlenmesi ve konumlandırılması için nano ölçekli şablonların oluşturulmasını sağlamaktadır. DNA origami dizileri ve kafesleri

nanoelektronik, plazmonik, fotonik kristaller ve cihaz üretimi ve fonksiyonel malzeme sentezi için nano ölçekli desenleme uygulamalarına sahiptir. Zhang ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptıkları çalışmada sentezledikleri DNA origami kafeslerine ait görüntü Şekil 2'de gösterilmektedir.



Şekil 2: DNA origami kafesleri. A) Saflaştırıldıktan sonra ve kafes büyümesini başlatacak polimerizasyon oligonükleotidlerinin eklenmesinden önce saflaştırılmış üçgen DNA origami yapılarının TEM görüntüleri. Yıldız işareti kusurlu bir monomere işaret etmektedir. B-F) DNA origami kafeslerinin SEM görüntüleri. Panel (B)'deki iç kısım sol el üst-alt tasarımını örneklemektedir. Panel (C), düzeneklerin 3D'sini ortaya koymaktadır ve polikristaliteleri panel (D)'de gösterilen geniş alan görünümünde belirginleşmektedir. Kurutma sırasında kafesler görüntüleme alt tabakalarında çökse de, çoklu katmanlar ve orijinal geometri büyütülmüş bir görünümde çıkarılabilir (beyaz oklar, panel (E)). F) Büyüme süreci sırasında kafesten atılan ve ancak daha sonra düşük sıcaklıklarda çevreye bağlanabilen kusurlu monomerleri gösteren yıldız işaretli bir kafesin sınırını gösteren SEM görüntüsü. (A-F)'deki ölçek çubukları: 100 nm, (D): 1 μm, (A) ve (B)'deki insetler: 50 nm. (Zhang vd., 2018).

4. DNA ORİGAMİ YAPILARININ İŞLEVSELLEŞTİRİLMESİ VE MODİFİKASYONU

DNA origami yapılarının işlevselleştirilmesi, nanopartiküller, proteinler, enzimler veya küçük moleküller gibi ek bileşenlerin DNA nanoyapıları üzerindeki belirli bölgelere bağlanmasını içermektedir. Bu işlevsel bileşenler, DNA origami düzeneklerine yeni özellikler ve işlevler kazandırarak

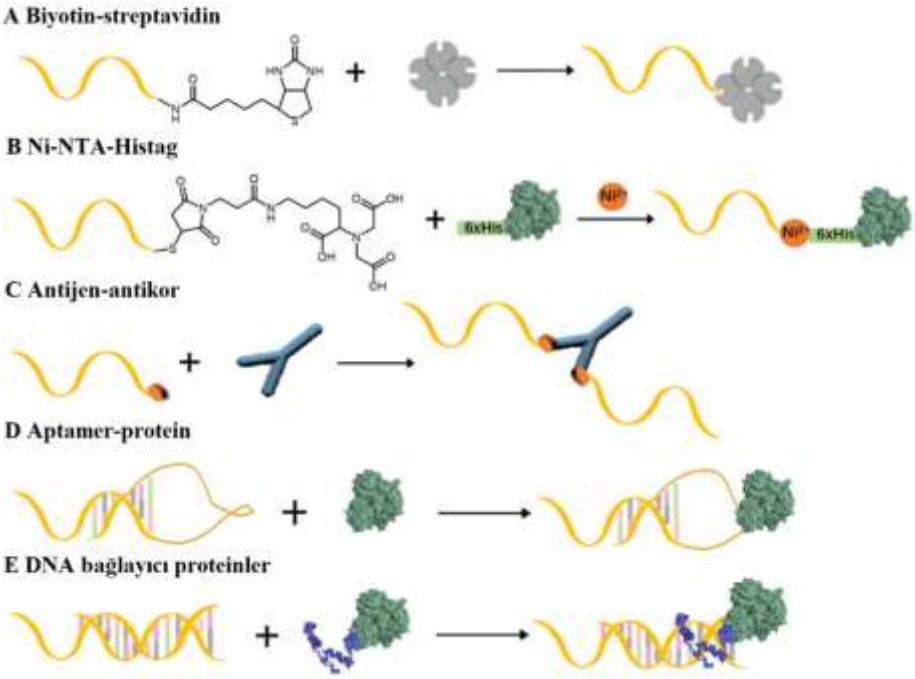
nanoteknoloji, biyotıp ve malzeme biliminde geniş bir uygulama yelpazesi sağlamaktadır.

4.1. Nanopartikül ile Fonksiyonelleştirme

Altın nanoparçacıklar, kuantum noktaları veya manyetik nanoparçacıklar gibi nanoparçacıklar, belirli bağlayıcı moleküller veya DNA hibridizasyon teknikleri aracılığıyla DNA origami yapılarına konjuge edilebilir (Tapio vd., 2021). Nanopartiküllerin boyutu, şekli ve yüzey kimyası, DNA origami iskelesini tamamlamak ve özelliklerini geliştirmek için hassas bir şekilde uyarlanabilir. İşlevselleştirilmiş DNA origami-nanopartikül hibritleri benzersiz optik, manyetik veya katalitik özellikler sergileyerek onları plazmonik, fotonik, biyoalgılama ve hibrit malzemelerin nano ölçekli montajındaki uygulamalar için değerli yapı taşları haline getirir (Xin vd., 2020; Ji vd., 2022; Kogikoski vd., 2023).

4.2. Protein ve Enzim Konjugasyonu

Proteinler ve enzimler, genetik füzyon, kimyasal çapraz bağlama veya spesifik bağlanma etkileşimleri gibi çeşitli konjugasyon yöntemleriyle DNA origami yapıları üzerine bölgeye özgü olarak immobilize edilebilmektedir (Hellmeier vd., 2021). Kovalent olmayan protein-DNA konjugasyonu için farklı strateji örnekleri Şekil 3'te gösterilmektedir. İşlevselleştirilmiş DNA origami-protein hibridleri, bağlı biyomoleküllerin biyolojik aktivitesini ve özgüllüğünü koruyarak biyokataliz, biyoalgılama ve hedefli ilaç dağıtımında çeşitli uygulamalara olanak tanımaktadır (Kong vd., 2020). Enzim işlevli DNA origami yapıları, kimyasal reaksiyonları yüksek verimlilik ve seçicilikle katalize etmek için programlanabilir nanoreaktörler olarak kullanılmakta ve enzimatik sentez, ilaç metabolizması çalışmaları ve biyoremediasyon için yeni fırsatlar sunmaktadır (Timm ve Niemeyer, 2015; Grossi vd., 2017).

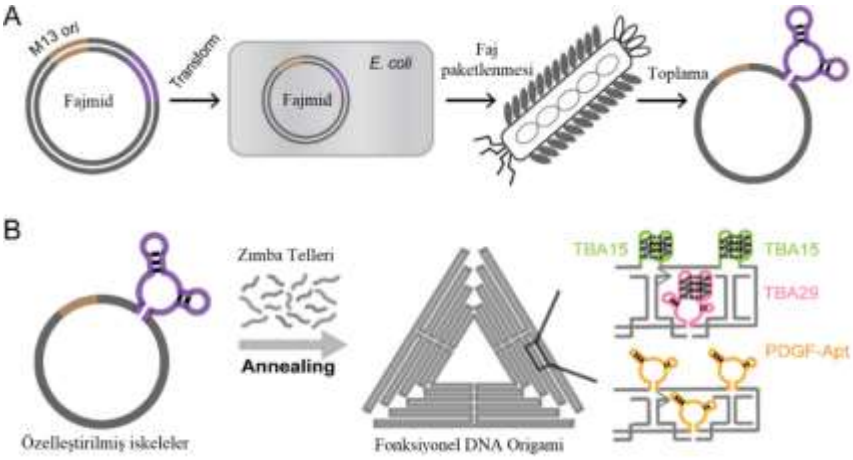


Şekil 3: Kovalent olmayan protein-DNA konjugasyonu için çeşitli stratejiler. (A) Biyotin-streptavidin bağlanması. (B) Ni-NTA-Histag bağlanması. (C) Antijen-antikor bağlanması. (D) Aptamer-hedef protein bağlanması. (E) Çinko parmak proteini gibi DNA bağlayıcı proteinler. (Kong vd., 2020).

4.3. DNA Aptamer ile Fonksiyonelleştirme

DNA aptamerleri, belirli hedef moleküllere yüksek afinite ve seçicilikle bağlanabilen kısa, tek sarmallı DNA molekülleridir (Zhang vd., 2019). Araştırmacılar, DNA aptamerlerini DNA origami yapılarına dahil ederek, proteinler, küçük moleküller ve hatta tüm hücreler gibi hedef analitlerin seçici olarak bağlanması ve tespit edilmesi için moleküler tanıma platformları oluşturabilmektedirler (Chen vd., 2021). Aptamer fonksiyonlu DNA origami sensörleri, biyoalgılama, tıbbi teşhis ve çevresel izleme uygulamaları için geliştirilmiştir ve hızlı algılama, düşük algılama limitleri ve çoklanmış analiz yetenekleri gibi avantajlar sunmaktadır. Aptamer ile fonksiyonelleştirilmiş

sentetik iskelelerin hazırlanması ve fonksiyonel DNA origami yapılarının montajı Şekil 4'te gösterilmektedir.



Şekil 4: Aptamer ile fonksiyonelleştirilmiş sentetik iskelelerin hazırlanması ve fonksiyonel DNA origami yapılarının montajının şematik gösterimi. (A) Aptamer dizileri içeren özel tasarlanmış ssDNA parçaları M13mp18 RF DNA vektörüne eklenir. Rekombinant fajmid daha sonra *E. coli* hücrelerine transforme edilir ve çok sayıda in vivo paketlenmiş faj partikülü elde edilir. İlgili ssDNA, bu fajların toplanması ve saflaştırılmasıyla elde edilir. (B) İşlevsel DNA origami nano yapılarının montajı için iskele olarak sekansa göre özelleştirilmiş ssDNA kullanılır. (Chen vd., 2021).

4.4. Küçük Molekül Entegrasyonu

Floresan boyalar, ilaçlar veya terapötik ajanlar gibi küçük moleküller DNA origami yapıları içinde kapsüllenebilir veya DNA iskelesi üzerindeki belirli bölgelere kimyasal olarak konjuge edilebilir. Fonksiyonelleştirilmiş DNA origami-küçük molekül hibridleri hedefli ilaç dağıtımı, kontrollü salım ve görüntüleme uygulamaları için kullanılabilir (Chen vd., 2016; Manuguri vd., 2022). Araştırmacılar, küçük molekülleri DNA origami nano yapılarının iç boşluklarında kapsülleyerek onları bozulmaya karşı koruyabilir, salım kinetiklerini kontrol edebilir ve biyolojik ortamlarda stabilitelerini ve biyoyararlanımlarını artırabilirler (Hartl vd., 2018; Cervantes-Salguero vd., 2022).

4.5. Tamamlayıcı DNA İplikleri ile Hibridizasyon

DNA origami yapıları, belirli fonksiyonel gruplar veya tanıma motifleri taşıyan tamamlayıcı DNA iplikleri ile hibridizasyon yoluyla daha da işlevselleştirilebilir. Araştırmacılar, istenen işlevlere sahip tamamlayıcı DNA iplikleri tasarlayarak, DNA origami düzeneklerinin yüzey özelliklerini seçici olarak değiştirebilir ve belirli uygulamalar için özel yapım nanoyapılar tasarlayabilirler (Buchberger vd., 2019). Hibridizasyon tabanlı işlevselleştirme, fonksiyonel grupların bağlanması ve ayrılması üzerinde dinamik kontrol sağlayarak DNA origami yapılarının tersine çevrilebilir modifikasyonuna ve ayarlanabilir özelliklere sahip uyarıcıya duyarlı malzemelerin oluşturulmasına olanak tanır (Schickinger vd., 2018; Zheng vd., 2021).

5. DNA ORİGAMİ UYGULAMA ALANLARI

5.1. Nanoelektronik ve Nanofotonik

DNA origami, yeni nesil elektronik ve fotonikler için nano ölçekli cihazların ve devrelerin üretilmesine yönelik kapsamlı bir yaklaşım sunmaktadır. Araştırmacılar, DNA origami tabanlı nanotellerin, nanotransistörlerin ve nanofotonik cihazların elektrik ve optik özellikler üzerinde hassas kontrol ile bir araya getirildiğini göstermiştir (Kuzyk vd., 2018). Uygulamalar arasında DNA tabanlı sensörler, DNA kodlu elektronik devreler ve fotonik cihazlar ve kuantum hesaplama için yarı iletken nanoparçacıkların DNA kılavuzluğunda montajı yer almaktadır (Shen vd., 2018; Dai vd., 2021; Gev d., 2022).

5.2. İlaç Salınımı ve Terapötikler

İşlevselleştirilmiş DNA origami yapıları, hedefli ilaç dağıtımı ve kontrollü salım için programlanabilir nanotaşıyıcılar olarak hizmet edebilir. Araştırmacılar, ilaçlar, siRNA veya proteinler gibi terapötik ajanları DNA origami platformlarına konjuge ederek ilaç stabilitesini artırabilir, biyoyararlanımı iyileştirebilir ve hastalıklı dokulara veya hücrelere seçici

hedefleme sağlayabilir (Ge vd., 2020). DNA origami tabanlı ilaç dağıtım sistemleri kanser terapisi, gen terapisi ve hassas tıp alanlarında potansiyel uygulamalara sahiptir ve hedef dışı etkilerin azaltılması, terapötik etkinliğin artırılması ve ayarlanabilir farmakokinetik gibi avantajlar sunar (Wang vd., 2018; Pan vd., 2019; Pal ve Rakshit, 2021).

5.3. Biyoalgılama ve Tanı

DNA origami nanoyapıları, proteinler, nükleik asitler ve küçük moleküller de dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik analitlerin tespit edilmesine yönelik son derece hassas ve seçici biyosensörler geliştirmek için ideal iskelelerdir (Daems vd., 2018). Araştırmacılar DNA origami platformlarına aptamerler, antikorlar veya DNA probları ekleyerek spesifik hedef tespiti için moleküler tanıma elemanları oluşturabilirler (Wang vd., 2020). DNA origami tabanlı biyosensörler hızlı tespit, yüksek hassasiyet ve çoklu analiz yetenekleri gibi avantajlar sunarak onları tıp ve veterinerlikte kanser ve enfeksiyon hastalıkları gibi çeşitli hastalıkların tanı testleri için değerli araçlar haline getirmektedir (Liu vd., 2018; Wang vd., 2018; Yang vd., 2018; Domljanovic vd., 2022).

6. KARŞILAŞILAN ZORLUKLAR VE GELECEĞE YÖNELİK ÖNERİLER

DNA origami araştırmalarında kaydedilen kayda değer ilerlemeye rağmen, tam potansiyelini ortaya çıkarmak ve çeşitli alanlarda daha geniş çapta benimsenmesini sağlamak için ele alınması gereken çeşitli zorluklar bulunmaktadır. Ayrıca, teknolojide ve disiplinler arası iş birliklerinde devam eden ilerlemeler, DNA origamisinde gelecekteki araştırma ve yenilikler için heyecan verici fırsatlar sunmaktadır. Bu alanda karşılaşılan bazı zorluklar aşağıda tartışılmıştır.

6.1. Ölçeklenebilirlik ve Verim

DNA origaminin karşılaştığı en büyük zorluklardan biri, üretim yöntemlerinin ölçeklenebilirliği ve verimidir. Mevcut teknikler DNA origami yapılarının küçük partiler halinde yüksek hassasiyetle üretilmesine olanak tanırken, üretimin endüstriyel seviyelere yükseltilmesi önemli bir engel olmaya devam etmektedir. Pratik uygulamalar için DNA origami nanoyapılarının büyük ölçekli üretimini sağlayan ölçeklenebilir ve uygun maliyetli üretim yöntemleri geliştirmek için gelecekteki araştırma çabalarına ihtiyaç vardır (Halley vd., 2019; Bush vd., 2020).

6.2. Yapısal Kararlılık ve Fonksiyonelleştirme Verimliliği

DNA origami yapılarının yapısal kararlılığını ve işlevselleştirme verimliliğini sağlamak, gerçek dünya uygulamalarındaki performansları ve güvenilirlikleri için çok önemlidir. DNA origami düzeneklerinin kararlılığını, tekdüzeliğini ve tekrarlanabilirliğini artırmak için iskele bütünlüğü, zımba bağlama özgüllüğü ve yüzey işlevselleştirme verimliliği gibi zorlukların ele alınması gerekir. Gelecekteki araştırma çabaları, DNA origami yapılarının sağlamlığını ve işlevselliğini geliştirmek için tasarım ilkelerini, montaj protokollerini ve yüzey modifikasyon stratejilerini optimize etmeye odaklanmalıdır (Ramakrishnan vd., 2018; Ramakrishnan vd., 2019; Oktay vd., 2023).

6.3. Biyouyumluluk ve İn Vivo Uygulamalar

DNA origami uygulamasının in vivo ortamlara genişletilmesi, biyouyumluluk, stabilite ve immünojenisite ile ilgili benzersiz zorluklar ortaya çıkarmaktadır. DNA origami, ilaç dağıtımı, görüntüleme ve terapötikler dahil olmak üzere çeşitli biyomedikal uygulamalar için umut vaat ederken, sitotoksisite, temizleme mekanizmaları ve bağışıklık tepkileri gibi endişeleri gidermek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Gelecekteki çalışmalar, güvenli ve etkili in vivo uygulamalar için DNA origami yapılarının

biyouyumluluğunu ve stabilitesini artırmaya yönelik stratejileri keşfetmelidir (Bila vd., 2019; Palazzolo vd., 2019; Pitikultham vd., 2021).

6.4. Dinamik ve Duyarlı Sistemler

Çevresel uyaranları algılayabilen ve bunlara yanıt verebilen dinamik ve duyarlı DNA origami sistemlerinin geliştirilmesi, gelecekteki araştırmalar için heyecan verici bir alandır. Araştırmacılar, pH'a duyarlı anahtarlar, ışığa duyarlı tetikleyiciler veya enzimatik aktüatörler gibi duyarlı unsurları DNA origami platformlarına entegre ederek, ayarlanabilir özelliklere ve işlevlere sahip akıllı nanomalzemeler oluşturabilirler. Gelecekteki çalışmalar, programlanabilir davranışlara ve tepkilere sahip dinamik ve uyarlanabilir DNA origami yapılarının mühendisliği için yeni tasarım ilkelerini ve montaj stratejilerini keşfetmeye odaklanmalıdır (Ijäs vd., 2018; Goetzfried vd., 2019; Wang vd., 2021).

6.5. Disiplinlerarası İş Birlikleri ve Uygulamalar

Moleküler biyoloji, nanoteknoloji, malzeme bilimi ve mühendislik gibi farklı disiplinlerden gelen araştırmacılar arasındaki iş birlikleri, DNA origami alanını ilerletmek ve yeni uygulamaların kilidini açmak için çok önemlidir. Disiplinler arası yaklaşımlar, tamamlayıcı uzmanlıkların, bakış açılarının ve tekniklerin entegrasyonunu sağlayarak inovasyonu teşvik eder ve DNA origami araştırmalarında çığır açar. Geleceğin yönelimleri, karmaşık zorlukların üstesinden gelmek ve DNA origami tabanlı teknolojilerde ortaya çıkan fırsatları ele almak için disiplinler arası iş birliklerine ve ortaklıklara öncelik vermelidir (Kong vd., 2020; Ma vd., 2021; Zhan vd., 2023).

6.6. Etik ve Toplumsal Çıkarımlar

DNA origami teknolojisi gelişmeye ve genişlemeye devam ettikçe, uygulamalarının etik, yasal ve toplumsal sonuçlarını göz önünde bulundurmak çok önemlidir. Gizlilik, güvenlik ve DNA origami tabanlı teknolojilerin

potansiyel kötüye kullanımı gibi konular, dikkatli bir değerlendirme ve etik gözetim gerektirmektedir. Gelecekteki araştırmalar, DNA origami teknolojilerinin toplumsal değerler ile uyumlu bir şekilde sorumlu bir şekilde geliştirilmesini ve uygulanmasını sağlamak için politika yapıcılar, etik uzmanları ve halk dahil olmak üzere farklı paydaşları içermelidir (Bursten vd., 2016; Ranallo vd., 2018; Coleridge ve Dunn, 2020).

Özetle, DNA origami araştırmalarındaki zorlukların ele alınması ve fırsatların benimsenmesi, bilim camiasının, endüstri ortaklarının ve politika yapıcıların ortak bir çaba göstermesini gerektirmektedir. Teknik engellerin üstesinden gelerek, disiplinler arası iş birliklerini teşvik ederek ve etik söylemde bulunarak, acil toplumsal ihtiyaçları ele almak, yeniliği teşvik etmek ve bilim ve teknolojinin geleceğini şekillendirmek için DNA origamisinin tüm potansiyelini kullanabiliriz.

7. TARTIŞMA

DNA origami, moleküler biyoloji, nanoteknoloji ve malzeme biliminin kesiştiği noktada dönüştürücü bir teknoloji olarak ortaya çıkmıştır ve olağanüstü hassasiyet ve karmaşıklığa sahip nano ölçekli yapıların mühendisliği için benzeri görülmemiş fırsatlar sunmaktadır. DNA origami, DNA'yı basit şekillere katlamak için bir yöntem olarak mütevazı başlangıcından itibaren, çeşitli şekil, boyut ve işlevlere sahip özel yapım nano yapılar oluşturmak için güçlü bir platforma dönüşmüştür.

Bu bölüm boyunca DNA origamisinin temel ilkeleri, tasarım yöntemleri, karakterizasyon teknikleri ve uygulamaları incelenerek bilimsel araştırma, teknolojik yenilik ve toplumsal etki için çok yönlü bir araç olarak önemi vurgulanmıştır. Nanoelektronik ve biyotıptan malzeme bilimine ve ötesine kadar, DNA origami bilim, teknoloji ve toplum için dönüştürücü etkileri olan geniş bir uygulama yelpazesi için umut vaat etmektedir.

Geleceğe baktığımızda, DNA origami araştırmaları alanında önümüzde çeşitli zorluklar ve fırsatlar bulunmaktadır. Ölçeklenebilirlik, kararlılık ve

biyouyumluluk sorunlarını ele almak, işlevselleştirme verimliliğini artırmak ve dinamik ve duyarlı sistemleri keşfetmek, araştırmacıların pratik uygulamalar için DNA origamisinin tam potansiyelini ortaya çıkarmak için üstesinden gelmesi gereken temel zorluklar arasındadır. Ayrıca, disiplinler arası iş birlikleri, etik hususlar ve toplumsal katılım, DNA origami tabanlı teknolojilerin sorumlu bir şekilde geliştirilmesi ve uygulanmasının şekillendirilmesinde çok önemli roller oynayacaktır.

Bu zorluklara rağmen, DNA origaminin geleceği umut ve potansiyel ile doludur. DNA origami sadece bilimsel bir atılımı değil, aynı zamanda insan yaratıcılığı ve becerisinin de bir kanıtıdır. Bilimsel bilginin sınırlarını zorlayarak, inovasyonu teşvik ederek ve işbirlikçi yaklaşımları benimseyerek, acil toplumsal ihtiyaçları ele almak, teknolojik gelişmeleri yönlendirmek ve nano ölçekli mühendisliğin yaşama, çalışma ve dünyayla etkileşim biçimimizi dönüştürdüğü bir geleceğin önünü açmak için DNA origamisinin benzersiz yeteneklerinden yararlanılabilir.

KAYNAKÇA

- Babatunde, B., Cagan, J., & Taylor, R. E. (2024). An Improved Shape Annealing Algorithm for the Generation of Coated Deoxyribonucleic Acid Origami Nanostructures. *Journal of Mechanical Design*, *146*(5).
- Bila, H., Kurisinkal, E. E., & Bastings, M. M. (2019). Engineering a stable future for DNA-origami as a biomaterial. *Biomaterials science*, *7*(2), 532-541.
- Buchberger, A., Simmons, C., Fahmi, N., Freeman, R., & Stephanopoulos, N. (2019). Hierarchical assembly of DNA origami nanostructures using coiled-coil peptides. *ChemRxiv*
- Bui, H., Shah, S., Mokhtar, R., Song, T., Garg, S., & Reif, J. (2018). Localized DNA hybridization chain reactions on DNA origami. *ACS nano*, *12*(2), 1146-1155.
- Bursten, J. R., Roco, M. C., Yang, W., Zhao, Y., Chen, C., Savolainen, K., ... & Schummer, J. (2016). Nano on reflection. *Nature nanotechnology*, *11*(10), 828-834.
- Bush, J., Singh, S., Vargas, M., Oktay, E., Hu, C. H., & Veneziano, R. (2020). Synthesis of DNA origami scaffolds: current and emerging strategies. *Molecules*, *25*(15), 3386.
- Buber, E., Yaadav, R., Schroeder, T., Franquelim, H. G., & Tinnefeld, P. (2023). DNA Origami Vesicle Sensors with Triggered Cargo Transfer. *bioRxiv*, 2023-11.
- Cao, H. H., Abel Jr, G. R., Gu, Q., Gueorguieva, G. A. V., Zhang, Y., Nanney, W. A., ... & Ye, T. (2020). Seeding the self-assembly of DNA origamis at surfaces. *ACS nano*, *14*(5), 5203-5212.
- Cervantes-Salguero, K., Biaggne, A., Youngsman, J. M., Ward, B. M., Kim, Y. C., Li, L., ... & Kuang, W. (2022). Strategies for controlling the spatial orientation of single molecules tethered on DNA origami templates

physisorbed on glass substrates: Intercalation and stretching. *International journal of molecular sciences*, *23*(14), 7690.

- Chen, C., Nie, J., Ma, M., & Shi, X. (2023). DNA origami nanostructure detection and yield estimation using deep learning. *ACS Synthetic Biology*, *12*(2), 524-532.
- Chen, C., Xu, J., Zhang, Y., Li, X., & Shi, X. (2020). Optical and Topological Characterization of Hexagonal DNA Origami Nanotags. *IEEE Transactions on NanoBioscience*, *20*(4), 516-520.
- Chen, H., Zhang, H., Pan, J., Cha, T. G., Li, S., Andréasson, J., & Choi, J. H. (2016). Dynamic and progressive control of DNA origami conformation by modulating DNA helicity with chemical adducts. *ACS nano*, *10*(5), 4989-4996.
- Chen, X., Jia, B., Lu, Z., Liao, L., Yu, H., & Li, Z. (2021). Aptamer-integrated scaffolds for biologically functional DNA origami structures. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *13*(33), 39711-39718.
- Coleridge, E. L., & Dunn, K. E. (2020). Assessing the cost-effectiveness of DNA origami nanostructures for targeted delivery of anti-cancer drugs to tumours. *Biomedical Physics & Engineering Express*, *6*(6), 065030.
- Cumberworth, A., Frenkel, D., & Reinhardt, A. (2022). Simulations of DNA-origami self-assembly reveal design-dependent nucleation barriers. *Nano Letters*, *22*(17), 6916-6922.
- Daems, D., Pfeifer, W., Rutten, I., Saccà, B., Spasic, D., & Lammertyn, J. (2018). Three-dimensional DNA origami as programmable anchoring points for bioreceptors in fiber optic surface plasmon resonance biosensing. *ACS applied materials & interfaces*, *10*(28), 23539-23547.
- Dai, L., Liu, P., Hu, X., Zhao, X., Shao, G., & Tian, Y. (2021). DNA origami: an outstanding platform for functions in nanophotonics and cancer therapy. *Analyst*, *146*(6), 1807-1819.

- Domljanovic, I., Loretan, M., Kempter, S., Acuna, G. P., Kocabey, S., & Ruegg, C. (2022). DNA origami book biosensor for multiplex detection of cancer-associated nucleic acids. *Nanoscale*, *14*(41), 15432-15441.
- Franken, L. E., Grünewald, K., Boekema, E. J., & Stuart, M. C. (2020). A technical introduction to transmission electron microscopy for soft-matter: Imaging, possibilities, choices, and technical developments. *Small*, *16*(14), 1906198.
- Gambietz, S., Stenke, L. J., & Saccà, B. (2023). Sequence-dependent folding of monolayered DNA origami domains. *Nanoscale*, *15*(31), 13120-13132.
- Ge, H., Yang, D., Li, Y., Wei, Y., Zhu, X., Wang, P., & Zhang, C. (2022). A Reconfigurable Nanophotonic Heterostructure Engineered by a DNA Origami Switch. *ChemPlusChem*, *87*(10), e202200229.
- Ge, Z., Guo, L., Wu, G., Li, J., Sun, Y., Hou, Y., ... & Li, Q. (2020). DNA origami-enabled engineering of ligand–drug conjugates for targeted drug delivery. *Small*, *16*(16), 1904857.
- Glaser, M., Deb, S., Seier, F., Agrawal, A., Liedl, T., Douglas, S., ... & Smith, D. M. (2021). The art of designing DNA nanostructures with CAD software. *Molecules*, *26*(8), 2287.
- Glatter, O. (2018). Dynamic Light Scattering (DLS). *Scattering Methods and their Application in Colloid and Interface Science*, 223-263.
- Goetzfried, M. A., Vogele, K., Mückl, A., Kaiser, M., Holland, N. B., Simmel, F. C., & Pirzer, T. (2019). Periodic operation of a dynamic dna origami structure utilizing the hydrophilic–hydrophobic phase-transition of stimulus-sensitive polypeptides. *Small*, *15*(45), 1903541.
- Green, C. M., Hughes, W. L., Graugnard, E., & Kuang, W. (2021). Correlative super-resolution and atomic force microscopy of DNA nanostructures and characterization of addressable site defects. *ACS nano*, *15*(7), 11597-11606.

- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Analysis of DNA by agarose gel electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2019*(1), pdb-top100388.
- Grossi, G., Jaekel, A., Andersen, E. S., & Saccà, B. (2017). Enzyme-functionalized DNA nanostructures as tools for organizing and controlling enzymatic reactions. *MRS Bulletin*, *42*(12), 920-924.
- Gür, F. N., Kempter, S., Schueder, F., Sikeler, C., Urban, M. J., Jungmann, R., ... & Liedl, T. (2021). Double-to Single-Strand Transition Induces Forces and Motion in DNA Origami Nanostructures. *Advanced Materials*, *33*(37), 2101986.
- Halley, P. D., Patton, R. A., Chowdhury, A., Byrd, J. C., & Castro, C. E. (2019). Low-cost, simple, and scalable self-assembly of DNA origami nanostructures. *Nano Research*, *12*, 1207-1215.
- Hartl, C., Frank, K., Amenitsch, H., Fischer, S., Liedl, T., & Nickel, B. (2018). Position accuracy of gold nanoparticles on DNA origami structures studied with small-angle X-ray scattering. *Nano letters*, *18*(4), 2609-2615.
- He, K., Li, Z., Liu, L., Zheng, M., & Mao, C. (2020). Assembly of a DNA origami Chinese Knot by only 15% of the staple strands. *ChemBioChem*, *21*(15), 2132-2136.
- Hellmeier, J., Platzer, R., Mühlgrabner, V., Schneider, M. C., Kurz, E., Schütz, G. J., ... & Sevcsik, E. (2021). Strategies for the site-specific decoration of DNA origami nanostructures with functionally intact proteins. *ACS nano*, *15*(9), 15057-15068.
- Ijäs, H., Nummelin, S., Shen, B., Kostiainen, M. A., & Linko, V. (2018). Dynamic DNA origami devices: From strand-displacement reactions to external-stimuli responsive systems. *International journal of molecular sciences*, *19*(7), 2114.

- Islam, M. S., Wilkens, G. D., Wolski, K., Zapotoczny, S., & Heddle, J. G. (2021). Chiral 3D DNA origami structures for ordered heterologous arrays. *Nanoscale Advances*, *3*(16), 4685-4691.
- Ji, M., Zhou, Z., Cao, W., Ma, N., Xu, W., & Tian, Y. (2022). A universal way to enrich the nanoparticle lattices with polychrome DNA origami "homologs". *Science Advances*, *8*(47), eadc9755.
- Julin, S., Keller, A., & Linko, V. (2022). Dynamics of DNA Origami Lattices. *Bioconjugate chemistry*, *34*(1), 18-29.
- Kabiri, Y., Ravelli, R. B., Lehnert, T., Qi, H., Katan, A. J., Roest, N., ... & Zandbergen, H. (2019). Visualization of unstained DNA nanostructures with advanced in-focus phase contrast TEM techniques. *Scientific reports*, *9*(1), 7218.
- Kogikoski, S., Ameixa, J., Mostafa, A., & Bald, I. (2023). Lab-on-a-DNA origami: nanoengineered single-molecule platforms. *Chemical Communications*, *59*(32), 4726-4741.
- Kong, G., Xiong, M., Liu, L., Hu, L., Meng, H. M., Ke, G., ... & Tan, W. (2020). DNA origami-based protein networks: from basic construction to emerging applications. *Chemical Society Reviews*, *50*(3), 1846-1873.
- Kuzuya, A., & Komiyama, M. (2010). DNA origami: Fold, stick, and beyond. *Nanoscale*, *2*(3), 309-321.
- Kuzuya, A., & Ohya, Y. (2014). Nanomechanical molecular devices made of DNA origami. *Accounts of chemical research*, *47*(6), 1742-1749.
- Kuzyk, A., Jungmann, R., Acuna, G. P., & Liu, N. (2018). DNA origami route for nanophotonics. *ACS photonics*, *5*(4), 1151-1163.
- Walter, A., Mannheim, J. G., & Caruana, C. J. (2021). Imaging Modalities for Biological and Preclinical Research: A Compendium, Volume 1: Part I: Ex Vivo Biological Imaging. IOP Publishing.

- Lim, T. S., & Montague-Cardoso, K. (2021). A DNA origami-based nanoscale molecular transport railway. *Communications Biology*, *4*(1), 1075.
- Liu, F., Liu, X., Shi, Q., Maffeo, C., Kojima, M., Dong, L., ... & Arai, T. (2021). A tetrahedral DNA nanorobot with conformational change in response to molecular trigger. *Nanoscale*, *13*(37), 15552-15559.
- Liu, K., Pan, D., Wen, Y., Zhang, H., Chao, J., Wang, L., ... & Shi, Y. (2018). Identifying the genotypes of hepatitis B virus (HBV) with DNA origami label. *Small*, *14*(6), 1701718.
- Ma, N., Dai, L., Chen, Z., Ji, M., Wang, Y., & Tian, Y. (2021). Environment-resistant DNA origami crystals bridged by rigid DNA rods with adjustable unit cells. *Nano Letters*, *21*(8), 3581-3587.
- Manuguri, S., Nguyen, M. K., Loo, J., Natarajan, A. K., & Kuzyk, A. (2022). Advancing the utility of DNA origami technique through enhanced stability of DNA-origami-based assemblies. *Bioconjugate chemistry*, *34*(1), 6-17.
- Natarajan, A. K., Ryssy, J., & Kuzyk, A. (2023). A DNA origami-based device for investigating DNA bending proteins by transmission electron microscopy. *Nanoscale*, *15*(7), 3212-3218.
- Oktay, E., Bush, J., Vargas, M., Scarton, D. V., O'Shea, B., Hartman, A., ... & Veneziano, R. (2023). Customized scaffolds for direct assembly of functionalized DNA origami. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *15*(23), 27759-27773.
- Pal, S., & Rakshit, T. (2021). Folate-functionalized DNA origami for targeted delivery of doxorubicin to triple-negative breast cancer. *Frontiers in Chemistry*, *9*, 721105.
- Palazzolo, S., Hadla, M., Russo Spena, C., Caligiuri, I., Rotondo, R., Adeel, M., ... & Rizzolio, F. (2019). An effective multi-stage liposomal DNA origami nanosystem for in vivo cancer therapy. *Cancers*, *11*(12), 1997.

- Pan, Q., Nie, C., Hu, Y., Yi, J., Liu, C., Zhang, J., ... & Chu, X. (2019). Aptamer-functionalized DNA origami for targeted codelivery of antisense oligonucleotides and doxorubicin to enhance therapy in drug-resistant cancer cells. *ACS applied materials & interfaces*, *12*(1), 400-409.
- Parikka, J. M., Järvinen, H., Sokołowska, K., Ruokolainen, V., Markešević, N., Natarajan, A. K., ... & Toppari, J. J. (2023). Creation of ordered 3D tubes out of DNA origami lattices. *Nanoscale*, *15*(17), 7772-7780.
- Pitikultham, P., Wang, Z., Wang, Y., Shang, Y., Jiang, Q., & Ding, B. (2021). Stimuli-responsive DNA origami nanodevices and their biological applications. *ChemMedChem*, *17*(1), e202100635.
- Ramakrishnan, S., Ijäs, H., Linko, V., & Keller, A. (2018). Structural stability of DNA origami nanostructures under application-specific conditions. *Computational and structural biotechnology journal*, *16*, 342-349.
- Ramakrishnan, S., Schärfen, L., Hunold, K., Fricke, S., Grundmeier, G., Schlierf, M., ... & Krainer, G. (2019). Enhancing the stability of DNA origami nanostructures: staple strand redesign versus enzymatic ligation. *Nanoscale*, *11*(35), 16270-16276.
- Ranallo, S., Porchetta, A., & Ricci, F. (2018). DNA-based scaffolds for sensing applications. *Analytical chemistry*, *91*(1), 44-59.
- Rosenhek-Goldian, I., & Cohen, S. R. (2023). Some considerations in nanoindentation measurement and analysis by atomic force microscopy. *Journal of Vacuum Science & Technology A*, *41*(6).
- Scheckenbach, M., Bauer, J., Zähringer, J., Selbach, F., & Tinnefeld, P. (2020). DNA origami nanorulers and emerging reference structures. *APL Materials*, *8*(11).
- Schickinger, M., Zacharias, M., & Dietz, H. (2018). Tethered multifluorophore motion reveals equilibrium transition kinetics of single

DNA double helices. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(32), E7512-E7521.

- Sheheade, B., Liber, M., Popov, M., Berger, Y., Khara, D. C., Jopp, J., & Nir, E. (2019). Self-Assembly of DNA Origami Heterodimers in High Yields and Analysis of the Involved Mechanisms. *Small*, *15*(51), 1902979.
- Shen, B., Kostiainen, M. A., & Linko, V. (2018). DNA origami nanophotonics and plasmonics at interfaces. *Langmuir*, *34*(49), 14911-14920.
- Siti, W., Too, H. L., Anderson, T., Liu, X. R., Loh, I. Y., & Wang, Z. (2023). Autonomous DNA molecular motor tailor-designed to navigate DNA origami surface for fast complex motion and advanced nanorobotics. *Science Advances*, *9*(38), eadi8444.
- Sun, C., Lux, S., Müller, E., Meffert, M., & Gerthsen, D. (2020). Versatile application of a modern scanning electron microscope for materials characterization. *Journal of Materials Science*, *55*, 13824-13835.
- Tapio, K., Mostafa, A., Kanehira, Y., Suma, A., Dutta, A., & Bald, I. (2021). A versatile DNA origami-based plasmonic nanoantenna for label-free single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy. *ACS nano*, *15*(4), 7065-7077.
- Timm, C., & Niemeyer, C. M. (2015). Assembly and purification of enzyme-functionalized DNA origami structures. *Angewandte Chemie International Edition*, *54*(23), 6745-6750.
- Trofymchuk, K., Kołątaj, K., Glembockyte, V., Zhu, F., Acuna, G. P., Liedl, T., & Tinnefeld, P. (2023). Gold nanorod DNA origami antennas for 3 orders of magnitude fluorescence enhancement in NIR. *ACS nano*, *17*(2), 1327-1334.
- Wang, D., Yu, L., Huang, C. M., Arya, G., Chang, S., & Ke, Y. (2021). Programmable transformations of DNA origami made of small modular

dynamic units. *Journal of the American Chemical Society*, *143*(5), 2256-2263.

- Wang, J., Wei, Y., Zhang, P., Wang, Y., Xia, Q., Liu, X., ... & Li, J. (2022). Probing Heterogeneous Folding Pathways of DNA Origami Self-Assembly at the Molecular Level with Atomic Force Microscopy. *Nano Letters*, *22*(17), 7173-7179.
- Wang, P., Rahman, M. A., Zhao, Z., Weiss, K., Zhang, C., Chen, Z., ... & Ke, Y. (2018). Visualization of the cellular uptake and trafficking of DNA origami nanostructures in cancer cells. *Journal of the American Chemical Society*, *140*(7), 2478-2484.
- Wang, S., Zhou, Z., Ma, N., Yang, S., Li, K., Teng, C., ... & Tian, Y. (2020). DNA origami-enabled biosensors. *Sensors*, *20*(23), 6899.
- Wang, Y., Dai, L., Ding, Z., Ji, M., Liu, J., Xing, H., ... & Tian, Y. (2021). DNA origami single crystals with Wulff shapes. *Nature Communications*, *12*(1), 3011.
- Williams, N. D., Landajuela, A., Kasula, R. K., Zhou, W., Powell, J. T., Xi, Z., ... & Lin, C. (2020). DNA-origami-based fluorescence brightness standards for convenient and fast protein counting in live cells. *Nano letters*, *20*(12), 8890-8896.
- Wu, X., Yang, C., Wang, H., Lu, X., Shang, Y., Liu, Q., ... & Ding, B. (2023). Genetically encoded DNA origami for gene therapy in vivo. *Journal of the American Chemical Society*, *145*(16), 9343-9353.
- Xin, X., Wang, L., Wang, K., Dai, L., Cao, H., Li, Z., & Tian, Y. (2020). Stepwise assembly of nanoclusters guided by DNA origami frames with high-throughput. *Chemical communications*, *56*(36), 4918-4921.
- Yang, Z., Xu, G., Reboud, J., Ali, S. A., Kaur, G., McGiven, J., ... & Cooper, J. M. (2018). Rapid veterinary diagnosis of bovine reproductive infectious diseases from semen using paper-origami DNA microfluidics. *ACS sensors*, *3*(2), 403-409.

- Yao, G., Zhang, F., Wang, F., Peng, T., Liu, H., Poppleton, E., ... & Yan, H. (2020). Meta-DNA structures. *Nature chemistry*, *12*(11), 1067-1075.
- Yardimci, S., Burnham, D. R., Terry, S. Y., & Yardimci, H. (2020). Three-dimensional super-resolution fluorescence imaging of DNA. *Scientific Reports*, *10*(1), 12504.
- Yuan, W., Dong, G. Z., Ning, H., Guan, X. X., Cheng, J. F., Shi, Z. W., ... & Dong, Y. C. (2024). Applying dynamic light scattering to investigate the self-assembly process of DNA nanostructures. *Chinese Chemical Letters*, *35*(3), 108384.
- Zadegan, R. M., Jepsen, M. D., Thomsen, K. E., Okholm, A. H., Schaffert, D. H., Andersen, E. S., ... & Kjems, J. (2012). Construction of a 4 zeptoliters switchable 3D DNA box origami. *ACS nano*, *6*(11), 10050-10053.
- Zhan, P., Peil, A., Jiang, Q., Wang, D., Mousavi, S., Xiong, Q., ... & Liu, N. (2023). Recent advances in DNA origami-engineered nanomaterials and applications. *Chemical Reviews*, *123*(7), 3976-4050.
- Zhang, T., Hartl, C., Frank, K., Heuer-Jungemann, A., Fischer, S., Nickels, P. C., ... & Liedl, T. (2018). 3D DNA origami crystals. *Advanced Materials*, *30*(28), 1800273.
- Zhang, Y., Lai, B. S., & Juhas, M. (2019). Recent advances in aptamer discovery and applications. *Molecules*, *24*(5), 941.
- Zhao, Y., Zhang, C., Yang, L., Xu, X., Xu, R., Ma, Q., ... & Han, D. (2021). Programmable and site-specific patterning on DNA origami templates with heterogeneous condensation of silver and silica. *Small*, *17*(47), 2103877.
- Zheng, M., Li, Z., Liu, L., Li, M., Paluzzi, V. E., Hyun Choi, J., & Mao, C. (2021). Kinetic DNA self-assembly: Simultaneously Co-folding complementary DNA strands into identical nanostructures. *Journal of the American Chemical Society*, *143*(48), 20363-20367.

- Zhou, L., Chandrasekaran, A. R., Yan, M., Valsangkar, V. A., Feldblyum, J. I., Sheng, J., & Halvorsen, K. (2021). A mini DNA–RNA hybrid origami nanobrick. *Nanoscale Advances*, *3*(14), 4048-4051.
- Zhou, Y., Dong, J., & Wang, Q. (2023). Fabricating higher-order functional DNA origami structures to reveal biological processes at multiple scales. *NPG Asia Materials, 15*(1), 25.

BÖLÜM 3

KANSER AŞILARI:

KANSER İMMÜNOTERAPİSİNDE YENİ BİR HAZİNE

Biyolog Bilgehan MİLLİDERE[5]

DOI: https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.12707225

[5] Biyolog, Biyoinformatik Analisti , Viagen; Aşağı Öveçler Mahallesi 1324.cad. No:39/A Çankaya/ANKARA bilgehanmil@gmail.com

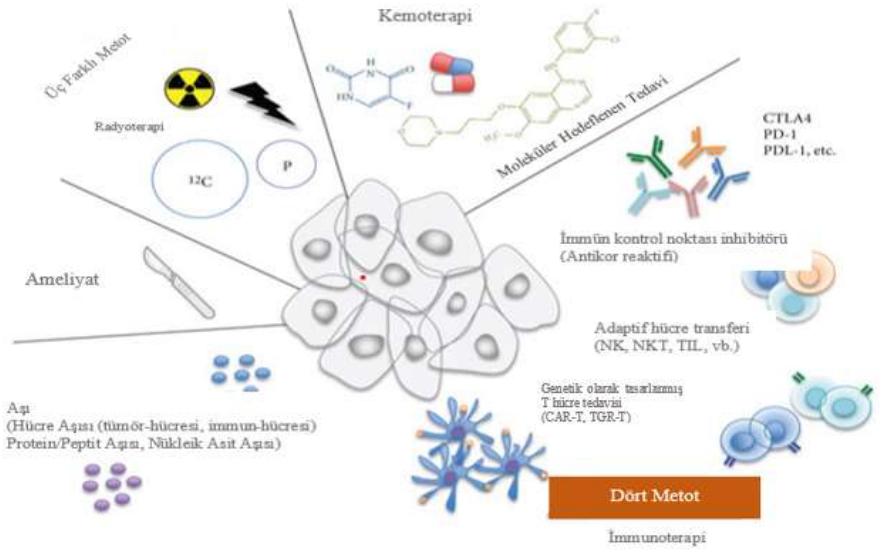
GİRİŞ

Geleneksel aşı tedavileri enfeksiyon hastalıklarına karşı uzun yıllardır başarılı bir koruma sağlamaktadır (1). Aşıların, sağlıklı bireylere verilen detoksifiye edilmiş patojenler sayesinde yapay bir bağışıklık yanıtı oluşturması, aşı mekanizmasının temelini oluşturmaktadır. Bu yöntem, bulaşıcı hastalıkların önlenmesi veya şiddetinin azaltılması açısından kritik bir rol oynamaktadır (2,3). Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün aşıları önemli önleyici tedbirler arasında kabul etmesi ve gelişmiş ülkelerde kabakulak ve suçiçeği gibi aşıların ücretsiz olarak uygulanmasını önermesi, aşılama sisteminin küresel sağlık üzerindeki etkisinin altını çizmektedir (4). Günümüzde, dünya genelinde rutin ve sıkı bir aşılama sistemi oluşturulmuş olup, bu sistem sayesinde pek çok enfeksiyon hastalığının yayılması engellenmiştir (4). Bağışıklık sisteminin, vücudu hastalıklara karşı koruyan karmaşık bir ağdır ve bu sistem, vücuda giren patojenleri tanıyarak ve onlara karşı yanıt geliştirerek homeostazı korumaktadır (5). Günlük yaşamda virüsler, bakteriler veya zararlı maddeler gibi dış etkenlere maruz kaldığımız gibi, hücrelerdeki anomalilere yol açabilecek radyasyon gibi çeşitli faktörlerle de karşılaşabiliriz. Güçlü bir bağışıklık sistemi sayesinde bu dış etkenlerin hemen hastalığa yol açması oldukça zordur. Ancak, bağışıklık sistemi ile dış uyaranlar arasında bir düzensizlik oluştuğunda, patojenleri veya hasarlı hücreleri yok edemeyebilir ve bu da enfeksiyon veya kanser gibi ciddi sağlık sorunlarına neden olabilmektedir (6)

2. Kanser Aşılarının Gelişim Süreci

Radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi eksizyon şimdiye kadar kanser hücrelerini hedef alarak yok eden üç temel kanser tedavi yöntemiydi. Kanser tedavisinde uzun yıllardır kullanılan üç temel yöntem olan radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi eksizyon yötemlerine ek olarak son yıllarda giderek daha fazla kabul gören dördüncü bir yöntemde hayatımıza girmiştir. Tümör mikro ortamının (TMO) stromal ve bağışıklık hücrelerinden oluşan karmaşık

yapısının hayati rolü daha iyi anlaşıldıkça, kanser immünoterapileri dördüncü ana kanser tedavi yöntemi olarak kabul görmeye başlamıştır. (Şekil) (7-9).



Şekil 1. Geleneksel kanser tedavi yöntemleri. Radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi eksizyon gibi geleneksel tedavi yöntemleri, doğrudan kanser hücrelerini hedef alarak yok etmeye yönelik stratejilerdir. Bu yöntemler, kanser tedavisinde uzun yıllardır kullanılan etkili araçlardır. Ancak, tıp bilimindeki son araştırmalar, bağışıklık sistemini düzenleyerek dolaylı yoldan kansere saldırabilen immünoterapilerin de önemli bir tedavi yöntemi olduğunu ortaya koymuştur. Bu yeni yöntem, vücudun doğal savunma mekanizmalarını harekete geçirerek kanserle mücadelede daha etkili ve uzun vadeli sonuçlar elde etmeyi amaçlamaktadır.

Kanser immünoterapisini temsil eden stratejiler arasında önleyici ve tedavi edici aşılar bulunmaktadır. Önleyici aşılar, sağlıklı bireylere uygulanarak bağışıklık hafızasını oluşturmayı ve belirli kanser türlerine bağlı sağlık risklerini azaltmayı amaçlar. Bu yöntem, kanserin gelişimini önlemeye veya riskini azaltmaya yönelik bir koruyucu stratejidir.

Diğer bir strateji ise tedavi edici aşılar kullanılarak gerçekleştirilir. Bu aşılar, zaten kanser tanısı almış hastalara yöneliktir ve hastanın kendi bağışıklık sistemini güçlendirerek veya yeniden etkinleştirerek hastalığın yönetilmesine yardımcı olmayı hedefler. Tedavi edici aşılar, kanser hücrelerine karşı immün yanıtı artırarak veya kanser hücrelerinin büyümesini durdurarak tedavi sürecine katkı sağlayabilir.

Bu iki yöntem de, kanser immünoterapisinin genişlemiş bir perspektifini temsil eder. Her biri, bağışıklık sisteminin kanserle mücadelede nasıl kullanılabileceğini gösteren ve hastalar için umut verici tedavi seçenekleri sunan önemli stratejilerdir. Kanser aşılarının klinik uygulamaları, birçok araştırmacının uzun yıllar süren araştırma ve geliştirme çabalarına rağmen, önemli engellerle karşılaşmıştır. Kanser immünoterapisi alanında ilk dikkate değer gelişmelerden biri, 1890'larda Dr. William B. Coley tarafından yapılmıştır. Coley, sarkom hastalarında streptokok organizmalarının (Coley toksini olarak bilinen) terapötik bir aşı olarak kullanılmasıyla ilgili çalışmalar yapmış ve bu, kanser immünoterapisi alanındaki ilk raporlardan biri olarak kayıtlara geçmiştir (10).

Dr. Coley, kanser tedavisinde bağışıklık sisteminin uyarılmasını hedefleyerek önemli bir yöntem geliştirmiştir ve bu yöntemle bazı hastalarında olumlu sonuçlar gözlemlemiştir. Bu çalışma, immünoterapi alanında önemli bir dönüm noktası olarak kabul edilir çünkü kanser hücrelerine karşı doğal bağışıklık tepkilerini yönlendirmeyi amaçlayan ilk girişimlerden biridir. Dr. Coley tarafından kullanılan yöntemde, hem profilaktik (önleyici) hem de terapötik (tedavi edici) amaçlarla belirli sarkom antijenlerine karşı spesifik immün tepkiler indüklendi. Coley, streptokok organizmalarından elde edilen Coley toksini ile hastaların bağışıklık sistemini aktive ederek, sarkom antijenlerine karşı doğal bir immün yanıt oluşturmayı amaçlamıştır. Dr. Coley'in geliştirdiği kanser aşısı yaklaşımı, hastalarda kanserin gelişimini önleme veya mevcut kanseri tedavi etme amacıyla antikor üretimini ve

bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunu teşvik etmeyi hedeflemektedir. Bu aşı yöntemi, bazı bulaşıcı hastalıkları olan insanlarda kanser insidansının düşük olduğu gözlemlerine dayanmaktadır. Bu gözlem, enfeksiyon ve inflamasyonun vücuttaki hücrelerin anormal antijenlerini ortaya çıkarabileceğini göstermektedir. Enfeksiyonlar veya inflamasyon durumlarında, bağışıklık sistemi vücuttaki anormal hücre antijenlerini tanıyarak buna karşı tepki gösterebilmektedir ve kanser hücreleri genellikle normal hücrelerden farklı antijenlere sahip olabildiğinden böylece bağışıklık sisteminin kanser hücrelerini hedeflemesine yol açabilmektedir. Bu sebeple, enfeksiyon veya inflamasyon durumlarında bağışıklık sistemi kanser hücrelerine karşı bir tepki geliştirebilir. Coley'in geliştirdiği aşı da bu ilkeye dayanır; streptokok organizmalarıyla indüklenen enfeksiyon veya inflamasyonun, bağışıklık sisteminin kanser hücrelerine karşı yanıt vermesine yol açabileceği önerilmiştir. Bu yüzden, aşılanan hastalarda kanser oluşma riskinin azaldığı veya mevcut kanserin geri çekilebileceği düşünülmektedir. Örneğin, kabakulak enfeksiyonu sırasında vücutta meydana gelen bağışıklık tepkileri, hücre yüzeyinde bulunan müsine (MUC1) gibi anormal antijenlere karşı antikor üretimini teşvik edebilir. Bu durum, özellikle yumurtalık kanseri gibi belirli kanser türlerinin görülme sıklığını azaltmada potansiyel bir rol oynayabilir (11). Son yıllarda yapılan araştırmalar, Bacillus Calmette-Guerin (BCG) adlı aşının mesane kanseri tedavisinde de etkili olabileceğini göstermektedir (12, 13). BCG, uzun süredir tüberkülozun önlenmesinde kullanılan bir aşıdır. Ancak mesane içine uygulandığında, bağışıklık sistemini harekete geçirerek mesane kanseri hücrelerine karşı özel bir immün yanıtı tetikleyebilir. Bu sayede, kanser hücrelerinin kontrol altına alınmasına veya gerilemesine yardımcı olabilir. Bazı kanser türleri, bulaşıcı virüslerle ilişkilendirilmiş ve bu virüslere karşı geliştirilen aşılar kanser gelişimini önlemede önemli bir rol oynayabilir. Özellikle HPV ve HBV gibi virüslerle ilişkili kanserlerde, FDA tarafından onaylanmış aşılar kullanılarak kanser riski azaltılabilir. Ancak, virüs kaynaklı

kanserler sadece belirli türlerde görülür ve bu nedenle antiviral aşıların etkinliği sınırlıdır. Ayrıca, aşıların küresel olarak yaygın bir şekilde uygulanması bazı zorluklarla karşı karşıyadır ve aşılama oranlarının yetersiz olduğu bölgelerde virüs kaynaklı kanserlerin önlenmesindeki etkinlik azalabilir. Bu durum, sağlık politikalarının ve toplumların aşıya erişim ve kabulü konusundaki çalışmalarının önemini ortaya koymaktadır (14,15). Bu sebeple, viral enfeksiyonlara karşı geliştirilen profilaktik aşıların kanser önlemedeki rolü büyük önem taşımaktadır. Ancak bu aşıların geniş çapta kullanılabilmesi ve küresel düzeyde herkese ulaşılabilir olması gerekmektedir. Ayrıca, bu örnekler bağışıklık sisteminin kanserle mücadeledeki potansiyel etkilerini göstermektedir ve immünoterapi stratejilerinin çeşitliliğini ve önemini vurgulamaktadır. Hastalıklar veya aşılar aracılığıyla bağışıklık sisteminin harekete geçirilmesi, kanser hücrelerine karşı doğal veya özgül bir savunma mekanizması oluşturabilir ve bu da kanser tedavisinde yeni yaklaşımların geliştirilmesine yol açabilir. Bu bağlamda, immünoterapinin kanser tedavisindeki yenilikçi potansiyeli, bilim dünyasında büyük umutlar yaratmaktadır.

Özetle kanser aşılarının tarihi gelişim süreci oldukça uzun ve çeşitli araştırmalarla şekillenmiştir. İlk denemeler, 19. yüzyılın sonlarında Dr. William B. Coley'in sarkom hastalarına streptokok bakterileri ile tedavi uygulamalarıyla başlamıştır. Coley, bu yöntemiyle bağışıklık sisteminin kanser hücrelerine karşı tepkisini güçlendirerek bazı hastalarda olumlu sonuçlar elde etmiştir. 20. yüzyılın ortalarında ve sonrasında, kanser immünoterapisi alanında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Özellikle, bağışıklık sistemini kanserle savaşmaya teşvik etmek amacıyla geliştirilen çeşitli aşılar araştırılmış ve klinik deneyler yapılmıştır. Örneğin, Bacillus Calmette-Guerin (BCG) aşısı, başlangıçta tüberküloz tedavisinde kullanılan ancak daha sonra mesane kanserinde terapötik etkileri gösteren bir aşı olarak keşfedilmiştir. 2000'li yıllarda ise, özellikle virüslere karşı geliştirilen profilaktik aşılarla kanser

önlemede büyük adımlar atılmıştır. İnsan papilloma virüsü (HPV) ve hepatit B virüsü (HBV) gibi virüslerin kanserlere neden olma potansiyeline karşı geliştirilen aşılar, FDA onayı alarak yaygın kullanıma sunulmuştur.

Bugün, kanser aşıları üzerine yapılan araştırmalar hızla devam etmekte olup, immünoterapi ve kişiselleştirilmiş tıp yaklaşımlarıyla kanser tedavisinde önemli bir rol oynaması beklenmektedir. Bu süreçte, aşılama stratejilerinin ve bağışıklık sisteminin kanserle savaşım mekanizmalarının daha da anlaşılması ve geliştirilmesi, gelecekte kanser tedavisinde yeni ve etkili yöntemlerin ortaya çıkmasını sağlayabilir.

3. Kanserlerin İmmünolojik Özellikleri

20. yüzyılın ikinci yarısında, tümör immünolojisi ve moleküler biyoloji alanlarında önemli ilerlemeler kaydedildi. Bu dönemde yapılan birçok çalışma, özellikle tümörlerin bağışıklık sistemi tarafından nasıl tanınmadığını ve bu sürecin moleküler mekanizmalarını detaylı bir şekilde incelemiştir. Bu araştırmaların sonucunda, tümörlerin bağışıklık sistemine karşı nasıl direnç göstererek hayatta kaldıklarını anlamamıza yardımcı olan çeşitli mekanizmalar tanımlanmıştır. Bu mekanizmalardan biri olan "kanser immün düzenlemesi", tümör hücrelerinin çeşitli moleküler sinyaller ve mekanizmalar aracılığıyla bağışıklık sistemi yanıtlarını baskılayarak veya etkisiz hale getirerek bağışıklık kaçınma stratejilerini uygulamaktadır (16).

Bu keşif, kanser immünolojisi alanında önemli bir ilerleme olarak kabul edilmekte olup kanser tedavisinde yeni potansiyeller sunmaktadır. Tümörlerin bağışıklık sistemiyle etkileşim mekanizmalarını anlamak, kanser immünolojisinin derinlemesine anlaşılmasını sağlayarak yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine olanak tanır. Kanser immün düzenlemesi mekanizması, tümörlerin bağışıklık sisteminden nasıl kaçtığını ve bu sürecin moleküler temellerini ortaya koyar. Bu bilgi, immünoterapi ve diğer kanser tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde kritik bir rol oynar, çünkü bu stratejiler

tümörlerin bağışıklık kaçınma stratejilerini aşarak bağışıklık sisteminin kanserle mücadelesini güçlendirmeyi hedeflemektedir.

Antijen sunan hücreler (APC'ler), özellikle dendritik hücreler ve makrofajlar gibi spesifik bağışıklık hücreleri, T hücrelerine kanser hücrelerinden gelen antijenleri sunarak bağışıklık yanıtlarını başlatırlar. Bu süreç, T hücrelerinin aktivasyonu için gerekli olan ikinci sinyallerin iletilmesiyle yönetilir. Özellikle CD28 gibi moleküller, T hücrelerinin antijen tanıma sürecinde kritik bir rol oynar; bu moleküller, T hücrelerinin etkin bir şekilde aktivasyonunu ve bağışıklık tepkisinin uygun şekilde yönlendirilmesini sağlar.

Bu bağlamda, kanser hücrelerinin nasıl kaçınma stratejileri geliştirdiği veya bu süreçte nasıl etkili oldukları da vurgulanabilir. Örneğin, kanser hücrelerinin antijen sunumu sırasında APC'lerin normal işlevini etkileyerek veya T hücrelerinin aktivasyonunu engelleyerek bağışıklık yanıtlarını baskılayabileceği bilinmektedir. Bu mekanizmalar, kanser immünoterapilerinde hedeflenen alanlardan biridir; çünkü bu terapiler, kanser hücrelerinin bağışıklık sisteminden kaçma stratejilerini aşarak T hücrelerinin tümörleri tanımasını ve yok etmesini teşvik etmeyi amaçlar. Kanser hücreleri genellikle kritik ikinci sinyalleri eksik veya yetersiz sağlayarak, özellikle güçlü kansere özgü antijenler olsa bile T hücrelerinin etkili bir şekilde aktivasyonunu engelleyebilirler. Bu durumda, T hücreleri antijenlere karşı anerjik hale gelebilir, yani antijen tanıma ve yanıt oluşturma yeteneklerini kaybedebilirler. Sonuç olarak, kanser hücrelerine karşı spesifik bağışıklık tepkileri zayıflayabilir veya tamamen ortadan kalkabilir. Tümör mikro ortamı (TMO), bu süreci destekleyen immünsüpresif hücrelerin varlığı ile karakterizedir. Örneğin, miyeloid türevli baskılayıcı hücreler (MDSC'ler) ve düzenleyici T hücreleri (Treg'ler), tümör hücreleri, stromal hücreler veya diğer bağışıklık hücreleri tarafından salgılanan kemotaktik faktörler nedeniyle TMO'ya çekilmektedir. Bu immünsüpresif hücreler, antitümör bağışıklık yanıtlarını

baskılayarak bağışıklık sisteminin etkinliğini azaltabilir. Kanser hücreleri, çeşitli inhibe edici ligandlar ve immünsüpresif faktörler üreterek bağışıklık sistemi yanıtlarını baskılamakta ve antitümör bağışıklık yanıtlarının zayıflamasına neden olmaktadır. Özellikle, PD-L1 gibi inhibe edici ligandların ifade edilmesi, T hücrelerinin etkinliğini azaltarak kanser hücrelerinin kontrolünden kaçmasına katkıda bulunur. Aynı şekilde, IL-10, TGF-b ve PGE2 gibi immünsüpresif faktörlerin salgılanması da bu sürece negatif etki yaparak kanser hücrelerinin büyümesini teşvik eder.

PD-L1 gibi inhibe edici ligandlar, kanser hücreleri tarafından üretilen proteinlerdir ve bu ligandlar, bağışıklık hücrelerinin (özellikle T hücreleri) etkinliğini baskılayarak, kanser hücrelerinin bağışıklık saldırılarından korunmasına yardımcı olabilir. Bu durum, kanser hücrelerinin immünsüpresif ortamını güçlendirerek ve bağışıklık sisteminden kaçma mekanizmalarını aktive ederek kanserin ilerlemesine katkıda bulunabilir. Öte yandan, IL-10, TGF-b ve PGE2 gibi immünsüpresif faktörler ise tümör mikro ortamında (TMO) yaygın olarak bulunur. Bu faktörler, immün yanıtları baskılayarak ve bağışıklık sistemini zayıflatarak kanser hücrelerinin büyümesini teşvik eder. IL-10, anti-inflamatuar özelliklere sahip bir sitokin olarak bilinirken, TGF-b ise hücre büyümesi ve bağışıklık sistemini düzenleme süreçlerinde önemli rol oynar. PGE2 ise iltihabi yanıtları düzenler ve tümör hücrelerinin çoğalmasını destekler.

Immünsüpresif hücreler, örneğin miyeloid türevli baskılayıcı hücreler (MDSC'ler) ve düzenleyici T hücreleri (Treg'ler), tümör mikro ortamında (TMO) etkin bir şekilde rol oynarlar. Bu hücreler tarafından salınan faktörler, özellikle IL-10, TGF-b ve PGE2 gibi immünsüpresif moleküller, bağışıklık yanıtlarını baskılayarak ve tümörün bağışıklık kaçma mekanizmalarını güçlendirerek kanser hücrelerinin büyümesine katkıda bulunabilir.

Bu mekanizmaların anlaşılması, kanser immünolojisi araştırmalarında merkezi bir odak noktası oluşturur. Çünkü bu bilgiler, immünoterapi gibi

yenilikçi kanser tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde kritik bir rol oynar. Immünoterapi, bağışıklık sistemini kanser hücrelerine karşı aktive ederek veya immünsüpresif mekanizmaları hedefleyerek kanseri tedavi etmeyi amaçlayan bir yaklaşımdır. Dolayısıyla, immünsüpresif hücrelerin ve bu hücrelerin salgıladığı faktörlerin rolünün detaylı olarak anlaşılması, kanser bağışıklık kaçış mekanizmalarının etkili bir şekilde hedeflenmesine ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak tanır (18).

4. Kanser Aşıları ve Günümüzdeki Durumu

Kanser hücrelerinin bağışıklık sisteminden kaçma mekanizmalarının anlaşılması, kanser immünoterapisi alanında yenilikçi tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Kanser hücreleri, bağışıklık sistemi tarafından tanınma ve yok edilme riskini azaltmak için çeşitli stratejiler geliştirmektedir. Bu stratejilerin belirlenmesi, kanser immünoterapisinde kullanılabilecek potansiyel hedefleri ortaya koymak açısından önemlidir. Kanser aşıları bu bağlamda önemli bir rol oynar. Genellikle üç ana kategori altında değerlendirilirler: hücre aşıları, protein/peptit aşıları ve nükleik asit aşıları. Hücre aşıları, genellikle tümör hücreleri veya bağışıklık hücreleri gibi canlı hücrelerden elde edilir ve bu hücrelerin kanserle ilişkili antijenlerini taşırlar. Protein/peptit aşıları ise spesifik kanser antijenlerinden oluşan protein veya peptitler içerir ve bağışıklık sisteminin bu antijenlere tepki göstermesini sağlamayı amaçlar. Nükleik asit aşıları ise DNA, RNA veya viral vektörler gibi genetik materyalleri içerir ve hücrelerde hedeflenmiş antijen üretimini tetikleyerek bağışıklık yanıtlarının oluşturulmasına katkıda bulunur.

Bu aşı türleri, kanser immünoterapisinin temel bileşenlerini oluşturur ve bağışıklık sistemini kanser hücrelerine karşı etkin bir şekilde harekete geçirmeyi hedefler. Her bir aşı tipinin avantajları ve dezavantajları bulunmakla birlikte, kanser hücrelerinin özgül antijenlerine karşı immün yanıtların güçlendirilmesi, kanser tedavisinde potansiyel olarak önemli bir adımdır.

Bu teknikler aşağıda özetlenmiştir:

Hücre Aşıları: Bu aşılar genellikle tümör hücrelerinden veya dendritik hücreler gibi bağışıklık hücrelerinden türetilen antijenler içerir. Dendritik hücreler genellikle tümör antijenleriyle yüklenerek kullanılır ve vücuda geri verilir, böylece bağışıklık sistemi tümör hücrelerine karşı özgül bir yanıt geliştirebilir.

Protein/Peptit Aşıları: Bu aşılar, kanser hücrelerinin yüzeyinde bulunan veya içinde barındırdığı spesifik antijenlerin protein veya peptit formunda sunulmasını içerir. Bu antijenler bağışıklık sistemi tarafından tanınarak antitümör yanıtların oluşturulmasını hedefler.

Nükleik Asit Aşıları: Bu kategori, kanser hücrelerinin özgül antijenlerini kodlayan DNA veya RNA'nın, hücre içine alınması ve antijenlerin hücreler tarafından sentezlenmesiyle bağışıklık yanıtlarının uyarılmasını içerir. Viral vektörler de genellikle bu kategori altında kullanılarak antijen sunumunu kolaylaştırır.

Üç ana kanser aşı tekniği, kanser hücrelerine karşı bağışıklık sistemini harekete geçirerek ve tümör büyümesini kontrol altına alarak veya gerileterek kanser tedavisinde önemli bir potansiyel sunmaktadır. Ancak her bir yöntemin kendine özgü avantajları ve zorlukları bulunmaktadır ve kanser immünoterapisi alanında devam eden araştırmalarla geliştirilmeye ve iyileştirilmeye devam etmektedir.

4.1. Hücre Aşıları (Tümör Hücre Aşıları veya Dendritik Hücre (DC) Aşıları)

Otolog tümör hücresi aşısı kanser immünoterapisi alanında değerlendirilen stratejilerden birisidir. Bu yaklaşımda, hastanın kendi tümör hücreleri alınır, genellikle radyasyon veya başka bir yöntemle öldürülerek zararsız hale getirilir ve daha sonra bu ışınlanmış tümör hücreleri bir adjuvan

(uyarıcı) ile birlikte hastaya geri verilir. Amaç, aşının hastanın kendi tümör hücrelerinin üzerinde ifade ettiği antijenlere özgü T hücrelerini uyararak bağışıklık sistemini aktive etmesidir (19,20). Ancak, bu stratejinin bazı sınırlamaları da bulunmaktadır. Özellikle yeterli sayıda ve kalitede tümör hücresi elde etme zorluğu, aşının hazırlanması ve uygulanması sürecini karmaşık hale getirebilir. Bu durum, aşının etkinliğini doğrudan etkileyebilir çünkü yeterli miktarda antijen içermeyen veya uygun immünostimülatuar etkisi olmayan aşılar, istenilen immün yanıtı sağlamakta zorluklar yaşayabilir. Dolayısıyla, otolog tümör hücresi aşısı gibi kişiye özgü yöntemlerin klinik uygulamada yaygınlaşması için bu teknik zorlukların aşılması ve standartlaştırılması gerekmektedir (21). Bu tür aşı stratejileri, kanser hücrelerinin spesifik antijenlerine karşı bağışıklık sistemini güçlendirerek kanserle savaşmada potansiyel bir avantaj sağlar. Ancak, klinik pratikte kullanımı için teknik ve pratik zorlukların üstesinden gelinmesi önemlidir. Bu, kanser immünoterapisi alanında yapılan araştırmaların ve teknolojik gelişmelerin önemini vurgulayan bir örnektir, çünkü bu gelişmeler aşının hazırlanması, uygulanması ve sonuçlarının değerlendirilmesindeki karmaşıklığı azaltabilir ve tedavi başarısını artırabilir (22).

Çeşitli kanser türlerinde denenmiş olan Tümör Hücre Aşıları veya Dendritik Hücre (DC) Aşıları, akciğer kanseri, kolorektal kanser, melanom (cilt kanseri), renal hücreli karsinom (böbrek kanseri) ve prostat kanseri gibi farklı kanser türlerinde uygulama bulmuştur (19-34). Her bir kanser türü, farklı antijen profilleri ve bağışıklık tepkilerine sahip olduğundan, bu aşı stratejilerinin kanser türüne özgü olarak uyarlanması gerekebilir (34).

GVAX ise genetiği değiştirilmiş tümör hücreleri tarafından salgılanacak şekilde tasarlanmış bir kanser aşısıdır. Bu aşı, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktörü (GM-CSF) adı verilen bir sitokin üreten tümör hücrelerine dayanmaktadır (36). GM-CSF, bağışıklık sisteminin aktivasyonunu artırarak antitümör yanıtların güçlendirilmesine katkıda bulunabilir. Bu strateji, tümör

hücrelerinin kendi bağışıklık sistemleri tarafından tanınmasını ve saldırılmasını teşvik etmeyi amaçlar (37). Bu aşılar, kanser tedavisindeki kişiye özgü immünolojik yanıtları harekete geçirmek amacıyla geliştirilmiştir (38). Her bir kanser türü için özelleştirilmiş aşı stratejileri geliştirilmesi, kanser hücrelerinin spesifik antijenlerine karşı bağışıklık sistemini etkili bir şekilde harekete geçirmenin ve tedaviye yanıtı artırmanın önemli bir yoludur. GVAX gibi genetiği değiştirilmiş aşılar ise tümör hücrelerini yeniden programlayarak bağışıklık sistemi üzerindeki baskıyı kırmayı hedefler, böylece kanserle mücadelede potansiyel bir güçlü araç olabilir (39).

GM-CSF, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktörü olarak bilinir ve bağışıklık sistemindeki granülositler ve makrofajların üretimini uyararak antitümör yanıtların geliştirilmesine katkıda bulunabilir (32). GM-CSF, tümör hücreleri tarafından üretildiğinde veya aşılarda kullanıldığında, bağışıklık hücrelerinin tümörle etkili bir şekilde savaşmasını sağlamak amacıyla kullanılır.

GVAX aşısı, kanser tedavisinde kullanılan bir immünoterapi yöntemidir ve genellikle radyasyon tedavisinden sonra kontrol edilemeyen büyümeyi durdurmak için geliştirilmiştir. İki temel GVAX aşısı yaklaşımı vardır: Birincisi otolog (hastanın kendi) hücreleri kullanırken, ikincisi allojenik (hastaya spesifik olmayan) hücrelerin kullanımını içerir. Otolog GVAX, hastanın kendi tümör hücreleri veya dendritik hücrelerinin kullanıldığı bir yöntemdir, bu sayede hastanın spesifik tümör antijenlerine karşı bağışıklık tepkileri uyarılabilir. Allojenik GVAX ise genellikle başka hastalardan alınan hücrelerle hazırlanır ve daha geniş bir antijen yelpazesine karşı bağışıklık yanıtlarını hedefler. Bu yöntemler, kanser immünoterapisinde kişiselleştirilmiş tedavi stratejileri geliştirmek için önemli bir adımdır. Her iki GVAX yaklaşımı da, bağışıklık sisteminin kanser hücrelerine karşı tepkilerini güçlendirme potansiyeline sahiptir.

Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlu hastalarda yapılan GVAX faz 1/2 klinik çalışmaları, GM-CSF (granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör) salgılanması ile hastaların prognozu arasında olumlu bir korelasyon göstermiştir (40). Bu sonuçlar, GM-CSF'nin bağışıklık sistemi üzerindeki potansiyel uyarıcı etkilerini vurgulamaktadır. Ancak, prostat kanserine yönelik yapılan faz 3 klinik çalışmalarında GVAX'ın etkili olmadığı görülmüştür (41). Bu sonuçlar, GVAX aşısının kanser tedavisinde tüm kanser tipleri için aynı etkinliği göstermediğini ve kanser biyolojisi ve hastalık özelliklerine bağlı olarak değişken sonuçlar alındığını göstermektedir. Günümüzde ise vücutta radyasyon veya mezotelini ifade eden Listeria monocytogenes aşısı veya siklofosfamid (CY) ile kombinasyon halinde yürütülen çeşitli faz 2 deneme çalışmaları, ileri evre pankreas kanseri için GVAX tedavisinin umut verici sonuçları olduğunu göstermektedir (42). Allojenik bir tümör hücresi aşısı olan Canvaxin (42) gibi, tümör hücre dizilerini içeren aşılar, otolog tümör aşılarının bireyselleştirilmesi ile ilgili sınırlamaları aşabileceği öngörülmektedir (145). Bu aşılar, prostat (43, 44), meme (45) ve pankreas kanserlerinde (46) araştırılmıştır. Homolog GVAX aşısının metastatik kastrasyona dirençli prostat kanserine (CRPC) karşı faz 3 klinik çalışmada hedeflerine ulaşamamasına rağmen, CRPC için allojenik GVAX ve bir immün kontrol noktası inhibitörü ile kombinasyon stratejileri üzerinde çalışılmaktadır (47, 48). 1990'ların sonlarından beri yoğun bir şekilde araştırılan DC tedavisi, antijenleri T hücrelerine sunan ve bağışıklık sistemi aktivasyonunu destekleyen dendritik hücrelere odaklanan yeni bir terapötik yaklaşımı temsil etmektedir. Bu tedavi yöntemi, dendritik hücreleri keşfeden Dr. Ralph M. Steinman'ın bu hücrelerin potansiyelini ve aşı olarak kullanım olasılığını fark ettiği zamanlardan beri geliştirilmektedir (49, 50).

Dendritik hücre (DC) aşıları, kanser immünoterapisi için umut verici bir strateji olarak öne çıkmaktadır. Bu aşılar, tümör hücrelerinden elde edilen çeşitli antijenlerle yüklenerek veya DC'lerin tümör hücreleriyle füzyonu gibi

yöntemlerle hazırlanabilirler. DC'lerin antijen sunumu, T hücrelerinin aktivasyonu için kritik öneme sahiptir; ancak bazı durumlarda bu sunumun immün aktivasyona katkıda bulunmadığı gözlemlenmiştir (51).

DC'lerin yüzeyinde bulunan çeşitli reseptörler, antijenlerin bağlanması ve sunumu sürecinde önemli rol oynar. Örneğin, temizleyici reseptör olarak bilinen lektin benzeri reseptörler, antijenlere özgü baskılayıcı CD4(+) T hücrelerinin indüksiyonunda rol oynayabilir. Bu mekanizmalar, DC aşılarının tasarımında dikkate alınması gereken detaylardan biridir (51).

Provenge (sipuleucel-T), FDA tarafından 2010 yılında prostat kanseri tedavisi için onaylanan bir immünoterapi yöntemidir ve dendritik hücrelerin kullanımını temel alır. Bu tedavi, hastanın kendi periferik kanından elde edilen immün hücrelerden oluşur ve bu hücreler, prostatik asit fosfataz (PAP) antijeni ile kültürlenir. GM-CSF (granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör) varlığında bu hücreler, Provenge'ın aktif bileşenleri olan dendritik hücreler haline gelir. Bu yöntem, hastanın kendi bağışıklık sisteminin özelleştirilmiş bir şekilde uyarılmasını sağlayarak, PAP antijenine karşı spesifik T hücre yanıtlarının oluşturulmasını hedefler (145).

Provenge, kişiselleştirilmiş tıbbın karmaşıklığının önemli bir örneğini sunar. Her hasta için özel olarak hazırlanan bu kanser aşısı, hastanın kendi hücrelerinden üretilmesini ve işlenmesini gerektirir. Bu süreç, numune toplama, hücre taşıma, kültür işlemleri, nakil ve uygulama gibi bir dizi adımı içerir. Bu durum, iş gücü ve maliyet açısından yüksek bir süreci beraberinde getirebilir.

Provenge'ın kişiselleştirilmiş yaklaşımı, her hasta için spesifik antijenlere karşı güçlü bir bağışıklık tepkisi oluşturulmasına olanak tanırken, aynı zamanda tedavi sürecinin kompleksliğini ve maliyetini artırır. Bu tür yöntemler, kanser tedavisinde bireyselleştirilmiş yaklaşımların potansiyelini ve bu yaklaşımların yaygın uygulanabilirliğini değerlendirirken, aynı zamanda sağlık sisteminin altyapısına ve kaynaklarına da önemli bir yük getirebilir.

4.2. Protein/Peptit Aşıları

Neoantijenler, kanser immünoterapisi alanında son zamanlarda büyük ilgi çeken bir konudur çünkü bunlar kanser hücrelerinde özel olarak bulunan ve normal dokularda bulunmayan antijenlerdir. Bu neoantijenler, kanser hücrelerinin mutasyonel yükü sonucunda ortaya çıkan özgün protein veya peptit yapılarıdır. Özellikle, normal dokularda bulunmayan kansere özgü gen mutasyonlarından türetilen bu neoantijenler, immün sistem tarafından daha kolayca tanınabilirler ve böylece kansere karşı spesifik immün yanıtların uyarılmasına olanak tanır (53).

Neoantijen aşıları, bu özel antijenleri içeren sentetik protein veya peptitlerin uygulanmasıyla çalışır. Profesyonel antijen sunan hücreler (APC'ler), bu aşıları alarak hücre yüzeylerinde HLA molekülleri ile birleştirip T hücrelerine sunarlar. T hücreleri, bu antijenleri tanıyarak kanser hücrelerine karşı özgü bir bağışıklık tepkisi başlatırlar (54-55).

Bu yaklaşım, kanser immünoterapisindeki son gelişmelerden biridir ve kanser tedavisindeki potansiyelini artırmak için çok çeşitli araştırmalar ve klinik çalışmalar yürütülmektedir. Neoantijenlerin tespiti için geliştirilen bilgisayar algoritmaları, kanser hastalarında potansiyel olarak hedeflenen antijenlerin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu sayede, her hastanın kanser hücrelerinin özgül özelliklerine göre uyarılan bir tedavi stratejisi geliştirilmesi mümkün olabilir. Neoantijenlerin kanser immünoterapisindeki rolü, özellikle bireyselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde ve kanser hücrelerine karşı daha etkili ve spesifik immün yanıtların sağlanmasında önemli bir potansiyel taşımaktadır. Bu alan, gelecekte kanser tedavisinde önemli bir yere sahip olabilecek yenilikçi ve hedefe yönelik immünoterapi stratejilerinin geliştirilmesine olanak tanıyabilir.

Protein/peptid aşılarının faz 3 klinik deneme çalışmalarında başarısız olması, kanser immünoterapisindeki zorlukları ve karmaşıklıkları vurgulayan önemli bir noktadır. Bu aşılar genellikle kanser hücrelerinden elde edilen özel

antijenleri içerir ve bu antijenlerin T hücreleri tarafından tanınarak kanser hücrelerine karşı spesifik bağışıklık tepkileri oluşturulması amaçlanır (56). Ancak, faz 3 klinik denemelerinin çoğunun başarısız olması, bu aşıların yalnız başına yeterli antitümör etki sağlamadığını göstermektedir. Bunun birkaç nedeni olabilir (56):

1. **İmmün Yanıtın Yetersizliği:** Protein/peptid aşıları, bazı durumlarda yeterli miktarda ve kalitede bir immün yanıtın tetiklenmesine yetmeyebilir. T hücreleri üzerinde yeterli aktivasyon sağlanamaması veya antijen sunan hücrelerin etkili bir şekilde antijen sunamaması gibi faktörler bu duruma katkıda bulunabilir.
2. **Tümörün İmmünsupresif Ortamı:** Tümör mikroçevresinde immünsupresif faktörlerin varlığı, T hücrelerinin etkili bir şekilde tümör hücrelerine karşı çalışmasını engelleyebilir. Bu faktörler, antijen sunumunu etkileyebilir veya T hücrelerinin fonksiyonlarını baskılayabilir.
3. **Antijen Seçimi ve Heterojenite:** Bazı durumlarda, kullanılan antijenlerin seçimi veya tümörlerin heterojen yapısı nedeniyle, aşıların etkinliği tutarsız olabilir. Tümörler içinde farklı alt tipler veya mutasyonel yükler bulunabilir, bu da aşının her tümör tipi veya hastada aynı derecede etkili olmasını zorlaştırabilir.

Protein /peptit türevli epitoplar tarafından T hücre yanıtları baskılanmış olsa bile, antitümör etkileri %10'dan az bir oran gibi nadiren düşük yanıt oluşturabilmektedir (57, 58). Bu olanaksız durumlaar, tümör immün kaçış mekanizmaları ve immünsüpresif tümör mikro ortamları da dahil olmak üzere çeşitli etmenlerle açıklanabilmektedir (59).

Peptit aşılarının MHC sınıf I ile sınırlı kısa zincirli peptitlerden oluşması, bazı önemli zorlukları beraberinde getirmektedir. Bu peptitler, işlenmemiş bir şekilde hücrelere bağlanabilmekte ve CD8+ T hücrelerine sunulduğunda ikincil kostimülatör sinyal olmaksızın anerjiyi tetikleyebilmektedir. Bu durum,

bağışıklık sisteminin toleransını artırarak kanserin ilerlemesi için uygun bir ortam oluşturabilir (60). Öte yandan, MHC sınıf I ile sınırlı kısa zincirli peptitler, etkili sitotoksik T lenfosit (CTL) indüksiyonu için gereken MHC sınıf II ile sınırlı yardımcı T hücrelerinin aktivasyonuna katkıda bulunamamaktadır. Bu nedenle, peptit aşılarının etkinliğini artırmak için uzun zincirli peptitlerin kullanımı önemli bir strateji olabilir. Uzun zincirli peptitler, hem MHC sınıf I hem de sınıf II ile sınırlı antijenlere işlenebilir ve bu sayede profesyonel antijen sunan hücreler (APC'ler), T hücresi reseptörleri (TCR'ler) aracılığıyla sinyal iletip anerjiyi önleyerek CTL veya yardımcı T hücrelerini etkin bir şekilde aktive edebilir (62).

Günümüzde, hem CTL hem de yardımcı T hücreleri için epitopları barındıran uzun zincirli peptit aşılarının geliştirilmesi devam etmektedir. Bu aşıların, kanser immünoterapisinde daha geniş ve etkili bağışıklık yanıtları oluşturabileceği düşünülmektedir (64). Ayrıca, peptit aşılarının etkinliğini artırmak için immün sistemi tetikleyen adjuvanların dahil edilmesi gibi yeni yaklaşımlar üzerinde de araştırmalar devam etmektedir. Bu çalışmalar, peptit aşılarının kanser tedavisindeki potansiyelini artırarak daha etkili ve geniş kapsamlı immünoterapi stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

4.3. Nükleik Asit Aşıları (DNA, RNA veya Viral Vektör)

Nükleik asit aşıları, DNA veya RNA formunda olabilen ve çoklu epitopları aynı anda aktive edebilen özellikleriyle önemli avantajlar sunmaktadır (69). Bu aşılar ekonomik ve stabil bir şekilde sentezlenebilirler. Viral vektörler kullanıldığında, adjuvanlar peptit aşıları kadar kritik olmayabilir çünkü viral vektörler doğal olarak güçlü bir immün cevap oluşturabilirler. Ancak viral vektör kullanılmadığında, hücreler tarafından nükleik asit alımının etkinliği düşük olabilir, bu dağıtım tekniklerinin geliştirilmesini gerektirebilir (70).

DNA aşıları, pek çok ön çalışmada umut verici sonuçlar vermiştir (71,72). Örneğin, VGX3100 adlı DNA aşısı, rahim ağzı kanserine karşı faz 3 klinik deneme çalışmalarında test edilmektedir (NCT03185013) (73). RNA aşıları ise DNA aşılarından farklı olarak genoma entegre olmadığı için kanserojenlik riskini azaltır. Ayrıca, sitoplazmada işlev görebildikleri için hızlı bir şekilde temizlenebilirler ve düşük yan etki riskine sahiptirler. Ancak, RNA'nın DNA'ya kıyasla daha kolay parçalanabilir olması dezavantaj olarak görülebilir. Bununla birlikte, lipozomlar veya stabilizasyon adjuvanları gibi çeşitli formülasyonlarla bu sorunun üstesinden gelinmesi mümkündür.

Özetle, nükleik asit aşıları, peptit aşılarına göre çeşitli avantajlar sunmakta ancak dağıtım ve stabilite gibi teknik zorlukları da beraberinde getirmektedir. Ancak bu aşıların potansiyelini artırmak için yapılan araştırmalar ve teknolojik ilerlemeler, kanser immünoterapisi alanında önemli adımlar atılmasını sağlamaktadır (74-77).

Günümüzde RNA kanser aşıları alanında pek çok umut verici çalışma bulunmaktadır. Özellikle melanom ve böbrek kanseri gibi çeşitli kanser türleri üzerinde yapılan devam eden faz 1/2 çalışmaları dikkat çekmektedir (79-81). Bu çalışmalar, mRNA tabanlı aşıların kanser tedavisinde potansiyelini araştırmakta ve bu aşıların güvenliği ile etkinliği üzerine önemli veriler sağlamaktadır. Örneğin, ilerlemiş melanomlu hastalar üzerinde lipozomla kapsüllenmiş mRNA'ya odaklanan bir faz I klinik denemesi de bu yöntemin potansiyelini değerlendirmektedir (82). Bu tür çalışmalar, mRNA aşılarının kanser immünoterapisi alanında yeni bir yaklaşım sunabileceğini ve hastaların tedaviye olan yanıtlarını iyileştirebileceğini göstermektedir. Ancak, bu çalışmaların henüz erken aşamalarda olması ve daha fazla klinik veriye ihtiyaç duyulması unutulmamalıdır. RNA aşılarının klinik kullanımda başarılı olabilmesi için daha fazla büyük ölçekli klinik deneme gereklidir. Bu süreçte, RNA aşılarının dağıtımı, stabilitesi ve immünojenitesi gibi teknik zorlukların aşılması önem arz etmektedir.

Viral vektörler, nükleik asit aşılarının geliştirilmesinde önemli bir araç olarak kabul edilmektedir. Bu vektörler, doğal olarak bağışıklık sistemini aktive edebilme özelliğine sahiptirler ve aynı zamanda virüslere karşı da bağışıklık tepkilerini tetikleyebilirler. Bu özellikleri sayesinde, viral vektörler genellikle ek adjuvanlara ihtiyaç duyulmadan etkili bir immün yanıtın oluşturulmasına yardımcı olurlar.

Çiçek virüsü, adenovirüs ve alfavirüs gibi yaygın olarak kullanılan viral vektörler genellikle güvenlik açısından zayıflatılmış veya replikasyonu kusurlu şekilde tasarlanmıştır. Bu şekilde, vektörlerin taşıdığı genetik materyal hücrelere girip replike olmadan antijen sunumunu yapabilmeleri sağlanmış olur. Örneğin, renal hücreli karsinom için 5T4 ve MUC1 antijenlerini hedeflemek üzere modifiye edilmiş aşı virüsü Ankara (MVA) gibi viral vektörler kullanılmaktadır (83,84). Rekombinant adenovirüsler ise kanser gen terapisi alanında sıkça kullanılmaktadır. Bu vektörler, hem bölünen hem de bölünmeyen hücrelere gen transferi yapabilirler ve ayrıca büyük miktarda üretilebilirler. Bu özellikleri, kanser tedavisinde gen terapisi uygulamaları için ideal bir platform sağlar (85–87) (NCT00583024, NCT00197522).

Herpes simpleks virüsü tip 1 (HSV-1), onkolitik bir virüs olarak kullanılarak kanser tedavisinde potansiyel bir araç olarak değerlendirilmektedir. Özellikle GM-CSF (granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör) ekspresyonu sağlayan HSV-1 varyantları, melanom gibi kanserlerde etkili olabilmektedir (88, 89). Bu tür onkolitik virüsler, tümör hücrelerini enfekte ederek çoğalır ve tümör hücrelerinin ölümüne yol açar, aynı zamanda immün yanıtları da uyarabilirler. Ancak viral vektörlerin kullanımında bazı zorluklar da vardır. Örneğin, tekrarlanan uygulamalar antiviral immün yanıtlara yol açabilir, bu da tedavinin etkinliğini azaltabilir veya tekrar uygulama yapılmasını zorlaştırabilir. Bu nedenle, virüs tabanlı aşı stratejilerinde heterolog prime-boost stratejileri geliştirilmiştir. Prime-boost stratejileri, farklı virüs vektörleri veya farklı aşı platformları kullanılarak

bağışıklık yanıtlarının güçlendirilmesini amaçlar (90-92). Örneğin, PROSTVAC aşısı, PSA (prostate spesifik antijen) eksprese eden çiçek virüsü vektörleri kullanılarak prostat kanseri için geliştirilmiştir. Bu aşı, üç immün arttırıcı molekül (LFA-3, ICAM-1 ve B7.1) ile birleştirilmiş ve prostat kanserinde bağışıklık tepkisini uyarmak için tasarlanmıştır.

PROSTVAC-VF/TRICOM adlı faz 3 çalışmasının sonuçları hayal kırıklığı yaratsa da, aşının bağışıklık kontrol noktası inhibitörleriyle birleştirilmesi umut verici sonuçlar doğurmuştur. Bu yaklaşım, kanser immünoterapisinde farklı terapötik stratejilerin kombinasyonunun önemini vurgular (93,94) (NCT02933255, NCT02506114).

Son olarak, virüslerin yanı sıra bakteri ve mayalar gibi diğer mikroorganizmalar da yeni aşı taşıyıcıları olarak keşfedilmekte ve araştırılmaktadır. Bu mikroorganizmaların aşı taşıyıcısı olarak potansiyelleri, aşıların etkinliğini ve uygulamalarını çeşitlendirerek gelecekte kanser ve diğer hastalıkların tedavisinde yeni yaklaşımların geliştirilmesine olanak sağlayabilir.

4.4. Kanser Aşılarıyla Kombinasyon Tedavisi

Kanser aşılarının monoterapi olarak sınırlı klinik etkiye sahip olması, kanser hücrelerinin çeşitli immün kaçınma mekanizmaları tarafından engellenmesiyle ilişkilendirilmiştir. Bu mekanizmalar, tümör mikroçevresinde immünsüpresif faktörlerin varlığı veya PD-L1 gibi immün kontrol noktası ligandlarının aşırı ifadesi gibi faktörlerle ilişkilidir. Bu durum, aşıların ortaya çıkardığı antitümör etkilerinin etkisiz hale gelmesine yol açabilir (95). Son yıllarda, kanser immünoterapisinde gelişen çeşitli tedavi yöntemleri ile birlikte, kombinasyon tedavilerinin önemi artmaktadır. Geleneksel kemoterapi veya radyasyon tedavisinin yanı sıra, daha yeni antikor tedavileri gibi farklı yaklaşımlar, immünoterapilerle eş zamanlı veya sıralı olarak test edilmektedir. Bu kombinasyon stratejileri, kanser hücrelerine karşı daha etkili bir immün

yanıtın tetiklenmesine ve tümör büyümesini kontrol etmeye yardımcı olabilir (96,97). Örneğin, bazı kemoterapi ilaçları veya radyasyon tedavisi, tümör hücrelerini öldürerek tümör antijenlerini serbest bırakabilir ve immünoterapilerin etkinliğini artırabilir. Ayrıca, immün kontrol noktası inhibitörleri gibi antikor tedavileri de immünsupresif mekanizmaları engelleyerek immün yanıtı güçlendirebilir. Bu tür kombinasyonlar, kanser tedavisinde daha kapsamlı ve etkili bir yaklaşım sağlamayı hedeflemektedir.

Sonuç olarak, kanser immünoterapisindeki ilerlemeler, tek bir tedavi yöntemi yerine kombinasyon stratejilerinin kullanımını teşvik etmektedir. Bu yaklaşım, farklı mekanizmaları hedef alarak kanser hücrelerine karşı daha güçlü ve sürdürülebilir bir immün yanıtın elde edilmesine olanak tanımaktadır.

4.5. Kanser Aşılarının Klinik Gelişimindeki Sorunlar

Kanser immünoterapisi, son yıllarda önemli ilerlemeler kaydetmiş olsa da, birçok zorlukla karşı karşıya olduğumuz bir alan olarak öne çıkmaktadır. İşte bu zorluklar ve keşfedilen bazı önemli bulgular:

1. **Düzenleyici Engeller:** Kanser immünoterapisi ilaçlarının geliştirilmesi ve onay süreçleri, dünya genelinde çeşitli düzenleyici otoriteler tarafından sıkı kontroller altındadır. FDA, Avrupa İlaç Ajansı gibi otoriteler, ilaçların etkinliğini değerlendirirken net son noktalar belirlemekte zorlanabilmektedir. Bu durum, yeni tedavilerin hızla hasta popülasyonuna ulaşmasını geciktirebilir.
2. **Sitotoksik İlaçlar ve Sağkalım:** Bazı sitotoksik ilaçlar, hastalıksız sağkalımı uzatırken genel sağkalımı etkileyemeyebilir. Bu, kanser tedavisinde kullanılan geleneksel yöntemlerin, hastaların yaşam kalitesini artırabileceği ancak tümörlerin tamamen ortadan kaldırılmasında sınırlı olabileceği anlamına gelmektedir.

3. **Immünoterapi Etkisi:** Immünoterapi, tümörde belirgin bir küçülme sağlamasa bile genel sağkalım sürelerini uzatabilir. Bu, immünoterapinin, tümörleri hedefleyen farklı bir mekanizma üzerinden çalıştığını ve klasik kemoterapiden önemli ölçüde farklı olduğunu göstermektedir.
4. **Bireysel Faktörlerin Rolü:** Her hastanın bağışıklık sistemi, yaş, genetik yapı ve önceki tedavi geçmişi gibi bireysel faktörler, immünoterapinin etkinliğini etkileyebilir. Bu nedenle, tedaviye yanıtı öngörmek ve optimize etmek için bireysel özelliklerin dikkate alınması önemlidir.

Kanser immünoterapisindeki araştırmalar, yeni tedavi stratejileri geliştirilmesinde umut verici ilerlemeler sağlamaktadır. Ancak, bireysel tedavi yanıtlarının öngörülmesi ve düzenleyici engellerin aşılması gibi zorluklar, bu alandaki ilerlemelerin hızını etkileyen faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle, multidisipliner çalışmalar ve uluslararası işbirlikleri, kanser immünoterapisinin potansiyelini tam olarak ortaya çıkarmak için kritik öneme sahiptir.

5. Diğer Kanser İmmünoterapilerinin Güncel Durumu

Kanser immünoterapisinde aşılar dışında birçok farklı yaklaşım ve tedavi yöntemi de geliştirilme aşamasındadır. CAR-T Hücre Terapisi: CAR-T hücreleri, hastadan alınan T hücrelerinin genetik olarak modifiye edilerek tümör hücrelerini tanıyacak şekilde programlanmasıyla çalışır. Bu yöntem, özellikle kan kanserlerinde, örneğin lösemi ve lenfoma tedavisinde önemli bir potansiyele sahiptir. Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs) Terapisi: Tümör içine sızan lenfositler, tümör hücrelerine karşı doğal bağışıklık tepkisi gösterir. TILs terapisi, hastanın kendi TIL'lerini artırarak veya laboratuvar ortamında büyüterek tümörü hedef alır. Bu yöntemlerin her biri farklı mekanizmalarla çalışarak kanser hücrelerine karşı bağışıklık tepkisini artırma potansiyeline sahiptir. Ancak her hasta için etkinliği farklı olabilir ve bu yöntemlerin

kombinasyonları veya diğer tedavi modaliteleri ile birlikte kullanılması giderek daha fazla araştırılmaktadır. Kanser immünoterapisi alanındaki bu çeşitlilik, tedavi seçeneklerini genişletmekte ve hastalar için umut vadetmektedir.

5.1. Tümör İnfiltratif Lenfosit (TIL) Tedavisi

Tümör infiltran lenfosit (TIL) tedavisi, özellikle melanom ve ileri rahim ağzı kanseri gibi bazı kanser türlerinde umut verici sonuçlar gösteren bir yaklaşımdır. Bu tedavi yöntemi, hastanın kendi tümör dokusundan alınan T hücrelerinin laboratuvar ortamında çoğaltılarak ve aktive edilerek hastaya geri verilmesini içerir. TIL tedavisi genetik modifikasyon gerektirmez ve bu nedenle uygulama açısından görece basit bir yaklaşım olarak değerlendirilebilir (145).

Dudley ve diğer araştırmacılar, TIL tedavisinin kanser hastalarında potansiyel etkileri konusunda önemli veriler sunmuşlardır. Özellikle melanom üzerinde yapılan çalışmalar, bu tedavi yönteminin etkileyici sonuçlar elde ettiğini göstermiştir. TIL tedavisi, melanom hastalarında uzun süreli sağkalım ve tümör küçülmesi gibi olumlu klinik etkiler sağlayabilmektedir (103-107). Son zamanlarda yapılan araştırmalar, IL-2 gibi bağışıklık sistemi aktivasyonunu artıran ajanların ve TIL'lerin eş zamanlı kullanımının tedavi etkinliğini artırabileceğini göstermektedir. Bu kombinasyon stratejileri, özellikle ileri melanom ve rahim ağzı kanseri gibi dirençli kanser türlerinde umut verici sonuçlar doğurabilir (107-110).

Özetle, TIL tedavisi, özellikle ileri kanser durumlarında ve özellikle melanomda potansiyel etkilere sahip bir immünoterapi yöntemi olarak önem kazanmaktadır. Ancak, tedavinin etkinliğini belirleyen faktörler arasında TIL'lerin kalitesi, miktarı ve hastaya uygulanan destekleyici tedavi yöntemleri gibi pek çok değişken bulunmaktadır. Ancak, TIL tedavisinin etkinliği tümör dokusundan elde edilen T hücrelerinin kalitesi ve miktarına bağlı olarak değişebilir. Bu nedenle, tedavi protokollerinin ve laboratuvar tekniklerinin sürekli olarak iyileştirilmesi gerekmektedir. TIL tedavisi alanında yapılan ileri

araştırmalar ve klinik çalışmalar, bu yaklaşımın kanser tedavisindeki potansiyelini daha da netleştirecektir.

5.2. TCR/CAR-T Hücre Tedavisi

TCR-T ve CAR-T hücre tedavileri, kanser tedavisinde önemli bir potansiyele sahip olan yenilikçi yaklaşımlardır. TCR-T terapisi, özgül antijen reseptörlerinin T hücrelerine transfer edilmesiyle antijen spesifik T hücrelerinin üretilmesini sağlar. Öte yandan, CAR-T terapisi, gen mühendisliği ile hedef antijenleri tanıyan kimerik reseptörlerle donatılmış T hücrelerinin kullanımını içerir (111). Özellikle CD19 antijenini hedefleyen CAR-T tedavisi, kan kanserleri gibi belirli kanser türlerinde büyük başarı göstermiştir (112).İ

FDA'nın 2017'de CD19 hedefli CAR-T tedavisini onaylaması, özellikle dirençli veya tekrarlayan B hücreli akut lenfoblastik lösemi (ALL) hastalarında önemli bir ilerleme olarak kabul edilmiştir (113,114). Ancak, bu tedavilerin yüksek maliyeti ve bazı kanser türlerindeki etkinlik sınırlamaları, geniş bir hasta kitlesine erişimi kısıtlayabilmektedir. Özellikle katı tümörler gibi heterojen tümörlerde, CAR-T tedavisinin etkinliği farklı hücre alt tipleri ve antijen ifadeleri nedeniyle daha sınırlı olabilir (115). TCR-T ve CAR-T terapileri, kanser tedavisindeki geleceğin önemli bir parçası olarak görülmektedir. Ancak, bu tedavilerin daha geniş bir hasta kitlesine ulaşabilmesi için maliyet etkinliğinin artırılması ve tedaviye yanıtı öngörebilme yeteneğinin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu yöntemlerin ilerlemesi, kanser immünoterapisi alanında önemli bir adım olarak kabul edilmektedir (116).

5.3. Bağışıklık Kontrol Noktası İnhibitörleri

CTLA-4 ve PD-1 gibi bağışıklık kontrol noktası moleküllerinin keşfi, immünolojide önemli bir dönüm noktası olmuştur (117). Bu moleküller, T hücresi aktivasyonunu düzenleyen ve aşırı immün cevabın önlenmesine yardımcı olan kritik rol oynarlar (118). CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4), aktive edilmiş T hücrelerinde CD28 ile rekabet ederek CD80 ve

CD86 ligandlarına bağlanır. Bu rekabet, T hücresi aktivasyonunu azaltarak immün yanıtın sınırlanmasına ve aşırı immün cevapların önlenmesine katkıda bulunur. CTLA-4'ün bu inhibe edici etkisi, özellikle otoimmün hastalıklarda ve kanser immünoterapisinde hedeflenen bir mekanizma olarak önem taşır (119). PD-1 (Programmed cell Death protein 1) ise antijenle uyarılan T hücrelerinde PD-L1 ve PD-L2 ligandlarına bağlanarak T hücresi aktivasyonunu inhibe eder. Bu bağlantı, T hücresinin aktivasyonunu sınırlayarak aşırı immün yanıtın ve otoimmün tepkilerin engellenmesine yardımcı olur. PD-1'in bu inhibe edici mekanizması, kanser hücrelerinin bağışıklık sisteminden kaçmasında rol oynayan bir strateji olarak da görülmektedir.

Kanser mikroortamı, çeşitli hücresel bileşenler tarafından düzenlenen bir ortamdır ve bu ortam, kanser hücrelerinin bağışıklık sisteminden kaçmasına ve ilerlemesine katkıda bulunabilir. Özellikle dendritik hücreler (DC'ler), makrofajlar, fibroblastlar gibi hücreler PD-L1 ve PD-L2 gibi bağışıklık kontrol noktası moleküllerinin ekspresyonunu artırarak immünosüpresif bir ortam oluşturabilirler. Bu moleküller, özellikle PD-1 ve CTLA-4 gibi, aktive T hücrelerinin inhibe edilmesine ve bu yolla bağışıklık tepkisinin kısıtlanmasına neden olabilirler (120-122). Bu bağlamda, PD-1 ve CTLA-4 gibi bağışıklık kontrol noktası moleküllerinin keşfi, kanser immünoterapisi alanında devrim niteliğinde yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak tanımıştır. Bu moleküllerin işlevlerinin anlaşılması ve düzenlenmesi, kanser tedavisinde kullanılan immünoterapilerin etkinliğini artırmak için kritik öneme sahiptir. Örneğin, bu moleküllerin inhibe edici etkilerini bloke ederek veya modifiye ederek, T hücrelerinin kanser hücrelerine karşı daha güçlü ve etkin bir immün yanıt göstermeleri sağlanabilir (145).

Kanser hücreleri, antijen tanıma için gerekli olan hücre yüzeyi moleküllerini silerek veya bağışıklık kontrol noktaları gibi bağışıklık sistemini baskılayan mekanizmaları doğrudan kullanarak bağışıklık sisteminden kaçabildiği gibi özellikle bazı kanser hücreleri, PD-L1 ve PD-L2 gibi bağışıklık kontrol noktası moleküllerinin ligandlarını yüksek düzeyde eksprese edebilmektedir. Bu durum, kanser hücrelerinin bağışıklık hücrelerini inhibe etmesine ve böylece bağışıklık sisteminin kanser hücrelerini tanımasını ve yok etmesini zorlaştırabilmektedir (123,124). Ancak, bazı hastalarda T hücrelerindeki bu inhibitör moleküllerin bloke edilmesiyle antitümör etkilerin gözlemlenebildiği belirtilmektedir. Özellikle bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri kullanılarak başlatılan antitümör aktivitenin, bağışıklık hafızası oluşturarak uzun süreli klinik etkilere sahip olması hedeflenmektedir. Bu bağlamda, kanser immünoterapisinde bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerinin potansiyeli ve önemi vurgulanmaktadır (125). Bu tedaviler, kanser hücrelerinin bağışıklık sistemine karşı geliştirdiği mekanizmaları aşarak, bağışıklık sisteminin kanserle etkili bir şekilde savaşmasını sağlayabilmektedir (126).

2011 yılında hem FDA hem de EMA, melanomlu hastalar için anti-CTLA-4 antikor tedavisi (ipilimumab) yani anti-PD-1 ve anti-PD-L1 gibi çeşitli bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri onaylanmış ve kullanılmıştır (127, 128). Tablo 1'de günümüzde onaylanmış çeşitli bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri ve bunların endikasyonları gösterilmektedir. Bu antikorlar, kanser hücrelerinin bağışıklık sisteminden kaçma mekanizmalarını bloke ederek, bağışıklık sisteminin kanserle savaşmasını teşvik etmektedir (129). Ancak, bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerinin etkinliği genellikle sınırlı veya geçici olabilir. Bu durum, antitümör immünitesinin karmaşıklığını ve kanser hücrelerinin çeşitli bağışıklık kaçış mekanizmalarını yansıtır. Örneğin, mikrosatellit stabil tümörlerde bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerinin etkisi daha azdır (131). Bu tümörler genellikle düşük antijenik kapasiteye sahiptir çünkü genetik olarak çok az anormallik gösterirler. Bu durum, tümörlerin kanser antijenine özgü T hücrelerini etkin bir şekilde indükleyememesine ve dolayısıyla bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerine yanıt vermeme riskini artırır (130). Ayrıca, immünsüpresif tümör mikroçevresi (TMO), bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerinin klinik etkilerini de olumsuz yönde etkileyebilmektedir. TMO, kanser hücrelerini çevreleyen destekleyici hücreler ve moleküllerin oluşturduğu ortamdır ve bağışıklık sisteminin tümörle etkili bir şekilde savaşmasını engelleyebilmektedir. Bu bağlamda, bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerinin kanser tedavisindeki potansiyeli ve sınırlamaları vurgulanmaktadır. Bu nedenle, kanser tedavisinde bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerinin kullanımı sırasında, tümör mikroçevresinin ve tümör antijenik yapısının dikkate alınması kritik önem taşır.

Bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri, kanser tedavisinde önemli bir yer edinmiş olsa da, tedavinin başarı şansını artırmak için daha fazla araştırma ve geliştirme gerekmektedir. Özellikle, bu tedavilerin kombinasyonları, yeni nesil immünoterapiler ve tümör mikroçevresinin modülasyonu üzerine yapılan çalışmalar, gelecekte kanser tedavisinde daha etkili stratejilerin geliştirilmesine yardımcı olabilir.

Tablo 1. Günümüzde onaylanmış kanser immünoterapilerinin listesi.

Nivolumab (Anti-PD-1 Ab)	Melanoma non-small cell lung cancer renal cell carcinoma Hodgkin's lymphoma Head neck cancer MSI-H/dMMR colorectal cancer hepatocellular carcinoma small cell lung cancer	Melanoma non-small cell lung cancer renal cell carcinoma Hodgkin's lymphoma Head neck cancer gastric cancer diffuse malignant pleural mesothelioma Esophageal cancer MSI-high colorectal cancer
Pembrolizumab (Anti-PD-1 Ab)	Melanoma non-small cell lung cancer Head neck cancer Hodgkin's lymphoma Urothelial cancer MSI-high colorectal cancer MSI-high cancer gastric cancer cervical cancer hepatocellular carcinoma Merkel cell carcinoma renal cell carcinoma endometrial cancer	Melanoma non-small cell lung cancer Urothelial cancer MSI-high solid tumor renal cell carcinoma * (combination) Head neck cancer ** (mono/combination)
Avelmab (Anti-PD-L1 Ab)	Merkel cell carcinoma renal cell carcinoma Urothelial cancer	Merkel cell carcinoma renal cell carcinoma * (combination)
Atezolizumab (Anti-PD-L1 Ab)	Urothelial cancer non-small cell lung cancer breast cencer small cell lung cancer	non-small cell lung cancer extensive-disease small cell lung cancer. triple negative breast cancer
Durvalumab (Anti-PD-L1 Ab)	Urothelial cancer non-small cell lung cancer	non-small cell lung cancer (stage 3)
Ipilimumab (Anti-CTLA4 Ab)	Melanoma renal cell carcinoma MSI-H/dMMR colorectal cancer	Melanoma *** (mono/combination) renal cell carcinoma **** (combination)
Kymriah (CAR-T)	B-ALL (<25 yars-old) DLBCL (Hodgkin's lymphoma)	B-ALL (<25 yars-old)
Yescarta (CAR-T)	DLBCL (Hodgkin's lymphoma)	not approved
Sipuleucel-T (Provenge) (DC-vaccine)	Prostate cancer	not approved

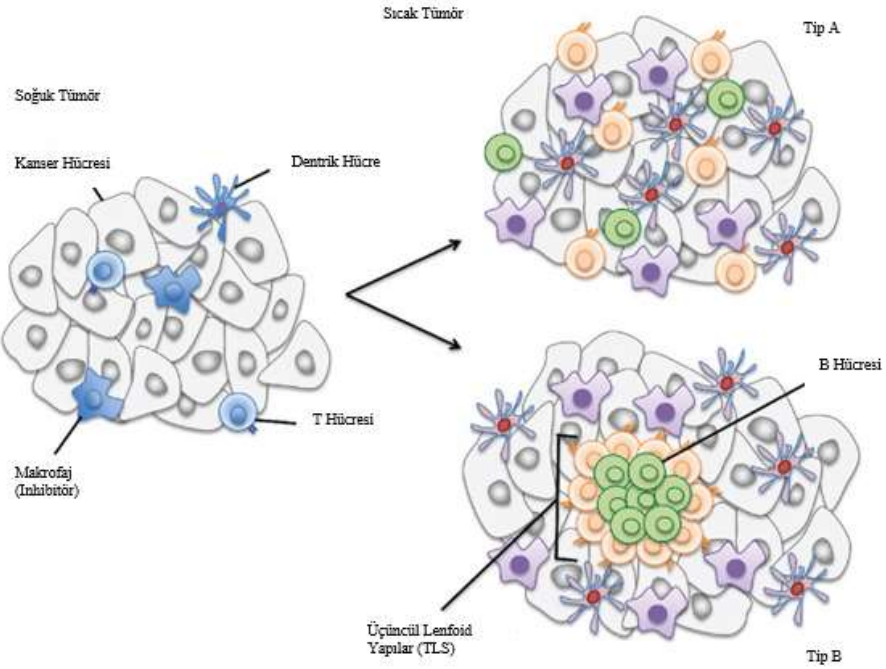
*Aksitinib kombinasyonu, ** monoterapi veya kemoterapi kombinasyonu, *** monoterapi veya nivolumab kombinasyonu, **** nivolumab

kombinasyonu. MSI-H/dMMR: Mikro Uydu Kararsızlığı-Yüksek/Eksik Uyumsuzluk Onarımı; B-ALL: B Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi; DLBCL: Yaygın Büyük B Hücreli Lenfoma; Ab: Antikor; PD-1: Programlanmış Ölüm-1; PD-L1: Programlanmış Ölüm Ligandı-1; CAR: Kimerik Antijen Reseptörü; DC: Dendritik Hücre; FDA: Gıda ve İlaç İdaresi; EMA: Avrupa İlaç Ajansı; MHLW: Sağlık, Çalışma ve Refah Bakanlığı.

6. Kanser İmmünoterapilerinin Gelecekteki Gelişimine Yönelik Zorluklar

Tümör mikroçevresindeki immun hücrelerin, özellikle tümör-infiltran lenfositlerin (TIL'ler) rolü, kanser immünoterapilerinin etkinliği üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Tümördeki TIL miktarı, hastaların prognozunu belirlemede ve immün kontrol noktası inhibitörlerinin etkinliğini öngörmede kritik bir parametre olarak kabul edilmektedir (132). Örneğin, immün kontrol noktası inhibitörleri genellikle "sıcak tümörler" olarak adlandırılan inflamatuar tümörlerde daha etkili olmaktadır (133-136). Bu tümörler, içerisinde aktif T hücreleri ve diğer immün hücrelerin bol miktarda bulunduğu tümörlerdir. Bu durum, immün kontrol noktası inhibitörlerinin işlevselliğinin, tümör mikroçevresindeki immün hücrelerin varlığına ve aktivitesine bağlı olduğunu göstermektedir. Diğer yandan, "soğuk tümörler" olarak adlandırılan tümörlerde intratumoral lenfosit infiltrasyonu daha azdır (137). Bu tür tümörlerde, immün kontrol noktası inhibitörlerinin etkinliği genellikle sınırlıdır çünkü bağışıklık sistemi tümöre karşı yeterince tepki gösteremez. Bu nedenle, kanser immünoterapisindeki ilerlemeler, tümörlere lenfosit infiltrasyonunu artırmaya yönelik stratejiler geliştirmeye odaklanmaktadır. Bu stratejiler, immün hücrelerin tümöre ulaşımını, birikimini ve etkinliğini artırmayı hedefler. Örneğin, TIL tedavisi gibi yaklaşımlar, hastanın kendi T hücrelerinin laboratuvar ortamında çoğaltılması ve tümöre geri verilmesiyle intratumoral lenfosit infiltrasyonunu artırabilir (Şekil 2).

Tümör mikroçevresindeki immun hücrelerin rolü, kanser immünoterapilerinin başarısını belirleyen önemli bir faktördür. Bu nedenle, immünoterapi tedavilerinin etkinliğini artırmak için tümöre özgü T hücre birikimini optimize etmeye yönelik çalışmalar hayati önem taşımaktadır.



Şekil 2. Tümörlerin immün hücre infiltrasyon düzeyine göre sınıflandırılması (145). "Soğuk tümör" olarak adlandırılan türler, bağışıklık hücrelerinin zayıf infiltrasyonu ile karakterizedir ve bu tür tümörler, bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerinin etkinliğine karşı dirençli olduğu bilinmektedir. Buna karşılık, "sıcak tümör" olarak adlandırılan türler, bağışıklık sistemi tarafından yoğun bir şekilde infiltrasyona uğramış hücrelerle karakterizedir ve bu tür tümörler, bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerine iyi yanıt verir. Son zamanlarda, "sıcak tümör, tip B" olarak bilinen üçüncül lenfoid yapıların, "sıcak tümör, tip A" olarak bilinen ayrışmış bağışıklık hücre infiltrasyonlarına kıyasla artan ilgi gördüğü bildirilmektedir.

CAR-T hücre tedavilerinin etkinliğini artırmak için sitokin ve kemokinle ilişkili genlerin modifikasyonunun önemli bir strateji olduğunu belirtmek önemlidir. Bu modifikasyonlar, uygulanan CAR-T hücrelerinin tümör

dokusuna daha etkin bir şekilde ulaşmasını ve bu dokuda etkili bir immün yanıt oluşturmasını sağlayabilir. Sitokinler ve kemokinler, bağışıklık hücrelerinin hareketini ve tümör içindeki konumlanmasını düzenleyen moleküllerdir. Dolayısıyla, bu genlerin modifikasyonuyla CAR-T hücrelerinin tümör içindeki etkinliği artırılabilir (138). Ancak, "soğuk tümörlerin" "sıcak tümörlere" dönüştürülmesi konusunda mevcut yöntemlerin sınırlı olduğu gerçeği de vurgulanmalıdır. Soğuk tümörler, bağışıklık hücrelerinin zayıf veya sınırlı infiltrasyon gösterdiği tümörlerdir ve bu tür tümörler bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri gibi standart immünoterapi tedavilerine genellikle dirençlidir. Bu nedenle, soğuk tümörlerin sıcak tümörlere dönüşümü için yeni ve etkili stratejilere ihtiyaç vardır (145). Kanser aşıları ve ex vivo genetik modifikasyon gibi immünoterapötik yaklaşımların kombinasyonu, tümörlerde lenfositlerin etkin bir şekilde toplanması ve birikmesi için umut vadeden bir yol olabilir. Bu yaklaşımlar, tümör mikroçevresini değiştirerek bağışıklık hücrelerinin tümöre karşı daha iyi bir yanıt göstermesini sağlayabilir. Ancak, bu alanda daha fazla araştırma yapılması ve yeni stratejilerin geliştirilmesi gerekmektedir (145).

CAR-T hücre tedavileri ve diğer immünoterapötik yöntemlerin tümör tedavisindeki etkinliğini artırmak için lenfosit toplanması ve tümöre infiltrasyonunu artırmaya yönelik çabalar kritik öneme sahiptir. Bu çabalar, kanser tedavisindeki yeni nesil immünoterapi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir.

6.1. Tersiyer Lenfoid Yapıların İndüksiyonu (TLS)

Tümörlerdeki lenfoid foliküller TLS olarak bilinmektedir ve birçok kanser türünde daha iyi bir prognozla ilişkilendirilmiştir (139, 140). Bu yapıların oluşumu için CCL19, CCL21, CXCL12, CXCL13, LIGHT ve lenfotoksin gibi faktörlerin etkili olduğu belirtilmiştir (141-144). Özellikle farelerde yapılan çalışmalarda lenfoid foliküllerin indüksiyonuna dair bazı temel bulgular elde edilmiş olsa da, insanlarda klinik uygulamada kullanılabilir

yöntemler henüz geliştirilmemiştir (145). Mevcut çabalar genellikle tek bir faktöre odaklandığından, tümör mikroçevresindeki karmaşık mekanizmalar nedeniyle TLS indüksiyonunun başarısız olabileceği vurgulanmaktadır. Önümüzdeki dönemde, insanlarda TLS'yi etkin bir şekilde indüklemeye yönelik yeni yöntemler geliştirilmesi gerekmektedir. Bu yeni yöntemlerin kanser aşıları, bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri gibi diğer immünoterapilerle birleştirildiğinde, tümörlerin kontrol edilmesi ve tedavi edilmesinde umut verici bir yaklaşım olabileceği düşünülmektedir. Bu yaklaşım, tümörlerin immün sistemin etkili bir şekilde hedef alınması ve tedavi edilmesi için potansiyel sağlayabilmektedir.

Lenfoid foliküllerin (TLS) tümörlerde oluşumu ve bu yapıların kanser prognozuyla ilişkilendirilmesi (139,140), immünoloji alanında son yıllarda önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir. TLS'ler, tümör mikroçevresinde immün yanıtların düzenlenmesinde önemli rol oynayan organoid benzeri yapılar olarak kabul edilir. Bu yapıların oluşumu için CCL19, CCL21, CXCL12, CXCL13, LIGHT ve lenfotoksin gibi faktörlerin etkili olduğu bilinmektedir. Bu moleküller, lenfoid hücrelerin tümör bölgesine çekilmesini ve organizasyonunu sağlayarak antitümör immün yanıtların oluşumuna katkıda bulunur (141-144).

Farelerde yapılan çalışmalar (145), TLS'lerin indüksiyonu üzerine bazı temel bulgular sağlamış olsa da, insanlarda bu yapıların klinik uygulamada kullanılabilirliği için henüz yeterli yöntemler geliştirilmemiştir. Mevcut çabalar genellikle tek bir faktöre odaklanmış durumda olduğundan, tümör mikroçevresindeki karmaşık mekanizmalar nedeniyle TLS indüksiyonunun başarısız olabileceği vurgulanmaktadır (145). Bu noktada, tümörlerde TLS'lerin etkin bir şekilde indüklenmesi için yeni ve çoklu faktörlü yöntemler geliştirilmesi gerekmektedir. TLS'lerin klinik önemi, özellikle kanser tedavilerinde umut verici bir strateji olabileceği düşüncesini güçlendirir. TLS'lerin tümör mikroçevresinde oluşumu, bağışıklık kontrol noktası

inhibitörleri gibi immünoterapilerle birleştirildiğinde, tümörlerin immün sistem tarafından daha etkili bir şekilde tanınmasını ve yok edilmesini sağlayabilir. Bu yaklaşım, kanser aşılarıyla birlikte kullanıldığında, tümörlerin kontrol edilmesinde ve tedavi edilmesinde yeni bir strateji sunabilir.

Özetle, TLS'lerin tümör mikroçevresinde indüksiyonu ve bu yapıların immün yanıtları nasıl şekillendirebileceği konusundaki araştırmalar, kanser immünoterapisindeki ilerlemeler için önemli bir adım olabilir. Gelecekte, bu yapıların klinik uygulamaya adapte edilmesi ve kanser tedavisindeki etkinliğinin daha geniş hasta grupları üzerinde değerlendirilmesi önemli bir hedef olarak görülmektedir.

7. Sonuç

Kanser immünoterapisindeki gelişmeler, özellikle bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri ve kanser aşıları gibi yenilikçi yaklaşımların klinik uygulamasıyla büyük bir ilerleme kaydetmiştir. Bu tedavi yöntemleri, bağışıklık sisteminin kanser hücrelerini tanımasını ve yok etmesini teşvik ederek, birçok kanser türünde tedavi seçeneklerini önemli ölçüde genişletmiştir. Son yıllarda RNA teknolojisindeki ilerlemeler, kanser aşılarının etkinliğini artırmak için büyük bir potansiyel sunmaktadır. Bu teknoloji, tümör spesifik antijenlerin hızlı bir şekilde keşfedilmesini sağlayarak, kişiye özgü kanser aşılarının geliştirilmesinde yeni bir çağ açabilir. Ancak, kanser aşılarının etkinliği üzerinde belirsizlikler ve sınırlamalar bulunmaktadır. Hangi antijenlerin hangi kanser türlerinde etkili olacağı henüz tam olarak belirlenmemiştir. Ayrıca, tümör hücrelerinin immün sistemin antitümör etkilerinden kaçınmak için geliştirdiği çeşitli mekanizmalar, bu tedavi yaklaşımlarının etkinliğini sınırlayabilir. Bu mekanizmalar arasında immünsüpresif tümör mikroortamı, immünoterapilerin etkinliğini azaltabilen bir faktör olarak öne çıkmaktadır. Bu zorlukların üstesinden gelmek ve kanser immünoterapisini daha etkili hale getirmek için, tümör mikroortamını ve tümör

hücrelerinin immün kaçınma mekanizmalarını daha ayrıntılı olarak anlamak önemlidir. Bu anlayışı geliştirmek için geniş kapsamlı araştırmalar ve yeni tedavi stratejileri geliştirilmesi gerekmektedir. Özellikle, kombinasyon tedavileri ve çeşitli immünoterapötik yaklaşımların entegrasyonu, kanser tedavisindeki çok yönlülüğü artırabilir ve tedavi sonuçlarını iyileştirebilir.

Sonuç olarak, kanser immünoterapilerindeki ilerlemeler ve gelecekteki potansiyel, hastalar için umut verici bir alan sunmaktadır. Ancak, mevcut sınırlamaların aşılması ve yeni stratejilerin geliştirilmesi için sürekli olarak çalışılması gerekmektedir. Bu çaba, kanser tedavisindeki devrim niteliğindeki değişimlerin önünü açabilir ve hastaların yaşam kalitesini önemli ölçüde artırabilir.

Referanslar

1. WHO, *Assessment reports of the Global Vaccine Action Plan*, 2018, World Health Organization, Geneva, https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/276967/WHO-IVB-18.11-eng.pdf?ua=1.
2. Immunology and Vaccine-Preventable Diseases, *Principles of Vaccination*, Pink Book, https://www.cdc.gov/vaccines/Pubs/pinkbook/downloads/prinvac.pdf.
3. Sallusto F., Lanzavecchia A., Araki K., and Ahmed R., From vaccines to memory and back, *Immunity*. (2010) 33, no. 4, 451–463, https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.008, 2-s2.0-77958492018, 21029957.
4. WHO, *Vaccines and immunization*, World Health Organization, https://www.who.int/health-topics/vaccines-and-immunization#tab=tab_1.
5. Rich R. R., The human immune response, *Clinical Immunology*, 2019, 3–17, https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6896-6.00001-6.
6. Goldszmid R. S., Dzutsev A., and Trinchieri G., Host immune response to infection and cancer: unexpected commonalities, *Cell Host & Microbe*. (2014) 15, no. 3, 295–305, https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.003, 2-s2.0-84896098517, 24629336.
7. Waldman A. D., Fritz J. M., and Lenardo M. J., A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice, *Nature Reviews Immunology*. (2020) 1–18, https://doi.org/10.1038/s41577-020-0306-5.
8. Esfahani K., Roudaia L., Buhlaiga N., del Rincon S., Papneja N., and Miller Jr W. H., A review of cancer immunotherapy: from the past, to the

present, to the future, *Current Oncology*. (2020) 27, no. Supplement 2, S87–S97, https://doi.org/10.3747/co.27.5223, 32368178.

9. Hegde P. S. and Chen D. S., Top 10 challenges in cancer immunotherapy, *Immunity*. (2020) 52, no. 1, 17–35, https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.12.011, 31940268.
10. Coley W. B., II. Contribution to the knowledge of sarcoma, *Annals of Surgery*. (1891) 14, no. 3, 199–220, https://doi.org/10.1097/00000658-189112000-00015, 17859590.
11. Cramer D. W., Vitonis A. F., Pinheiro S. P., McKolanis J. R., Fichorova R. N., Brown K. E., Hatchette T. F., and Finn O. J., Mumps and ovarian cancer: modern interpretation of an historic association, *Cancer Causes & Control*. (2010) 21, no. 8, 1193–1201, https://doi.org/10.1007/s10552-010-9546-1, 2-s2.0-77955712706, 20559706.
12. Morales D. E., Eidinger D., and Bruce A. W., Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors, *Journal of Urology*. (1976) 116, no. 2, 180–182, https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)58737-6, 820877.
13. Kamat M., Bellmunt J., Galsky M. D., Konety B. R., Lamm D. L., Langham D., Lee C. T., Milowsky M. I., O'Donnell M. A., O'Donnell P. H., Petrylak D. P., Sharma P., Skinner E. C., Sonpavde G., Taylor J. A., Abraham P., and Rosenberg J. E., Society for immunotherapy of cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of bladder carcinoma, *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. (2017) 5, no. 1, https://doi.org/10.1186/s40425-017-0271-0, 2-s2.0-85027281463, 28807024.
14. Garbuglia A. R., Lapa D., Sias C., Capobianchi M. R., and del Porto P., The use of both therapeutic and prophylactic vaccines in the therapy of

papillomavirus disease, *Frontiers in Immunology*. 11, https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00188.

15. Nguyen M. H., Wong G., Gane E., Kao J. H., and Dusheiko G., Hepatitis B virus: advances in prevention, diagnosis, and therapy, *Clinical Microbiology Reviews*. (2020) 33, no. 2, https://doi.org/10.1128/CMR.00046-19, 32102898.

16. Dunn G. P., Bruce A. T., Ikeda H., Old L. J., and Schreiber R. D., Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape, *Nature Immunology*. (2002) 3, no. 11, 991–998, https://doi.org/10.1038/ni1102-991, 2-s2.0-0036852241, 12407406.

17. Chen L. and Flies D. B., Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition, *Nature Reviews Immunology*. (2013) 13, no. 4, 227–242, https://doi.org/10.1038/nri3405, 2-s2.0-84875463042, 23470321.

18. Lindau D., Gielen P., Kroesen M., Wesseling P., and Adema G. J., The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells, *Immunology*. (2013) 138, no. 2, 105–115, https://doi.org/10.1111/imm.12036, 2-s2.0-84872559040, 23216602.

19. Berger M., Kreutz F. T., Horst J. L., Baldi A. C., and Koff W. J., Phase I study with an autologous tumor cell vaccine for locally advanced or metastatic prostate cancer, *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. (2007) 10, no. 2, 144–152.

20. Harris J. E., Ryan L., Hoover H. C., Stuart R. K., Oken M. M., Benson A. B., Mansour E., Haller D. G., Manola J., and Hanna M. G., Adjuvant active specific immunotherapy for stage II and III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: Eastern Cooperative Oncology Group Study E5283, *Journal of Clinical Oncology*. (2000) 18, no. 1, 148–157, https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.1.148, 10623705.

21.Maver C. and McKneally M., Preparation of autologous tumor cell vaccine from human lung cancer, *Cancer Research*. (1979) 39, no. 8.

22.Schulof R. S., Mai D., Nelson M. A., Paxton H. M., Cox JW Jr, Turner M. L., Mills M., Hix W. R., Nochomovitz L. E., and Peters L. C., Active specific immunotherapy with an autologous tumor cell vaccine in patients with resected non-small cell lung cancer, *Molecular Biotherapy*. (1988) 1, no. 1, 30–36, 2855788.

23.Nemunaitis J. and Nemunaitis J., Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-transfected autologous tumor cell vaccine: focus on non-small-cell lung cancer, *Clinical Lung Cancer*. (2003) 5, no. 3, 148–157, https://doi.org/10.3816/CLC.2003.n.027, 2-s2.0-0347600569, 14667270.

24.Rüttinger D., van den Engel N. K., Winter H., Schlemmer M., Pohla H., Grützner S., Wagner B., Schendel D. J., Fox B. A., Jauch K.-W., and Hatz R. A., Adjuvant therapeutic vaccination in patients with non-small cell lung cancer made lymphopenic and reconstituted with autologous PBMC: first clinical experience and evidence of an immune response, *Journal of Translational Medicine*. (2007) 5, no. 1, https://doi.org/10.1186/1479-5876-5-43, 2-s2.0-35348883568.

25.de Weger V. A., Turksma A. W., Voorham Q. J. M., Euler Z., Bril H., van den Eertwegh A. J., Bloemena E., Pinedo H. M., Vermorken J. B., van Tinteren H., Meijer G. A., and Hooijberg E., Clinical effects of adjuvant active specific immunotherapy differ between patients with microsatellite-stable and microsatellite-instable colon cancer, *Clinical Cancer Research*. (2012) 18, no. 3, 882–889, https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1716, 2-s2.0-84856551463, 22156611.

26.Hanna M. G., Hoover H. C., Vermorken J. B., Harris J. E., and Pinedo H. M., Adjuvant active specific immunotherapy of stage II and stage III

colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: first randomized phase III trials show promise, *Vaccine*. (2001) 19, no. 17–19, 2576–2582, https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00485-0, 2-s2.0-0035925638, 11257395.

27.Ockert D., Schirrmacher V., Beck N., Stoelben E., Ahlert T., Flechtenmacher J., Hagmüller E., Buchcik R., Nagel M., and Saeger H. D., Newcastle disease virus-infected intact autologous tumor cell vaccine for adjuvant active specific immunotherapy of resected colorectal carcinoma, *Clinical Cancer Research*. (1996) 2, no. 1, 21–28, 9816085.

28.Baars A., van Riel J. M. G. H., Cuesta M. A., Jaspars E. H., Pinedo H. M., and van den Eertwegh A. J. M., Metastasectomy and active specific immunotherapy for a large single melanoma metastasis, *Hepato-Gastroenterology*. (2002) 49, no. 45, 691–693, 12063971.

29.Berd D., Maguire H. C., McCue P., and Mastrangelo M. J., Treatment of metastatic melanoma with an autologous tumor-cell vaccine: clinical and immunologic results in 64 patients, *Journal of Clinical Oncology*. (1990) 8, no. 11, 1858–1867, https://doi.org/10.1200/JCO.1990.8.11.1858, 2-s2.0-0025147441, 2230873.

30.Méndez R., Ruiz-Cabello F., Rodríguez T., Del Campo A., Paschen A., Schadendorf D., and Garrido F., Identification of different tumor escape mechanisms in several metastases from a melanoma patient undergoing immunotherapy, *Cancer Immunology Immunotherapy*. (2007) 56, no. 1, 88–94, https://doi.org/10.1007/s00262-006-0166-2, 2-s2.0-33751383080, 16622680.

31.Antonia S. J., Seigne J., Diaz J., Muro-Cacho C., Extermann M., Farmelo M. J., Friberg M., Alsarraj M., Mahany J. J., Pow-Sang J., Cantor A., and Janssen W., Phase I trial of a B7-1 (CD80) gene modified autologous

tumor cell vaccine in combination with systemic interleukin-2 in patients with metastatic renal cell carcinoma, *Journal of Urology*. (2002) 167, no. 5, 1995–2000, 11956426, https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)65071-9, 2-s2.0-0036223749.

32.Fishman M., Hunter T. B., Soliman H., Thompson P., Dunn M., Smilee R., Farmelo M. J., Noyes D. R., Mahany J. J., Lee J. H., Cantor A., Messina J., Seigne J., Pow-Sang J., Janssen W., and Antonia S. J., Phase II trial of B7-1 (CD-86) transduced, cultured autologous tumor cell vaccine plus subcutaneous interleukin-2 for treatment of stage IV renal cell carcinoma, *Journal of Immunotherapy*. (2008) 31, no. 1, 72–80, https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e31815ba792, 2-s2.0-40749088132, 18157014.

33.Kinoshita Y., Kono T., Yasumoto R., Kishimoto T., Wang C. Y., Haas G. P., and Nishisaka N., Antitumor effect on murine renal cell carcinoma by autologous tumor vaccines genetically modified with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 cells, *Journal of Immunotherapy*. (2001) 24, no. 3, 205–211, https://doi.org/10.1097/00002371-200105000-00003, 2-s2.0-0035020885, 11395635.

34.Tani K., Azuma M., Nakazaki Y., Oyaizu N., Hase H., Ohata J., Takahashi K., OiwaMonna M., Hanazawa K., Wakumoto Y., Kawai K., Noguchi M., Soda Y., Kunisaki R., Watari K., Takahashi S., Machida U., Satoh N., Tojo A., Maekawa T., Eriguchi M., Tomikawa S., Tahara H., Inoue Y., Yoshikawa H., Yamada Y., Iwamoto A., Hamada H., Yamashita N., Okumura K., Kakizoe T., Akaza H., Fujime M., Clift S., Ando D., Mulligan R., and Asano S., Phase I study of autologous tumor vaccines transduced with the GM-CSF gene in four patients with stage IV renal cell cancer in Japan: clinical and immunological findings, *Molecular Therapy*. (2004) 10, no. 4, 799–

816, https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.07.001, 2-s2.0-4644299284, 15451464.

35. Asada H., Kishida T., Hirai H., Satoh E., Ohashi S., Takeuchi M., Kubo T., Kita M., Iwakura Y., Imanishi J., and Mazda O., Significant antitumor effects obtained by autologous tumor cell vaccine engineered to secrete interleukin (IL)-12 and IL-18 by means of the EBV/lipoplex, *Molecular Therapy*. (2002) 5, no. 5, 609–616, https://doi.org/10.1006/mthe.2002.0587, 2-s2.0-0036099019.

36. Dranoff G., Jaffee E., Lazenby A., Golumbek P., Levitsky H., Brose K., Jackson V., Hamada H., Pardoll D., and Mulligan R. C., Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (1993) 90, no. 8, 3539–3543, https://doi.org/10.1073/pnas.90.8.3539, 2-s2.0-0027538181, 8097319.

37. Mach N., Gillessen S., Wilson S. B., Sheehan C., Mihm M., and Dranoff G., Differences in dendritic cells stimulated in vivo by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand, *Cancer Research*. (2000) 60, no. 12, 3239–3246, 10866317.

38. Salgia R., Lynch T., Skarin A., Lucca J., Lynch C., Jung K., Hodi F. S., Jaklitsch M., Mentzer S., Swanson S., Lukanich J., Bueno R., Wain J., Mathisen D., Wright C., Fidias P., Donahue D., Clift S., Hardy S., Neuberg D., Mulligan R., Webb I., Sugarbaker D., Mihm M., and Dranoff G., Vaccination with irradiated autologous tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments antitumor immunity in some patients with metastatic non-small-cell lung carcinoma, *Journal of Clinical Oncology*. (2003) 21, no.

4, 624–630, https://doi.org/10.1200/JCO.2003.03.091, 2-s2.0-0037441842, 12586798.

39.Jaffee E. M., Hruban R. H., Biedrzycki B., Laheru D., Schepers K., Sauter P. R., Goemann M., Coleman J., Grochow L., Donehower R. C., Lillemoe K. D., O'Reilly S., Abrams R. A., Pardoll D. M., Cameron J. L., and Yeo C. J., Novel allogeneic granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor vaccine for pancreatic cancer: a phase I trial of safety and immune activation, *Journal of Clinical Oncology*. (2001) 19, no. 1, 145–156, https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.1.145, 2-s2.0-0035152718, 11134207.

40.Nemunaitis J., Jahan T., Ross H., Sterman D., Richards D., Fox B., Jablons D., Aimi J., Lin A., and Hege K., Phase 1/2 trial of autologous tumor mixed with an allogeneic GVAX® vaccine in advanced-stage non-small-cell lung cancer, *Cancer Gene Therapy*. (2006) 13, no. 6, 555–562, https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700922, 2-s2.0-33646776056, 16410826.

41.Arlen P. M., Mohebtash M., Madan R. A., and Gulley J. L., Promising novel immunotherapies and combinations for prostate cancer, *Future Oncology*. (2009) 5, no. 2, 187–196, https://doi.org/10.2217/14796694.5.2.187, 2-s2.0-66349097221, 19284377.

42.Morton D. L., Foshag L. J., Hoon D. S. B., Nizze J. A., Wanek L. A., Chang C., Davtyan D. G., Gupta R. K., Elashoff R., and Irie R. F., Prolongation of Survival in Metastatic Melanoma after Active Specific Immunotherapy With a New Polyvalent Melanoma Vaccine, *Annals of Surgery*. (1992) 216, no. 4, 463–482, https://doi.org/10.1097/00000658-199210000-00010, 2-s2.0-0026802163, 1417196.

43.Simons J. W., Phase I/II trial of an allogeneic cellular immunotherapy in Hormone-Naive prostate cancer, *Clinical Cancer Research*. (2006) 12,

no. 11, 3394–3401, https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0145, 2-s2.0-33745219416.

44.Small E. J., Sacks N., Nemunaitis J., Urba W. J., Dula E., Centeno A. S., Nelson W. G., Ando D., Howard C., Borellini F., Nguyen M., Hege K., and Simons J. W., Granulocyte macrophage colony-stimulating Factor-Secreting allogeneic cellular immunotherapy for hormone-refractory prostate cancer, *Clinical Cancer Research*. (2007) 13, no. 13, 3883–3891, https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2937, 2-s2.0-34447123763, 17606721.

45.Emens L. A., Asquith J. M., Leatherman J. M., Kobrin B. J., Petrik S., Laiko M., Levi J., Daphtary M. M., Biedrzycki B., Wolff A. C., Stearns V., Disis M. L., Ye X., Piantadosi S., Fetting J. H., Davidson N. E., and Jaffee E. M., Timed sequential treatment with cyclophosphamide, doxorubicin, and an allogeneic granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-secreting breast tumor vaccine: a chemotherapy dose-ranging factorial study of safety and immune activation, *Journal of Clinical Oncology*. (2009) 27, no. 35, 5911–5918, https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.3494, 2-s2.0-73349084990, 19805669.

46.Lutz E., Yeo C. J., Lillemoe K. D., Biedrzycki B., Kobrin B., Herman J., Sugar E., Piantadosi S., Cameron J. L., Solt S., Onners B., Tartakovsky I., Choi M., Sharma R., Illei P. B., Hruban R. H., Abrams R. A., le D., Jaffee E., and Laheru D., A lethally irradiated allogeneic granulocyte-macrophage colony stimulating factor-secreting tumor vaccine for pancreatic adenocarcinoma. A phase II trial of safety, efficacy, and immune activation, *Annals of Surgery*. (2011) 253, no. 2, 328–335, https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3181fd271c, 2-s2.0-79151486551, 21217520.

47.van den Eertwegh A. J. M., Versluis J., van den Berg H. P., Santegoets S. J. A. M., van Moorselaar R. J. A., van der Sluis T. M., Gall H. E., Harding T. C., Jooss K., Lowy I., Pinedo H. M., Scheper R. J., Stam A. G. M., von Blomberg B. M. E., de Gruijl T. D., Hege K., Sacks N., and Gerritsen W. R., Combined immunotherapy with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced allogeneic prostate cancer cells and ipilimumab in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: a phase 1 dose-escalation trial, *Lancet Oncology*. (2012) 13, no. 5, 509–517, https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70007-4, 2-s2.0-84860436621, 22326922.

48.Wang X.-Y., Zuo D., Sarkar D., and Fisher P. B., Blockade of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 as a new therapeutic approach for advanced melanoma, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. (2011) 12, no. 17, 2695–2706, https://doi.org/10.1517/14656566.2011.629187, 2-s2.0-81255188604, 22077831.

49.Nestle F. O., Alijagic S., Gilliet M., Sun Y., Grabbe S., Dummer R., Burg G., and Schadendorf D., Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumorlysate-pulsed dendritic cells, *Nature Medicine*. (1998) 4, no. 3, 328–332, https://doi.org/10.1038/nm0398-328, 2-s2.0-0031941423, 9500607.

50.Steinman R. M. and Banchereau J., Taking dendritic cells into medicine, *Nature*. (2007) 449, no. 7161, 419–426, https://doi.org/10.1038/nature06175, 2-s2.0-34848837386, 17898760.

51.Li D., Romain G., Flamar A.-L., Duluc D., Dullaers M., Li X.-H., Zurawski S., Bosquet N., Palucka A. K., Le Grand R., O'Garra A., Zurawski G., Banchereau J., and Oh S. K., Targeting self- and foreign antigens to dendritic cells via DC-ASGPR generates IL-10-producing suppressive CD4+ T cells, *Journal of Experimental Medicine*. (2012) 209, no.

1, 109–121, https://doi.org/10.1084/jem.20110399, 2-s2.0-84863116620, 22213806.

52.Small E. J., Fratesi P., Reese D. M., Strang G., Laus R., Peshwa M. V., and Valone F. H., Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells, *Journal of Clinical Oncology*. (2000) 18, no. 23, 3894–3903, https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.23.3894, 2-s2.0-0034554863, 11099318.

53.Meena N., Mathur P., Medicherla K. M., and Suravajhala P., A bioinformatics pipeline for whole exome sequencing: overview of the processing and steps from raw data to downstream analysis, *bioRxiv*. https://doi.org/10.1101/201145.

54.Tsoi L. C., Wolf B., and Chen Y. A., The promise of genomic studies on human diseases: from basic science to clinical application, *International Journal of Genomics*. (2017) 2017, 2, 7983236, https://doi.org/10.1155/2017/5093167, 2-s2.0-85037152290, 28848759.

55.Roudko V., Greenbaum B., and Bhardwaj N., Computational prediction and validation of tumor-associated neoantigens, *Frontiers in Immunology*. (2020) 11, https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00027.

56.Buonaguro L., Petrizzo A., Tornesello M. L., and Buonaguro F. M., Translating tumor antigens into cancer vaccines, *Clinical & Vaccine Immunology*. (2011) 18, no. 1, 23–34, https://doi.org/10.1128/CVI.00286-10, 2-s2.0-78650919399, 21048000.

57.Melero I., Gaudernack G., Gerritsen W., Huber C., Parmiani G., Scholl S., Thatcher N., Wagstaff J., Zielinski C., Faulkner I., and Mellstedt H., Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials, *Nature Reviews Clinical Oncology*. (2014) 11, no. 9, 509–

524, https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.111, 2-s2.0-85047692172, 25001465.

58.Melief C. J. M. and van der Burg S. H., Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines, *Nature Reviews Cancer*. (2008) 8, no. 5, 351–360, https://doi.org/10.1038/nrc2373, 2-s2.0-42549138499, 18418403.

59.Marincola F. M., Jaffee E. M., Hicklin D. J., and Ferrone S., Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance, *Advances in Immunology*. (1999) 74, 181–273, https://doi.org/10.1016/s0065-2776(08)60911-6.

60.Bijker M. S., van den Eeden S. J. F., Franken K. L., Melief C. J. M., van der Burg S. H., and Offringa R., Superior induction of anti-tumor CTL immunity by extended peptide vaccines involves prolonged, DC-focused antigen presentation, *European Journal of Immunology*. (2008) 38, no. 4, 1033–1042, https://doi.org/10.1002/eji.200737995, 2-s2.0-44849109375, 18350546.

61.Hailemichael Y., Dai Z., Jaffarzad N., Ye Y., Medina M. A., Huang X. F., Dorta-Estremera S. M., Greeley N. R., Nitti G., Peng W., Liu C., Lou Y., Wang Z., Ma W., Rabinovich B., Sowell R. T., Schluns K. S., Davis R. E., Hwu P., and Overwijk W. W., Persistent antigen at vaccination sites induces tumor-specific $CD8^+$ T cell sequestration, dysfunction and deletion, *Nature Medicine*. (2013) 19, no. 4, 465–472, https://doi.org/10.1038/nm.3105, 2-s2.0-84878469107, 23455713.

62.Bijker M. S., van den Eeden S. J. F., Franken K. L., Melief C. J. M., Offringa R., and van der Burg S. H., CD8+ CTL Priming by Exact Peptide Epitopes in Incomplete Freund's Adjuvant Induces a Vanishing CTL Response, whereas Long Peptides Induce Sustained CTL Reactivity, *The Journal of Immunology*. (2007) 179, no. 8, 5033–

5040, https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.8.5033, 2-s2.0-38449106129, 17911588.

63.Janssen E. M., Droin N. M., Lemmens E. E., Pinkoski M. J., Bensinger S. J., Ehst B. D., Griffith T. S., Green D. R., and Schoenberger S. P., CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death, *Nature*. (2005) 434, no. 7029, 88–93, https://doi.org/10.1038/nature03337, 2-s2.0-14544288632, 15744305.

64.Rosalia R. A., Quakkelaar E. D., Redeker A., Khan S., Camps M., Drijfhout J. W., Silva A. L., Jiskoot W., van Hall T., van Veelen P. A., Janssen G., Franken K., Cruz L. J., Tromp A., Oostendorp J., van der Burg S. H., Ossendorp F., and Melief C. J. M., Dendritic cells process synthetic long peptides better than whole protein, improving antigen presentation and T-cell activation, *European Journal of Immunology*. (2013) 43, no. 10, 2554–2565, https://doi.org/10.1002/eji.201343324, 2-s2.0-84885723472, 23836147.

65.Drake C. G., Lipson E. J., and Brahmer J. R., Breathing new life into immunotherapy: review of melanoma, lung and kidney cancer, *Nature Reviews Clinical Oncology*. (2014) 11, no. 1, 24–37, https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.208, 2-s2.0-84890980389, 24247168.

66.Liu L., Chen Q., Ruan C., Chen X., Zhang Y., He X., Zhang Y., Lu Y., Guo Q., Sun T., Wang H., and Jiang C., Platinum-based nanovectors engineered with Immuno-modulating adjuvant for inhibiting tumor growth and promoting immunity, *Theranostics*. (2018) 8, no. 11, 2974–2987, https://doi.org/10.7150/thno.24110, 2-s2.0-85046077260, 29896297.

67.Hos B. J., Tondini E., van Kasteren S. I., and Ossendorp F., Approaches to improve chemically defined synthetic peptide vaccines, *Frontiers in*

Immunology. (2018) 9, 884–891, https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00884, 2-s2.0-85046074426.

68. Varypataki E. M., Benne N., Bouwstra J., Jiskoot W., and Ossendorp F., Efficient eradication of established tumors in mice with cationic liposome-based synthetic long-peptide vaccines, *Cancer Immunology Research*. (2017) 5, no. 3, 222–233, https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0283, 2-s2.0-85016089187, 28143806.

69. Aurisicchio L. and Ciliberto G., Genetic cancer vaccines: current status and perspectives, *Expert Opinion on Biological Therapy*. (2012) 12, no. 8, 1043–1058, https://doi.org/10.1517/14712598.2012.689279, 2-s2.0-84863795689.

70. Jorritsma S. H. T., Gowans E. J., Grubor-Bauk B., and Wijesundara D. K., Delivery methods to increase cellular uptake and immunogenicity of DNA vaccines, *Vaccine*. (2016) 34, no. 46, 5488–5494, https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.09.062, 2-s2.0-84992358958, 27742218.

71. Ferraro B., Morrow M. P., Hutnick N. A., Shin T. H., Lucke C. E., and Weiner D. B., Clinical applications of DNA vaccines: current progress, *Clinical Infectious Diseases*. (2011) 53, no. 3, 296–302, https://doi.org/10.1093/cid/cir334, 2-s2.0-79960750673, 21765081.

72. Sardesai N. Y. and Weiner D. B., Electroporation delivery of DNA vaccines: prospects for success, *Current Opinion in Immunology*. (2011) 23, no. 3, 421–429, https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.03.008, 2-s2.0-79957781340, 21530212.

73. Trimble C. L., Morrow M. P., Kraynyak K. A., Shen X., Dallas M., Yan J., Edwards L., Parker R. L., Denny L., Giffear M., Brown A. S., Marcozzi-Pierce K., Shah D., Slager A. M., Sylvester A. J., Khan A., Broderick K. E., Juba R. J., Herring T. A., Boyer J., Lee J., Sardesai

N. Y., Weiner D. B., and Bagarazzi M. L., Safety, efficacy, and immunogenicity of VGX-3100, a therapeutic synthetic DNA vaccine targeting human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 proteins for cervical intraepithelial neoplasia 2/3: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial, *Lancet*. (2015) 386, no. 10008, 2078–2088, https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00239-1, 2-s2.0-84947869406, 26386540.

74.Espuelas S., Roth A., Thumann C., Frisch B., and Schuber F., Effect of synthetic lipopeptides formulated in liposomes on the maturation of human dendritic cells, *Molecular Immunology*. (2005) 42, no. 6, 721–729, https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.09.022, 2-s2.0-15244342229, 15781116.

75.Fotin-Mleczek M., Zanzinger K., Heidenreich R., Lorenz C., Thess A., Duchardt K. M., and Kallen K. J., Highly potent mRNA based cancer vaccines represent an attractive platform for combination therapies supporting an improved therapeutic effect, *Journal of Gene Medicine*. (2012) 14, no. 6, 428–439, https://doi.org/10.1002/jgm.2605, 2-s2.0-84862891254, 22262664.

76.Qiu P., Ziegelhoffer P., Sun J., and Yang N. S., Gene gun delivery of mRNA in situ results in efficient transgene expression and genetic immunization, *Gene Therapy*. (1996) 3, no. 3, 262–268, 8646558.

77.Scheel B., Teufel R., Probst J., Carralot J. P., Geginat J., Radsak M., Jarrossay D., Wagner H., Jung G., Rammensee H. G., Hoerr I., and Pascolo S., Toll-like receptor-dependent activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA, *European Journal of Immunology*. (2005) 35, no. 5, 1557–1566, https://doi.org/10.1002/eji.200425656, 2-s2.0-21044440406, 15832293.

78.Pascolo S., Vaccination with messenger RNA (mRNA), *Handbook of Experimental Pharmacology*. (2008) 183, no. 183, 221–235, https://doi.org/10.1007/978-3-540-72167-3_11.

79.Weide B., Carralot J.-P., Reese A., Scheel B., Eigentler T. K., Hoerr I., Rammensee H.-G., Garbe C., and Pascolo S., Results of the first phase I/II clinical vaccination trial with direct injection of mRNA, *Journal of Immunotherapy*. (2008) 31, no. 2, 180–188, https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e31815ce501, 2-s2.0-44949195901, 18481387.

80.Weide B., Pascolo S., Scheel B., Derhovanessian E., Pflugfelder A., Eigentler T. K., Pawelec G., Hoerr I., Rammensee H. G., and Garbe C., Direct injection of protamine-protected mRNA: results of a phase 1/2 vaccination trial in metastatic melanoma patients, *Journal of Immunotherapy*. (2009) 32, no. 5, 498–507, https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e3181a00068, 2-s2.0-67651152679.

81.Oshiumi H., Matsumoto M., Funami K., Akazawa T., and Seya T., TICAM-1, an adaptor molecule that participates in toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction, *Nature Immunology*. (2003) 4, no. 2, 161–167, https://doi.org/10.1038/ni886, 2-s2.0-0037320451, 12539043.

82.Kranz L. M., Diken M., Haas H., Kreiter S., Loquai C., Reuter K. C., Meng M., Fritz D., Vascotto F., Hefesha H., Grunwitz C., Vormehr M., Hüsemann Y., Selmi A., Kuhn A. N., Buck J., Derhovanessian E., Rae R., Attig S., Diekmann J., Jabulowsky R. A., Heesch S., Hassel J., Langguth P., Grabbe S., Huber C., Türeci Ö., and Sahin U., Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy, *Nature*. (2016) 534, no. 7607, 396–401, https://doi.org/10.1038/nature18300, 2-s2.0-84975832642, 27281205.

83.Amato R. J., Hawkins R. E., Kaufman H. L., Thompson J. A., Tomczak P., Szczylik C., McDonald M., Eastty S., Shingler W. H., de Belin J., Goonewardena M., Naylor S., and Harrop R., Vaccination of metastatic renal cancer patients with MVA-5T4: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study, *Clinical Cancer Research*. (2010) 16, no. 22, 5539–5547, https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2082, 2-s2.0-78349284842, 20881001.

84.Oudard S., Rixe O., Beuselinck B., Linassier C., Banu E., Machiels J. P., Baudard M., Ringeisen F., Velu T., Lefrere-Belda M. A., Limacher J. M., Fridman W. H., Azizi M., Acres B., and Tartour E., A phase II study of the cancer vaccine TG4010 alone and in combination with cytokines in patients with metastatic renal clear-cell carcinoma: clinical and immunological findings, *Cancer Immunology, Immunotherapy*. (2011) 60, no. 2, 261–271, https://doi.org/10.1007/s00262-010-0935-9, 2-s2.0-79151471986, 21069322.

85.Das S. K., Sarkar S., Dash R., Dent P., Wang X. Y., Sarkar D., and Fisher P. B., Cancer terminator viruses and approaches for enhancing therapeutic outcomes, *Advances in Cancer Research*. (2012) 115, 1–38, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398342-8.00001-X, 2-s2.0-84866788367.

86.Liu T.-C., Hwang T.-H., Bell J. C., and Kirn D. H., Translation of targeted oncolytic virotherapeutics from the lab into the clinic, and back again: a high-value iterative loop, *Molecular Therapy*. (2008) 16, no. 6, 1006–1008, https://doi.org/10.1038/mt.2008.70, 2-s2.0-44349106062, 18500240.

87.Raty J., Pikkarainen J., Wirth T., and Yla-Herttuala S., Gene therapy: the first approved gene-based medicines, molecular mechanisms and clinical indications, *Current Molecular Pharmacology*. (2008) 1, no. 1, 13–23, https://doi.org/10.2174/1874467210801010013, 20021420.

88.Senzer N. N., Kaufman H. L., Amatruda T., Nemunaitis M., Reid T., Daniels G., Gonzalez R., Glaspy J., Whitman E., Harrington K., Goldsweig H., Marshall T., Love C., Coffin R., and Nemunaitis J. J., Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma, *Journal of Clinical Oncology*. (2009) 27, no. 34, 5763–5771, https://doi.org/10.1200/JCO.2009.24.3675, 2-s2.0-73349133717, 19884534.

89.Kaufman H. L. and Bines S. D., OPTIM trial: a phase III trial of an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF for unresectable stage III or IV melanoma, *Future Oncology*. (2010) 6, no. 6, 941–949, https://doi.org/10.2217/fon.10.66, 20528232.

90.Hodge J. W., Chakraborty M., Kudo-Saito C., Garnett C. T., and Schlom J., Multiple costimulatory modalities enhance CTL avidity, *Journal of Immunology*. (2005) 174, no. 10, 5994–6004, https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.5994, 2-s2.0-18644376211, 15879092.

91.Kantoff P. W., Schuetz T. J., Blumenstein B. A., Glode L. M., Bilhartz D. L., Wyand M., Manson K., Panicali D. L., Laus R., Schlom J., Dahut W. L., Arlen P. M., Gulley J. L., and Godfrey W. R., Overall survival analysis of a phase II randomized controlled trial of a poxviral-based PSA-targeted immunotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer, *Journal of Clinical Oncology*. (2010) 28, no. 7, 1099–1105, https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.0597, 2-s2.0-77949895922, 20100959.

92.Gulley J. L., Arlen P. M., Madan R. A., Tsang K. Y., Pazdur M. P., Skarupa L., Jones J. L., Poole D. J., Higgins J. P., Hodge J. W., Cereda V., Vergati M., Steinberg S. M., Halabi S., Jones E., Chen C., Parnes

H., Wright J. J., Dahut W. L., and Schlom J., Immunologic and prognostic factors associated with overall survival employing a poxviral-based PSA vaccine in metastatic castrate-resistant prostate cancer, *Cancer Immunology, Immunotherapy*. (2010) 59, no. 5, 663–674, https://doi.org/10.1007/s00262-009-0782-8, 2-s2.0-77950473925, 19890632.

93.Remondo C., Cereda V., Mostböck S., Sabzevari H., Franzusoff A., Schlom J., and Tsang K. Y., Human dendritic cell maturation and activation by a heat-killed recombinant yeast (Saccharomyces cerevisiae) vector encoding carcinoembryonic antigen, *Vaccine*. (2009) 27, no. 7, 987–994, https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.12.002, 2-s2.0-58549112458, 19110021.

94.Wansley E. K., Chakraborty M., Hance K. W., Bernstein M. B., Boehm A. L., Guo Z., Quick D., Franzusoff A., Greiner J. W., Schlom J., and Hodge J. W., Vaccination with a recombinant Saccharomyces cerevisiae expressing a tumor antigen breaks immune tolerance and elicits therapeutic antitumor responses, *Clinical Cancer Research*. (2008) 14, no. 13, 4316–4325, https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0393, 2-s2.0-48249091314, 18594015.

95.Zou W., Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance, *Nature Reviews Cancer*. (2005) 5, no. 4, 263–274, https://doi.org/10.1038/nrc1586, 2-s2.0-16844379997.

96.Yan Y., Kumar A. B., Finnes H., Markovic S. N., Park S., Dronca R. S., and Dong H., Combining immune checkpoint inhibitors with conventional cancer therapy, *Frontiers in Immunology*. (2018) 9, https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01739, 2-s2.0-85053187734.

97.Hwang W. L., Pike L. R. G., Royce T. J., Mahal B. A., and Loeffler J. S., Safety of combining radiotherapy with immune-checkpoint

inhibition, *Nature Reviews Clinical Oncology*. (2018) 15, no. 8, 477–494, https://doi.org/10.1038/s41571-018-0046-7, 2-s2.0-85048036084, 29872177.

98. Bolhassani A., Safaiyan S., and Rafati S., Improvement of different vaccine delivery systems for cancer therapy, *Molecular Cancer*. (2011) 10, no. 1, https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-3, 2-s2.0-78650949758.

99. Riley R. S., June C. H., Langer R., and Mitchell M. J., Delivery technologies for cancer immunotherapy, *Nature Reviews Drug Discovery*. (2019) 18, no. 3, 175–196, https://doi.org/10.1038/s41573-018-0006-z, 2-s2.0-85059772897, 30622344.

100. European Medicines Agency, Guideline on the evaluation of anticancer medicinal products in man: EMA/CHMP/205/95/Rev.4, 2012, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2013/01/WC500137128.pdf

101. FDA, Guidance for industry: clinical considerations for therapeutic cancer vaccines, 2011, http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Vaccines/UCM278673.pdf.

102. Madan R. A., Gulley J. L., Fojo T., and Dahut W. L., Therapeutic cancer vaccines in prostate cancer: the paradox of improved survival without changes in time to progression, *The Oncologist*. (2010) 15, no. 9, 969–975, https://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-0129, 2-s2.0-77957787538, 20798195.

103. Dudley M. E., Wunderlich J. R., Yang J. C., Sherry R. M., Topalian S. L., Restifo N. P., Royal R. E., Kammula U., White D. E., Mavroukakis S. A., Rogers L. J., Gracia G. J., Jones S. A., Mangiameli D. P., Pelletier M. M., Gea-Banacloche J., Robinson M. R., Berman D. M., Filie A. C., Abati A., and Rosenberg S. A., Adoptive cell transfer therapy

following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma, *Journal of Clinical Oncology*. (2005) 23, no. 10, 2346–2357, https://doi.org/10.1200/JCO.2005.00.240, 2-s2.0-20244366111, 15800326.

104. Stevanović S., Draper L. M., Langhan M. M., Campbell T. E., Kwong M. L., Wunderlich J. R., Dudley M. E., Yang J. C., Sherry R. M., Kammula U. S., Restifo N. P., Rosenberg S. A., and Hinrichs C. S., Complete regression of metastatic cervical cancer after treatment with human papillomavirus-targeted tumor-infiltrating T cells, *Journal of Clinical Oncology*. (2015) 33, no. 14, 1543–1550, https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.9093, 2-s2.0-84933508708, 25823737.
105. Rohaan M. W., van den Berg J. H., Kvistborg P., and Haanen J. B. A. G., Adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a viable treatment option, *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. (2018) 6, no. 1, https://doi.org/10.1186/s40425-018-0391-1, 2-s2.0-85054434034, 30285902.
106. Mehta G. U., Malekzadeh P., Shelton T., White D. E., Butman J. A., Yang J. C., Kammula U. S., Goff S. L., Rosenberg S. A., and Sherry R. M., Outcomes of adoptive cell transfer with tumor-infiltrating lymphocytes for metastatic melanoma patients with and without brain metastases, *Journal of Immunotherapy*. (2018) 41, no. 5, 241–247, https://doi.org/10.1097/CJI.0000000000000223, 2-s2.0-85047244246, 29672342.
107. Forget M. A., Haymaker C., Hess K. R., Meng Y. J., Creasy C., Karpinets T., Fulbright O. J., Roszik J., Woodman S. E., Kim Y. U., Sakellariou-Thompson D., Bhatta A., Wahl A., Flores E., Thorsen S. T., Tavera R. J., Ramachandran R., Gonzalez A. M., Toth C. L., Wardell

S., Mansaray R., Patel V., Carpio D. J., Vaughn C., Farinas C. M., Velasquez P. G., Hwu W. J., Patel S. P., Davies M. A., Diab A., Glitza I. C., Tawbi H., Wong M. K., Cain S., Ross M. I., Lee J. E., Gershenwald J. E., Lucci A., Royal R., Cormier J. N., Wargo J. A., Radvanyi L. G., Torres-Cabala C. A., Beroukhim R., Hwu P., Amaria R. N., and Bernatchez C., Prospective analysis of adoptive TIL therapy in patients with metastatic melanoma: response, impact of anti-CTLA4, and biomarkers to predict clinical outcome, *Clinical Cancer Research*. (2018) 24, no. 18, 4416–4428, https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3649, 2-s2.0-85053219246, 29848573.

108. Besser M. J., Shapira-Frommer R., Treves A. J., Zippel D., Itzhaki O., Hershkovitz L., Levy D., Kubi A., Hovav E., Chermoshniuk N., Shalmon B., Hardan I., Catane R., Markel G., Apter S., Ben-Nun A., Kuchuk I., Shimoni A., Nagler A., and Schachter J., Clinical responses in a phase II study using adoptive transfer of short-term cultured tumor infiltration lymphocytes in metastatic melanoma patients, *Clinical Cancer Research*. (2010) 16, no. 9, 2646–2655, https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0041, 2-s2.0-77951714425, 20406835.

109. Dudley M. E., Yang J. C., Sherry R., Hughes M. S., Royal R., Kammula U., Robbins P. F., Huang J. P., Citrin D. E., Leitman S. F., Wunderlich J., Restifo N. P., Thomasian A., Downey S. G., Smith F. O., Klapper J., Morton K., Laurencot C., White D. E., and Rosenberg S. A., Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens, *Journal of Clinical Oncology*. (2008) 26, no. 32, 5233–5239, https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.5449, 2-s2.0-55949125601, 18809613.

110. Radvanyi L. G., Bernatchez C., Zhang M., Fox P. S., Miller P., Chacon J., Wu R., Lizee G., Mahoney S., Alvarado G., Glass M., Johnson V. E., McMannis J. D., Shpall E., Prieto V., Papadopoulos N., Kim K., Homsi J., Bedikian A., Hwu W. J., Patel S., Ross M. I., Lee J. E., Gershenwald J. E., Lucci A., Royal R., Cormier J. N., Davies M. A., Mansaray R., Fulbright O. J., Toth C., Ramachandran R., Wardell S., Gonzalez A., and Hwu P., Specific lymphocyte subsets predict response to adoptive cell therapy using expanded autologous tumor-infiltrating lymphocytes in metastatic melanoma patients, *Clinical Cancer Research*. (2012) 18, no. 24, 6758–6770, https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1177, 2-s2.0-84871207055.

111. Eshhar Z., Waks T., Gross G., and Schindler D. G., Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (1993) 90, no. 2, 720–724, https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.720, 2-s2.0-0027471898, 8421711.

112. Porter D. L., Levine B. L., Kalos M., Bagg A., and June C. H., Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia, *New England Journal of Medicine*. (2011) 365, no. 8, 725–733, https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103849, 2-s2.0-80051720194, 21830940.

113. U.S. Food and Drug Administration FDA approves CAR-T cell therapy to treat adults with certain types of large B-cell lymphoma, 2017, https://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm581216.htm.

114. Chow V. A., Shadman M., and Gopal A. K., Translating anti-CD19 CAR T-cell therapy into clinical practice for relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma, *Blood*. (2018) 132, no. 8, 777–781, https://doi.org/10.1182/blood-2018-04-839217, 2-s2.0-85052138476, 29914976.
115. Martinez M. and Moon E. K., CAR T cells for solid tumors: new strategies for finding, infiltrating, and surviving in the tumor microenvironment, *Frontiers in Immunology*. (2019) 10, https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00128, 2-s2.0-85062164680.
116. Schmidts A. and Maus M. V., Making CAR T cells a solid option for solid tumors, *Frontiers in Immunology*. (2018) 9, https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02593, 2-s2.0-85056301051.
117. Leach D. R., Lrimmel M. F., and Allison J. P., Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade, *Science*. (1996) 271, no. 5256, 1734–1736, https://doi.org/10.1126/science.271.5256.1734, 2-s2.0-0029947568, 8596936.
118. Ishida Y., Agata Y., Shibahara K., and Honjo T., Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death, *The EMBO Journal*. (1992) 11, no. 11, 3887–3895, https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x, 1396582.
119. Wei S. C., Duffy C. R., and Allison J. P., Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy, *Cancer Discovery*. (2018) 8, no. 9, 1069–1086, https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0367, 2-s2.0-85053176626, 30115704.
120. Curiel T. J., Wei S., Dong H., Alvarez X., Cheng P., Mottram P., Krzysiek R., Knutson K. L., Daniel B., Zimmermann M. C., David O., Burow M., Gordon A., Dhurandhar N., Myers L., Berggren

R., Hemminki A., Alvarez R. D., Emilie D., Curiel D. T., Chen L., and Zou W., Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity, *Nature Medicine*. (2003) 9, no. 5, 562–567, https://doi.org/10.1038/nm863, 2-s2.0-0038273853, 12704383.

121. Wu K., Kryczek I., Chen L., Zou W., and Welling T. H., Kupffer cell suppression of CD8+ T cells in human hepatocellular carcinoma is mediated by B7-H1/programmed death-1 interactions, *Cancer Research*. (2009) 69, no. 20, 8067–8075, https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0901, 2-s2.0-70350234729, 19826049.
122. Nazareth M. R., Broderick L., Simpson-Abelson M. R., KelleherR. J.Jr., Yokota S. J., and Bankert R. B., Characterization of human lung tumor-associated fibroblasts and their ability to modulate the activation of tumor-associated T cells, *Journal of Immunology*. (2007) 178, no. 9, 5552–5562, https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.9.5552, 2-s2.0-34247597310, 17442937.
123. Keir M. E., Butte M. J., Freeman G. J., and Sharpe A. H., PD-1 and its ligands in tolerance and immunity, *Annual Review of Immunology*. (2008) 26, no. 1, 677–704, https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331, 2-s2.0-42649125225.
124. Zou W. and Chen L., Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment, *Nature Reviews. Immunology*. (2008) 8, no. 6, 467–477, https://doi.org/10.1038/nri2326, 2-s2.0-44349150012, 18500231.
125. Brahmer J. R., Drake C. G., Wollner I., Powderly J. D., Picus J., Sharfman W. H., Stankevich E., Pons A., Salay T. M., McMiller T. L., Gilson M. M., Wang C., Selby M., Taube J. M., Anders R., Chen L., Korman A. J., Pardoll D. M., Lowy I., and Topalian S. L., Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and

immunologic correlates, *Journal of Clinical Oncology*. (2010) 28, no. 19, 3167–3175, https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.7609, 2-s2.0-77954899030, 20516446.

126. Zou W., Wolchok J. D., and Chen L., PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: mechanisms, response biomarkers, and combinations, *Science Translational Medicine*. (2016) 8, no. 328, https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad7118, 2-s2.0-84959529731, 26936508.
127. Hodi F. S., O′Day S. J., McDermott D. F., Weber R. W., Sosman J. A., Haanen J. B., Gonzalez R., Robert C., Schadendorf D., Hassel J. C., Akerley W., van den Eertwegh A. J. M., Lutzky J., Lorigan P., Vaubel J. M., Linette G. P., Hogg D., Ottensmeier C. H., Lebbé C., Peschel C., Quirt I., Clark J. I., Wolchok J. D., Weber J. S., Tian J., Yellin M. J., Nichol G. M., Hoos A., and Urba W. J., Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma, *New England Journal of Medicine*. (2010) 363, no. 8, 711–723, https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466, 2-s2.0-77954801079, 20525992.
128. Lipson E. J. and Drake C. G., Ipilimumab: an anti-CTLA-4 antibody for metastatic melanoma, *Clinical Cancer Research*. (2011) 17, no. 22, 6958–6962, https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1595, 2-s2.0-81255138488, 21900389.
129. Vesely M. D. and Schreiber R. D., Cancer immunoediting: antigens, mechanisms, and implications to cancer immunotherapy, *Annals of the New York Academy of Sciences*. (2013) 1284, no. 1, 1–5, https://doi.org/10.1111/nyas.12105, 2-s2.0-84880955514, 23651186.
130. Koebel C. M., Vermi W., Swann J. B., Zerafa N., Rodig S. J., Old L. J., Smyth M. J., and Schreiber R. D., Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state, *Nature*. (2007) 450, no. 7171, 903–

907, https://doi.org/10.1038/nature06309, 2-s2.0-36849010167, 18026089.

131. Le D. T., Uram J. N., Wang H., Bartlett B. R., Kemberling H., Eyring A. D., Skora A. D., Luber B. S., Azad N. S., Laheru D., Biedrzycki B., Donehower R. C., Zaheer A., Fisher G. A., Crocenzi T. S., Lee J. J., Duffy S. M., Goldberg R. M., de la Chapelle A., Koshiji M., Bhaijee F., Huebner T., Hruban R. H., Wood L. D., Cuka N., Pardoll D. M., Papadopoulos N., Kinzler K. W., Zhou S., Cornish T. C., Taube J. M., Anders R. A., Eshleman J. R., Vogelstein B., and Diaz L. A., PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency, *New England Journal of Medicine*. (2015) 372, no. 26, 2509–2520, https://doi.org/10.1056/NEJMoa1500596, 2-s2.0-84932628341, 26028255.

132. Hegde P. S., Karanikas V., and Evers S., The where, the when, and the how of immune monitoring for cancer immunotherapies in the era of checkpoint inhibition, *Clinical Cancer Research*. (2016) 22, no. 8, 1865–1874, https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1507, 2-s2.0-84967321420, 27084740.

133. Ribas A., Dummer R., Puzanov I., VanderWalde A., Andtbacka R. H. I., Michielin O., Olszanski A. J., Malvehy J., Cebon J., Fernandez E., Kirkwood J. M., Gajewski T. F., Chen L., Gorski K. S., Anderson A. A., Diede S. J., Lassman M. E., Gansert J., Hodi F. S., and Long G. V., Oncolytic virotherapy promotes intratumoral T cell infiltration and improves anti-PD-1 immunotherapy, *Cell*. (2017) 170, no. 6, 1109–1119.e10, https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.027, 2-s2.0-85028829596, 28886381.

134. Mariathasan S., Turley S. J., Nickles D., Castiglioni A., Yuen K., Wang Y., KadelE. E.III, Koeppen H., Astarita J. L., Cubas R., Jhunjhunwala S., Banchereau R., Yang Y., Guan Y., Chalouni C., Ziai J., Şenbabaoğlu

Y., Santoro S., Sheinson D., Hung J., Giltnane J. M., Pierce A. A., Mesh K., Lianoglou S., Riegler J., Carano R. A. D., Eriksson P., Höglund M., Somarriba L., Halligan D. L., van der Heijden M. S., Loriot Y., Rosenberg J. E., Fong L., Mellman I., Chen D. S., Green M., Derleth C., Fine G. D., Hegde P. S., Bourgon R., and Powles T., TGFβ attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells, *Nature*. (2018) 554, no. 7693, 544–548, https://doi.org/10.1038/nature25501, 2-s2.0-85042495633, 29443960.

135. Rosenberg J. E., Hoffman-Censits J., Powles T., van der Heijden M. S., Balar A. V., Necchi A., Dawson N., O′Donnell P. H., Balmanoukian A., Loriot Y., Srinivas S., Retz M. M., Grivas P., Joseph R. W., Galsky M. D., Fleming M. T., Petrylak D. P., Perez-Gracia J. L., Burris H. A., Castellano D., Canil C., Bellmunt J., Bajorin D., Nickles D., Bourgon R., Frampton G. M., Cui N., Mariathasan S., Abidoye O., Fine G. D., and Dreicer R., Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial, *Lancet*. (2016) 387, no. 10031, 1909–1920, https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00561-4, 2-s2.0-84959577118, 26952546.

136. Garon E. B., Rizvi N. A., Hui R., Leighl N., Balmanoukian A. S., Eder J. P., Patnaik A., Aggarwal C., Gubens M., Horn L., Carcereny E., Ahn M. J., Felip E., Lee J. S., Hellmann M. D., Hamid O., Goldman J. W., Soria J. C., Dolled-Filhart M., Rutledge R. Z., Zhang J., Lunceford J. K., Rangwala R., Lubiniecki G. M., Roach C., Emancipator K., Gandhi L., and KEYNOTE-001 Investigators, Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer, *New England Journal of Medicine*. (2015) 372, no. 21, 2018–

2028, https://doi.org/10.1056/NEJMoa1501824, 2-s2.0-84929481480, 25891174.

137. Herbst R. S., Soria J. C., Kowanetz M., Fine G. D., Hamid O., Gordon M. S., Sosman J. A., McDermott D. F., Powderly J. D., Gettinger S. N., Kohrt H. E. K., Horn L., Lawrence D. P., Rost S., Leabman M., Xiao Y., Mokatrin A., Koeppen H., Hegde P. S., Mellman I., Chen D. S., and Hodi F. S., Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients, *Nature*. (2014) 515, no. 7528, 563–567, https://doi.org/10.1038/nature14011, 2-s2.0-84920956735, 25428504.

138. Adachi K., Kano Y., Nagai T., Okuyama N., Sakoda Y., and Tamada K., IL-7 and CCL19 expression in CAR-T cells improves immune cell infiltration and CAR-T cell survival in the tumor, *Nature Biotechnology*. (2018) 36, no. 4, 346–351, https://doi.org/10.1038/nbt.4086, 2-s2.0-85045127709, 29505028.

139. Hiraoka N., Ino Y., and Yamazaki-Itoh R., Tertiary lymphoid organs in cancer tissues, *Frontiers in Immunology*. (2016) 7, https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00244, 2-s2.0-84977507634.

140. Dieu-Nosjean M.-C., Goc J., Giraldo N. A., Sautès-Fridman C., and Fridman W. H., Tertiary lymphoid structures in cancer and beyond, *Trends in Immunology*. (2014) 35, no. 11, 571–580, https://doi.org/10.1016/j.it.2014.09.006, 2-s2.0-84923092072, 25443495.

141. Colbeck E. J., Ager A., Gallimore A., and Jones G. W., Tertiary lymphoid structures in cancer: drivers of antitumor immunity, immunosuppression, or bystander sentinels in disease?, *Frontiers in Immunology*. (2017) 8, https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01830, 2-s2.0-85038410098.

142. Sautès-Fridman C., Lawand M., Giraldo N. A., Kaplon H., Germain C., Fridman W. H., and Dieu-Nosjean M.-C., Tertiary lymphoid structures in cancers: prognostic value, regulation, and manipulation for therapeutic intervention, *Frontiers in Immunology*. (2016) 7, https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00407, 2-s2.0-84997108103.

143. Tang H., Zhu M., Qiao J., and Fu Y.-X., Lymphotoxin signalling in tertiary lymphoid structures and immunotherapy, *Cellular & Molecular Immunology*. (2017) 14, no. 10, 809–818, https://doi.org/10.1038/cmi.2017.13, 2-s2.0-85031285320, 28413217.

144. Jing F. and Choi E. Y., Potential of cells and cytokines/chemokines to regulate tertiary lymphoid structures in human diseases, *Immune Network*. (2016) 16, no. 5, 271–280, https://doi.org/10.4110/in.2016.16.5.271, 2-s2.0-85020099868, 27799872.

145. Igarashi, Y., & Sasada, T. (2020). *Cancer Vaccines: Toward the Next Breakthrough in Cancer Immunotherapy. Journal of Immunology Research, 2020, 1–13.* doi:10.1155/2020/5825401

BÖLÜM 4

AKCİĞER KANSERİNDE BİYOBELİRTEÇ OLARAK MİRNA'LAR

Dr. Öğr. Üyesi Esra GÖKÇE GÜNDÜZER[6,*]
Sema Nur AĞARAN[2]

DOI: https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.12707305

[6]Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye, esragokce@gazi.edu.tr, Orcid ID: 0000-0002-4474-7523
[2] Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye, semaagaran@gmail.com
[*]Sorumlu Yazar

GİRİŞ

Akciğer kanseri, en yaygın rastlanan kanser çeşididir. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından sağlanan bilgilere göre, 2022 yılında dünya genelinde yaklaşık 19,9 milyon yeni kanser vakası tespit edilmiş ve her yıl yaklaşık 10 milyon kişinin kanser nedeniyle hayatını kaybettiği rapor edilmiştir (1). Histolojik olarak akciğer kanserlerinin çok büyük bir kısmı epitelyal kökenli olup küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olarak iki çeşidi bulunmaktadır (2). Akciğer kanseri vakalarının %80'inde küçük hücreli dışı akciğer kanseri çeşidi belirlenmiştir (3). Dünya çapında en fazla ölüm ile sonuçlanan kanser çeşidi olan akciğer kanseri, insidansı ve moleküler yapısı sebebiyle de her toplumda farklılıklar göstermektedir. Sessizce geliştiği için ileri evrelerde ortaya çıkmakta ve bu durum tedavi başarısını oldukça düşük hale getirmektedir (4). Cerrahideki yeniliklere, radyoterapi ve kemoterapideki ilerlemelere rağmen akciğer kanserinde hayatta kalma oranı %16 olduğundan, akciğer kanserinin gelişimini aydınlatmak ve yeni terapötik hedefler belirlemek amacıyla moleküler araştırma sayısının arttırılması gerekmektedir (2).

MikroRNA (miRNA)'lar, translasyon düzeyinde gen ifadesini düzenleyen, 18-24 nükleotid uzunluğunda, protein kodlamayan, küçük RNA molekülleridir (5, 6). Günümüzde 28.000'den fazla miRNA tanımlanmıştır (7).

Kan temelli tümör belirteçleri kanser tanısında kullanılmakla birlikte tümörlerin tanısında doğruluk düzeyleri oldukça sınırlıdır (8). miRNA ifadelerinin incelendiği çalışmalarda, miRNA'ların mRNA'lardan daha etkili bir şekilde kanserleri teşhis etmede kullanılabileceği, bu nedenle de kanser tanısı ve ilerlemesinde belirteç olarak kullanılabilecekleri ifade edilmiştir (9). Volinia ve arkadaşları (2006) ilk kez insan pankreas, mide, kolon, prostat, meme ve akciğer, tümörlerinde mikroRNA ifadelerini belirlemek amacıyla mikrodizilerden yararlanmışlardır. miRNA ifadesinin, tümör çeşidinin kökenini ve ilerlemesini belirlemede doğru ve hassas sonuç sağladığı

gösterilerek miRNA'ların tümör sınıflandırması için bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği ortaya koyulmuştur (10).

Bu bölümde büyüme ve gelişme, proliferasyon, hücre döngüsü, kromozom organizasyonu ve tümörigenez üzerinde önemli rol oynayan ve parazitik genlere karşı hücreleri korumada önemli bir role sahip olan RNAi ve bunu takiben miRNA yapısı ve keşfi, miRNA biyogenezi, mikroRNA'ların onkogenik ve tümör baskılayan etkileri, onkogenik miRNA'lar, miRNA'ların kanser ile ilişkisi ve miRNA'ların akciğer kanserinde biyobelirteç olarak kullanılması üzerinde durulmuştur.

1. MİKRORNA ve KANSER

1.1. Kodlanmayan RNA'lar

RNA interferaz (RNAi) mekanizması, hücre içinde genlerin hangilerinin aktif olduğunu belirleyen, aynı zamanda da ilgili genlerin işleyişini düzenleyen bir mekanizmadır. Dört çeşit RNAi belirlenmiştir: endojen kaynaklı mikro RNA (miRNA/miR), eksojen kaynaklı küçük interferans RNA (siRNA), hücre içinde piwi ile etkileşen RNA (piRNA) ve nükleolar RNA (snoRNA) (Tablo 1.1). Yaklaşık 21-23 nükleotid uzunluğundaki bu küçük tek iplikli RNA'lar, transkripsiyon sonrası gen düzenlemesinde önemli işlevlere sahiptir; genlerin doğrudan ürünleri olan RNA'lara bağlanarak, bu RNA'ların aktivitesini azaltabilir (mRNA translasyonunu önleyebilir) veya arttırabilirler. RNAi kodlamayan RNA'lardır, yani DNA'ya kopyalanan ancak proteinlere çevrilmeyen genler içerirler. RNAi, hücrelerin parazit genlerden korunmasında önemli bir rol oynamakla birlikte büyüme ve gelişmede, çoğalmada, hücre bölünmesinde, kromozom organizasyonunda ve tümör oluşumunda da önemli bir rol oynamaktadır (11).

Tablo 1.1. Küçük kodlanmayan RNA'lar ve işlevleri

Kodlanmayan RNA'lar	İşlevi
snoRNA (Küçük Nükleolar RNA)	Ribozomal RNA'ların modifikasyonundan sorumludur.
PiRNA (Piwi ile etkileşimli RNA)	Embriyonun gelişimi sürecinde transpozonların baskılanmasında ve spermatogenezde görev alır.
siRNA (küçük interferaz RNA)	Transkripsiyon sonrası gen susturulmasında görev alır.
miRNA (mikro RNA)	Gen ifadesinin transkripsiyon sonrası kontrol edilmesinde rol oynar.

1.2. MikroRNA Yapısı ve Keşfi

MikroRNA (miRNA), yaklaşık 18-24 nükleotidlik, tek sarmallı, küçük bir RNA molekülüdür. miRNA'lar, proteine çevrilmeyen; ancak diğer genlerin ifadesini düzenleyen, DNA'nın intron veya ekzon bölgelerinden kopyalanırlar. Bu nedenle de diğer protein kodlayan genleri modüle ettikleri düşünülmektedir. Öncelikle miRNA genlerinin birincil transkriptleri olan pri-miRNA'lar işlenerek kısa sap-ilmik yapısına çevrilir ve bu daha sonra işlevsel bir miRNA haline gelir. İnsan genomunda, miRNA üreten ve yoğun biçimde muhafaza edilen yüzlerce gen bölgesi tespit edilmiştir (12). miRNA'lara ilişkin bilgiler kamu kaynaklı bir veri bankası olan miRBase'de kayıt alıtına alınmaktadır. 2018 yılı Şubat ayı verilerine göre bu veri tabanında 28.645 miRNA girişi bulunmaktadır (13). 1993 yılında Lee ve arkadaşları *Caenorhabditis elegans*'ı genetik yönden inceledikleri çalışmalarında, lin-4 genin herhangi bir protein

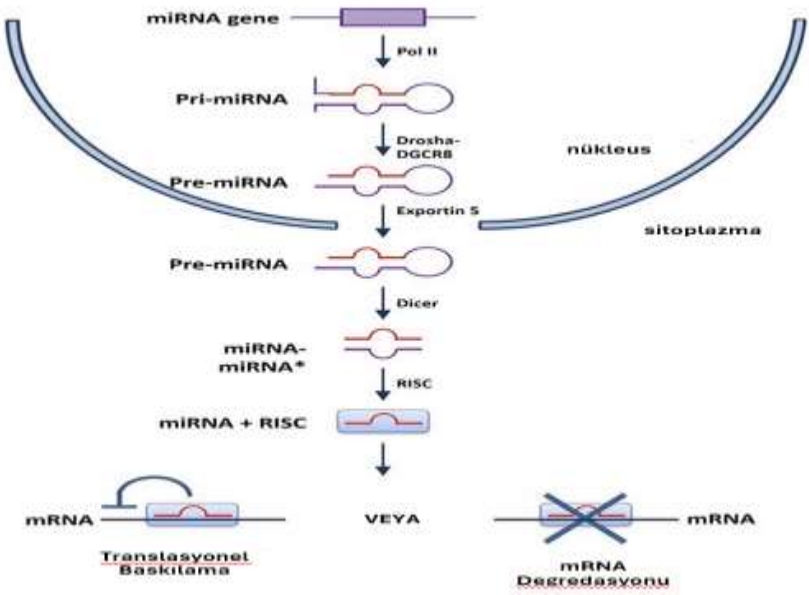
kodlamadığını, ancak 22 nükleotidlik kısa bir RNA parçasının transkripsiyonunu gerçekleştirdiğini rapor etmişlerdir. Böylece ilk mikroRNA, 1993'te Lee ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir (14). Reinhart ve çalışma arkadaşları ise 2000 yılında, *C. elegans*'ın gelişmesini düzenleyen, 22 nükleotid uzunluğunda ve let-7 adı verilen, başka bir mikroRNA keşfetmişlerdir (15). Bu gelişmeler üzerine birçok çok hücreli organizmada let-4 ve let-7 ile benzer yapıya sahip birkaç RNA molekülü tespit edilmiş ve miRNA şeklinde adlandırılmıştır (16). 2001 yılında ise mikroRNA ifadesi kullanılmaya başlanmıştır (17).

1.3. MikroRNA Biyogenezi

miRNA'ların biyogenezi, çekirdekte ve sitoplazmada bulunan birçok enzim ve protein tarafından gerçekleştirilen karmaşık bir süreçtir. miRNA'lar, kopyalanmış RNA moleküllerinden türetilmekte ve farklı yollarla düzenlenmektedirler. Ancak bu RNA'lar, olgun miRNA türlerini üretmek için korunmuş yollardan işlenirler. İntronik miRNA'lar bilinen genlerin intronları arasında yer alan dizilerden oluşurken intergenik miRNA'lar ise intergenik bölgelerden oluşmaktadırlar (18).

MikroRNA'lar üç adımda oluşmaktadırlar. İlk adımda, miRNA geninden birincil miRNA (primiRNA) transkribe edilir. İkinci adımda, çekirdekte primiRNA, pre-miRNA'ya dönüştürülür. Son olarak ise, sitoplazmada olgun miRNA meydana gelmektedir (19). Başlangıçta, hücre çekirdeğinde RNA polimeraz tarafından 'cap' ve 'poli(A)' kuyruğu eklenmiş saç tokası yapısında birincil mikroRNA (pri-miRNA) sentezlenir (20). Oluşan pri-miRNA'lar, 5' cap ve 3' poliadenilasyon işlemlerine maruz bırakıldıktan sonra, çekirdekte Drosha ve kofaktörü olan Pasha (DGCR8) aracılığıyla 60-75 nükleotid uzunluğunda bölünerek sap-ilmik formunda bir başka öncü RNA'ya, pre-miRNA'ya dönüştürülürler (21, 22). Bir nükleaz çeşidi olan Drosha ve çift zincirli RNA'ya bağlanan bir protein çeşidi olan Pasha'dan meydana gelen kompleks

"mikroişlemci kompleksi" olarak adlandırılmaktadır (23). Taşıyıcı protein exportin-5 (XPO5) öncü mikroRNA'ları (pre-miRNA'ları) tanır ve Ran-GTP ile kompleks oluşturarak pre-miRNA'ların çekirdekten sitoplazmaya taşınmasını sağlarlar. Pre-miRNA'nın sap-ilmik yapısının bulunduğu yerden Dicer enzimi tarafından bölünür ve Argonat proteinleri (insanlarda AGO1- AGO4) ile bağlanır. Sonuç olarak, hemen hemen 19-24 nükleotidlik çift sarmallı bir yapı oluşturulur ve bu yapının bir ipliği olgun miRNA'yı içerir (24). Olgun miRNA'lar, Argonat (Argonaute; Ago) proteinlerini içeren 'RNA kaynaklı susturma (RISC)' kompleksine dahil edilirler (25). RISC kompleksi, dubleks yapı birbirinden ayrıldığı zaman aktifleşmektedir. RISC yapısına bağlanan zincir olgun miRNA'yı oluştururken diğer zincir hemen parçalanmaktadır (Şekil 1.1) (26).



Şekil 1.1. miRNA Biyogenezi (29)

1.4. MikroRNA'ların Fonksiyonu

Olgun mikroRNA'lar, gen ifadesini düzenleyerek protein sentezinin düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar (27). MikroRNA'lar, nükleotidlerini tamamlayıcı hedef mRNA'ları tanıyabilme yetenekleri ile hücrelerin büyümesi, farklılaşması ve ölümü sürecinde işlevlerini yerine getirmektedirler (28).

miRNA'nın, hedef mRNA'nın 3' ifade edilmeyen bölgesine (Untranslated Region, UTR) spesifik olarak bağlanması ile transkripsiyon sonrası düzenleme gerçekleşmektedir. miRNA'lar genel olarak, hedef mRNA'nın stabilitesini, taşınmasını ve translasyon sonrası düzenlemesini etkileyen sekanslar içeren ve mRNA'nın 3' ucunda yer alan 3' UTR bölgesine bağlansa da, aynı zamanda 5' ucunda bulunan ve ribozomun mRNA'ya bağlanmasına yardımcı olan 5' UTR bölgesine veya açık okuma çerçevesine (ORF okuma haritası) bağlanarak gen ekspresyonunu da düzenlemektedirler (29).

Ayrıca yapılan çalışmalarda her mikroRNA'nın fazla sayıda mRNA'nın ifadesini kontrol edebildiği ve her mRNA'nın da fazla sayıda mikroRNA tarafından hedeflenebileceği belirtilmiştir (30).

1.5. MikroRNA'ların Onkogenik ve Tümör Baskılayıcı Özellikleri

miRNA'lar, hedef mRNA'ların moleküler yolaklarındaki özelliğine bağlı olarak onkogenik veya tümör baskılayıcı özellikler kazanabilirler. Kanserin farklı çeşitlerinde ifadesi artan miRNA'ya onkogenik miRNA adı verilmektedir. Tümör baskılayıcı genleri veya hücre farklılaşmasını düzenleyen genleri hedef alarak tümör oluşumuna katkıda bulunan miRNA'lar, onkomir olarak adlandırılmaktadır. Tümör baskılayıcı miRNA'lar, tümör oluşumunun engellenmesini onkogenleri baskılayarak sağlamaktadırlar (31).

1.6. Tümör Süpresör (Baskılayıcı) MikroRNA'lar

MikroRNA'ların kanser oluşumu süreci üzerindeki etkisi 2001 yılında miR-15a ve miR-16-1'in keşfiyle bildirilmiştir. Tümör süpresör gen olarak işlev gören bu genler, birçok kanser türünde önemli bir anti-apoptotik gen olan Bcl-2 genini hedef alarak normal bir apoptotik cevap oluşturmaktadırlar (32).

Tümör baskılayıcı özelliği olan farklı bir miRNA grubu da let-7b, let-7c, let-7d, let-7f ve let-7g olmak üzere let-7 ailesinin üyelerini içerir (12). let-7, kanser çeşitlerinde sıklıkla delesyona uğrayan bir kromozom bölgesinde yer aldığı ve gen ifadesi azaldığında onkogenik farklılaşma kaybına yol açtığından, tümör baskılayıcı miRNA'lar arasında sınıflandırılmaktadır (33).

Üç farklı izoforma sahip miR-29 geninin üyeleri olan miR-29a, miR-29b ve miR-29c'nin AML (Akut miyeloid lösemi), KLL (Kronik lenfositer lösemi), invaziv meme kanseri ile akciğer kanseri gibi bazı kanser çeşitlerinde tümör baskılayıcı yönde etkileri olduğu bildirilmiştir (31).

miRNA-143'ün çeşitli histolojik tümör çeşitlerinde normal olmayan büyümeyi baskıladığı gösterilmiş olup; meme, servikal, kolon, mesane ve hipofiz tümörlerinde baskılayıcı yönde rol aldığı ortaya koyulmuştur. Rahim ağzı kanserinde ise hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, kolon kanserinde KRAS ve KRAS aşağı akış sinyal aktarım yolaklarını direkt olarak engellediği açığa çıkarılmıştır (31).

1.7. Onkogenik MikroRNA'lar

Tümör baskılayıcı özelliğe sahip miRNA'lardan farklı olarak onkogenik miRNA'lar, çoğu zaman kanser çeşitlerinde düzensiz hücre çoğalmasını teşvik edici ve/veya anti-apoptotik bir etki göstermektedirler (12). Onkogenik mir-155, tanımlanan ilk onkogenik miRNA olup miR-155 gen ifadesinin lenfomalarda daha yüksek olduğu ve pro-apoptotik proteinleri hedeflediği belirlenmiştir (34).

Onkogenik fonksiyonu olan bir diğer miRNA ise miRNA-21'dir. Farklı tümör çeşitlerinde PTEN1 ve PDCD4 gibi anahtar görevi olan tümör baskılayıcı genleri hedeflediği tespit edilmiştir (35). mir-21'in PTEN'in mRNA'sını hedef alarak invazyon ve metastaza yol açtığı belirlenmiş ve bu olaylarla ilişkisi iyi bir şekilde açığa çıkarılmıştır (32).

miR 17-92 onkogenik fonksiyona sahip olup kromozom üzerinde 13q31 bölgesinde bulunan polisistronik özellikte bir miRNA'dır. Bu gen grubu, miR-17, miR-18a, miR-19a, miR20a, miR-19b-1, miR-92-1 ve miR 17-92 şeklinde altı farklı miRNA kodlamakta olup, genlerin ifadesi küçük hücreli akciğer kanserinde ve B hücreli lenfomada normal hücrelere kıyasla yüksek düzeydedir. Hematolojik malignite durumlarında, akciğer, lenfoma, kolon, meme, mide pankreas, prostat, gibi kanser çeşitlerinde daha yüksek düzeyde ifade edildiği gösterilmiştir (36).

1.8. MikroRNA'ların Kanser ile İlişkisi

Normal hücrelerde miRNA moleküllerinin seviyeleri ve bunların transkripsiyonel hedefleri dengededir. Yapılan araştırmalarda, hastalığın semptomlarının miRNA seviyesinin değiştirilmesiyle (knock-out veya aşırı ekspresyon) ortaya çıktığı bulunmuştur (37). miRNA'lar transkripsiyon sonrası gen ifadesini etkilediği için kanserde etkili olduğu belirlenmiş genlerin ifade edilmesinde anahtar düzenleyicilerden biri olmaya adaydırlar. Araştırmalar sonucunda elde edilen bulgulara göre bazı kanser çeşitleri ve miRNA'lar arasında bağlantı olduğu belirlenmiştir (11).

MikroRNA'ların kanser aktivitesine dahil olduğuna dair ilk kanıt, 2002'de Calin ve arkadaşlarının KLL hastaları üzerinde yaptıkları moleküler düzeydeki bir araştırma ile keşfedilmiştir. miR-15 ve miR-16 genlerinin tümör baskılayıcı geni hedeflemek yerine, kronik lenfatik hastalıkların yaklaşık %50'sinde meydana gelen 13q14 delesyonundan sorumlu olabileceğini göstermişlerdir (38). Cimmino ve ark. yaptıkları çalışmada, antiapoptotik

BCL2 geninin miR-15/16 genleri tarafından manipüle edildiğini ve BCL2'nin yüksek miktarda ifade edildiği lösemi hücrelerinde tedaviye yönelik kullanılabileceğini bildirmişlerdir (39). Calin ve Croce'in araştırmalarında ise insan miRNA genleri ve kanser arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla DNA üzerinde miRNA haritası tasarlanmıştır. Bu tasarımda genler, önceden belirli kanser çeşitleri ve ilişkili olduğu belirlenen genetik mutasyonlarla karşılaştırılmış ve miRNA genlerinin ağırlıklı olarak hassas bölgeler olan kayıp bölgelerde yer aldığı görülmüştür (32).

Michael ve çalışma arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada ise insan solid organ tümörleri normal dokularla karşılaştırılmış, miRNA'ların gen ifade seviyelerinin değiştiği belirlenmiştir (40). Tümör baskılayıcı özelliklere sahip bir diğer miRNA ise let-7 genidir. Johnson ve ark., let-7 geninin insanlardaki önemli onkogenlerden biri olan RAS aktivitesini düzenlediğini keşfetmiş ve let-7 içeren tümör hücrelerinin, önemli ölçüde artan RAS proteini seviyelerine sahip olduğunu bulmuşlardır (41). Akciğer kanseri hastaları üzerinde yapılan çalışma, let-7α ekspresyonu ile hayatta kalma arasında bir bağlantı olduğunu göstermiştir. Ayrıca insan adenokarsinom hücre dizisi üzerinde yapılan bir çalışma, let-7'nin yüksek düzeyde ifade edilmesi ile hücrelerin proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir; bu durum ise bunun akciğer kanseri için potansiyel bir tedavi olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (31).

Üç izoforma sahip olan miR-29 ve miR-143'ün de tümör baskılayıcı özellikler sergileyen diğer miRNA'lar arasında olduğu bilinmektedir. Tümör baskılayıcı miRNA'ların aksine, onkogenik miRNA'lar, miR-155, miR-21 ve mir-17-92 dahil olmak üzere kanser modellerinde kontrolsüz büyümede veya anti-apoptotik mekanizmalarda aktiftirler (42).

2. AKCİĞER KANSERİNDE BİYOBELİRTEÇ OLARAK MİRNA'LAR

Biyobelirteçler; DNA, RNA, proteinler, peptitler, nükleik asitler, enzimler ve reseptörler gibi molekülleri analiz ederek canlı organizmalardaki normal veya anormal durumları tanımlayan niceliksel olarak ölçülen bir özelliği tanımlarlar (43). Biyobelirteçlerin tanımının son on yılda teknolojik gelişmelere bağlı olarak değiştiğini belirtmek gerekir. Dünya Sağlık Örgütü biyobelirteç terimini "Vücutta veya ürünlerinde bulunan, ölçülebilen, hastalık ve rahatsızlıkları etkileyebilen veya tahmin edebilen herhangi bir madde veya süreçtir." ifadesiyle tanımlamıştır (44).

Yapılan araştırmalarda akciğer kanseri dokularında ve normal dokularda mir-20b (45), miR-429, miR-205, miR-200b, miR-203, miR-125b ve miR-34b (46), miR-635 (47), miR-328 (48), miR-935(49) gibi çeşitli miRNA türleri karşılaştırılmış, bu miRNA'ların kanserli dokularda ifade düzeyinin sağlıklı dokulardan önemli ölçüde yüksek olduğu bulunmuş ve kanser grubundaki hastalarda daha kötü sağkalım ile ilişkilendirilmiştir. Aynı zamanda miR-383 (50), miR-33a (51), mir-let-7b (52), miR-935 (53), miR-518 (54) gibi bazı miRNA türlerinin kanser hastalarında normal sağlıklı bireyelere göre daha düşük seviyede ifade olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. Bu durum bu miRNA'ların gelecekte potansiyel olarak birer biyobelirteç olarak kullanılabileceklerini göstermektedir.

Tablo.2.1. Akciğer kanseri teşhisinde ve hastalığın seyrini belirlemede kullanılan miRNA biyobelirteçlerinden bazıları (55).

miRNA'lar	**Örnek Tipi**	**Gen İfadesinde Artma/Azalma**
miR-21, miR-205, miR-30d, miR-24	Serum	+
miR-155, miR-197, miR-182	Plazma	+
Let-7f, miR-30e-3p	Plazma	-
miR-361-3p, miR-625	Serum	-
miR-1254, miR-574-5p	Serum	+
miR-21, miR-126, miR-210, miR-486-5p	Plazma	+
miR142-3p, miR-29b	Serum	+

Erken evre KHDAK tanısı olan hastalarda yapılan bir çalışmada, 12 mikroRNA'nın gen ifadesinde önemli farklılıklar gösterdiği bulunmuştur. Araştırmacılar doku ve plazmadaki gen ifadesi düzeylerini karşılaştırdıklarında 5 miRNA'nın farklı sonuçlar oluşturduğunu tespit etmişlerdir (Tablo.2.1.). miR-21, miR-126, miR-210 ve miR-486-5p düzeyleri kontrol ile karşılaştırıldığında, KHDAK'nin yüksek duyarlılık ve özgüllükle ayırt edilebildiği saptanmıştır (56). miR-1254 ve miR-574-5p ifadesinin, KHDAK'nin erken evresinde önemli ölçüde arttığı bulunmuştur (57). Başka bir çalışmada ise, cerrahi olarak çıkarılan tümörlerin miRNA analizi yapıldığında, miR-21, miR-486, miR-375 ve miR-200b gen ifadelerinin normal kontrollerle

karşılaştırılmasıyla, yüksek duyarlılık ve özgüllük ile akciğer adenokarsinomu tanısı koyduruculuğu bulunduğunu gösterilmiştir (58). Xing ve arkadaşları yaptıkları çalışma ile benzer bulgular elde ederek balgam örneklerinde miR-205, miR-210 ve miR-708 ifadesinin akciğer kanseri vakasında benzer oranlarda duyarlılık ve özgüllük oranı ile tespit edildiğini bildirmişlerdir (59).

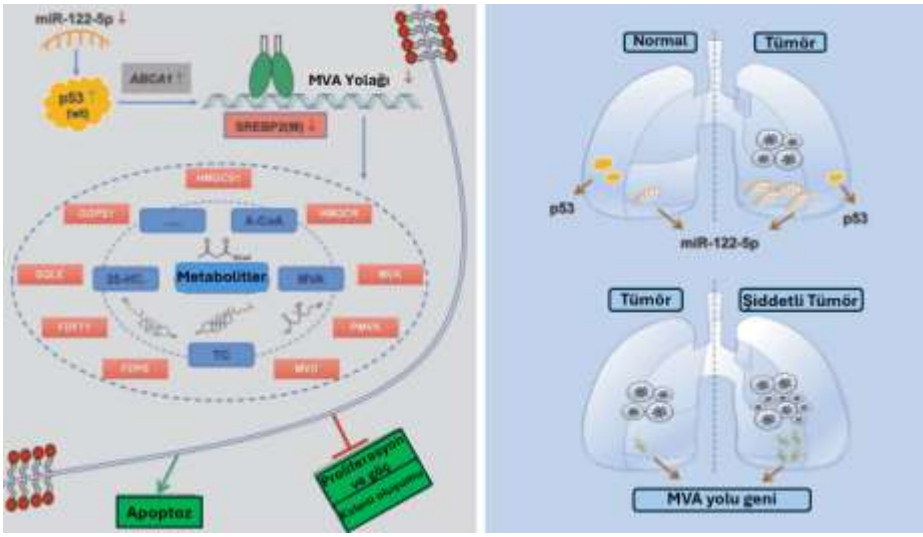
2.1 miRNA-122

Spesifik miRNA'lar yüksek duyarlılığa sahiptirler ve KHDAK'nin erken evresinde engelleyici olmayan bir teşhis için biyobelirteç olarak kullanılabilirler. miR-122-5p, böbrek, karaciğer, yumurtalık kanseri dahil birçok kanser çeşidinde yüksek düzeyde ifade edilmektedir. Dolayısıyla miR-122-5p'nin gelecekte kanser belirteci olarak klinikte rol oynayacağı söylenebilir (60).

miR-122 karaciğerde oldukça zengin bir mikroRNA çeşidiyken diğer dokularda bulunmaz (61). Karaciğerdeki baskın miRNA olmasıyla bilinen miR-122 klonlanmış dizilerin %72'sini oluşturur. Bu, miR-122'nin yetişkin karaciğer hücresi başına yaklaşık 66.000 kopya halinde mevcut olduğu, RNaz inhibisyon analizi ile gösterilerek doğrulanmıştır. Bu durum miR-122'yi en fazla ifade edilen miRNA'lardan biri haline getirmektedir (62).

Araştırmalar miR-122-5p'nin KHDAK'nin gelişiminde rol oynadığını göstermektedir (Şekil 2.2). Ayrıca miR-122-5p ile kanser proteini p53 arasındaki ilişki, biyoinformatik analiz ve lusiferaz raportör deneyleri ile belirlenmiştir (63). p53 geni mutasyonlarının %35-90 oranında küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK)'nde ve %49-50 oranında ise küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK)'nde bulunduğu rapor edilmiştir (64). p53, KHDAK'nin çoğalmasını ve hücre göçünü teşvik etmektedir (65). p53 ayrıca kanser lipid metabolizmasında da rol oynamaktadır. Çalışmalar, p53'ün sterol büyümesini engellemek için ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı A1'i (ABCA1) hedef aldığını göstermiştir (66). Biyolojik olarak önemli bir yol olan SREBP2 (Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 2), mevalonat (MVA) yolağının ana

düzenleyicisidir (67). Hücrelerin sterol (kolesterol gibi) ve nonsteroidal izoprenoidler üretmesine izin vermektedir (68). HMGCS1 (Hidroksimetilglutaril-CoA sentaz 1) geninin ifadesini düzenler ve kanser hücresi büyümesini inhibe ederek in-vivo akciğer tümörü metastazını indüklemektedir. HMGCR (hidroksimetilglutarilkoenzim A redüktaz), MVA yolağının önemli bir inhibitörüdür. Bu nedenle HMGCR'yi hedeflemek kanser tedavisi için umut verici bir stratejidir (69).



Şekil 2.2. miR-122-5p'nin mekanizma diyagramı, miR-122-5p küçük hücreli dışı akciğer kanserinde p53'ü hedefleyerek mevalonat yolunu düzenler. miR-122-5p KHDAK'nde A549 hücrelerini engelleyip, p53 ekspresyonunun yukarı regülasyonuna yol açmaktadır. Bu, p53 hedef geni ABCA1'in ekspresyonunu yükseltip, SREBP2'nin olgunlaşmasını inhibe etmektedir. miRNA-122-5p, MVA yolunu engelleyip A549 hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü etkilemekte ve A549 hücrelerinin apoptozunu teşvik etmektedir. miR-122-5p, KHDAK tümör dokularında p53 ekspresyonu ile negatif korelasyon göstermektedir. KHDAK'nin malignitesi MVA yolundaki anahtar genlerin ekspresyonu ile pozitif olarak ilişkili olabileceği düşünülmektedir (60).

2.2 miR-21

Kromozom üzerinde 17q23.2 bölgesinde bulunan miR-21(70), IL-6 sinyal yolunda Stat3 tarafından transkripsiyonel olarak aktive edilmekte olup invazyon ve metastazda önemli rolü olduğu tespit edilmiştir. Tümör baskılayıcı özellikteki PTEN mRNA'sını hedef alan mir-21, hücre çoğalması ve invazyonu üzerinde etki etmektedir. PTEN, çeşitli MMP (Matriks Metalloproteaz) proteinlerinin ifadesini inhibe ederek, hücre invazyonunu azaltmakta, tümör oluşumunu engelleyici yönde etki yapmaktadır (71,72). miR-21'in inhibisyonu, hücre döngüsü baskılayıcısı olarak bilinen p21cip1'in artan aktivitesi ile büyüme inhibisyonuna neden olmaktadır (73).

Yapılan çalışmalarda kanser olmayan hastalara kıyasla kanser hastalarından alınan örneklerde miR-21 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (74). Daha sonra yapılan bir çalışmada balgamdaki miR-21 artışının %69,9 duyarlılık ile %100 özgüllük göstererek akciğer kanseri tanısı koyabileceği rapor edilmiştir (75). Bu nedenle balgamda artan miR-21 ifadesinin tespiti, akciğer kanserini teşhis etmek için kullanılabilecek invaziv olmayan bir yöntem olarak önem taşımaktadır.

2.3 miR-205

Kromozom üzerinde 1q32.2 bölgesinde bulunan miR-205; 22 nükleotit uzunluğunda, gelişim, farklılaşma ve hücresel stres yanıtında görev alan bir miRNA'dır. Bazı kanser çeşitlerinde aşağı regülasyonu gözlemlenmiş ve apoptoz, EMT, proliferasyon ve metastaz ile onkogenik etkilerde rol oynadığı rapor edilmiştir (76). Küçük hücre dışı akciğer kanserinde yukarı regülasyonu hastalık patogenezi ile ilişkilendirilmiştir (77).

2.4 miR-155

Kromozom üzerinde 21q21.3 bölgesinde yer alan miR-155, BIC (B-cell Integration Cluster) ekzonu tarafından kodlanan 22-nükleotit uzunluğunda bir miRNA'dır. Esas olarak lenfoid dokularda ifade edilmektedir. Bağışıklık, hematopoietik farklılaşma, inflamasyon, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol oynayan oldukça aktif bir miRNA çeşididir. AT1R (Tip 1 anjiotensin II reseptör), HIF-1 (hipoksi ile indüklenebilir faktör 1), SMAD5 (SMAD gen ailesi üyesi 5), SLA (Scr-benzeri adaptör) ve RHOA (Ras homolog gen ailesi üyesi A) miR-155 tarafından düzenlenen genlerden bazılarıdır (78). miR-155'in ifadesinde artış olması, akciğer kanserinde hayatta kalma oranının azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (79).

2.5 miR-let-7a

Caenorhabditis elegans'ta memelilere kadar türler arasında büyük oranda korunmuş olan ve ilk keşfedilmiş miRNA ailesidir. İnsanlarda let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g, let-7i, miR-98 ve miR- 202 olmak üzere nükleotid sekansları birbirinden farklı olan on ayrı üyesi bulunmaktadır (80).

let-7 ailesinin, transkripsiyon sonrası faktörün baskılanması yoluyla RAS onkogenik ailesini kontrol ettiği belirlenmiştir (81). Let-7 hücre döngüsünü düzenleyen genlerden cdk-25A, cdk 6 ve siklin D2 vb pekçok farklı geni hedef aldığından G1/S'e geçişi ve hücre proliferasyonunu engellemektedir (82).

Akciğer kanseri hastaları üzerinde yapılan bir çalışma, let-7a ifadesi ile ameliyat sonrası hayatta kalma oranının azalması arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Ayrıca, insan adenokarsinom hücre dizisi üzerinde yapılan çalışmalar, let-7'nin yüksek düzeyde ifade edilmesinin hücrelerin proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermiş; bu da akciğer kanseri için potansiyel bir tedavi olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (31).

SONUÇ

Özellikle son on yılda yapılan çalışmalarda, miRNA ifadesinin insan malignitelerinde anormal şekilde olduğu iyi bilinmektedir. Bu bulgular aynı zamanda miRNA'ları moleküler onkolojinin odak noktası haline getirmiştir. miRNA ifade seviyelerindeki farklılıklar tümöre özgü ve bazen prognozla ilişkili olabilmektedir (83). miRNA'lar, gelişim ve farklılaşmadaki merkezi rolleri, tümörün biyolojik süreçleriyle ilişkileri, stabiliteleri ve tespit kolaylığı nedeniyle doku ve kan bazlı biyopsi olarak nitelendirilen kanser biyobelirteçleri sınıfını temsil etmektedirler (84). miRNA'lar tarafından negatif yönde düzenlenen hedef mRNA'ların büyük bir kısmı bilinmemekle birlikte gelecekte planlanacak çalışmalarda bu eksiklikler giderilerek miRNA'ların tanısal gücü daha iyi anlaşılmış olacaktır.

KAYNAKLAR

1. İnternet: International Agency for Research on Cancer (IARC) World Health Organization, https://www.iarc.who.int (Son Erişim Tarihi: 27.05.2024).
2. Zamani, A. G., Zamani, A., (2013). MikroRNA'lar ve Akciğer Kanseri. *Tuberk Toraks*, 61(1), 57-62.
3. Devesa, S.S., Bray, F., Vizcaino, A.P., Parkin, D.M. (2005). International lung cancer trends by histologic type: male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. *International journal of cancer*, 117, 294-299.
4. Siegel, R. L., Miller, K. D., Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA: a cancer journal for clinicians*, *68*(1), 7-30.
5. Kusenda, B., Mraz, M., Mayer, J., Pospisilova, S. (2006). MicroRNA biogenesis, functionality and cancer relevance. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, *150*(2), 205-215.
6. Kim, V. N. (2005). Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Molecules and cells*, *19*(1), 1-15.
7. İnternet: miRBase: the microRNA database the archive for microRNA sequences and annotations, https://www.mirbase.org (Son Erişim Tarihi: 27.05.2024).
8. Lee, Y. S., Dutta, A. (2009). MicroRNAs in cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *4*, 199-227.
9. Jay, C., Nemunaitis, J., Chen, P., Fulgham, P., Tong, A. W. (2007). miRNA profiling for diagnosis and prognosis of human cancer. *DNA and cell biology*, *26*(5), 293-300.
10. Lu, J., Deutsch, C. (2005). Folding zones inside the ribosomal exit tunnel. *Nature structural & molecular biology*, *12*(12), 1123-1129.
11. Küçükhüseyin, Ö., Öztürk, O. (2013). miRNAlar ve Meme Kanserindeki Etkileri. *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, *3*(5), 13-24.

12. Saydam, F., Değirmenci, İ., Güneş, H. V. (2011). MikroRNA\'lar ve kanser. *Dicle Tıp Dergisi*, *38*(1), 113-120.
13. Soyocak, A. (2018). MikroRNA Polimorfizmleri ve Kanser. *Tıp Fakültesi Klinikleri Dergisi*, *1*(1), 1-18.
14. Lee, R. C., Feinbaum, R. L., Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *cell*, *75*(5), 843-854.
15. Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R., Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, *403*(6772), 901-906.
16. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, *294*(5543), 853-858.
17. Ruvkun, G. (2001). Glimpses of a tiny RNA world. *Science*, *294*(5543), 797-799.
18. Acar, Ç. A., Yeşilot, Ş. (2018). Kanserde MikroRNA'lar ve İlaç Yanıtı. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, *25*(4), 498-507.
19. Kwak, P. B., Iwasaki, S., Tomari, Y. (2010). The microRNA pathway and cancer. *Cancer science*, *101*(11), 2309-2315.
20. Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, *136*(4), 642-655.
21. Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, *425*(6956), 415-419.
22. Roberts, T. C. (2015). The microRNA machinery. *microRNA: Basic Science: From Molecular Biology to Clinical Practice*, 15-30.
23. Esquela-Kerscher, A., Slack, F. J. (2006). Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. *Nature reviews cancer*, *6*(4), 259-269.

24. Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development*, *17*(24), 3011-3016.
25. O'connell, R. M., Rao, D. S., Chaudhuri, A. A., Baltimore, D. (2010). Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, *10*(2), 111-122.
26. Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. *Nature*, *404*(6775), 293-296.
27. Shenouda, S. K., Alahari, S. K. (2009). MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer and metastasis reviews*, *28*, 369-378.
28. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*, *116*(2), 281-297.
29. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature reviews genetics*, *9*(2), 102-114.
30. Karagün, B. Ş., Antmen, B., Şaşmaz, İ., Kılınç, Y. (2014). Mikro RNA ve kanser. *Türk Klinik Biyokimya Derg*, *12*(1), 45-56.
31. Çelik, D. A., Koşar, P. A., Özçelik, N. (2013). MikroRNAlar ve kanser ile ilişkisi. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, *20*(3), 121-127.
32. Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S.,Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., Croce, C. M. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(9), 2999-3004.
33. Calin, G. A., Croce, C. M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nature reviews cancer*, *6*(11), 857-866.

34. Obernosterer, G., Leuschner, P. J., Alenius, M., Martinez, J. (2006). Post-transcriptional regulation of microRNA expression. *Rna*, *12*(7), 1161-1167.
35. Meng, F., Henson, R., Wehbe–Janek, H., Ghoshal, K., Jacob, S. T., Patel, T. (2007). MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*, *133*(2), 647-658.
36. O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, C. V., Mendell, J. T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *nature*, *435*(7043), 839-843.
37. Dalmay, T. (2008). MicroRNAs and cancer. *Journal of internal medicine*, *263*(4), 366-375.
38. Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the national academy of sciences*, *99*(24), 15524-15529.
39. Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S. E., Agelian, R. I., Zupu, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volina, S., Liu, C, G., Kipps, T. J., Negrini, M., Croce, C. M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(39), 13944-13949.
40. Michael, M. Z., O'Connor, S. M., van Holst Pellekaan, N. G., Young, G. P., James, R. J. (2003). Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Molecular cancer research*, *1*(12), 882-891.
41. Johnson, S. M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K. L.,Brown, D., Slack, F. J. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, *120*(5), 635-647.

42. Dağlıoğlu, Y., Yüksel, A. (2023). Kanser Tedavisi İçin MikroRNA'ların Çok İşlevli Nano-taşıyıcılar İle Dağıtımı. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, *32*(1), 52-60.
43. Goossens, N., Nakagawa, S., Sun, X., Hoshida, Y. (2015). Cancer biomarker discovery and validation. *Translational cancer research*, *4*(3), 256.
44. Lassere, M. N. (2008). The Biomarker-Surrogacy Evaluation Schema: a review of the biomarker-surrogate literature and a proposal for a criterion-based, quantitative, multidimensional hierarchical levels of evidence schema for evaluating the status of biomarkers as surrogate endpoints. *Statistical methods in medical research*, *17*(3), 303-340.
45. Peng, L., Li, S., Li, Y., Wan, M., Fang, X., Zhao, Y., Zuo, W., Long, D., Xuan, Y. (2019). Regulation of BTG3 by microRNA-20b-5p in non-small cell lung cancer. *Oncology Letters*, *18*(1), 137-144.
46. Halvorsen, A. R., Bjaanæs, M., LeBlanc, M., Holm, A. M., Bolstad, N., Rubio, L., Peñalver, J. C., Cervera, J., Mojarrieta, J. C., López-Guerrero, J. A., Brustugun, O. T., Helland, Å. (2016). A unique set of 6 circulating microRNAs for early detection of non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, *7*(24), 37250-37259.
47. Zhang, Y., Sun, Z., Zhang, Y., Fu, T., Liu, C., Liu, Y., Lin, Y. (2016). The microRNA-635 suppresses tumorigenesis in non-small cell lung cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *84*, 1274-1281.
48. Shen, M., Cai, L., Jiang, K., Xu, W., Chen, Y., Xu, Z. (2018). The therapeutic role of inhibition of miR-328 on pulmonary carcinoma induced by chlamydia pneumoniae through targeting histone H2AX. *Cancer Biomarkers: Section A of Disease Markers*. 2018 Dec 27.
49. Wang, C., Li, S., Xu, J., Niu, W., Li, S. (2019). microRNA-935 is reduced in non-small cell lung cancer tissue, is linked to poor outcome, and acts

on signal transduction mediator E2F7 and the AKT pathway. *British Journal of Biomedical Science*, *76*(1), 17-23.

50. Huo, F., Liu, Y., Huangfu, G. X., Zheng, Y. L., Liu, L. X., Cao, W. (2017). MircoRNA-383 suppress cell proliferation and invasion by targeting GPC5 in human non-small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, *10*(1), 332-340.
51. Kang, M., Li, Y., Zhao, Y., He, S., Shi, J. (2018). miR-33a inhibits cell proliferation and invasion by targeting CAND1 in lung cancer. *Clinical and Translational Oncology*, *20*, 457-466.
52. Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., Mitsudomi, T., Takahashi, T. (2004). Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer research*, *64*(11), 3753-3756.
53. Wang, C., Li, S., Xu, J., Niu, W., Li, S. (2019). microRNA-935 is reduced in non-small cell lung cancer tissue, is linked to poor outcome, and acts on signal transduction mediator E2F7 and the AKT pathway. *British Journal of Biomedical Science*, *76*(1), 17-23.
54. Zhang, M., Zhou, S., Zhang, L., Zhang, J., Cai, H., Zhu, J., Huang, C., Wang, J. (2012). miR-518b is down-regulated, and involved in cell proliferation and invasion by targeting Rap1b in esophageal squamous cell carcinoma. *FEBS letters*, *586*(19), 3508-3521.
55. Çınar, İ., Dursun, H. G. (2016). miRNA biyogenezi ve kanser patogenezindeki fonksiyonu. *Sakarya Tıp Dergisi*, *6*(2) 64-71.
56. Shen, J., Todd, N. W., Zhang, H., Yu, L., Lingxiao, X., Mei, Y., Guarnera, M., Liao, J., Chou, A., Lu, C. L., Jiang, Z., Fang, H., Katz, R. L., Jiang, F. (2011). Plasma microRNAs as potential biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Laboratory investigation*, *91*(4), 579-587.

57. Foss, K. M., Sima, C., Ugolini, D., Neri, M., Allen, K. E., Weiss, G. J. (2011). miR-1254 and miR-574-5p: serum-based microRNA biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology*, *6*(3), 482-488.

58. Yu, L., Todd, N. W., Xing, L., Xie, Y., Zhang, H., Liu, Z., Fang, H., Zhang, J., Katz, R. L., Jiang, F. (2010). Early detection of lung adenocarcinoma in sputum by a panel of microRNA markers. *International journal of cancer*, *127*(12), 2870-2878.

59. Xing, L., Todd, N. W., Yu, L., Fang, H., Jiang, F. (2010). Early detection of squamous cell lung cancer in sputum by a panel of microRNA markers. *Modern Pathology*, *23*(8), 1157-1164.

60. Zheng, Y. K., Zhou, Z. S., Wang, G. Z., Tu, J. Y., Cheng, H. B., Ma, S. Z., Ke, C., Wang, Y., Jian, Q. P., Shu, Y. H., Wu, X. W. (2023). MiR-122-5p regulates the mevalonate pathway by targeting p53 in non-small cell lung cancer. *Cell Death & Disease*, *14*(4), 234.

61. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current biology*, *12*(9), 735-739.

62. Chang, J., Nicolas, E., Marks, D., Sander, C., Lerro, A., Buendia, M. A., Xu, C., Mason, W. S., Moloshok, T., Bort, R., Zaret, K. S., Taylor, J. M. (2004). miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from *hcr* mRNA and maydownregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA biology*, *1*(2), 106-113.

Chang J, Nicolas E, Marks D, Sander C, Lerro A, Buendia MA, (2004)

63. Fan, X., Wu, X. (2019). MicroRNA-122-5p promotes the development of non-small cell lung cancer via downregulating p53 and activating PI3K-AKT pathway. *J buon*, *24*, 273-279.

64. Pehlivan, M., Yılmaz, U., Koyuncuoğulu, M., İtil, O., Sevinç, C., Akkoçlu, A. (2002). Küçük Hücreli Akciğer Kanserinde p53 Ekspresyonunun

Kemoterapiye Yanıt ve Sağkalım Üzerine Etkisi. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*, *50*(1), 29-33.

65. Wudu, M., Ren, H., Hui, L., Jiang, J., Zhang, S., Xu, Y., Wang, Q., Su, H., Jiang, X., Dao, R., Qiu, X. (2019). DRAM2 acts as an oncogene in non-small cell lung cancer and suppresses the expression of p53. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *38*, 1-13.
66. Moon, S. H., Huang, C. H., Houlihan, S. L., Regunath, K., Freed-Pastor, W. A., Morris IV, J. P., Tschaharganeh, D. F., Kastenhuber, E. R., Barsotti, A. M., Culp-Hill, R., Xue, W., Ho, Y. J., Baslan, T., Li, X., Mayle, A., Stanchina, E. D., Zender, L., Tong, D. R., Alessandro, A. D., Lowe, S. W., Prives, C. (2019). p53 represses the mevalonate pathway to mediate tumor suppression. *Cell*, *176*(3), 564-580.
67. Guerra, B., Recio, C., Aranda-Tavío, H., Guerra-Rodríguez, M., García-Castellano, J. M., Fernández-Pérez, L. (2021). The mevalonate pathway, a metabolic target in cancer therapy. *Frontiers in oncology*, *11*, 626971.
68. Liao, P., Hemmerlin, A., Bach, T. J., Chye, M. L. (2016). The potential of the mevalonate pathway for enhanced isoprenoid production. *Biotechnology advances*, *34*(5), 697-713.
69. Cai, S., Chen, S. M., Wang, Y. Y., Liu, H. Z., Li, F., & Zhang, Z. D. (2021). Exploration of potential mechanisms of corylin against lung cancer by high-throughput sequencing. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 183-192.
70. Shah, M. Y., Calin, G. A. (2014). MicroRNAs as therapeutic targets in human cancers. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, *5*(4), 537-548.
71. Löffler, D., Brocke-Heidrich, K., Pfeifer, G., Stocsits, C., Hackermüller, J., Kretzschmar, A. K., Burger, R., Gramatzki, M., Blumert, C., Bauer, K., Cvijic, H., Ullmann, A. K., Stadler, P. F., Horn, F. (2007). Interleukin-6–dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved

enhancer. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *110*(4), 1330-1333.

72. Frankel, L. B., Christoffersen, N. R., Jacobsen, A., Lindow, M., Krogh, A., Lund, A. H. (2008). Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(2), 1026-1033.
73. Asangani, I. A., Rasheed, S. A., Nikolova, D. A., Leupold, J. H., Colburn, N. H., Post, S., Allgayer, H. (2008). MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*, *27*(15), 2128-2136.
74. Xie, Y., Todd, N. W., Liu, Z., Zhan, M., Fang, H., Peng, H., Alattar, M., Deepak, J., Stass, S. A., Jiang, F. (2010). Altered miRNA expression in sputum for diagnosis of non-small cell lung cancer. *Lung cancer*, *67*(2), 170-176.
75. Wang, Q., Wang, S., Wang, H., Li, P., Ma, Z. (2012). MicroRNAs: novel biomarkers for lung cancer diagnosis, prediction and treatment. *Experimental Biology and Medicine*, *237*(3), 227-235.
76. Yu, J., Ryan, D. G., Getsios, S., Oliveira-Fernandes, M., Fatima, A., Lavker, R. M. (2008). MicroRNA-184 antagonizes microRNA-205 to maintain SHIP2 levels in epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(49), 19300-19305.
77. Mizuno, K., Mataki, H., Seki, N., Kumamoto, T., Kamikawaji, K., Inoue, H. (2017). MicroRNAs in non-small cell lung cancer and idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of human genetics*, *62*(1), 57-65.
78. Faraoni, I., Antonetti, F. R., Cardone, J., Bonmassar, E. (2009). miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, *1792*(6), 497-505.

79. Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., Stephens, R. M., Okomoto, A., Yokota, J., Tanaka, T., Calin, G. A., Liu, C., Croce, C. M., Harris, C. C. (2006). Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer cell*, *9*(3), 189-198.
80. Blandino, G., Fazi, F., Donzelli, S., Kedmi, M., Sas-Chen, A., Muti, P., Strano, S., Yarden, Y. (2014). Tumor suppressor microRNAs: A novel non-coding alliance against cancer. *FEBS letters*, *588*(16), 2639-2652.
81. Johnson, S. M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K. L., Brown, D., Slack, F. J. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, *120*(5), 635-647.
82. Malumbres, M. (2013). miRNAs and cancer: an epigenetics view. *Molecular aspects of medicine*, *34*(4), 863-874.
83. Calin, G. A., Croce, C. M. (2006). MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer research*, *66*(15), 7390-7394.
84. Boeri, M., Pastorino, U., Sozzi, G. (2012). Role of microRNAs in lung cancer: microRNA signatures in cancer prognosis. *The Cancer Journal*, *18*(3), 268-274.

BÖLÜM 5

BİTKİSEL ANKSİYOLİTİKLERE MOLEKÜLER DÜZEYDE BAKIŞ

Büşra KARPUZ AĞÖREN[7], Esra KÜPELİ AKKOL[8*]

DOI: https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.12707317

[7] Başkent Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, 06790, Ankara, Türkiye
[8] * *Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, 06330, Ankara, Türkiye*
*: Prof. Dr. Esra AKKOL, Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, 06330, Ankara, Türkiye, E-mail: esrak@gazi.edu.tr

1. Giriş

Bitkiler, tarih boyunca insanlar tarafından avlanmak, dini ritüellere saygı göstermek, yiyecek ve barınak elde etmek, sağlık sorunlarını çözmek gibi çok çeşitli alanlarda yararlandıkları en önemli doğal kaynaklar olmuştur. Anadolu'da yaşamış olan Dioscorides, ilk farmakope olarak kabul edilebilecek 5 ciltlik "De Materia Medica" adlı eserinde 500 tıbbi bitkinin ve bu bitkilerden hazırlanan ilaçların kullanımına ilişkin ayrıntılı bilgilere yer vermiştir [1]. Bitkilerin tıbbi amaçlarla kullanımı, günümüzde modern tıbba giden yolun başlangıcıdır. Tıbbi bitkilerin kullanımındaki en önemli üç faktör, geleneksel ilaçlarla benzerlik gösteren kalite, etkinlik ve güvenliktir. Bu bağlamda tıbbi bitkilerin etkili bileşiklerinin tespiti ve bu bileşiklerinin etki mekanizmalarının belirlenmesine yönelik çalışmalar oldukça önemlidir.

Anksiyete, kaynağı büyük bir ölçüde bilinmeyen potansiyel bir tehlike algılanması durumunda ortaya çıkan, hoş olmayan özellikleri ile diğer duygulanım şekillerinden ayrılan bir durumdur. Patolojik açıdan anksiyetenin şiddeti, seyri ve süresi değişkenlik gösterebilir. Fizyolojik olarak çarpıntı, nefes almada zorluk, hızlı nefes alma, ellerde ve ayaklarda titreme, aşırı terleme gibi belirtiler söz konusudur. Anksiyete, dünya çapında 260 milyondan fazla insanı etkileyen en yaygın ruhsal bozukluklardan biri olarak kabul edilmektedir [2]. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) verilerine göre, 2015 yılında anksiyete bozuklukları yaşayan insan sayısının tahmini 264 milyon olduğu ve 2005 yılından bu yana %14,9 oranında arttığı belirtilmiştir [3]. COVID-19 pandemisinin ortaya çıkışı, 2020 yılından sonra dünya genelinde anksiyete bozukluklarının hızla artmasına yol açmıştır. Pandemi sırasında, majör depresif bozukluk vakaları dünya genelinde yaklaşık 53,2 milyon ek vaka ile %27,6 oranında artarken, anksiyete vakalarında yaklaşık 76,2 milyon artış ile %25,6'lık bir yükseliş tespit edilmiştir. Türkiye'de COVID-19 pandemisi süreci sonunda anksiyete bozukluklarındaki artışın yaklaşık %34 olduğu rapor edilmiştir [4]. Anksiyete ve uykusuzluk tedavisinde kullanılan konvansiyonel

ilaçların suistimal edilmeleri, bağımlılık geliştirmeleri, amnezi, bilişsel ve cinsel işlev bozukluğu gibi önemli yan etkileri nedeniyle daha az yan etkiye sahip doğal kaynaklı bileşiklere yönelme söz konusudur. Bu bileşiklerin etki mekanizmaları anksiyeteye neden olan çok sayıda farklı moleküler mekanizmaya ve faktöre bağlıdır.

2. Anksiyete oluşumunda rol oynayan sistemler ve nörotransmitterler

Stres ve anksiyete bozukluklarının oluşumunda, nörojenezin azalmasıyla hipotalamik-hipofiz-adrenal (HPA) ekseninin düzensizleşmesi, enflamasyon ve oksidatif stresin artması, GABAerjik, serotonerjik, adrenerjik yolaklarda değişiklikler ve psikolojik stresi ölçmek için en çok kullanılan belirteçlerden biri olan kortizol gibi glukokortikoidlerin daha yüksek salgılanmasını içeren hem akut hem de kronik strese yanıt veren çok sayıda faktör ve farklı beyin alanları rol oynamaktadır [5].

2.1. Gama-aminobütirik asit (GABA)

Gama-aminobütirik asit (GABA), glutamat dekarboksilaz enzimi aracılı glutamattan sentezlenen, sinir sisteminde aktif rol oynayan, beyindeki major inhibitör nörotransmiterdir. Sinir iletimini inhibe ederek nöronal uyarılabilirliği azaltma işlevi görür. GABAerjik nöronlar hipokampus, talamus, bazal ganglionlar, hipotalamus ve beyin sapında bulunur. GABA reseptörleri, GABA post-sinaptik sinir terminaline salındığında yanıt veren reseptörlerdir. Merkezi sinir sistemi (MSS) için başlıca inhibitör reseptörler olarak kabul edilirler. GABA reseptörleri $GABA_A$ ve $GABA_B$ olarak alt bölümlere ayrılır. $GABA_A$ ligand kapılı bir iyon kanalı/inotropik reseptör olarak sınıflandırılır. $GABA_A$ hızlı sinaptik inhibisyonda dikkate alınır. Reseptörün GABA'ya bağlanması üzerine, klorürün hücre zarı boyunca hareket etmesine izin vermek için bir iyon gözeneği açılır. Klorür negatif yüklü bir iyon olup pozitif yük alanına doğru ilerler ve klorür hücre içi boşluğa geçer. Negatif yükün artışı hücrenin dinlenme

potansiyelini azaltacak ve böylece inhibitör bir etkiye neden olacaktır. $GABA_A$ reseptörleri MSS boyunca bulunur. Ancak limbik sistemde ve retinada yüksek konsantrasyonlara sahiptirler [6]. $GABA_A$ reseptörü, daha büyük bir GABA/ilaç reseptörü-Cl- iyon kanalı makromoleküler kompleksinin bir parçasıdır. Kompleks beş ana bağlanma alanı içerir. Bunlar arasında GABA, benzodiazepinler, barbitüratlar ve pikrotoksin için Cl- kanalının içinde veya yakınında lokalize bağlanma bölgeleri ve anestezik steroitler için bağlanma bölgeleri bulunmaktadır. Bu bağlanma alanları GABA uyarımına reseptör yanıtını modüle eder. Ayrıca, uçucu anestezikler, etanol ve penisilin gibi diğer ilaçların da bu reseptör üzerinde etkisi olduğu bildirilmiştir. Bu kompleksin ayrılmaz bir parçası Cl^- kanalıdır. GABA bağlayıcı bölge Cl^- kanalının açılmasından doğrudan sorumludur. Çeşitli agonistler bu bölgeye bağlanır ve GABA benzeri tepkiler ortaya çıkarır. En kullanışlı agonistlerden biri, psikoaktif mantar *Amanita muscaria*'dan izole edilen ve doğal olarak oluşan bir GABA analoğu olan muscimol bileşiğidir [7]. $GABA_A$ reseptörü, beyindeki birçok ilacın etkisi için ana moleküler hedeftir. Bunlar arasında benzodiazepinler, intravenöz ve uçucu anestezikler ve muhtemelen etanol bulunmaktadır. Benzodiazepin reseptör bağlama bölgeleri GABA bağlama bölgeleri ile çiftleşir. Ayrıca benzodiazepin reseptörleri, GABA bağlanma bölgesini içeren proteini tanımak için geliştirilen antikorlarla immünopresipite edilir. Bu da benzodiazepin reseptörünün $GABA_A$ reseptörü-Cl^- kanal kompleksinin ayrılmaz bir parçası olduğunu göstermektedir [8]. Benzodiazepin agonistleri, barbitüratları da içeren genel depresan ilaçlar sınıfında antikonvülsan, anksiyolitik ve sedatif-hipnotik aktivite gösteren en yeni ajan grubunu temsil eder. İyi bilinen örnekler arasında diazepam ve klordiazepoksit yer alır ve bunlar genellikle anti-anksiyete etkileri için reçete edilir. Benzodiazepin agonistlerinin etki mekanizması GABAerjik iletimi arttırmaktır. Elektrofizyolojik çalışmalardan, bu benzodiazepinlerin GABA'ya yanıt olarak kanal açılma sıklığını artırdığı ve böylece farmakolojik ve terapötik etkilerini

açıkladığı bilinmektedir. Ek olarak, benzodiazepin bölgesi barbitürat ve pikrotoksin bölgelerine allosterik olarak bağlanır. Benzodiazepin reseptörleri, belirli ligandlara afinite açısından heterojendir. β-karbolinler, siklopirrolonlar ve imidazopiridinler gibi çok çeşitli nonbenzodiazepinler de benzodiazepin bölgesine bağlanır [6].

$GABA_B$ reseptörü bir G-çift protein reseptörüdür. $GABA_B$ reseptörleri yavaş sinaptik inhibitörler olarak kabul edilir. GABA reseptöre bağlandıktan sonra potasyum iletkenliği artar. Adenilil siklaz aktive olarak kalsiyum girişini engeller ve böylece diğer nörotransmitterlerin presinaptik salınımını inhibe eder. $GABA_B$'nin bulunduğu yerler arasında talamik yollar ve serebral korteks yer alır [9].

GABA miktarını artıran ilaçlar genellikle antikonvülsan, sakinleştirici ve anksiyolitik olarak kullanılır. GABA'daki artış nedeniyle, MSS depresyonu yaygın bir yan etkidir. Bazı GABA agonistlerinin bağımlılık potansiyeli vardır ve kullanımı yakından izlenmelidir. $GABA_A$ reseptör agonistleri: Alkol (etanol), barbitüratlar ve benzodiazepin. Barbitüratlar fenobarbital ve sodyum tiyopental içerir. Barbitüratlar yüksek bağımlılık potansiyeli ve antidot eksikliği nedeniyle daha az kullanılmaktadır. Benzodiazepinler çoğunlukla onların yerini almıştır. Benzodiazepinler anksiyete, ajitasyon, nöbetler ve kas spazmlarını tedavi edebilir. Benzodiazepinin sadece kısa süreli kullanımı teşvik edilmektedir. Benzodiazepinlerin aşırı dozu, özellikle alkol ve opioidlerle birlikte kullanıldığında, solunum depresyonu nedeniyle ölümcül olabilir [10]. Flumazenil benzodiazepinler için geri döndürücü ajandır. $GABA_B$ reseptör agonistleri: Baklofen, sodyum oksibat (GHB), propofol. $GABA_B$ agonistleri MSS depresyonunu artırır. Baklofen tipik olarak spastisiteyi tedavi etmek için bir kas gevşetici olarak kullanılır. GHB narkolepsi tedavisi için onaylanmıştır. GHB'de ciddi MSS depresyonu yaygındır. Belirgin solunum depresyonu ve obtundasyon yaygın olarak görülür. Propofol genel anestezi indüksiyonu ve

idamesi için kullanılır. Yan etkileri arasında hipotansiyon, apne ve istemsiz vücut hareketleri yer alır [11].

2.2. Serotonin (5-Hidroksitriptamin)

Serotonin (5-hidroksitriptamin; 5-HT) depresyon, anksiyete, panik atak, gibi birçok psikiyatrik hastalıkta önemli rol oynayan bir nöromodülatördür. 5-HT, triptofanın triptofan hidroksilaz tarafından 5 hidroksi triptofana dönüştürülüp devamında DOPA dekarboksilazın etkisiyle serotonine dönüşmesiyle meydana gelir. Serotonin esas olarak üç ana hücre tipinde depolanmış olarak bulunur: (a) MSS'deki ve bağırsak miyenterik pleksusundaki serotonerjik nöronlar, (b) gastrointestinal sistem mukozasındaki enterokromaffin hücreleri ve (c) kan trombositleri. 5-HT resöptörlerinin ise yaygın olarak kabul edilen sınıflandırma şeması farmakolojik özelliklere, ikinci haberci işlevine ve çıkarılan amino asit dizisine dayanmaktadır. Bu sınıflandırma şeması 5-HT reseptörlerinin 7 alt ailesini önermektedir. [12]. Özellikle anksiyete mekanizmasinda 5-HT1A ve 5-HT2A reseptörleri öne çıkmaktadır. Buspiron, çeşitli anksiyete bozukluklarını tedavi etmek için kullanılan 5-HT1A reseptörlerinde kısmi bir agonisttir. 5-HT ve diğer aracıların salınımını azaltan inhibitör otoreseptörler olan 5-HT1A reseptörleri için yüksek spesifiklik gösterir. Buspiron ve ilgili bileşikler ipsapiron ve gepiron, sedasyona veya motor koordinasyona neden olmaz ve barbitüratlar gibi diğer anksiyolitiklerde olduğu gibi yoksunluk etkilerine sahip değildir. Serotonin, lokus seruleus üzerindeki modulatuar etkileri ve amigadalaya gelen serotonerjik liflerin varlığı ile anksiyetede rol oynar. Serotonerjik ve noradrenerjik sistemler arasındaki etkileşme, anksiyete gelişimini tetikleyen bir unsurdur. Yapılan preklinik çalışmalarda, santral serotonerjik merkez olarak kabul edilen beyin sapının raphe sistemi noradrenerjik nöronlar tarafından innerve edilirken, lokus seruleusun da beyin sapı raphe sisteminden serotonerjik innervasyonlar aldığı belirlenmiştir. [13].

2.3. Kolesistokinin

Beyin sapı ve orta beyinin pekrçok bölümünde bulunan duygudurum ile ilişkili bir nöropeptid olan kolesistokinin bir anksiyete bozukluğu olan panik ataklarda rol oynar. Kolesistokinin uzun zamandır duygusal durumların düzenlenmesinde rol oynayan bir nöromediyatör olarak kabul edilmektedir. Kolesistokinin, beyinde yüksek oranlarda bulunur ve GABA ve 5-HT sistemleri ile etkileşime girer. Anksiyete bozukluklarında, stres ve korku üzerinde kortikosteroid regülasyonunun rolü araştırılmış ve kortikosteroidlerin beynin korku uyaranları işlemesini etkileyerek belirli sinir yolaklarının aktivitesini artırabileceği veya azaltabileceği tespit edilmiştir. MSS'de kolesistokininin CCK-A ve CCK-B reseptör tipleri tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda, insanlarda CCK-4 ve pentagastrin gibi CCK-B reseptör agonistleri panik atağın ortaya çıkmasına neden olurken, deney hayvanlarında CI-988 ve L-365, 250 gibi CCK-B reseptör antagonistleri nin anksiyolitik etkiye neden olduğu belirlenmiştir. Bu durum, kolesistokininin anksiyete bozukluklarına aracılık eden bir nöromediyatör olduğunu göstermektedir. [14].

2.4. Oksidatif Stres

Başta oksijen ve nitrojen türleri olmak üzere reaktif türlerin aşırı üretimi oksidatif stresi meydana getirir. Bu tür reaktif türlerin öncüleri, amino asitler, vitaminler, oksijen, nitrit ve sülfat içeren organik ve inorganik bileşiklerden türetilir. Şiddetlenen oksidatif stres, proteinlerin, lipidlerin ve nükleik asitlerin oksidasyonuna neden olarak oksidatif bölünme sürecinden kaynaklanan yüksek ve düşük moleküler ağırlıklı ürünler (yani aldehitler, ketonlar ve laktamlar) oluşturur. En çok çalışılan toksik aldehitlerden biri, lipit çift katmanlı membranlarda bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinden kaynaklanan oksidatif hasarın sonucu olan malonaldehittir (MDA) [15]. Oksidatif stres, endojen ve eksojen antioksidan savunma mekanizmaları ile kontrol edilebilir. Bu tür

antioksidan sistemler serbest radikal temizleyicileri olarak kabul edilir ve zihinsel bozukluklar da dahil olmak üzere kronik hastalıkları önleyebilir [16].

Endojen antioksidan savunma temel olarak süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) gibi enzimatik sistemlerden oluşur. Bu enzimler süperoksit, peroksitler ve diğer serbest radikallerin şelatlanması yoluyla redoks dengesinin korunmasından sorumludur. SOD, dismutazı süperoksit anyon radikalinden ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksite (HO) katalizleyerek H_2O_2 üretir. H_2O_2, GPx veya CAT tarafından su ve oksijene dönüştürülebilir. GPx, indirgenmiş glutatyonu (GSH) oksitlenmiş glutatyon formuna (GSSH) oksitlemek için HO kullanır. Son olarak, NADPH ortamı stabilize etmek için yüksek enerjili elektronlar bağışlar. Eksojen antioksidanlar, E, C, A vitamini, karotenoitler ve polifenollerle diyetle alınabilirler. Oksidatif stres, normal beyin performansını, nöronal işlevi ve nörotransmisyonu, daha yüksek oksijen harcaması ve antioksidan savunmaların tükenmesi yoluyla değiştirebilir [17]. Anksiyete bozukluklarında antioksidan savunmanın azaldığı ve proteinler, lipidler ve nükleik asitlerde oksidatif hasarın arttığı öne sürülmüştür [16]. Polifenoller, bir elektron veya bir hidrojen atomu bağışı ile reaktif türleri stabilize edebilir, antioksidan enzimlerin ekspresyonunu veya aktivitesini artırabilir ve pro-oksidatif enzimlerin ekspresyonunu inhibe edebilir [18].

2.5. Enflamasyon

Duygudurum bozuklukları yaygın olarak egzersiz, diyet, vücut ağırlığı, uyku bozukluğu, eşlik eden kronik hastalık, genetik belirleyiciler ve travma veya psikolojik strese maruz kalma gibi çevre ve yaşam tarzı faktörleriyle ilişkilendirilebilen kronik bir enflamasyonla ilişkilidir [19]. Bazı yazarlar, duygudurum ve anksiyete ile ilişkili bozuklukları olan hastalarda periferik ve merkezi düzeyde artan enflamatuvar belirteçler tanımlamıştır [20]. Buna ek olarak, interlökin-6 (IL-6), IL-1α, IL-1β ve tümör nekroz faktörü-α (TNF-α) gibi enflamatuvar sitokinlerin ve bunların reseptörlerinin veya dönüştürücü

enzimlerinin yükseldiği gözlemlenmiştir. İlginç bir şekilde, pro-enflamatuvar sitokinlerin bu şekilde artışı, duygudurum bozuklukları dışında başka bir hastalığı olmayan hastalarda da gözlenmiştir. Bu anlamda, enflamasyonun duygudurum bozukluklarına mı yoksa tam tersine mi neden olduğu net değildir, ancak pro-enflamatuvar sitokinlerin duygudurumla ilgili bozukluk semptomlarına katkıda bulunduğu tespit edilmiştir [19].

Çay polifenolleri, uyku yoksunluğu ile indüklenen strese maruz bırakılan sıçanların hipokampüsünde TNF-α seviyelerinde önemli bir azalma göstermiştir. Ayrıca, çay polifenolleri, inaktif TNF-α öncüsünün aktif olgun forma dönüşümünden sorumlu enzim olan TNF-α dönüştürücü enzimi (TACE) azaltabilmiş ve bu da aktif TNF-α'nın aracılık ettiği enflamatuvar süreçlerin modülasyonuna işaret etmiştir [21]. Pro-enflamatuvar sitokinler, kortizol sentezinde artışa neden olan kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH) salınımını artırarak HPA eksenini aktive edebilmektedir. Kalıcı stres uyaranları, nörogenez sürecini engelleyen pro-enflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu artıran mikrogliaları aktive eder. Ayrıca, beyindeki serotonin sentezi, nöronal fonksiyonu ve plastisiteyi değiştirebilen pro-enflamatuvar sitokinler tarafından azaltılabilir. Bazı moleküler çalışmalar, NF-κB sinyal yolunu aşağı doğru düzenleyerek bitkilerden elde edilen polifenollerin uygulanmasıyla anksiyete veya stres durumunda inflamatuar sürecin zayıflatılmasını tanımlamıştır. Bununla birlikte, polifenollerin anksiyete/stres bozukluklarını modüle edebileceği enflamasyonla ilgili mekanizmaları belirlemek için farklı polifenol alt sınıflarının etkisinin derinlemesine değerlendirilmesi gerekmektedir [22].

2.6. Hipotalamus-hipofiz-adrenal (HPA) ekseni

Artan glukokortikoit seviyeleri nöronal sağkalımı, enerji metabolizmasını ve glukoz homeostazını etkileyebilir ve bunlar stres ve anksiyete dahil olmak üzere duygudurum bozukluklarıyla ilişkilidir. Dolaşımdaki yüksek glukokortikoid içeriği HPA ekseninin hiperaktivasyonu ile ilişkilidir. HPA ekseninin hiperaktivitesi, paraventriküler hipotalamik

çekirdekten CRH salgılanmasını artırarak HPA eksenini kalıcı olarak uyarır ve ön hipofizden adrenokortikotropik hormon (ACTH) salgılanmasını sağlar. Dolaşımdaki ACTH, adrenal bezden glukokortikoid salgılanmasını artırır, bu da glukokortikoid reseptörlerini inhibe eder veya azaltır ve dolaşıma daha fazla glukokortikoid salınmasına neden olur. Birçok stresli süreç, HPA ekseni aktivitesinin programlanması ve glukokortikoidlerin bazal içeriğinin artırılması yoluyla katekolaminler ve glukokortikoidlerin aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir İnsanlarda kortizol (ve sıçanlarda kortikosteron) HPA ekseninde üretilen ve stres seviyesini temsil eden bir hormondur [23].

HPA ekseni, çevresel, ekolojik, duygusal ve fiziksel stres faktörleri de dahil olmak üzere farklı stres faktörlerine yanıt olarak aktive olabilen bu zihinsel bozuklukların gelişiminde rol oynamaktadır [24]. HPA ekseninin aşırı uyarılması bağırsak disbiyozu ile ilişkilendirilmiştir [25]. Bağırsak disbiyozu, bağırsak mikrobiyotasındaki yararlı ve zararlı mikroorganizmaların dengesinin bozulması durumudur. Sağlıklı bir bağırsak mikrobiyotası, sindirim sistemi sağlığı, bağışıklık fonksiyonu ve genel vücut sağlığı için önemli olan birçok farklı bakteri türünü dengeli bir şekilde içerir. Disbiyoz, bu denge bozulduğunda ortaya çıkar ve genellikle zararlı bakterilerin, mantarların veya diğer mikroorganizmaların aşırı çoğalmasıyla karakterizedir. Bağırsak mikrobiyotasının bileşiminde ve işlevinde değişiklikler meydana gelir ve bağırsak pH'sında değişikliklere yol açar; sıkı bağlantı proteinlerinin afinitesi düşer; endotoksinlerin, lipopolisakkaritlerin ve sitokinlerin aşırı üretimi ve bunun sonucunda bağırsak geçirgenliği artar [26]. Bu durum, HPA eksenine etkilerinin yanı sıra, bağırsak serotonin, epinefrin ve norepinefrin taşıyıcısının; nöropeptid Y (NPY) sisteminin; beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ve glutamat reseptörü gibi sıkı bağlantı proteinlerinin ifadesini düzenleyen temel bir rol oynar ve bunların hepsi birlikte deneklerin davranışsal ve biyokimyasal yönlerini etkileyebilir [25].

Anksiyete bozukluklarında kullanılan ilaçlar ve mekanizmaları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Anksiyete bozukluklarında kullanılan ilaçlar ve etki mekanizmaları

İlaç Grubu	Etki Mekanizması	Klinik uygulama
Benzodiazepinler	$GABA_A$ reseptörlerine bağlanır, GABA aracılı klorür iyon kanallarının açılma frekansını arttırarak membran hiperpolarizasyonunda artışa neden olur.	Akut anksiyete durumları, uykusuzluk, iskelet kası gevşemesi, anestezi (yardımcı)
Barbitüratlar	GABAA reseptörlerine bağlanır, GABA aracılı klorür iyon kanallarının açılma frekansını arttırarak membran hiperpolarizasyonunda artışa neden olur.	Anestezi, uykusuzluk, epileptik bozukluklar
Hipnotikler (Eszopiklon, Zaleplon, Zolpidem)	$GABA_A$ reseptörlerine selektif olarak bağlanır, benzodiazepin benzeri mekanizma ile etki eder.	Uyku bozuklukları (özellikle uykuya dalamama problemlerinde)
Melatonin Reseptör Agonistleri (Ramelteon)	MSS'de suprakiazmatik çekirdeklerdeki MT1 ve	Uyku bozuklukları (özellikle uykuya

	MT2 reseptörlerini aktive eder.	dalamama problemlerinde)
5-HT Reseptör Agonistleri (Buspiron)	Mekanizma kesin değildir. Dopaminin D2 ve serotoninin 5-HT2 reseptörlerine afinitesi bulunmaktadır.	Yaygın anksiyete bozukluğu

3. Stres kaynaklı anksiyetede rol oynayan moleküler sinyal yolları

3.1. NF-κB sinyal yolağı

NF-κB (aktive B hücrelerinin nükleer faktör kappa-ışık zinciri arttırıcısı), bağışıklık ve enflamatuvar reaksiyonlarda yer alan genlerin ekspresyonunu kontrol eden bir transkripsiyon faktörüdür. Bu transkripsiyon faktörü yaygın olarak inflamasyonun ana düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir. NF-κB'nin aktivasyon mekanizmaları tam olarak anlaşılmamış olsa da veriler bağışıklık hücreleri, mikroglia ve astrositler tarafından salınan proinflamatuar sitokinler TNFα, IL-1β ve IL-6'nın kritik bir rolü olduğunu göstermiştir [27]. Stres kaynaklı anksiyete, depresyon benzeri davranışlar ve kan beyin bariyeri (KBB) bozulması astrositlerde, mikroglialarda, serebral endotelyal hücrelerde ve nöronlarda NF-κB aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir [27,28]. Koo ve arkadaşları (2010), kronik strese maruz kalmanın neden olduğu depresyon benzeri davranışlara, hipokampus da dahil olmak üzere belirli beyin bölgelerinde NF-κB sinyal yolunun aktivasyonunun aracılık ettiğini bildirmiştir.

Chiang ve arkadaşları (2019) tarafından adolesanlarda yapılan bir çalışmada, depresyon skoru daha yüksek olan bireylerde inflamasyonla ilişkili genler yukarı doğru düzenlendiği bildirilmiştir. Veriler, monositlerde artan NF-κB aktivitesinin ve yüksek proinflamatuar sitokin seviyelerinin majör depresif

bozukluk ve travma sonrası stres bozukluğu semptomlarının şiddeti ile ilişkili olduğunu güçlü bir şekilde göstermektedir [29]. Deney hayvanlarının 4 haftalık kronik öngörülemeyen hafif strese maruz bırakılması, TLR4'ün yukarı regülasyonu yoluyla NF-κB'nin aktivasyonuna yol açarak nöroenflamasyon, oksidatif stres, anksiyete ve depresif benzeri davranışlarla sonuçlanmıştır. Strese maruz kalmanın bu sonuçları, BV2 mikroglial hücre hattını kullanan bir in vitro modelde reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin salınımını da azaltan bir TLR4 inhibitörü ile ön muamele ile tersine çevrilmiştir. Dolayısıyla, TLR4/NF-κB, stres ve ilgili hastalıkların patojenik mekanizmalarında yer alan önemli bir sinyal yoludur [30].

3.2. GSK3 sinyalizasyonu

Glikojen sentaz kinaz-3 (GSK3) sinyali, enfeksiyon veya travmada olanlara benzer şekilde, stres kaynaklı nöroenflamasyon ve KBB bozulmasına da dahil edilmiştir. Beyinde ve KBB'de stres kaynaklı değişikliklerin, en azından kısmen, inflamasyonla ilişkili transkripsiyon faktörlerini düzenleyerek enflamatuvar yanıta katkıda bulunan GSK3'ün aktivasyonuna bağlı olduğuna inanılmaktadır [31]. GSK3'ün aktivitesine, psikolojik ve çevresel stres de dahil olmak üzere bir dizi uyaran tarafından düzenlenen fosfatidilinositol 3-OH kinaz (PI3K), protein kinaz B (PKB/Akt) ve MAPK gibi yukarı akış kinazlarının uyarıcı aktivitesi aracılık eder [32].

Cheng ve arkadaşları (2018), uzun süreli öğrenilmiş çaresizlik yaşayan farelerde, GSK3'ün stres kaynaklı aktivasyonunun, özellikle TNFα olmak üzere proinflamatuar faktör seviyelerini artırarak BBB bozulmasına katkıda bulunduğunu göstermiştir. Bu nedenle, bir TNFα inhibitörü olan etanersept ile tedavi, BBB bozukluğunun tersine çevrilmesiyle sonuçlanmış ve deney hayvanlarında uzun süreli öğrenilmiş çaresizlik ve depresif benzeri davranışları hafifletmiştir. Ortaya çıkan çalışmalar GSK3'ün stres ve ilgili bozukluklar için kritik bir terapötik hedef olduğunu tutarlı bir şekilde göstermiştir [33].

3.3. Nrf2 sinyalizasyonu

Nrf2 (nükleer faktör eritroit 2 ile ilişkili faktör 2), antioksidan ve detoksifiye edici enzimlerin ifadesini kontrol eden ve böylece hücresel ve doku hasarına ve enflamatuvar reaksiyonlara karşı koruyucu etkiler gösteren önemli bir transkripsiyon faktörüdür [34]. Nrf2 yaygın olarak antioksidan yanıt sisteminin ana düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir [35]. Ortaya çıkan veriler, stres faktörlerinin Nrf2 ile etkileşime girdiğini göstermiştir [36]. Martín-Hernández ve arkadaşları (2016), kronik hafif stresin bir sıçan modelini kullanarak, sadece MAPK p38/NF-κB yolunun artan aktivasyonunu değil, aynı zamanda Nrf2 sinyalinin değiştiğini ve depresif benzeri davranışların geliştiğini tespit etmiştir [37].

Nrf2, faz II (NADPH:kinon oksidoredüktaz ve glutatyon S-transferaz) ve antioksidan (hem oksijenaz 1, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz) genlerin transkripsiyonel aktivasyonuna aracılık etmek için antioksidan yanıt elemanını aktive eder. Sonuç olarak, Nrf2, NADPH oksidaz faaliyetleri yoluyla mitokondri ve sitoplazmada ROS/RNS (reaktif nitrojen türleri) oluşumunu ve NF-κB ile çapraz sinyalleşmesi yoluyla enflamatuvar hastalıkları kontrol eder [38].

4. Bitkisel anksiyolitikler

Yukarıda bahsedildiği gibi hem hücresel hem de tüm organizma düzeyinde, merkezi sinir sisteminin (MSS) aracılık ettiği stres tepkilerinde çok sayıda moleküler süreç yer almaktadır. Psikiyatrik bozuklukların (örneğin depresyon, anksiyete veya uykusuzluk) karmaşıklığı göz önüne alındığında, tek bir nörotransmitter hedefinin modülasyonu, hastayı birden fazla nöroendokrin sistemi hedef alan yaklaşımlar kadar başarılı bir şekilde tedavi etmeyebilir. Bu durum, duygudurum bozukluklarında etkinliği artırmak için müdahalelerin ek kombinasyonlarının kullanıldığı olumlu çalışmaların giderek artmasıyla kanıtlanmaktadır [39].

Psikiyatrik bozuklukların tedavisinde kullanılan bitkisel ilaçların etki mekanizmaları öncelikle nörotransmitter/nöromodülatör reseptörlerine bağlanan spesifik bitki metabolitleri aracılığı ile nörotransmitter sentezi ve genel fonksiyonun değiştirilmesi yoluyla nöronal iletişimin modülasyonunu içerir. Diğer etkiler MSS aktivitesini uyarma veya yatıştırma ve endokrin sistemin sağlıklı işlevini düzenleme veya desteklemeyi içerebilir [40, 41]. Bitkisel ilaçlar antidepresan, anksiyolitik, nootropik (bilişsel güçlendirici), yatıştırıcı, hipnotik ve analjezik etkileri içerebilen bir dizi psikoterapötik etkiye sahiptir [40]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, bağırsak disbiyozu modülasyonu, inflamasyon ve oksidatif stresin azaltılması, bağırsak-beyin ve HPA eksenlerinin düzenlenmesi, serotonin ve norepinefrinin kontrol edilmesi ve diğer mekanizmalar yoluyla diyetin ve belirli bitkisel bileşiklerinin stres ve anksiyete tedavisi üzerindeki etkisini göstermektedir [42]. Literatürde moleküler etki mekanizması aydınlatılan veya henüz aydınlatılmamış anksiyolitik etkili çok sayıda bitki yer almaktadır (Tablo 2).

Tablo 2. Anksiyete tedavisinde kullanılan başlıca tıbbi bitkiler [43]

Bitki adı	**Türkçe adı**	**Familyası**
***Abies pindrow* Royle**	Batı Himalaya köknarı	Pinaceae
***Achillea millefolium* L.**	Civanperçemi	Asteraceae
***Adiantum capillus-veneris* L.**	Venüssaçı	Pteridaceae
***Agrimonia eupatoria* L.**	Koyunotu	Rosaceae
Albizia sp.	Düz taç	Fabaceae
Aloysia sp.	Limon otu	Verbenaceae

Angelica sp.	Melek otu	Apiaceae
***Annona cherimola* Mill.**	Çerimoya	Annonaceae
***Anthemis arvensis* L.**	Tarla papatyası	Asteraceae
***Apocynum venetum* L.**	Pembekız	Apocynaceae
***Artemisia sp.*.**	Pelin otu	Asteraceae
Avena fatua L.	Yabani yulaf	Poaceae
***Azadirachta indica* A. Juss.**	Nim	Meliaceae
***Bacopa monniera* (L.) Wettst.**	Brahmi/Bakopa	Plantaginaceae
Ballota nigra L.	Köpekotu	Lamiaceae
***Blumea lacera* (Burm.f.) DC.**	-	Asteracea
***Boophone disticha* L.f.**	Yüzyıl bitkisi	Amaryllidaceae
***Borago officinalis* L.**	Hodan	Boraginaceae
***Caesalpinia bonducella* (Roxb)**	-	Caesalpiniaceae
Calendula officinalis L.	Aynısefa	Asteraceae
***Camellia sinensis* (L.) Kuntz**	Çay	Theaceae
Cannabis sativa L.	Hint keneviri	Cannabaceae
***Caralluma adscendens* var. *fimbriata* (Wall.) Gravely & Mayur**	-	Apocynaceae
***Casimiroa edulis* La Llave**	Beyaz sapot	Rutaceae
***Caesalpinia bonducella* (Roxb)**	-	Caesalpiniaceae
***Coriandrum sativum* L.**	Kişniş	Apiaceae
***Dianthus seguieri* Vill.**	Çayır karanfili	Caryophyllaceae
***Drymaria cordata* (L.) Willd. ex Schult.**	Tropikal kuş otu	Caryophyllaceae

***Ecballium elaterium* (L.) A. Rich**	Eşek hıyarı	Cucurbitaceae
***Eucalyptus globulus* Labill.**	Mavi okaliptüs	Myrtaceae
***Euphorbia hirta* L.**	Astım otu	Euphorbiaceae
Euphoria longana Lam.	Ejderha gözü	Euphorbiaceae
***Eurycoma longifolia* Jack.**	Tongkat Ali	Simaroubaceae
***Hallea ciliate* (Aubrév. & Pellegr.) J. F.Leroy**	-	Rubiaceae
Hibiscus rosa sinensis L.	Japon gülü	Malvaceae
***Humulus lupulus* L.**	Şerbetçiotu	Cannabaceae
Hyoscyamus niger L.	Kara banotu	Solanaceae
Lactuca virosa L.	Acı marul	Asteraceae
Laurus nobilis L.	Akdeniz defnesi	Lauraceae
***Lavandula angustifolia* Mill.**	Lavanta	Lamiaceae
Lavandula stoechas L.	Karabaş otu	Lamiaceae
Malva sylvestris L.	Büyük ebegümeci	Malvaceae
Mangifera indica L.	Mango	Anacardiaceae
***Matricaria chamomilla* L.**	Mayıs papatyası	Asteraceae
***Nepeta persica* Boiss.**	-	Lamiaceae
Nerium oleander L.	Zakkum	Apocynaceae
Ocimum basilicum L.	Fesleğen	Lamiaceae
***Paeonia moutan* Sims.**	Ağaç şakayık	Paeoniaceae
Polypodium vulgare L.	Benli eğrelti/Besbaye	Polypodiaceae
Primula veris L.	Yabani çuha	Primulaceae
***Ruta chalepensis* L.**	Saçaklı sedef otu	Rutaceae
Salix alba L.	Ak söğüt	Salicaceae
***Salvia officinalis* L.**	Adaçayı	Lamiaceae

***Securidaca longepedunculata* Fresen.**	Menekşe ağacı	Polygalaceae
***Senecio delphinifolius* Vahl.**	-	Asteraceae
***Sesbania grandiflora* (L.) Poiret.**	Sinekkuşu/Batı Hint bezelyesi	Fabaceae
Solanum nigrum L.	İtüzümü	Solanaceae
***Tilia platyphyllus* Scop.**	Büyük yapraklı ıhlamur	Malvaceae
***Tragia involucrata* L.**	Hint ısırgan otu	Euphorbiaceae
***Turnera aphrodisiaca* Ward**	Damiana	Turneraceae
Tussilago farfara L.	Öksürük otu	Asteraceae
***Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Jacks**	Kedi pençesi otu	Rubiaceae
Urtica dioica L.	Isırgan otu	Urticaceae
Valeriana montana L.	Kediotu	Valerianaceae
***Valeriana officinalis* L.**	Kediotu	Valerianaceae
***Zizyphus jujuba* Mill.**	Hünnap	Rhamnaceae

Piper methysticum (Kava kava) moleküler mekanizması ayrıntılı açıklanan bitkisel anksiyolitiklere bir örnektir. Bu bitki anksiyolitik etkisini genellikle GABA sistemi üzerinden gösterir [41]. Bu etki, voltaj kapılarının blokajı veya blokajı, iyonik kanal iletimini indükleyerek veya membran yapılarının değiştirilmesi yoluyla, GABA transaminaz veya glutamik asit dekarboksilaz inhibisyonu veya daha az yaygın olarak benzodiazepin reseptör bölgelerine (örneğin α alt birimi) bağlanma yoluyla gerçekleşebilmektedir [40,44]. Artan GABA nörotransmisyonu, uyarıcı yollarda sönümleyici bir etkiye sahiptir ve bu da sonuçta psikolojik olarak sakinleştirici bir etki sağlar.

Awad ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan yeni bir çalışma, yaygın kullanılan birkaç tıbbi bitkinin GABA metabolizmasından sorumlu birincil beyin enzimlerini doğrudan etkileyip etkilemediğini araştırmıştır. *In vitro* sıçan beyni homojenat deneyleri, değerlendirilen preparatlar arasında *Melissa officinalis*'in (melisa) sulu ekstrelerinin GABA transaminaz aktivitesinde en büyük inhibisyonu sergilediğini, *Matricaria recutita* (papatya) ve *Humulus lupulus*'un (şerbetçiotu) ise glutamik asit dekarboksilaz aktivitesinde önemli inhibisyon gösterdiğini ortaya koymuştur [44].

Hypericum maculatum ve *Hypericum perforatum* uygulamasından sonra frontal lobda lipid peroksidasyonu azalırken, *H. perforatum* ve kersetin hipokampüste malondialdehit (MDA) içeriğini azaltmıştır. Kersetin ise tek başına hem frontal lobda hem de hipokampüste CAT ve SOD aktivitelerini iyileştirmiştir [45].

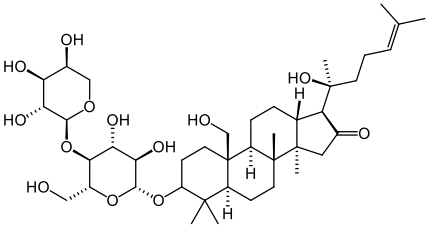
Açai tohumu ekstresi tedavisi, tedavi edilmeyen gruba kıyasla anlamlı seviyede CRH'nin plazma seviyelerini ($p \leq 0.05$) önemli ölçüde azaltmıştır. Ayrıca, açai tohumu ekstresi glukokortikoit reseptör ekspresyonunu artırmıştır. Aynı şekilde, *H. maculatum*, *H. perforatum* ve kersetin hayvanlarda kortikosteron serum seviyelerini önemli ölçüde azaltmıştır. Çaydan elde edilen epigallokateşin-3-gallat (EGCG), kersetin, ksantohumol ve resveratrol kullanımı sonucunda da kortikosteron üzerinde benzer bir azalma gözlenmiştir [46].

Tablo 3'te, anksiyolitik etkileri bilinen bazı tıbbi bitkilerin etki mekanizmaları ve klinik uygulamaları ayrıntılı olarak verilmiştir. Şekil 1 de ise anksiyolitik etkili bazı fitokimyasal bileşikler gösterilmiştir.

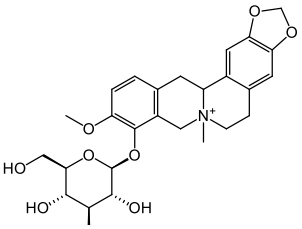
BİTKİ	ETKİ MEKANİZMASI	POTANSİYEL KLİNİK UYGULAMASI	MAJOR ETKİLİ BİLEŞENLERİ	KAYNAK
Bacopa monniera	• Metal şelasyonu/β-amiloid koruması • $5HT_{2c}$ modülasyonu • Antioksidan etki	• Bilişsel bozukluk • Anksiyete • Depresyon • Sinirsel yorgunluk	Bakozit A Bakozit P	[47]
Eschscholzia californica	• GABA reseptörleri ile bağlanma afinitesi (flumazenil antagonisti)	• Anksiyete • İnsomnia • Ağrı	Essolidin Seilantifolin	[48]
Matricaria recutita	• GABA reseptörleri ile bağlanma • Monoamin nörotransmisyonunu modüle eder • Nöroendokrin modülasyonu	• Anksiyete • İnsomnia • Stres	Apigenin α-Bisabolol	[44]
Centella asiatica	• GABA transaminaz inhibisyonu	• Anksiyete • Stres	Asiatikozit	[44]
Piper methysticum	• GABA kanal modülasyonu (lipid membran yapısı ve sodyum kanal fonksiyonu) • Zayıf GABA bağlanması (GABA-α reseptörlerine bağlanan [3H] muscimolün sinerjik etkisinin artması) • Prefrontal kortekste norepinefrinin yeniden alım inhibisyonu	• Anksiyete • Komorbid depresyon • Kaygılı depresyon • ADHD	Kawain Dihidrokawain	[49]
Melissa officinalis	• Sıçan beyni GABA transaminazının (GABA-T) güçlü in vitro inhibitörü • MAO-A inhibisyonu	• Anksiyete • Akut stres	Sitranellal	[44]

		• Depresyon	Geraniol	
***Passiflora* sp.**	• GABA sistemi aracılı anksiyoliz • Benzodiazepin reseptör kısmi agonisti	• Anksiyete • İnsomnia	Harman Krizin	[50]
Scutellaria lateriflora	• Pozitif GABA-α bağlanma afinitesi	• Anksiyete • Sinir yorgunluğu • İnsomnia	Skutelaterin A Baikalin	[44]
Withania somnifera	• GABA-mimetik aktivite	• Anksiyete • Sinir yorgunluğu • İnsomnia	Vitanolit Vitaferin	[51]
Valeriana sp.	• GABA modülasyonu • Kediotundan elde edilen valerenik asit $GABA_A$ reseptörü (β3 alt birimi) agonizmi göstermiştir • 5-HT5a kısmi agonizmi	• Anksiyete • İnsomnia	Valepotriat Valerinik asit	[52]

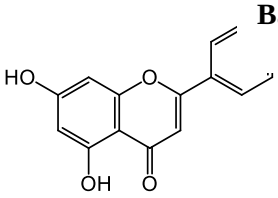
Tablo 3. Bitkisel anksiyolitiklerin etki mekanizmaları ve klinik uygulamaları

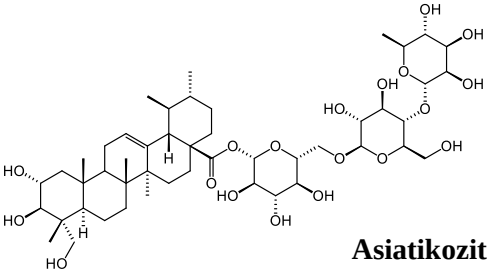


Bakozit A

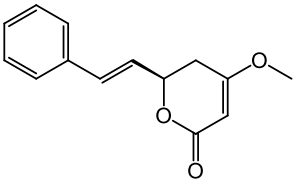


Essolidin

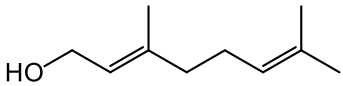


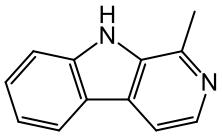


Asiatikozit

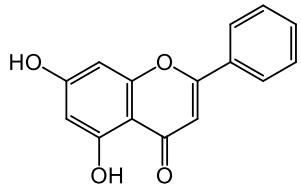


Kawain

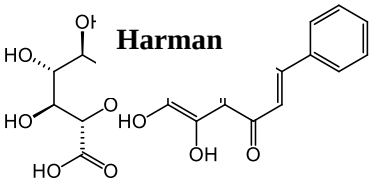


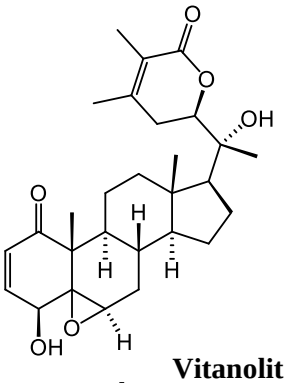


Harman

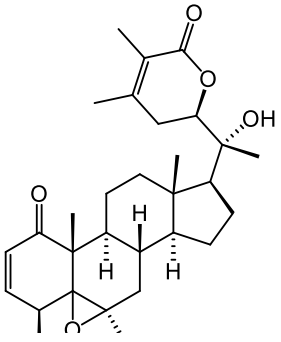


Krisin

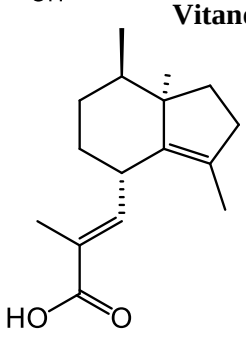




Vitanolit



Valepotriat



Şekil 1. Anksiyolitik etkili fitokimyasallar

5. Sonuç

Anksiyete bozukluklarının oluşmasında çok sayıda moleküler süreç yer almaktadır. Tedavide kullanılan bileşikler de bu moleküler süreçler üzerinde etkili olmaktadır. Amigadala ve lokus seruleus başta olmak üzere hipotalamus, nükleus retikülaris, nükleus ambigius ve paraventriküler nükleus gibi nöroanatomik yapılar ile GABA, santral noradrenerjik ve serotonerjik sistemler; santral adenozin, glutamat ve kolesistokin anksiyete semptomlarının ortaya çıkmasında ve anormal anksiyetenin bir hastalık olarak sürdürülmesinde önemli rol oynamaktadır. Sentetik kimyasal bileşiklerin yanı sıra anksiyolitik etkili fitokimyasallara günümüzde önemli bir talep bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, bitkisel anksiyolitikler oksidatif stres, inflamasyon, HPA ekseni ve serotonerjik/adrenerjik ve GABAerjik yolakların modülasyonunu içeren farklı mekanizmalar yoluyla anksiyete yönetimine yardımcı olabilir.

KAYNAKLAR

1. Baytop, T., 1999. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, Geçmiste ve Bugün (Therapy with Medicinal Plants in Turkey, Past and Present), 2th ed. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.

2. Karslıoğlu, E.H. ve Kaymak, S.U. (2010). Bunaltı bozukluklukları tedavisinde kullanılan diğer ilaçlar. N. Yüksel (Editör) Temel Psikofarmakoloji içinde (s. 581-603) Ankara: Türk Psikiyatri Derneği.

3. World Health Organisation (2017). Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. Geneva: World Health Organization.

4. COVID-19 Mental Disorders Collaborators. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. Lancet. 2021 Nov 6;398(10312):1700-1712. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02143-7. Epub 2021 Oct 8. PMID: 34634250; PMCID: PMC8500697.

5. Dennis, J. A., O. Khan, M. Ferriter, N. Huband, M. J. Powney, and C. Duggan. 2012. Psychological interventions for adults who have sexually offended or are at risk of offending. The Cochrane Database of Systematic Reviews 12:CD007507. doi: 10.1002/14651858. CD007507.pub2

6. Wong CG, Bottiglieri T, Snead OC. GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease. Ann Neurol. 2003;54 Suppl 6:S3-12.

7. Macdonald R L , Olsen R W . GABAA receptor channels. Annu. Rev. Neurosci. 1994;17:569–602.

8. Fritschy J M , Möhler H . GABAA receptor heterogeneity in the adult rat brain: Differential regional and cellular distribution of seven major subunits. J. Comp. Neurol. 1995;359:154–194.

9. Padgett CL, Slesinger PA. GABAB receptor coupling to G-proteins and ion channels. Adv Pharmacol. 2010;58:123-47.

10. Chen X, de Haas S, de Kam M, van Gerven J. An Overview of the CNS-Pharmacodynamic Profiles of Nonselective and Selective GABA Agonists. Adv Pharmacol Sci. 2012;2012:134523.

11. Brohan J, Goudra BG. The Role of GABA Receptor Agonists in Anesthesia and Sedation. CNS Drugs. 2017 Oct;31(10):845-856.

12. Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR. et al. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin) Pharmacol Rev. 1994;46(2):157–203.

13.(Traber J, Glaser T. 5-HT1A receptor releted anxiolytics. Trends In Pharmacological Science. 1987;8:432–437. [Google Scholar])

14. Korte, S.M. (2001). Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. Neurosc. Biobehav, Rev; 25(1), 17-42.

15. Barrera, G., S. Pizzimenti, M. Daga, C. Dianzani, A. Arcaro, G. P. Cetrangolo, G. Giordano, M. A. Cucci, M. Graf, and F. Gentile. 2018. Lipid peroxidation-derived aldehydes, 4-hydroxynonenal and malondialdehyde in aging-related disorders. *Antioxidants* 7 (8):102. doi: 10.3390/antiox7080102.

16. Fedoce, A. D., F. Ferreira, R. G. Bota, V. Bonet-Costa, P. Y. Sun, and K. J. Davies. 2018. The role of oxidative stress in anxiety disorder: Cause or consequence? *Free Radical Research* 52 (7):737–50. doi: 10.1080/10715762.2018.1475733.

17. Abreu, I. A, and D. E. Cabelli. 2010. Superoxide dismutases – A review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochimica et Biophysica Acta* 1804 (2):263–-74. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.11.005.

18. Barreca, D. 2020. Mechanisms of plant antioxidants action. *Plants (Basel, Switzerland)* 10 (1):35. doi: 10.3390/plants10010035

19. Felger, J. C, and F. E. Lotrich. 2013. Inflammatory cytokines in depression: Neurobiological mechanisms and therapeutic implications. *Neuroscience* 246:199–229. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.04.060.

20. Michopoulos, V., A. Powers, C. F. Gillespie, K. J. Ressler, and T. Jovanovic. 2017. Inflammation in fear- and anxiety-based disorders: PTSD, GAD, and Beyond. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 42 (1):254–70. doi: 10.1038/npp.2016.146.

21. Yang, H., J. Xie, W. Mu, X. Ruan, J. Zhang, L. Yao, Z. Diao, M. Wu, Y. Li, W. Ren, et al. 2020. Tea polyphenols protect learning and memory in sleep-deprived mice by promoting AMPA receptor internalization. *Neuroreport* 31 (12):857–64. doi: 10.1097/WNR.0000000000001462.

22. Jeon, S. W, and Y. K. Kim. 2016. Neuroinflammation and cytokine abnormality in major depression: Cause or consequence in that illness? *World Journal of Psychiatry* 6 (3):283–93. doi: 10.5498/wjp. v6.i3.283.

23. Maccari, S., H. J. Krugers, S. Morley-Fletcher, M. Szyf, and P. J. Brunton. 2014. The consequences of early-life adversity: Neurobiological, behavioral and epigenetic adaptations. *Journal of Neuroendocrinology* 26 (10):707–23. doi: 10.1111/jne.12175.

24. Joseph, D. N, and S. Whirledge. 2017. Stress and the HPA Axis: Balancing homeostasis and fertility. International Journal of Molecular Sciences 18 (10):2224. doi: 10.3390/ijms18102224.

25. Fröhlich, E. E., A. Farzi, R. Mayerhofer, F. Reichmann, A. Jačan, B. Wagner, E. Zinser, N. Bordag, C. Magnes, E. Fröhlich, et al. 2016. Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: Analysis of gut microbiota-brain communication. Brain, Behavior, and Immunity 56:140–55. doi: 10.1016/j.bbi.2016.02.020

26. Foster, J. A, and K. M. Neufeld. 2013. Gut-brain axis: How the microbiome influences anxiety and depression? Trends in Neurosciences 36 (5):305–12. doi: 10.1016/j.tins.2013

27. Koo JW, Russo SJ, Ferguson D et al (2010) Nuclear factor-κB is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior. Proc Natl Acad Sci U S A 107:2669–2674. https://doi. org/10.1073/pnas.0910658107

28. Leng L, Zhuang K, Liu Z et al (2018) Menin defciency leads to depressive-like behaviors in mice by modulating astrocytemediated neuroinfammation. Neuron 100:551–563. https://doi. org/10.1016/j.neuron.2018.08.031

29. Chiang JJ, Cole SW, Bower JE et al (2019) Depressive symptoms and immune transcriptional profiles in late adolescents. Brain Behav Immun 80:163–169. https ://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.03.004

30. Gong H, Su WJ, Cao ZY, Lian YJ, Peng W, Liu YZ, Zhang Y, Liu LL, Wu R, Wang B, Zhang T, Wang YXJC (2018) Hippocampal Mrp8/14 signaling plays a critical role in the manifestation of depressive-like behaviors in mice. J Neuroinflamm 15:252. https ://doi.org/10.1186/s1297 4-018-1296-0

31. Jope RS, Cheng Y, Lowell JA et al (2017) Stressed and infamed, can GSK3 be blamed? Trends Biochem Sci 42:180–192. https://doi. org/10.1016/j.tibs.2016.10.009

32. Jere SW, Houreld NN, Abrahamse H (2019) Role of the PI3K/AKT (mTOR and GSK3β) signalling pathway and photobiomodulation in diabetic wound healing. Cytokine Growth Factor Rev 50:52–59

33. Cheng Y, Desse S, Martinez A et al (2018) TNFα disrupts blood brain barrier integrity to maintain prolonged depressive-like behavior in mice. Brain Behav Immun 69:556–567. https ://doi. org/10.1016/j.bbi.2018.02.003

34. Gold R, Kappos L, Arnold DL et al (2012) Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. N Engl J Med 367:1098–1107. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1114287

35. Wang XJ, Sun Z, Chen W et al (2008) Activation of Nrf2 by arsenite and monomethylarsonous acid is independent of Keap1-C151: enhanced Keap1-Cul3 interaction. Toxicol Appl Pharmacol 230:383–389. https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.03.003

36. Dang R, Guo YY, Zhang K et al (2019) Predictable chronic mild stress promotes recovery from LPS-induced depression. Mol Brain 12:42. https://doi.org/10.1186/s13041-019-0463-2

37. Martín-Hernández D, Caso JR, Bris ÁG et al (2016) Bacterial translocation afects intracellular neuroinfammatory pathways in a depression-like model in rats. Neuropharmacology 103:122–133. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.12.003

38. Ahmed SMU, Luo L, Namani A et al (2017) Nrf2 signaling pathway: pivotal roles in inflammation. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis 1863:585–597

39. Sarris, J., Kavanagh, D., Byrne, G., 2010a. Adjuvant use of nutritional and herbal medicines with antidepressants, mood stabilizers and benzodiazepines. J. Psychiatr. Res. 44, 32–41.

40. Spinella, M., 2001. The Psychopharmacology of Herbal Medicine: Plant Drugs That Alter Mind, Brain and Behavior (Paperback). MIT Press, Cambridge.

41. Sarris, J., 2007. Herbal medicines in the treatment of psychiatric disorders: a systematic review. Phytother. Res. 21, 703–716

42. Godos, J., W. Currenti, D. Angelino, P. Mena, S. Castellano, F. Caraci, F. Galvano, D. Del Rio, R. Ferri, and G. Grosso. 2020. Diet and mental health: Review of the recent updates on molecular mechanisms. Antioxidants 9 (4):346. doi: 10.3390/antiox9040346.

43. Bayır, E., Elgin Cebe, G. 2023. Anksiyete Bozukluklarında Kullanılan Tıbbi Bitkiler, Ankara Ecz. Fak. Derg. / J. Fac. Pharm. Ankara, 47(3): 1084-1100.

44. Awad, R., Levac, D., Cybulska, P., Merali, Z., Trudeau, V.L., Arnason, J.T., 2007. Effects of traditionally used anxiolytic botanicals on enzymes of the gamma-aminobutyric acid (GABA) system. Can. J. Physiol. Pharmacol. 85, 933–942.

45. Sevastre-Berghian, A. C., V. A. Toma, B. Sevastre, D. Hanganu, L. Vlase, D. Benedec, I. Oniga, I. Baldea, D. Olteanu, and R. Moldovan. 2018. Characterization and biological effects of hypericum extracts on experimentally-induced – anxiety, oxidative stress and inflammation in rats. *Journal of Physiology and Pharmacology* 69 (5):789–800. doi: 10.26402/jpp.2018.5.13.

46. Donoso, F., S. Egerton, T. F. S. Bastiaanssen, P. Fitzgerald, S. Gite, F. Fouhy, R. P. Ross, C. Stanton, T. G. Dinan, and J. F. Cryan. 2020. Polyphenols selectively reverse early-life stress-induced behavioural, neurochemical and microbiota changes in the rat. *Psychoneuroendocrinology* 116:104673. doi: 10.1016/j.psyneuen.2020.104673.

47. Krishnakumar, A., Nandhu, M.S., Paulose, C.S., 2009. Upregulation of 5-HT2C receptors in hippocampus of pilocarpine-induced epileptic rats: antagonismby Bacopa monnieri. Epilepsy Behav. 16, 225–230.

48. Hanus, M., Lafon, J., Mathieu, M., 2004. Double-blind, randomised, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and safety of a fixed combination containing two plant extracts (Crataegus oxyacantha and Eschscholtzia californica) and magnesium in mildto- moderate anxiety disorders. Curr. Med. Res. Opin. 20, 63–71.

49. Boonen, G., Haberlein, H., 1998. Influence of genuine kavapyrone enantiomers on the GABA-A binding site. Planta Med. 64, 504–506.

50. Sena, L.M., Zucolotto, S.M., Reginatto, F.H., Schenkel, E.P., De Lima, T.C., 2009. Neuropharmacological activity of the pericarp of Passiflora edulis flavicarpa degener: putative involvement of C-glycosylflavonoids. Exp Biol Med Maywood 234, 967–975.

51. Bhattacharya, S.K., Muruganandam, A.V., 2003. Adaptogenic activity of Withania somnifera: an experimental study using a rat model of chronic stress. Pharmacol. Biochem. Behav. 75, 547–555.

52. Benke, D., Barberis, A., Kopp, S., Altmann, K., Schubiger, M., Vogt, K., Rudolph, U.,Möhler, H., 2009. GABA(A) receptors as in vivo substrate for the anxiolytic action of valerenic acid, a major constituent of valerian root extracts. Neuropharmacology 56, 174–181.

BÖLÜM 6

PALİNOLOJİK ÇALIŞMALARA MOLEKÜLER YAKLAŞIMLAR

Doç. Dr. Funda ÖZBEK[9]

DOI: https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.12707323

[9] Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Teknikokullar, ANKARA. fundaozbek@gazi.edu.tr Orcid ID: 0000-0002-0135-0155

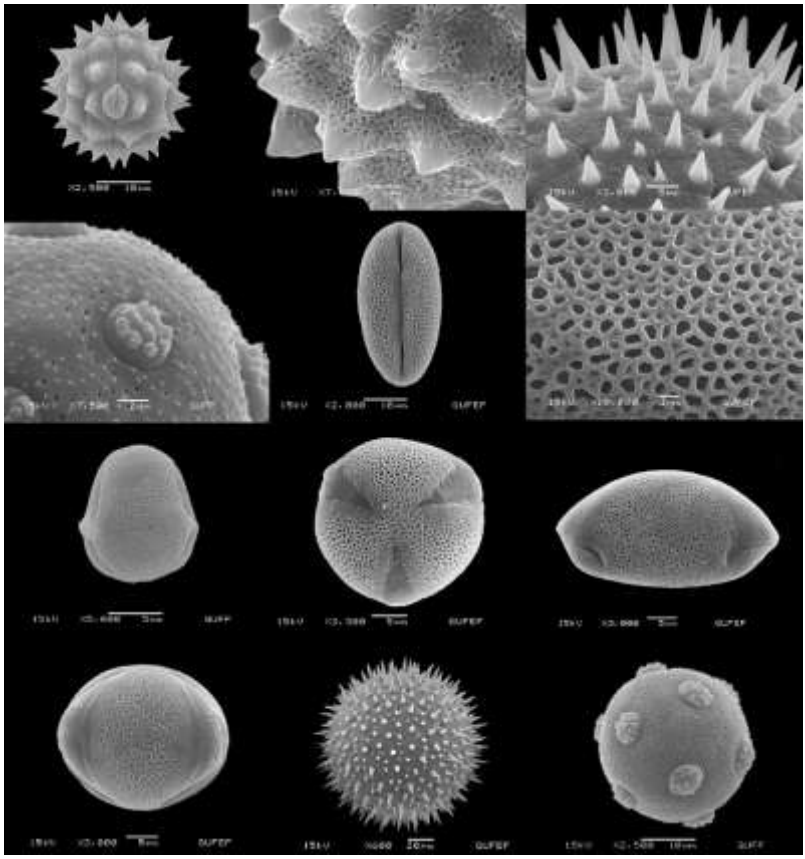
1. Palinolojiye Giriş

Palinoloji terimi, ilk kez Hyde ve Williams tarafından 1944 yılında kullanılmış ve eski Yunanca dilinde "paluno" (serpmek, dağıtmak) ve "pale" (un veya toz) kelimelerinden türetilmiştir. Bu terim, Aytuğ ve Merev (2002) tarafından "günümüzde yaşayan veya günümüze ulaşamayan fosil bitkilerin polen ve sporlarını inceleyen bilim dalı" olarak tanımlanmıştır (Karlıoğlu Kılıç vd., 2020). Ayrıca sporomorf veya palinomorf olarak adlandırılan dinoflagellat, akritark, foraminifer, tasmanit, kitinozoa, skolekodont, bryozoa ve koloni şeklindeki algler gibi organik yapıdaki mikrofosilleride ele almaktadır (Pınar vd., 2003; Halbritter vd., 2018).

Palinoloji bilimi 1945'ten bu yana yapılan kapsamlı ve önemli araştırmalar neticesinde "Polen Morfolojisi", "Polen Fizyolojisi", "Polen Kimyası" ve "Polen Analizleri" olmak üzere 4 alt dala ayrılmıştır. Ayrıca Aerobiyoloji, Sistematik Botanik, Tıp ve Eczacılık Bilimleri, Bitki Sosyolojisi, Ekoloji, Fitopatoloji, Paleobotanik, Paleoklimatoloji, Silvikültür, Agrikültür, Apikültür, Kriminoloji, Coğrafya, Klimatoloji, Meteoroloji, Fenoloji, Jeoloji, Sedimantoloji, Stratigrafi, Oseanografi, Arkeoloji, Sosyoloji, Antropoloji ve Kronoloji bilim dallarına doğrudan veya dolaylı olarak katkı sağlamaktadır (Aytuğ, 1981). Dolayısıyla, Palinoloji bilimiyle ilgili yapılan çalışmalar ilişkili olduğu çok sayıdaki bilim dalı düşünüldüğünde daha da fazla önem kazanmaktadır. Bu bölümde Palinolojinin inceleme materyallerinden biri olan polenler üzerinde durulacaktır. Tohumlu bitkilerde vejetatif ve generatif olmak üzere iki hücreden meydana gelmiş n kromozomlu mikrospora polen denir (Şekil 1). Polenler, erkek organlardaki polen keselerinde bulunan sporojen dokularda gelişen polen ana hücrelerinin mayoz bölünme geçirmesi ile oluşurlar (Pınar vd., 2003).

Palinoloji Carl Julius Fritzsche'nin polen çizimleri ile ortaya çıkmışken; Modern Palinoloji ise 1916 yılında Lennart von Post'un eski kayaçlarda polen analizlerine dayalı yaptığı fosil polen diyagramları ile başlamıştır. Daha

sonrasında Wodehouse (1935) tarafından yazılan "Pollen Grains", Erdtman'ın (1943, 1969) "An Introduction to Pollen Analysis" ve "Handbook of Palynology" isimli eserleri, ve Faegri ve Iversen (1950) tarafından yayınlanan "Textbook of Modern Pollen Analysis" Palinoloji bilimindeki çalışmalara temel kaynakları oluşturmuşlardır. Özellikle elektron mikroskoplarının gelişmesiyle birlikte polenler daha detaylı olarak incelenmeye başlanmış ve polen teşhislerine yardımcı olan polen atlasları yayımlanmıştır. Bunlardan, Kuzeybatı Avrupa (Moore ve Webb, 1978; Moore vd.,1991), Kuzey Amerika (McAndrews vd., 1973) ve özellikle dokuz ciltlik Kuzey-Batı Avrupa Polen Florası (Punt vd., 1976-2009) yurt dışında; İstanbul çevresindeki bitkilerin polen atlası ise Aytuğ vd. (1971) tarafından ülkemizde yayımlanmış günümüzde de faydalanılan önemli eserlerdir.



Şekil 1. Farklı familyalardaki bitkilere ait polenlerin Taramalı Elektron Mikroskobu görüntüleri

2. Palinolojide DNA Barkodlama / Metabarkodlama

Polen, tür içi ve türler arası etkileşimlerdeki mekânsal ve zamansal varyasyonları tespit etmek için güçlü bir biyolojik belirteçtir (Hornick vd., 2022). Çevresel örneklerden elde edilen polenler, biyoçeşitlilikteki değişikliklerin araştırılmasında faydalı olabilen bitki türlerinin kompozisyonunu belirlemede (Leontidou vd., 2021), mevcut ekosistemleri geçmişteki örneklerle karşılaştırmada (Simanonok vd., 2021), biyolojik istilaların erken tespitinde (Tremblay vd., 2019) ve insan sağlığını etkileyen

alerjenik polenlerin atmosferde izlenmesinde (Suanno vd., 2021) kullanılabilir. Polenler ayrıca fenolojideki değişiklikleri değerlendirmek (Burkle vd., 2013), bitki-tozlayıcı (polinatör) etkileşimlerini tespit etmek (Sponsler vd., 2020), polen taşıma ağlarını yeniden oluşturmak (Tur vd., 2014) ve geçmişteki bitki örtüsünü ve buna bağlı olarak iklimi yeniden oluşturmak için (Liu vd., 2021) kullanılabilir. Hayvanların vücutlarından alınan polenlerin tanımlanması, özellikle bitki-polinatör etkileşim ağlarının yeniden oluşturulmasında yararlıdır. Böylece çiçek ziyareti gözlemleriyle yeniden oluşturulan ağlardan daha fazla sayıdaki ağ hakkında bilgi edinilir (Bosch vd., 2009).

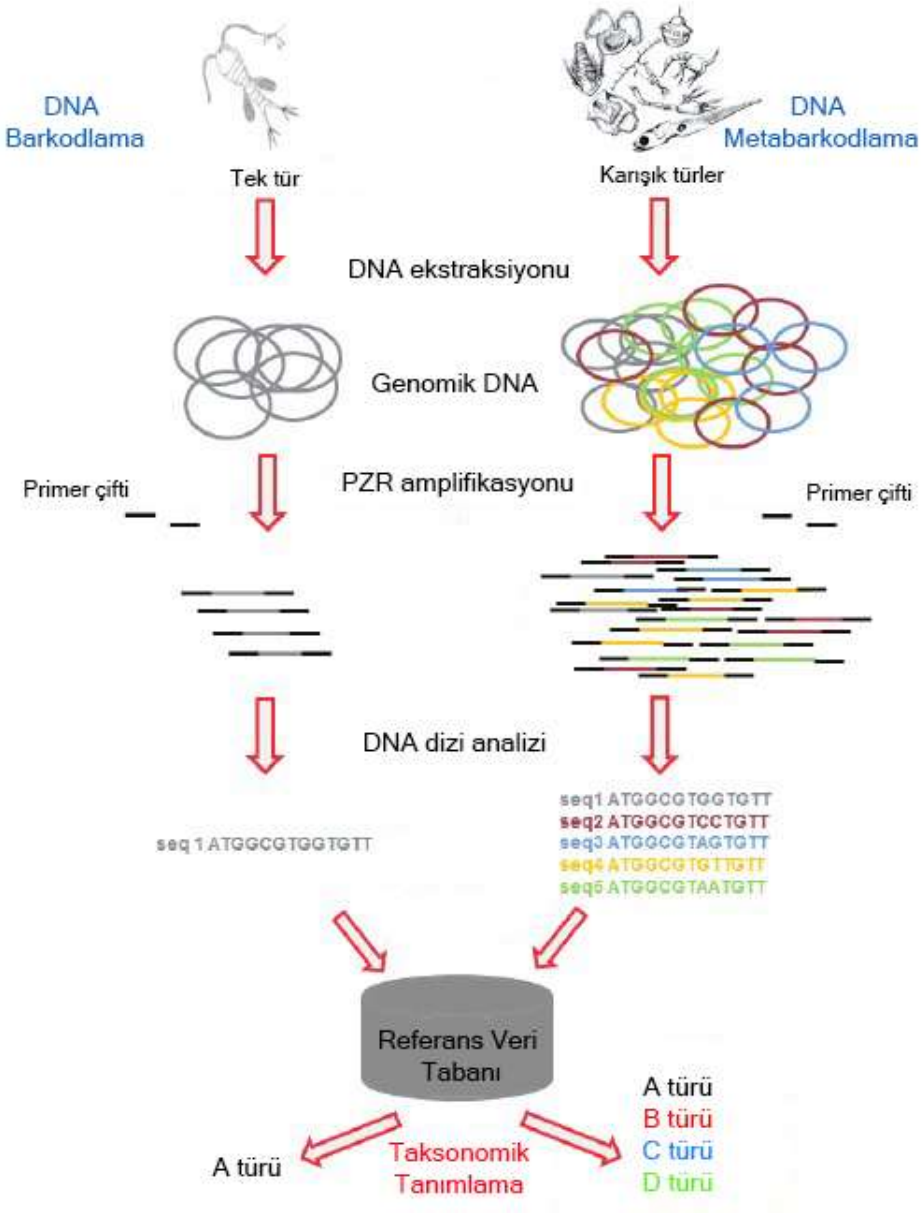
Geleneksel olarak, polenlerin taksonomik tanımlaması morfolojik yapılarının görsel gözlemine dayanmaktadır. Polen taneleri boyanarak preparasyonu yapılır ve ışık mikroskobunda morfolojik özellikleri incelenerek, eğer mümkünse en düşük taksonomik gruba kadar tanımlanır. Bu yöntemle polen sayımı da mümkündür ve tür bolluğunu anlamak için kullanılabilir. Ancak bu metod son derece eğitimli uzmanları gerektirir ve zaman alıcıdır, bu da genellikle az sayıdaki polen örneğinde tanımlamanın gerçekleşebilmesine olanak verir (Stillman ve Flenley, 1996). Dahası, morfolojik özelliklerdeki belirgin varyasyonların eksikliği, polenin mikroskobik tanımlamasını genellikle sadece cins düzeyine ve sıklıkla yalnızca familya düzeyine sınırlar (Mander ve Punyasena, 2014; Richardson vd., 2019; Lau vd., 2019). Otomatik taksonomik tanımlama, bu sınırlamaları aşmak için üç şekilde önerilmiş ve uygulanmıştır (Stillman ve Flenley, 1996). İlki, yapısal analiz ve evrişimsel sinir ağları (CNN, konvolüsyonel sinir ağları diye de geçmektedir. Bir görüntünün analizini yaparken, görüntüdeki çeşitli obje veya nesneleri birbirinden ayrıştırmamıza yardımcı olan derin öğrenme algoritmasıdır) gibi yöntemlerle morfolojik özelliklerin görüntü analizini içerir (Marcos vd., 2015; Sevillano vd., 2020). İkinci olarak, raman spektroskopisi, manyetik rezonans spektroskopisi (MRS) veya fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) gibi kimyasal özelliklere dayalı yöntemler bulunur (Zimmermann, 2018;

Klimczak vd., 2020; Pereira vd., 2021). Derin öğrenme yöntemleri, morfolojik veya kimyasal yöntemlerle elde edilen verilerden taksonların tanımlanmasını geliştirmek için kullanılabilir (Dunker vd., 2021). Ayrıca flow sitometrisi, polen saymak ve sonraki analizlerde polenleri sınıflandırmada başarıyla kullanılmıştır (Kron vd., 2021). Kimyasal ve görüntü analizlerini flow sitometrisi ve derin öğrenme yöntemleriyle birleştirmek, hızlı ve doğru takson tanımlamasını ve sayımını sağlayabilir (Dunker vd., 2021). Bununla birlikte, bu yöntemler birkaç farklı polen tipinin olduğu durumlarda işe yarasa da, çok sayıda farklı polen tipinin bulunduğu örneklere uygulanmamıştır. Dahası, çoğu gelişmiş teknik, taksonomik tanımlamayı gerçekleştirmek için özel ekipman ve kapsamlı eğitim veri setlerini gerektirmektedir. Polen tanımlaması için üçüncü bir yöntem olan moleküler genetik (yani, DNA dizilerinin kullanımı), son zamanlarda yüksek verimlilik kapasiteleri ve yaygın teknikler ve ekipmanlar nedeniyle dikkat çekmektedir (Bell vd., 2023).

Gelişen DNA teknolojisi ve diğer moleküler teknikler sayesinde DNA barkodlama olarak bilinen yöntemle türler tanımlanmakta ve o türe ait bir barkod oluşturulmaktadır. “DNA barkodu” kavramı ilk kez 1993 yılında kullanılmış; Hebert vd. (2003) tarafından yayınlanan eserle bilim dünyasının ilgisini çekmeyi başarmıştır. Bu teknikte, her tür için spesifik olan kısa ve evrensel olarak standardize edilmiş çekirdek, plastid veya mitokondri genomundan elde edilen DNA gen bölgeleri kullanılmaktadır (Hebert vd., 2003; Barrett ve Hebert, 2005). DNA barkodlama çalışmaları, yalnızca türlerin birbirinden ayrımında değil, yeni taksonların tespiti, türlerin korunması, biyolojik çeşitlilik, ekolojik araştırmalar ve türlerin dijital barkod kütüphanesinin oluşturulmasında da rol oynamaktadır (Lahaye vd., 2008; Bell vd., 2012; Hosein vd., 2017). DNA barkodlama çalışmaları hızla gelişmeye devam etmekle birlikte temel metodolojisi şu şekildedir: DNA ekstraksiyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), DNA dizileme, Biyoinformatik analizler ve DNA barkodunun gen bankalarında saklanmasıdır (Hürkan, 2020).

Barkodlama için gerekli olan DNA, bitkinin yaprak, çiçek, meyve, kök, polen, tohum gibi vejetatif veya generatif organlarından az miktarda alınan bir numuneden izole edilmektedir (Uluğ, 2023). Birden fazla organizma içeren örneklere ise DNA metabarkodlama uygulanmaktadır. Böylece karmaşık örneklerin içindeki çoklu türlerin her biri yeni nesil dizileme (NGS) yöntemiyle ayrı ayrı olarak tanımlanabilmektedir (Şekil 2).

Birçok çalışma, bitki DNA barkodlamasına odaklanmıştır. Yüksek taksonlar (takım, familya) düzeyinde tanımlamanın %90' dan fazla başarılı olduğu, ancak referans DNA barkodu dizilerine ilişkin yetersiz verinin, cins veya tür düzeyinde belirlemeyi engelleyici olduğu belirtilmiştir (Prosser ve Hebert, 2017). Bu nedenle, başarılı tür tanımlamanın anahtarı doğru DNA barkodu ve bunları amplifiye etmek için kullanılan primerlerin doğru seçimidir. Kloroplast genomunun rbcL, matK, trnL, trnH-psbA bölgeleri ve nükleer ITS2, bitki DNA barkodu olarak en sık kullanılan bölgelerdir. Bitkiler için standart DNA barkodlama yaklaşımları genellikle kloroplast DNA' sını (cpDNA; örneğin, rbcL, matK, trnL) ve/veya nükleer ribozomal DNA' sını (örneğin, ITS1, ITS2) kullanır (CBOL Bitki Çalışma Grubu, 2009; Chen vd., 2010).



Şekil 1. DNA Barkodlama ve Metabarkodlama yöntemlerinin şematik gösterimi (Corell ve Rodríguez-Ezpeleta, 2014).

Polen hücrelerinde bulunan DNA, standart DNA barkodlama (tek tür örneklerin tanımlanması), metabarkodlama (karma tür örnekler) veya tek polenden genotipleme (polen tanelerinin doğrudan amplifikasyonu ve dizilenmesi) yöntemleriyle bitki türlerinin taksonomik tanımlanması için kullanılabilir (Isagi ve Suyama, 2011). Polen analizinde DNA barkodlamasının uygulanması, etkili ve güvenilir bir yaklaşım olarak umut vermektedir. Bilinmeyen polenlerin morfolojilerini referans örneklerin polen özellikleriyle karşılaştırmak gibi, kökeni bilinmeyen DNA dizileri de referans örneklerden elde edilen dizilerle karşılaştırılabilir. Bu yaklaşımın polen analizine ilk uygulamalarında kapiler dizileme teknolojisi kullanılmıştır; ancak, yeni nesil dizileme teknolojilerinin doğruluk ve uzunluk kapasitelerindeki ilerlemeler, araştırmacılara pratik, yüksek verimli bir alternatif sunmaktadır (Galimberti vd., 2014; Kraaijeveld vd., 2015). Polen metabarkodlamada yaygın olarak kullanılan DNA belirteç bölgeleri arasında plastid rbcL ve trnL ile nükleer ribozomal ITS bölgeleri (nrITS) ITS1 ve ITS2 bulunmaktadır.

2.1. Aeropalinolojide Polen DNA Metabarkodlama

Atmosferde bulunan polen, küf sporları, bakteriler ve virüsler alerjik semptomlara ve hastalıklara neden olan temel biyolojik maddelerdir (Alan vd., 2019). Aerobiyoloji, biyolojik aerosollerin havayla pasif taşınımını araştırır. Bitki biyoçeşitliliği, alerji önleme ve polenler tarafından gerçekleşen atmosferdeki gen akışı uygulama alanlarından bazılarıdır. Aeropalinolojinin inceleme materyallerinden biri olan polenlere bağlı solunum alerjileri dünya genelinde yüz milyonlarca insanı etkilemektedir (Bousquet vd., 2007). Belirtilerin şiddeti bitki türleri arasında büyük farklılıklar gösterir. Bu nedenle çiçeklenme zamanı ile birlikte rüzgar, sıcaklık ve nem gibi meteorolojik değişkenler ve hava kirliliği gibi faktörlerden etkilenir (D'Amato vd., 2005). Özellikle 21. yüzyılda saman nezlesi vakalarının artmasıyla birlikte, atmosferdeki polenlerin izlenmesi, hem sağlık hizmeti hem de araştırma alanında küresel sosyo-ekonomik önem kazanmıştır (Suanno vd., 2021).

Aerobiyolojik araştırmalar tarafından elde edilen polen verileri, alerjen taksonların çiçeklenme özelliklerini ortaya çıkarma, bulunduğu alandaki bitki örtüsünü yeniden oluşturma ve atmosferdeki polenin bitki örtüsü ve iklimle ilişkisini inceleme gibi çeşitli yönlerde bilgi sağlayabilir. Bu tür bir bilgi, ortaya çıkan verilerin mevsimsel alerjilerle ilişkilendirilebilmesinden ötürü hem halk sağlığı için, hem de bitkiler üzerindeki iklim değişikliğinin etkilerini tespit etmek için önemlidir (Damialis vd., 2007).

Polen izlemesi ideal olarak, kıta genelinde çok sayıda izleme istasyonu ağları kurularak yapılmalıdır. Ne yazık ki, mevcut polen izleme sürecinin birkaç yönü, bu ağların kurulmasını engellemektedir. Atmosferdeki polen çeşitliliği, genellikle polen tuzakları ile poleni farklı alıcılar üzerinde toplayan volumetrik veya gravimetrik yöntemlerle belirlenir. Aerobiyolojik izlemede en yaygın olarak kullanılan Hirst tipi volumetrik örnekleme cihazında, emilen hava polen tanelerini yapışkan bir yüzeye yönlendirir, burada etkileşimle polenler yakalanırlar. Bunun karşısında, gravimetrik örneklemede, polen taneleri yerçekimi ile bir yüzeye veya bir örnekleme çözeltisine düşmektedir (Levetin, 2004). Güncel aerobiyolojik çalışmalarda, örnekleme ortamı mikroskopta incelenerek polen taksonları tanımlanır ve yakalandığı alan için bir polen spektrumu belirlenir (Leontidou vd., 2017). Bu yöntem, çeşitli polen türlerini tanıyabilen eğitimli personeli gerektirir, işgücü yoğun ve dolayısıyla maliyetlidir. Mikroskobik analizle az sayıda polen tanesi tür düzeyinde tanımlanabilir, çünkü ortak morfolojik özellikler bazen cinsler ve familyalar arasında hatta sadece familyalar arasında paylaşılır. Örneğin, Cupressaceae üyelerinin Taxaceae familyasındaki taksonlarla aynı polen morfolojisi özelliklerini paylaşması, Cupressaceae-Taxaceae tipi şeklinde mikroskobik bir sınıflandırmaya yol açar. Mikroskobik analiz ayrıca büyük ölçekli çalışmalarda da sorun yaratabilir, çünkü polen tanımlama ve sayımı için önemli miktarda zaman ve uzmanlık gerektirir (Longhi vd., 2009). Bu durum hem araştırma hem de hastalara bilgi sağlama açısından yararlı olabilecek daha sık örnekleme

yapılmasını ve birden fazla polen izleme istasyonunun kurulmasını engeller. Başka bir sorun ise, polenlerin tümünün cins düzeyine kadar tanımlanamaması neticesinde bu yöntemin duyarlılığının azalmasıdır. Polen sayımını ve tanımlamasını yeni teknolojileri kullanarak otomatikleştirmek veya polen görüntülerinde derin öğrenme algoritmalarını kullanmak hızı ve doğruluğu arttırmaktadır; fakat genellikle taksonomik çözünürlüğü arttırmaz (Sauvageat vd., 2020; Sevillano vd., 2020; Dunker vd., 2021). Poaceae, Urticaceae ve Cupressaceae/Taxaceae gibi birçok önemli alerjenik familya stenopalinozdur (yani morfolojik olarak birbirine benzeyen polenler üretmektedir), bu nedenle her bir türün göreceli bolluğu ve bazı özellikleriyle ilgili birçok bilgi kaybolmaktadır (Erdtman, 1986). Farklı türler farklı alerjenik profillere ve ekolojik tercihlere sahip olabileceğinden bu bilgi önemlidir (D'Amato vd., 2007). Ayrıca, çok sayıdaki kültür bitkisine ve egzotik bitki türlerine ait polenler hakkında atmosferden bilgi edinmek çok zordur. Bu nedenlerden dolayı, daha verimli, maliyeti düşük ve duyarlı bir yönteme ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir (Polling vd., 2022).

Atmosferdeki polen çeşitliliğinin belirlenmesi konusunda, polenlerin morfolojik tanımlanması dışında DNA metabarkodlama günümüzde aktif olarak gelişen alternatif bir yaklaşımdır. DNA tabanlı yöntemler, özellikle yeni nesil dizileme (NGS) teknolojisinin son zamanlarda ortaya çıkmasıyla umut vaat etmektedir.

2.2. Balda Polen DNA Metabarkodlama

Tüketiciler, tükettikleri gıdaların kalitesi ve kaynağının doğru ve güvenilir olmasını talep etmektedir. Üreticilerin ürünlerini koruyarak markalarının zarar görmesini engellemek ve tüketicilerin gıda güvenilirliği için gıda otantisite ve tağşiş tespitine yönelik çeşitli testler uygulanmaktadır. DNA barkodlama/metabarkodlama gıdaların botanik orijinini belirlemek için kullanılan testlerden biridir (Galimberti vd., 2013). Gıda tağşişleri, gıda endüstrisindeki aldatıcı faaliyetlerdir ve maksimum ekonomik fayda elde etmek

için bu yolla daha ucuz gıda maddeleri üretilir (Spink ve Moyer, 2011). Türk Gıda Kodeksi bal tebliğine göre bala gıda katkı maddesi dahil herhangi bir gıda bileşeni ya da dışarıdan herhangi bir katkı eklenemez. Fakat bal, en çok karıştırılan yiyecekler arasında altıncı sıraya yerleştirilmiştir (Izquierdo vd., 2020). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından bal "Çiçeklerin nektarından veya bitkilerin canlı kısımlarının salgılarının bal arıları tarafından toplanıp, kendi spesifik maddeleriyle birleştirdiği ve dönüştürülerek, depolanması ve olgunlaşması için bal peteğinde sakladığı doğal tatlandırıcı bir maddedir" şeklinde tanımlanmıştır (Ünal, 2022). Balın ana bileşiği karbonhidratlar ve sudur. Ayrıca organik asitler, amino asitler, enzimler, proteinler, mineraller, fenolik bileşikler, vitaminler ve uçucu bileşikler gibi birçok faydalı içeriğe sahip olmasıyla başta gıda sektörü olmak üzere kozmetik ve sağlık alanında da kullanılmaktadır (Bogdanov, 2017; Machado De-Malo vd., 2018; Demir Kanbur, 2021).

Doğal ürünlere olan talebin artması neticesinde tağşiş yoluyla elde edilen bal tüketici sağlığı açısından risk oluşturmaktadır. Bu yüzden balın kalitesinin ve gerçekliğinin belirlenmesi için balın bileşimi tespit edilmelidir. Balın bileşimini belirlemek için yaygın olarak kullanılan yöntemler melissopalinolojik ve kimyasal analizlerdir. Palinolojinin alt dallarından biri olan ve arılar tarafından toplanan polenleri tanımlayan Melissopalinolojinin, tozlaşma biyolojisi (polinasyon), polinatörlerin beslenme davranışları, arıcılık ürünlerinin kaynağı ve doğrulanması ve bal arısı (*Apis mellifera* L.) beslenme biyolojisi gibi alanlarda vazgeçilmez bir araç olduğu kanıtlanmıştır (Kearns ve Inouye, 1993; Dimou ve Thrasyvoulou, 2007; Wilson vd., 2010; Girard vd., 2012; Cusser ve Goodell, 2013) . Geleneksel Melissopalinoloji, polen örneklerinin mikroskop altında dikkatlice incelenmesi için özenle hazırlanmasını ve yerel taksonlardan alınan bir referans polen koleksiyonuyla karşılaştırılarak polen tanelerinin tanımlanmasını içerir (Erdtman, 1943; Kearns ve Inouye, 1993). Bu yöntem, doğru bir şekilde uygulandığında güvenilir

veriler sağlayabilir; ancak (1) insan uzmanlığına son derece bağımlı olmaları ve insan hatasına duyarlı olmaları, (2) birçok taksonun sadece familya düzeyinde tanımlanabilir olmasından ötürü taksonomik hassasiyetin sınırlı olması ve (3) büyük ölçekli çalışmalar için aşırı derecede zaman alıcı olmaları gibi dezavantajları vardır (Khansari vd., 2012). Melissopalinolojik analizlerin dışında son zamanlarda daha hızlı ve güvenilir sonuçların elde edilebileceği DNA metabarkodlama yöntemiyle balın bitkisel kökeni tespit edilmeye başlanmıştır; fakat bu çalışmaların sayısı ülkemizde yok denecek kadar azdır (Ünal, 2022; Özkök vd., 2023). Polenlerin kimlik tespitinde moleküler bir metod olan polen DNA metabarkodlaması daha güvenilir ve tekrar edilebilir sonuçlarıyla mikroskobik yöntemlere göre daha fazla sayıda taksonu tespit edebilmektedir (Hawkins vd., 2015; Smart vd., 2017). Ayrıca baldaki DNA hem polen hem de nektar sağlayan bitkilerden geldiği için moleküler yöntemlerle sadece polen analiziyle belirlenenden daha fazla bitkinin tanımlanması sağlanmaktadır (Prosser ve Hebert, 2017). DNA tabanlı tanımlamanın melissopalinolojik analize kıyasla birçok avantajı bulunmakla birlikte, bu kadar çok türü kapsayan eksiksiz veri tabanlarına ihtiyaç duyması bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır (Özkök vd., 2023).

2.3. Böcek Göçlerinde Polen DNA Metabarkodlama

Böcekler, sayılarının fazlalığı ve biyokütlelerinden dolayı kuşlar gibi daha büyük organizmaların göçlerine göre daha uzun mesafeli hava göçlerine uğrarlar (Holland vd., 2006). Bu uzun menzilli hareketlerin, ekosistemler ve insan ekonomisi üzerinde önemli etkileri vardır (Bauer ve Hoye, 2014). Bununla birlikte, çoğunlukla küçük organizmaların izlenmesiyle ilgili teknik zorluklar nedeniyle, böcek göçleri hakkındaki bilgiler, özellikle omurgalı göçleri ile karşılaştırıldığında son derece sınırlıdır (Holland vd., 2006; Chapman vd., 2015).

Uzun mesafeli böcek göçlerinin izlenmesinde geleneksel gözlem yöntemleri, çeşitli işaretleyicilerle işaretleme-yeniden yakalama, telemetri,

dikey görünümlü radarlar veya Doppler hava durumu radarları ve genetik belirteç veya izotop bileşenleri gibi içsel belirteçler ile bireylerin gerçek yolları belirlenebilir (Chapman vd., 2011; Talavera ve Vila, 2016). Ayrıca böcekler çiçekleri ziyaret edip onlarla beslendikçe polenler vücutlarında biriktiği ve uzun mesafelere taşınabildiği için, böcekler tarafından taşınan polen tanelerinin morfolojik tanımlamaları böceklerde uzun mesafeli göç modellerini anlamak için kullanılmıştır (Ahmed vd., 2009). Bununla birlikte, ışık veya elektron mikroskobu ile geleneksel polen tanımlaması zaman alıcıdır ve özel taksonomik bilgi gerektirir. Bu nedenle geniş ölçekli çalışmalar için geniş çapta erişilebilir bir araç olarak uygulanması zordur (Sickel vd., 2015). Ayrıca polenin taksonomik sınıflandırmasına genellikle tür ve hatta cins düzeyinde ulaşılamaz (Kraaijeveld vd., 2015; Richardson vd., 2015). DNA metabarkodlaması, tanımlama sürecini büyük ölçüde kolaylaştıran ve böcekler tarafından taşınan yüksek polen çeşitliliğini yakalayan hızlı ve verimli bir yöntemdir (Taberlet vd., 2012). Çok sayıdaki taksonun tür düzeyinde tanımlanması sayesinde böceklerin göç yolları izlenebilmektedir. Polen DNA metabarkodlama, çiçekleri ziyaret eden tüm önemli böcek takımlarının (Coleoptera, Diptera, Hymenoptera ve Lepidoptera) yanı sıra, kuşlar veya yarasalar gibi bazı omurgalılar için geniş bir uygulamaya sahiptir (Kevan ve Baker, 1983; Cronk ve Ojeda, 2008; Fleming vd., 2009).

2.4. Polinasyonda Polen DNA Metabarkodlama

Ekosistemde karşılıklı fayda sağlayan türler arasındaki etkileşimlerin tümü olarak tanımlanan mutualistik ağlar, biyolojik çeşitliliğin oluşturulması ve sürdürülmesinde anahtar bir faktör olarak göze çarpmaktadır (Thompson, 1994). Mutualistik ağlar, bitki-tohum dağıtıcı ağları ve bitki-polinatör ağlarını içermektedir. Ayrıca daha özel türlerin genel türlerle etkileşim halinde olduğu, birçok habitat tipinin ve bitki ve dağıtıcı/polinatör taksonlarının bulunduğu bir "yuva" yapısına sahiptir (Bascompte vd., 2003).

Polinasyon, ekosistemin işlevini sürdüren ve insan gıda üretimine yardımcı olan önemli bir biyolojik etkileşimdir (Buchmann ve Nabhan, 2012). Bu ekosistem hizmeti, böcekler, kuşlar, yarasalar ve bazı uçmayan memeliler de dahil olmak üzere çeşitli organizmalar tarafından gerçekleştirilir. Bitkiler ve polinatörler arasındaki ilişkiyi anlamak biyoçeşitliliği koruma, gıda güvenliği ve ekosistem sürdürülebilirliği için hayati öneme sahiptir (Klein vd., 2007). Dünya çapında yaklaşık 350.000 polinatör hayvan türü bulunmaktadır, bunların önemli bir kısmını böcekler oluşturur (Ollerton, 2017). Son yıllarda polinatörlerin populasyonu, habitat kaybı, iklim değişikliği ve pestisitlerin yanlış kullanımı gibi insan kaynaklı stres faktörlerine maruz kalmakta ve tür zenginliğinde ve bolluğunda azalma belirtileri küresel ölçekte artmaktadır. Bu düşüşlerin nedenini anlamak ve sonucu olarak ortaya çıkan olumsuz etkileri azaltmanın yollarını bulmak, bitki-polinatör ilişkilerinin daha iyi anlaşılmasını gerektirir (Arstingstall vd., 2021).

Polinatörler tarafından yapılan çiçek ziyaretlerinin tanımlanması, bitkilerle polinatörler arasındaki ekolojik etkileşimlerin anlaşılmasını geliştirmek için bir fırsat sunar; bu da biyoçeşitliliğin korunmasına katkı sağlar ve ekosistemi dengede tutmayı teşvik eder. Çiçek ziyaretlerinin belirlenmesi, böceklerin kullandığı kaynaklar ve polinasyon hakkında fikir verebilir. Çiçek ziyareti çalışmaları, bitki veya böcek odaklı olabilir. Böcek odaklılar, boya, plastik etiketler kullanılarak işaretleme, yeniden yakalama veya harmonik radar gibi gözlem yöntemlerini içerir (Osborne vd., 1999). Ayrıca bal arılarının koloniye, kaynakların konumunu iletmek için kullandığı sallanma dansları besin tercih ve davranışlarını aydınlatmak için uygulanabilir (Balfour vd., 2015). Alternatif olarak, her bir polinatörün taşıdığı polenlerin tanımlanmasıyla bir polinatörün hangi bitkileri ziyaret ettiğine dair bir kayıt sağlanır (Bell vd., 2017). Bu yöntem avantajlara sahip olsa da poleni görsel mikroskopi yoluyla tanımlamanın birçok dezavantajı bulunmasından dolayı bu yöntem geniş çapta kullanılmamıştır. Çünkü polenlerin tanımlanması son derece uzmanlık

gerektirir, zaman alıcıdır ve genellikle düşük taksonomik çözünürlüğe sahiptir. Ayrıca, polenler genellikle mevcut bir polen örneğinden tanımlanırlar ve bu nedenle daha nadir taksonlar tespit edilemeyebilir (Bosch vd., 2009; Bell vd., 2016). Polen taşıma temelli polinasyon ağlarının oluşturulması için alternatif metodoloji, polenin DNA barkodlamasını içerir (Sickel vd., 2015; Bell vd., 2016). DNA metabarkodlama, polenin polinatör üzerinden tanınması temelli yöntemlere dayanır ve yüksek verimli dizileme kullanarak karışık tür örneklerindeki birden fazla türü tanımlar. Polen DNA metabarkodlama, görsel polen tanımlamasına kıyasla bir dizi potansiyel avantaj sunar; bunlar arasında çok daha hızlı bir işlem; bir örnekteki tüm polenlerin daha kapsamlı karakterizasyonu; temel bir moleküler biyoloji laboratuvarında standart olan yöntemlerin ve ekipmanların kullanımı (polenleri görsel olarak tanımlamak için gerekli olan uzmanlaşmış bilgiye gerek duymayan); ve bitki taksonlarının %70-90'ı veya daha fazlasının tür düzeyinde tanımlanmasıyla daha yüksek taksonomik çözünürlük (CBOL Bitki Çalışma Grubu, 2009) bulunmaktadır.

2.5. Adli Palinolojide Polen DNA Metabarkodlama

Adli Palinoloji, 1950'lerden beri polen ve sporları bir suç çözme aracı olarak kullanan palinolojinin alt dallarından biridir (Bryant, 2013). Polen ve sporların bu alanda kullanılması, dağılım mekanizmaları, çok sayıda olmaları, mekanik ve kimyasal tahribattan korunmaları ve morfoloji ve mikroskobik boyutlarına dayanmaktadır. Jeolojik literatürde, polenin binlerce hatta milyonlarca yıl boyunca varlığını sürdürebildiği ve genellikle kömürleşme ve diğer tipik yanma olaylarının izleriyle ilişkilendirildiği belirtilmiştir (Sniderman ve Haberle, 2012). Polenler bağırsakta 21 gün boyunca kalabilir. Bu nedenle, polen analizi adli araştırmanın önemli bir alanını oluşturmaktadır (Arguelles vd., 2015).

Polenler, kimyasal saldırılara son derece dayanıklı oldukları için adli uygulamalarda yer almaktadırlar. Araştırmaya konu olan olaydan uzun bir süre sonra bile suç mahallinde kalabilirler. Ayrıca polenler, spor veya polen içeren

bir bitki parçasıyla doğrudan temas yoluyla da aktarılabilirler. Polen taneleri küçük, çok çeşitli ve havaya maruz kalmış veya etkileşime girmiş nesnelerde bulunmaları nedeniyle ideal adli ipucu materyalleridir. Polen izolasyonu, çoğu nesneden adli muayene için örnek gönderilerek gerçekleştirilebilir. Bu tür örnekler arasında toprak, halatlar ve ip çeşitleri, giysi ve kumaşlar, ilaçlar, hava filtreleri, bitki, hayvan ve insan materyali, kürk, saç ve mide içeriği bulunabilir (Milne vd., 2005). Polenlerin analizi, delil materyali için kaynak oluşturabilecek bitki topluluklarının, çevrenin ve muhtemel bölgelerin belirlenmesi için önemli bir bilgi sağlar. Adli Palinoloji, son otuz yıldır deneyimli araştırmacılar tarafından yasal durumlarda adli kanıt ve bilgi sağlamak için kullanılmış ve adli yapılanma için son derece önemli, hassas ve güçlü yöntemleri içermektedir (Milne vd., 2005; Mildenhall vd., 2006; Morgan vd., 2014).

Bitkilerin tanımlanması, bir örneğin coğrafi kökenini belirlemeye, suç mahalli ile şüpheliler arasında bağ kurmaya, yasaklanmış veya nesli tehlike altında olan türleri bulunduranları veya ticaretini yapanları belirlemeye yardımcı olabilir (Dunbar ve Murphy, 2009). Bitkisel ipuçlarının değeri ceza ve hukuk davalarında net bir şekilde gösterilmiş olmasına ve mahkemeler tarafından uygun bir bilimsel kanıt olarak geniş ölçüde kabul edilmesine rağmen, maalesef birçok soruşturmacı bunu görmezden gelmeye devam etmektedir. Bitki kanıtları bir ölümün kaza, intihar veya cinayet neticesinde mi olduğunu veya bir cesedin ne zaman gömüldüğünü belirlemede yararlı olabilir. Ayrıca bir suç mahallinin birincil veya ikincil bir olay yeri olup olmadığını ve tanınmayan veya tanımlanamayan cesetleri tanımlamak için de kullanılabilirler (Coyle vd., 2005).

Polenler kolaylıkla dışarı atılamadıklarından kumaşlarda, ayakkabı ve diğer nesnelerin küçük aralıklarında hapsolurlar. Yüzey oluşturmaları ve statik yüklerinden dolayı hareket edemeyen polenler, bir makinede yıkanmış kıyafetlerden ve ayakkabılardan bile kolay kolay çıkmazlar (Wiltshire, 1997).

Bu dayanıklı yapışkanlık, onları indikatör ve belirli yerlerin veya özel yüzeylerin kanıtı olarak çok değerli kılar (Patricia, 2008). Ayrıca polen dışındaki çoğu bitki kanıtı, çürüme, kuruma, küf etkisi veya başka şekillerde değişme gibi etkilere maruz kalabilir (Coyle vd., 2005). Suç mahallinden elde edilen polenin, bir şüphelininkiyle eşleşmesi, kişinin o bölgeyi yakın zamanda ziyaret etmiş olabileceğini temelde gösterebilir, ancak bu kişinin suç işlediği anlamına gelmez. Polenlerin görüntülenmesi, dünya genelinde hatta adli palinolojide bile DNA teknolojisinin gelişiminden önce, belgeleme ve araştırma için veri toplama yöntemlerinin doğruluğunu birçok açıdan arttırdığını ortaya koymuştur. Polen taneleri görüntülerinin elde edilmesi için üç yöntem vardır: ışık mikroskobu, geniş alan floresan mikroskobu yöntemi ve yapılandırılmış aydınlatma yöntemi. Bu üç yöntem, polenleri tespit etmede yarı otomatik geleneksel yöntemler olarak düşünülebilir (Johnsrud vd., 2013).

DNA araştırmaları, birçok adli laboratuvarda standart hale gelmiştir ve son zamanlarda tek bir polen tanesinden bile DNA'nın izole edilebileceği gösterilmiştir. Polenlerin kanıt olarak kullanılmasından önce bitki türlerinin tanımlanmasında alandaki sınırlı sayıda uzmanın varlığı, bilgi ve veri tabanı eksikliği ve taksonomik çözünürlüğün düşük olması gibi sorunlarla karşılaşılmaktaydı. Ancak DNA teknolojisinin hızla gelişmesiyle birlikte adli palinoloji alanında da DNA barkodlama yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemin iki temel faydası bulunmaktadır: (1) Birden fazla taksonomik grubu tanımlar ve (2) Organizmanın morfolojisinde görünmeyen parçaları daha etkili bir şekilde belirler (Bell vd., 2016). Bu doğrultuda, DNA barkodlamanın polenler arasında ayrım yapmanın en hızlı yol olduğu ifade edilmiştir (Galimberti vd., 2014).

3. Sonuç

Günümüzde polenlerin geniş uygulama alanlarında çalışılması gerektiğinden taksonomik olarak tanımlanmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Polenlerin doğru bir şekilde teşhis edilmesinde DNA temelli yöntemlerin, morfolojiye dayalı uygulamalarla karşılaştırıldığında çok sayıda avantaja sahip olduğu belirtilmiştir. Bunlar, gerekli laboratuvar ve biyoinformatik uzmanlığa sahip daha çok sayıda personelin varlığı, daha büyük taksonomik çözünürlüğün elde edilebilmesi; daha yüksek verimlilik potansiyelinin olması; ve bir örneğin polen kompozisyonunu tümüyle tanımlamanın mümkün olması şeklindedir.

Son zamanlarda yüksek verimli dizileme (HTS) teknolojisinin ortaya çıkmasıyla DNA tabanlı polen tanımlaması artık zaman alıcı bireysel polen tanelerinin izolasyonu ve dizilenmesine (Matsuki vd., 2007) veya Sanger dizilemesinden önce amplikonların klonlanmasına (Galimberti vd., 2014) bağlı değildir. Bunun yerine, HTS ile araştırmacılar, DNA metabarkodlama kullanarak toplu örneklerden poleni dizileyebilmişlerdir. Bu ilerleme, karışımlar içindeki türlerin hızlı ve büyük ölçekli tanımlanmasını sağlamıştır (Kraaijeveld vd., 2015; Richardson vd., 2015). HTS'deki ilerlemeler ve maliyetlerdeki düşüşler ile üçüncü nesil dizileme teknolojilerinin ortaya çıkması, DNA tabanlı polen tanımlamalarını daha da geliştirebilir; fakat yine de tanımlama için uygun ve eksiksiz referans veri tabanlarının varlığını gerektirir.

Polen DNA metabarkodlama şu anda poleni mikroskobik olarak tanımlama ve bitki-polinatör etkileşimlerini doğrudan gözlemleme gibi geleneksel yöntemlere tamamlayıcı bir metod olarak dikkat çekmektedir. Referans veri tabanları geliştikçe, DNA tabanlı yöntemler geleneksel yaklaşımlarla karşılaştırıldıkça ve standartlaştırıldıkça, ve çok yıllık veri setleri biriktirildikçe polen DNA metabarkodlama ve ilgili yöntemlerin potansiyel uygulamalarının gelişerek artacağı kaçınılmazdır (Bell vd., 2023).

KAYNAKÇA

Ahmed, S., Compton, S. G., Butlin, R. K., & Gilmartin, P. M. (2009). Wind-borne insects mediate directional pollen transfer between desert fig trees 160 kilometers apart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(48), 20342-20347.

Alan, Ş., Sarışahin, T., Acar Şahin, A., Kaplan, A., Erdoğan, İ., & Pınar, N. M. (2019). A new method to quantify atmospheric Poaceae pollen DNA based on the trnT-F cpDNA region. *Turkish Journal of Biochemistry*, 44(3), 248-253.

Arguelles, P., Reinhard, K., & Shin, D. H. (2015). Forensic palynological analysis of intestinal contents of a Korean mummy. *The Anatomical Record*, 298(6), 1182-1190.

Arstingstall, K. A., DeBano, S. J., Li, X., Wooster, D. E., Rowland, M. M., Burrows, S., & Frost, K. (2021). Capabilities and limitations of using DNA metabarcoding to study plant–pollinator interactions. *Molecular Ecology*, 1-32.

Aytuğ, B., Aykut, S., Merev, N., & Edis, G. (1971). *İstanbul Çevresi Bitkilerinin Polen Atlası*. İstanbul: İ.Ü. Orman Fakültesi Yayınları.

Aytuğ, B. (1981). Palinoloji ve yerbilimlerindeki uygulamaları 1. *İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 31(2), 57-67.

Aytuğ, B., & Merev, N. (2002). *Palinoloji Ders Notu*. Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi, Orman Fakültesi.

Balfour, N. J., Fensome, K. A., Samuelson, E. E. W., & Ratnieks, F. L. W. (2015). Following the dance: Ground survey of flowers and flowervisiting insects in a summer foraging hotspot identified via honey bee waggle dance decoding. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 213, 265-271.

Barrett, R. D. H., & Hebert, P. D. N. (2005). Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*, 83, 481-491.

Bascompte, J., Jordano, P., Melian, C. J., & Olesen, J. M. (2003). The nested assembly of plant-animal mutualistic networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 9383-9387.

Bauer, S., & Hoye, B. J. (2014). Migratory animals couple biodiversity and ecosystem functioning worldwide. *Science*, 344, 1242552.

Bell, D., Long, D. G., Forrest, A. D., Hollingsworth, M. L., Blom, H. H., & Hollingsworth, P. M. (2012). DNA barcoding of European Herbertus (Marchantiopsida, Herbertaceae) and the discovery and description of a new species: DNA barcoding Herbertus. *Molecular Ecology Resources*, 12, 36-47.

Bell, K. L., de Vere, N., Keller, A., Richardson, R. T., Gous, A., Burgess, K. S., & Brosi, B. J. (2016). Pollen DNA barcoding: Current applications and future prospects. *Genome*, 59, 629-640.

Bell, K. L., Fowler, J., Burgess, K. S., Dobbs, E. K., Gruenewald, D., Lawley, B., Morozumi, C., & Brosi, B. J. (2017). Applying pollen DNA metabarcoding to the study of plant–pollinator interactions. *Applications in Plant Science*, 5, 1600124.

Bell, K. A., Turo, K. J., Lowe, A., Nota, K., Keller, A., Encinas-Viso, F., Parducci, L., Richardson, R., Legget, R. M., Brosi, B. J., Burgess, K. S., Suyama, Y., & de Vere, N. (2023). Pollen DNA metabarcoding and related methods in global change ecology: prospects, challenges, and progress. *Molecular Ecology*, 32, 6345-6362.

Bogdanov, S. (2017). Honey in medicine: A review. *Bee Product Science*, 1-28.

Bosch, J., Gonzalez, A. M., Rodrigo, A., & Navarro, D. (2009). Plant-pollinator networks: adding the pollinator's perspective. *Ecology Letters*, 12(5), 409-419.

Bousquet, J., Dahl, R., & Khaltaev, N. (2007). Global alliance against chronic respiratory diseases. *Allergy*, 62, 216-223.

Bryant, V. M. (2013). Analytical techniques in forensic palynology. S. A. Elias (Ed.), *The encyclopedia of quaternary science, vol. 4* içinde (556-566. ss.). Amsterdam: Elsevier.

Buchmann, S. L., & Nabhan, G. P. (2012). *The forgotten pollinators*. Washington, D.C.: Island Press.

Burkle, L. A., Marlin, J. C., & Knight, T. M. (2013). Plant-pollinator interactions over 120 years: Loss of species, co-occurrence, and function. *Science*, 339(6127), 1611-1615.

CBOL Plant Working Group (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 12794-12797.

Chapman, J. W., Drake, V. A., & Reynolds, D. R. (2011). Recent insights from radar studies of insect flight. *Annual Review of Entomology*, 56, 337-356.

Chapman, J. W., Reynolds, D. R., & Wilson, K. (2015). Long-range seasonal migration in insects: mechanisms, evolutionary drivers and ecological consequences. *Ecology Letters*, 18, 287-302.

Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Zhu, Y., Ma, X., Gao, T., Pang, X., Luo, K., Li, Y., Li, X., Jia, X., Lin, Y., & Leon, C. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One*, 5(1), e8613.

Corell, J., & Rodríguez-Ezpeleta, N. (2014). Tuning of protocols and marker selection to evaluate the diversity of zooplankton using metabarcoding. *Revista de Investigación Marina*, 21(2), 19-39.

Coyle, H. M., Lee, C. L., Lin, W. Y., Lee, H. C., & Palmbach, T. M. (2005). Forensic botany: using plant evidence to aid in forensic death investigation. *Croatian Medical Journal*, 46(4), 606-612.

Cronk, Q., & Ojeda, I. (2008). Bird-pollinated flowers in an evolutionary and molecular context. *Journal of Experimental Botany*, 59(4), 715-727.

Cusser, S., & Goodell, K. (2013). Diversity and distribution of floral resources influence the restoration of plant-pollinator networks on a reclaimed strip mine. *Restoration Ecology*, 21, 713-721.

D'Amato, G., Liccardi, G., D'Amato, M., & Holgate, S. (2005). Environmental risk factors and allergic bronchial asthma. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 35, 1113-1124.

D'Amato, G., Cecchi, L., Bonini, S., Nunes, C., Annesi-Maesano, I., Behrendt, H., Liccardi, G., Popov, T., & van Cauwenberge, P. (2007). Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy*, 62, 976-990.

Damialis, A., Halley, J. M., Gioulekas, D., & Vokou, D. (2007). Long-term trends in atmospheric pollen levels in the city of Thessaloniki, Greece. *Atmospheric Environment*, 41(33), 7011-7021.

Demir Kanbur, E. (2021). Floristik ve çevresel faktörlerin arı ve arı ürünlerinde fiziko-kimyasal ve palinolojik parametrelere etkisi: Senoz Vadisi (Çayeli/Rize) örneği. Doktora Tezi. Rize: Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Dimou, M. G., & Thrasyvoulou, A. (2007). A comparison of three methods for assessing the relative abundance of pollen resources collected by honey bee colonies. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 46, 144-148.

Dunbar, M., & Murphy, T. M. (2009). DNA analysis of natural fiber rope. *Journal of Forensic Sciences*, 54, 1-6.

Dunker, S., Motivans, E., Rakosy, D., Boho, D., Mader, P., Hornick, T., & Knight, T. M. (2021). Pollen analysis using multispectral imaging flow cytometry and deep learning. *New Phytologist*, 229(1), 593-606.

Erdtman, G. (1943). *An introduction to pollen analysis*. Waltham, Mass: Chronica Botanica Co.

Erdtman, G. (1969). *Handbook of palynology, morphology, taxonomy and ecology*. Copenhagen: Munksgaard.

Erdtman, G. (1986). *Pollen morphology and plant taxonomy: Angiosperms*. Leden: Brill Archive.

Faegri, K., & Iversen, J. (1950). *Textbook of modern pollen analysis*. Copenhagen: Munksgaard.

Fleming, T. H., Geiselman, C., & Kress, W. J. (2009). The evolution of bat pollination: a phylogenetic perspective. *Annals of Botany*, 104(6), 1017-1043.

Galimberti, A., De Mattia, F., Losa, A., Bruni, I., Federici, S., Casiraghi, M., Martellos, S., & Labra, M. (2013). DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International*, 50(1), 55-63.

Galimberti, A., De Mattia, F., Bruni, I., Scaccabarozzi, D., Sandionigi, A., Barbuto, M., Casiraghi, M., & Labra, M. (2014). A DNA barcoding approach to characterize pollen collected by honeybees. *PLoS One*, 9(10), e109363.

Girard, M., Chagnon, M., & Fournier, V. (2012). Pollen diversity collected by honey bees in the vicinity of *Vaccinium* spp. crops and its importance for colony development. *Botany*, 90, 545-555.

Halbritter, H., Ulrich, S., Grímsson, F., Weber, M., Zetter, R., Hesse, M., Buchner, R., Svojtka, M., & Frosch-Radivo, A. (2018). *Illustrated pollen terminology*. Second edition. Vienna: Springer.

Hawkins, J., de Vere, N., Griffith, A., Ford, C. R., Allainguillaume, J., Hegarty, M. J., Baillie, L., & Adams-Groom, B. (2015). Using DNA metabarcoding to identify the floral composition of honey: A new tool for investigating honey bee foraging preferences. *PLoS One*, 10(8), e0134735.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & de Waard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270, 313-321.

Holland, R. A., Wikelski, M., & Wilcove D. S. (2006). How and why do insects migrate?. *Science*, 313, 794-796.

Hornick, T., Richter, A., Harpole, W. S., Bastl, M., Bohlmann, S., Bonn, A., … & Dunker, S. (2022). An integrative environmental pollen diversity assessment and its importance for the sustainable development goals. *Plants People Planet*, 4(2), 110-121.

Hosein, F. N., Austin, N., Maharaj, S., Johnson, W., Rostant, L., Ramdass, A. C., & Rampersad, S. N. (2017). Utility of DNA barcoding to identify rare endemic vascular plant species in Trinidad. *Ecology and Evolution*, 7, 7311-7333.

Hürkan, K. (2020). Bitkisel ürünlerin güvenirliğinin belirlenmesinde kullanılan bazı modern moleküler biyoloji yöntemleri. A. Ünal, A. Aydın, K. Hürkan, & Y. Kemeç Hürkan (Ed.), *Tarımsal ve endüstriyel biyoteknoloji uygulamaları-Biyoekonomi* içinde (5-39. ss.). Ankara: İksad Yayınevi.

Isagi, Y., & Suyama, Y. (2011). *Single-pollen genotyping*. Tokyo: Springer.

Izquierdo, M., Lastra-Mejías, M., González-Flores, E., Cancilla, J. C., Pérez, M., & Torrecilla, J. S. (2020). Convolutional decoding of thermographic images to locate and quantify honey adulterations. *Talanta*, 209, 120500.

Johnsrud, S., Yang, H., Nayak, A., & Punyasena, S. (2013). Semi-automated segmentation of pollen grains in microscopic images: a tool for three imaging modes. *Grana*, 52(3), 181-191.

Karlıoğlu Kılıç, N., Yılmaz Dağdeviren, R., Caner, H., & Akkemik, Ü. (2020). Türkiye'de kullanılmakta olan palinoloji ve polen terimleri üzerine bir değerlendirme ve öneriler. *Avrasya Terim Dergisi*, 8(2), 98-108.

Kearns, C. A., & Inouye, D. W. (1993). *Techniques for pollination biologists*. Colorado, USA: University Press of Colorado.

Kevan, P. G., & Baker, H. G. (1983). Insects as flower visitors and pollinators. *Annual Review of Entomology*, 28(1), 407-453.

Khansari, E., Zarre, S., Alizadeh, K., Attar, F., Aghabeigi, F., & Salmaki, Y. (2012). Pollen morphology of *Campanula* (Campanulaceae) and allied genera in Iran with special focus on its systematic implication. *Flora*, 207, 203-211.

Klein, A. M., Vaissiere, B. E. Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A. Kremen, C., & Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274, 303-313.

Klimczak, L. J., Ebner von Eschenbach, C., Thompson, P. M., Buters, J. T. M., & Meuller, G. A. (2020). Mixture analyses of air-sampled pollen extracts can accurately differentiate pollen taxa. *Atmospheric Environment*, 243, 117746.

Kraaijeveld, K., de Weger, L. A., Ventayol García, M., Buermans, H., Frank, J., Hiemstra, P. S., & den Dunnen, J. T. (2015). Efficient and sensitive identification and quantification of airborne pollen using next-generation DNA sequencing. *Molecular Ecology Resources*, 15, 8-16.

Kron, P., Loureiro, J., Castro, S., & Čertner, M. (2021). Flow cytometric analysis of pollen and spores: An overview of applications and methodology. *Cytometry*, 1-11.

Lahaye, R., van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., & Savolainen, V. (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), 2923-2928.

Lau, P., Bryant, V., Ellis, J. D., Huang, Z. Y., Sullivan, J., Schmehl, D. R., Cabrera, A. R., & Rangel, J. (2019). Seasonal variation of pollen

collected by honey bees (*Apis mellifera*) in developed areas across four regions in the United States. *PLoS One*, 14(6), e0217294.

Leontidou, K., Vernesi, C., De Groeve, J., Cristofolini, F., Vokou, D., & Cristofori, A. (2017). DNA metabarcoding of airborne pollen: new protocols for improved taxonomic identification of environmental samples. *Aerobiologia*, 34, 63-74.

Leontidou, K., Vokou, D., Sandionigi, A., Bruno, A., Lazarina, M., De Groeve, J., … & Cristofori, A. (2021). Plant biodiversity assessment through pollen DNA metabarcoding in Natura 2000 habitats (Italian Alps). *Scientific Reports*, 11, 18226.

Levetin, E. (2004). Methods for aeroallergen sampling. *Current Allergy and Asthma Reports*, 4(5), 376-383.

Liu, S., Li, K., Jia, W., Stoof-Leichsenring, K. R., Liu, X., Cao, X., & Herzschuh, U. (2021). Vegetation reconstruction from Siberia and the Tibetan Plateau using modern analogue technique–comparing sedimentary (ancient) DNA and pollen data. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9, 668611.

Longhi, S., Cristofori, A., Gatto, P., Cristofolini, F., Grando, M. S., & Gottardini, E. (2009). Biomolecular identification of allergenic pollen: A new perspective for aerobiological monitoring?. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 103(6), 508-514.

Machado De-Melo, A. A., Almeida-Muradian, L. B. D., Sancho, M. T., & Pascual-Maté, A. (2018). Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research*, 57(1), 5-37.

Mander, L., & Punyasena, S. W. (2014). On the taxonomic resolution of pollen and spore records of earth's vegetation. *International Journal of Plant Sciences*, 175(8), 931-945.

Marcos, J. V., Nava, R., Cristobal, G., Redondo, R., Escalante-Ramirez, B., Bueno, G., … & Rodriguez, T. (2015). Automated pollen identification using microscopic imaging and texture analysis. *Micron*, 68, 36-46.

Matsuki, Y., Isagi, Y., & Suyama, Y. (2007). The determination of multiple microsatellite genotypes and DNA sequences from a single pollen grain. *Molecular Ecology Notes*, 7(2), 194-198.

McAndrews, J. H., Berti, A. A., & Norris, G. (1973). Key to the quaternary pollen and spores of the Great Lakes Region. Toronto: Royal Ontario Museum.

Mildenhall, D. C., Wiltshire, P. E. J., & Bryant, V. M. (2006). Forensic palynology: Why do it and how it works. *Forensic Science International*, 163, 163-172.

Milne, L., Bryant, V. M., & Mildenhall, D. C. (2005). Forensic palynology. H. M. Coyle (Ed.), *Forensic Botany: Principles and Applications to Criminal Casework* içinde (217-252. ss.). Boca Raton, USA: CRC Press.

Moore, P. D., & Webb, J. A. (1978). *An illustrated guide to pollen analysis*. London: Hodder & Stoughton.

Morgan, R. M., Flynn, J., Sena, V., & Bull, P. A. (2014). Experimental forensic studies of the preservation of pollen in vehicle fires. *Science & Justice*, 54, 141-145.

Moore, P. D., Webb, J. A, & Collinson, M. E. (1991). *Pollen analysis*. 2nd edn. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Ollerton, J. (2017). Pollinator diversity: distribution, ecological function, and conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 48, 353-376.

Osborne, J. L., Clark, S. J., Morris, R. J., Williams, I. H., Riley, J. R., Smith, A. D., Reynolds, D. R., & Edwards, A. S. (1999). A landscape-scale study of bumble bee foraging range and constancy, using harmonic radar. *Journal of Applied Ecology*, 36, 519-533.

Özkök, A., Akel Bilgiç, H., Kosukcu, C., Arık, G., Canlı, D., Yet, İ., & Karaaslan, C. (2023). Comparing the melissopalynological and next generation sequencing (NGS) methods for the determining of botanical origin of honey. *Food Control*, 148, 109630.

Patricia, E. J. W. (2008). Chapter 9 Forensic Ecology, Botany, and Palynology: Some Aspects of Their Role in Criminal Investigation.

Pereira, S. G., Guedes, A., Abreu, I., & Ribeiro, H. (2021). Testing the Raman parameters of pollen spectra in automatic identification. *Aerobiologia*, 37(1), 15-28.

Pınar, N. M., Akgül, G., & Tuğ, G. N. (2003). *Palinoloji laboratuvar kılavuzu*. Ankara: Ankara Üniversitesi Döner Sermaye İşletmesi Yayınları.

Polling, M., Sin, M., de Weger, L. A., Speksnijder, A. G. C. L., Koenders, M. J. F., de Boer, H., & Gravendeel, B. (2022). DNA metabarcoding using nrITS2 provides highly qualitative and quantitative results for airborne pollen monitoring. *Science of The Total Environment*, 806, 150468.

Prosser, S. W., & Hebert, P. D. (2017). Rapid identification of the botanical and entomological sources of honey using DNA metabarcoding. *Food Chemistry*, 214, 183-191.

Punt, W., Blackmore, S., & Clarke, G. C. S. (1976-2009). *The North-West European pollen flora.* Volumes 1-9. Amsterdam: Elsevier.

Richardson, R. T., Lin, C. H., Quijia, J. O., Riusech, N. S., Goodell, K., & Johnson, R. M. (2015). Rank-based characterization of pollen assemblages collected by honey bees using a multi-locus metabarcoding approach. *Applications in Plant Sciences*, 3(11), 1500043.

Richardson, R. T., Curtis, H. R., Matcham, E. G., Lin, C. H., Suresh, S., Sponsler, D. B., Hearon, L. E., & Johnson, R. M. (2019). Quantitative multi- locus metabarcoding and waggle dance interpretation reveal honey bee spring foraging patterns in Midwest agroecosystems. *Molecular Ecology*, 28(3), 686-697.

Sauvageat, E., Zeder, Y., Auderset, K., Calpini, B., Clot, B., Crouzy, B., Konzelmann, T., Lieberherr, G., Tummon, F., & Vasilatou, K. (2020). Real-time pollen monitoring using digital holography. *Atmospheric Measurement Techniques*, 13, 1539-1550.

Sevillano, V., Holt, K., & Aznarte, J. L. (2020). Precise automatic classification of 46 different pollen types with convolutional neural networks. *PLoS One*, 15(6), e0229751.

Sickel, W., Ankenbrand, M. J., Grimmer, G., Holzschuh, A., Härtel, S., Lanzen, J., & Keller, A. (2015). Increased efficiency in identifying mixed pollen samples by meta-barcoding with a dual-indexing approach. *BMC Ecology*, 15(1), 20.

Simanonok, M. P., Otto, C. R. V., Cornman, R. S., Iwanowicz, D. D., Strange, J. P., & Smith, T. A. (2021). A century of pollen foraging by the endangered rusty patched bumble bee (*Bombus affinis*): inferences from molecular sequencing of museum specimens. *Biodiversity and Conservation*, 30, 123-137.

Smart, M. D., Cornman, R. S., Iwanowicz, D. D., McDermott-Kubeczko, M., Pettis, J. S., Spivak, M. S., & Otto, C. R. V. (2017). A comparison of honey bee-collected pollen from working agricultural lands using light microscopy and ITS metabarcoding. *Environmental Entomology*, 46(1), 38-49.

Sniderman, J. M. K., & Haberle, S. G. (2012). Fire and vegetation change during the Early Pleistocene in southeastern Australia. *Journal of Quaternary Science*, 27(3), 307-317.

Spink, J., & Moyer, D. C. (2011). Defining the public health threat of food fraud. *Journal of Food Science*, 76(9), 157-163.

Sponsler, D. B., Shump, D., Richardson, R. T., & Grozinger, C. M. (2020). Characterizing the floral resources of a North American metropolis using a honey bee foraging assay. *Ecosphere*, 11(4), e03102.

Stillman, E. C., & Flenley, J. R. (1996). The needs and prospects for automation in palynology. *Quaternary Science Reviews*, 15(1), 1-5.

Suanno, C., Aloisi, I., Fernández-Gonzalez, D., & Del Duca, S. (2021). Monitoring techniques for pollen allergy risk assessment. *Environmental Research*, 197, 111109.

Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., & Willerslev, E. (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 21(8), 2045-2050.

Talavera, G., & Vila, R. (2016). Discovery of mass migration and breeding of the painted lady butterfly Vanessa cardui in the Sub-Sahara: the Europe–Africa migration revisited. *Biological Journal of the Linnean Society*, 120(2), 274-285.

Thompson, J. N. (1994). *The coevolutionary process*. Chicago, Illinois, USA: University of Chicago Press.

Tremblay, E. D., Duceppe, M. O., Thurston, G. B., Gagnon, M. C., Cote, M. J., & Bilodeau, G. J. (2019). High-resolution biomonitoring of plant pathogens and plant species using metabarcoding of pollen pellet contents collected from a honey bee hive. *Environmental DNA*, 1, 155-175.

Tur, C., Vigalondo, B., Trojelsgaard, K., Olesen, J. M., & Traveset, A. (2014). Downscaling pollen-transport networks to the level of individuals. *Journal of Animal Ecology*, 83(1), 306-317.

Uluğ, A. (2023). Bitki biyoçeşitliliğinin DNA tabanlı tanımlama sistemi ile korunması. A. Dayangaç, H. Akgül, Z. Özomay, & M. Özomay (Ed.), *Fen Bilimleri & Matematikte güncel araştırmalar* içinde (1-13. ss.). Ankara: Gece Kitaplığı.

Ünal, İ. (2022). Balda DNA metabarkodlama çalışmaları. Yüksek Lisans Tezi. Gebze: Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Wiltshire, P. E. J. (1997). Forensic ecology, botany and palynology. Some aspects of their role in criminal investigations. K., Ritz, L., Dawson, & D., Miller (Ed), *Criminal and Environmental Soil Forensics* içinde (129-150. ss.). Dordrecht: Springer.

Wilson, E. E., Sidhu, C. S., Levan, K. E., & Holway, D. A. (2010). Pollen foraging behaviour of solitary Hawaiian bees revealed through molecular pollen analysis. *Molecular Ecology*, 19, 4823-4829.

Wodehouse, R. P. (1935). *Pollen grains*. New York: McGraw-Hill Press.

Zimmermann, B. (2018). Chemical characterization and identification of Pinaceae pollen by infrared microspectroscopy. *Planta*, 247(1), 171-180.

BÖLÜM 7

EKSOZOMLAR VE KULLANIM ALANLARI

Arş. Gör. Recep ÇELİK[10]

Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN[11]

DOI: https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.12707329

[10] Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Teknikokullar, ANKARA. recepcelik@gazi.edu.tr Orcid ID: 0009-0003-2939-1009

[11] Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Genetik A.B.D Başkanı, Teknikokullar , ANKARA hakkitastan@gazi.edu.tr. Orcid ID: 0000-0001-9540-2931

1. Giriş

Eksozomlar, Türkçe olarak hücre dışı kesecik/veziküller olarak çevrilebilir. Bu veziküller hücrenin ekstra-selüler boşluğa salgıladıkları maddeleri içerir. Geçmiş tarihine bakacak olursak ilk çalışmalar 1940'lı yıllarda yapılmaya başlanmış olup 2000'li yıllara kadar emekleme aşamasında olan bu konu moleküler biyoloji ve biyoteknoloji başta olmak üzere biyoloji biliminde popüler hale gelmiştir.[1]. Bu küçük hücre dışı vezikküllerin boyutları 30-160nm arası değişmektedir. Eksozomlar çeşitli araştırmalar sonucunda hücre-hücre etkileşiminde önemli roller oynadığı ortaya konmuştur. Bu nedenle de hücre-hücre etkili veya ek salgı maddeleri ile sinyal mekanizmasının başka bir aracı olarak kabul edilir[2]. İnsan vücudunda; serum, Beyin omurilik sıvısı, idrar gibi birçok biyolojik sıvının içerisinde bolca bulunur . Hücreler arası çeşitli maddeler taşıyabilmekle birlikte çeşitli hastalıkların erken tanısında kullanılabilecek güçlü adaylardır. [3].

2. Eksozomların izolasyonu ve karakterizasyonu

Organik bir maddenin karakterizasyonu için ön koşul o maddeyi izolasyonunu yapabilmektir bu yüzden ilk önce izolasyon yöntemlerine odaklanmak gerekir. Burada dikkat edilmesi gereken bazı ölçütler vardır. Bunlar eksozomların boyutları arasındaki çeşitlilik ve diğer biyolojik moleküllere benzerliklerinin yüksek oluşudur. Yaygın olarak kullanılan izolasyon teknikleri; Ultra santrifügasyon, Yoğunluk gradyan santrifügasyonu, Polimer çökeltimi, Boyut dışlama(exlusion) Kromatografisi, ultrafiltrasyon ve İmmunoafinite Kromatografisidir. Bu yöntemlerin herhangi biri için en doğrusu demek mümkün olmamakla birlikte çalışma stratejisine göre seçilmesi önemlidir . Aşağıda bu yöntemlerin bir özeti sunulmuştur.

Ultra santrifügasyon (UC): Altın standart, boyuta ve yoğunluğa göre ayırır. Zaman alıcı, pahalı ve eksozomlara zarar verebilir, ancak yüksek verim sunar.

Yoğunluk Gradyan Santrifügasyonu: Eksozom saflığını artırmak için UC ile kullanılır. Virüsler gibi benzer büyüklükteki partiküllerden eksozomları ayırabilir.

Polimer Çökeltimi: Eksozomları çökelterek polimerler kullanır. Diğer yöntemlere kıyasla hızlı ve uygulaması kolaydır, ancak daha düşük saflık ve geri kazanım oranına sahiptir.

Boyut Dışlama(exlusion) Kromatografisi (SEC): Boyuta göre ayırır, minimal eksozom hasarı ile hızlı ve kolay izolasyon sunar, ancak daha düşük saflık ile sonuçlanabilir.

Ultrafiltrasyon: Eksozomları ayırmak için membranlar kullanır, düşük maliyet ve yüksek zenginleştirme sunar, ancak düşük saflık ve spesifik olmayan bağlanma potansiyeli vardır.

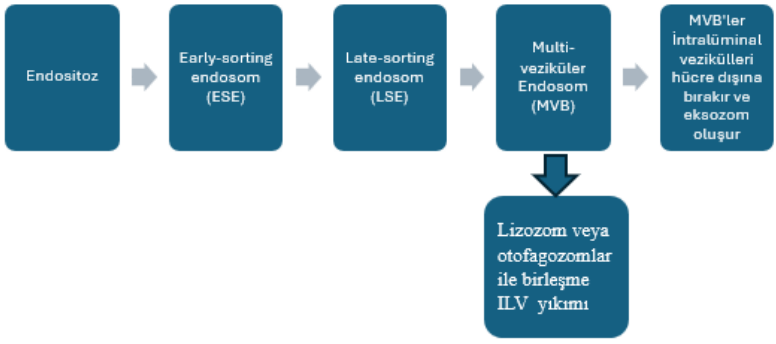
İmmunoafinite Kromatografisi (IAC): Yüksek özgüllük, eksozomları yakalamak için antikorlar kullanır, yüksek saflık ve verim sunar, ancak pahalı olabilir [4]

Bu verilen yöntemler eksozomları saflaştırmak için kullanılabilecek örneklerden bazıları ve sıklıkla tercih edilenleridir. Karakterizasyon aşaması ise ISEV (uluslararası ekstraselüler veziküller derneği) tarafından iki tip proteine odaklanılması önerilmiştir. Bu proteinler sırasıyla GPI bağlantılı proteinler ve eksozomlarda bulunan sitozolik proteinlerdir[5] biyolojik sıvılardan elde edilen Eksozomları üç şekilde tanımlanabilir. Bunlar; Eksozomların TEM ile morfolojilerinin belirlenmesi, NTA (nanopartikül izleme analiz cihazı) ile boyutlarının belirlenmesi ve Eksozomlar yüzey proteinlerinin immün-blot (Western-Blot) ile tanımlanmasıdır. Karakterizasyon ise iki türde yapılmaktadır, bunlar iç (örneğin, membran proteinleri, lipid raftı) ve dış (genellikle morfoloji ve parçacık boyutu tespiti) karakterizasyonadır. Bu karakterizasyon yöntemlerine ek olarak NP-TRFIA ismi verilen yeni bir yöntem de geliştirilmiştir (2019). Bu yöntem izolasyon adımlarına gerek kalmadan direkt olarak vücut sıvısı veya hücre kültüründeki eksozomları

konjuge antikorlarla tespitine dayanmaktadır, geliştirilen bu yöntem kanserle ilişkili olan proteinlerin tespitinde kullanılmak amaçlı geliştirilmiştir[6]

3. Hücresel yolakları ve oluşum mekanizmaları

Eksozom biyosentezi, plazma zarının çifte içe kıvrılması(invajinasyon) ve hücresel multivesiküler endozomlar (MVB'ler) oluşumunu içeren bir süreçte meydana gelir. İntralüminal veziküller (ILV'ler) içeren MVB'ler daha sonra Eksozomlar olarak salgılanır ve yaklaşık 40-160 nm çapındadır. Plazma zarının ilk içe kıvrımı ile, hücre yüzeyinde yer alan proteinler ve ekstra-selüler ortamdaki çözünebilen proteinleri içeren bir yapı oluşturmaktadır. Bu, yeni bir early-sorting endosom (ESE) oluşmasına yol açar. Oluşan ESE önceden var olan diğer bir ESE ile de birleşebilmektedir. Trans-Golgi ağı ve endoplazmik retikulum 'da ESE oluşumuna ve içeriğine katkıda bulunabilir. ESE daha sonra birden fazla ILV içeren MVB'ler üreten late-sorting endozomlarına (LSE'ler) yol açabilir. Bu süreç, birden fazla ILV (gelecekteki Eksozomlar) içeren MVB'lerin oluşumuna neden olmaktadır. MVB'ler Hücre zarına taşınabilir ve içerisindeki ILV'leri eksozom olarak dışarı salınabilir veya parçalamak için otofagozomlar ya da lizozomlarla birleşebilir.



Ras yolağı ile ilişkili olan Rab GTPase, Sytenin-1, TSG101 (tümör duyarlılık geni 101), ALIX (apoptozla ilişkili bir gen) SNARE [çözünür N-etilmaleimid'e duyarlı faktör (NSF)] bağlayıcı protein reseptörü] protein

kompleksleri eksozom biyosentezinde önemli bir yer tutmaktadır ancak tam bu protein kompleksinin eksozom biyosentezi ve kökenindeki işlevleri tam olarak aydınlatılmış değildir. Özellikle, Rab ve ESCRT proteinlerini içeren fonksiyon kaybı veya kazanımı deneylerinin, otofaji ve lizozomal yollar gibi çeşitli hücre içi veziküler aktiviteleri bozması muhtemeldir aynı zamanda Golgi aygıtı kaynaklı vezikül trafiği gibi eksozom biyosentezini dolaylı olarak etkileyebilir.[7]

4. Eksozom Mühendisliği

İstenilen özelliklere sahip ya da eksozom mühendisliği ile sahip olabilecek Eksozomlar; hedefe yönelik ilaç taşıma, aşı geliştirme, gen terapisi, kanser teşhisi ve tedavisi, doku rejenerasyonunda ümit verici bir manipülasyon aracı olarak değerlendirilmektedir. Biyomedikal eksozomların elde edilmesinde genelde iki tip strateji kullanılır. Bu stratejiler pre-izolasyon eksozom mühendisliği ve post- izolasyon eksozom mühendisliği altında toplanır. Pre-izolasyon eksozom mühendisliği terapötik molekülleri eksozom lümenine veya membran yapısına genetik mühendisliği yöntemleri ile entegre etme metodunu kullanır, post izolasyon eksozom mühendisliği ise click kimyası(2022 Nobel kimya ödülü), gizleme(cloaking), biyo-konjugasyon, sonikasyon, ekstrüzyon ve elektroporasyon gibi metotları kullanır[8].

Eksozom mühendisliğinde kullanılan teknikler neler yükleneceği ve neresinin hedefleneceğine göre değişkenlik göstermektedir Eksozomlara yük yükleme stratejileri arasında inkübasyon, transfüzyon, fiziksel işlemler ve in-situ sentez gibi çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemler aşağıda listelenmiş olup kısaca anlatılmıştır.

İnkübasyon: İstenen yüklerin eksozomlar veya eksozom salgılayan hücrelerle inkübe edilerek yüklerin eksozomlara difüzyon yoluyla girmesini sağlanır. Bu yöntem, basit ve kullanımı kolaydır ancak yüklemenin kontrol edilmesi zor olabilmekte ve buna bağlı etkinlik sınırlı olabilmektedir. Küçük

moleküller, nükleik asitler, proteinler ve nano materyaller bu stratejiyle eksozomlara yüklenebilmektedir.

Transfeksiyon: Elde var olan hücrelere vektörler aracılığı ile elde edilmek istenen proteinin veya moleküllerin genetik materyallerini aktarımı ve aşırı ifade edilmesi işlemidir. Örneğin, miRNA-122'in hepatoselüler karsinom tedavisinde kullanılabilmesi için Mezenkimal Kök Hücrelere (MSC'ler) miRNA-122 ifadesini sağlayan bir plazmid ile transfekte edilmiştir. Böylece miRNA-122'ce zenginleştirilmiş eksozomlar elde edilmiştir. Benzer şekilde, BCR-ABL siRNA'sı HEK293(insan embriyonik böbrek hücresi) hücrelerine edilmiş ve kronik miyeloid lösemi hücrelerini hedefleyen siRNA'larca zengin eksozomlar elde edilmiştir.

Fiziksel işlemler, eksozom zarında mikro gözeneklerin oluşturulmasını veya zar rekompozisyonunu sağlayarak kargoların eksozomlara girmesini sağlayarak yüklenmiş eksozomlar elde etmeyi sağlar. fiziksel işlemler sonikasyon, elektroporasyon, ekstrüzyon, donma-çözülme, yüzey aktif madde işlemi ve diyaliz olarak ayrılabilmektedir

Sonikasyon, eksozom zarının bütünlüğünü zayıflatmak için ek bir mekanik kesme kuvveti uygulayan fiziksel bir stratejidir. Bu, ilaçlar, proteinler ve nanomalzemeler de dahil olmak üzere eksozomal kargoların yüklenmesini teşvik eder. Örneğin, pankreas kanser hücresinden gelen eksozomları gemcitabin ile karıştırıp karışımı sonikasyona tabi tutuldu ve membranın yenilenmesi sonucunda, gemcitabin yüklü eksozomlar toplandı. Benzer şekilde, paclitaxel gibi diğer kemoterapötik ilaçlar da basit inkübasyon stratejilerine kıyasla sonikasyonla daha yüksek yükleme kapasitesi ile eksozomlara yüklenebilir. Ayrıca, katalaz ve altın nanopartiküller de sonikasyon yoluyla eksozomlara yüklenebilmektedir.

Elektroporasyon, zarın geçirgenliğini artırmak için eksozom zarında mikro gözenekler oluşturan ek bir elektriksel şok ile kargoları eksozomlara yükleme stratejisidir. Elektroporasyon yöntemi ile birçok ilaç, nükleik asit ve

nanomalzeme eksozomlara yüklenebilir. İlaçların, ilaçların inkübasyon yoluyla eksozomlara yayılabilmesine rağmen, elektroporasyon ile yüklenme verimliliği önemli ölçüde artırılabilmektedir. Elektroporasyon ayrıca doğrudan nükleik asitlerin ve nanomalzemelerin eksozomlara yüklenebilmesi için de kullanılmaktadır.

Ekstrüzyon, eksozomlar ve kargo karışımını bir ekstrüder içinde sıkıştırarak zar rekompozisyonu indükleyen fiziksel bir işlemdir. Ekstrüzyon sonucunda, homojen bir şekilde kargo yüklü eksozomlar elde edilir. Bu strateji, kargo yükleme verimliliği açısından oldukça etkilidir, ancak eksozomun yüzey yapısının rekompozisyonu, eksozomun immün sistemi elamanlarınca yabancı antijen olarak tanımlanmasına neden olabilmektedir.

Hızlı donma-çözülme işlemi, lipozom oluşumu için iyi bilinen bir rekonstrüksiyon prosedürüdür. Son zamanlarda, bu yöntemin eksozomlar için de uygulanmaya başlandığı bildirilmiştir. İlaçlar, katalaz çözeltisiyle karıştırılarak ve karışım tekrarlayan donma-çözülme döngüleriyle işlendiğinde, katalaz yüklü eksozomlar etkili bir şekilde elde edilebilir. Bu strateji ayrıca lipozomların eksozomlarla birleştirilmesi için de uygulanabilir. Ancak, tekrarlayan donma-çözülme verim düşüklüğüne neden olabilmektedir.

Yüzey aktif maddeler(sülfektanlar), eksozom yüzeyinde gözenekler oluşturmak için uygulanır ve bu da zarın geçirgenliğini artırır. Ancak, yüzey aktif maddelerin kargoları bozabileceği ve terapötik etkileri etkileyebilme potansiyeli vardır.

Diyaliz, istenen kargoların hipotonik diyaliz aracılığıyla eksozomlara yüklenmesi sürecidir.

In-situ sentez, nanomalzemeleri eksozom yüzeyine veya içine yüklemek için kullanılan bir yöntemdir. Örneğin, dentritik hücrelerden elde edilen eksozomlar, doxorubicin ile yüklenmiş daha sonra bu eksozomlar altın nanopartiküllerle kaplanarak membran proteinlerinin aracılığıyla altın nanopartiküllerin eksozom yüzeyinde kendiliğinden büyümesi sağlanmıştır.

Benzer şekilde, eksozomlar içinde Pb(kurşun) nano-sheetsleri sentezlenmiştir. Bu yöntemin başlıca avantajı, eksozom bütünlüğünün korunmasıdır.[9].

Bu yöntemlerle oluşturulmuş eksozomların hedef hücrelere gidebilmesi için birtakım modifikasyonlar geçirmesi şarttır bu modifikasyonlar eksozomları hücre veya doku spesifik haline getirebilme potansiyeli kazandırır. Bu modifikasyonlar genel olarak gerekçesi ile aşağıda kısaca değinilmiştir.

Hedefleme ligandları: eksozomların membranlarına onları belirli bir doku ve hücreye özgü ligand proteinleri eklenebilir bu sayede Eksozomlar RES(Retiküloendotelyal Sistem) e yakalanmadan ilgili doku ve hücrelerle buluşması amaçlanmaktadır.

Yüzey modifikasyonları: Eksozom zar yapısına, kan dolaşımı veya diğer karşılaşacağı dış etmenlere karşı dirençli haline getirmek için yapı eklenme işlemidir.

İçerik modifikasyonu: Eksozomların içerisine yüklenen moleküllerin türü, etkinliği, yoğunluğu gibi etkenler terapötik etkinliği arttıracak şekilde değiştirilip optimal hale getirme işlemidir[10].

5. Eksozomların Biyomedikal Alanlarda Kullanımı

5.1 SARS-CoV2

COVID-19 viral partikülleri ile enfekte olmuş ve enfekte olmamış hücreler arasındaki iletişimden sorumlu eksozomların olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu nedenle, eksozomların COVID-19 enfeksiyonu bulaş, hücreler arası yayılım ve yeniden enfeksiyon üzerine rol oynadığı düşünülmektedir. Mezenşimal kök hücrelerden elde edilen eksozomlar ve iyileşen dokulardan elde edilen eksozomlar, COVID-19'un tedavisinde umut verici bir strateji olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, mRNA yüklenmiş eksozomlar, SARS-CoV-2 bağışıklığını indüklemek ve mikroRNA taşıyarak sitokin fırtınasını hafifletmek için kullanılabileceği de ortaya konmuştur.[11]

5.2 Diyabet

Eksozomların diyabetik yaraların iyileşme sürecini ve gecikmiş iyileşmeyi etkileyen faktörlerde önemli bir rol oynadığı kanıtlanmıştır. Diyabetik yaraların iyileşme sürecinde Eksozomlar, fibroblastlar, makrofajlar, keratinositler ve endotel hücreleri arasındaki sinyalizasyonu gerçekleştirmekte ve yara iyileşmesinde birbirini takip eden inflamasyon 'dan proliferasyon sürecine geçişte anahtar rol oynadığı tespit edilmiştir. . Ek olarak, anjiyogenezi ve kolajen birikimini teşvik edip inflamasyonu inhibe ederek diyabetik yaraların iyileşmesini hızlandırmaktadır. Diyabetik yaraların iyileştirilmesinde eksozomal proteinler, miRNA'lar, lncRNA ve circRNA'nın moleküler mekanizmaları da ayrıca önemlidir. Bu yaraların iyileşmesinde eksozomların çeşitli harici kremler ve pansumanlarla kombinasyonu ve uygulanması umut verici bir yaklaşım olarak görülmektedir[3, 12].

5.3 Kanser

Tümör kaynaklı eksozomlar, kanserli doku hücrelerinden salınarak kanserin yayılmasına ve ilerlemesine katkı sağlamaktadır aynı zamanda pre-metastatik niş oluşturup kemoterapi ilaçlarına direnç gelişiminde rol alabilmektedir. Örneğin hipoksi(oksijen yetersizliği) durumunda kanserli hücreler eksozomların salımını teşvik edip invazivliğini arttırıcı etkileri olabilir. Bu tümör kaynaklı eksozomların immün sistemi baskılamasının nedeni ise Fas-L, STAT3, PGE2, PDL1, TGF-Beta, IL3, NKG2D gibi immün baskılayıcıları taşımasıdır. Yapılan bir çalışmada tümörle ilişkili genleri, metilasyon profilinin değiştirilmesi ve TLR(tool like receptor) ligandları gibi immün güçlendiriciler ile manipüle edebilir ya da siRNA/miRNA' lar eksozomlara yüklenerek ilgili genlerde susturma yapılabilmektedir. Ayrıca tümör kaynaklı eksozomlar ısı şok proteinleri olarak bildiğimiz proteinleri(örn. HSP90, HSP70, HSP4) bol miktarda içerdiği raporlanmıştır. Bu Eksozomlar fareler üzerinde denendiği zaman güçlü bir immün yanıt oluşturmuş ve bu özelliğiyle eksozomların kanser tedavilerinde immün cevap oluşturmak için

kullanılabileceği görülmüştür. Tüm bunların yanı sıra akıllı ilaç taşıma sistemlerinde kullanılabilecek bir aday konumundadır. Örneğin güçlü bir anti-kanser ajanı olan kurkumin eksozomlar yolu ile hücre ve dokulara bozulmadan taşınabilir ve antikanser etkisini gösterebilir. [13].

5.4 Nörodejeneratif hastalıklar

Bahsedildiği üzere Eksozomlar birtakım moleküller taşır bunlar: miRNA, lncRNA, circRNA… gibi moleküller olabileceği gibi protein gibi büyük makromoleküller de olabilmektedir. Rastogi ve ekibinin yaptığı araştırma sonucunda sağlıklı insanlardan alınan tükürük sıvısı ve çalıştıkları hasta gruplarının(Alzheimer, Parkinson, ALS, Huntington hastaları) tükürük sıvısı içerisindeki eksozomların belirli biyobelirteçleri taşıdıkları bulunmuştur. Bu biyobelirteçlerden bazıları şunlardır;

Alzheimer: eksozom membranı A beta, lümende Lactoferrin, APP, Amyloid beta, Parkinson ile ortak paylaşılan AChE, Tau miRNA

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS): SOD1, TDP 43

Hunhington: mHtt

Parkinson:DJ-1, alfa-Syn ve Alzheimer ile ortak paylaşılan AChE, Tau miRNA

Bu bahsedilen biyo-belirteçlerden daha niceleri farklı vücut sıvıları için de keşfedilmiştir ancak nörodejeneratif hastalıkların birçoğunda tanı BOS sıvısı alınarak konulduğu için hem hastalar hem de hekimler için pek istenen bir yöntem değildir. Tükürük sıvısı içerisindeki bu belirteçler, hastalığın erken tanısı ve tedavisi açısından oldukça ümit vericidir[14].

Özetle eksozomlar; gen terapisi, ilaç taşıyıcısı, hastalıklar için birer biyobelirteç olabilirler. Hastalıklara direnç kazandırmak için aşı çalışmalarında kullanılabilirler. Diğer viral vektörler gibi antijen sunumu yapmadıkları için immün sistem tarafından zarar görmemeleri, çeşitli ligandlar ile modifiye edildikten sonra hücre spesifik hale gelebilmeleri ve kurkumin örneğinde olduğu gibi vücut içerisinde yarı ömürleri az olan maddeleri hem koruyup hem

de ilgili yerlere ulaştırarak aktif bir şekilde ilacın amacını yerine getirebilmesini ve diğer sayılamayacak pek çok avantajlarından dolayı halen güncel bir konu olarak çalışılmaya devam etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Van Hoof, A. and R. Parker, *The Exosome.* Cell, 1999. 99(4): p. 347-350.
2. Urbanelli, L., et al., *Signaling Pathways in Exosomes Biogenesis, Secretion and Fate.* Genes, 2013. 4(2): p. 152-170.
3. Chung, I.-M., et al., *Exosomes: Current use and future applications.* Clinica Chimica Acta, 2020. 500: p. 226-232.
4. Zhang, Y., et al., *<p>Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications</p&gt.* International Journal of Nanomedicine, 2020. Volume 15: p. 6917-6934.
5. Théry, C., et al., *Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines.* J Extracell Vesicles, 2018. 7(1): p. 1535750.
6. Islam, K., et al., *A Nanoparticle-Based Approach for the Detection of Extracellular Vesicles.* Scientific Reports, 2019. 9.
7. Kalluri, R. and V.S. LeBleu, *The biology, function, and biomedical applications of exosomes.* Science, 2020. 367(6478): p. eaau6977.
8. Jafari, D., et al., *Designer Exosomes: A New Platform for Biotechnology Therapeutics.* BioDrugs, 2020. 34(5): p. 567-586.
9. Fu, S., et al., *Exosome engineering: Current progress in cargo loading and targeted delivery.* NanoImpact, 2020. 20: p. 100261.
10. Malekian, F., et al., *Exosome engineering for efficient and targeted drug delivery: Current status and future perspective.* The Journal of Physiology, 2023. 601(22): p. 4853-4872.
11. Aljuhani, A., et al., *Exosomes in COVID-19 infection: Focus on role in diagnosis, pathogenesis, immunity, and clinical trials.* Cell Biol Int, 2023. 47(6): p. 1049-1067.

12.Li, D. and N. Wu, *Mechanism and application of exosomes in the wound healing process in diabetes mellitus.* Diabetes Research and Clinical Practice, 2022. 187: p. 109882.

13.Taghikhani, A., et al., *Engineered Tumor-Derived Extracellular Vesicles: Potentials in Cancer Immunotherapy.* Frontiers in Immunology, 2020. 11.

14.Rastogi, S., et al. *The Evolving Landscape of Exosomes in Neurodegenerative Diseases: Exosomes Characteristics and a Promising Role in Early Diagnosis*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. 22, DOI: 10.3390/ijms22010440.

BÖLÜM 8

TARIMSAL BİYOİNFORMATİK: SÜRDÜRÜLEBİLİR VE İKLİM DEĞİŞİKLİĞİYLE BAŞA ÇIKMA YOLUNDA STRATEJİK GELİŞMELER

Yüksek Biyomüh. Aybüke OKAY[12]

Prof. Dr. E. Sümer ARAS[13]

Prof. Dr. İlker BÜYÜK[14,*]

DOI: https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.12707338

[12] Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye
[13] Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye
[14] Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye
*Sorumlu Yazar: Prof. Dr. İlker BÜYÜK; buyuki@ankara.edu.tr

1. Giriş

Enformatik bakış açısı, hücresel biliş, fizyolojik durumların moleküler temsilleri, genom mimarisi, genom ifadesinin algoritmik doğası ve evrimde genomun yapılandırılması hakkında yeni kavramların geliştirilmesine katkı sağlar. Bu gelişmeler, moleküler biyolojinin santral dogmasının detaylandırılması ile birlikte birçok radikal keşiften yararlanmıştır [1]. James Watson ve Francis Crick'in DNA'nın çift sarmal yapısını keşfetmelerinin ardından moleküler biyolojideki anlayışımız hızla gelişmiş ve santral dogma daha da zenginleştirilmiştir. İnsan Genom Projesi sonrası bireysel genom dizilimleri yerini yüksek verimli teknolojilere bırakmıştır. Elde edilen büyük miktardaki verinin depolanması, biyolojik ağların yapılanması ve analizi hesaplamalı biyoloji yöntemleri ile özel veri tabanlarının kullanımını gerektirmiştir [2].

Biyolojik ağların yapılanması ve analizinde iki model temel oluşturur; Watts-Strogatz modeli, kompleks ağların özelliklerini inceleyerek biyolojik ağların işlevlerini daha iyi anlamamıza yardımcı olur. Ölçütlü büyüme ilkesine dayanan Barabási-Albert modeli ise biyolojik ağların evrimini açıklamada önemlidir. Bu modeller özellikle gen düzenleyici ağları, protein etkileşim ağlarının oluşumunu ve evrimini anlamamıza yardımcı olur [3, 4]. Bu yaklaşımlar biyom, etkileşim, mikrobiyom gibi "omes" olarak adlandırılan büyük ölçekli biyolojik ağların inşasıyla sonuçlanan özellikle biyoinformatik de dahil olmak üzere birçok bilimsel alana uygulanmıştır.

Biyoinformatik ise genomik, transkriptomik, proteomik, metabolomik, mikrobiyomik gibi pek çok büyük biyolojik veri kümelerini analiz etmek ve bu verilerden anlamlı bilgilere ulaşmak için bilgisayar bilimi, istatistik ve mühendislik tekniklerini kullanır (Şekil 1) [5]. Dizi analizlerinde, moleküllerin biyolojik ağlarının belirlenmesi, karmaşık hücresel süreçlerin genetik ve biyokimyasal yollarının oluşturulması, düzenlenmesi ve sistematikleştirilmesi için biyoinformatik yaklaşımlar benimsenmelidir. Çalışmaların ürünleri olarak

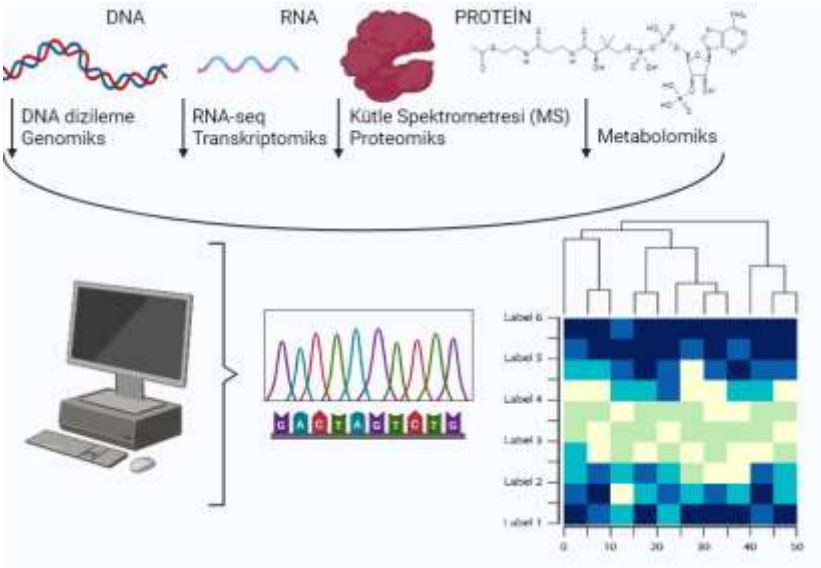
elde edilen DNA dizileri, düzenleyici RNA'lar, proteinler, ikincil metabolitler, gen ifadesi verileri, fiziksel ve işlevsel olarak birbirine bağlı olabilen diğer küçük moleküller de dahil olmak üzere birçok farklı veri türünü entegre eder. Fiziksel ve işlevsel olarak birbirine bağlı olan hücresel süreçlerin moleküler ağlarının inşası ve organizasyonu ancak simülatif, yinelemeli ve model odaklı biyoinformatik yaklaşımların kombinasyonu uygulanarak gerçekleştirilebilir. Bu biyolojik ağlar, hücresel süreçlerin karmaşık bağlantılarını analiz etmek ve görselleştirmek için kullanışlıdır. Modern sistem biyolojisinin merkezi bileşeni olan nöronal ağlar, besin ağları, türler arası / tür içi etkileşim ağları gibi diğer biyolojik ağların anlaşılmasına da yardımcı olur. "Omes" ile ilgili ağlara örnek olarak Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi (KEGG), BioCyc veritabanı koleksiyonu, Braunschweig ENzyme DAtabase (BRENDA), Reactome, Comparative Toxicogenomics Database (CTD) ve diğer birçok biyolojik ağ verilebilir [5].

Bitkiler de yukarıda değinilen sistem ve yolakları içeren organizmalar olup genetik çeşitlilikleri sayesinde doğaya özgü çok sayıda biyolojik ağa sahiplerdir. Bu çeşitliliklerini ise belirli bir stres etkenine karşı yanıt verirken, farklı genler tarafından düzenlenen çoklu yolların aktifleştirilmesi sayesinde kazanmışlardır. Karmaşık çevresel sinyal ağları, özellikle stres durumlarında farklı moleküler mekanizmaları etkinleştirme yeteneği ile dikkat çeker [6-8]. Yüksek sıcaklık, soğuk hava, kuraklık, tuzluluk ve su baskını gibi abiyotik stres faktörleri bitki büyümesini ve mahsul verimini belirgin bir şekilde etkileyebilmektedir. Bu nedenle, abiyotik stres yönetimi tarımda karşılaşılan temel zorluklardan biridir [9-12]. Mevcut iklim değişikliği senaryoları altında, abiyotik stres faktörlerine maruz kalma sıklığı artmaktadır. Hızla artan dünya nüfusu nedeniyle gıda arzının sürdürülebilir hale getirilmesi son derece önemli ve popüler bir konu haline gelmiştir. Yapılan kapsamlı araştırmalar, abiyotik stres yanıtlarının moleküler temellerini anlama, stres toleransına sahip, gelişmiş ve verimli bitkilerin geliştirilmesine odaklanmaktadır [13-15]. Bu faaliyetler,

stres koşulları altında bitki organizasyonu ve işlevselliği üzerine moleküler araştırmaları teşvik etmek için temel stratejiler sunan yeni omik teknolojileri ve omik destekli ürün iyileştirme yaklaşımları tarafından ciddi bir destek görmektedir [16, 17]. İlk oluşturuldukları andan itibaren bu yaklaşımlar, genomik seviyeden transkriptomik, proteomik ve metabolomik seviyelere kadar değişen hücresel düzeylerde beklenmedik iç görülere imkan tanımıştır. Ayrıca son zamanlarda epigenomik yaklaşımlar sayesinde kromatin organizasyonu üzerine yapılan araştırmalar da pek çok bilgi sunmuştur [18, 19]. Farklı biyolojik işlevsellik seviyelerini kapsayan bu yaklaşımlar, bitkilerin moleküler tepkilerinin karmaşıklığını ve abiyotik stresleri incelemek için her seviyede daha derin araştırmalara ve entegre görüşlere olanak sağlamıştır [20-22]. Ayrıca teknolojik evrim ve ucuz metodolojiler içeren araştırmaları destekleyen daha hızlı ve daha erişilebilir yaklaşımlar sürekli kendini yenilemeye devam etmektedir [23, 24].

"Yeni Nesil Dizileme" (NGS) teknolojileri gibi önemli örnekler, bitki genom organizasyonu ve çevresel değişkenlik ile ilişkili mekanizmalar hakkında daha derin bilgilerin elde edilmesine olanak sağlayarak gen ifadesinin en temel seviyesi olan transkriptom analizini aydınlatmıştır. Bu, ifade edilen dizi etiketleri (EST'ler) ve mikroarray tabanlı tekniklerden, RNA-seq ve benzeri güçlü yaklaşımlara geçişi teşvik etmiştir. Aynı şekilde, proteomik prosedürlerde 2D-jellerin kullanımından kütle spektrometresine (MS), ardından LC-MS (sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi) ve GC-MS (gaz kromatografisi-kütle spektrometresi) gibi metabolomik teknolojilerin geliştirilmesi ile incelenen biyolojik süreçlerin daha iyi anlaşılmasına katkılar sağlanmıştır [25-27]. Bu bağlamda farklı moleküler bilgi seviyelerinden elde edilen sonuçların entegrasyonu ile bitkilerin olumsuz veya değişen çevresel koşullara tepki verirken etkin olan karmaşık moleküler süreçleri çözümlemek için bütüncül bir bakış açısının elde edilmesi mümkün hale gelmiştir [28, 29].

Biyoinformatik bu noktada, farklı omik teknolojilerinin bir araya gelmesiyle elde edilen bilginin organizasyonu ve veri madenciliği için temel bir araç haline gelmiştir. Biyoinformatik; yüksek verimli teknolojiler tarafından üretilen büyük miktardaki bilginin etkili bir şekilde yönetilmesini ve yorumlanmasını sağlar. İnsan gözü tarafından işlenmesi zor olan büyük veri kümelerinin anlamlı bilgilere dönüştürülmesiyle bilim camiasına geniş bir perspektif sunar. Bu sayede, biyolojik sistemlerin işlevselliği hakkında daha kapsamlı bir anlayış elde etmek mümkün olur. Ayrıca biyoinformatik, çeşitli omik teknolojiler ve dizi karşılaştırmaları gibi analizleri destekleyen çok çeşitli kaynakların kullanımını teşvik ederek öncü araştırmaların gelişimine katkı sağlar [30, 31]. Biyoinformatik kaynaklar, araştırma alanlarının başarısı ve omik teknoloji evriminin ana itici güçleri arasındadır. Çünkü verilerin erişilebilir, güvenilir ve karşılaştırılmaya uygun hale getirilmesi bütünleştirici biyoinformatik ile mümkündür [32]. Veri kullanımı, günümüzde hala farklı veri kaynaklarının sunduğu olanaklar, kısıtlamalar, çeşitli teknolojilerin hassasiyeti ve özgüllüğü ile düzenlenen sonuçların kalitesi gibi faktörlere dayanmaktadır. Ek olarak uzman olmayan kullanıcılar, biyolojik sistemlerin organizasyonu ve işlevselliği hakkında yeni bilgiler elde etmek için mevcut kaynaklardan gelen verileri etkili bir şekilde ele almak, analiz etmek ve karşılaştırmak için bu alandaki temel bilgilere sahip olmalılardır [33, 34].



Şekil 1. Biyoinformatik; genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi pek çok büyük biyolojik veri kümelerini analiz etmek ve bu verilerden anlamlı bilgilere ulaşmak için bilgisayar bilimi, istatistik ve mühendislik tekniklerini kullanır. BioRender ile çizilmiştir (https://www.biorender.com/)

2. Biyolojik Bilgi Yönetimi ve Hesaplamalı Biyoloji

Biyolojik örneklerin nano ölçekteki incelemelerinden büyük ölçekli araştırmalara kadar geniş bir yelpazede incelenebilmesine olanak tanıyan teknolojiler ve cihazlar, benzeri görülmemiş miktarda dijital veri üretmektedir. Bu veri bolluğu, insan beyninin işleyemeyeceği kadar büyüktür. Bu nedenle verilerin etkili bir şekilde işlenmesi ve bağlamsallaştırılması için hesaplamalı yöntemlere giderek daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır. ***Biyoinformatik, biyolojik bilgiyi incelemek için bilgisayar bilimi, istatistik ve mühendislik alanlarının kavramlarını ve yöntemlerini kullanır.*** Biyoinformatik iki ana kategoriye ayrılabilir: biyolojik bilgi yönetimi ve hesaplamalı biyoloji. Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH) (http://www.bisti.nih.gov/) ilk kategoriyi, "biyolojik, tıbbi, davranışsal veya sağlık verilerinin kullanımını genişletmek için bu tür verilerin elde edilmesi, temsil edilmesi, tanımlanması, depolanması, analiz edilmesi veya görselleştirilmesi dahil olmak üzere hesaplama araçlarının ve yaklaşımlarının araştırılması, geliştirilmesi veya uygulanması'' olarak

tanımlamaktadır. İkinci kategori ise "biyolojik sistemlerin incelenmesinde veri analitiği ve teorik yöntemlerin, matematiksel modellemenin ve hesaplamalı simülasyon tekniklerinin geliştirilmesi, uygulanması'' olarak tanımlanır. Bu kategorilerin sınırları ise gün geçtikçe daha fazla kaynaşmıştır [35]. Farklı omik yaklaşımlardan büyük miktarlarda veri üretilirken zenginleştirilmiş bu bilgilere kolayca erişilebilmesi, verimli bir şekilde bütünleştirilebilmesi için güçlü ve bilgilendirici biyoinformatik araçlara olan ihtiyaç giderek artmıştır. Bu nedenle genlerin, proteinlerin ve metabolitlerin araştırılması için temel platformlar oluşturulmuştur. Bu alan ise ***Veri Entegrasyonu ve Madenciliği*** (***Data Integration and Mining)*** olarak tanımlanmıştır [36].

2.1. Biyolojik Kodun Şifresi: Sekans Analitikleri

Tüm genom dizilimi, bakterilerden insanlara kadar değişen canlılarda; tıp, tarım, biyoteknoloji ve temel araştırmalar gibi biyolojide artan çeşitli kullanım durumları için giderek daha rutin bir teknik haline gelmiştir. Farklı genomlardan elde edilen diziler, karşılaştırmalı analizler aracılığıyla evrimsel tarihçenin çeşitli zaman ölçeklerinde incelenmesine olanak tanır. Birçok türün dizilenmesi ile popülasyonların genetik yapısı belirlenmiş ve polimorfizmler arasında ilişkiler kurulmuştur [37-39].

İnsanlar, çiftlik hayvanları, bitkiler ve patojenler de dahil olmak üzere binlerce genom, farklı tamlık seviyelerinde dizilenmiştir. Başlangıçta yüksek maliyetleri nedeniyle Sanger yöntemi, genellikle mikroorganizmalarla (küçük genomlara sahip olanlar) ve bilimsel açıdan özel ilgi gören türlerle sınırlı kalmıştır. Model bitki türü olan *Arabidopsis thaliana*, 2001 yılında yaklaşık 100 milyon dolarlık bir maliyetle dizilenen ilk bitki olmuş ve onu 2005 yılında pirinç izlemiştir. Yeni nesil dizileme (NGS) teknolojilerinin gelişimiyle birlikte zaman içerisinde yüzlerce türün dizisi çıkarılmıştır [40-42].

Yeşil algler dahil olmak üzere bitkilerin çeşitliliği büyük bir genomik karmaşıklık sergiler [43, 44]. Yeşil alglerin genomları yaklaşık 10 megabayt (Mb) büyüklüğünde olurken kara bitkilerinin genomları 60 Mb ile 150 gigabayt

(Gb) arasında değişen büyüklüklerde bulunur. Bu, insan genomundan yaklaşık 50 kat daha büyük olduğunu gösterir [45-47].

Poliploidizasyon, bitki genomlarının evriminde sıkça karşılaşılan bir olaydır. Bu durum, bir organizmanın genetik materyalinin iki veya daha fazla kopyasını içermesi anlamına gelir. Bu tür genom genişlemeleri, bitkilerin farklı çevresel koşullara uyum sağlamalarına yardımcı olabilir ve hatta kitlesel yok olma olaylarına karşı bir tür sigorta işlevi görebilir [48]. Transpozonlar, genlerin yerini değiştiren veya çoğaltan DNA parçalarıdır. Bu tür aktiviteler de bitki genomlarının büyümesine katkıda bulunabilir. Sonuç olarak bu mekanizmalar bitki genomlarının genişlemesini sağlarken doğru orantılı olarak bitki evriminin karmaşıklığını da artırır [49].

Bir genom dizilemenin tamlığı ve doğruluğu kullanılan teknolojilere, kaynaklara ve amaçlarına bağlıdır. *Arabidopsis thaliana* genomu, bitki türleri için bir referans haline gelmiştir. Bu genom, çok hücreli bitkiler için küçüktür (yaklaşık 125 megabayt) ve beş kromozomun tamamı (organel genomları dahil) neredeyse eksiksiz bir şekilde bir araya getirilmiştir. Kısa okumalı yeni nesil dizileme (NGS) tekniklerinin geliştirilmesi, bitki genomlarının sayısında hızlı bir artışa yol açmış ancak başlangıçta veri kalitesinde bazı düşüşlere neden olmuştur. Ancak gelişen dizileme teknolojileri (örneğin Pacific Biosciences, Oxford Nanopore), kromatin yakalama yöntemleri ve yeni bilişim yaklaşımları gibi gelişmeler genomun tamlığı ve doğruluğunda önemli iyileşmelere yol açmıştır [50-52].

Arabidopsis gibi iyi çalışılmış organizmalarda, protein kodlayan genlerin büyük bir kısmına Gen Ontolojisi (GO) kullanılarak işlevsel açıklamalar eklenmiş durumdadır. Dolayısıyla bu genlerin yarısından fazlası, deneysel verilere dayalı açıklamalara sahiptir. Ancak daha az araştırılmış bitki türlerinde (örneğin patates, şeker pancarı, adzuki fasulyesi gibi) genlerin işlevlerini tanımlayan GO açıklamalarının kapsamı %60'ın altında kalmıştır ve birçok türde genlerin işlevleri için yetersiz deneysel veri bulunmaktadır [53-55]. Bu

durum, iyi çalışılmış bitki türlerinden bilgi aktarmanın mümkün olduğu, ancak bu türlerden önemli ölçüde farklılaşan bitki türlerinde, homoloji temelli işlev tahminlerinin daha az güvenilir olabileceği anlamına gelir. Bununla birlikte birçok araştırmacı, verilerini etkili bir şekilde analiz etmek için gerekli hesaplama becerilerine ve biyoinformatik bilgisine erişim eksikliği yaşamaktadır. Bu nedenle, günümüzde bilim insanları için ana zorluklardan biri, veri üretmekten ziyade bu verileri etkili bir şekilde analiz etmektir [56].

Birçok bitki türü, örneğin Arabidopsis ve pirinç gibi, tür içi genetik çeşitliliği incelemek amacıyla büyük veri setleriyle araştırılmıştır. Popülasyon düzeyinde genetik dizilemelerin kullanılması, bitki ıslahı, türlerin korunması ve tanımlanması gibi çeşitli alanlarda giderek daha yaygın hale gelmiştir. Ancak bir türün tam genomunu anlamak için, spesifik bireylere özgü olabilen bölgeleri içeren yüksek kapsama alanına sahip dizilemelere hala ihtiyaç vardır [57]. Bunun ötesinde, bu verilerin doğru bir şekilde temsil edilmesi ve analiz edilmesi için hesaplama modelleri, mevcut araçlara kıyasla hala geliştirilmeye açıktır. Referans kalitesindeki genom dizilerinin sayısı arttıkça, bu modellerin standart hale gelmesi muhtemeldir. Genomik verilerin gelecekteki araştırmalar için kullanılabilirliği, bu verilerin uygun bir biçimde yayınlanmasına bağlıdır. Nükleotid dizilerinin merkezi havuzları, örneğin INSDC (International Nucleotide Sequence Database Collaboration), genom odaklı veri tabanları (örneğin Ensembl Plants ve Phytozome) ve türe özgü kaynaklar (örneğin Arabidopsis Bilgi Kaynağı) gibi kamuya açık veri tabanları bu nedenle büyük bir öneme sahiptir [58-61].

Son zamanlarda, herhangi bir türde elde edilen bilimsel verilerin FAIR ilkesine (Bulunabilir, Erişilebilir, Birlikte Çalışabilir ve Yeniden Kullanılabilir) uygun olması gerektiği vurgulanmaktadır. Ayrıca bilim dünyasında, bilimsel bilgilerin tekrar üretilebilirliği açısından artan bir endişe bulunmaktadır. Bu, bilim projelerinin her aşamasında iyi uygulamaların önemli olduğu anlamına gelir [62]. Özellikle biyolojik araştırmalar giderek daha fazla veriye dayalı hale

geldikçe, sadece geleneksel bilimsel makalelerin değil, aynı zamanda verilerin de erken aşamalarda (uygun destekleyici meta verilerle birlikte) yayınlanmasının önemli olduğunun her geçen gün altı çizilmektedir [63].

2.2. Dijital Hazine Avı: Veri Keşifleri

Organize bir veri koleksiyonu; şemaları, sorguları, raporları, görüntüleri ve diğer nesneleri toplamayı amaçlayan veri tabanları olarak adlandırılır. Veri tabanlarındaki bilgilere erişim "veri tabanı yönetim sistemi" (VTYS) olarak adlandırılan entegre bir bilgisayar yazılımı seti tarafından sağlanır [3]. VTYS, kullanıcıların veri tabanlarında bulunan tüm verilere erişmesini sağlar. Bu sistemlerin veri tanımı, girişi, depolanması, güncellenmesi, yönetimi, modelleme (hiyerarşik ve ağ modelleri), kümeleme, sorgu dilleri, sorgu optimizasyonu ve görselleştirme algoritmaları gerektiren organize bir şekilde büyük miktarlarda bilginin alınması için genel işlevlere sahip olmaları gerekmektedir [3]. Bu nedenle veri tabanlarının geliştirilmesi önemli ölçüde biyoinformatik araçlara, ilerlemelere, araştırmalara ve uygulamalara bağlıdır. Biyolojik veri depolama ve organizasyonunun tüm yönlerini kapsayan çok sayıda farklı türde veri tabanı mevcuttur. GenBank (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), DDJB (DNA Data Bank of Japan) gibi bazı veri tabanları birincil nükleotid dizisi veri tabanlarına aittir. Entrez, mGen, Metascape gibi diğer birçok veri tabanından derlenen verileri içeren meta veri tabanları da vardır. Bazıları ise, örneğin TAIR (The Arabidopsis Information Resource), p53 Bilgi Bankası (p53), bitki alternatif ekleme veri tabanı (PASD), bitki sekretomu ve alt hücresel proteom bilgi tabanı (PlantSecKB) gibi bir organizasyona özgü olanlar gibi özel veri tabanlarıdır [3]. Tüm veri tabanları veri tanımı, kullanımı, formatı ve erişim türü bakımından farklılık göstermektedir.

Elde edilen verilerin astronomik birikimi, bunların ifade profilleri, depolama, organizasyon, sistematikleştirme, biyolojik ağlara ve veri tabanı sistemlerine entegrasyonu, araştırma topluluğu tarafından geniş kullanımı;

bilgisayar programlama algoritmalarını, analiz araçlarını, hizmetlerini ve iş akışı sistemlerini gerektirmiştir. Bu nedenle, yazılım ve analiz araçları ortaya çıkışından bu yana biyoinformatiğin ana alanları ve temel hedefleri olmuştur. Çeşitli biyoinformatik şirketlerinin veya kamu kurumlarının katkılarıyla, biyoinformatik yazılımları ve araçları basit komut-satır araçları olarak var olmaya başlamış ancak sonrasında daha karmaşık grafik programlara, bağımsız paketlere ve web hizmetlerine dönüşmüştür. Moleküler analizler için ilk biyoinformatik yazılım ve analiz araçlarının geliştirilmesinden bu yana, birçok ücretsiz ve açık kaynaklı yazılım aracı geliştirilmiştir. Genomik bilimlerde kaydedilen ilerleme, büyüme ve gelişme ise halen hızla devam etmektedir [3].

Paylaşım modellerinin ve web erişim araçlarının geliştirilmesi, kullanıcıların internet aracılığıyla kendi bilgisayar sistemlerinden bu verilere erişmeleri, biyoinformatik alanının ilk hedeflerinden birisidir. Simple Access Protocol (SOAP) [123] ve Representational State Transfer (REST) web hizmetleri sağlamak için kullanılan iki biyoinformatik araçtır [64, 65]. SOAP, aslen Microsoft tarafından geliştirilen standart tabanlı bir web hizmeti erişim protokolüdür. Çok basit web servis erişimi sağlayan REST, SOAP ile ilgili sorunları gidermek için geliştirilmiştir [66]. Her iki araç da HTTP protokolü üzerinde benzerlikler paylaşsa da mimari tarzı ve esnekliği bakımından farklılık gösterir [67]. "Dizi Arama Hizmetleri" (SSS) "Çoklu Dizi Hizalama" (MSA) ve "Biyolojik Dizi Analizi" (BSA) gibi birkaç temel biyoinformatik hizmetleri de bulunmaktadır [68]. Bu web hizmeti tabanlı biyoinformatik analiz kaynakları, bağımsız veya web tabanlı ara yüz veri analiz araçlarının yanı sıra bütünleştirici, dağıtılmış ve genişletilebilir biyoinformatik iş akışı yönetim sistemlerinin (BWMS) bir koleksiyonunu temsil eder. BWMS'ler, biyoinformatik analizlerde bir dizi etkileşimli hesaplama veya veri manipülasyon adımını (yani bir iş akışını) oluşturmak ve yürütmek için özel olarak tasarlanmıştır. Bu tür sistemler biyolojik verilerin etkileşimli analizini sağlar, analiz için özel iş akışları oluşturur, analiz çıktılarının gerçek zamanlı

olarak görselleştirilmesini sağlar ve bilim insanları arasında iş akışlarının paylaşılması ile yeniden kullanılması sürecini basitleştirir. Bu hizmeti veren platformlardan bazıları Galaxy, UGENE ve Taverna'dır. Biyoinformatikte kullanılan veri tabanları, genetik verilerin depolanması ve yayılması için standartlar sunar ve araştırmacıların büyük miktarda veriyi kolayca aramalarını ve analiz etmelerini sağlar. Bu, yeni ilaçların keşfi ve genetik hastalıkların anlaşılması gibi birçok alanda önemli keşiflere yol açar. Ayrıca özellikle bitki biyoinformatik veri tabanları bitki geliştirme, biyolojik çeşitlilik çalışmaları ve bitkilerin çevresel tepkileri hakkında önemli bilgiler sağlar.

Biyoinformatiğin klasik verileri arasında genlerin veya tam genomların DNA dizileri ve proteinlerin amino asit dizileri gibi yapılar yer almaktadır. Dolayısıyla "-omik" veri akışları içeriğinde transkriptomik, DNA'dan RNA sentezi modeli, proteomik, proteinlerin hücrelerdeki dağılımı, interaktomik, protein-protein ve protein-nükleik asit etkileşimlerinin modelleri, metabolomik, hücrelerde aktif olan biyokimyasal yollar tarafından küçük moleküllerin dönüşümlerinin doğası ve trafik modellerini de barındırır. Örneğin veriler hücre tipine, veri toplama zamanlamasına (hücre döngüsü sırasında veya günlük, mevsimsel veya yıllık değişimler), gelişim aşamasına ve çeşitli dış koşullara bağlı olarak değişebilir. Metagenomik ve metaproteomik, bu ölçümleri bir kova okyanus suyu veya bir toprak örneği gibi çevresel herhangi bir örnekteki organizmaların kapsamlı bir tanımını sağlar. Genom dizileme teknolojileri, son derece etkili bir şekilde gelişmektedir. 1999 yılında, tüm nükleik asit dizilerini içeren arşivler toplamda 3.5 milyar nükleotid içeriyordu ki bu, tek bir insanın genomunun uzunluğuna yaklaşır. Ancak 10 yıl sonra, bu arşivler 283 milyardan fazla nükleotidi içermekte idi ve bu da yaklaşık olarak 95 insan genomunun uzunluğuna eşdeğerdir. ABD Ulusal Sağlık Enstitüleri, bir insanın genomunu dizileme maliyetini düşürme hedefini ortaya koymuştur. Bu hedef, DNA dizilemesinin hastaneler, klinikler, tarımsal araştırmalar gibi pek çok alanda daha uygun maliyetli ve pratik bir araç haline

getirmeyi amaçlamaktadır. Dolayısıyla biyoinformatik, biyolojide veri üretim süreçleri tarafından yönlendirilmektedir.

3. Verilerin Elde Edilmesi

3.1. DNA Veri Bilimi: Genomiks

Son yıllarda, özellikle yeni nesil dizileme tekniklerinin kullanılmaya başlamasıyla birlikte, genom dizileme yöntemleri önemli ölçüde gelişti ve tüm genom shotgun (WGS) yöntemleri, BAC-by-BAC yaklaşımlarına göre daha yaygın hale geldi [69]. Sanger tekniğine kıyasla daha ucuz ve hızlı olan yüksek verimli teknolojilerin kullanılması ile milyarlarca DNA dizisi parçası aynı anda dizilenerek erişilebilir hale getirilmiştir. Bu durum, genom dizilemenin daha geniş bir araştırmacı kitlesi için ulaşılabilir olmasını sağlamıştır [70]. Bu gelişme, sınırlı sayıda veya referans model türün dizilenmesinden, farklı türlerin ve genotiplerin çok sayıda genom dizisinin yayınlanmasına doğru ilerleyen çeşitli genom dizileme projelerinin yayılmasını teşvik etmiştir [71]. Bu projeler, genellikle farklı bitki türleri ve genotipleri ile ilişkilendirilen önceden yayınlanmış gen dizilerine açıklamalar ekleyerek aynı türlere veya az araştırılan kladların temsilcilerine dair mevcut kaynakların sayısını artırmıştır. Ortaya çıkan çalışmalar, bitki ıslahı uygulamaları için temel moleküler bilgileri de açığa çıkarmıştır. Bu nedenle, toplanan verilerin işlenmesiyle elde edilen değerli bilgiler, web üzerinden erişilebilen referans kaynakları aracılığıyla ilgili topluluğa sunulmaktadır [72-74].

Bu amaçla, EMBL-EBI sekans koleksiyonu, DDBJ ve INSDC tarafından desteklenen Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) gibi referans merkezleri, dünya çapındaki sekanslama projelerinin sonuçlarını bir araya getirerek araştırmacılara önemli bir hizmet sunmaktadır [61, 75-77]. Bitki türleri içinde bazı ana referans siteleri oluşturulmuştur. Bunlar arasında Ensembl Plants, PlantGDB ve Phytozome genomik verilerin madenciliği, görselleştirilmesi ve analizi için bütünleştirici kaynaklar olarak en sık

kullanılan platformlar arasında yer almıştır [59]. Farklı amaçlara yönelik olarak, dahil edilen türler ve sunulan hizmetler açısından daha özelleşmiş diğer platformlar da bulunmaktadır. Örneğin Plaza, bitki gen ve genom evrimini araştırmak için faydalı bilgiler sunan bir karşılaştırmalı genomik kaynaktır. TreeGenes ise çok sayıda bitki türü için genomik ve fenomik bilgileri düzenler. Gramene, bitkilerde ve model bitki türlerinde karşılaştırmalı fonksiyonel genomik için düzenlenmiş bir veri kaynağıdır [78-84]. Türe özgü veri tabanları da bulunmaktadır. Örneğin, *Arabidopsis thaliana'ya* özgü veri tabanı Arabidopsis Bilgi Kaynağı'dır (TAIR) [60]. Özel platformların önemli örnekleri, ürün bitkilerine (örneğin domates, patates, patlıcan ve biber gibi) ve endüstri ilişkili Solanaceae bitki ailesine odaklandıkları için öne çıkmaktadır. Son yıllarda, bu bitki ailesinin moleküler düzeydeki bilgileri büyük ölçüde geliştirilmiştir. Bu bağlamda, Sol Genomics Network (SGN), Solanaceae ve benzer bitki türlerine odaklanan bir veri tabanı olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca Solanaceae ailesinin bir üyesi olan patatesin genom verileri için bir referans kaynağı olarak kabul edilen Spud veri tabanı da büyük öneme sahiptir. Diğer özel kaynaklar arasında MaizeGDB, Baklagil Bilgi Sistemi ve Soybase bulunmaktadır [80, 82, 83]. Bu faaliyetlerin yaygınlaşması nedeniyle ilgili tüm bitki genom kaynaklarını düzenlemek için paralel çabalar devam etmektedir [85-87]. Genellikle, farklı kaynaklardan gelen genom derlemeleri ve gen açıklamaları arasındaki bu çeşitlilik, sağladıkları sonuçların kalitesi ve güvenilirliği açısından önemli bir sorun teşkil eder. Bu çeşitlilik, genom dizileme teknolojilerinin hızla gelişen performansının bir sonucu olarak ortaya çıkar. Ortaya çıkan teknolojiler, uygun maliyetlerle daha fazla sekans verisi üretebilmeyi mümkün kılmıştır. Ancak yeni genom dizilerinin hızlı bir şekilde üretilip yayımlanması, kaliteli referanslar oluşturulmasını etkileyebilir. Ayrıca yeni veya güncellenmiş genomların sürekli olarak piyasaya sürülmesi, sonuç analizlerinin yürütülmesinde daha düşük verimlilikle sonuçlanabilir [87]. Biyoinformatik, hızla gelişen yeni teknolojilere ayak uydurmalı ve her türlü

analiz için güvenilir bilgi paylaşımını desteklemelidir. Bu durum hem tek tür analizlerinde hem de çoklu tür karşılaştırmalarında daha fazla verinin karmaşıklığıyla başa çıkmak anlamına gelir. Örneğin, genom montajlarının kalitesinin net bir şekilde değerlendirilmesi gereklidir ve gen açıklamaları uyumlu hale getirilmelidir. Ayrıca özellikle protein kodlayan bölgelerin doğru tahminlerinin önemli olduğu durumlarda, gen tabanlı karşılaştırmalı analizler ve genler arası ilişkileri belirlemek, ortolog veya paralog ilişkilerin tanımlanması için uygun yöntemler kullanılmalıdır [87, 88]. Biyoinformatikteki büyük veri sorunuyla başa çıkmak için yeni stratejiler geliştiriliyor olsa da bilgi kalitesinin değerlendirilmesi ve güvenilir referans kaynaklarının yaygınlaştırılması için daha uzun vadeli çalışmalar ve doğrulamalar gerekmektedir. Bu çabalar, elde edilen bilgilerin bilimsel topluluklar arasında paylaşılmasını ve daha sonra verimli bir şekilde kullanılmasını desteklemeyi hedeflemektedir [71].

Güvenilir ve istikrarlı referans kaynakları, transkriptomik, epigenomik, proteomik ve metabolomik gibi ilişkili kaynaklardan elde edilen verilerin etkili bir şekilde kullanılabilmesi için temel öneme sahiptir [89]. Diğer bir zorluk, genlerin işlevselliğini tam olarak tanımlamak veya analizleri entegre etmek için gerekli olan uygun bilgi eksikliğidir. GO gibi kuruluşlar, gen işlevlerinin uygun tanımını sağlamak ve analizi entegre etmek için çeşitli çabalar göstermektedir. Ancak açıklamalar genellikle mevcut gözlemlerle sınırlıdır ve belirli bir organizma türü hakkında daha fazla bilgi elde etmek için sürekli gelişmeye ihtiyaç duyar [90].

Bilgiye dayalı koleksiyonlar, genellikle benzer içerikle ilişkilendirilse de farklı kaynaklardan elde edilen bilgilerin mevcut olması nedeniyle başka bir çeşitlilik kaynağı oluşturabilir [88, 89]. Örneğin, NCBI Gen veri tabanı gibi birden fazla veri kaynağından elde edilen gen spesifik bilgilerin bir koleksiyonunu ele alalım. Bu veri tabanında "abiyotik stres" anahtar kelimesiyle yapılan bir sorgu, "abiyotik stres" kelimelerini içeren geniş bir gen

listesiyle sonuçlanır. Aynı sorguyu NCBI Refseq veri tabanında yaptığımızda bu veri tabanı yedekli olmayan ve iyi açıklanmış dizi setleri ile entegre ve küratörlü koleksiyonlar sunar [91]. Spesifik olmayan anahtar kelimelerin aramayı saptırabileceği, "tuz stresi" veya "kuraklık stresi" gibi daha filtrelenmiş anahtar kelimeler kullanmanın daha uygun olacağı göz önüne alındığında, farklı sonuçlar aynı referans sitesinin farklı bilgi parçaları sağlayabileceğini göstermektedir. Elbette, iki sorgu sonucu arasındaki tutarsızlıkları haklı çıkaran teknik açıklamalar vardır, bunlar esas olarak uzmanlar tarafından da açıklanan ve iyi bilinen özellikleriyle ilgilidir. Farklı kaynaklardan gelen muğlak bilgiler uzman olmayanların kafasını karıştırarak sonraki analizleri tehlikeye atabilir. Ayrıca bitki türleri arasındaki sonuç farklılıkların bir örneği, özellikle *Arabidopsis thaliana* türünün abiyotik stresle ilgili gen sayısının diğer türlerle karşılaştırıldığında daha az olmasıdır. Bu tür farklılıklar, gen işlevlerinin referans modellerden diğer bitki türlerine aktarılması için karşılaştırmalı çalışmaların hala oldukça önemli olduğunu göstermektedir. Biyoinformatik ayrıca bitki iyileştirmeleri için yeni zorlukların ele alınmasında önemli bir rol oynamaktadır [92]. Son bir örnek olarak genom düzenlemesi amacıyla abiyotik streslere karşı dayanıklılığı artırmak veya özelliklerini iyileştirmek isteyen çalışmalarda kullanılan CRISPR/Cas9 yöntemi, uygun biyoinformatik araçları ve genetik bilgileri kullanmaktadır. Bu amaçla, E-CRISP, TIDE, CHOPCHOP ve CCTop gibi çevrimiçi araçlar geliştirilmiş ve CRISPR/Cas9 hedeflerini tahmin etmek ve seçmek için araştırmacılara yardımcı olan yazılımlar sunulmuştur [93-97].

3.2. Gen İfade Haritası: Transkriptomiks Veriler

Abiyotik ve biyotik stresler, ürünlerin büyümesini ve verimliliğini etkileyen dünya çapında gıda krizine yol açan en zararlı faktörlerdir. Kuraklık, tuzluluk, sıcak, soğuk, donma, besin, yüksek ışık yoğunluğu, ozon (O3) ve anaerobik stresler başlıca abiyotik streslerdir [16]. Abiyotik streslerin yanı sıra, bitkiler patojenlerin (bakteriler, mantarlar, virüsler ve nematodlar dahil) ve

otçul zararlıların neden olduğu biyotik streslerle de yüzleşmek zorundadır [98]. Son çalışmalar, artan sıcaklıklar gibi abiyotik streslerin patojenlerin yayılmasını kolaylaştırabileceğini ve bitkilerin savunma mekanizmalarını zayıflatabileceğini göstermiştir [99, 100]. Strese karşı direnci artırmak için çeşitler ve mutant hatlar geliştirilmektedir [101, 102]. Farklı dokular ve gelişim aşamaları strese karşı farklı dirençler gösterdiğinden, çeşitli çevresel stres koşulları altında farklı dokuların, türlerin ve gelişim aşamalarının transkriptom profilinin çıkarılması, bitkilerin strese nasıl yanıt verdiğine dair moleküler mekanizmalar hakkında bilgi sağlayabilir [103, 104].

Transkriptom verilerinin karşılaştırılması, genellikle farklı koşullarda ve dokularda nasıl çalıştığını anlamak amacıyla gen işlevselliği ve ifade mekanizmalarını incelemek için sıkça kullanılmaktadır [105]. Transkriptomik veriler, bitkilerin abiyotik streslere yanıt verirken hangi süreçlerin etkilendiğini anlamak ve gen ifadesini kontrol eden düzenleyici mekanizmaları keşfetmek amacıyla büyük bir öneme sahiptir. Bu mekanizmaları çözümlemek amacıyla, genellikle mikroarray ve RNA dizileme (RNA-seq) analizleri gibi yöntemlerle büyük ölçüde transkriptom düzeyinde araştırmalar yapılmaktadır [106, 107]. Mikroarray teknolojisi, biyolojik bir örneğin transkripsiyonel mekanizmasını keşfetmek için sık kullanılan yaklaşımlardan biri olmuştur [108]. *A. thaliana* için GeneChip ATH1 Genome Array'in geliştirilmesiyle, yaklaşık 24.000 gen için prob setleri tasarlanmış ve bitki bilimlerinde mikroarray analizlerinin kullanımı yaygınlaştırılmıştır [109]. Bu referans dizi, birden fazla doku ve koşuldan elde edilen sonuçların toplanmasını ve Arabidopsis için gen ekspresyon atlaslarının düzenlenmesini kolaylaştırmıştır. Bu da gen koekspresyon analizlerini destekleyen kaynaklarda yararlı hesaplama stratejileriyle ilişkilendirilmiştir.

ArrayExpress Arşivi ve Gen Expression Omnibus (GEO), şu anda mevcut olan fonksiyonel genomik verilerin ana kamu koleksiyonlarıdır. Bu iki platform "abiyotik stres" anahtar kelimeleriyle sorgulanması sonucunda

yapılmış pek çok deneyin verilerini araştırmacılara sunar [110, 111]. İfade edilen dizi etiketleri (EST'ler), rastgele seçilen tamamlayıcı DNA (cDNA) kütüphanelerinden elde edilen dizilerdir. dbEST, NCBI'da bulunan özel bir GenBank bölümüdür ve farklı organizmalardan kamuya açık olan tüm EST koleksiyonlarını içerir. Şu anda viridiplantae (yeşil bitkiler) kategorisinde "abiyotik stres" anahtar kelimesi ile yapılan bir sorgulama sonucunda, toplamda 77 farklı kütüphaneye ait olan 221.400 EST içeren veriye erişilmesi mümkündür. Yani dbEST, abiyotik stresle ilgili pek çok farklı bitki türünden elde edilen EST verilerini içermektedir [112]. Son yıllarda, ifade edilen dizi etiketleri (EST'ler) yerini, bir hücredeki veya belirli bir dokudaki farklı koşullarda bulunan RNA'yı tanımlamak ve ölçmek için kullanılan daha ucuz ve güçlü tekniklere bırakmıştır [113, 114]. RNA-seq teknolojisi, analiz edilen organizmanın genom bilgisini gerektirmez ve yüksek verimliliği sayesinde mikrodizi teknolojisine göre transkriptom içeriğini daha tutarlı bir şekilde belirleyebilir [113-117]. RNA-seq, gen/izoform ifade seviyelerini mikroarray teknolojisinden daha yüksek çözünürlükte ölçebilen ve kodlama-transkript profilinin yanı sıra uzun kodlamayan RNA (lncRNA) profilini de sağlayan devrim niteliğinde bir araçtır [114]. Son zamanlarda, RNA-seq kullanılarak yapılan küresel transkriptom profilleme analizlerinin tuz, sıcak, soğuk, kuraklık, ışık, ozon, aşırı bor ve patojen enfeksiyonu gibi çevresel streslere yanıt olarak farklı şekilde ifade edilen lncRNA'ları, kodlama genlerini ve alternatif olarak eklenmiş izoformları tanımladığı bildirilmiştir [118-120].

NCBI Sequence Read Archive (SRA) ve Gene Expression Omnibus (GEO), dünya genelindeki çeşitli Yeni Nesil Dizileme (NGS) çalışmalarından elde edilen verileri bir araya getirmek için kurulmuş bir referans kaynağıdır. Bu veriler, farklı NGS platformlarından, örneğin Illumina Genome Analyzer, Applied Biosystems SOLiD System, Roche 454 GS System gibi teknolojilerden gelmektedir. SRA, dünya genelindeki NGS çalışmalarından gelen verileri toplar ve halka açık bir koleksiyon sunar [121-124]. "Abiyotik

stres" anahtar kelimesi ile yapılan sorgulama sonucunda, şu anda SRA'da onlarca bitki türüne ait veri bulunmaktadır.

Genel referans kaynaklarına ek olarak yıllar içinde EST tabanlı kaynaklardan ifade verilerini ve ilgili araçları toplamak ve yaymak amacıyla türe veya kladlara özgü veri tabanları oluşturulması için çeşitli çabalar gösterilmiştir. Ancak bu kamu kaynaklarından hiçbiri sadece bitkilerin abiyotik streslere verdiği tepkilere odaklanmış değildir [125]. Birçok transkriptomik çalışma, özellikle yüksek verimli dizileme teknolojileri ve hatta hücresel düzeyde RNA'nın belirlenmesi için daha gelişmiş yöntemlere dayanan, kodlamayan RNA'ların keşfine odaklanmıştır. Bu çalışmalar, birçok bitki türünde, özellikle abiyotik stres altındayken bitki dokularında bulunan kodlamayan RNA'ların fizyolojik, patolojik veya stres koşullarında oynadığı aktif rolü vurgulamıştır [126]

Şu anda RiceSRTFDB [127], STIFDB2 [128], PASmiR [129], QlicRice [16], PhytAMP [130] ve PSPDB [131] gibi bitki stresi için oluşturulmuş halka açık birkaç veri tabanı bulunmaktadır. Bunlar arasında RiceSRTFDB ve STIFDB2 mikroarray verileriyle düzenlenmiş ve transkripsiyon faktörlerine odaklanmıştır. PASmiR'nin geliştirilmesi abiyotik strese duyarlı miRNA'ya dayanmaktadır. PSPDB, biyotik ve abiyotik stres verileri ile oluşturulmuştur. PRGdb 2.0 veri tabanı, yalnızca bitkilerin direnç genleriyle ilişkili olan RNA-seq verilerini toplamıştır. Ancak postgenomik dönemde RNA-seq, bitkilerin genetik bilgisini daha kapsamlı bir şekilde çözmemize yardımcı olur. Bu teknoloji, bitki biyologlarının, lncRNA'ları (uzun kodlamayan RNA'ları), kodlayan genleri ve çeşitli yanıt mekanizmalarını içeren, geniş bir transkriptom profili oluşturmalarına imkan tanır. Bu da bitkilerin moleküler mekanizmalarını, biyotik (canlı organizmalar kaynaklı) ve abiyotik (canlı olmayan faktörler kaynaklı) olaylara nasıl yanıt verdiği hakkında yeni bilgiler elde etmelerine yardımcı olur. Küçük RNA koleksiyonları RFAM ve miRbase veri tabanlarında halka açık olarak bulunurken, bitkiye özel diğer platformlara

örnek olarak plantDARIO ve PsRobot verilebilir. Ayrıca sadece bitkilerin abiyotik streslere verdiği tepkilere odaklanan özel smallRNA koleksiyonları da mevcuttur [132-135].

3.3. Hücresel Yapıları Aydınlatmak: Proteomiks

Enzimler ve proteinler, hücrelerin düzgün çalışması için temel öneme sahiptir. Bitkilerin abiyotik streslere nasıl yanıt verdiği konusunda proteinlerin katkısı büyük bir rol oynar. Çünkü proteinler, bitkilerin çeşitli çevresel koşullara uyum sağlamasına ve bu koşullara tepki vermesine yardımcı olur. Bu sebeple bitkilerin belirli bir çevresel stresle başa çıkma yeteneklerini saptamak, bu proteinlerin işlevi ve katkılarını anlamak önemlidir [136]. Proteomik, bitkilerdeki proteinlerin çalışma şekillerini incelemek için güçlü bir araçtır. Proteinlerin işlevini, kimyasal değişikliklerini, birbirleriyle nasıl etkileşimde bulunduğunu ve bitki metabolizması üzerindeki moleküler etkileri anlamak için kullanılır. Bu sayede, bitkilerin çeşitli koşullara nasıl uyum sağladığı ve bu koşullara nasıl tepki verdiği daha iyi anlaşılır [137]. Proteomik çalışmalar, bitki hücrelerinde abiyotik stresleri veya bu streslerin hafifletilmesinden sorumlu proteinleri tanımlayarak hücresel mekanizmaların daha ayrıntılı bir şekilde anlaşılmasına yardımcı olur. Bu çalışmalar sayesinde, bitkilerin çevresel streslere nasıl yanıt verdiği ve bu streslere nasıl uyum sağladığı konularında daha fazla bilgi edinilir [138]. Stres altındaki bitkilerde karşılaştırmalı proteomik analizler, bitkilerin protein etkileşim ağlarındaki elemanların belirlenmesine yardımcı olur. Bu sayede bitkilerin, stres altındayken veya normal koşullarda nasıl yanıt verdiği ve bu yanıtların moleküler düzeyde nasıl işlediği daha iyi anlaşılır [139].

Proteomik çalışmaların başlangıcında, proteinlerin ayrılması için iki boyutlu jel elektroforez yöntemi olan 2D-jel kullanılmaktadır. Daha sonra, bu ayrılan proteinlerin analizi için kütle spektrometresi (MS) kullanılmıştır [140]. Yakın dönemde, MS platformlarının sunduğu olanakların tamamını kullanma amacıyla "shotgun proteomik" adı verilen bir yaklaşım geliştirilmiştir. Bu

yöntemde, protein karışımları önce daha küçük peptitlere parçalanır ardından sıvı kromatografi (LC) ve tandem kütle spektrometresi (MS/MS) ile ayrıştırılıp analiz edilir [141]. Son olarak, bu dizilenmiş peptitler, IDPicker ve PAnalyzer gibi çeşitli biyoinformatik araçlar kullanılarak, potansiyel olarak bir organizmanın tüm proteinlerini tanımlamak için bir araya getirilir [141-143].

Çeşitli bitkilerde, örneğin *Arabidopsis thaliana*, buğday (*Triticum aestivum*), mısır (*Zea mays*), pirinç (*Oryza sativa*), soya fasulyesi (*Glycine max*), yağlı tohumlu kolza (*Brassica napus*), patates (*Solanum tuberosum*), domates (*Solanum lycopersicum*) gibi, streslere verilen tepkileri incelemek amacıyla geniş kapsamlı proteomik çalışmalar yapılmıştır [144-148]. Bu çalışmalar, hücresel sinyal yolaklarında, transkripsiyon faktörlerinde ve protein-protein etkileşimlerinde bulunan proteinlerdeki dinamik değişikliklere odaklanmıştır. Aynı zamanda, farklı genotipler, çevresel stres türleri ve şiddeti, proteinlerin hücre içindeki konumu, proteinlerin post translasyonel modifikasyonları (PTM'ler) gibi çeşitli faktörlerin önemini açıkça göstermiştir. Bu araştırmalar, stresle ilişkilendirilen bileşiklerin ve süreçlerin üretimine katkıda bulunan bir dizi protein ve enzimi tanımlamaya olanak sağlamıştır [145]. Yapılan çalışmalar biriktikçe bitki türlerinde abiyotik strese hassas ve strese duyarlı çeşitlerde uyum mekanizmaları incelenmiştir. Elde edilen verilerin protein sentezi, enerji (glikoliz), fotosentez, sinyal iletimi ve bitki savunma tepkileri gibi protein ve amino asit sentez mekanizması ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu bulunmuştur [149]. Bu mekanizmaların ortaya çıkarılmasındaki büyük proteom verilerini toplamak ve erişilebilir kaynakları düzenlemek için ise genel bir zorluk vardır. Genomik veya transkriptomik gibi diğer yaklaşımlarla karşılaştırıldığında, proteomik verilerin depolanması ve yayılmasına yönelik kamu kaynakları, özellikle homojen koleksiyonların tasarımını çok zorlaştıran farklı veri türleri ve deneysel prosedürlerin çeşitliliği nedeniyle hala zayıftır [150, 151]. Proteomik çalışmalarında, protein modifikasyonlarına olası hedeflerin sayısı ve protein etkileşimlerinde meydana

gelen değişiklikler gibi pek çok farklı sinyal çeşidi bulunmaktadır. Bu nedenle, özellikle peptit montajı ve ardından proteom rekonstrüksiyonu gibi aşamalarda, analitik yöntemlerin ve biyoinformatik iş akışlarının çeşitliliği ile ilgili istatistiksel analizler gerekmektedir. Bu çeşitlilik, proteomik veri madenciliği ve yorumlama araçlarının daha karmaşık hale gelmesine neden olmaktadır [150, 152-154].

Proteomik çalışmalarında, bilgilendirici ve güvenilir sonuçlar elde etmek önemlidir. Ayrıca tipik bir "shot-gun" proteomik deneyinde tanımlanmamış çok sayıda parçalanma spektrumu bulunur ve bu tanımlanmamış spektrumların büyük bir kısmı beklenmeyen protein değişikliklerinden veya doğal peptit farklılıklarından kaynaklanabilir [151]. Bu nedenle, proteomik verilerin analizinde çok sayıda faktörü göz önünde bulundurmak gereklidir. Sonuç olarak, proteomik verilerin analizi büyük bir yatırım, altyapı ve koordinasyon gerektirir. PAPPSO proteomik platformu, bu zorlukları aşmak için teknolojik gelişmelere katkıda bulunmuştur. Bu amaçla, LC-MS hizalama, pik çıkarma ve algılama (MassChroQ; [155]) gibi çeşitli araçlar geliştirilmiştir. Ayrıca protein izoformları ve post translasyonel modifikasyonlar (PTM'ler) gibi peptitlerin tanımlanması ve gruplandırılması (X! TandemPipeline; [156]) için araçlar oluşturulmuştur. Arabidopsis proteom haritası gibi girişimler, protein birikimi, modifikasyonları (örneğin fosforilasyon), düzenlemeleri, lokalizasyonları ve termal stabilite hakkında kapsamlı bilgiler sunarak önemli bir kaynak sağlamaktadır [157, 158].

Proteomik verileri için başlıca açık veri tabanları arasında ProteomicsDB [159], PRoteomics IDEntifications (PRIDE) veri tabanı [160], PeptideAtlas [161] ve Global Proteome Machine Database (GPMDB) [162] yer almaktadır. PRIDE, bugüne kadar bitki türleri üzerinde çok sayıda proteomik deney içeren bir veri tabanı olmuştur ve verilerin büyük bir kısmı çevresel stresle ilişkilidir. GPMDB de bitki türlerinden proteomik veriler içerir, ancak web ara yüzü verileri sorgulamak için uygun değildir bu nedenle abiyotik stresle ilgili mevcut

deney sayısını belirlemek zordur. İki diğer referans kaynağı olan Peptidome [163] ve Tranche [164], finansman eksikliği nedeniyle sürekliliğe sahip değildir ve proteomik alanında veri paylaşımının ve sürdürülmesinin zorluklarını vurgular. Bitki Proteomik Veri Tabanı (PPDB [165]), sınırlı bir şekilde Arabidopsis ve mısır çalışmalarına odaklanmasına rağmen, çeşitli proteomik deneyler ve araçlar içermektedir. Özellikle, ozon, soğuk ve kuraklık gibi belirli abiyotik stres türlerindeki özgül proteinleri aramak ve almak için kullanışlıdır [165].

Belirli bazı protein sınıflarına odaklanan özel veri tabanları da bulunmaktadır ve kamuya açık olarak kullanılmaktadır. Bu veri tabanları arasında örneğin, ARAMEMNON bulunur ve hem tek çenekli bitkiler (mısır, muz, pirinç, brakipodium vb.) hem de çift çenekli bitkiler (Arabidopsis, kavak, üzüm, domates, misk kavunu vb.) için stresle ilgili integral membran proteinlerin tanımlanmasını sağlar [166]. Son olarak proteom çalışmalarında hücre altı lokalizasyon ve post-translasyonel modifikasyonlarla ilgili iki önemli hususu ele alan kaynaklar da geliştirilmiştir. Bitki hücre altı proteom veri tabanları plastid (Plprot, [239]) ve hücre duvarı (WallProtDB, [241]) seviyelerinde bilgi sunsa da abiyotik streslere özgü peptitler için özelleştirilmiş aramalara olanak tanımazlar. Bitki fosforilasyon veri tabanı ise (P3DB, [167]), altı farklı bitki türünde (Arabidopsis, kolza tohumu, soya fasulyesi, yonca, pirinç ve mısır) stres kaynaklı fosforlanmış proteinlerin değişikliklerini inceleme imkanı sunar [168].

3.4. Biyolojik Kimyanın Sırları: Metabolomiks Araştırmaları

Abiyotik stresler, bitki metabolik profillerini önemli ölçüde etkiler. Bir biyolojik sistemin metabolomu, gen ifadesi ve protein birikimi ile doğrudan ilişkili olarak organizmanın abiyotik streslere tepkisini yansıtır [169]. Organizmanın metabolik değişiklikleri, stres tepkisinin fenotipik etkileri açısından genellikle en ilginç olanlardır. Bu değişiklikler, bitki hücreleri tarafından hassas bir şekilde düzenlenen belirli metabolitlerin varlığı veya

yokluğunda olumsuz bir duruma yanıt olarak metabolizmanın yeniden şekillendirilmesi yoluyla gerçekleşir. Bu nedenle metabolomik analizler, metabolik değişikliklerin belirlenmesine, strese bağlı genler ve proteinler arasındaki ilişkilere dair araştırmacıların çıkarımlarda bulunmasına olanak tanır [170]. Günümüzde metabolomik, bitkilerin abiyotik streslere yanıtını anlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca yüksek verimli tekniklerdeki ilerlemeler metabolomik çalışmaların sayısını artırmıştır. Bitki metabolomu temel olarak uçucu olmayan ve uçucu olabilen iki fraksiyona ayrılır. Uçucu olmayan metabolom, hidroalkolik veya organik çözücüler içindeki bileşikleri içerir. Diğer yandan, uçucu metabolom ise uçucu moleküllerden (genellikle bitki kokularını, uçucu yağları veya uçucu organik bileşenleri) oluşur. Metabolom analizlerinde genellikle iki yaklaşım kullanılır: "hedeflenmemiş" ve "hedeflenmiş" yaklaşımlar. Hedeflenmemiş yaklaşım, deneyin tüm kütle kromatogramlarını işler ve biyolojik sürecin özelliğini yansıtan bir "metabolik parmak izi" elde etmek için çok değişkenli analizler kullanır. Öte yandan hedeflenmiş yaklaşım, bilinen metabolitlerin tespitine, miktarının belirlenmesine odaklanır ve genellikle kamuya açık veya özel metabolomik veri tabanlarını kullanır [171].

Soğuk stresine karşı bitki tepkilerinin ilk metabolomik çalışmaları Arabidopsis'te gerçekleştirilmiş ve metabolomun düşük sıcaklığa yanıt olarak özellikle amino asit, organik asit ve poliamin seviyelerinde kapsamlı bir şekilde yeniden yapılandırıldığını ortaya koymuştur [172]. Daha sonraki çalışmalar ise yine Arabidopsis üzerinde kuraklık metabolit profilinin çıkarılmasıyla devam etmiştir ve bunları takiben çok sayıda veri ortaya konmuştur [265].

Tuzluluk stresinin tarımdaki önemi nedeniyle, Arabidopsis, pirinç, domates, asma, kavak, baklagil ve Lotus gibi çeşitli bitkiler üzerinde strese direnç ve toleransla ilgili bileşikleri ortaya çıkaran ve böylece abiyotik stres tepkileriyle ilişkili aday genlerin tanımlanmasına yardımcı olan birçok metabolomik çalışma gerçekleştirilmiştir [173-177]. Bu çalışmalar bir dizi

şeker, korizmik asit türevleri, fenilpropanoidler (ferulik ve vanilik asitler gibi fenolik asitler) gibi metabolik ürünlerin görevlerini açıklamıştır. Çeşitli araştırmalar neticesinde Arabidopsis, arpa, domates ve adi fasulye gibi bitkilerde metabolomik yaklaşımlardan sıklıkla yararlanılmış karbon, azot, kükürt, fosfat ve karbonhidrat eksikliğinin etkileri analiz edilmiştir [178-180]. Ayrıca yapılan çalışmalar hücre ölümü ve büyüme inhibisyonu süreçlerinin zayıflamasıyla elde edilen oksidatif strese toleransın gelişmiş bir metabolik aktivite kapasitesinden kaynaklandığını göstermiştir [298]. Sıklıkla abiyotik stresin neden olduğu moleküler ve biyokimyasal değişiklikleri belirlemek amacıyla duyarlı ve toleranslı genetik materyaller arasında karşılaştırmalar yapılır. Örneğin, asma anacı genetik materyal olarak kullanılarak yapılan çalışmalarda magnezyum eksikliğinin büyüme ve bitki verimliliği üzerinde büyük etkilere yol açtığı anlaşılmıştır. Bu durum transkriptlerin ve metabolitlerin dramatik değişiklikleri ile ilişkilendirilmiştir. Bu değişiklikler, özellikle hücre duvarı bileşenleri, antioksidanlar, alkaloidler, terpenoidler ve fenilpropanoidler gibi ikincil metabolitleri etkileyerek ortaya çıkmaktadır [181].

Şu anda bitkilerde abiyotik stres tepkileriyle ilgili metabolom verilerini toplayan yalnızca bir web tabanlı platform mevcuttur: MetaboLights [182]. Bu çerçevede, tamamen bitkilere adanmış diğer iki metabolomik kaynak ise Bitki Metabolom Veri Tabanı (PMD) [183] ve PlantMetabolomics.org'dur [184]. Abiyotik stres ve bitki alanına özgü olmasa da değerli ve rutin olarak güncellenen kaynaklar arasında DrugBank, T3DB, SMPDB ve FooDV olmak üzere dört bölümden oluşan ve hem polar hem de polar olmayan bileşikleri içeren, diğer veri tabanlarına (KEGG, PubChem, MetaCyc, ChEBI, PDB, UniProt ve GenBank) köprü bağlantısı olan İnsan Metabolom Veri Tabanıdır (HMD, [185]).

Ayrıca MZmine2 gibi ham veri işleme, pik tespiti, görselleştirme ve biyoinformatik/istatistiksel analizlere kadar MS veri analizine izin veren çok

sayıda modülden oluşan araçlar da bulunmaktadır [186]. WUR'da geliştirilen MetAlign ve MSClust ise, MS çalışmasında tespit edilen iyonları bir dizi işlem (doğru kütle hesaplamaları, taban çizgisi düzeltmeleri, pik toplama, doygunluk ve kütle-pik artefakt filtreleme) sonucunda değerlendiren, ücretsiz olarak kullanıma açık iki yazılımdır [187].

LC/GC-MS platformlarının, çok sayıda bileşiği ölçmek için tipik olarak düşük hassasiyeti vardır ve bu durum metabolitlerin kesin tanımlamalarını zorlaştırabilir. Bu nedenle metabolitlerin doğru bir şekilde tanımlanması için Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) teknolojisi gibi diğer yöntemler tercih edilebilir. Ancak LC-MS ve GC-MS gibi kütle spektrometrisi yöntemleri ile karşılaştırıldığında bu tür platformların tanımlama konusunda bazı sınırlamaları olabilir. Ayrıca ölçülen metabolitler hakkında yeterli biyolojik bilgi olmaması, özellikle bu metabolitlerin hangi fizyolojik süreçlerle ilişkili olduğunu anlamamızı zorlaştırabilir. Mevcut metabolomik veri tabanları, metabolitlerin kimyasal özellikleri hakkında bilgi sağlayabilir ancak bu metabolitlerin hangi biyolojik süreçlerde biriktiği hakkında detaylı bilgi sunmamaktadır. Sonuç olarak metabolit tanımlama süreci, hassas analizler ve biyolojik anlayışların birleşimini gerektirir [188].

4. Bitki Stresleri için Özel Kaynaklar

Bitkilerde stres tepkisine özgü halka açık web tabanlı erişilebilir veri tabanları ve platformlar mevcuttur. Bunlar, farklı seviyelerdeki araştırmalardan elde edilen sonuçları organize etmek ve bilim camiasının kullanımına sunmak için gereklidir. Bu bağlamda Plantstress (**https://plantstress.com**) bitki çevresel abiyotik stresi ile ilgili web tabanlı profesyonel bir kaynaktır. Web sayfası aracılığıyla türlere, gen kimliğine veya işleve göre sorgulama yaparak bilgi aramak mümkündür. Ayrıca veri tabanında yer alan türler arasında paralog veya ortolog genler hakkında bilgi edinmek de mümkündür. Bitki biyolojisindeki referans model için *Arabidopsis thaliana* Strese Duyarlı Gen Veri Tabanı (ASRGD) mevcuttur [189]. Sadece *A. thaliana* ile ilişkili manuel

küratörlü stres tolerans genlerine dayanan, stres tepkileriyle ilgili genlerin halka açık bir koleksiyonunu temsil eder. Bu kaynak, anahtar kelimelerle veya stres türüne göre (yani ozmotik, ısı, vb.) kullanılabilen çok sayıda stres koşulu ve gen içerir. Benzer şekilde, protein düzeyinde The Plant Stress Protein Database (PSPDB) [131], çok sayıda bitki türünü, bitki stres proteinini kapsayan aynı zamanda bitkilerin biyotik ve abiyotik stres baskısı altındaki işlevsel rollerini vurgulayan halka açık bir kaynaktır. Veri tabanından gen, tür, anahtar kelime, atıf, gen aileleri ve taksonomik sınıflandırmaya göre arama yaparak bilgi almak mümkündür. Genel streslere (biyotik ve abiyotik) karşı bitki tepkileri için proteomik alanında bir başka kaynak PlantPReS'tir **(http://www.proteome.ir/)** [190]. PlantPReS, kullanıcı dostu bir ara yüz, arama motoru, gen ontolojisi, çapraz referanslama ve stres tepkisine dahil olan hedef proteinlerin ifade kalıpları gibi çeşitli analiz araçları nedeniyle bitki stres topluluğu için çok değerli bir kaynağı temsil etmektedir.

Ayrıca belirli stres türleri için özel kaynaklar da mevcuttur. Örneğin, DroughtDB **(https://ngdc.cncb.ac.cn/databasecommons/database/id/906)** [191] kuraklık stresi tepkisinde yer alan manuel olarak küratörlü genleri içeren, dokuz model ve mahsul bitkisinde hesaplanmış ortolog genler hakkında ayrıntılı bilgi sağlayan halka açık bir kaynaktır. Diğer taraftan, moleküler ve fonksiyonel roller temelinde özel veri tabanları da oluşturulmuştur. Örneğin, *A. thaliana* ve *O. sativa'da* stres tepkilerini araştırmak için hedeflenen, yüksek verimli deneysel ve hesaplamalı çalışmalar için yararlı olan Stres Duyarlı Transkripsiyon Faktörü Veri Tabanı (STIFDB v.2) [128], şu anda bir HMM modeline dayalı stres duyarlı transkripsiyon faktörü (STIF) algoritması kullanılarak tahmin edilen 38 binden fazla stres sinyali, stres duyarlı gen ve transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi ilişkisine sahiptir. Gen adı, kromozom, transkripsiyon faktörü ve/veya stres sinyaline göre sorgulama yapılabilir. RiceSRTFDB (https://ngdc.cncb.ac.cn/databasecommons/database/id/794) [127], mikroarray deneylerinden elde edilen kuraklık ve

tuzluluk stresi koşulları sırasında gen fonksiyon analizini kolaylaştırmak için ifade kalıpları, cis-düzenleyici eleman ve mutant bilgileri, pirinç transkripsiyon faktörlerini içeren veri tabanıdır. Web sitesi, seçilen genlerin tuzluluk veya kuraklık streslerinde diferansiyel ifadesini kontrol etmeyi sağlayan bir İfade Görüntüleyici sunmaktadır. PASmiR [129], yaklaşık 200 yayınlanmış çalışmadan elde edilen verileri içeren 1000'in üzerinde düzenleyici ilişkiyi temsil eden, bitki abiyotik stresinde miRNA moleküler düzenlemesi hakkında bilgi toplayan bir veri tabanıdır. Sorgulama sistemi miRNA adı, tür ve/veya abiyotik stres türüne göre sorgulama yapılmasına izin verir ve kullanıcı veri tabanında yer alan tüm verileri indirme olanağına sahiptir.

Sonuç olarak biyoinformatik, tarımsal biyoteknoloji alanında son derece kritik bir disiplindir. Genetik bilgiyi işleme, analiz etme, bitki ıslahı, hastalık kontrolü, verim artışı ve gıda üretimi gibi pek çok konuda devrim niteliğinde sonuçlar doğurmuştur. Ayrıca tarımsal biyoteknoloji uygulamalarını hızlandırmak ve optimize etmek için büyük miktarda biyolojik verinin etkili bir şekilde analiz edilmesini sağlamaktadır. Biyoinformatik dolayısıyla temel bir bileşen haline gelerek bitki yetiştiriciliği ve gıda üretimi gibi alanlarda sürdürülebilirliği artırmak için önemli bir araç olarak kabul edilmiştir. Bu disiplin, gelecekteki tarım sektörü için yenilikçi çözümler sunma potansiyeline sahiptir. Tarım endüstrisinin daha verimli, dirençli ve sürdürülebilir hale gelmesine katkıda bulunmaya devam edeceği düşünülmektedir.

Referanslar

1. Shapiro, J.A., *Revisiting the central dogma in the 21st century.* Annals of the New York Academy of Sciences, 2009. **1178**(1): p. 6-28.
2. Chen, J. and G. Coppola, *Bioinformatics and genomic databases.* Handbook of Clinical Neurology, 2018. **147**: p. 75-92.
3. Abdurakhmonov, I.Y., *Bioinformatics: basics, development, and future*. 2016: InTech Rijeka.
4. Shah, V.A., et al., *Applications of bioinformatics in pharmaceutical product designing: a review.* World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2015. **4**: p. 477-493.
5. Ma'ayan, A., *Introduction to network analysis in systems biology.* Science signaling, 2011. **4**(190): p. tr5-tr5.
6. Hirayama, T. and K. Shinozaki, *Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future.* The plant journal, 2010. **61**(6): p. 1041-1052.
7. You, J. and Z. Chan, *ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants.* Frontiers in plant science, 2015. **6**: p. 1092.
8. Potters, G., et al., *Stress drives plant cells to take the road towards embryogenesis.* Floriculture, ornamental and plant biotechnology, 2006: p. 289-294.
9. Cavanagh, C., et al., *From mutations to MAGIC: resources for gene discovery, validation and delivery in crop plants.* Current opinion in plant biology, 2008. **11**(2): p. 215-221.
10. Chinnusamy, V. and J.-K. Zhu, *Epigenetic regulation of stress responses in plants.* Current opinion in plant biology, 2009. **12**(2): p. 133-139.
11. Mittler, R. and E. Blumwald, *Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives.* Annual review of plant biology, 2010. **61**: p. 443-462.

12. Munns, R. and M. Tester, *Mechanisms of salinity tolerance.* Annu. Rev. Plant Biol., 2008. **59**: p. 651-681.
13. Kumar, R., *Role of microRNAs in biotic and abiotic stress responses in crop plants.* Applied biochemistry and biotechnology, 2014. **174**: p. 93-115.
14. Sanghera, G.S., et al., *Engineering cold stress tolerance in crop plants.* Current genomics, 2011. **12**(1): p. 30.
15. Tripathi, A., K. Goswami, and N. Sanan-Mishra, *Role of bioinformatics in establishing microRNAs as modulators of abiotic stress responses: the new revolution.* Frontiers in Physiology, 2015. **6**: p. 286.
16. Suzuki, N., et al., *Abiotic and biotic stress combinations.* New Phytologist, 2014. **203**(1): p. 32-43.
17. Bokszczanin, K.L., S.P.T.I.T.N. Consortium, and S. Fragkostefanakis, *Perspectives on deciphering mechanisms underlying plant heat stress response and thermotolerance.* Frontiers in Plant Science, 2013. **4**: p. 315.
18. Boyko, A. and I. Kovalchuk, *Genome instability and epigenetic modification—heritable responses to environmental stress?* Current opinion in plant biology, 2011. **14**(3): p. 260-266.
19. Matsui, A. and M. Seki, *The involvement of long noncoding RNAs in response to plant stress.* Plant Long Non-Coding RNAs: Methods and Protocols, 2019: p. 151-171.
20. Keller, M. and S. Simm, *The coupling of transcriptome and proteome adaptation during development and heat stress response of tomato pollen.* BMC genomics, 2018. **19**: p. 1-20.
21. Kumar, A., et al., *Systems biology for smart crops and agricultural innovation: filling the gaps between genotype and phenotype for complex traits linked with robust agricultural productivity and sustainability.* Omics: a journal of integrative biology, 2015. **19**(10): p. 581-601.

22. Nakabayashi, R. and K. Saito, *Integrated metabolomics for abiotic stress responses in plants.* Current opinion in plant biology, 2015. **24**: p. 10-16.
23. Ercolano, M.R., et al., *Patchwork sequencing of tomato San Marzano and Vesuviano varieties highlights genome-wide variations.* BMC genomics, 2014. **15**: p. 1-13.
24. Tranchida-Lombardo, V., et al., *Whole-genome re-sequencing of two Italian tomato landraces reveals sequence variations in genes associated with stress tolerance, fruit quality and long shelf-life traits.* DNA Research, 2018. **25**(2): p. 149-160.
25. Chang, Y., et al., *The draft genomes of five agriculturally important African orphan crops.* GigaScience, 2019. **8**(3): p. giy152.
26. Li, Y.-h., et al., *De novo assembly of soybean wild relatives for pan-genome analysis of diversity and agronomic traits.* Nature biotechnology, 2014. **32**(10): p. 1045-1052.
27. Peace, C.P., et al., *Apple whole genome sequences: recent advances and new prospects.* Horticulture Research, 2019. **6**.
28. D'Alessandro, A., et al., *Cadmium stress responses in Brassica juncea: hints from proteomics and metabolomics.* Journal of proteome research, 2013. **12**(11): p. 4979-4997.
29. Komatsu, S., et al., *Comprehensive analysis of mitochondria in roots and hypocotyls of soybean under flooding stress using proteomics and metabolomics techniques.* Journal of Proteome Research, 2011. **10**(9): p. 3993-4004.
30. Gonzalez-Mula, A., M. Torres, and D. Faure, *Integrative and deconvolution omics approaches to uncover the Agrobacterium tumefaciens lifestyle in plant tumors.* Plant signaling & behavior, 2019. **14**(3): p. e1581562.

31. Wong, D.C., *Harnessing integrated omics approaches for plant specialized metabolism research: new insights into shikonin biosynthesis.* Plant and Cell Physiology, 2019. **60**(1): p. 4-6.
32. Goh, H.-H., *Integrative multi-omics through bioinformatics.* Omics applications for systems biology, 2018: p. 69-80.
33. Pinneh, E.C., et al., *Expression levels of inositol phosphorylceramide synthase modulate plant responses to biotic and abiotic stress in Arabidopsis thaliana.* PloS one, 2019. **14**(5): p. e0217087.
34. Pour-Aboughadareh, A., et al., *iPASTIC: An online toolkit to estimate plant abiotic stress indices.* Applications in plant sciences, 2019. **7**(7): p. e11278.
35. Miller Jr, W.B., *Biological information systems: Evolution as cognition-based information management.* Progress in biophysics and molecular biology, 2018. **134**: p. 1-26.
36. Mısırlı, G.k., et al., *Data integration and mining for synthetic biology design.* ACS synthetic biology, 2016. **5**(10): p. 1086-1097.
37. Fleischmann, R.D., et al., *Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd.* science, 1995. **269**(5223): p. 496-512.
38. Olsen, U.D.J.G.I.H.T.B.E.P.P.R.P.W.S.S.T.D.N.C.J.-F., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome.* nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
39. Venter, J.C., H.O. Smith, and M.D. Adams, *The sequence of the human genome.* Clinical chemistry, 2015. **61**(9): p. 1207-1208.
40. Sanger, F., *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors 1977 (classical article).* Biotech, 1992. **24**: p. 104-108.
41. Iniative, A.G., *Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana.* Nature, 2000. **408**(6814): p. 796-815.

42. Goff, S.A., J.C. Schnable, and K.A. Feldmann, *The evolution of plant gene and genome sequencing*, in *Advances in Botanical Research*. 2014, Elsevier. p. 47-90.
43. Project, I.R.G.S. and T. Sasaki, *The map-based sequence of the rice genome.* Nature, 2005. **436**(7052): p. 793-800.
44. Willis, K., *State of the world's plants 2017*. 2017: Royal Botanics Gardens Kew.
45. Kuroiwa, T., et al., *Genome size of the ultrasmall unicellular freshwater green alga, Medakamo hakoo 311, as determined by staining with 4', 6-diamidino-2-phenylindole after microwave oven treatments: II. Comparison with Cyanidioschyzon merolae, Saccharomyces cerevisiae (n, 2n), and Chlorella variabilis.* Cytologia, 2016. **81**(1): p. 69-76.
46. Fleischmann, A., et al., *Evolution of genome size and chromosome number in the carnivorous plant genus Genlisea (Lentibulariaceae), with a new estimate of the minimum genome size in angiosperms.* Annals of botany, 2014. **114**(8): p. 1651-1663.
47. Pellicer, J., M.F. Fay, and I.J. Leitch, *The largest eukaryotic genome of them all?* Botanical Journal of the Linnean Society, 2010. **164**(1): p. 10-15.
48. Consortium, I.W.G.S., et al., *Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome.* Science, 2018. **361**(6403): p. eaar7191.
49. JiaYan, W., et al., *Systematic analysis of intron size and abundance parameters in diverse lineages.* Science China Life Sciences, 2013. **56**: p. 968-974.
50. Eid, J., et al., *Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules.* Science, 2009. **323**(5910): p. 133-138.

51. Jain, M., et al., *The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community.* Genome biology, 2016. **17**: p. 1-11.
52. De Wit, E. and W. De Laat, *A decade of 3C technologies: insights into nuclear organization.* Genes & development, 2012. **26**(1): p. 11-24.
53. Diambra, L.A., *Genome sequence and analysis of the tuber crop potato.* Nature, 2011. **475**.
54. Dohm, J.C., et al., *The genome of the recently domesticated crop plant sugar beet (Beta vulgaris).* Nature, 2014. **505**(7484): p. 546-549.
55. Kang, Y., et al., *Draft genome sequence of adzuki bean, Vigna angularis. Sci Rep 5: 8069*. 2015.
56. Attwood, T.K., et al., *A global perspective on evolving bioinformatics and data science training needs.* Briefings in Bioinformatics, 2019. **20**(2): p. 398-404.
57. *Computational pan-genomics: status, promises and challenges.* Briefings in bioinformatics, 2018. **19**(1): p. 118-135.
58. Kersey, P.J., et al., *Ensembl Genomes 2018: an integrated omics infrastructure for non-vertebrate species.* Nucleic acids research, 2018. **46**(D1): p. D802-D808.
59. Goodstein, D.M., et al., *Phytozome: a comparative platform for green plant genomics.* Nucleic acids research, 2012. **40**(D1): p. D1178-D1186.
60. Lamesch, P., et al., *The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools.* Nucleic acids research, 2012. **40**(D1): p. D1202-D1210.
61. Cochrane, G., et al., *The international nucleotide sequence database collaboration.* Nucleic acids research, 2016. **44**(D1): p. D48-D50.
62. Wilson, G., et al., *Good enough practices in scientific computing.* PLoS computational biology, 2017. **13**(6): p. e1005510.

63. Kratz, J. and C. Strasser, *Data publication consensus and controversies.* F1000Research, 2014. **3**.
64. Kulkarni-Kale, U., S. Bhosle, and A.S. Kolaskar, *CEP: a conformational epitope prediction server.* Nucleic acids research, 2005. **33**(suppl_2): p. W168-W171.
65. Kringelum, J.V., et al., *Reliable B cell epitope predictions: impacts of method development and improved benchmarking.* PLoS computational biology, 2012. **8**(12): p. e1002829.
66. Qi, T., et al., *SEPPA 2.0—more refined server to predict spatial epitope considering species of immune host and subcellular localization of protein antigen.* Nucleic acids research, 2014. **42**(W1): p. W59-W63.
67. Sweredoski, M.J. and P. Baldi, *PEPITO: improved discontinuous B-cell epitope prediction using multiple distance thresholds and half sphere exposure.* Bioinformatics, 2008. **24**(12): p. 1459-1460.
68. Giacò, L., et al., *B-Pred, a structure based B-cell epitopes prediction server.* Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry, 2012: p. 11-21.
69. Budiman, M.A., et al., *A deep-coverage tomato BAC library and prospects toward development of an STC framework for genome sequencing.* Genome research, 2000. **10**(1): p. 129-136.
70. Mardis, E.R., *The impact of next-generation sequencing technology on genetics.* Trends in genetics, 2008. **24**(3): p. 133-141.
71. Esposito, A., et al., *Bioinformatics for agriculture in the next-generation sequencing era.* Chemical and Biological Technologies in Agriculture, 2016. **3**: p. 1-12.
72. Denoeud, F., et al., *Annotating genomes with massive-scale RNA sequencing.* Genome biology, 2008. **9**: p. 1-12.
73. Potter, S.C., et al., *The Ensembl analysis pipeline.* Genome research, 2004. **14**(5): p. 934-941.

74. Tomato Genome Consortium, x., *The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution.* Nature, 2012. **485**(7400): p. 635.
75. Li, W., et al., *The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework.* Nucleic acids research, 2015. **43**(W1): p. W580-W584.
76. Mashima, J., et al., *DNA data bank of Japan (DDBJ) progress report.* Nucleic acids research, 2016. **44**(D1): p. D51-D57.
77. Sayers, E., *NCBI Resource Coordinators, Database resources of the National Center for Biotechnology Information.* Nucleic Acids Res, 2018. **46**: p. D8-D13.
78. Proost, S., et al., *PLAZA: a comparative genomics resource to study gene and genome evolution in plants.* The Plant Cell, 2009. **21**(12): p. 3718-3731.
79. Wegrzyn, J.L., et al., *TreeGenes: A forest tree genome database.* International journal of plant genomics, 2008. **2008**.
80. Fernandez-Pozo, N., et al., *The Sol Genomics Network (SGN)—from genotype to phenotype to breeding.* Nucleic acids research, 2015. **43**(D1): p. D1036-D1041.
81. Hirsch, C.D., et al., *Spud DB: A resource for mining sequences, genotypes, and phenotypes to accelerate potato breeding.* The Plant Genome, 2014. **7**(1): p. plantgenome2013.12.0042.
82. Andorf, C.M., et al., *MaizeGDB update: new tools, data and interface for the maize model organism database.* Nucleic acids research, 2016. **44**(D1): p. D1195-D1201.
83. Dash, S., et al., *Legume information system (LegumeInfo. org): a key component of a set of federated data resources for the legume family.* Nucleic acids research, 2016. **44**(D1): p. D1181-D1188.
84. Grant, D., et al., *SoyBase, the USDA-ARS soybean genetics and genomics database.* Nucleic acids research, 2010. **38**(suppl_1): p. D843-D846.

85. Zerbino, D.R., et al., *Ensembl 2018.* Nucleic acids research, 2018. **46**(D1): p. D754-D761.
86. O'Leary, N.A., et al., *Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation.* Nucleic acids research, 2016. **44**(D1): p. D733-D745.
87. Chiusano, M., *On the multifaceted aspects of bioinformatics in the next generation era: the run that must keep the quality.* Next Generat Sequenc & Applic, 2015. **2**: p. e106.
88. Ambrosino, L., et al., *Multilevel comparative bioinformatics to investigate evolutionary relationships and specificities in gene annotations: an example for tomato and grapevine.* BMC bioinformatics, 2018. **19**: p. 85-101.
89. Goodwin, S., et al., *Oxford Nanopore sequencing, hybrid error correction, and de novo assembly of a eukaryotic genome.* Genome research, 2015. **25**(11): p. 1750-1756.
90. Ashburner, M., et al., *Gene ontology: tool for the unification of biology.* Nature genetics, 2000. **25**(1): p. 25-29.
91. Brown, G.R., et al., *Gene: a gene-centered information resource at NCBI.* Nucleic acids research, 2015. **43**(D1): p. D36-D42.
92. Doudna, J.A. and E. Charpentier, *The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9.* Science, 2014. **346**(6213): p. 1258096.
93. Osakabe, Y., et al., *Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing to modify abiotic stress responses in plants.* Scientific reports, 2016. **6**(1): p. 26685.
94. Heigwer, F., G. Kerr, and M. Boutros, *E-CRISP: fast CRISPR target site identification.* Nature methods, 2014. **11**(2): p. 122-123.
95. Brinkman, E.K., et al., *Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition.* Nucleic acids research, 2014. **42**(22): p. e168-e168.

96. Montague, T.G., et al., *CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing.* Nucleic acids research, 2014. **42**(W1): p. W401-W407.

97. Stemmer, M., et al., *CCTop: an intuitive, flexible and reliable CRISPR/Cas9 target prediction tool.* PloS one, 2015. **10**(4): p. e0124633.

98. Atkinson, N.J. and P.E. Urwin, *The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field.* Journal of experimental botany, 2012. **63**(10): p. 3523-3543.

99. Bale, J.S., et al., *Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores.* Global change biology, 2002. **8**(1): p. 1-16.

100. Luck, J., et al., *Climate change and diseases of food crops.* Plant Pathology, 2011. **60**(1): p. 113-121.

101. Rajashekar, C., et al., *Suppression of phospholipase Dα1 induces freezing tolerance in Arabidopsis: response of cold-responsive genes and osmolyte accumulation.* Journal of plant physiology, 2006. **163**(9): p. 916-926.

102. Kuzuya, M., et al., *Powdery mildew (Sphaerotheca fuliginea) resistance in melon is selectable at the haploid level.* Journal of Experimental Botany, 2003. **54**(384): p. 1069-1074.

103. Yu, L., et al., *Tissue-specific transcriptome analysis reveals multiple responses to salt stress in Populus euphratica seedlings.* Genes, 2017. **8**(12): p. 372.

104. Zheng, J., et al., *Are adult life history traits in oriental fruit moth affected by a mild pupal heat stress?* Journal of Insect Physiology, 2017. **102**: p. 36-41.

105. Bräutigam, A. and U. Gowik, *What can next generation sequencing do for you? Next generation sequencing as a valuable tool in plant research.* Plant biology, 2010. **12**(6): p. 831-841.

106. Budak, H. and B.A. Akpinar, *Plant miRNAs: biogenesis, organization and origins.* Functional & integrative genomics, 2015. **15**: p. 523-531.
107. Ambrosone, A., et al., *Distinct gene networks drive differential response to abrupt or gradual water deficit in potato.* Gene, 2017. **597**: p. 30-39.
108. Schena, M., et al., *Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray.* Science, 1995. **270**(5235): p. 467-470.
109. Redman, J.C., et al., *Development and evaluation of an Arabidopsis whole genome Affymetrix probe array.* The Plant Journal, 2004. **38**(3): p. 545-561.
110. Di Salle, P., et al., *Gene co-expression analyses: an overview from microarray collections in Arabidopsis thaliana.* Briefings in Bioinformatics, 2017. **18**(2): p. 215-225.
111. Kolesnikov, N., et al., *ArrayExpress update—simplifying data submissions.* Nucleic acids research, 2015. **43**(D1): p. D1113-D1116.
112. Adams, M.D., et al., *Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project.* Science, 1991. **252**(5013): p. 1651-1656.
113. Liu, Y., J. Zhou, and K.P. White, *RNA-seq differential expression studies: more sequence or more replication?* Bioinformatics, 2014. **30**(3): p. 301-304.
114. Wang, Z., M. Gerstein, and M. Snyder, *RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics.* Nature reviews genetics, 2009. **10**(1): p. 57-63.
115. Vital, C.E., et al., *An integrative overview of the molecular and physiological responses of sugarcane under drought conditions.* Plant molecular biology, 2017. **94**: p. 577-594.
116. Hanhart, P., et al., *Bioinformatic and expression analysis of the Brassica napus L. cyclophilins.* Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 1514.

117. Li, C.-X., et al., *An RNA-seq analysis of grape plantlets grown in vitro reveals different responses to blue, green, red LED light, and white fluorescent light.* Frontiers in plant science, 2017. **8**: p. 78.
118. Di, C., et al., *Characterization of stress-responsive lnc RNA s in A rabidopsis thaliana by integrating expression, epigenetic and structural features.* The Plant Journal, 2014. **80**(5): p. 848-861.
119. Moustafa, K. and J.M. Cross, *Genetic approaches to study plant responses to environmental stresses: an overview.* Biology, 2016. **5**(2): p. 20.
120. Staiger, D. and J.W. Brown, *Alternative splicing at the intersection of biological timing, development, and stress responses.* The Plant Cell, 2013. **25**(10): p. 3640-3656.
121. Kodama, Y., M. Shumway, and R. Leinonen, *The Sequence Read Archive: explosive growth of sequencing data.* Nucleic acids research, 2012. **40**(D1): p. D54-D56.
122. Bennett, S., *Solexa ltd.* Pharmacogenomics, 2004. **5**(4): p. 433-438.
123. Droege, M. and B. Hill, *The Genome Sequencer FLX™ System—Longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets.* Journal of biotechnology, 2008. **136**(1-2): p. 3-10.
124. Harris, T.D., et al., *Single-molecule DNA sequencing of a viral genome.* Science, 2008. **320**(5872): p. 106-109.
125. Leinonen, R., et al., *The sequence read archive.* Nucleic acids research, 2010. **39**(suppl_1): p. D19-D21.
126. Barrett, T., et al., *NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update.* Nucleic acids research, 2012. **41**(D1): p. D991-D995.
127. Priya, P. and M. Jain, *RiceSRTFDB: a database of rice transcription factors containing comprehensive expression, cis-regulatory element and mutant information to facilitate gene function analysis.* Database, 2013. **2013**: p. bat027.

128. Naika, M., et al., *STIFDB2: an updated version of plant stress-responsive transcription factor database with additional stress signals, stress-responsive transcription factor binding sites and stress-responsive genes in Arabidopsis and rice.* Plant and Cell Physiology, 2013. **54**(2): p. e8-e8.
129. Zhang, S., et al., *PASmiR: a literature-curated database for miRNA molecular regulation in plant response to abiotic stress.* BMC plant biology, 2013. **13**(1): p. 1-8.
130. Hammami, R., et al., *PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides.* Nucleic acids research, 2009. **37**(suppl_1): p. D963-D968.
131. Anil Kumar, S., et al., *PSPDB: plant stress protein database.* Plant molecular biology reporter, 2014. **32**: p. 940-942.
132. D'Agostino, N., et al., *TomatEST database: in silico exploitation of EST data to explore expression patterns in tomato species.* Nucleic Acids Research, 2007. **35**(suppl_1): p. D901-D905.
133. D'Agostino, N., et al., *An EST database from saffron stigmas.* BMC Plant Biology, 2007. **7**(1): p. 1-8.
134. Moretto, M., et al., *VESPUCCI: exploring patterns of gene expression in grapevine.* Frontiers in Plant Science, 2016. **7**: p. 633.
135. Borrill, P., R. Ramirez-Gonzalez, and C. Uauy, *expVIP: a customizable RNA-seq data analysis and visualization platform.* Plant physiology, 2016. **170**(4): p. 2172-2186.
136. Bludau, I. and R. Aebersold, *Proteomic and interactomic insights into the molecular basis of cell functional diversity.* Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2020. **21**(6): p. 327-340.
137. Meena, K.K., et al., *Abiotic stress responses and microbe-mediated mitigation in plants: the omics strategies.* Frontiers in plant science, 2017. **8**: p. 172.

138. Silva-Sanchez, C., H. Li, and S. Chen, *Recent advances and challenges in plant phosphoproteomics.* Proteomics, 2015. **15**(5-6): p. 1127-1141.
139. Zhang, F., et al., *Data-independent acquisition mass spectrometry-based proteomics and software tools: a glimpse in 2020.* Proteomics, 2020. **20**(17-18): p. 1900276.
140. Rabilloud, T. and C. Lelong, *Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial.* Journal of proteomics, 2011. **74**(10): p. 1829-1841.
141. Aslam, B., et al., *Proteomics: technologies and their applications.* Journal of chromatographic science, 2016: p. 1-15.
142. Ma, Z.-Q., et al., *IDPicker 2.0: Improved protein assembly with high discrimination peptide identification filtering.* Journal of proteome research, 2009. **8**(8): p. 3872-3881.
143. Prieto, G., et al., *PAnalyzer: a software tool for protein inference in shotgun proteomics.* BMC bioinformatics, 2012. **13**: p. 1-8.
144. Liu, Z., et al., *Comparative phospho-proteomics analysis of salt-responsive phosphoproteins regulated by the MKK9-MPK6 cascade in Arabidopsis.* Plant Science, 2015. **241**: p. 138-150.
145. Kosová, K., et al., *Biological networks underlying abiotic stress tolerance in temperate crops—a proteomic perspective.* International journal of molecular sciences, 2015. **16**(9): p. 20913-20942.
146. Xu, J., et al., *Quantitative proteomic analysis of the rice (Oryza sativa L.) salt response.* PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0120978.
147. Wang, Y., et al., *Proteomic analyses reveal the mechanism of Dunaliella salina Ds-26-16 gene enhancing salt tolerance in Escherichia coli.* PLoS One, 2016. **11**(5): p. e0153640.
148. Kosová, K., et al., *Plant abiotic stress proteomics: the major factors determining alterations in cellular proteome.* Frontiers in plant science, 2018. **9**: p. 122.

149. Parrine, D., et al., *Proteome modifications on tomato under extreme high light induced-stress.* Proteome science, 2018. **16**: p. 1-15.
150. Ambrosino, L., et al., *Bioinformatics resources for plant abiotic stress responses: state of the art and opportunities in the fast evolving-omics era.* Plants, 2020. **9**(5): p. 591.
151. Perez-Riverol, Y., et al., *Making proteomics data accessible and reusable: current state of proteomics databases and repositories.* Proteomics, 2015. **15**(5-6): p. 930-950.
152. Zhang, Y., et al., *Protein-protein interactions and metabolite channelling in the plant tricarboxylic acid cycle.* Nature communications, 2017. **8**(1): p. 15212.
153. Ezkurdia, I., et al., *Analyzing the first drafts of the human proteome.* Journal of proteome research, 2014. **13**(8): p. 3854-3855.
154. Gupta, N. and P.A. Pevzner, *False discovery rates of protein identifications: a strike against the two-peptide rule.* Journal of proteome research, 2009. **8**(9): p. 4173-4181.
155. Valot, B., et al., *MassChroQ: a versatile tool for mass spectrometry quantification.* Proteomics, 2011. **11**(17): p. 3572-3577.
156. Langella, O., et al., *X! TandemPipeline: a tool to manage sequence redundancy for protein inference and phosphosite identification.* Journal of proteome research, 2017. **16**(2): p. 494-503.
157. Mergner, J., et al., *Mass-spectrometry-based draft of the Arabidopsis proteome.* Nature, 2020. **579**(7799): p. 409-414.
158. Jarzab, A., et al., *Meltome atlas—thermal proteome stability across the tree of life.* Nature methods, 2020. **17**(5): p. 495-503.
159. Samaras, P., et al., *ProteomicsDB: a multi-omics and multi-organism resource for life science research.* Nucleic acids research, 2020. **48**(D1): p. D1153-D1163.

160. Vizcaíno, J.A., et al., *The PRoteomics IDEntifications (PRIDE) database and associated tools: status in 2013.* Nucleic acids research, 2012. **41**(D1): p. D1063-D1069.
161. Farrah, T., et al., *State of the human proteome in 2013 as viewed through PeptideAtlas: comparing the kidney, urine, and plasma proteomes for the biology-and disease-driven Human Proteome Project.* Journal of proteome research, 2014. **13**(1): p. 60-75.
162. Craig, R., J.P. Cortens, and R.C. Beavis, *Open source system for analyzing, validating, and storing protein identification data.* Journal of proteome research, 2004. **3**(6): p. 1234-1242.
163. Slotta, D.J., T. Barrett, and R. Edgar, *NCBI Peptidome: a new public repository for mass spectrometry peptide identifications.* Nature biotechnology, 2009. **27**(7): p. 600-601.
164. Smith, B.E., et al., *Tranche distributed repository and ProteomeCommons. org.* Data Mining in Proteomics: From Standards to Applications, 2011: p. 123-145.
165. Sun, Q., et al., *PPDB, the plant proteomics database at Cornell.* Nucleic acids research, 2009. **37**(suppl_1): p. D969-D974.
166. Schwacke, R., et al., *ARAMEMNON, a novel database for Arabidopsis integral membrane proteins.* Plant physiology, 2003. **131**(1): p. 16-26.
167. Kleffmann, T., et al., *plprot: A comprehensive proteome database for different plastid types.* Plant and cell physiology, 2006. **47**(3): p. 432-436.
168. Thelen, J.J., *P3DB: An Integrated Database for Plant Protein Phosphorylation.* 2012.
169. Bundy, J.G., et al., *Discrimination of pathogenic clinical isolates and laboratory strains of Bacillus cereus by NMR-based metabolomic profiling.* FEMS microbiology letters, 2005. **242**(1): p. 127-136.

170. Wang, W.-W., et al., *Transcriptome and metabolome analysis reveal candidate genes and biochemicals involved in tea geometrid defense in Camellia sinensis.* PLoS One, 2018. **13**(8): p. e0201670.
171. Ribbenstedt, A., H. Ziarrusta, and J.P. Benskin, *Development, characterization and comparisons of targeted and non-targeted metabolomics methods.* PLoS One, 2018. **13**(11): p. e0207082.
172. Cook, D., et al., *A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of Arabidopsis.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004. **101**(42): p. 15243-15248.
173. Kim, J.K., et al., *Time-course metabolic profiling in Arabidopsis thaliana cell cultures after salt stress treatment.* Journal of Experimental Botany, 2007. **58**(3): p. 415-424.
174. Zuther, E., K. Koehl, and J. Kopka, *Comparative metabolome analysis of the salt response in breeding cultivars of rice.* Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops, 2007: p. 285-315.
175. Shulaev, V., et al., *Metabolomics for plant stress response.* Physiologia plantarum, 2008. **132**(2): p. 199-208.
176. Cramer, G.R., et al., *Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles.* Functional & integrative genomics, 2007. **7**: p. 111-134.
177. Sanchez, D.H., et al., *Integrative functional genomics of salt acclimatization in the model legume Lotus japonicus.* The Plant Journal, 2008. **53**(6): p. 973-987.
178. Osuna, D., et al., *Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived Arabidopsis seedlings.* The Plant Journal, 2007. **49**(3): p. 463-491.
179. Huang, C.Y., et al., *Metabolite profiling reveals distinct changes in carbon and nitrogen metabolism in phosphate-deficient barley plants*

(Hordeum vulgare L.). Plant and Cell Physiology, 2008. **49**(5): p. 691-703.

180. Urbanczyk-Wochniak, E. and A.R. Fernie, *Metabolic profiling reveals altered nitrogen nutrient regimes have diverse effects on the metabolism of hydroponically-grown tomato (Solanum lycopersicum) plants.* Journal of experimental botany, 2005. **56**(410): p. 309-321.
181. Livigni, S., et al., *The different tolerance to magnesium deficiency of two grapevine rootstocks relies on the ability to cope with oxidative stress.* BMC plant biology, 2019. **19**: p. 1-17.
182. Haug, K., et al., *MetaboLights—an open-access general-purpose repository for metabolomics studies and associated meta-data.* Nucleic acids research, 2013. **41**(D1): p. D781-D786.
183. Udayakumar, M., et al., *PMDB: plant metabolome database—a metabolomic approach.* Medicinal Chemistry Research, 2012. **21**: p. 47-52.
184. Bais, P., et al., *PlantMetabolomics. org: a web portal for plant metabolomics experiments.* Plant physiology, 2010. **152**(4): p. 1807-1816.
185. Wishart, D.S., et al., *HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018.* Nucleic acids research, 2018. **46**(D1): p. D608-D617.
186. Tikunov, Y., et al., *MSClust: a tool for unsupervised mass spectra extraction of chromatography-mass spectrometry ion-wise aligned data.* Metabolomics, 2012. **8**: p. 714-718.
187. Ruttkies, C., et al., *MetFrag relaunched: incorporating strategies beyond in silico fragmentation.* Journal of cheminformatics, 2016. **8**(1): p. 1-16.
188. Markley, J.L., et al., *The future of NMR-based metabolomics.* Current opinion in biotechnology, 2017. **43**: p. 34-40.

189. Borkotoky, S., et al., *The Arabidopsis stress responsive gene database.* International journal of plant genomics, 2013. **2013**.
190. Mousavi, S.A., et al., *PlantPReS: a database for plant proteome response to stress.* Journal of Proteomics, 2016. **143**: p. 69-72.
191. Alter, S., et al., *DroughtDB: an expert-curated compilation of plant drought stress genes and their homologs in nine species.* Database, 2015. **2015**: p. bav046.

BÖLÜM 9

MOLEKÜLER TEKNİKLERLE BİTKİ SİSTEMATİĞİNDE DEVRİM

Doç. Dr. Deniz AYGÖREN ULUER[15] *,
Öğr. Gör. Dr. Tuğba ERTUĞRUL[16]

DOI: https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.12707349

[15] Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Çiçekdağı MYO, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, 40700, Kırşehir, Türkiye
[16] Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 06500, Ankara, Türkiye
*Sorumlu Yazar: Doç. Dr. Deniz Aygören Uluer; d.aygoren @ahievran.edu.tr

Giriş

Sistematik; geleneksel taksonomiyi de içerecek şekilde, organizmaların tanımlanmaları (deskripsiyon), tanınmaları (identifikasyon), isimlendirilmeleri (nomenklatür) ve sınıflandırılmalarını kapsayan bir bilimdir (Simpson, 2012). Canlıları sınıflandırmanın ise iki ana çeşidi vardır: fenetik ve filogenetik. **Fenetik** sınıflandırma benzer olanları bir arada gruplandırmadır ve bitki sistematiğindeki birçok geleneksel sınıflandırmada en çok kullanılan yöntemdir; **filogenetik** ise benzerlik ile ilişkili olabilen (veya olmayan) evrimsel geçmişi temel alır ve bu filogenetik akrabalıkların belirlenmesinde incelenen organizmaların makromoleküllerinden elde edilen bilgilerden yararlanarak moleküler sistematik dediğimiz bilim dalı meydana gelmiştir (Simpson, 2012).

Bitki sistematiğinde moleküler tekniklerin kullanımı, 20. yüzyılın ikinci yarısında başlamış, 1960'lar, 1970'ler ve 1980'lerde protein elektroforezi, izoenzim analizleri, RFLP (Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi), ve özellikle DNA'nın baz sırasını belirlemeyi mümkün kılan Sanger dizileme gibi yöntemlerle genetik bilgilerin analizi büyük ölçüde kolaylaşmıştır (Zuckerkandl ve Pauling, 1962; Karp vd. 1996; Daly vd. 2001). 1990'larda DNA'nın çok küçük miktarlarından bile uygulanabilen Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknolojisinin yaygın hale gelmesi ile ise bu dalda bir çığır açılmıştır (Bromhan, 2016). 2000'ler ve sonrasında ise genomik ve yüksek verimli dizileme (Next-Generation Sequencing, NGS) tekniklerinin gelişmesi, daha kapsamlı ve hızlı genetik analizlerin yapılabilmesini sağlamaktadır (Shendure ve Ji, 2008). Görece olarak hala maliyetli olan bu teknolojiler, sadece birkaç yüz baz çifti (base pair) kullanarak bitkileri sınıflandıran klasik yöntemlerin aksine, on binlerce baz çiftini (örneğin kloroplast için 120-160 bin arası) kullanarak tüm genomların karşılaştırılması ve daha ayrıntılı filogenetik ağaçların oluşturulmasında büyük rol oynamaktadır.

Moleküler tekniklerin ortaya çıkışıyla bitki sistematiği sadece önemli bir dönüşüm geçirmemiş, aynı zamanda bitki evrimi, çeşitliliği ve taksonomisi hakkındaki anlayışımızı kökten değiştirmiştir. Hatta birçok araştırmacı tarafından bu değişiklik bir devrim olarak nitelendirilmiş, ve bu konudaki çalışmaların sayısı her geçen gün de artmıştır. Neredeyse her yeni sınıflandırma, filogeniye ve evrime özel ağırlık vermektedir. Gelişen teknoloji ve teknikler de, çoklu varyasyon analizi ile benzeri yöntemlerin devreye girmesine aracı olmuştur. Bu gelişmeler sonucunda, yeni sınıflandırmaların hem çok daha objektif olduğu, hem de bitkilerin gerçek evrimsel ilişkilerini yansıtarak taksonomik grupları oluşturduğu için çok daha "doğal" olduğu anlaşılmıştır (Hall, 2004). Örneğin, morfolojiden ziyade büyük oranda moleküler verilere dayanan Angiosperm Filogenisi Grubu çalışmaları (APG, 1998; 2009; 2016), çiçekli bitki ilişkileri hakkındaki anlayışımızı neredeyse tamamen değiştirmiş, hatta Fabales, Astragales, Liliaceae, Scrophulariaceae kladları başta olmak üzere birçok bitki grubunun yeniden sınıflandırılmasına yol açmıştır. Yine APG3 sistemi ile morfolojik ve moleküler bilginin kombinasyonu kullanılarak diğer angiosperm familyaları yeniden revize edilmiş, ailelerin sınırları APG3'e göre düzenlenmiş, geleneksel sınırlar içinde ya ayrı gruplara bölünmüştür (örneğin, geleneksel Liliaceae ve Scrophulariaceae) ya da bir familya altında birleştirilmişlerdir (örneğin, Bombaceae, Malvaceae, Sterculiaceae ve Tiliaceae familyaları Malvaceae familyası altında toplanmıştır) (Simpson, 2012). Yine yeni yazılmakta olan Resimli Türkiye Florası'nda sınıf ile cins arasındaki kategorilerde, APG3 (Kapalı Tohumlular Filogeni Kümesi) sistemi benimsenmiştir. Canlılığın filogenisini bilmek ayrıca diğer alanları kavrayabilme olanağı da sunar ve pratik öneme de sahiptir. Örneğin, Hint yer elması olarak bilinen bir *Dioscera* türünün steroid bileşikler (ilk olarak doğum kontrol hapı olarak kullanılmıştır) ihtiva ettiği keşfedilince diğer yakın ilişkili türlerin incelenmesi sonucu, bu

türlerin bu bileşikleri çok daha fazla miktarlarda ihtiva ettikleri tespit edilmiştir (Simpson, 2012).

Yapılan birçok moleküler sistematik çalışma ile dinamik ve güncellenebilir bir sistem oluşturulmuş, botanik araştırmalarının ve biyolojik çeşitliliğin anlaşılmasında büyük ilerlemeler sağlanmıştır. Hatta yeni tür tanımlamalarının yapıldığı bilimsel yayınlarda morfolojik verilerin moleküler çalışmalarla desteklenmesi artık birçok bilimsel dergi tarafından şart koşulmaktadır.

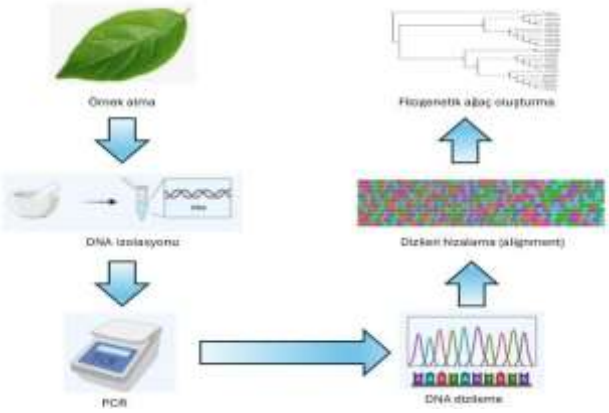
1. Klasik Bitki Sistematiği ve Yaşanan Sorunlar

Geleneksel bitki sistematiği, bitkilerin yaprak şekli, çiçek yapısı, meyve tipi gibi morfolojik özelliklerine ve kök sistemleri, yaprak damarlanması gibi anatomik farklılıklarına göre sınıflandırılmasını temel alır (Cronquist, 1981). Ancak, morfolojik özelliklere dayalı sınıflandırma çevresel faktörler ve dolayısıyla adaptasyon süreçleri nedeniyle yanıltıcı olabilir, çünkü yakınsak (veya konvergent) evrim denilen bu süreçte farklı türler benzer çevresel baskılar altında benzer adaptasyonlar geliştirir, ve hem morfolojik hem de fonksiyonel olarak birbirine benzeyen özellikleri bağımsız evrimsel yollarla (ortak bir atadan gelmeden) kazanır (Savolainen ve Chase, 2003). Aynı şekilde fenotipik esneklikte bir organizmanın genotipi çevresel koşullara bağlı olarak farklı fenotipler üretebilir ve bu da aynı tür içinde bile önemli morfolojik varyasyonlara neden olarak sınıflandırmayı zorlaştırır (Sommer, 2020). Kriptik türler, yani morfolojik olarak ayırt edilemeyen ancak genetik olarak farklı türler ise, geleneksel morfolojik yöntemler ile tespit edilemez ve mutlaka moleküler analizlerle tespit edilmeleri gereklidir (Calahorra-Oliart vd. 2021). İşte bu bahsedilen sorunların üstesinden ancak geleneksel sistematiğin yanında moleküler sistematik gibi yöntemler kullanılarak gelinebilir ve onlarca yıldır Türkiye dahil birçok ülkede bu metotların kullanımı hızlı bir şekilde artmaktadır.

Moleküler bitki sistematiği, sadece bitkilerin genetik materyallerini analiz ederek bitki evrimini ve ilişkilerini daha iyi anlamamızı ve daha güvenilir sınıflandırmalar yapmamızı mümkün kılmaz, aynı zamanda geleneksel morfoloji ve anatomi tabanlı yöntemlerin sınırlamalarını aşarak, uzun süredir devam eden taksonomik tartışmaların çözülmesine de olanak sağlar. Örnek vermek gerekirse Leguminosae (Fabaceae veya baklagiller) familyası geleneksel olarak (morfolojiye dayalı sınıflandırma) Caesalpinioideae, Mimosoideae ve Papilionoideae olmak üzere üç (3) alt familyaya ayrılıyordu (Käss ve Wink, 1996). Ancak 2017 yılında LPWG (Legume Phylogeny Working Group) tarafından yapılan moleküler filogenetik çalışma gösterdi ki Cercidoideae, Detarioideae, Duparquetioideae, Dialioideae, Caesalpinioideae ve Papilionoideae olmak üzere familyanın altı (6) alt familyaya ayrılması gereklidir, ve bu sayede daha doğru ve doğal bir sınıflandırma yapılmış oldu. Diğer bir örnek ise uzun zamandır süregelen taksonomik tartışmaların çözülmesidir. Örneğin, uzun zamandır süregelen monokot-dikot tartışmasında, moleküler verilerin ışığında monokotlar ve dikotlar arasındaki ilişki netleşmiş, yapılan çalışmalar monokotların çiçekli bitkiler grubu içindeki konumunu net bir şekilde ortaya çıkarmıştır (APG, 1998; Soltis vd. 2000). Bu iki örnekten de anlaşılacağı üzere moleküler veriler birçok bitki grubunun yeniden sınıflandırılmasına yol açmış, cins ve ailelerin genetik kanıtlara dayalı olarak birleştirilmesi veya ayrılmasına neden olmuştur. Ancak burada dikkat edilmesi gereken önemli bir husus ise morfoloji biliminin göz ardı edilmesi değil, aksine moleküler filogeni ile entegre edilmesi zorunluluğudur. Çünkü veri toplama aşamasında bir bitki grubunun morfolojisinin neye benzediğini bilmeden arazi çalışmaları ile o grubun bireylerinden veri elde etmek mümkün değildir. Ayrıca moleküler teknikler yeni bir çerçeve sağlarken, moleküler ve morfolojik verilerin entegrasyonu, bitki sistematiği konusunda kapsamlı bir anlayış için önemlidir. Bu bütüncül yaklaşım, sınıflandırmaların sağlam olmasını ve hem genetik ilişkileri hem de fenotipik çeşitliliği yansıtılmasını sağlar.

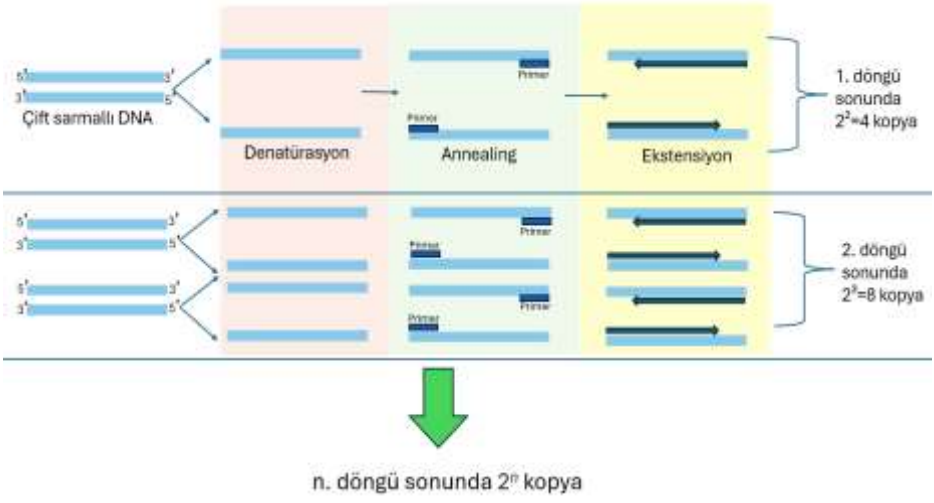
2. DNA temelli klasik bir moleküler filogenetik çalışmada izlenen temel adımlar

2.1. Veri toplama: Bu aşamada hedeflenen organizmalardan örnekler alınır ve bu bitkiler için çoğunlukla (fazlaca plastid içeren yeşil) bir yaprak örneğidir. Bu taze örneğin silika jel içeren bir poşette muhafazası ileriki aşamalarda organel kalitesi açısından önemlidir, ancak olmazsa olmaz da değildir. Yine herbaryum materyallerinden elde edilmiş yaprak örnekleri de kullanılabilir (materyalin yaşı ile ilgili daha fazla bilgi için lütfen Kuzmina vd. 2017'ye bakınız). Bazen Boraginaceae familyasında olduğu gibi yapraktan DNA izolasyonu bitkinin kimyasal bileşenleri (örneğin sekonder metabolitler) ve fiziksel özelliklerinden (örneğin yoğun tüyler) zorluklar içerebilir, ve bu zorlukların üstesinden gelmek için uygun stratejiler kullanmak gerekmektedir (Kuzmina vd. 2017). Sonrasında DNA izolasyon aşamaları takip edilerek materyalden DNA izolasyonu yapılır, ve günümüzde bunun için genellikle hazır kitler kullanılmaktadır (Şekil 1). Burada dikkat edilmesi gereken nokta bu örneklerin aynı zamanda onaylı bir herbaryumda saklanmasıdır (Simpson, 2012).



Şekil 1: DNA temelli klasik bir moleküler filogenetik çalışmada izlenen temel adımlar (Jeon vd. 2023, s: 4'ten uyarlanmıştır.)

2.2.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR): PCR, DNA dizilerini çoğaltmak için kullanılan bir laboratuvar tekniğidir (Şekil 1 ve 2). Bu aşamada çalışılan gruba (alttür, tür, cins, familya vs.) göre moleküler belirteçlere (gen, marker veya DNA bölgesi) karar verilir. Örneğin tür seviyesinde bir çalışma için *mat*K (maturase K), tüm ITS (Internal Transcribed Spacer), ITS1, ITS2, *trn*L-F (*trn*L intron ve *trn*L-*trn*F intergenic spacer), *rpL*32-*trn*L (intergenic spacer) gibi hızlı evrimleşen gen bölgeleri kullanılırken, familya ve üzeri seviyelerde ise *rbc*L (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit), *atp*B (ATP synthase beta subunit) veya 5.8S gibi daha yavaş evrimleşen gen bölgeleri tercih edilir. Yine burada kullanılacak gen bölgesi sayısı çalışılacak seviyeye, grubun karmaşıklığına ve hedefe göre değişebilir. Bazı grupların filogenetik ilişkilerini çözmede bir gen bölgesi yeterliyken, diğerlerinde tüm genom bile yeterli olmayabilir.



Şekil 2: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) döngüsü

Moleküler belirteçlerin çeşitlerine bakacak olursak ise,

- Ribozomal DNA (rDNA): Tüm bitkilerde bulunması ve nispeten yavaş evrimleşmesi nedeniyle filogenetik çalışmalar için yaygın olarak kullanılır.
- Kloroplast DNA (cpDNA): Anneden kalıtılması ve korunan doğası nedeniyle bitki evrimi, moleküler tarihleme, karakter evrimi ve biyocoğrafya çalışmaları için çok değerlidir ve bitki filogenetik çalışmalarında ribozomal DNA (örneğin ITS) ile birlikte en çok kullanılan gen bölgelerinden biridir.
- Mitokondriyal DNA (mtDNA): Bitkilerde sık rekombinasyon ve karmaşık evrim nedeniyle daha az kullanılır.
- Mikrosatellitler (SSR, Simple Sequence Repeats), AFLP (Amplifikasyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi), RFLP (Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi), ve SNP (Tek Nükleotid Polimorfizmi): Bu genetik markerlar da bireyler arasındaki genetik varyasyonu incelemek için kullanılır (Karp vd. 1996), ancak bitki sistematiğinde hiçbiri muhtemelen plastid ve ribozomal DNA'nın popülerliğini elde edememiştir.

Bu markerların elde edilmesi için primer dediğimiz tek sarmallı ve kısa DNA parçaları kullanılır, ve çalışılacak grup için kullanılması gereken primer çiftleri (ileri ve geri) ve yine kullanılacak PCR programı o bitki grubu için kısa bir literatür taraması ile bulunabilir (Bromhan, 2016).

Dizilerin düzenlenmesi: Bu adımda elde edilen ham DNA verileri analiz için uygun hale getirilir. DNA dizilerdeki gereksiz kısımların çıkarılması (genellikle net sonuç elde edilemeyen başlangıç ve son bölümlerin kesilmesi), ileri (forward) ve geri (reverse) dizilerin bir araya getirilmesi ile hatalı bazların düzeltilmesi gibi işlemler gerçekleştirilir. Bu adımda elde edilen dizilerin BLASTn (nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) gibi bir yöntemle grubun diğer üyelerinin DNA dizileri ile olan benzerliği (Hall, 2004), muhtemel

kontaminasyon (örneğin ITS çekirdek bölgesini dizilerken hata ile bitkilerle simbiyotik yaşayan fungal DNA'nın dizilenmesi veya laboratuvarda meydana gelebilecek bir kontaminasyon sonucu başka bir bitkinin DNA'sının dizilenmesi) riski ve dolayısıyla çalışmanın sonucunun yanlış çıkma ihtimali ortadan kaldırılmış olacaktır.

Dizilerin hizalanması (alignment): Bu adımda benzerlikleri ve farklılıkları görebilmek için moleküler verilerdeki homolog bölgeler birbirine hizalanır. Hem dizilerin düzenlenmesi hem de hizalanması için Geneious (Kearse vd. 2012), MAFFT (Katoh vd. 2005), Muscle (Edgar, 2004), BioEdit (Hall, 1999) gibi programlar kullanılır.

Dış grup seçimi: Filogenetik analizlerde dış grup (outgroup) seçimi, analiz edilen grubun (ingroup) köklenmesini ve evrimsel ilişkilerinin daha doğru bir şekilde belirlenmesini sağlamak için kritik öneme sahiptir. Çünkü yanlış bir dış grup seçimi, filogenetik ağacın yanlış yorumlanmasına ve grupların evrimsel ilişkilerinin yanlış köklenmesine yol açabilir (Smith, 1994). Bu nedenle, dış grup seçimi evrimsel yakınlığa dayanır, ve dış grup incelenen grup ile yeterince yakın evrimsel ilişkiye sahip olmalıdır ancak doğrudan bir parçası olmamalıdır (Kirchberger vd. 2014). Örneğin, *Thalictrum* (Ranunculaceae) için yapılan bir moleküler filogenetik çalışmada Thalictroideae altfamilyasının diğer elemanlarından olan *Aquilegia, Leptopyrum* veya *Isopyrum* örnekleri dış grup olarak kullanılabilir.

Dış grup seçiminde kısa bir literatür taraması ile hangi grubun (veya grupların) dış grup olarak kullanılacağına karar verilebilir. Ancak burada diğer bir önemli nokta dış grup ile incelenen grubun monofiliği, yani tek bir ortak atadan evrimleşmiş olmasıdır. Ayrıca tek bir yakın dış grup kullanımı ile yakınlığı değişen (ancak yine de yakın akraba) farklı birkaç dış grubun, ve böylece daha "dengeli" bir filogenetik ağaç elde etmeyle ilgili de tartışmalar mevcuttur (Bakınız Smith, 1994)

Evrimsel modellerin seçimi: Bu adım filogenetik ağaçların ve evrimsel süreçlerin doğru bir şekilde tahmin edilmesi için kritiktir ve evrimsel modeller, dizilerdeki nükleotid veya amino asit değişimlerinin nasıl gerçekleştiğini tanımlar (Lemey vd. 2009). Yaygın kullanılan bazı nükleotid değişim evrimsel model türleri Jukes-Cantor (JC), Kimura 2-Parametre (K2P) ve General Time Reversible (GTR)'dir (Felsenstein, 2004). JC modeli en basit modeldir ve tüm nükleotid değişimlerini eşit olasılıklı kabul ederken, K2P geçişler (transition) ve transversiyonlar (transversion) arasındaki farklılıkları hesaba katar, GTR evrimsel modeli ise en genel modeldir ve tüm değişim oranlarının farklı olabileceğini varsayar (Yang ve Rannala, 2012). Filogenetik analizler için uygun bir evrim modelini seçerken ModelTest (Posada ve Crandall, 1998), jModelTest (Posada, 2008), PartitionFinder (Lanfear vd. 2012) gibi programlar kullanılır ve bir sonraki adımda bu modeller uygulanır.

Analiz yöntemlerinin seçimi ve filogenetik ağaçların oluşturulması: Moleküler verilerin analizi için filogenetik ağaçlar Maximum Parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML), Bayesian Inference (BI) gibi yöntemlerden bir veya birkaçı kullanılarak oluşturulur. Bu ağaçlar da sıklıkla PAUP (Swofford ve Sullivan, 2003), MrBayes (Huelsenbeck ve Ronquist, 2001), RAxML (Stamatakis, 2014) gibi programlardan elde edilir, ve farklı taksonlar (alttürler, türler, familyalar, takımlar vs.) arasındaki evrimsel ilişkileri, bunların ortak atalarını, evrimin derecesini ve yönünü gösterir. NCBI (GenBank) gibi halka açık veri tabanlarından aynı taksona ve/veya dış gruplara ait DNA dizilerini de çalışmaya katmak sadece örneklemin sayısını artırmayacak, aynı zamanda dünyanın diğer bölgelerinde yayılış gösteren kladın diğer üyeleri ile olan ilişkilerini ortaya çıkaracaktır. Bu ilişkileri, daha doğrusu yaptığımız analizlerin sonucunu görmek için de Figtree (Drummond ve Rambaut, 2007) veya iTOL (Letunic ve Bork, 2021) gibi programlar kullanılabilir.

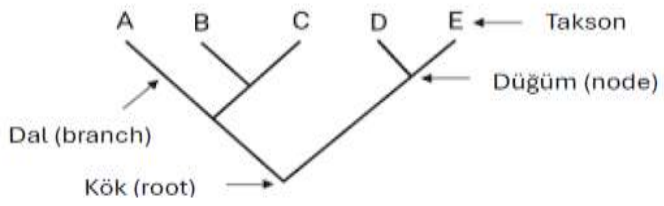
Son olarak, bu filogenetik ağaçlar bize sadece evrimsel ilişkileri değil, aynı zamanda bu ilişkilerin istatistiksel olarak ne kadar desteklendiğini de

gösterir. Bu destek değerleri (support values) filogenetik ağaçların güvenilirliğini ve doğruluğunu değerlendirmede kritik öneme sahiptir. Çokça kullanılan destek değerleri bootstrap (BS) ve posterior olasılıklar ise (posterior probability=PP). Bootstrap değerleri MP ve ML analizleri sonucu, posterior olasılıklar ise Bayesian analizinde belirli bir dallanmanın desteklenme yüzdesini gösterir ve %0 ile %100 arasında bir değer alır. Jackknife değerleri de verinin belirli kısımlarının çıkarılması ile hesaplanan destek ölçüleridir (Felsenstein, 1985), ancak yukarıda bahsedilen iki destek değeri kadar sık kullanılmamaktadır.

3. Moleküler Tekniklerle Elde Edilen Filogenetik Ağaçlar Bize Ne Anlatır?

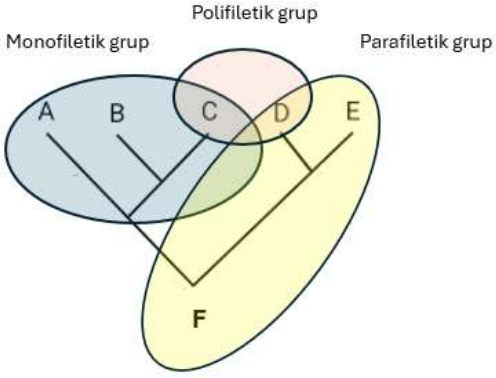
Sistematik botaniğin belkemiğini oluşturan filogenetik ağaçlar, yaşamın evrimini, türler arasındaki ilişkileri, genetik benzerlikleri veya farklılıkları, ortak ataları, kısacası filogenetik ilişkileri anlamak için kullanılan güçlü araçlardır (Hall, 2004. Biyolojik açıdan bu önemli işlevlere sahip filogenetik ağaçlar moleküler ve/veya morfolojik veriler ile oluşturulabilir, ve evrimsel biyoloji, ekoloji, tıp ve çevre bilimleri gibi birçok alanda bilim dünyasında önemli rol oynarlar (Jones ve Brown, 2018). Örneğin evrimsel ve sistematik biyoloji türler arasındaki evrimsel ilişkileri anlamak için filogenetik ağaçları kullanırken, ekoloji türlerin ekosistemler içindeki konumunu ve etkileşimlerini incelemek için bu ağaçlardan yararlanır (Kozak vd. 2012). Tıp alanında ise, filogenetik ağaçlar hastalık taşıyan organizmaların kökenini belirlemek ve hastalık yayılımını izlemek için kullanılır (Holmes ve Drummond, 2017).

Filogenetik ağaçlar, dallar ve düğümlerden oluşur, dallar, farklı türleri veya grupları temsil ederken, düğümler ise ortak ataları gösterir (Kumar ve Hedges, 2016) (Şekil 3).



Şekil 3: Filogenetik bir ağaçta dal, kök ve düğüm kavramlarının grafiksel gösterimi.

Taksonomik grupların evrimsel ilişkilerini ve birbirleriyle nasıl ilişkili olduklarını ifade etmek için ise bazı terimler kullanılır (Ajawatanawong, 2017). Organizmaların sınıflandırılmasında **monofili** ortak atayı ve o ortak atadan türemiş tüm taksonları içerir ve taksonomi açısından en tercih edilen ve bilimsel olarak en sağlam gruplamadır, çünkü ortak bir atadan türetilmiş tüm türleri içerirler (Şekil 4). Çiçekli bitkiler, Poaceae (buğdaygiller), Fabaceae (baklagiller) gibi gruplar örnek olarak verilebilir.



Şekil 4: Filogenetik ağaç üzerinde monofiletik, polifiletik ve parafiletik grupların gösterimi

Polifiletik ise bir grup içinde birden fazla farklı atadan türemiş organizmaları içeren bir taksonomik grubu ifade eder ve polifiletik gruplar, farklı atalara sahip oldukları için taksonomik olarak sorunludur (Şekil 3). Örneğin sukulent bitkiler Cactaceae, Euphorbiaceae, Crassulaceae ve Aizoaceae gibi birçok farklı bitki ailesinde benzer çevresel koşullara adaptasyon sonucu olarak bağımsız olarak evrimleşmiştir ve bu nedenle polifiletik sınıflandırmaya örnek olarak verilebilir. Aynı şekilde birçok familyada bağımsız olarak evrimleşen sucul bitkiler (örneğin Nymphaeaceae, Iridaceae ve Lemnaceae), böcek kapan bitkiler (örneğin Droseraceae, Nepenthaceae ve Lentibulariaceae) ve epifitik bitkiler (örneğin Orchidaceae, Bromeliaceae ve Araceae) de polifiletik bitki gruplarına örnek teşkil ederler (APG, 2016). Bu örneklere benzer olarak halofit (tuzseven) bitkiler tuzlu ortamlarda hayatta kalabilmek için tuza dayanıklı kök sistemleri, tuz dengesini sağlamak için özel yaprak dokuları ve tuz birikimini kontrol etmek için özel salgı bezleri gibi çevresel baskılara karşı evrimleşmiş adaptasyonlar sonunda benzer morfolojik ve fizyolojik özelliklere sahip olacak şekilde evrimleşmişlerdir (Flowers vd. 2010). Burada benzer anatomik ve fizyolojik yapılar bir analog evrim örneğidir, ve analog organlar, farklı organizmalarda benzer işlevlere sahip özelliklerin bağımsız (ortak bir atadan değil) olarak benzer çevresel seçilim baskılarına yanıt olarak ortaya çıktığı durumları ifade eder (Flowers ve Colmer, 2008). Tersine, homolog evrim ise embriyonik gelişim kökenleri benzer ancak aynı görevi yapmak zorunda olmayan organları ifade etmektedir (Ereshefsky, 2009). Örneğin fotosentezle görevli bitki yaprakları kaktüste savunmayla görevli dikenlere dönüşürken, böcek kapan bitkilerde ise yakaladığı böcekleri sindirmek için besin elde etmek amacıyla özelleşmiş tüyler ve kapanma mekanizmalarına evrimleşmiştir. Ancak her ne kadar görevleri farklı olsa da yapısal olarak aynıdırlar.

Son olarak, **parafiletik** gruplandırma ise son ortak atayı içine alırken bu atadan türemiş taksonların sadece bazılarını kapsar (Şekil 3). Örnek vermek

gerekirse geleneksel anlamda kullanılan "dikot bitkiler" tanımı dikot bir atadan evrimleşmiş olan monokot bitkileri hariç tuttuğu için parafiletik bir gruptur. Aynı şekilde yeşil algler (yeşil algler yani Chlorophyta, yeşil bitkiler yani Viridiplantae içinde yer alır ancak kara bitkilerini yani Embryophyta'yı içermez) ve karayosunları (karayosunları yani Bryophyta Embryophyta'nın içinde yer alır, ancak damarlı bitkileri yani trakeofitleri içermez) moleküler sistematik analizler ile belirlenmiş parafiletik gruplardır.

Ancak, bu ağaçların oluşturulması ve yorumlanması karmaşık bir süreçtir, her zaman kesin değildir. Ayrıca sadece kullanılan verinin değil, aynı zamanda metodların da güncellenmesi gerekebilir (Rambaut ve Drummond, 2020). Örneğin moleküler filogenin emekleme çağında çokça kullanılan Maximum Parsimony (MP) yöntemi yerini daha doğru sonuçlar veren ve büyük çapta verilerin analizine olanak tanıyan daha sofistike ve hesaplama gücü yüksek, karmaşık modellemeleri içeren ve homoplazi ve long branch attraction (LBA) gibi bağımsız evrimsel olayları dikkate alan yöntemler olan ML ve BI metodlarına bırakmıştır. (Baum ve Smith, 2013). Aynı şekilde geçmişte yoğun bir kullanım alanına sahip olan ve genomdaki belirli bölgelere odaklanarak genetik varyasyonu incelemek için kullanılan bir moleküler biyoloji tekniği olan AFLP yönteminin kullanımı giderek azalmakta, yerini daha hassas, maliyet-etkin ve kapsamlı teknikler olan ve genomun diğer bölgelerindeki genetik varyasyonu da göz önüne alan SNP analizi gibi yöntemlere bırakmaktadır. Aynı şekilde *mat*K, *trn*L *rbc*L gibi belirli gen bölgeleri kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçların yerini NGS yöntemiyle elde edilen tüm genom verisi ile oluşturulan ağaçlara bırakmaktadır. Bu yöntemin de kendine has zorlukları (maliyet ve biyoinformatik) ve kısıtlamaları (rastgelelik) olsa da, yine de daha doğru ve güvenilir sonuçlar sunduğu aşikardır (Shendure ve Ji, 2008).

4. Moleküler Tekniklerin Botanik Bilimine Diğer Katkıları

Moleküler teknikler, bitki türlerinin tanımlanmasında ve yeni türlerin keşfinde de önemli bir rol oynar. Moleküler veriler kullanılarak yapılan bu çalışmalar, daha önce tanımlanmamış veya yanlış sınıflandırılmış türlerin keşfedilmesine olanak tanır. Örneğin DNA barkodlama, bir organizmanın tanımlanması için kısa bir DNA dizisinin kullanılmasıdır (Hebert vd, 2003). Bu yöntem, özellikle morfolojik olarak benzer türlerin ayrımında oldukça etkilidir. Yine bu yöntem ile nesli tükenmekte olan türlerin izlenmesi ve korunmasını, kriptik türlerin tanımlanmasını, biyolojik çeşitlilik çalışmalarında örneklerin doğrulanmasını büyük ölçüde kolaylaştırmıştır (Hebert ve Gregory, 2005).

Moleküler tekniklere dayalı bitki sistematiği bitki türlerinin biyocoğrafik dağılımlarını, göç yollarını, türlerin çevresel değişimlere nasıl tepki verdiğini ve evrimsel tarihçelerini de daha ayrıntılı bir şekilde incelememize olanak tanır. Biyocoğrafik analizler türlerin veya diğer taksonomik grupların coğrafi dağılımlarının tarihçesini incelemek, taksonların günümüz yayılışından sorumlu dispersal, vikaryans gibi tarihsel biyocoğrafik süreçleri anlamak için kullanılırken; moleküler tarihleme ise türlerin veya populasyonların evrimsel tarihini; türlerin ayrılması ya da ortak atanın ortaya çıkışı gibi belirli olayların zamanlamasını belirlemek için kullanılır (Felsenstein, 2004). Bu bağlamda, her birinin farklı bir algoritması olan RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies, Yu vd. 2015), BEAST (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees, Drummond ve Rambaut, 2007), Mesquite (Maddison ve Maddison, 2007), DIVA (Dispersal-Vicariance Analysis, Yu vd. 2010) gibi programlar bitkilerin biyocoğrafik tarihini anlamamızı sağlarken, BEAST, r8s (Sanderson, 2003) gibi programlar da moleküler tarihleme analizlerine olanak verir. Son olarak ise atasal karakter (ancestral character/state) analizleri ile morfolojik veya anatomik karakterin RASP, BayesTraits, Mesquite gibi programlar kullanılarak bir filogenetik ağaç üzerinde incelenmesidir, ve bu analizler

"grubun atasal karakter özellikleri nasıldı, bu karakterler hangi dallarda nasıl evrimleşti ve zaman içinde nasıl değişti" gibi sorulara yanıt arar.

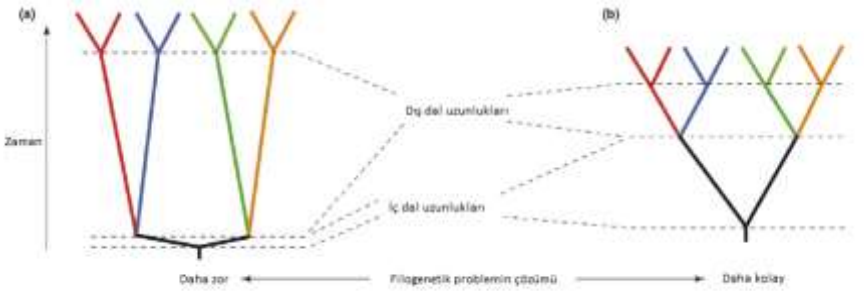
Moleküler teknikler, ayrıca bitkilerde hibrid türlerin kökenini ve genetik yapısı, hibridizasyon ve türleşme süreçlerinin anlaşılmasına, bitki-hayvan etkileşimlerinin (örneğin taşıyıcıları olan böceklerin ve bitkilerin etkileşimleri gibi bitki üreme biyolojisi ve ekosistem işleyişleri), biyolojik çeşitliliğin korunması (örneğin bitki popülasyonlarının genetik yapısını inceleyerek nesli tükenme tehlikesi altındaki türlerin korunması, koruma biyolojisi projelerinde genetik işaretçiler ile genetik varyasyonun izlenmesi ve stratejilerin geliştirilmesi, gen akışı, genetik sürüklenme ve tarihsel göç desenlerinin belirlenmesi) anlaşılmasına da katkıda bulunur.

5. Gelecek Perspektifleri, Zorluklar ve Teknik Sınırlamalar

Bitki sistematiğindeki gelecekteki yönelimler muhtemelen genomikteki gelişmelerle şekillenecektir. Ancak moleküler teknikler, büyük miktarda veri üretir ve bu verilerin yönetimi ve analizi önemli bir zorluktur. Biyoinformatik ise bu verilerin işlenmesi ve yorumlanmasında kritik bir rol oynar. Bu nedenle etkili veri yönetimi ve analiz araçlarının geliştirilmesi, bilimsel işbirliklerini ve ilerlemeyi teşvik edecek şekilde verilerin açık erişimli ve paylaşılabilir olması bir diğer önemli husustur ve moleküler sistematik araştırmaların başarısı için gereklidir.

Güçlü olmalarına rağmen, moleküler tekniklerin bazı sınırlamaları da vardır. Ve hatta çiçekli bitkiler grubu da dahil olmak üzere bu çok sık rastlanan bir problemdir (örneğin Koenen vd. 2020). Özellikle hibritleşme, introgression, birbiri ile çelişen gen ağaçları (conflicting gene trees), tüm genom duplikasyonu (poliploidi), yatay gen transferi (horizontal gene transfer), eksik soy hattı ayrışması (incomplete lineage sorting) gibi mekanizmalar veya kullanılan filogenetik metod, yanlış dış grup seçimi, uzun dal çekimi (LBA), yetersiz örneklem, yetersiz veri gibi tekniksel sorunlar da filogenetik analizleri zorlaştırır (Aygören Uluer vd. 2020). Bir diğer olasılık ise bitki grubunun

orijininde yaşanmış olan hızlı yayılım (rapid radiation) problemidir. Bu gibi durumlar uzun dış dallar ve kısa iç dallar ile karakterize edilir (Şekil 5) ve diğer filogenilerin aksine çözmek daha zordur (Whitfield ve Lockhart, 2007). Benzer ancak daha zor bir senaryo ise kitlesel yok oluşları takip eden hızlı yayılımlardır (örneğin Crisp ve Cook, 2009). Tüm genom analizleri bu sorunlarının bazılarının (örneğin yetersiz veri sorunu, birbiri ile çelişen gen ağaçları ve grubun orijinde hızlı bir yayılım) üstesinden gelebilir. Ancak burada dikkat edilmesi gereken bir diğer konu bu analizlerin yüksek destek oranları ile yanlış filogenetik ilişkileri destekleme ihtimalidir ve bu konuda dikkatli olunmalıdır.



Şekil 5: a) Hızlı türleşme (ancient rapid radiation) ve b) nispeten istikrarlı bir türleşme arasındakı fark (Whitfield ve Lockhart, 2007, s: 257'den uyarlanmıştır).

Bir başka konu ise "daha fazla örnek mi, daha fazla veri mi" sorusudur (Rokas ve Carroll, 2005) ve bu sorun gelişmiş ülkelerde bile (özellikle tüm genom analizleri için) halen bir problemdir. Bir moleküler sistematik çalışmanın güvenilir sonuçlar verebilmesi için örneklemin "yeterli" olması gereklidir. Ancak maddi kaynakların yetersizliği araştırmacıları "taksonun mümkün olduğunca fazla üyesini çalışmama dahil etmek için örneklemi mi geniş tutsam, yoksa örneklemi dar tutup zor sistematik soruları çözmek için daha fazla gen bölgesi mi çalışsam" sorusuna yöneltmektedir. Bu bağlamda, sadece taksonun genel bir evrimsel resmini çizmek için değil, aynı zamanda taksonun ve o taksonu oluşturan grupların monofiletik olup olmadığını anlamak

için geniş bir örneklem çok önemlidir. Ancak aynı zamanda çözülmesi görece daha kolay olan filogenetik sorulara (daha fazla veri ile çözülmesi muhtemel soft politomiler) nazaran çözülmesi çok daha fazla veri gerektiren, hatta bazı durumlarda imkansıza yakın olan filogenilerde (hard politomi) ise elde edilecek verinin büyüklüğü de en az örneklem kadar önemlidir (Maddison, 1989). Ve bu durumlarda araştırmacının muhtemelen zor bir karar vermesi gerekebilir. Tüm genom analizlerini içeren çalışmalarda aslında sıklıkla bu durumla karşılaşıyoruz. Örneğin son zamanlarda yapılan birçok tüm genom çalışmasında birkaç düzineyi geçmeyecek kadar örnek sayısı ile tüm cinsin filogenisi çözülmeye çalışılmıştır. Aksine, sadece birkaç gen bölgesi ile yapılan çalışmalarda ise örneklem sayısı hayli fazladır, yüzlerceyi hatta binlerceyi bulabilir. Ancak tüm genom analiz maliyetinin zamanla düşmesi sonucu bu sorun yakın zamanda muhtemelen çözüme ulaşacaktır.

Diğer taraftan GenBank gibi halka açık veri tabanlarında depolanan dizilerin eldesinde yanlış tür tanımlaması, kontaminasyon (örneğin bir örnekteki sekans başka bir organizmanın DNA'sını içerebilir), sekanslama sürecinde yapılan teknik hatalar gibi nedenler DNA veya protein dizilerinin doğruluğuna gölge düşürebilir (Bromhan, 2016). Bunlardan özellikle ilki moleküler sistematik çalışmalar için büyük bir sorun teşkil etmektedir. Bir çalışmaya göre GenBank'ta halihazırda depo edilmiş mantar (Fungi) DNA dizilerinden %20 kadarı yanlış tür tayinine dayanmaktadır (Nilsson vd. 2006). Bu probleme önerilebilecek çözümlerden belki de en güvenilir olanı moleküler verisi bu veri tabanına depolanan her bir bitki örneğinin bir herbaryumda saklanması ve bitkinin teşhisine dair gerekli fotoğrafların da sisteme yüklenmesidir. Ancak bu konuda herhangi bir gelişme yoktur. Diğer taraftan araştırmacılar tarafından verinin dikkatle incelenmesi (örneğin hizalama esnasında şüpheli gözüken dizilerin çalışmaya dahil edilmemesi), hatta bu sorunlu dizilerin GenBank yetkilileri ile iletişime geçilerek sistemden elenmesi şu aşamada araştırmacıların bireysel olarak alabileceği önlemler arasındadır.

Moleküler çalışmalar için bitki materyali toplanması, biyolojik çeşitliliğin korunması ve yerli halkların hakları ile ilgili etik kaygılar doğurabilir. Örneğin Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesi'nin taraflarından biri olan Türkiye, ~3000'i endemik olmak üzere 9500'den fazla bitki çeşidine sahiptir, ve sahip olduğu bu büyük ekolojik zenginlik ile bu materyalin korunması daha büyük bir dikkati hak etmektedir (Tan, 2010). Her ülkenin kendi biyolojik materyalini diğer ülkelerden gelen araştırmacılarla paylaşmama hakkı olduğu gibi, birçok araştırmacının da Türkiye'yi turist olarak ziyaret ettiği, yaprak, tohum, çiçek soğanı, böcek, mikroorganizma gibi biyolojik materyalleri hiçbir zarar vermeden topladığı bildirilmiştir (Karagöz, 1998). Ne yazık ki hızlı bir literatür taraması bile "turistik" amaçlı gelerek bitki örneği toplayan, ve bunları kendi ülkesine götürerek çalışmalar yapan bilim insanlarının sayısının hiç de az olmadığını göstermektedir, ve bu da gelişmemiş veya gelişmekte olan ülkelerin doğal kaynaklarının sömürülmesine neden olmaktadır. Bu nedenle herhangi bir ülkeden herhangi bir biyolojik materyal toplanmadan önce idari birimlerden gerekli izinlerin alınması, fikri mülkiyet haklarının karşılanması, fayda paylaşımı anlaşmalırının yapılması gereklidir (Davalos vd 2003; Blaustein, 2006). Burada bitki araştırmacıları kadar dergilerin de bu izinlerin alınıp alınmadığı veya en azından ilgili ülkelerden araştırmacıların yayına dahil edilip edilmediği konusunda dikkatli olmaları önemlidir.

Ancak, birçok ülke ve bu ülkelerde ikamet eden bilim insanları için moleküler çalışmaların yüksek maliyeti ve bazen de teknik uzmanlık gereksinimi, bu tekniklerin yaygın olarak benimsenmesinin önünde engel teşkil edebilir, hatta bazı durumlarda (özellikle finansal nedenler sonucunda) moleküler sistematik bir çalışmanın o ülkede yapılmasını tamamen engelleyebilir. Bu da biyolojik verinin eksik analizine (örneğin tüm Avrupa'da yayılış gösteren bir cinsin Türkiye ayağının incelenmemesi), hatta yanlış sonuçlara (örneğin bir cinsin orijinin aslında çalışmaya dahil edilmeyen bir coğrafik bölge olması) neden olabilir. Bu nedenle gelişmiş ve

gelişmemiş/gelişmekte olan ülkeler arasında işbirliği gerekli izinlerin kolaylaştırılması ile mutlaka yapılmalıdır. Ancak bu işbirliği sömürüye neden olmadan, ve sadece gelişmiş ülkenin çıkarlarını düşünmeden olmalıdır.

Sonuç

Moleküler teknikler, bitki sistematiği alanında devrim niteliğinde değişiklikler yapmış ve bu alandaki araştırmaların doğruluğunu ve verimliliğini büyük ölçüde artırmıştır. DNA dizileme, PCR, genetik işaretçiler ve biyoinformatik gibi teknolojiler, bitkilerin filogenetik ilişkilerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamış, tür tanımlama süreçlerini kolaylaştırmıştır. Hatta hipotezlerini kurmak ve test etmek için evrimsel geçmişi dikkate almaları gereken bilim insanları için filogenetik metadolojisi günümüzde karşılaştırmalı biyolojinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır (Simpson, 2012). Gelecekte, moleküler tekniklerin daha da geliştirilmesi ve yenilikçi uygulamaların yaygınlaşması ile bitki alanında daha büyük başarılar elde edileceği su götürmez bir gerçektir. Bu süreçte, etik ve regülasyon sorunlarına dikkat edilmesi ve biyolojik çeşitliliğin korunması için gerekli önlemlerin alınması da büyük önem taşımaktadır.

Kaynakca

Ajawatanawong, P. 2017. Molecular phylogenetics: Concepts for a newcomer. Network Biology: 185-196.

Angiosperm Phylogeny Group, 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants. Annals of the Missouri Botanical Garden: 531-553.

Angiosperm Phylogeny Group, 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Botanical Journal of the Linnean Society, 161(2): 105-121.

Angiosperm Phylogeny Group, 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. Botanical Journal of the Linnean Society, 181(1): 1-20.

Aygören Uluer, D., Forest, F. and Hawkins, J.A., 2020. Supermatrix analyses and molecular clock rooting of Fabales: Exploring the effects of outgroup choice and long branch attraction on topology. Botany, 98(4): 231-247.

Baum, D.A. and Smith, S.D. 2012. Tree Thinking: An Introduction to Phylogenetic Biology. 1st ed. Greenwood Village, CO.

Blaustein, R. 2006. Genetic resources and the Convention on Biological Diversity. BioScience, 56(7): 560-563.

Bromham, L. 2016. An introduction to molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press.

Calahorra-Oliart, A., Ospina-Garcés, S.M. and León-Paniagua, L. 2021. Cryptic species in *Glossophaga soricina* (Chiroptera: Phyllostomidae): do morphological data support molecular evidence?. Journal of Mammalogy, 102(1): 54-68.

Crisp, M.D. and Cook, L.G., 2009. Explosive radiation or cryptic mass extinction? Interpreting signatures in molecular phylogenies. Evolution, 63(9): 2257-2265.

Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press.

Daly, D.C., Cameron, K.M. and Stevenson, D.W. 2001. Plant systematics in the age of genomics. Plant Physiology, 127(4): 1328-1333.

Davalos, L.M., Sears, R.R., Raygorodetsky, G., Simmons, B.L., Cross, H., Grant, T., Barnes, T., Putzel, L. and Porzecanski, A.L. 2003. Regulating access to genetic resources under the Convention on Biological Diversity: an analysis of selected case studies. Biodiversity & Conservation, 12(7): 1511-1524.

Drummond, A.J. and Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. BMC Evolutionary Biology, 7: 1-8.

Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research, 32(5): 1792-1797.

Ereshefsky, M. 2009. Homology: integrating phylogeny and development. Biological Theory, 4: 225-229.

Felsenstein, J. 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. Evolution, 39(4): 783-791.

Felsenstein, J. 2004. Inferring Phylogenies, Sinauer Associates Sunderland, MA.

Flowers, T.J. and Colmer, T.D., 2008. Salinity tolerance in halophytes. New Phytologist: 945-963.

Flowers, T.J., Galal, H.K. and Bromham, L. 2010. Evolution of halophytes: multiple origins of salt tolerance in land plants. Functional Plant Biology, 37(7): 604-612.

Hall, T.A. 1999, January. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In Nucleic Acids Symposium Series 41 (41): 95-98).

Hall, B.G. 2004. Phylogenetic Trees Made Easy: A How-to Manual; Sinauer Associates.

Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L. and deWaard, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 270(1512): 313-321.

Hebert, P.D. and Gregory, T.R. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. Systematic Biology, 54(5): 852-859.

Holmes, E. C. and Drummond, A. J. 2017. The Evolutionary Genetics of Emerging Viruses. Annual Review of Genetics, 41: 379-407.

Huelsenbeck, J.P. and Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics, 17(8): 754-755.

Jeon, H., Kim, J.E., Yang, J.W., Son, H. and Min, K., 2023. Application of direct PCR for phylogenetic analysis of *Fusarium fujikuroi* species complex isolated from rice seeds. Frontiers in Plant Science, 13: 1093688.

Jones, A. and Brown, B. 2018. Molecular Phylogenetics: Concepts and Applications. Annual Review of Genetics, 42: 87-110.

Karagöz, A. 1998. Biyolojik çeşitlilik sözleşmesi. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 1(7): 1-9.

Karp, A., Seberg, O.L.E. and Buiatti, M. 1996. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. Annals of Botany, 78(2): 143-149.

Käss, E. and Wink, M. 1996. Molecular evolution of the Leguminosae: phylogeny of the three subfamilies based on *rbc*L-sequences. Biochemical Systematics and Ecology, 24(5): 365-378.

Katoh, K., Kuma, K.I., Toh, H. and Miyata, T. 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. Nucleic Acids Research, 33(2): 511-518.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C. and Thierer, T. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform

for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics, 28(12): 1647-1649.

Kirchberger, P.C., Sefc, K.M., Sturmbauer, C. and Koblmüller, S. 2014. Outgroup effects on root position and tree topology in the AFLP phylogeny of a rapidly radiating lineage of cichlid fish. Molecular Phylogenetics and Evolution, 70: .57-62.

Koenen, E.J., Ojeda, D.I., Steeves, R., Migliore, J., Bakker, F.T., Wieringa, J.J., Kidner, C., Hardy, O.J., Pennington, R.T., Bruneau, A. and Hughes, C.E. 2020. Large-scale genomic sequence data resolve the deepest divergences in the legume phylogeny and support a near-simultaneous evolutionary origin of all six subfamilies. New Phytologist, 225(3): 1355-1369.

Kozak, K.H and Wiens, J.J. 2012. Phylogeny, ecology, and the origins of climate–richness relationships. Ecology, 93(sp8): S167-S181.

Kumar, S. and Hedges, S. 2016. Building Phylogenetic Trees. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 32: 43-66.

Kuzmina, M.L., Braukmann, T.W., Fazekas, A.J., Graham, S.W., Dewaard, S.L., Rodrigues, A., Bennett, B.A., Dickinson, T.A., Saarela, J.M., Catling, P.M. and Newmaster, S.G. 2017. Using herbarium-derived DNAs to assemble a large-scale DNA barcode library for the vascular plants of Canada. Applications in Plant Sciences, 5(12): 1700079.

Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y. and Guindon, S. 2012. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. Molecular Biology and Evolution, 29(6): 1695-1701.

Legume Phylogeny Working Group, 2017. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. Taxon, 66(1): 44-77.

Lemey, P., Salemi, M. and Vandamme, A.M. 2009. The phylogenetic handbook: a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing. Cambridge University Press.

Letunic, I. and Bork, P. 2021. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. Nucleic acids research, 49(W1): W293-W296.

Maddison, W. 1989. Reconstructing character evolution on polytomous cladograms. Cladistics, 5(4): 365-377.

Maddison, W. and Maddison, D., 2007. Mesquite 2. A Modular System for Evolutionary Analysis. Available online at: http://www. mesquiteproject. org.

Nilsson, R.H., Ryberg, M., Kristiansson, E., Abarenkov, K., Larsson, K.H. and Kõljalg, U. 2006. Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. PloS One, 1(1): e59.

Posada, D. and Crandall, K.A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 14(9): 817-818.

Posada, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. Molecular Biology and Evolution, 25(7): 1253-1256.

Rambaut, A., & Drummond, A. J. 2020. Molecular Evolution: Principles and Methods. Nature Reviews Genetics, 18(11): 708-721.

Rokas, A. and Carroll, S.B., 2005. More genes or more taxa? The relative contribution of gene number and taxon number to phylogenetic accuracy. Molecular Biology and Evolution, 22(5): 1337-1344.

Sanderson M.J. r8s: inferring absolute rates of molecular evolution and divergence times in the absence of a molecular clock. Bioinformatics. 2003;19(2):301–2.

Savolainen, V. and Chase, M.W. 2003. A decade of progress in plant molecular phylogenetics. Trends in Genetics, 19(12): 717-724.

Shendure, J. and Ji, H. 2008. Next-generation DNA sequencing. Nature Biotechnology, 26(10): 1135-1145.

USA.

Simpson, M.G. 2012. Plant Systematics. Elsevier Inc., Burlington, MA, USA.

Smith, A.B. 1994. Rooting molecular trees: problems and strategies. Biological Journal of the Linnean Society, 51(3): 279-292.

Soltis, D.E., Soltis, P.S., Chase, M.W., Mort, M.E., Albach, D.C., Zanis, M., Savolainen, V., Hahn, W.H., Hoot, S.B., Fay, M.F. and Axtell, M. 2000. Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, *rbc*L, and *atp*B sequences. Botanical Journal of the Linnean Society, 133(4): 381-461.

Sommer, R.J. 2020. Phenotypic plasticity: from theory and genetics to current and future challenges. Genetics, 215(1): 1-13.

Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics, 30(9): 1312-1313.

Swofford, D.L. and Sullivan, J. 2003. Phylogeny inference based on parsimony and other methods using PAUP*. The phylogenetic handbook: a practical approach to DNA and protein phylogeny, cáp, 7: 160-206.

Tan, A. 2010. Türkiye bitki genetik kaynakları ve muhafazası. Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi, 20(1): 7-25.

Whitfield, J.B. and Lockhart, P.J. 2007. Deciphering ancient rapid radiations. Trends in Ecology & Evolution, 22(5): 258-265.

Yang, Z. and Rannala, B. 2012. Molecular phylogenetics: principles and practice. Nature Reviews Genetics, 13(5): 303-314.

Yu, Y., Harris, A.J. and He, X. 2010. S-DIVA (Statistical Dispersal-Vicariance Analysis): a tool for inferring biogeographic histories. Molecular Phylogenetics and Evolution, 56(2): 848-850.

Yu, Y., Harris, A.J., Blair, C. and He, X. 2015. RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies): a tool for historical biogeography. Molecular Phylogenetics and Evolution, 87: 46-49.

Zuckerkandl, E. and Pauling, L. 1962. Molecular disease, evolution, and genetic heterogeneity. In M. Kasha & B. Pullman (Eds.), Horizons in Biochemistry. Academic Press.

BÖLÜM 10

MULTİFAKTÖRİYEL KALITIMLI HASTALIKLARA BİR MODEL: ALZHEIMER HASTALIĞI

Doç. Dr. Mustafa Türker DUMAN[17]

DOI: https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.12707356

[17] Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, email: dumanturker@yahoo.com, ORCID:0000-0003-0093-239

GİRİŞ

Genetik; Mendel'in 19. yüzyıldaki çalışmalarıyla başlayarak, zamanla gelişmiş ve günümüzde en merak uyandıran, en ilgi çekici alanlardan biri haline gelmiştir. Genetiğin inceleme alanlarından biri olan insan genetik hastalıkları, genellikle üç ana başlık altında sınıflandırılır: Tek gen hastalıkları, kromozomal hastalıklar ve multifaktöriyel hastalıklar [1].

Mendel tipi kalıtım insanlarda çoğu hastalığın geçiş şeklini açıklayamamaktadır. Bazı hastalıkların belirgin olmayan etkilerle birlikte ailelerde birikebildiği gözlemlenmiştir. Bu hastalıklar, kalıtsal olmalarına rağmen etkileri genellikle hafiftir ve ancak çevresel faktörlerle etkileşime girdiklerinde aktifleşebilirler. Bu tür minör etkili yatkınlık genlerine dayanan kalıtım şekli "multifaktöriyel kalıtım" olarak adlandırılır [2].

Multifaktöriyel hastalıklar, genetik faktörlerin yanı sıra çevresel etkenlerin de rol oynadığı hastalıklardır [3]. Başka bir deyişle; biyolojik, davranışsal, sosyal ve psikolojik etkenlerin etkileşimiyle oluşan hastalık grubudur. Tek başlarına etkileri sınırlı olduğundan, genellikle toplumda negatif bir seçilime uğramazlar ve yaygın olarak görülürler [2].Yine bu hastalıkların pek çoğunun üreme başarısına olumsuz bir etkisi yoktur.

Multifaktöriyel hastalıklar, genetik ve çevresel faktörlere bağlı olarak gelişirler. Bu hastalıklar, genlerdeki küçük değişikliklerin bir araya gelmesiyle oluşan bir bütündür. Diyabet, böbrek hastalıkları, hipertansiyon, nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın kalıtımında önemli bir rol oynarlar ve konjenital malformasyonlara neden olabilirler.

Nörodejeneratif hastalıklar, sinir hücrelerindeki yapısal ve işlevsel bozulma ile karakterize edilen, dünya genelinde milyonlarca insanı etkileyen, multifaktöriyel ve ölümcül bir hastalık grubudur. Alzheimer, Parkinson, Huntington, Amyotrofik Lateral Skleroz ve Multiple Skleroz, yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen ve hızlı ilerleme gösteren en önemli nörodejeneratif hastalıklardır [4, 5].

Nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıkma nedeni, merkezi sinir sisteminde bulunan hücrelerin hasar görmesi veya kaybıdır. Demansın en yaygın tipi olarak Alzheimer hastalığı (AH), multifaktöriyel bir yapısı olmasının yanı sıra genetik ve nöropatolojik faktörlerle de iç içedir. Alzheimer geri dönüşü olmayan, hafıza kaybı ve bilişsel gerileme ile karakterize bir hastalıktır.

Etiyolojik unsurları net olarak bilinmeyen Alzheimer hastalığının oluşumu ve gelişiminde etkili olduğu düşünülen pek çok faktör mevcuttur. Alzheimer, geçmişten gelen genetik ve içerisinde bulunulan çevresel faktörlerin birbirine entegre olmasıyla ortaya çıkan multifaktöriyel bir bozukluktur. AH patogenezinde rol oynayan en önemli etiyolojik faktörün yaş olmasına rağmen, bu unsur risk faktörü olarak tek başına yeterli gelmemektedir. Hastalığın oluşum mekanizmasında yaş kadar diğer genetik risk faktörlerinin de rol aldığı bilinmektedir [6].

AH, 1907 yılında hastanede beş yıl süresince izlenip ölümü sonrası otopsisi yapılan; genel kortikal atrofisi, bellek kaybı, dil defektleri ile işitsel halüsinasyonları olan, nesne kullanım becerisi gerilemiş 51 yaşındaki Auguste D. isimli hastanın ekibinde yer alan Alois Alzheimer'ın ismiyle anılmaktadır.

Raporda belirtilen ve ilerleyen yıllarda da doğrulanan Alzheimer patogenezine ait iki temel unsur göze çarpmaktadır:

- Korteksin normalden ince olması
- Beyinde iki anormal bulgunun varlığı

Bulguların ilki, yaşlı beyinlerinde de saptanan senil plaklar, diğeri ise ilk kez tanımlanacak olan nörofibriler yumaklardır [7].

Nörofibriler yumaklar otopsi öncesinde hiç tanımlanmamış olup, o dönemlerde bu yeni bulgu yeni bir hastalığa işaret etmiştir. Alman psikiyatrist ve nöropatolojist olan Dr. Alzheimer, yeni bir hastalık keşfi olarak gördüğü bu vakayı "Serebral korteksin tuhaf bir hastalığı" başlığını kullanarak duyurmuştur [8].

Alzheimer hastalığının isim babası ise Klinik Psikiyatri el kitabında bu bozukluğa ilk defa "Alzheimer hastalığı" terimini kullanan Dr. Alzheimer'ın klinik şefi Dr. Emil Kraepelin olarak alanyazına geçmiştir [9].

AH genel olarak "Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı; LOAD=GBAH" veya "Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı; EOAD=EBAH" şeklinde sınıflandırılmaktadır. EBAH semptomları 65 yaşın öncesinde başlamakta, hastaların yaklaşık %4-6'lık bölümünü oluşturmaktadır. EBAH, Aβ peptidinin fizyolojik işlenmesini engelleyen Presenilin 1 (PSEN1), Presenilin 2 (PSEN2) ve Amiloid öncü protein (APP) genlerindeki mutasyonlarla ilişkilendirilmektedir. PSEN1 geninin 300'den fazla, PSEN2 geninin ise 80'den fazla mutasyonu tanımlanmıştır [10]. Missense mutasyonlar, γ-sekretaz kompleksinin füzyonunu engelleyen ve APP'nin işlenmesini değiştiren proteinlerin üretimini sağlayarak Aβ42/Aβ40 oranında artış meydana gelmesine yol açar [11]. Bu proteini kodlayan APP geni, çeşitli izoformlara sahiptir ve bunlardan üçü AH için oldukça önemlidir. APP genindeki mutasyonlar, nöronlarda total Tau ve fosforile Tau seviyelerinde artışa neden olur. Hem genlerin hem de çevresel faktörlerin etkili olduğu GBAH'de ise genetik yapı çok daha komplekstir.

GBAH kalıtım aralığı %13-80 aralığında olup; hastada görülmesi için en önemli risk faktörleri bireyin yaşı, geçmiş aile öyküsü ve Apolipoprotein-E (APOE) genotipi olarak belirlenmiştir. Tüm bunların yanı sıra AH patogenezinde rol alan TREM2, PICALM, ABCA7, BIN1, CD2AP, SORL1, CD33, EPHA1 gibi çok sayıda gen de bildirilmiştir.

Öte yandan, bildirilen bu genler henüz AH'nin karmaşıklığını açıklamaya yetmemektedir. AH'ye neden olabilecek 29'dan fazla risk lokusu ve 215'ten fazla potansiyel risk geni tanımlanmıştır. APOE genindeki belirli varyantlar, Alzheimer hastalığının en iyi bilinen genetik risk faktörleridir. APOE geni, APOE-ε2, APOE-ε3 ve APOE-ε4 olmak üzere üç farklı alleli

içerir. APOE-ε4 aleli Alzheimer hastalığı riskini artırırken, APOE-ε2 aleli ise koruyucu bir etki gösterebilir.

Miyeloid hücrelerde bağışıklıkla ilgili genlerin ifadesinde yer alan bir transkripsiyon faktörü olan PU.1 (SPI1), bağışıklık yanıtı ile ilişkili temel yolları düzenlerken AH'ye de katkıda bulunabilir [12, 13]. Benzer şekilde, bir miyeloid hücre yüzey antijeni olan CD33, sitokin üretiminin negatif düzenlemesinde rol alır ve mikroglial aktivasyonu modüle ederek AH'de rol oynayabilir.

Bunların yanı sıra, Alzheimer belirteçlerinden biri olarak bilinen Tau metabolizmasında çeşitli genler de tanımlanmıştır: CD2AP, CD33, BIN1, CR1, PICALM, ABCA7, TREM2 ve CLU hipokampüste güçlü bir şekilde ifade edilirken mikroglialarda yüksek oranda ifade edilen risk genlerini de temsil etmektedir ve AH'de bağışıklık yanıtı ile ilişkilendirilirler [14]. Bu genler, erken belirteçlerin ve nöroinflamatuar süreçleri sınırlamaya odaklanan terapötiklerin geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir.

AH'de etkili olduğu bilinen bazı gen ve işlevleri şu şekildedir:

Çizelge 1 AH'de rol alan bazı genler ve işlevleri [15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25]

Gen	**Fiziksel İşlevi**	**AH'deki Rolü**
ABCA7	Lipid metabolizmasını, fagositozu, apoptozu ve mikroglia tarafından Aβ'nin fagositozunu modüle eder.	Aβ işleme ve β-sekretaz tarafından APP'nin düzenlenmesinde değişiklik yapar.
BIN1	İmmün yanıtta, kalsiyum homeostazında, apoptozda, sinaptik veziküllerin	Amyloid (β-sekretaz aktivitesi aracılığıyla) ve Tau patolojisine katkıda bulunur ve iltihap,

	endositozunda ve plazma membranının dinamiklerinde yer alır.	apoptoz ve kalsiyum homeostazı ile ilişkilidir.
PICALM	Otofajiyi, membran metabolizmasını, hücre reseptörlerinin internalizasyonunu, sinaptik iletimi, apoptotik hücrelerin uzaklaştırılmasını ve APP işleme için endositoz yollarını modüle eder.	Sinaptik işlev bozukluğu ve lipid metabolizmasının değişmesi ile ilişkilidir.
CLU	Lipid metabolizmasına, hücre çoğalmasına, apoptoza, bağışıklık yanıtına ve nöronal diferansiyasyona katılır.	Aβ agregasyonunda, lipid metabolizmasında, hücre döngüsünün düzenlenmesinde ve nöronal apoptozunun, nöroinflamasyonun düzenlenmesinde değişikliklere neden olur.
TREM2	Proliferasyonu, hayatta kalma, fagositozu ve inflamasyonu düzenler.	Mikroglial disfonksiyonlar, endoplazmik retikulum stresi, Tau ve amiloid patolojisi ve nöroinflamasyon ile ilişkilidir.
TOMM40	Mitokondriyal membran solunum zincirinin stabilizasyonunda rol oynar.	Mitokondriyal membran disfonksiyonu ve sonrasında oksidatif streste rol alır.

CASS4	Hücre yapışmasında, hücre yayılmasında, kalsiyum sinyalizasyonunda ve mikrotübül stabilizasyonunda yer alır.	Nöritik plakların ve NFT'nin oluşumunda, nöroinflamasyon ve sinaps bozuklukları, kalsiyum sinyalizasyonu ve mikrotübül stabilizasyonunda disfonksiyona neden olur.
ACE	Kan basıncını, elektrolit homeostazını, sinaptik plastisiteyi ve Aβ metabolizmasını düzenler.	Bilişsel gerileme, oksidatif stres, nöroinflamasyon, yüksek Aβ ve Tau yükü seviyeleri ile ilişkilidir.

GWAS, AH ile ilişkilendirilen aday genetik varyantları tanımlamada çok mühim olmasına rağmen, bugüne kadar tanımlanan AH risk lokusları, kalıtımının sadece küçük bir kısmını açıklayabilmektedir. GWAS'ın örneklem büyüklüğünün artması ve incelenen popülasyonların çeşitlenmesi, bu kısıtlılığa bir çözüm olabilecektir [26, 27, 28, 29]. GWAS gibi çalışmaların sınırlamaları ve hastalığın çoklu genetik ve çevresel faktörlerle etkileşimi nedeniyle hala ileri araştırmaların yapılması ve hastalığın genetik bileşenlerinin daha derinlemesine anlaşılması gerekmektedir.

Genlerin dışında, epigenetik faktörler de Alzheimer hastalığının gelişiminde etkili olabilir. Örneğin, DNA metilasyonu gibi epigenetik modifikasyonlar, gen ifadesini düzenleyebilir ve Alzheimer hastalığına duyarlılığı değiştirebilir.

Alzheimer etiyolojisinde önemli olduğu düşünülen diğer unsurlar aşağıdaki gibidir:

Cinsiyet; risk faktörü hakkında tartışmalar olsa da pek çok araştırma, AH sıklığının erkeklerde kadınlara oranla daha az olduğunu göstermektedir.

Aileden alınan demans öyküsü; bireyde AH'nin ortaya çıkma riski açısından önemli bir unsurdur. Kişinin yakın aile bireylerinde demans

görülmesi durumunda hastalığın ortaya çıkma riski oranı %10 ila %30 artmaktadır.

Diğer risk faktörleri olarak çeşitli kafa travmaları, kısıtlı bilişsel kapasitenin kullanıldığı hayat tarzı, miyokard infarktüsü, hipertansiyon gibi unsurlar mevcuttur.

Sonuç olarak, genetik temelli multifaktöriyel hastalıkların karmaşıklığı nedeniyle araştırmacılar, bu hastalıkları tanımlamak ve değerlendirmek için çeşitli çalışmalar yürütmektedir. Gelişiminde birden çok sayıda risk faktörü etkili olan, hem genetik hem de çevresel etkilerin iç içe geçtiği Alzheimer hastalığı da bir multifaktöriyel hastalık olarak yaşam kalitesini önemli ölçüde azaltmakta, yaşam boyu süren zorluklara neden olmaktadır. Bilişsel fonksiyonlarda bozulmaya yol açmasının yanı sıra, Alzheimer hastalığına sahip bireylerin birden fazla nörolojik bozukluğa daha yatkın olabileceği de tartışılmaktadır. Bu durumda, multifaktöriyel hastalıklar devreye girmekte ve bireyde birden fazla nörolojik durumun eşzamanlı olarak ortaya çıktığını göstermektedir. Bu kapsamda, iki hastalık arasındaki ilişkinin anlaşıldığı takdirde, tanı ve tedavi süreçlerinin geliştirilmesinde önemli bir yol alınacağı aşikardır.

KAYNAKLAR

1. Karaoğuz, M. Y. 2007. İnsandaki genetik hastalıklar. Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi, 19.
2. Oktay, Y., Cemaliye, B. ve Özduman, K. 2017. Gliom Gelişiminde Genetik Yatkınlığın Rolü.
3. Çavuşoğlu, H. 2015. Çocuk Sağlığı Hemşireliği, Cilt 2. Ankara: Ofset yayınevi. (3-22).
4. Ratheesh G, Tian L, Venugopal JR., Ezhilarasu H, Sadiq A, Fan TP, Ramakrishna S. Role of medicinal plants in neurodegenerative diseases. Biomanuf Rev. 2017; 2(1), 1-16
5. Singhal AK, Naithani V, Bangar OP. Medicinal plants with a potential to treat Alzheimer and associated symptoms. Int J Nutr Pharmacol Neurol Dis. 2012; 2(2), 84.
6. Lane, C. A., Hardy, J. ve Schott, J. M. 2018. Alzheimer's disease. European Journal of Neurology, 25(1), 59-70.
7. Stelzmann, R. A., Schnitzlein, H. N., ve Murtagh, F. R. 1995. An English of Alzheimer's 1907 paper, Uber eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde. Clinical, 8(6), 429-431.
8. Selekter, K. 2010. Alois alzheimer ve alzheimer hastalığı. Türk Geriatri Dergisi, 13(3), 9-14.
9. Lanoiselee, H. M., Nicolas, G., Wallon, D., Rovelet-Lecrux, A., Lacour, M., Rousseau, S., Richard, A. C., Pasquier, F., Rollin-Sillaire, A., Martinaud, O. vd. 2017. APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. PLOS Medicine.
10. Van Cauwenberghe, C., Van Broeckhoven, C. ve Sleegers, K. 2016. The genetic landscape of Alzheimer disease: Clinical implications and perspectives. Genetics in Medicine. 18, 421–430.

11. Cao, H., Zhou, X., Chen, Y., Ip, F. C. F., Chen, Y., Lai, N. C. H., Lo, R. M. N., Tong, E. P. S., Mok, V. C. T., Kwok, T. C. Y. vd. 2022. Association of SPI1 Haplotypes with Altered SPI1 Gene Expression and Alzheimer's Disease Risk. J. Alzheimers Disease, 86, 1861–1873.
12. Jones, R. E., Andrews, R., Holmans, P., Hill, M. ve Taylor, P. R. 2021. Modest changes in Spi1 dosage reveal the potential for altered microglial function as seen in Alzheimer's disease. Scientific Reports, 11, 14935.
13. Spangenberg, E. E., Lee, R. J., Najafi, A. R., Rice, R. A., Elmore, M. R., Blurton-Jones, M., West, B. L. ve Green, K. N. 2016. Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid-beta pathology. Brain, 139 Pt 4,1265–1281.
14. De Roeck, A., Van Broeckhoven, C. ve Sleegers, K. 2019. The role of ABCA7 in Alzheimer's disease: Evidence from genomics, transcriptomics and methylomics. Acta Neuropathologica, 138, 201–220.
15. Zhao, Q. F., Yu, J. T., Tan, M. S., Tan, L. 2015. ABCA7 in Alzheimer's Disease. Molecular Neurobiology, 51, 1008–1016.
16. Gao, P., Ye, L.,Cheng, H. ve Li, H. 2021. The Mechanistic Role of Bridging Integrator 1 (BIN1) in Alzheimer's Disease. Cellular and Molecular Neurobiologyi 41, 1431–1440.
17. Moreau, K., Fleming, A., Imarisio, S., Lopez Ramirez, A.,Mercer, J. L., Jimenez-Sanchez, M., Bento, C. F., Puri, C., Zavodszky, E., Siddiqi, F. vd. 2014. PICALM modulates autophagy activity and tau accumulation. Nature Communications, 4998.
18. Uddin, M. S., Kabir, M. T., Begum, M. M., Islam, M. S., Behl, T., Ashraf, G. M. Exploring the Role of CLU in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. 2021. Neurotoxicity Research. 2021, 39, 2108–2119.
19. Ulland, T. K., Song, W. M., Huang, S. C., Ulrich, J. D., Sergushichev, A., Beatty, W. L., Loboda, A. A., Zhou, Y., Cairns, N. J., Kambal, A. vd.

2017. TREM2 Maintains Microglial Metabolic Fitness in Alzheimer's Disease. Cell, 170, 649–663.e13.

20. Lee, E. G., Chen, S., Leong, L., Tulloch, J., Yu, C. E. 2021. TOMM40 RNA Transcription in Alzheimer's Disease Brain and Its Implication in Mitochondrial Dysfunction. Genes, 12, 871.
21. Hassan, M., Shahzadi, S., Alashwal, H., Zaki, N., Seo, S. Y., Moustafa, A. A. 2018. Exploring the mechanistic insights of Cas scaffolding protein family member 4 with protein tyrosine kinase 2 in Alzheimer's disease by evaluating protein interactions through molecular docking and dynamic simulations. Neurological Sciences. 39, 1361–1374.
22. Beck, T. N., Nicolas, E., Kopp, M. C., Golemis, E. A. 2014. Adaptors for disorders of the brain? The cancer signaling proteins NEDD9, CASS4, and PTK2B in Alzheimer's disease. Oncoscience, 1, 486–503.
23. MacLachlan, R., Kehoe, P. G. ve Miners, J. S. 2022. Dysregulation of ACE-1 in Normal Aging and the Early Stages of Alzheimer's Disease. The Journals of Gerontology, 77, 1775–1783.
24. Bellenguez, C., Kucukali, F., Jansen, I. E., Kleineidam, L., Moreno-Grau, S., Amin, N., Naj, A. C., Campos-Martin, R., Grenier-Boley, B., Andrade, V. vd. 2022. New insights into the genetic etiology of Alzheimer's disease and related dementias. Nature Genetics, 54, 412–436.
25. Andrade-Guerrero, J. vd. 2023. Alzheimer's Disease: An Updated Overview of Its Genetics. International Journal of Molecular Sciences. 24, 3754.
26. Jansen, I. E., Savage, J. E., Watanabe, K., Bryois, J., Williams, D. M., Steinberg, S., Sealock, J., Karlsson, I. K., Hagg, S., Athanasiu, L. vd. 2019. Genome-wide meta-analysis identifies new loci and functional pathways influencing Alzheimer's disease risk. Nature Genetics, 51, 404–413.

27. Mez, J., Chung, J., Jun, G., Kriegel, J., Bourlas, A. P., Sherva, R., Logue, M. W., Barnes, L. L., Bennett, D. A., Buxbaum, J. D. vd. 2017. Two novel loci, COBL and SLC10A2, for Alzheimer's disease in African Americans. Alzheimers Dementia, 13, 119–129.

28. Wingo, A. P., Liu, Y., Gerasimov, E. S., Gockley, J., Logsdon, B. A., Duong, D. M., Dammer, E. B., Robins, C., Beach, T. G., Reiman, E. M. vd. 2021. Integrating human brain proteomes with genome-wide association data implicates new proteins in Alzheimer's disease pathogenesis. Nature Genetics, 53, 143–146.

29. Duthey, B. 2013. Background paper 6.11: Alzheimer disease and other dementias. A public health approach to innovation, 6, 1-74.

BÖLÜM 11

SİRTUİNLERİN NÖRODEJENERATİF HASTALIKLARLA OLAN İLİŞKİSİ

Arş. Gör. Elif Naz GÜRSOY[18], Arş. Gör. Kübra ŞENER[19],
Büşra BÖREKCİ[20], Prof. Dr. Şule COŞKUN CEVHER[21]

DOI: https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.12707365

[18] Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye
[19] Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye
[20] Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye
[21] Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye
Sorumlu Yazar: Araş. Gör. Elif Naz; elifnaz.alver@gmail.com

1. Giriş

Sirtuinler (SIRT) apoptoz, DNA onarımı, protein katlanması, yaşlanma ve nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili inflamatuar süreçleri modüle ederek nöroprotektif bir rol oynarlar ve metabolizma üzerinde çeşitli hayati hücresel fonksiyonların düzenlenmesinde katkı sağlarlar.

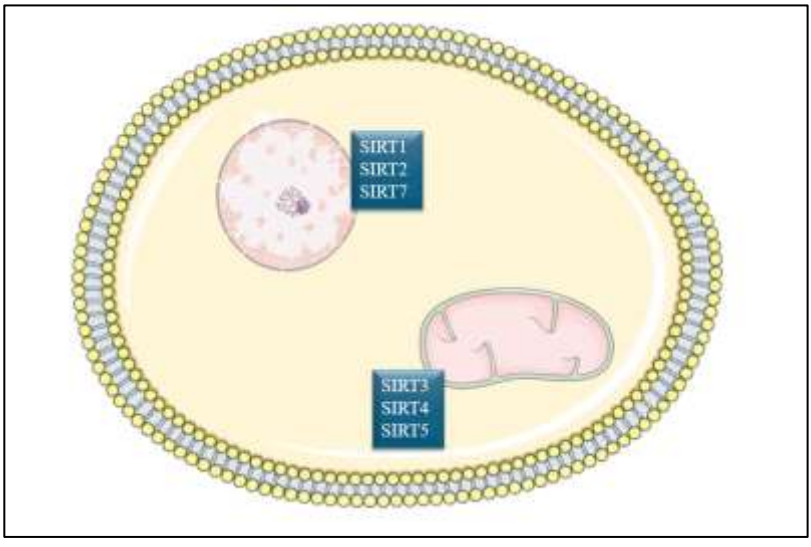
Sirtuinlerin, bakteriler (*Sulfolobus solfataricus* L. major), mayalar (*Saccharomyces cerevisiae*), nematodlar (*Caenorhabditis elegans*), meyve sinekleri (*Drosophila melanogaster*), insanlarda (*Homo sapiens sapiens*) tespit edilmiştir. Ayrıca pirinç (*Oryza sativa*), thale tere (*Arabidopsis thaliana*), asma (*Vitis vinifera* L.) domates (*Solanum lycopersicum*) gibi bitkilerde bile bulunduğu bilinmektedir (1-6).

Bu kadar farklı organizmada ve hayati hücresel fonksiyonlarda yer alan SIRT'ler, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+) bağımlı sınıf III histon deasetilaz enzimleridir. Memelilerde bilinen yedi üyesi bulunmaktadır (SIRT 1-7) (7). Histon ve histon olmayan proteinler üzerinde hidroliz yoluyla asetil grubunu lizinden uzaklaştırır, dolayısıyla genellikle "lizin deasetilazlar" olarak anılırlar (1, 5, 8). Sirtuinlerin temel özellikleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Sirtuinlerin temel özellikleri (7)

Sınıf	Sirtuin	Lokalizasyon	Görev
I	SIRT1	Nükleus, sitoplazma	Oksidatif stres, inflamasyon, apoptoz, otofaji, metabolizma
	SIRT2	Nükleus, sitoplazma	Hücre döngüsü, oksidatif stres, inflamasyon

	SIRT3	Mitokondri	Oksidatif stres, apoptoz, otofaji, metabolizma
II	SIRT4	Mitokondri	İnflamasyon, oksidatif stres, metabolizma
III	SIRT5	Mitokondri	Oksidatif stres, apoptoz, metabolizma
IV	SIRT6	Nükleus	DNA onarımı, oksidatif stres, apoptoz, otofaji, inflamasyon, metabolizma
	SIRT7	Çekirdekçik	Oksidatif stres, apoptoz, rRNA transkripsiyonu

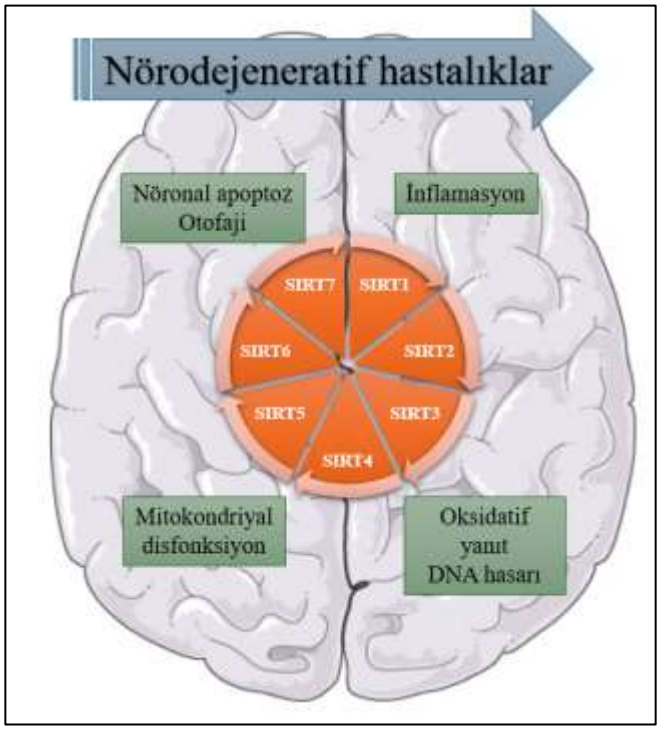


Şekil 1. Sirtuinlerin hücre içi lokalizasyonu

Yedi SIRT'lerin tümü, tüm insan dokularında eksprese edilir (9). Kütle spektrometresi ve yarı kantitatif çalışmalar, tüm sirtuinlerin insan ve insan dışı beyinde ve ince bağırsakta ifade edildiğini göstermiştir (10, 11). Beyinde SIRT1 (110 KDa) ve SIRT2 (37 KDa), en bol bulunan ve en yaygın şekilde ifade edilen sirtuin tipleridir. Genel olarak SIRT1 ekspresyonu beyincik, hipokampus ve hipotalamustaki nöronlarda yüksek düzeydedir. SIRT2 omurilik ve beyin sapında en yüksektir ve aynı zamanda korteks, frontal lob, hipokampus, striatum ve beyincikte de yüksek oranda eksprese edilir. Mitokondriyal sirtuinler SIRT3, SIRT4, SIRT5 de beynin farklı bölgelerinde ifade edilir, ancak SIRT1 ve SIRT2'den daha düşük seviyelerdedir. Beyinde SIRT6 ve SIRT7 diğer sirtuinlere göre en düşük seviyelerde ifade edilir. SIRT7 dışındaki tüm sirtuinler ince bağırsakta beyinde tespit edilenden daha düşük seviyelerde eksprese edilir. SIRT7, beyindekinden 10 kat daha yüksek ekspresyonla ince bağırsakta en yüksek oranda eksprese edilen sirtuindir (12).

Nörodejeneratif hastalıklar motor, fizyolojik ve bilişsel işlevlerde ilerleyici bir kayba yol açan, hafızayı, hareket etme, konuşma ve nefes alma yeteneğini etkileyen, nöronların kademeli ve geri dönüşü olmayan bir şekilde tahrip edilmesiyle ilişkili çeşitli hastalıklardan oluşan bir gruptur. En yaygın örnekler Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, amyotrofik lateral skleroz (ALS), multipl sklerosiz (MS) ve omurilik hasarıdır (SCI) (13). Önceki çalışmalar, SIRT'lerin nöronal hücre ölümünün düzenlenmesi ve nörodejeneratif hastalıkların patolojisi için kritik olduğunu göstermiştir. Aksonal dejenerasyon, ALS ve Parkinson hastalığı gibi çeşitli nörolojik bozuklukların bir göstergesidir. Buna göre SIRT aktivasyonu, aksonal NAD^+ tükenmesine önemli katkılarda bulunan ve aksonal dejenerasyona yol açan SARM1 gibi NAD^+azlar tarafından modüle edilebileceği düşünülmektedir (14).

Bu bölümde SIRT'lerin nörodejeneratif hastalıkların patolojisine nasıl katkıda bulunduğunu üzerine durulacaktır (Şekil 2).



Şekil 2. Sirtuinlerin nörodejeneratif hastalıklarındaki rolünün şematize edilmesi

2. Alzheimer Hastalığı ve Sirtuin İlişkisi

Alzheimer hastalığı (AH) dünya çapında birçok insanı etkileyen ve yaşlılar arasında demansın en yaygın nedenidir (15). AH, yaşa bağlı en yaygın ilerleyici nörodejeneratif bozukluk olarak bilinmektedir. AH 'de bireyler, bilişsel ve işlevsel gerilemenin yanı sıra hafıza kaybıyla sonuçlanan nörolojik işlev bozukluğundan da muztariptir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, AH'daki bilişsel gerilemenin önde geldiğini ve AH'nın bir metabolik bozukluk olduğunu vurgulamaktadır (16). Alzheimer öyküsünde gözüken azalmış nöronlar, azalmış lipit metabolizması ve genel metabolik kapasitenin gösterdiği metabolik kusurlar bu fikri desteklemektedir (17).

AH, makroskobik olarak özellikle beynin korteks ve hipokampüs bölgelerinde gelişen difüz atrofi ile karakterizedir (18). AH, nöropatolojisi amiloid beta plaklar (Aβ), nörofibriler yumaklar, granülovakuolar dejenerasyon, sinaps kaybı ve Meynert'in bazal nükleusu, hipokampüs, asosiasyon korteksinde kolinerjik hücre kaybı ve Hirano cisimciklerin varlığıyla karakterizedir (18-20). AH ile ilgili yapılan genetik çalışmalarda, Amiloid Öncü Protein (APP) geninde ve gama-sekretaz bileşenlerini kodlayan presenilin 1 ve 2 genlerinde (PSEN1 ve PSEN2) baskın mutasyonlar bulunmuştur (21). Amiloid plakların ana bileşeni, APP ve gama-sekretazın ardışık etkisiyle proteolitik olarak parçalanması sonucu oluşan amiloid beta-peptitidir. Yaygın olarak kabul edilen beta-amiloid hipotezi, amiloid plakların AH patolojisinin ana etiyolojik ajanı olduğu ve bu nedenle geniş terapötik stratejilerin nörotoksik amiloid plak üretiminin ve agregasyonunun inhibisyonuna odaklandığını öne sürmektedir (22, 23). Nörofibriler yumaklar, hiperfosforile edilmiş mikrotübül ile ilişkili tau proteininden oluşan agregatlardır. Tau proteinleri, insanlarda "mikrotübülle ilişkili protein tau" olarak tanımlanan tek bir genin ürünüdür (24). Altı izoformu bulunan tau, AH' de beyinde filamentler halinde hiperfosforile edilmiş bir durumda mevcuttur. Bu tau agregatlarının diğer nörodejeneratif bozukluklarda da mevcut olduğu rapor edilmiştir (25).

Sirtuin-1

Sirtuinler (SIRT) içerisinde özellikle beyinde en çok çalışılan SIRT1, Alzheimer, Parkinson ve Huntington hastalıkları gibi birçok yaygın nörodejeneratif hastalıkta analiz edilmiştir (1, 26). SIRT1 özellikle AH'da kapsamlı olarak incelenen tek sirtuindir (27). SIRT1, anormal APP işleme, nöroinflamasyon, nörodejenerasyon ve mitokondriyal disfonksiyon gibi AD ile ilişkili patojenik mekanizmalarda yer almaktadır.

SIRT1'in AH'nin patolojik mekanizmalarına katkısı çeşitli çalışmalarla aydınlatılmıştır. SIRT1, çeşitli biyolojik mekanizmalar yoluyla hem Aβ hem de

tau protein metabolizmasında önemli rol oynamaktadır. SIRT1, Beta-sekretaz 1 (BACE1) ve α-sekretaz (ADAM10, A Disintegrin ve metalloproteinaz alanı içeren protein 10) gibi APP metabolizmasına entegre olan anahtar enzimleri/enzim komplekslerini modüle etmektedir (28). ADAM10, amiloidojenik Aβ peptidleri yerine çözünür APP-α'yı serbest bırakmak için APP'yi parçalayan bir sekretaz olarak hareket etmektedir. Sirt1, retinoik asit reseptör-beta (RARB) aktivasyonu yoluyla Adam10 ekspresyonunu ve çözünür APP-α peptitlerini artırır (29). Böylece SIRT1, Aß üretiminin düzenlenmesinde görev alarak AH karşı nöroprotektif bir mekanizma sağlar (30). SIRT1'in aktivasyonunun azalmış Aβ üretiminin indüklenmiş etkilerinden sorumlu olduğunu ve SIRT1'in devreden çıkarılmasının antagonistik bir etkiyle sonuçlandığını gösteren bir fotobiyomodülasyon tedavisi çalışmasıyla da desteklenmektedir (31). Yapılan çalışmalar doğrultusunda, SIRT1in ADAM10'un AH işlevini etkilemedeki kilit rolünü destekleyen kanıtlar da artmaktadır (32, 33).

SIRT1 ayrıca Apolipoprotein E (APOE) ile bağlantılı patojenik mekanizmalarda da rol oynamaktadır. APOE-4'ün ifadesi SIRT1 seviyesinin azalmasına neden olmaktadır (34). APOE-4, Alzheimer, vasküler demans, ateroskleroz, kardiyovasküler hastalık ve diğer demans formlarında (Vasküler demans, Lewy cisimcikli demans gibi) en önemli genetik risk faktörlerinden biridir. ApoE4, çift sarmallı DNA'yı yüksek afiniteyle bağlayan ve nükleer translokasyona uğrayan bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapmaktadır. AH'de Pin1, SIRT1, PSEN1 ve beyinden türetilen nörotrofik faktörün (BDNF) mRNA ve protein seviyeleri değişmektedir. Azalan Pin1 seviyeleri nörofibriler dejenerasyonu ve amiloidojenik süreçleri arttırmaktadır. Lattanzio ve ark. (2004) çalışmalarında, ApoE4 farelerinin frontal korteksinde SIRT1 seviyelerini azalmış ve PSEN1 mRNA seviyeleri frontal kortekste daha düşük olduğunu göstermiştir (35). ApoE3 ve ApoE4, APP ile nanomolar afinite göstermektedir; ancak sadece ApoE4, SIRT1'i ve çözünür amiloid öncü protein

alfa'nın (sAPPα) Aβ'ya oranını azaltarak nöroprotektif SIRT1'in nörotoksik SIRT2'ye oranının belirgin şekilde farklılaşmasına neden olmaktadır. ApoE4 ayrıca Tau fosforilasyonunu ve APP fosforilasyonunu tetikler ve programlanmış hücre ölümünü indüklemektedir (34).

AH için bir diğer nörotoksisite kaynağı da Gliseraldhit türevi ileri glikasyon son ürünleri (AGE'ler)'dir. AGE'ler reaktif oksijen türleri (ROS) yoluyla APP ve Aβ'yı arttırmakradır. AGE'ler ile Aß'nın kombinasyonu ise nörotoksisiteyi arttırmaktadır. AGE'ler SIRT1'in nöroprotektif etkilerini bozar ve nöronal hücre ölümüne yol açmaktadır (36). Yapılan çalışmalar da modern diyetteki değişikliklerin nörotoksik metil-glioksal türevleri (MG) gibi besinlere bağlı aşırı AGE'leri içerdiğini ve diyet AGE'lerinin baskılanmış SIRT1 ve diğer konak savunmaları yoluyla AH'yi teşvik ettiği öne sürülmektedir (37).

SIRT1'in ayrıca otofajiyi arttırıcı etkileri mevcuttur. Bunun etkisiyle de Aβ bozulmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir (38). Memelilerde otofaji mekanizmalarında SIRT1 düzeylerinin azalması, fosforile tau gibi substratların hiperasetilasyonuna yol açmaktadır (39). Ayrıca SIRT1'in tau proteininden asetil gruplarını çıkardığı da gösterilmiştir ve *in vivo* bir çalışma ile SIRT1 eksikliğinin asetillenmiş tau seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle, SIRT1'in inhibisyonu veya yaşla birlikte gözlenen Sirt1 enzim aktivitesindeki düşüş, tau'nun deasetilasyonunda bir azalmaya neden olabilmekte, bu da tau poliubikitinasyonunu ve tau proteazomal bozunmasını engellemektedir ve nihayetinde nörofibriler yumak oluşumuna yol açabilmektedir (39, 40).

Toplumda SIRT1'in serum düzeylerinde yaşa bağlı bir düşüş gözlemlenmektedir ve serum SIRT1 düzeyleri AH'nin erken bir biyolojik belirteci olarak önerilmektedir (41). Sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında AH ve hafif bilişsel bozukluğu olan hastalarda SIRT1 düzeylerinde açık bir düşüş gözlenmektedir (42) SIRT1'in Alzheimer'da bozulan bilişsel süreçler olan hafıza ve öğrenmedeki önemine dair kanıtlar da ortaya çıkmaktadır. Yapılan farklı çalışmalarda, SIRT1 gen nakavtıyla 5-6 aylık erkek farelerde uzamsal

öğrenme ve hem kısa hem de uzun süreli hafıza bozuldu gözlemlenmiştir(43, 44). Bu bulgular Sirt1'in nöronal gelişim ve plastisitedeki önemli rolünü destekleyen kanıtlar sağlamaktadır. Ayrıca, DNA metilasyonu gibi epigenetik mekanizmalar hafıza oluşumuna ve bakımına katkıda bulunmaktadır ; bu da SIRT1'in epigenetik bir "koordinatör" rolüyle önemli bir katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir (45).

Son çalışmalarda SIRT1'deki genetik varyasyonun diyet, uyku ve fiziksel aktivite gibi yaşam tarzı faktörlerinin demans ve Alzheimer gelişimi üzerindeki etkisini değiştirip değiştiremeyeceği üzerine odaklanmıştır. Bununla birlikte, SIRT1 gen varyasyonları ile yaşam tarzı faktörleri arasındaki etkileşimlerin, bazıları AH risk faktörleri olan diğer kronik hastalıkların sonuçlarını etkileyebileceğine dair bazı kanıtlar bulunmuştur (33). Bu kanıtlar, SIRT1'deki genetik çeşitlilik ile diyet, uyku ve fiziksel aktivite gibi yaşam tarzı faktörleri arasındaki etkileşimi ve bu etkileşimin Alzheimer riskini ve patofizyolojisini nasıl etkileyebileceğini araştırmayı amaçlayan gelecekteki çalışmalara ivme kazandırmaktadır.

Sirtuin- 2

Sirtuin ailesinde beyin hücrelerinden en çok oligodendrositler ve mikroglialarda bulunması ve ekspresyonunun nöronlarda ve astrositlerde oldukça önemli olması nedeniyle SIRT2'ye olan ilgi son yıllarda katlanarak artmaktadır (11).

Yapılan çalışmalarda, merkezi sinir sisteminde ve AH ölüm sonrası örneklerinin temprotal korteksinde yaşa bağlı olarak ifadesinin arttığı tespit edilmiştir(46, 47). Ayrıca plazma örneklerinde, AH'li ve sağlıklı yaşlanan kişilerde sağlıklı genç kontrollere kıyasla daha yüksek *SIRT2* mRNA seviyeleri bulunmuştur (48). Pascoal ve ark. (2021) yaptığı çalışmada beyin omurilik sıvısında (BOS) SIRT2 seviyesinin fazla olduğunu ve bu durumun BOS' da Aβ oranıyla ilişkili olduğunu tanımlamıştır(49).

SIRT2 modülasyonunun AH' de amiloid patolojisindeki potansiyel rolünün ilk çalışması Biella ve ark. (2016) tarafından ele alınmıştır. Çalışmada SIRT2 inhibisyonunun, bilişsel performansta bir iyileşmeye, sAPPα fragmanlarında bir artışa ve sAPPβ seviyelerinde bir azalmaya neden olduğunu gösterilmiştir(50). Silva ve ark. (2017) SIRT2 inhibitörü ile yaptıkları çalışmalarında Aβ agregatlarının azalmasının artan otofaji aktivitesinden kaynaklandığını öne sürmektedirler (46). Bu gözlemler doğrultusunda, SIRT2'nin amiloidojenik yolu iki farklı mekanizma yoluyla modüle ettiği yakın zamanda daha ayrıntılı olarak açıklanmıştır:

İlk olarak, APP hücre dışı alanının 132 ve 134 numaralı lizinleri üzerinde asetillenmektedir ve SIRT2 APP ile etkileşime girerek APP'yi deasetile etmektedir. Bu deasetilasyon amiloidojenik yolu, Aβ birikimini ve AH ilerlemesini desteklemektedir (51). Bai ve ark. (2022) çalışmalarında SIRT2 inhibisyonu ile APP asetilasyon seviyelerinin artığını ve amiloidojenik olmayan işlemeyi destekleyerek Aβ plaklarının azalmasına, hayatta kalma oranının artmasına ve hafızanın iyileşmesine yol açtığını tespit etmiştir (51). APP'nin α-sekretaz tarafından bölünmesi sadece Aβ plaklarının oluşumunu engellemekle kalmayıp aynı zamanda nöroprotektif, pro-survival ve pro-kognitif sAPPα'yı da ürettiğinden, araştırıcılar AH hayvan modellerinde SIRT2 inhibisyonunun nöroprotektif etkisinin muhtemelen bu peptit aracılığıyla olabileceğini öne sürmektedir (51-53). Çalışmalar doğrultusunda APP asetilasyonunun, amiloidojenik olmayan yolu teşvik etmede anahtar olduğunu ve SIRT2 ile modüle edilmiş APP deasetilasyonunun AH ilerlemesi sırasında fonksiyonel öneme sahip olduğu ileri sürülmüştür.

SIRT2 inhibisyonunun AH üzerindeki potansiyel ilgisi göz önüne alındığında, SIRT2'nin tau fosforilasyonuna etkisi de değerlendirilmiştir. Spires-Jones ve ark. (2012) SIRT2 inhibitörünü doğrudan tau transgenik rTg4510 farelerinin hipokampüsüne uyguladıklarında, SIRT2 inhibisyonunun, tau patolojisinde herhangi bir iyileşme olmaksızın nöron kaybı

ve nörodejenerasyondan korunduğunu gözlemlemişlerdir (54). Bu çalışmayla uyumlu olarak Diaz-Perdigon ve ark. (2020). SIRT2'nin inhibisyonunun uzamsal öğrenme ve hafıza bozukluklarını iyileştirdiği gösterilmiştir (55). Ancak yakın zamanda yapılan bir *in vitro* çalışma, SIRT2 aşırı ekspresyonunun, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz aktivasyonu yoluyla tau hiperfosforilasyonunu indüklediğini belirlemiştir (56).

Öğrenme ve hafıza bozukluklarının AH hastalarının ana semptomlarından olduğu göz önüne alındığında, SIRT2 modülasyonunun bu semptomların iyileştirilmesinde rol alabileceği düşünülmüştür. Bu konu hakkında çelişkili çalışmalar bulunmasına karşın, Yoo ve ark. (2015) çalışmalarında SIRT2 aşırı ekspresyonunun, yeni nesne tanıma testinde hafıza eksikliklerine neden olduğunu ve hücre proliferasyonu ve nöroblast farklılaşması gibi hipokampüs fonksiyonlarını etkilediğini gözlemlemişlerdir (57). Ayrıca, yaşlanmayı hızlandıran bir fare modelinde SIRT2 inhibisyonu, Morris Su Labirenti testinde uzaysal öğrenme ve hafıza bozukluklarını iyileştirdiği ve glutamat reseptörlerinin hipokampal protein seviyelerini düzenlediği gösterilmiştir(55).

Mitokondriyal disfonksiyonun AH patogenezinde rol oynaması muhtemeldir. Mitokondri, mikrotübül ağı asetilasyonunu düzenleyen SIRT2'nin aşırı aktivasyonu nedeniyle otofaji/mitofajide bir işlev bozukluğuna yol açabilmektedir. SIRT2, Aβ/tau aracılı otofajiyi düzenleyerek Aβ toplanması ve tau fosforilasyonu sürecine müdahale ederek AH'yi etkilemekle kalmaz, aynı zamanda yanlış katlanmış proteinlerin temizlenmesini artırarak AH'yi de etkilemektedir. SIRT2 fonksiyon kaybı, mikrotübül stabilizasyonunu kurtarır ve otofajiyi iyileştirerek toksik Aβ oligomerlerinin ortadan kaldırılması yoluyla hücre sağkalımını desteklemektedir(46). Aβ'ya ek olarak SIRT2'nin AH'de tau fosforilasyonunu ve otofajik akışı etkilediği de gösterilmiştir (58).

Bu bağlamda SIRT2, yaşlanma, amiloid patolojisi, mikrotübül stabilitesi, otofaji ve oksidatif stres gibi AH patolojisinde yer alan farklı

moleküler mekanizmaların önemli bir düzenleyicisi olarak göründüğünden, AH'yi tedavi etmek için potansiyel bir terapötik hedef olabileceği düşüncesini arttırmıştır. SIRT2'nin birçok fizyolojik süreçteki rolü, normal fizyolojik işlevlerin geliştirilmesi ve sürdürülmesindeki vazgeçilmez rolü vurgulanmaktadır. Bununla birlikte, farklı hücre tiplerindeki varlığı ve çok çeşitli substratları, enzimatik inhibisyonunun, genetik delesyonunun veya aşırı ekspresyonunun fonksiyonel veya moleküler sonuçlarını anlamak ve yorumlamak söz konusu olduğunda iki ucu keskin bir bıçaktır. SIRT2'nin farklı koşullar altında bu ve diğer süreçlerdeki spesifik rolüne ilişkin literatürde tanımlanan çelişkili sonuçları göz ardı edilmemelidir.

Sirtuin- 3

Stresin neden olduğu mitokondriyal bütünlüğün ve enerji metabolizmasının korunmasından sorulumlu SIRT3, AH gibi bir çok nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde de rol oynar (59). Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu AH'nin patogeneziyle yakından ilişkilidir (60). SIRT3 kaybı, eksitotoksisiteye maruz kalan beyinlerde nörodejenerasyonu hızlandırmaktıdır (61). Mitokondriyal ROS'taki artışın, SIRT3 aşırı ekspresyonunun nöroprotektif bir etki gösterdiği birincil hipokampal kültürlerde SIRT3 ekspresyonunu artırdığı tespit edilmiştir (60). SIRT3 mRNA ve protein seviyeleri AH serebral korteksinde ve APP/PS1 çift transgenik farelerin korteksinde azalmıştır (62). SIRT3, p53 kaynaklı mitokondriyal disfonksiyonu ve nöronal hasarı deasetilaz aktivitesine bağlı bir şekilde önlemektedir. Mito-p53, mitokondri DNA'sı tarafından kodlanan *ND2* ve *ND4* gen ekspresyonunu azaltmaktadır ve bunun sonucunda ROS artışı ve mitokondriyal oksijen tüketiminde azalma meydana gelmektedir. AH'de ND2 ve ND4 ifadesi azalmaktadır. SIRT3, *ND2* ve *ND4* ifadesini geri kazandırmakta ve mito-p53 aktivitesini baskılayarak mitokondriyal oksijen tüketimini artırmaktadır. SIRT3 disfonksiyonu AH'de p53 aracılı nöronal ve mitokondriyal hasara yol açmaktadır (63).

SIRT3, ROS'un üretimi ve detoksifikasyonunda rol oynayan protein substratlarını ve lipit beta-oksidasyon yolunun enzimlerini aktive etmektedir. Mikroglia, merkezi sinir sisteminde ROS'un ana hücresel kaynağıdır. SIRT3, hücresel ROS seviyelerinin düzenlenmesinde rol oynar.SIRT3 antioksidan genleri, katalazı (CAT) ve manganez süperoksit dismutazı (MnSOD) işlemden geçiren bir transkripsiyon faktörü olan Forkhead box O3 (Foxo3a) deasetilleyerek hücresel ROS'u azaltmaktadır. SIRT3, erken doğum sonrası sıçan beyninin korpus kallosumunun ameboid mikroglial hücrelerinde lokalize olur ve yetişkin sıçan beyninin korpus kallosumundaki dallanmış mikroglial hücrelerde azalır. *Mikrogliadaki SIRT3'ün* yıkılması, hücresel ve mitokondriyal ROS'ta bir artışa ve antioksidan MnSOD ekspresyonunda bir azalmaya yol açmaktadır, bu da SIRT3'ün mikrogliadaki ROS düzenlemesindeki rolünü etkilemektedir. Tersine, *SIRT3'ün* aşırı ekspresyonu, CAT ve MnSOD ekspresyonunu arttırmaktadır ve bu etkiye Foxo3a'nın ekspresyonunda ve nükleer translokasyonunda bir artışa neden olmaktadır. Sırt3'ün, Foxo3a'nın aktivasyonu yoluyla antioksidanların ekspresyonunu indükleyerek ROS'u düzenlediğini düşündürmektedir (64, 65).

Hipofiz adenilat siklaz aktive edici polipeptit (PACAP), AD'de nöroprotektif etkileri olan bir nörotrofindir. *PACAP* ve *SIRT3* ekspresyonu AH'de azalır ve Aβ ve tau protein seviyeleri ile ters korelasyon göstermektedir. PACAP ile tedavi nöronları Aβ toksisitesine karşı korumaktadır. PACAP mitokondriyal SIRT3 üretimini uyarmaktadır. *SIRT3''ün* yıkılması, PACAP'ın nöroprotektif etkilerini ortadan kaldırmakta ve bu etki, *SIRT3'ün* aşırı ekspresyonuyla tersine çevirmektedir (66).

Sirtuin- 6

AH'de hücre yaşlanması, oksidatif stres ve yaşlanma gibi faktörlerin tümü patogenezde önemli faktörlerdir (67). Bu önemli faktörler aynı zamanda telomer uzunluğunu da doğrudan etkiler (68, 69). AH hastalarının beyinlerindeki telomer bütünlüğünü ve telomeraz aktivitesini karakterize eden

bir başka çalışma, Alzheimer hastalarının hipokampal nöronlarındaki nöronal telomerlerin, kontrol denekleriyle karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha kısa olduğunu göstermiştir. Ayrıca kontrole kıyasla AH hastalarının piramidal nöronlarında bir kayıp olduğunu bulmuşlardır (70). Uzun ömürlülük geni olarak bilinen SIRT6, telomer bakımı, DNA onarımı, genom bütünlüğü, enerji metabolizması ve inflamasyonda rol oynayarak yaşam süresinin düzenlenmesine katkıda bulunduğundan AH için oldukça önemlidir. SIRT6 AD hastalarında eksiktir (71).

SIRT6 kaybı, hücrenin, stokastik replikasyonla ilişkili telomer dizi kaybıyla birlikte işlevsiz telomerler tarafından başlatılan erken yaşlanmaya, telomerik DNA odaklarının birikmesine ve kromozomal uçtan uca füzyonlarla genomik istikrarsızlığa maruz kalmasına neden olmaktadır(72). Telomerler, guanin açısından zengin yapıları nedeniyke oksidatif strese karşı da oldukça hassastır. Guanin kolayca 8-okso-7,8-dihidro-2-deoksiguanozine (8-oksodG) oksitlenir. 8-oksodG'deki aşamalı artışların telomer uzunluğunun azalmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (69). AH'de oksidatif stres düzeyi daha yüksektir ve yüksek düzeyde oksitlenmiş proteinler; lipid peroksidasyon son ürünleri; peroksitler, alkoller, aldehitler, serbest karbonlar, ketonlar ve kolestenon gibi toksik türlerin oluşumu ve nükleer ve mitokondriyal DNA'da oksidatif modifikasyonlar yoluyla yansıtılmıştır(73). AH'de oksidatif stres daha yüksek olduğundan ve telomerler hasara eğilimlidir, SIRT6 telomerlerin korunmasında çok önemli görünmektedir ve bu nedenle AH'ye karşı koruyucu olabileceği düşünülmektedir (71). SIRT6, DNA hasarının birikmesiyle birlikte yaşla birlikte azalan bir aktivite olan DNA onarımını destekler. SIRT6, GSK3α/β kinazın artan aktivasyonu yoluyla Tau protein stabilitesini ve fosforilasyonunu düzenlemektedir (74). AD'li beyinlerde SIRT6 protein ekspresyon seviyeleri azalır. Aβ42, SIRT6 ekspresyonunu azaltır ve Aβ42'nin indüklediği DNA hasarı, hipokampal nöronlarda SIRT6'nın aşırı ekspresyonu ile önlemektedir. Aβ42 kaynaklı DNA hasarı ile p53 seviyeleri arasında negatif

bir korelasyon görülmektedir ve p53'ün Nutlin-3 ile yukarı regülasyonu, SIRT6 azalmasını ve Aβ42 tarafından indüklenen DNA hasarını önlemektedir. p53'e bağımlı SIRT6 ekspresyonu, hücreleri Aβ42'nin indüklediği DNA hasarından korumaktadır (75).

3. Parkinson Hastalığı ve Sirtuin İlişkisi

Parkinson hastalığı (PH), yaşlılarda bilişsel gerilemenin önemli sebeplerinden olan, yavaş ilerleyen ve karmaşık bir nörodejeneratif hastalıktır. Bazı proteinlerin yanlış katlanarak beyinde ve omurilikte birikmesi sonucunda geliştiği tahmin edilen hastalıkta özellikle α-sinüklein birikimi göze çarpmaktadır (76). Hastalığın oluşumunda büyük rolü olan anormal protein agregatları dışında en belirgin sebepler *substantia nigra pars compacta*'da Lewy cisimcik varlığı ve dopamin üreten nöron kayıplarıdır (77). Hastalığın semptomları arasında motor bozukluklar öne çıkmaktadır. Bradikinezi, tremor, kas sertliği, duruş ve yürüme bozuklukları klasik motor semptomlarıdır. Bunlara postüral instabilite, disfaji, konstipasyon, uyku bozuklukları, hafıza kaybı ve depresyon eşlik edebilir (78). Motor semptomlarının dopaminerjik nöron kayıplarından kaynaklı olduğu bilinmekle beraber kolinerjik, adrenerjik ve serotoninerjik gibi diğer nörotransmitter sistemlerinin de etkili olduğu düşünülmektedir (79). PH, günümüzde tedavisi semptomatik olan progresif bir nörolojik hastalıktır.

Yapılan araştırmalara göre PH riski yaşla beraber artmaktadır. Aile öyküsünde PH olan bireylerde daha erken görülebilir fakat genel olarak 60 yaşından sonra hastalık geliştirme olasılığı yükselir. Dolayısıyla yaşlanmanın PH için baskın bir risk faktörü olduğu söylenebilir (80). Bir diğer risk faktörü olarak çevresel etkenler gösterilmektedir. Kesin rolü kanıtlanmamış olmasına rağmen kırsalda yaşayanlarda, çiftçilik yapanlarda ve tarımsal ilaçlara maruziyeti daha fazla olanlarda PH görülme insidansı yüksek çıkmıştır (81). α-sinüklein, parkin, fosfataz ve tensin homologu (PTEN)-indüklenmiş muhtemel kinaz 1 (PINK1) ve PARK7 olarak da bilinen bir genin ürünü olan dejlizaz

park7 protein (DJ-1) gibi Parkinson hastalığına yatkınlık faktörlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar bireyi erken başlangıçlı, ailevi parkinsonizme yatkın hale getirebilir (82, 83). PH'nin hücresel ayırt edici özellikleri olarak kabul edilmekte olan reaktif oksijen türleri (ROT), apoptoz, yanlış katlanmış proteinler, nöroinflamasyon, sinaptik ve mitokondriyal disfonksiyonlar hastalığın oluşumunu hızlandırmaktadır. En fazla doğrulanmış olan sebebi ise α-sinüklein agregasyonudur. α-sinüklein, Lewy cisimciklerinin ana protein bileşenidir. Aşırı ekspresyonu halinde nörodejenerasyona yol açan agregasyon ve oligomerizasyon oluşur. Birikmiş α-sinüklein Lewy cisimciklerine dönüşür, böylece sinaptik disfonksiyon ve nöronal homeostazda bozulma meydana gelir (84). α-sinüklein birikiminin aynı zamanda mikrogliaların aktivasyonunu artırarak nöroinflamasyon oluşturmasıyla bu hastalığı tetiklediği bilinmektedir (85).

Sirtuinler (SIRT), nikotinamid adenin dinükleotit (NAD+) bağımlı protein deasetilazlar ailesine ait, yaşlanma süreçleri ile ilişkili olan ve birçok hücresel süreci düzenleyen bir grup protein enzimidir. I ve II. sınıf histon deasetilazlardan ayrı bir sınıf olarak III. sınıf histon deasetilaz olarak nitelendirilmektedirler (86). Bu deasetilazlar NAD+ bağımlı olduklarından redoks duyarlıdır ve besin açlığı koşullarında aktive olabilirler. SIRT'lerin aktiviteleri hücresel hayatta kalma, stres yanıtı, sirkadiyen ritim kontrolü ve çeşitli dokuların homeostazı için önemlidirler (83). Memelilerde farklı hücresel lokasyonlara sahip toplam yedi SIRT tipi bulunmaktadır (SIRT1-7). SIRT3, SIRT4 ve SIRT5 mitokondriyal olarak yerleşikken SIRT1, SIRT6 ve SIRT7 ise genelde nükleer bulunur. SIRT2 ise çoğunlukla sitoplazmik bölgede yerleşik olarak karşımıza çıkmaktadır (87).

SIRT'lerin birçok koruyucu etkisi arasında en belirgeni nöroprotektif özelliğidir. SIRT1'in akut veya kronik nöron ölümüne yol açabilen farklı nörodejeneratif hastalıklarda olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (88). PH ve HH, SIRT'lerle güçlü bir şekilde ilişkilendirilen nörolojik hastalıklardandır.

in vitro ve *in vivo* yapılmış çalışmalarla bilinen bir SIRT1 aktivatörü olan resveratrolün PH modellerinde nörokoruyucu ve yararlı etkiler sağladığı gözlemlenmiştir (83, 89). Araştırmalarda farklı SIRT tiplerinin PH ve HH patogenezindeki rollerine dair çelişkili bulgulara rastlanmıştır. SIRT1 ve SIRT3 PH patolojisinde belirli bir şekilde koruyucu olabilirken çeşitli hücre ve hayvan modellerinde SIRT2 inhibe edildiğinde PH'yi iyileştirdiği gösterilmiştir.

Sirtuin-1

SIRT1, memelilerde en yaygın olarak bilinen ve incelenen SIRT çeşididir. Nörolojik bozukluklarda potansiyel bir terapötik hedef olarak kabul edilmektedir. Nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıkmasındaki en önemli sebepler aşırı serbest radikal üretimi sonucu oluşabilen oksidatif stres, nöronal Ca homeostazının düzensizliği, nöroinflamasyon, dopaminerjik nöron kayıpları, α-sinüklein agregatları ve mitokondriyal disfonksiyondur. Araştırmalar göstermiştir ki; SIRT1 inhibe edildiğinde dopaminerjik nöronların dejenerasyonu artmakta, α-sinüklein inklüzyonları yoğunlaşmakta ve oksidatif stres yükselmektedir. SIRT1, ROT'un üretim ve birikimini regüle etmektedir (90). ROT birikimi aşırı inflamasyona neden olarak mitokondriyal disfonksiyon ve hücre ölümüne yol açar (91), bu nörolojik hastalıkların gelişmesine izin verir. Bununla birlikte, SIRT1 mitokondriyal fonksiyonu teşvik etmekten ve mitokondriyal homeostazı düzenlemekten sorumludur. Çalışmalar, SIRT1'in aşırı ekspresyonunun hücre ölümünü etkili bir şekilde inhibe edebileceğini ve hücre hayatta kalmasını teşvik edebileceğini kısacası hücrelerin ömrünü uzatabileceğini göstermiştir (92).

SIRT1'in genetik artışı ve farmakolojik aktivasyonunun PH modellerinde hayatta kalım faydaları sağladığı gösterilmiştir. Birçok çalışma, PH modellerinde antioksidan uygulamalarının SIRT1 üzerinden etkisini incelemiştir. Böylece antioksidanların hastalıklar üzerindeki nörokoruyucu etkisinde SIRT1 aracılığı olduğu görülmektedir. Resveratrol veya kuersetin

gibi bileşikler nörotoksisiteyi azaltmıştır ve SIRT1 inhibitörleriyle etkisi yok edilerek SIRT1'in rolü gösterilebilmiştir. Bu çalışmalar, genel olarak, nöral hücrelerde veya primer nöronlarda SIRT1 aktivasyonunun koruyucu bir etkisini göstermektedir (93-95). SIRT1, ısı şoku faktörü 1 (HSF1) aktivitesini ve Hsp70 gibi şaperon proteinlerin ekspresyonunu düzenlemektedir. PH hayvan modellerinde SIRT1'in dahil olduğunu belirleyen genetik manipülasyonlarla ilgili çalışmalar nadirdir. Farede 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) ile toksik etki oluşturulan dopaminerjik nöronlarda SIRT1 tarafından deasetile edilerek aktive edilen bir transkripsiyon koaktivatörü olan peroksizom proliferatör-aktive edici reseptör-g koaktivatör1α (PGC-1α)'nin transgenik aşırı ekspresyonunun nöronları dirençli hale getirerek yararlı olduğu gösterilmiştir (96). Ancak 2015 yılında yapılmış bir başka çalışmada aynı şekilde MPTP toksisitesi oluşturulan farelerde SIRT1'in aşırı ekspresyonu bir değişikliğe sebep olmamıştır (97). Bu çalışmaların sonuçları, patolojik koşullar altında SIRT1'in doğrudan nöroprotektif etkili olduğunu söylemek için dikkatli olunması gerektiğini öne sürmektedir. SIRT1'in PH başlangıcını ve ilerlemesini durdurmadaki rollerinin değerlendirilmesinde daha fazla araştırma yapılmalıdır. İlginç bir son dönem gözlemi, PH'de rol oynayan gen DJ-1'in SIRT1 ile etkileşime girip onu aktive ettiğini söylemektedir (98). Diğer PH'ye yatkınlık genlerinin SIRT1 ekspresyonunu nasıl etkilediği ve SIRT1'in bu genlerin ekspresyonu üzerinde geri bildirim düzenlemesi olup olmadığını ortaya çıkarmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Sirtuin-2

SIRT2, SIRT1'den önemli ölçüde farklılık gösterir ve histon deasetilaz 6 (HDAC6) ile birlikte, α-tübülin'i lizin40 (Lys40)'ta deasetilleştiren başlıca tübülün deasetilazıdır. Bugüne kadar yapılmış çalışmalar SIRT2 aktivitesinin PH modellerinde nöronal çöküşü kötüleştirdiğini göstermiştir. SIRT2 inhibisyonunun α-sinüklein aşırı ifade eden hücrelerde toksisiteyi azalttığı ve inklüzyon birikimini değiştirdiği bildirilmiştir (99). SIRT2 baskılanmış

farelerde MPTP tarafından indüklenen nigrostriatal hasarın azaldığı gözlenmiştir. Dolayısıyla SIRT2 aktivasyonu PH modellerinde nöronal ölümü kötüleştirmektedir.

Öte yandan, SIRT2'nin nöronlar üzerindeki olumsuz etkisinin bir nedeni, α-tübülin'in deasetilasyonunun mikrotübül stabilitesini ve dinamiklerini değiştirmesi ve belirsiz yollarda mikrotübül tabanlı aksonal taşımayı veya PH'de etkili α-sinüklein'in temizlenmesini bozması olabilir. Mikrotübül instabilitesinin aslında PH'nin ilerlemesini hızlandırdığı öne sürülmüştür. Hastalıklı mitokondrilerin daha düşük ATP üretimi, mikrotübül bağımlı trafiği bozabilir. PH ile ilişkilendirilen lösin zengin tekrarlanan kinaz 2 (LRRK2) mutasyonları, deasetilleştirilmiş mikrotübüllerle etkileşime girer ve *Drosophila* modelinde nöronlarda aksonal taşımayı inhibe ederken, SIRT2'nin inhibisyonu hem aksonal taşınmayı hem de lokomotor davranışı kurtarmıştır. Bu bulgular, SIRT2'nin tübülin deasetilasyon aktivitesinin neden nöronal hayatta kalma üzerinde negatif bir etkiye sahip olabileceğini açıklayabilir (100).

Sirtuin 3

SIRT3, mitokondriyal proteinlerin genel asetilasyon düzenleyicisi olduğu için mitokondriyal metabolizmayı anlamada önemlidir ve SIRT1 gibi böbrek, beyin ve kalpte yüksek düzeyde ifade edilir (101). Mitokondriyal SIRT3'ün yükseltilmesinin MPTP ve rotenon tarafından indüklenen nöronal ölüme karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (102). SIRT3 ve SIRT5'in farelerde inhibe edilmesi, MPTP tarafından nigrostriatal nöron ölümünü daha da artırmıştır (103). Hem SIRT1 hem de SIRT3'ün otofaji/mitofajiyi olumlu bir şekilde düzenlediği bilinmektedir. α-sinüklein agregat oluşumu, PH nöronlarının temel histopatolojik belirtecidir, bu da toksik α-sinüklein agregatlarını ve hasarlı mitokondrileri temizlemeye yardımcı olur. SIRT3'ün PH patolojilerindeki rolünü daha iyi anlamak için yapılan araştırmaların sayısının arttırılmasına ihtiyaç vardır.

4. Huntington Hastalığı ve Sirtuin İlişkisi

Huntington hastalığı (HH), otozomal baskın olan kalıtsal, progresif bir nörodejeneratif hastalık çeşididir. Ortalama 40 yaşlarında başlayan HH'nin tipik semptomu, istemsiz sarsıntılı harekettir ve dolayısıyla hareket koordinasyonunda problemler görülür. Yürüme ve duruş bozuklukları, konuşma güçlüğü gibi PH ile benzer semptomları mevcuttur. Zamanla bu motor bozukluklara bilişsel gerileme de eşlik eder. Sonucunda psikiyatrik bozukluklar, hatta demansa ilerleyen semptomlara rastlanır. Henüz tedavisi olmayan bu hastalığa sahip kişilerin durumu 15-20 yıl süren bir süreçte gittikçe kötüleşir ve sonunda ölüm görülür. Şu an mevcut terapötik seçenekler sadece semptomların azaltılmasını sağlamaktadır (104).

HH, genetik temelli bir hastalıktır. İnsanın 4. kromozomunun kısa kolunda (4p16.3) bulunan huntingtin geninin (HTT) 1. ekzonda poliglutamini (polyQ) kodlayan CAG trinükleotid tekrarında genişlemesi HH'nin ana sebebidir (105). Bu tekrar 36 ve üzerinde olursa HTT proteininin N-terminusunda polyQ'nun anormal sentezi olur. HH, prototipik bir polyQ hastalığı olarak adlandırılır. Genetik testlerle belirlenebilen hastalığı teşhis ederken 40 veya daha fazla CAG tekrarı HH varlığına işaret eder. HH'nin semptomlarından evvel bireylerde MRI ile striatumun hacminin azaldığı ve korteksin inceldiği gözlenebilir. Bu sebeple hastalığın nöropatolojik özellikleri olarak striatal nöron ölümleri, *globus pallidus* ve *substantia nigra*'ya projeksiyon yapan gama-aminobütirik asit (GABA)erjik orta spiny projeksiyon nöronlarının ve korteksten striatuma projeksiyon yapan nöronların belirgin kaybı sayılabilir. Striatum, motor kontrolü, hareket koordinasyonu ve duygusal işlevleri düzenlemede rol oynayan beynin önemli bir bölgesidir. Sinirsel iletişimin karmaşık bir ağıdır ve farklı nörotransmitterlarla etkileşime girerek sinirsel aktiviteyi düzenler. GABA, glutamat ve dopamin striatum'un etkileşime girdiği nörotransmitterlardandır. Bu nörokimyasalların değişimi ile HH arasında anlamlı ilişkiler bulunmuştur (106). Ayrıca putamenler ve kaudat

çekirdeğinde hücre kaybı ve atrofisi de nöropatolojik değişiklikler arasındadır. Kaudat boyutunun küçülmesine ventriküllerin genişlemesi eşlik eder. Nörositopatolojik özellikleri ise intranükleer inklüzyonları ve N-terminal mutant HTT parçalarından oluşan ubikuitin pozitif sitoplazmik agregatları içerir (107, 108).

Sirtuin-1

SIRT1'in HH'yi yavaşlatmadaki rolü konusunda bir uzlaşı olmasa da, yayımlanan çalışmaların çoğunluğu, nöronal sağkalımı ve motor iyileşmeyi sağlayan çeşitli hücresel yolaklarda SIRT1 aktivasyonunun yararlı etkilerini sistematik olarak tanımlamaktadır. Bunlardan biri, SIRT1'in öncelikle nükleer alanda bulunması ve birkaç transkripsiyon faktörünü ve koaktivatörü deasetile etmesiyle HH modellerinde bozulmuş olan transkripsiyonel aktiviteyi arttırmasıdır. SIRT1 aşırı ekspresyonu mutasyonlu HTT'nin neden olduğu deasetilaz eksikliğini karşılayarak motor işlev kaybının ilerlemesini yavaşlatır (109). Bazı çalışmalar HH'de HTT'nin CREB tarafından düzenlenen transkripsiyon koaktivatörü 1 (TORC1) - CREB etkileşimini etkileyebileceğini, böylece beyin türetilmiş nörotrofik faktör (BDNF) transkripsiyonunu baskılayabileceğini; tersine, SIRT1'in TORC1'i deasetile ederek ve aktive ederek CREB ile etkileşimini artırabileceğini gösterdi (107, 110). Histon deasetilasyonunun yanı sıra, SIRT1, histonların ve DNA'nın metilasyonunu modüle ederek repressif heterokromatin oluşumuna da katkıda bulunabilir. Ayrıca SIRT1, FOXO3a'nın p300 aracılı aktivasyonunu antagonize eder (111). Bu da FOXO3a'nın aktivitesini düşürebilir ve hücresel yanıtı etkileyebilir. Oksidatif hasar ve mitokondriyal bozukluk, HH modellerinde ana patolojik bulgulardandır. SIRT1, nöronlarda PGC-1α aracılığıyla hücresel antioksidan yolunun aktivasyonunu sağlayabilir ve oksidatif hasarı azaltabilir.

Sirtuin-2

SIRT2, nöron işlevlerinde etkili olan ve hücresel metabolizmayı düzenleyen bir SIRT çeşididir. Diğer SIRT türlerinden farklı olarak sitoplazmada lokasyon gösterir. Genel işlevi mikrotübül bileşenlerin deasetilasyonunu sağlamaktır. Bu sayede HH'de bozulduğu bilinen hücre içi taşıma mekanizmasını etkileyebilir. Ancak bu etkileşim HH için olumlu bir sonuç oluşturmaz. Hatta tersine diğer tüm nörodejeneratif hastalıklarda olduğu gibi HH patogenezinde de nöronal ölümü arttırdığı öne sürülmektedir. HH'de Httex1pQ93 yetişkin sineklerinde SIRT2'nin genetik yok edilmesinin fotoreseptör nöron ölümünü doza bağımlı bir şekilde kurtardığını gösterdi (112). Yapılan çalışmalarda SIRT2'nin inhibe edilmesi ile mutasyonlu HTT inklüzyonlarının sayısı azalmış ve nöroprotektif etki gözlemlenmiştir (107).

Sirtuin-3

HH patogenezinde mitokondriyal disfonksiyonun önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. SIRT3, mitokondriyal proteinlerin global asetilasyon peyzajını regüle ettiği bilinen bir protein olarak öne çıkar. Mitokondriyal disfonksiyonun HH ile ilişkilendirilmesi, SIRT3'ün HH patolojisinde potansiyel bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. HH modellerinde yapılan çalışmalar, SIRT3'ün mitokondriyal proteinlerin asetilasyon durumunu düzenleyerek biyoenerjetik fonksiyonları etkileyebileceğini göstermektedir. Örneğin, SIRT3'ün piruvat dehidrojenaz E1 alfa alt birimi (PDHA1) ve piruvat dehidrojenaz fosfataz 1 (PDP1) gibi piruvat dehidrojenaz kompleksi (PDH) kompleksinin önemli bileşenlerini deasetile ederek PDH aktivitesini düzenlediği bulunmuştur (110, 113). Bu da, HH'de mitokondriyal disfonksiyonun bir sonucu olarak ortaya çıkan enerji metabolizması bozukluklarının potansiyel olarak SIRT3 aracılı deasetilasyon yoluyla düzeltilebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, SIRT3'ün kompleks I, II ve V'in bileşenlerini de deasetile ederek oksidatif fosforilasyon mekanizmasını

düzenlediği ve ATP üretimini artırdığı bilinmektedir (114). Bu mekanizmaların da HH patolojisinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (115). Bununla birlikte, SIRT3'ün nükleer ve mitokondriyal rolleri arasındaki etkileşimler hala net değildir. HH patolojisinde SIRT3'ün nükleer ve mitokondriyal fonksiyonlarının nasıl etkilendiğini anlamak, bu proteinin HH tedavisinde potansiyel bir hedef olarak kullanılabilirliğini daha iyi anlamamıza yardımcı olabilir.

5. Multipl Sklerozis ve Sirtuin İlişkisi

Multipl skleroz (MS), lezyonların tipik olarak beyinde, omurilikte veya kranial sinirlerde ve optik sinirde görülen inflamatuar bir miyelin kılıfı hastalığıdır. Multipl sklerozun nedenleri tam olarak tanımlanmamıştır ancak muhtemelen otoimmün bir etiyolojiden kaynaklanmaktadır; bu nedenle geleneksel olarak inflamatuar bir hastalık olarak tedavi edilir. Ancak son zamanlarda multipl sklerozun, hastalığa sahip hastalarda kalıcı aksonal hasar, nöron kaybı ve nörolojik sakatlığın bir arada bulunması nedeniyle nörodejeneratif bir hastalık olduğu da kabul edilmektedir (116, 117).

MS genç erişkinlerdeki MSS hastalıklarının en sık nedenlerinden birisidir (118). Hastaların 2/3'de semptomlar 20-40 yaş arasında başlar. Semptomların 15 yaşından önce ve 50 yaşından sonra görülmesi oldukça nadirdir. Kadınlarda görülme olasılığı erkeklerden 2-3 kat fazladır. Bu durum genellikle immün ve inflamatuar durumların kadınlarda daha sık görülmesi ile açıklanmaktadır (119).

MS'in karmaşık bir etiyolojisi vardır ve nedenleri hala tam olarak anlaşılamamıştır, ancak MS ilerlemesinin patolojisinde çeşitli mekanizmaların rol oynadığı öne sürülmüştür. Hastalık hem iltihaplanma hem de sinirsel dejenerasyon görünümünü gösterir (120); CNS lezyonları inflamatuar süreçler tarafından yönlendirilirken, birkaç yıl süren kronik inflamasyonun ardından nörodejenerasyon ve aksonal hasar, hastalığın ilerlemesine neden olur (121). Ayrıca son çalışmalar, bağışıklık hücrelerindeki veya nöronlar/aksonlardaki

metabolik değişikliklerin hastalığın ilerlemesini ve patolojiyi etkilediğini göstermektedir (122).

Nörodejenerasyon, otoimmünite ve değişen metabolizma MS patolojisinin üç farklı yönüdür. Öte yandan sirtuinlerin bu yollarda anahtar düzenleyici olduğu rapor edilmiştir (123).

Sirtuin-1

10q21.3 kromozomunda yer alan sirtuin 1 (SIRT1) geni, transkripsiyon faktörlerini, histonları ve çekirdek düzenleyicileri hedef alan histon deasetilaz ailesinin bir üyesidir (124, 125). Beyinde, iskelet kasında, pankreasta, karaciğerde ve yağ dokusunda bulunan Sirtuin 1 , DNA stabilitesi üzerinde büyük etkiye sahiptir (126). Hücreleri oksidatif strese karşı koruyan bir bariyer görevi görür ve enerji metabolizmasını, DNA onarımını ve ayrıca DNA onarımına verilen yanıtı değiştirir (125). SIRT1 nörodejeneratif hastalık, inflamasyon, kardiyovasküler hastalıklar ve amyotrofik lateral skleroz ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca amyotrofik lateral skleroz (ALS) için potansiyel bir tedavidir (126).

SIRT1, deneysel otoimmün ensefalomiyelit (EAE), gibi farklı hayvan modellerinde ve MS hastası bireylerden elde edilen örneklerde bu ailenin en çok araştırılan üyesi olarak düşünülmektedir (123). EAE, MS'in incelendiği mevcut en iyi hayvan modellerinden biridir. Bu modelde SIRT1 aktivasyonuyla ilgili bazı çelişkili sonuçlar vardır; bazı çalışmalar EAE farelerinde SIRT1'in koruyucu fonksiyonunu bildirmiştir. Shindler ve meslektaşları, SIRT1 aktivatörleri ile tedavinin, tekrarlayan EAE'nin indüksiyonunu takiben optik nöritte retinal ganglion hücresi ölümünü azalttığını göstermiştir. (127). Yabanıl tip EAE farelerine kıyasla baskılanmış EAE semptomları, SIRT1'in nöron spesifik aşırı ekspresyonuna sahip transgenik farelerde miyelin oligodendrosit glikoprotein (MOG) peptidi ile immünizasyon yoluyla indüklenen EAE'de gösterilmiştir (128). Nöroprotektif ajanlar olarak NRF2 veya SIRT1'in eşzamanlı aşırı ekspresyonu, EAE farelerinde görsel fonksiyonun bozulmasını

önleyebilir ve retinal ganglionik hücrelerin hayatta kalmasını indükleyebileceğini göstermiştir (McDougald ve diğerleri, 2018). Ayrıca C57BL/6 farelerinde kronik EAE'de ve virüs kaynaklı CNS demiyelinizasyon modelinde de benzer koruyucu etkiler rapor edilmiştir (129, 130).

Doğrudan SIRT1'i hedef alan ve bu proteinin MS hayvan modellerindeki rolünü değerlendiren çalışmaların yanı sıra, hastalıktan koruyucu ajanların kullanıldığı ve SIRT1 düzeyinin ölçüldüğü çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu koruyucu ilaçlardan bazılarının etkileri SIRT1 değişikliklerine bağlanmıştır. Bu şekilde Singh ve meslektaşları, AMPK'nin aktivasyonunda rol alan RhoA ve AICAR'ın bir inhibitörü olarak lovastatinin SIRT1 transkripsiyonunun ekspresyonunun arttığını bildirmişlerdir (131). Kuprizon kaynaklı demiyelinizasyon modelinde linagliptinin farelerde davranışsal işlev bozukluğu üzerindeki nöroprotektif etkisinin AMPK/SIRT1 sinyal yolunun modülatör olarak rolü gösterilmiştir (132). Ayrıca AMPK/SIRT1 sinyal yolunun NAD+ inhibitörü, metilen mavisi ve Adiponektin tedavisiyle hedeflenebileceği ve tedavinin EAE modellerinde Th1/Th17 immün yanıtlarının modülasyonuyla sonuçlanabileceği düşünülmektedir (133, 134).

Sirtuin-2

Sirtun-2 (SIRT2), oligodendrosit farklılaşmasında, miyelin kılıfının oluşumunda ve miyelin ile aksonların etkileşiminde önemli bir rol oynar. SIRT2 proteini bu etkileri hem arborizasyonu hem de miyeline özgü genlerin ekspresyonunu teşvik ederek gösterir (123).

MS hastalarında ve sağlıklı bireylerde insan beyin omurilik sıvısının (BOS) incelendiğii bir çalışma, MS hastalarının %44'ünden fazlasının BOS'unda SIRT2'ye karşı antikorların bulunduğunu göstermiştir (135). Bir başka çalışma, EAE hayvanlarında SIRT2 seviyesinin azaldığını göstermiştir. Ayrıca, post-mortem dokuda, MS hastası ve/veya sağlıklı gruplarda normal görünümlü beyaz madde ile karşılaştırıldığında, MS lezyonundaki SIRT2'nin

çeşitli izoformlarının seviyesinin azaldığını bildirmişlerdir (136). İskemik inme modelinde ise SIRT2'nin miyeline bağlı nöronal işlev bozukluğuna aracılık ettiği düşünülmektedir (137).

Sirtuin 3-4 ve 5

Üç sirtuin (SIRT3, SIRT4 ve SIRT5) mitokondriyal sirtuinler olarak bilinir, öncelikle mitokondri içinde bulunurlar. SIRT1 ve SIRT2'nin aksine, MS'te kapsamlı olarak çalışılmamışlardır, ancak enerji üretimi, hücre sinyali ve apoptozda önemli rolleri olduğu düşünülmektedir (87).

Yakın zamanda yapılan bir çalışma, bir Sirt3 aktivatörü olan honokiolün C57BL/6 farelerini EAE'ye karşı koruduğunu ve bu korumanın demiyelinizasyondaki azalmayla bağlantılı olduğunu göstermiştir (138). Ayrıca, Sirt3 enziminin fare beyin nöronlarının etrafındaki miyelin kılıflarının gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bu ön bulgulara göre, Sirt3 enzimleri MS gibi mitokondriyal hastalıkların tedavisi için ileriye dönük terapötik hedefler haline gelebilir (139).

SIRT4 ise, GDH'nin aşağı regülasyonuna katkıda bulunarak glutamat seviyelerinin artmasına neden olduğu gözlemlenmiştir (140). Çeşitli çalışmalar MS'in anormal glutamat metabolizması, eksitotoksisite ve gen varyantları ile bağlantılı olduğunu göstermiştir (141-143). Yapılan çalışmalar SIRT5'in ise oligodendrosit farklılaşması ve miyelin bakımının düzenlenmesinde rol oynadığını göstermiş ve MS patofizyolojisi ile potansiyel ilgisini vurgulamıştır. SIRT5'in MS ile ilişkisinin incelendiği çalışmaların yetersiz kaldığı görülmüştür.

Sirtuin-6

Sirtuin-6'nın (SIRT6) metabolizma yollarındaki kilit düzenleyici rolü, metabolizmadaki değişiklikler ile bağışıklık yanıtı arasındaki bağlantı kanıtlanmış olmasına rağmen, MS'in hayvan modellerinde veya ölüm sonrası

beyin örneklerinde bu proteinin seviyelerinde herhangi bir değişiklik veya stabilite olduğunu gösteren yeterli kanıt yoktur.

SIRT6 fizyolojik ve patolojik süreçlerde, yaşlanma, kanser, obezite, insülin direnci, inflamasyon ve enerji metabolizmasını düzenleyen önemli rollere sahiptir (72). SIRT6'nın inhibisyonunun, inflamasyonlu lenf nodlarında deneysel otoimmün ensefalomiyelitin başlangıcını geciktirdiği gösterilmiştir (144). Bir başka çalışma ise, EAE modelinde SIRT6'nın transkripsiyon seviyesinin kronik hastalık aşamalarında MSS'de önemli ölçüde arttığını göstermiştir (145).

Sirtuin-7

Sirtuin-7 (SIRT7) en az çalışılan sirtuin olmuştur, ancak son zamanlarda ribozom biyogenezi, stres yanıtı, genom bütünlüğü, metabolizma, kanser ve yaşlanmadaki rolleri ile birçok önemli biyolojik fonksiyona sahip olduğu bildirilmiştir (146, 147).

SIRT7 nakavt fareleri ve miyelin oligodendrosit glikoprotein (MOG) peptidi 35-55 ile EAE indüksiyonu modelinde, SIRT7'nin, özellikle periferik IFN seviyesinde azalmaya ve nakavt farelerde EAE'nin MSS'sinde düzenleyici T hücrelerinin birikiminde azalmaya neden olarak hücre farklılaşmasını ve sitokin üretimini düzenleyebileceği gösterilmiştir. Ayrıca SIRT7'nin yetişkin nöronların hayatta kalmasını olumlu yönde düzenlediğini ancak hipokampal nöronların çoğalmasını etkilemediğini göstermişlerdir. SIRT7'nin bağışıklık ve sinir sistemini etkileyebileceği, ancak MS modelindeki süreçleri modüle etmek için tek başına yeterli olmadığı düşünülmektedir (148).

6. Omurilik Yaralanması ve Sirtuin İlişkisi

Omurilik yaralanması (SCI), omuriliğe geçici veya kalıcı olarak işlevinde değişikliklere neden olan hasar olarak tanımlanır. SCI travmatik ve travmatik olmayan etiyolojilere ayrılmıştır. Travmatik SCI'da, birincil hasar, hücrelere zarar verir ve döngüsel olarak nöronların ve glial hücrelerin ölümüne,

iskeminin ve inflamasyona neden olan karmaşık bir ikincil yaralanma kaskadını başlatır. Bu kaskad, glial yaralanma ve kistik boşlukların oluşumu da dahil olmak üzere omuriliğin organizasyonu ve yapısal mimarisindeki değişiklikler takip eder. Glial yaralanma ve kistik boşluklar, zayıf endojen remiyelinasyon ve aksonal yeniden büyüme ile birlikte, omuriliğin zayıf bir intrinsik iyileşme potansiyeline sahip olduğu anlamına gelir, böylece SCI kalıcı nörolojik hasarlara neden olur (Ahuja et al., 2017). SCI'ların hastalar ve aileleri için yıkıcı fiziksel, sosyal ve mesleki sonuçları vardır ve bağımsızlık kaybı ve sürekli artan yaşam boyu mortalite oranları SCI'nin ayırt edici özellikleridir. Önlenemeyen SCI için etkili tedavilerin geliştirilmesi çok önemlidir (Ahuja et al., 2017).

Sirtuin-1 ve 2

Yakın zamanda yapılan bir çalışma, sirtuin-1 ‘in (SIRT1) endotelyal ROS üretimini azalttığını ve SCI sonrası kan-omurilik bariyerinin bozulmasını hafiflettiğini göstermekte ve SIRT1 aktivasyonunun SCI sonrası kan-omurilik bariyerinin bozulmasına karşı fonksiyonel iyileşmeyi desteklemek için terapötik bir yaklaşım olarak potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir (149). Zhao ve ark yaptığı çalışma ise, resveratrolün SCI sıçanlarında nöronal apoptozu inhibe edebildiğini, doku hasarını azaltabildiğini ve SIRT1/AMPK sinyal yolunun aracılık ettiği otofajiyi aktive ederek motor fonksiyonun iyileşmesini destekleyebildiğini göstermektedir (150). Bir SIRT1 agonisti olan SRT1720'nin, inflamasyonun inhibisyonu yoluyla yabanıl tip farelerde SCI sonrası sonuçların iyileşmesine katkıda bulunduğunu; ancak yeterli olmadığını gösterilmiştir (151). miRNA'ların ise SIRT1'i düzenleyerek SCI için potansiyel terapötik hedefler olduğu bildirilmiştir. Yu ve arkadaşları SIRT1'in hem *in vivo* hem de *in vitro* SCI'de p53 sinyal yolu aracılığıyla apoptozun inhibisyonuna katkıda bulunduğunu, miR-494'ün ise bu süreci inhibe ettiğini ve SIRT1'i hedefleyerek apoptozu indüklediğini göstermişlerdir (152).

Mikroglia aktivasyonu, travma sonrası inflamasyon ve oksidatif streste önemli bir faktördür. Mikroglia aktivasyonunun düzenlenmesi nöronal

fonksiyonun iyileşmesi için çok önemlidir. Lu ve ark., SIRT1'in mikroglia aktivasyonunu inhibe etmek için Wnt/β-katenin sinyalini aşağı regüle ederek nöroprotektif etkiler gösterdiğini ve böylece SCI'nin erken aşamalarında lokal inflamasyonu ve hücresel stresi azalttığını göstermiştir (153).

SIRT2, nöral iyileşmeyi iyileştirmek için mikrotübüllerdeki stabil Ac-α-tubulinin deasetilasyonunu artırarak SCI'den sonra ependimal kök hücrelerin nöronlara farklılaşmasını teşvik etmektedir (154). Kaitsuka ve ark. SIRT2 inhibisyonunun HIF-1α sinyalini aktive ettiğini ve nöronal canlılığı oksidatif stresten korumasından kaynaklı olabileceğini düşünüdürmektedir (155).

Diğer Sirtuinler

Song ve ark., SIRT3 ve PGC-1α'nın, mitokondriyal dinamikleri koruyarak sıçan omurilik motor nöronlarını mutant SOD1(G93A) kaynaklı mitokondriyal parçalanma ve nöronal hücre ölümünden koruduğunu bulmuşlardır (156). Son zamanlarda, SIRT4'ün, AMPK sinyal yolunu baskılayarak travmatik olarak yaralanan omuriliğe sızan düzenleyici T hücrelerinin anti-nöroinflamatuar aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (157). Ayrıca SIRT6, hasarı hafifletmek için inflamasyonu, oksidatif stresi ve hücre apoptozunu inhibe ederek SCI'ye karşı koruyucu bir faktör olarak da işlev görür (158).

Farklı olarak Shao ve ark. SIRT6'nın, nekrotik hücre ölümü ve artan ROS üretimi ile ilişkili olan nöronal hücrelerde oksidatif stresin neden olduğu hasarı arttırdığını göstermiştir (159). Ek olarak SIRT7'nin, p53 aracılı sinyal yolunu düzenleyerek nöronları oksijen-glikoz yoksunluğundan koruyabileceği düşünülmektedir (160).

7. Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) ve Sirtuin İlişkisi

Amyotrofik lateral skleroz (ALS), motor nöronları etkileyerek motor fonksiyonun bozulmasına neden olan nörodejeneratif bir hastalıktır (161). ALS, omurilik, beyin sapı ve motor korteksteki motor nöronların seçici hassasiyeti

ile karakterizedir(162). ALS'nin patogenezi vakaların büyük çoğunluğunda tam olarak anlaşılamamıştır ve motor nöron dejenerasyonunda rol oynayan mekanizmalar çok faktörlü ve karmaşıktır. ALS patolojisine ilişkin daha önceki algılar, büyük ölçüde birbiriyle bağlantılı iki ana etiyolojik bozukluk sınıfına odaklanmıştır: (1) mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve oksidatif stres ve (2) protein toplanması ve toksik proteinlerin veya bunların topaklarının temizlenmesindeki bozulma. Bunlar, nöron ölümü ve akson-kas ayrılmasına neden olan aksonal taşıma, nöroenflamasyon ve eksitotoksisitedeki kusurlara yol açar veya bunlara eşlik eder. ALS yaşla birlikte nöron kaybı da görülür. ALS'de nöromüsküler kavşak denervasyonunun ve nihai motor nöron ölümünün altında yatan nedenler çözülmemiştir.Oksidatif stresin motor nöron ölümünün altında yatabileceği hipotezini destekleyen önemli kanıtlar bulunmaktadır (162). Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve nöroinflamasyonun da ALS patogenezinde rol oynamaktadır. Peroksizom proliferatörüyle aktifleştirilen reseptörler (PPAR'ler) ve özellikle PPAR-y, ALS'de nöroinflamasyonda rol oynayan ana sinyal yolunun bir parçasını oluşturmaktadır (163). PPAR-y'nin aktivasyonu veya inaktivasyonu, ALS'deki nöroinflamasyon mekanizmasının anlaşılmasında geçerli ve umut verici bir yaklaşım sağlayabileceği düşünülmektedir.

Sirtuin-1

SIRT1'in, yıkıcı bir insan motor nöron bozukluğu olan AH ve ALS için fare modellerinde arttığı bulunmuştur (164). SIRT1 deasetilaz aktivitesinin manipülasyonu, sağlıklı yaşlanan organizmalarda protein seviyesinde etkilere sahiptir. Merkezi sinir sisteminde SIRT1 ekspresyonu immünoreaktivitesinde bölgeye özgü değişiklikler göstermektedir. SIRT1 serebral kortikal piramidal hücrelerde, CA1-3 bölgesinin hipokampal piramidal hücrelerinde ve dentat girus hücrelerinde, talamusta ve omurilikte artış göstermektedir (165).

SIRT1, birden fazla lizin bölgesinde PPAR-y, koaktivatör-1α (PGC-1α) ile fiziksel olarak etkileşime girerek deasetilasyona uğratmaktadır ve PGC-1α

aktivitesini arttırmaktadır. Bu bulgular, PPAR-y'nin nöroinflamasyonun önemli bir düzenleyicisi olduğunu ve ALS için terapötik stratejilerin geliştirilmesinde yeni bir potansiyel hedef olduğunu göstermektedir(166).

Sirtuin-3

ALS hastalığında artan hücre ölümü ile birlikte çift yönlü aksonal taşıma kusurları ile birlikte parçalanmış mitokondrilerde bir artış görülmektedir (59). ALS'nin genetik ve klinik görünümü, Cu-Zn süperoksit dismutaz (veya SOD1) mutasyonlarının (Rosen ve ark. 1993) ailesel ALS'nin yaygın bir nedeni olarak görülmektedir. Süperoksit dismutaz 1 (SOD1)(G93A) mutant faresi, ALS'nin sıklıkla kullanılan bir hayvan modelidir (167). Bir ALS modelinde SIRT3, SOD1G93A ile transfekte edilen omurilik motor nöronlarının mitokondriyal parçalanmasını önleyebildiği gösterilmiştir. İlginç bir şekilde, SIRT3 veya PGC-1α ile birlikte ekspresyon, hücre sağkalımını iyileştirmek için SOD1G93A kaynaklı mitokondriyal parçalanmayı kurtarabilir (156). SIRT3, mitokondriyal 3-hidroksi-3-metilglutaril CoA sentaz 2'nin (HMGCS2) deasetilasyonu yoluyla keton gövdesi üretimini düzenleyerek SOD1G93A modelinde nöroproteksiyon potansiyelini göstermektedir (168).

8. Sonuç

Bahsedilen bu nörodejeneratif hastlaıkların ortak sebepleri oksidatif stres, nöroinflamasyon, nöron kayıpları, enerji metabolizması bozuklukları ve nörokimyasal değişikliklerdir. SIRT'lar ise bu süreçlerde rolü olan bir grup protein enzimidir. Zararlı protein agregasyonlarını azaltabilirler. SIRT'ların antioksidan ve nöroprotektif etkileri, nöronlarda inflamasyonu azaltma ve onları koruma potansiyeli nörodejeneratif hastalıkların gelişimini ve ilerlemesini yavaşlatabileceğine ya da durdurabileceğine dair umut vericidir. Ancak bu hastalıklar ve SIRT'larla ilgili kısıtlı olan araştırmaların çoğaltılmasına ihtiyaç vardır.

Kaynakça

1. Donmez G, Guarente L. Aging and disease: connections to sirtuins. Aging cell. 2010;9:285-290.
2. Horio Y, Hayashi T, Kuno A, Kunimoto R. Cellular and molecular effects of sirtuins in health and disease. Clinical science. 2011;121:191-203.
3. Donmez G, Arun A, Chung C-Y, McLean PJ, Lindquist S, Guarente L. SIRT1 protects against α-synuclein aggregation by activating molecular chaperones. Journal of Neuroscience. 2012;32:124-132.
4. Lalla R, Donmez G. The role of sirtuins in Alzheimer's disease. Frontiers in aging neuroscience. 2013;5:16.
5. Donmez G, Outeiro TF. SIRT1 and SIRT2: emerging targets in neurodegeneration. EMBO molecular medicine. 2013;5:344-352.
6. Szućko I. Sirtuins: not only animal proteins. Acta Physiologiae Plantarum. 2016;38:1-9.
7. Lin J, Xiong Z, Gu J, Sun Z, Shuai J, Fan D, Li W. Sirtuins: potential therapeutic targets for defense against oxidative stress in spinal cord injury. Oxidative medicine and cellular longevity. 2021;2021:1-14.
8. Anekonda TS, Reddy PH. Neuronal protection by sirtuins in Alzheimer's disease. Journal of neurochemistry. 2006;96:305-313.
9. Yamamoto H, Schoonjans K, Auwerx J. Sirtuin functions in health and disease. Molecular endocrinology. 2007;21:1745-1755.
10. Sidorova-Darmos E, Wither RG, Shulyakova N, Fisher C, Ratnam M, Aarts M, Lilge L, Monnier PP, Eubanks JH. Differential expression of sirtuin family members in the developing, adult, and aged rat brain. Frontiers in aging neuroscience. 2014;6:333.
11. Jayasena T, Poljak A, Braidy N, Zhong L, Rowlands B, Muenchhoff J, Grant R, Smythe G, Teo C, Raftery M. Application of targeted mass spectrometry for the quantification of sirtuins in the central nervous system. Scientific reports. 2016;6:35391.

12. Chandramowlishwaran P, Vijay A, Abraham D, Li G, Mwangi SM, Srinivasan S. Role of sirtuins in modulating neurodegeneration of the enteric nervous system and central nervous system. Frontiers in Neuroscience. 2020;14:614331.
13. Gitler AD, Dhillon P, Shorter J. Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new hope. Disease models & mechanisms. 2017;10:499-502.
14. Gerdts J, Brace E, Sasaki Y, DiAntonio A, Milbrandt J. SARM1 activation triggers axon degeneration locally via NAD+ destruction. Science. 2015;348:453-457.
15. Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA. Alzheimer disease. Disease-a-month: DM. 2010;56:484.
16. Peng Y, Gao P, Shi L, Chen L, Liu J, Long J. Central and peripheral metabolic defects contribute to the pathogenesis of Alzheimer's disease: targeting mitochondria for diagnosis and prevention. Antioxidants & redox signaling. 2020;32:1188-1236.
17. Xu L, Liu R, Qin Y, Wang T. Brain metabolism in Alzheimer's disease: biological mechanisms of exercise. Translational Neurodegeneration. 2023;12:33.
18. Elmacı N. Alzheimer hastalığının patofizyolojisi. Turkiye Klinikleri J Neurol-special Topics. 2012;5:3.
19. Hardiman O, Doherty CP, Elamin M, Bede P: Neurodegenerative disorders, Springer; 2011.
20. Hawkins KE, Duchen M. Modelling mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease using human induced pluripotent stem cells. World Journal of Stem Cells. 2019;11:236.
21. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. science. 2002;297:353-356.

22. Selkoe DJ. Amyloid β-protein and the genetics of Alzheimer's disease. Journal of Biological Chemistry. 1996;271:18295-18298.
23. Outeiro TF, Marques O, Kazantsev A. Therapeutic role of sirtuins in neurodegenerative disease. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. 2008;1782:363-369.
24. Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo S-Y, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1975;72:1858-1862.
25. Alonso AdC, Zaidi T, Novak M, Barra HS, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Interaction of tau isoforms with Alzheimer's disease abnormally hyperphosphorylated tau and in VitroPhosphorylation into the disease-like protein. Journal of Biological Chemistry. 2001;276:37967-37973.
26. Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian Sirtuins: Biological Insights and Disease Relevance. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. 2010;5:253-295.
27. Lalla R, Donmez G. The role of sirtuins in Alzheimer's disease. Frontiers in Aging Neuroscience. 2013;5.
28. Qin W, Yang T, Ho L, Zhao Z, Wang J, Chen L, Zhao W, Thiyagarajan M, MacGrogan D, Rodgers JT. Neuronal SIRT1 activation as a novel mechanism underlying the prevention of Alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction. Journal of Biological Chemistry. 2006;281:21745-21754.
29. Lee HR, Shin HK, Park SY, Kim HY, Lee WS, Rhim BY, Hong KW, Kim CD. Cilostazol suppresses β-amyloid production by activating a disintegrin and metalloproteinase 10 via the upregulation of SIRT1-coupled retinoic acid receptor-β. Journal of neuroscience research. 2014;92:1581-1590.
30. Wang R, Li JJ, Diao S, Kwak Y-D, Liu L, Zhi L, Büeler H, Bhat NR, Williams RW, Park EA. Metabolic stress modulates Alzheimer's β-

secretase gene transcription via SIRT1-PPARγ-PGC-1 in neurons. Cell metabolism. 2013;17:685-694.

31. Zhang Z, Shen Q, Wu X, Zhang D, Xing D. Activation of PKA/SIRT1 signaling pathway by photobiomodulation therapy reduces Aβ levels in Alzheimer's disease models. Aging cell. 2020;19:e13054.
32. A McKenzie J, J Spielman L, B Pointer C, R Lowry J, Bajwa E, W Lee C, Klegeris A. Neuroinflammation as a common mechanism associated with the modifiable risk factors for Alzheimer's and Parkinson's diseases. Current aging science. 2017;10:158-176.
33. Mehramiz M, Porter T, O'Brien EK, Rainey-Smith SR, Laws SM. A Potential Role for Sirtuin-1 in Alzheimer's Disease: Reviewing the Biological and Environmental Evidence. Journal of Alzheimer's Disease Reports. 2023;7:823-843.
34. Theendakara V, Patent A, Peters Libeu CA, Philpot B, Flores S, Descamps O, Poksay KS, Zhang Q, Cailing G, Hart M. Neuroprotective Sirtuin ratio reversed by ApoE4. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013;110:18303-18308.
35. Lattanzio F, Carboni L, Carretta D, Rimondini R, Candeletti S, Romualdi P. Human apolipoprotein E4 modulates the expression of Pin1, Sirtuin 1, and Presenilin 1 in brain regions of targeted replacement apoE mice. Neuroscience. 2014;256:360-369.
36. Ko S-Y, Ko H-A, Chu K-H, Shieh T-M, Chi T-C, Chen H-I, Chang W-C, Chang S-S. The possible mechanism of advanced glycation end products (AGEs) for Alzheimer's disease. PloS one. 2015;10:e0143345.
37. Cai XJ, Widdowson PS, Harrold J, Wilson S, Buckingham RE, Arch J, Tadayyon M, Clapham JC, Wilding J, Williams G. Hypothalamic orexin expression: modulation by blood glucose and feeding. Diabetes. 1999;48:2132-2137.

38. Gal J, Bang Y, Choi HJ. SIRT2 interferes with autophagy-mediated degradation of protein aggregates in neuronal cells under proteasome inhibition. Neurochemistry international. 2012;61:992-1000.
39. Min S-W, Cho S-H, Zhou Y, Schroeder S, Haroutunian V, Seeley WW, Huang EJ, Shen Y, Masliah E, Mukherjee C. Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. Neuron. 2010;67:953-966.
40. Quintas A, de Solís AJ, Díez-Guerra FJ, Carrascosa JM, Bogónez E. Age-associated decrease of SIRT1 expression in rat hippocampus: prevention by late onset caloric restriction. Experimental gerontology. 2012;47:198-201.
41. Kumar R, Chaterjee P, Sharma PK, Singh AK, Gupta A, Gill K, Tripathi M, Dey AB, Dey S. Sirtuin1: a promising serum protein marker for early detection of Alzheimer's disease. PloS one. 2013;8:e61560.
42. Carboni L, Lattanzio F, Candeletti S, Porcellini E, Raschi E, Licastro F, Romualdi P. Peripheral leukocyte expression of the potential biomarker proteins Bdnf, Sirt1, and Psen1 is not regulated by promoter methylation in Alzheimer's disease patients. Neuroscience Letters. 2015;605:44-48.
43. Michán S, Li Y, Chou MM-H, Parrella E, Ge H, Long JM, Allard JS, Lewis K, Miller M, Xu W. SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity. Journal of Neuroscience. 2010;30:9695-9707.
44. Gao J, Wang W-Y, Mao Y-W, Gräff J, Guan J-S, Pan L, Mak G, Kim D, Su SC, Tsai L-H. A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. Nature. 2010;466:1105-1109.
45. Vaquero A, Scher M, Lee D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. Molecular cell. 2004;16:93-105.
46. Silva D, Esteves A, Oliveira C, Cardoso S. Mitochondrial metabolism power SIRT2-dependent deficient traffic causing Alzheimer's-disease related pathology. Molecular neurobiology. 2017;54:4021-4040.

47. Singh P, Hanson PS, Morris CM. Sirtuin-2 protects neural cells from oxidative stress and is elevated in neurodegeneration. Parkinson's Disease. 2017;2017.
48. Wongchitrat P, Pakpian N, Kitidee K, Phopin K, Dharmasaroja PA, Govitrapong P. Alterations in the expression of amyloid precursor protein cleaving enzymes mRNA in Alzheimer peripheral blood. Current Alzheimer Research. 2019;16:29-38.
49. Pascoal TA, Benedet AL, Ashton NJ, Kang MS, Therriault J, Chamoun M, Savard M, Lussier FZ, Tissot C, Karikari TK. Microglial activation and tau propagate jointly across Braak stages. Nature medicine. 2021;27:1592-1599.
50. Biella G, Fusco F, Nardo E, Bernocchi O, Colombo A, Lichtenthaler SF, Forloni G, Albani D. Sirtuin 2 inhibition improves cognitive performance and acts on amyloid-β protein precursor processing in two Alzheimer's disease mouse models. Journal of Alzheimer's Disease. 2016;53:1193-1207.
51. Bai N, Li N, Cheng R, Guan Y, Zhao X, Song Z, Xu H, Yi F, Jiang B, Li X. Inhibition of SIRT2 promotes APP acetylation and ameliorates cognitive impairment in APP/PS1 transgenic mice. Cell Reports. 2022;40.
52. Habib A, Sawmiller D, Tan J. Restoring Soluble Amyloid Precursor Protein α Functions as a Potential Treatment for A lzheimer's Disease. Journal of neuroscience research. 2017;95:973-991.
53. Tackenberg C, Nitsch RM. The secreted APP ectodomain sAPPα, but not sAPPβ, protects neurons against Aβ oligomer-induced dendritic spine loss and increased tau phosphorylation. Molecular brain. 2019;12:1-4.
54. Spires-Jones TL, Fox LM, Rozkalne A, Pitstick R, Carlson GA, Kazantsev AG. Inhibition of sirtuin 2 with sulfobenzoic acid derivative AK1 is non-

toxic and potentially neuroprotective in a mouse model of frontotemporal dementia. Frontiers in pharmacology. 2012;3:23088.

55. Diaz-Perdigon T, Belloch FB, Ricobaraza A, Elboray EE, Suzuki T, Tordera RM, Puerta E. Early sirtuin 2 inhibition prevents age-related cognitive decline in a senescence-accelerated mouse model. Neuropsychopharmacology. 2020;45:347-357.
56. Zhou C, Jung C-G, Kim M-J, Watanabe A, Abdelhamid M, Taslima F, Michikawa M. Insulin deficiency increases Sirt2 level in streptozotocin-treated alzheimer's disease-like mouse model: increased Sirt2 induces tau phosphorylation through ERK activation. Molecular Neurobiology. 2022;59:5408-5425.
57. Yoo DY, Kim DW, Kim MJ, Choi JH, Jung HY, Nam SM, Kim JW, Yoon YS, Choi SY, Hwang IK. Sodium butyrate, a histone deacetylase Inhibitor, ameliorates SIRT2-induced memory impairment, reduction of cell proliferation, and neuroblast differentiation in the dentate gyrus. Neurological Research. 2015;37:69-76.
58. Esteves AR, Arduíno DM, Silva DF, Viana SD, Pereira FC, Cardoso SM. Mitochondrial metabolism regulates microtubule acetylome and autophagy trough sirtuin-2: impact for Parkinson's disease. Molecular neurobiology. 2018;55:1440-1462.
59. Ansari A, Rahman MS, Saha SK, Saikot FK, Deep A, Kim KH. Function of the SIRT 3 mitochondrial deacetylase in cellular physiology, cancer, and neurodegenerative disease. Aging cell. 2017;16:4-16.
60. Weir HJ, Murray TK, Kehoe PG, Love S, Verdin EM, O'Neill MJ, Lane JD, Balthasar N. CNS SIRT3 expression is altered by reactive oxygen species and in Alzheimer's disease. PloS one. 2012;7:e48225.
61. Khanna A, Acharjee P, Acharjee A, Trigun SK. Mitochondrial SIRT3 and neurodegenerative brain disorders. Journal of chemical neuroanatomy. 2019;95:43-53.

62. Yang W, Zou Y, Zhang M, Zhao N, Tian Q, Gu M, Liu W, Shi R, Lü Y, Yu W. Mitochondrial Sirt3 expression is decreased in APP/PS1 double transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Neurochemical Research. 2015;40:1576-1582.
63. Lee J, Kim Y, Liu T, Hwang YJ, Hyeon SJ, Im H, Lee K, Alvarez VE, McKee AC, Um SJ. SIRT3 deregulation is linked to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. Aging cell. 2018;17:e12679.
64. Rangarajan P, Karthikeyan A, Lu J, Ling E-A, Dheen S. Sirtuin 3 regulates Foxo3a-mediated antioxidant pathway in microglia. Neuroscience. 2015;311:398-414.
65. Cacabelos R, Carril JC, Cacabelos N, Kazantsev AG, Vostrov AV, Corzo L, Cacabelos P, Goldgaber D. Sirtuins in Alzheimer's Disease: SIRT2-Related GenoPhenotypes and Implications for PharmacoEpiGenetics. International Journal of Molecular Sciences. 2019;20:1249.
66. Han P, Tang Z, Yin J, Maalouf M, Beach TG, Reiman EM, Shi J. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects against β-amyloid toxicity. Neurobiology of aging. 2014;35:2064-2071.
67. Smith MA, Sayre LM, Monnier VM, Perry G. Radical AGEing in Alzheimer's disease. Trends in neurosciences. 1995;18:172-176.
68. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. Nature. 1990;345:458-460.
69. Kawanishi S, Oikawa S. Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. Annals of the new York Academy of Sciences. 2004;1019:278-284.
70. Franco S, Blasco MA, Siedlak SL, Harris PL, Moreira PI, Perry G, Smith MA. Telomeres and telomerase in Alzheimer's disease: epiphenomena or a new focus for therapeutic strategy? Alzheimer's & Dementia. 2006;2:164-168.

71. Mohamad Nasir NF, Zainuddin A, Shamsuddin S. Emerging roles of Sirtuin 6 in Alzheimer's disease. Journal of Molecular Neuroscience. 2018;64:157-161.
72. Kugel S, Mostoslavsky R. Chromatin and beyond: the multitasking roles for SIRT6. Trends in biochemical sciences. 2014;39:72-81.
73. Gella A, Durany N. Oxidative stress in Alzheimer disease. Cell adhesion & migration. 2009;3:88-93.
74. Kaluski S, Portillo M, Besnard A, Stein D, Einav M, Zhong L, Ueberham U, Arendt T, Mostoslavsky R, Sahay A. Neuroprotective functions for the histone deacetylase SIRT6. Cell reports. 2017;18:3052-3062.
75. Jung ES, Choi H, Song H, Hwang YJ, Kim A, Ryu H, Mook-Jung I. p53-dependent SIRT6 expression protects Aβ42-induced DNA damage. Scientific reports. 2016;6:25628.
76. Peng C, Trojanowski JQ, Lee VM-Y. Protein transmission in neurodegenerative disease. Nature Reviews Neurology. 2020;16:199-212.
77. Alqahtani T, Deore SL, Kide AA, Shende BA, Sharma R, Chakole RD, Nemade LS, Kale NK, Borah S, Deokar SS. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease, and Parkinson's disease, Huntington's disease and amyotrophic lateral sclerosis-an updated review. Mitochondrion. 2023.
78. Tolosa E, Garrido A, Scholz SW, Poewe W. Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. The Lancet Neurology. 2021;20:385-397.
79. Antony PM, Diederich NJ, Krüger R, Balling R. The hallmarks of P arkinson's disease. The FEBS journal. 2013;280:5981-5993.
80. Hindle JV. Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease. Age and ageing. 2010;39:156-161.

81. Wirdefeldt K, Adami H-O, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. European journal of epidemiology. 2011;26:1-58.

82. Shulman JM, De Jager PL, Feany MB. Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. 2011;6:193-222.

83. Tang BL. Sirtuins as modifiers of Parkinson's disease pathology. Journal of neuroscience research. 2017;95:930-942.

84. Sheng Z-H, Cai Q. Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. Nature Reviews Neuroscience. 2012;13:77-93.

85. Sanchez-Guajardo V, Tentillier N, Romero-Ramos M. The relation between α-synuclein and microglia in Parkinson's disease: Recent developments. Neuroscience. 2015;302:47-58.

86. Falkenberg KJ, Johnstone RW. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. Nature reviews Drug discovery. 2014;13:673-691.

87. Verdin E, Hirschey MD, Finley LW, Haigis MC. Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling. Trends in biochemical sciences. 2010;35:669-675.

88. Min S-W, Sohn PD, Cho S-H, Swanson RA, Gan L. Sirtuins in neurodegenerative diseases: an update on potential mechanisms. Frontiers in aging neuroscience. 2013;5:53.

89. ur Rasheed MS, Tripathi MK, Mishra AK, Shukla S, Singh MP. Resveratrol protects from toxin-induced parkinsonism: plethora of proofs hitherto petty translational value. Molecular neurobiology. 2016;53:2751-2760.

90. Tripodi F, Lombardi L, Guzzetti L, Panzeri D, Milanesi R, Leri M, Bucciantini M, Angeloni C, Beghelli D, Hrelia S. Protective effect of

Vigna unguiculata extract against aging and neurodegeneration. Aging (Albany NY). 2020;12:19785.

91. Teng W-L, Huang P-H, Wang H-C, Tseng C-H, Yen F-L. Pterostilbene attenuates particulate matter-induced oxidative stress, inflammation and aging in keratinocytes. Antioxidants. 2021;10:1552.
92. Kitada M, Ogura Y, Monno I, Koya D. Sirtuins and type 2 diabetes: role in inflammation, oxidative stress, and mitochondrial function. Frontiers in endocrinology. 2019;10:415266.
93. Wu Y, Li X, Zhu JX, Xie W, Le W, Fan Z, Jankovic J, Pan T. Resveratrol-activated AMPK/SIRT1/autophagy in cellular models of Parkinson's disease. Neurosignals. 2011;19:163-174.
94. Chao J, Li H, Cheng K-W, Yu M-S, Chang RC-C, Wang M. Protective effects of pinostilbene, a resveratrol methylated derivative, against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. The Journal of nutritional biochemistry. 2010;21:482-489.
95. Cui Z, Zhao X, Amevor FK, Du X, Wang Y, Li D, Shu G, Tian Y, Zhao X. Therapeutic application of quercetin in aging-related diseases: SIRT1 as a potential mechanism. Frontiers in immunology. 2022;13:943321.
96. Mudo G, Mäkelä J, Liberto VD, Tselykh TV, Olivieri M, Piepponen P, Eriksson O, Mälkiä A, Bonomo A, Kairisalo M. Transgenic expression and activation of PGC-1α protect dopaminergic neurons in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. Cellular and Molecular Life Sciences. 2012;69:1153-1165.
97. Kitao Y, Ageta-Ishihara N, Takahashi R, Kinoshita M, Hori O. Transgenic supplementation of SIRT1 fails to alleviate acute loss of nigrostriatal dopamine neurons and gliosis in a mouse model of MPTP-induced parkinsonism. F1000Research. 2015;4.
98. Takahashi-Niki K, Ganaha Y, Niki T, Nakagawa S, Kato-Ose I, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. DJ-1 activates SIRT1 through its direct binding to

SIRT1. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2016;474:131-136.

99. Outeiro TF, Kontopoulos E, Altmann SM, Kufareva I, Strathearn KE, Amore AM, Volk CB, Maxwell MM, Rochet J-C, McLean PJ. Sirtuin 2 inhibitors rescue α-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease. science. 2007;317:516-519.
100. Godena VK, Brookes-Hocking N, Moller A, Shaw G, Oswald M, Sancho RM, Miller CC, Whitworth AJ, De Vos KJ. Increasing microtubule acetylation rescues axonal transport and locomotor deficits caused by LRRK2 Roc-COR domain mutations. Nature communications. 2014;5:5245.
101. Jin L, Galonek H, Israelian K, Choy W, Morrison M, Xia Y, Wang X, Xu Y, Yang Y, Smith JJ. Biochemical characterization, localization, and tissue distribution of the longer form of mouse SIRT3. Protein science. 2009;18:514-525.
102. Zhang J-Y, Deng Y-N, Zhang M, Su H, Qu Q-M. SIRT3 acts as a neuroprotective agent in rotenone-induced Parkinson cell model. Neurochemical research. 2016;41:1761-1773.
103. Liu L, Peritore C, Ginsberg J, Kayhan M, Donmez G. SIRT3 attenuates MPTP-induced nigrostriatal degeneration via enhancing mitochondrial antioxidant capacity. Neurochemical research. 2015;40:600-608.
104. Walker FO. Huntington's disease. The Lancet. 2007;369:218-228.
105. MacDonald ME, Ambrose CM, Duyao MP, Myers RH, Lin C, Srinidhi L, Barnes G, Taylor SA, James M, Groot N. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. Cell. 1993;72:971-983.
106. Pandey M, Rajamma U. Huntington’s disease: the coming of age. Journal of genetics. 2018;97:649-664.

107. Neo SH, Tang BL. Sirtuins as modifiers of Huntington's disease (HD) pathology. Progress in molecular biology and translational science. 2018;154:105-145.

108. Balaban ÖD, Atbaşoğlu EC. Huntington Hastalığı'nın Nöropsikiyatrik Yönü. Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar. 2022;14:98-112.

109. Razick DI, Akhtar M, Wen J, Alam M, Dean N, Karabala M, Ansari U, Ansari Z, Tabaie E, Siddiqui S. The Role of Sirtuin 1 (SIRT1) in Neurodegeneration. Cureus. 2023;15.

110. Naia L, Rego AC. Sirtuins: double players in Huntington's disease. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. 2015;1852:2183-2194.

111. Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, Auwerx J. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD+ metabolism and SIRT1 activity. Nature. 2009;458:1056-1060.

112. Luthi-Carter R, Taylor DM, Pallos J, Lambert E, Amore A, Parker A, Moffitt H, Smith DL, Runne H, Gokce O. SIRT2 inhibition achieves neuroprotection by decreasing sterol biosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010;107:7927-7932.

113. Fan J, Shan C, Kang H-B, Elf S, Xie J, Tucker M, Gu T-L, Aguiar M, Lonning S, Chen H. Tyr phosphorylation of PDP1 toggles recruitment between ACAT1 and SIRT3 to regulate the pyruvate dehydrogenase complex. Molecular cell. 2014;53:534-548.

114. Rahman M, Nirala NK, Singh A, Zhu LJ, Taguchi K, Bamba T, Fukusaki E, Shaw LM, Lambright DG, Acharya JK. Drosophila Sirt2/mammalian SIRT3 deacetylates ATP synthase β and regulates complex V activity. Journal of Cell Biology. 2014;206:289-305.

115. Zhang H, Dai S, Yang Y, Wei J, Li X, Luo P, Jiang X. Role of sirtuin 3 in degenerative diseases of the central nervous system. Biomolecules. 2023;13:735.

116. Lassmann H. Axonal and neuronal pathology in multiple sclerosis: what have we learnt from animal models. Experimental neurology. 2010;225:2-8.

117. Shindler KS, Ventura E, Dutt M, Elliott P, Fitzgerald DC, Rostami A. Oral resveratrol reduces neuronal damage in a model of multiple sclerosis. Journal of Neuro-Ophthalmology. 2010;30:328-339.

118. Winkelmann A, Engel C, Apel A, Zettl UK. Cognitive impairment in multiple sclerosis. Journal of neurology. 2007;254:II35-II42.

119. Victor M, Ropper AH: Adams and Victor's manual of neurology. 2002.

120. Compston A. Genetic epidemiology of multiple sclerosis. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry. 1997;62:553.

121. Lassmann H, Van Horssen J, Mahad D. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. Nature Reviews Neurology. 2012;8:647-656.

122. Tannahill GM, Iraci N, Gaude E, Frezza C, Pluchino S. Metabolic reprograming of mononuclear phagocytes in progressive multiple sclerosis. Frontiers in immunology. 2015;6:133402.

123. Foolad F, Khodagholi F, Javan M. Sirtuins in Multiple Sclerosis: The crossroad of neurodegeneration, autoimmunity and metabolism. Multiple sclerosis and related disorders. 2019;34:47-58.

124. Zarrabeitia MT, Valero C, Martín-Escudero JC, Olmos JM, Bolado-Carrancio A, de Sande-Nacarino EL, Rodríguez-Rey JC, Sainz J, Riancho JA. Association study of sirtuin 1 polymorphisms with bone mineral density and body mass index. Archives of Medical Research. 2012;43:363-368.

125. Batiha GE-S, Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Elekhnawy E. SIRT1 pathway in Parkinson's disease: a faraway snapshot but so close. Inflammopharmacology. 2023;31:37-56.

126. Zhang Y, Anoopkumar-Dukie S, Arora D, Davey AK. Review of the anti-inflammatory effect of SIRT1 and SIRT2 modulators on neurodegenerative diseases. European journal of pharmacology. 2020;867:172847.

127. Shindler KS, Ventura E, Rex TS, Elliott P, Rostami A. SIRT1 activation confers neuroprotection in experimental optic neuritis. Investigative ophthalmology & visual science. 2007;48:3602-3609.

128. Nimmagadda VK, Bever CT, Vattikunta NR, Talat S, Ahmad V, Nagalla NK, Trisler D, Judge SI, Royal W, Chandrasekaran K. Overexpression of SIRT1 protein in neurons protects against experimental autoimmune encephalomyelitis through activation of multiple SIRT1 targets. The Journal of Immunology. 2013;190:4595-4607.

129. Fonseca-Kelly Z, Nassrallah M, Uribe J, Khan RS, Dine K, Dutt M, Shindler KS. Resveratrol neuroprotection in a chronic mouse model of multiple sclerosis. Frontiers in neurology. 2012;3:25846.

130. Khan RS, Dine K, Das Sarma J, Shindler KS. SIRT1 activating compounds reduce oxidative stress mediated neuronal loss in viral induced CNS demyelinating disease. Acta neuropathologica communications. 2014;2:1-14.

131. Singh I, Samuvel DJ, Choi S, Saxena N, Singh AK, Won J. Combination therapy of lovastatin and AMP-activated protein kinase activator improves mitochondrial and peroxisomal functions and clinical disease in experimental autoimmune encephalomyelitis model. Immunology. 2018;154:434-451.

132. Elbaz EM, Senousy MA, El-Tanbouly DM, Sayed RH. Neuroprotective effect of linagliptin against cuprizone-induced demyelination and

behavioural dysfunction in mice: a pivotal role of AMPK/SIRT1 and JAK2/STAT3/NF-κB signalling pathway modulation. Toxicology and applied pharmacology. 2018;352:153-161.

133. Wang J, Zhao C, Kong P, Sun H, Sun Z, Bian G, Sun Y, Guo L. Treatment with NAD+ inhibited experimental autoimmune encephalomyelitis by activating AMPK/SIRT1 signaling pathway and modulating Th1/Th17 immune responses in mice. International immunopharmacology. 2016;39:287-294.

134. Wang J, Zhao C, Kong P, Bian G, Sun Z, Sun Y, Guo L, Li B. Methylene blue alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis by modulating AMPK/SIRT1 signaling pathway and Th17/Treg immune response. Journal of Neuroimmunology. 2016;299:45-52.

135. Lovato L, Cianti R, Gini B, Marconi S, Bianchi L, Armini A, Anghileri E, Locatelli F, Paoletti F, Franciotta D. Transketolase and 2′, 3′-cyclic-nucleotide 3′-phosphodiesterase type I isoforms are specifically recognized by IgG autoantibodies in multiple sclerosis patients. Molecular & Cellular Proteomics. 2008;7:2337-2349.

136. Jastorff AM, Haegler K, Maccarrone G, Holsboer F, Weber F, Ziemssen T, Turck CW. Regulation of proteins mediating neurodegeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. PROTEOMICS–Clinical Applications. 2009;3:1273-1287.

137. Krey L, Lühder F, Kusch K, Czech-Zechmeister B, Könnecke B, Outeiro TF, Trendelenburg G. Knockout of silent information regulator 2 (SIRT2) preserves neurological function after experimental stroke in mice. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 2015;35:2080-2088.

138. Hsiao Y-P, Chen H-T, Liang Y-C, Wang T-E, Huang K-H, Hsu C-C, Liang H-J, Huang C-H, Jan T-R. Development of nanosome-encapsulated honokiol for intravenous therapy against experimental autoimmune encephalomyelitis. International Journal of Nanomedicine. 2020:17-29.

139. Hares K, Kemp K, Rice C, Gray E, Scolding N, Wilkins A. Reduced axonal motor protein expression in non-lesional grey matter in multiple sclerosis. Multiple Sclerosis Journal. 2014;20:812-821.

140. Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Karow M, Blander G. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic β cells. Cell. 2006;126:941-954.

141. Matute C, Alberdi E, Domercq Ma, Pérez-Cerdá F, Pérez-Samartín A, Sánchez-Gómez MaV. The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases. Trends in neurosciences. 2001;24:224-230.

142. Geurts J, Wolswijk G, Bö L, Van Der Valk P, Polman C, Troost D, Aronica E. Altered expression patterns of group I and II metabotropic glutamate receptors in multiple sclerosis. Brain. 2003;126:1755-1766.

143. Baranzini SE, Srinivasan R, Khankhanian P, Okuda DT, Nelson SJ, Matthews PM, Hauser SL, Oksenberg JR, Pelletier D. Genetic variation influences glutamate concentrations in brains of patients with multiple sclerosis. Brain. 2010;133:2603-2611.

144. Piacente F, Bottero M, Benzi A, Vigo T, Uccelli A, Bruzzone S, Ferrara G. Neuroprotective potential of dendritic cells and sirtuins in multiple sclerosis. International Journal of Molecular Sciences. 2022;23:4352.

145. Prozorovski T, Ingwersen J, Lukas D, Göttle P, Koop B, Graf J, Schneider R, Franke K, Schumacher S, Britsch S. Regulation of sirtuin expression in autoimmune neuroinflammation: Induction of SIRT1 in oligodendrocyte progenitor cells. Neuroscience Letters. 2019;704:116-125.

146. Yamagata K, Yoshizawa T. Transcriptional regulation of metabolism by SIRT1 and SIRT7. International review of cell and molecular biology. 2018;335:143-166.

147. Wu D, Li Y, Zhu KS, Wang H, Zhu W-G. Advances in cellular characterization of the sirtuin isoform, SIRT7. Frontiers in endocrinology. 2018;9:420642.

148. Burg N, Bittner S, Ellwardt E. Role of the epigenetic factor Sirt7 in neuroinflammation and neurogenesis. Neuroscience Research. 2018;131:1-9.

149. Jiang T, Qin T, Gao P, Tao Z, Wang X, Wu M, Gu J, Chu B, Zheng Z, Yi J. SIRT1 attenuates blood-spinal cord barrier disruption after spinal cord injury by deacetylating p66Shc. Redox Biology. 2023;60:102615.

150. Zhao H, Chen S, Gao K, Zhou Z, Wang C, Shen Z, Guo Y, Li Z, Wan Z, Liu C. Resveratrol protects against spinal cord injury by activating autophagy and inhibiting apoptosis mediated by the SIRT1/AMPK signaling pathway. Neuroscience. 2017;348:241-251.

151. Chen H, Ji H, Zhang M, Liu Z, Lao L, Deng C, Chen J, Zhong G. An agonist of the protective factor SIRT1 improves functional recovery and promotes neuronal survival by attenuating inflammation after spinal cord injury. Journal of Neuroscience. 2017;37:2916-2930.

152. Yu X, Zhang S, Zhao D, Zhang X, Xia C, Wang T, Zhang M, Liu T, Huang W, Wu B. SIRT1 inhibits apoptosis in in vivo and in vitro models of spinal cord injury via microRNA-494. International Journal of Molecular Medicine. 2019;43:1758-1768.

153. Lu P, Han D, Zhu K, Jin M, Mei X, Lu H. Effects of Sirtuin 1 on microglia in spinal cord injury: involvement of Wnt/β-catenin signaling pathway. Neuroreport. 2019;30:867-874.

154. Ma Y, Deng M, Zhao X-q, Liu M. Alternatively polarized macrophages regulate the growth and differentiation of ependymal stem cells through the SIRT2 pathway. Experimental neurobiology. 2020;29:150.

155. Kaitsuka T, Matsushita M, Matsushita N. SIRT2 inhibition activates hypoxia-inducible factor 1α signaling and mediates neuronal survival.

Biochemical and Biophysical Research Communications. 2020;529:957-962.

156. Song W, Song Y, Kincaid B, Bossy B, Bossy-Wetzel E. Mutant SOD1G93A triggers mitochondrial fragmentation in spinal cord motor neurons: neuroprotection by SIRT3 and PGC-1α. Neurobiology of disease. 2013;51:72-81.

157. Lin W, Chen W, Liu W, Xu Z, Zhang L. Sirtuin4 suppresses the anti-neuroinflammatory activity of infiltrating regulatory T cells in the traumatically injured spinal cord. Immunology. 2019;158:362-374.

158. Zhaohui C, Shuihua W. Protective effects of SIRT6 against inflammation, oxidative stress, and cell apoptosis in spinal cord injury. Inflammation. 2020;43:1751-1758.

159. Shao J, Yang X, Liu T, Zhang T, Xie QR, Xia W. Autophagy induction by SIRT6 is involved in oxidative stress-induced neuronal damage. Protein & Cell. 2016;7:281-290.

160. Lv J, Tian J, Zheng G, Zhao J. Sirtuin7 is involved in protecting neurons against oxygen-glucose deprivation and reoxygenation-induced injury through regulation of the p53 signaling pathway. Journal of biochemical and molecular toxicology. 2017;31:e21955.

161. Novak V, Rogelj B, Župunski V. Therapeutic Potential of Polyphenols in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. Antioxidants. 2021;10:1328.

162. Barber SC, Mead RJ, Shaw PJ. Oxidative stress in ALS: a mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. 2006;1762:1051-1067.

163. Shibata N, Kawaguchi-Niida M, Yamamoto T, Toi S, Hirano A, Kobayashi M. Effects of the PPARγ activator pioglitazone on p38 MAP kinase and IκBα in the spinal cord of a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Neuropathology. 2008;28:387-398.

164. Kim D, Nguyen MD, Dobbin MM, Fischer A, Sananbenesi F, Rodgers JT, Delalle I, Baur JA, Sui G, Armour SM. SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. The EMBO journal. 2007;26:3169-3179.

165. Wang J, Zhang Y, Tang L, Zhang N, Fan D. Protective effects of resveratrol through the up-regulation of SIRT1 expression in the mutant hSOD1-G93A-bearing motor neuron-like cell culture model of amyotrophic lateral sclerosis. Neuroscience letters. 2011;503:250-255.

166. Kiaei M. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Huntington's Disease. PPAR research. 2008;2008.

167. Tang BL. Could Sirtuin Activities Modify ALS Onset and Progression? Cellular and Molecular Neurobiology. 2017;37:1147-1160.

168. Pasinetti GM, Bilski AE, Zhao W. Sirtuins as therapeutic targets of ALS. Cell Research. 2013;23:1073-1074.





ISBN: 978-625-367-762-6