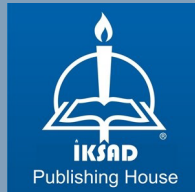
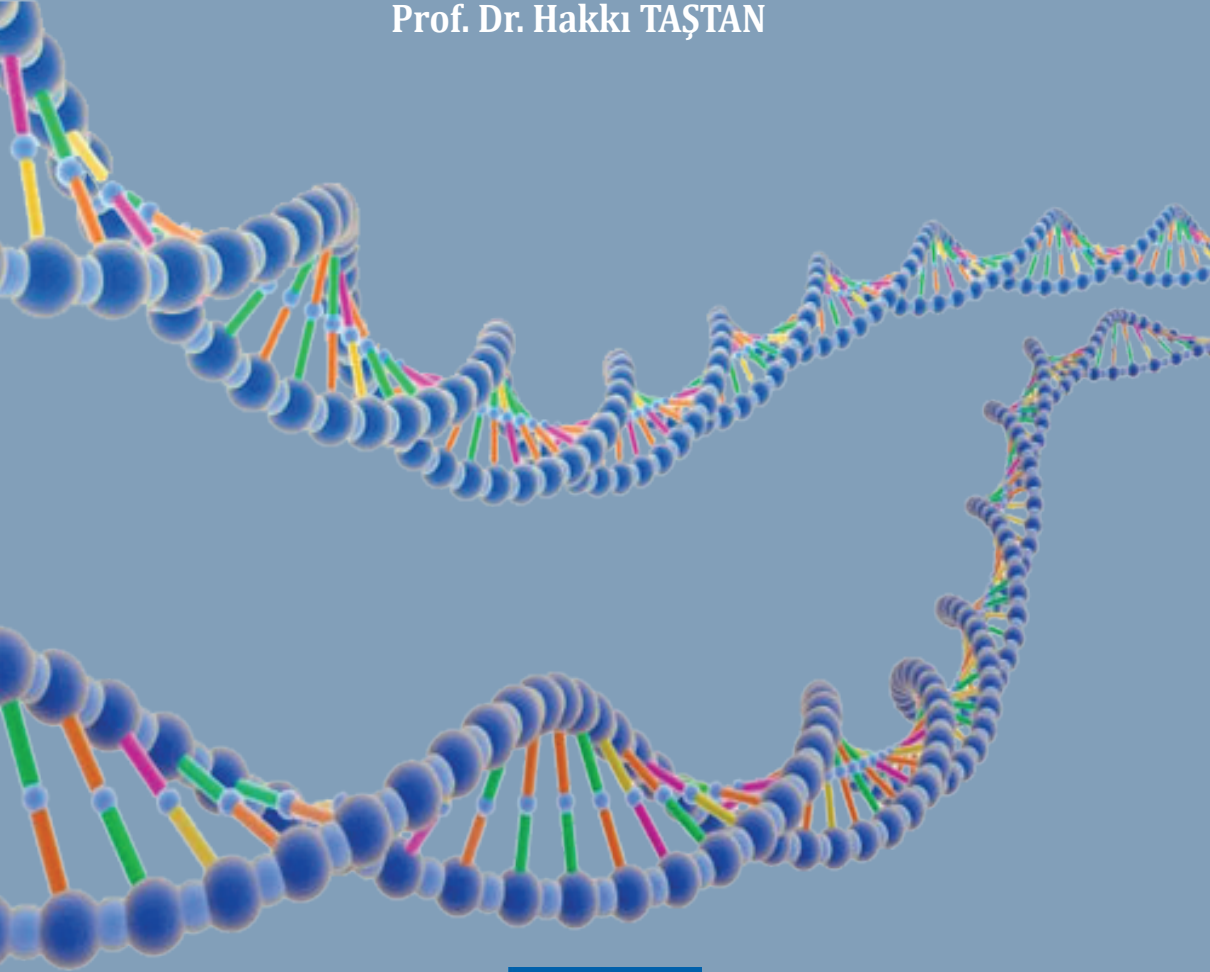


# MOLEKÜLER BİYOLOJİDE YENİ KONULAR

EDİTÖR  
Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN



# MOLEKÜLER BİYOLOJİDE YENİ KONULAR

## EDİTÖR

Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN

## YAZARLAR

Prof. Dr. Erkan YILMAZ

Prof. Dr. Esra KÜPELİ AKKOL

Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN

Doç. Dr. Arzu ATALAY

Doç. Dr. Duygu DUMAN

Doç. Dr. Mustafa Türker DUMAN

Dr. Öğr. Üyesi Esra GÖKÇE GÜNDÜZER

Dr. Öğr. Üyesi Betül AYDIN

Dr. Öğr. Üyesi Fahriye ÖCAL ÖZDAMAR

Dr. Öğr. Üyesi Gökçen BAYSAL FURTANA

Dr. Öğr. Üyesi Tuğba GÜNBATAN

Arş. Gör. Dr. Çiğdem DÖNMEZ

Biyolog Dr. Aynur IŞIK

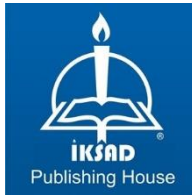
Arş. Gör. Büşra KARPUZ AĞÖREN

Biyolog Ayşe Gökçe ERMAN KILINÇ

Biyolog Bilgehan MİLLİDERE

Biyolog İlayda ENGİN

Ecz. Rümeyşa DOĞAN



Copyright © 2023 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 – 2023©  
**ISBN: 978-625-367-439-7**  
Cover Design: İbrahim KAYA  
November / 2023  
Ankara / Türkiye  
Size = 16 x 24 cm

## **İÇİNDEKİLER**

**ÖNSÖZ**.....1

### **BÖLÜM 1**

#### **TIBBİ BİTKİ TEŞHİSİNDE MOLEKÜLER BİYOLOJİNİN ÖNEMİ: MOLEKÜLER FARMAKOGNOZİ UYGULAMALARI**

Arş. Gör. Büşra KARPUZ AĞÖREN

Prof. Dr. Esra KÜPELİ AKKOL.....3

### **BÖLÜM 2**

#### **KÖK HÜCRE BİYOLOJİSİNDE GELİŞEN MOLEKÜLER YAKLAŞIMLAR**

Dr. Öğr. Üyesi Esra GÖKÇE GÜNDÜZER.....17

### **BÖLÜM 3**

#### **DOĞAL KAYNAKLI SARS-COV-2 TEMEL PROTEAZ İNHİBİTÖRLERİ: COVID-19 TEDAVİSİNDE MOLEKÜLER YAKLAŞIMLAR**

Dr. Öğr. Üyesi Tuğba GÜNBATAN.....39

### **BÖLÜM 4**

#### **BÜYÜK DOKU UYGUNLUK KOMPLEKSİ VE HLA GENLERİ**

Doç. Dr. Mustafa Türker DUMAN.....55

### **BÖLÜM 5**

#### **KANSER HEDEFLİ TEDAVİLERİNDE ANTİKOR-İLAÇ KONJUGATLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE KULLANIMI**

Ecz. Rümeyşa DOĞAN

Doç. Dr. Arzu ATALAY.....69

### **BÖLÜM 6**

#### **DİFFÜZ MİDE KANSERLERİNİN MOLEKÜLER TEMELLERİ**

Biyolog Dr. Aynur IŞIK

Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN.....105

### **BÖLÜM 7**

#### **KANSER TEDAVİSİNDE RNA İNTERFERAZIN UYGULANABİLİRLİĞİ: GÜNCEL DURUM**

Arş. Gör. Dr. Çiğdem DÖNMEZ.....119

## **BÖLÜM 8**

### **MOLEKÜLER BİYOLOJİDE BİYOİNFORMATİK VE OMİK TEKNOLOJİLERİ**

Biyolog Bilgehan MİLLİDERE.....137

## **BÖLÜM 9**

### **METAGENOMİKS ALANINDAKİ GELİŞMELER: MİKROBİYAL ÇEŞİTLİLİĞİN VE İŞLEVSEL YAKLAŞIMLARIN ANLAŞILMASI**

Dr. Öğr. Üyesi Betül AYDIN.....159

## **BÖLÜM 10**

### **İŞİTME KAYBI GENETİĞİ**

Doç. Dr. Duygu DUMAN.....183

## **BÖLÜM 11**

### **İMMÜNOTERAPİ İÇİN GELİŞTİRİLEN ANTİKORLAR**

Biyolog İlayda ENGİN

Biyolog Ayşe Gökçe ERMAN KILINÇ

Prof. Dr. Erkan YILMAZ.....203

## **BÖLÜM 12**

### **HALOFİTLERİN MOLEKÜLER ADAPTASYONU**

Dr. Öğr. Üyesi Gökçen BAYSAL FURTANA

Dr. Öğr. Üyesi Fahriye ÖCAL ÖZDAMAR.....225

## ÖNSÖZ

Moleküler Biyoloji son yıllarda hızlı bir şekilde gelişen, bilimsel farklı alanlar ile ilişkilendirilen, bu disiplinlerin çalışmalarını destekleyen ve değişik görüş yaklaşımları kazandıran temel ana bilim dallarından biri haline gelmiştir. Birçok bilim dalı, artık Moleküler Biyoloji temelli teknik araştırma yaklaşımları temel bilgilerini kullanarak kendi çalışma alanlarında oluşturdukları bilimsel hipotezlerini doğrulama yoluna gitmişlerdir. Bu bilimsel doğrulamalar, kurulan bilimsel hipotezin farklı yaklaşımlar ile de ortaya konulmasına imkan sağlamıştır. Moleküler Biyolojideki bu ilerleyişe, farklı bilimsel alanlardaki konuların Moleküler Biyoloji temelinde ilişkilendirilmesi ve bu ilişkinin ortaya konulması hazırlanan kitabın temel hedefi olmuştur. Ayrıca bilimsel temelli farklı alanlarda, Moleküler Biyolojinin yeni yaklaşım modelleri ile bu alandaki çalışmaların ortaya konulması bu kitabın, yenilikçi yönünü ortaya çıkarmıştır. 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 araştırmacılar ve uzmanları tarafından yazılmıştır. Bu kitap bölümlerinde, farklı bilimsel çalışma alanları Moleküler Biyoloji temelinde ele alınmış ve alanındaki tüm yeni bilgiler kendi bölümü içinde ayrıntılı olarak verilmiştir. Kitap bölümleri son yıllardaki öne çıkan bilimsel yeni konuların olmasına özen gösterilmiş ve her bir bölüm bilimsel literatür kaynaklarına dayandırılmıştır. Kitap bölümlerinin akıcı ve anlaşılır bir dilde yazılmasına özen gösterilmiş olup, böylece ilgili bölümlerin daha net bir şekilde anlaşılması sağlanmıştır.

Bu kitabın hazırlanmasında bana destek olan, başta eşim ve çocuklarım olmak üzere, tüm akademik, uzman çalışma arkadaşlarıma ve bu kitabın düzenlenmesinde emeği olan sayın Seyithan Seydoşoğlu' nun şahsında Iksad International Publishing House çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi saygılarımla arz ederim.

01.12.2023

Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü,  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı



## BÖLÜM 1

### TIBBİ BİTKİ TEŞHİSİNDE MOLEKÜLER BİYOLOJİNİN ÖNEMİ: MOLEKÜLER FARMAKOGNOZİ UYGULAMALARI

Arş. Gör. Büşra KARPUZ AĞÖREN<sup>1</sup>,

Prof. Dr. Esra KÜPELİ AKKOL<sup>2,\*</sup>

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.10251334>

---

<sup>1</sup> Başkent Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, 06790, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup> Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, 06330, Ankara, Türkiye

\*Sorumlu Yazar: Prof. Dr. Esra Küpeli Akkol; [esrak@gazi.edu.tr](mailto:esrak@gazi.edu.tr)





## 1. Giriş

1953'te Watson ve Crick tarafından DNA'nın yapısını keşfi, yaşam bilimleri için yeni bir döneme işaret ederek tıp bilimlerini ve ilgili alanlardaki akademisyenlerin düşüncelerini önemli ölçüde değiştirmiştir. Bu keşiften beri insanlar yaşamın doğasını ve yasalarını moleküler düzeyden yeniden anlamaya başlamışlardır. Moleküler biyoloji hızla gelişerek uygulamalı biyotıp alanına girmiş, bu da çok sayıda disiplinler arası alanı ortaya çıkarmıştır. Doku kültürü teknolojileri, özellikle de polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi genetik mühendisliği alanlarının gelişmesi, tıbbi bitkiler üzerinde yapılan çalışma alanlarının ve yöntemlerinin tamamen genişlemesine ve zenginleşmesine katkıda bulunmuştur. Doğal kaynaklı ilaç hammaddelerini araştıran bir disiplin olan farmakognozi alanında da bu gelişmeler yer bulmuş ve farmakognozi ile moleküler biyoloji arasındaki karşılıklı entegrasyonlar sonucunda moleküler farmakognozi olarak adlandırılan yeni bir disiplinler arası alan ortaya çıkmıştır [1].

Moleküler biyolojinin gelişimi ile biyolojiyle ilgili tüm dallar moleküler düzeye taşınmıştır [2]. Bitkisel ve hayvansal kaynaklı ilaçlara odaklanan farmakognozi, birçok biyolojik teori ve yönteme değindiğinden moleküler farmakognozinin ortaya çıkması şartı olamamıştır. Moleküler biyolojinin teorik ve metodolojik olarak farmakognoziye uygulanması, hayvansal ve bitkisel etken maddelerin incelenmesi popülasyon, organizma, doku, organ ve hücre seviyelerinden genetik seviyeye doğru ilerlemesini sağlamıştır.

## 2. Moleküler Farmakognozi için Temel Kapsamlar ve Uygulamalar

Farmakognozi alanındaki araştırmaların bir amacı, doğru teşhis edilmiş tıbbi bitkiler ile kalite değerlendirmesini sağlamak veya doğal kaynaklı bileşik kaynaklarının üretimi ve sürdürülebilir kullanımı için bilimsel temeller oluşturmaktır. Bu tür çalışmalar hücre, doku, organizma ve popülasyon düzeyinde yürütülmektedir. Moleküler farmakognozi, tıbbi bitkilerin yüksek kalitede üretimi ve korunması için, droglardaki belirli molekülleri tanımlamayı, bunların kökenlerinin arka planını incelemeyi, sekonder metabolit birikiminin moleküler mekanizmalarını ortaya çıkarmayı, sekonder metabolitlerin biosentezini yöneten ilkeleri anlamayı ve bilimsel temeller sağlamayı amaçlamaktadır [3].

## 2.1. Moleküler Farmakognozi Kullanım Alanları

### 2.1.1. Tür Teşhisi

Tıbbi drogların moleküler teşhisi, moleküler farmakognozinin hedeflerinden biridir. Doğru tür teşhisi, tıbbi bir drog elde edilirken etkinliğini ve güvenliğini kontrol etmek için kritik öneme sahiptir. Bitkisel ürünlerin üretim kalitesinin doğrulanması için, özellikle de bitkisel pazarlar için güvenilir bir yönteme ihtiyaç duyulmaktadır. Şekil, renk, doku, koku, doku düzeni ve hücre bileşenleri gibi organoleptik ve mikroskobik özelliklere dayanan geleneksel tanımlama yöntemleri basit ve ucuzdur. Bununla birlikte, tıbbi droglardaki ayırıcı özelliklerin yetersiz olması, düşük doğruluğa ve sınırlı çözümlüğe yol açabilir. Moleküler yöntemlerden yararlanarak moleküler teşhisin yapılması, tıbbi drogların morfolojik varyasyonlarının morfolojik, doku veya kimyasal düzeyde yapılan tanımlamalardan çok daha kesin bir şekilde tanımlanmasını sağlar [4].

Farklı organizmaların DNA dizilerindeki varyasyona dayalı moleküler tanımlama alternatif bir yaklaşım sunmaktadır. Prensip olarak, genetik yapı parçaları, büyüme aşaması ve çevreden bağımsız olarak bir türe özgüdür. Ayrıca, PCR'ın gelişiminden yararlanarak, tanımlama işleminin gerçekleştirilmesi için az miktarda bir örnek yeterlidir. Bu avantaj sınırlı tedariki olan pahalı malzemelerden bahsetmeksizin, parçalanmış malzeme veya tozun tanımlanmasında özellikle önemlidir [5]. Ayrıca, DNA nispeten stabildir ve herbaryum örneklerinden, işlenmiş gıdalardan ve ticari ürünlerden elde edilebilir. Birçok moleküler tanımlama tekniği yaygın olarak kullanılmaktadır.

### 2.1.2. Kaynakların Korunması

Genetik çeşitlilik hakkındaki bilgiler, özellikle endemik ve tehlike altında olan tıbbi bitkilerin korunmasında rehberlik edebilir. Moleküler belirteç teknolojisi, türlerin genetik çeşitliliğini değerlendirmede, tür ilişkisini analiz etmede, iyi germplazm kaynaklarının belirteçlerini seçmede ve moleküler belirteç destekli ıslahı uygulamada bariz bir avantaja sahiptir. Nesli tükenmekte olan iki tıbbi bitki olan *Cistanche deserticola* ve *C. tubulosa*'nın genetik çeşitliliğinin ve genetik yapısının değerlendirilmesi, tıbbi bitkilerin moleküler teknikler kullanılarak korunmasına örnek oluşturmaktadır [6].

### 2.1.3. İyi Kalitede Sekonder Bileşiklerin Biyosentez Mekanizmasının Belirlenmesi

Tıbbi bitkilerin kalitesi ve sekonder metabolit miktarı genetik temellerinden ve ekolojik çevrelerinden büyük ölçüde etkilenir. İyi kalitedeki sekonder metabolitlerin biyosentez mekanizmasının araştırılması, tıbbi bitkilerin moleküler ıslahı ve yetiştirilmesi için yardımcı olacaktır. Günümüzde, bazı tıbbi bitki genleri elde edilmiş ve sekonder metabolitlerin biyosentezinde, gen ifadesinin kontrolünde ve sinyal iletiminde önemli rol oynadıkları gösterilmiştir [7,8].

### 2.1.4. Aktif bileşiklerin üretimi

Transgenik teknoloji, hastalıklara, böceklere ve kuraklığa dirençli ya da daha yüksek aktif bileşik üretimine sahip transgenik tıbbi bitkiler elde etmek için başarıyla kullanılmıştır. Son zamanlarda, Bt ve TMV kaplama proteini geni tıbbi bitkilere eklenmiş ve böcek saldırısına ve hastalığa karşı direnç sağlamıştır [9].

Transgenik *Hyoscyamus niger*'deki skopolamin içeriği, normal tipe kıyasla 9,6 kat artmıştır [10]. Artemisininin ara maddesi olan artemisinik asit, 100 mg/L üretim oranına sahip mühendislik ürünü bir maya suşu tarafından doğrudan üretilebilir [11]. Artemisinik asit içeriği, tütünde genetik mühendisliği yoluyla terpen biyosentezinin değiştirilmesiyle de artırılmıştır [12].

*Lithospermum erythrorhizon* [13], *Catharanthus roseus* [14], *Panax ginseng* [15] ve *Glycyrrhiza uralensis* [16] gibi tıbbi bitkiler için çok sayıda kök kültür sistemi geliştirilmiştir. Aktif bileşenlerin genetik düzenlenmesi *Papaver somniferum*, *Taxus chinensis* [17] ve *Camptotheca acuminata* [18] dahil olmak üzere birçok tıbbi bitki için incelenmiştir.

Transgenik teknikler, tıbbi bitkilerde stres toleransının artırılması, bitkilerde hastalık ve böcek istilasının izlenmesi ve tahmin edilmesinin yanı sıra kuraklık ve aşırı tuzluluğun azaltılması için uygulanmıştır.

## 2.2. Tıbbi drogların moleküler tanımlanmasında kullanılan yöntemler

### 2.2.1. DNA Parmak İzi

DNA parmak izi tüm genomdaki veya numunenin belirli bir bölgesindeki DNA polimorfizmi araştırır. Polimorfik desenler genellikle agaroz jel, poliakrilamid jel veya kapiler elektroforez ile görselleştirilir. Bir tıbbi malzemedeki DNA'nın miktarı ve kalitesi, hasat sonrası işleme ve depolama nedeniyle yetersiz şekilde korunabileceğinden, çoğu DNA parmak izi yöntemi bir amplifikasyon aşamasından geçer. Günümüzde tıbbi drogların DNA parmak izi tanımlama yöntemleri arasında rastgele arttırılmış polimorfizm (random amplified polymorphism:RAP), ankrajlı primer arttırma polimorfizmi (anchored primer amplification polymorphism:APAP) ve arttırılmış parça uzunluğu polimorfizmi (Amplified fragment length polymorphism: AFLP) bulunmaktadır. [19].

**Rastgele Arttırılmış Polimorfizm (RAP):** Tüm genom parmak izlerini kullanır ve belirteç analizi için bir dizi yöntem (RAPD, arbitrarily primed PCR [AP-PCR] ve uzunluk polimorfizmlerinin doğrudan amplifikasyonu [DALP]) içerir [20,21]. Bu yöntem, genellikle 8-20 nükleotid uzunluğundaki rastgele dizilerden oluşan kısa PCR primerlerini kullanır. Tek primer, genomik DNA şablonuna çeşitli bölgelerde bağlanır ve hem ileri hem de geri primerler olarak görev yapar. Rastgele arttırılmış polimorfizm, genom hakkında önceden bilgi sahibi olmayı gerektirmez ve aynı anda birden fazla lokusu incelemek için kullanılabilir. Belirteçleri baskındır ve genellikle homozigot lokusları heterozigot lokuslardan ayırt edemez. Tıbbi materyalleri tanımlamak için bu yaklaşımı kullanan birçok yayın yapılmıştır. Cheung ve arkadaşları [22], üç primer (M13 ileri, M13 geri ve Gal-K primerleri) kullanılarak oluşturulan tüm AP-PCR parmak izlerinin, kurutulmuş ginseng (*Panax ginseng*) köklerini Amerikan ginsenginden (*P. quinquefolius*) başarıyla ayırt ettiğini bulmuştur. Benzer bir yaklaşım daha sonra *Angelica sinensis*, *Cordyceps sinensis* ve *Akebia quinata* dahil olmak üzere diğer tıbbi türlerin teşhisinde de uygulanmıştır [23,24].

**Ankrajlı Primer Amplifikasyon Polimorfizmi (APAP):** SSR'lere (basit diziler arası tekrar polimorfizmi), açık okuma çerçevelerine (hedef bölge

amplifikasyon polimorfizmi ve diziyle ilişkili amplifikasyon polimorfizmi) veya başlangıç kodonunu çevreleyen dizilere (başlangıç kodonu hedefli polimorfizm) ankrajlı PCR primerlerini kullanan bir tüm genom tarama parmak izi tekniğidir. Ankrajlı primer amplifikasyon polimorfizmi de genom hakkında ön bilgi gerektirmez ve çoğunlukla popülasyon genetik çeşitlilik analizinde veya farklı yörelerden gelen varyantlar, çeşitler ve türlerdeki tıbbi bitkileri ve taşıyıcılarını ayırt etmek için kullanılır. Çoğu ankrajlı primer amplifikasyon polimorfizm yöntemi iyi seçilmiş primerler agaroz jel veya kapiler elektroforez ile görüntülenen makul derecede doğru parmak izi sonuçları sağlayabilir. ISSR polimorfizmi, *Citrus grandis* bitkisinden elde edilen droğu (Citri Grandis Exocarpium) diğer Citrus varyantlarından ayırt etmek için kullanılmıştır [25]. ISSR parmak izi *Dendrobium*, *Rhubarb* ve *Coptis* türlerini teşhisi için de uygulanmıştır [26]. Ayrıca *Descurainia sophia*, *Astragalus mongholicus* ve *Cassia tora*'nın genetik çeşitliliğini incelemek için de kullanılmıştır [27].

**Arttırılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi (AFLP):** Restriksiyon enzimleri kullanarak genomik DNA'dan DNA restriksiyon parçalarının bir alt kümesini çoğaltmaktır [28]. Genomik DNA ilk olarak, yapışkan uçlu kısıtlama parçaları oluşturmak için çoklu lokuslardaki çeşitli kısıtlama bölgelerinde kısıtlama enzimleriyle (örneğin EcoRI ve MseI) sindirilir. Sentetik adaptörler daha sonra bu uçlara bağlanır ve bunlar, sıkı koşullar altında PCR ile daha sonra amplifikasyon için spesifik primerlerin bağlanma bölgeleri olarak işlev görür. Arttırılmış parçaların ayrılması yüksek çözünürlüklü poliakrilamid jel kullanılarak gerçekleştirilir ve otoradyografi, floresan veya gümüş boyama teknikleri kullanılarak görselleştirilir. Literatürde, çeşitli lokalitelerden ginseng (*P. ginseng*) ve Amerikan ginsengi (*P. quinquefolius*) gibi yakından ilişkili tıbbi türleri ayırt etmek için AFLP kullanmıştır [29]. AFLP kullanımının diğer örnekleri arasında *Panax japonicus*, tıbbi *Plectranthus* sp. ve *Cannabis sativa*'nın tanımlanması yer almaktadır [30,31].

### 2.2.2. Spesifik Amplifikasyon

Spesifik amplifikasyon, numunenin belirli bir bölgesindeki DNA polimorfizmini araştırır. Polimorfik desenler genellikle agaroz, poliakrilamid jel veya kapiler elektroforez ile görselleştirilir. Spesifik amplifikasyon, tıbbi droğların moleküler olarak teşhisinde en yaygın kullanılan yöntemdir. *Zaocys*,

*Agkistrodon* türlerinin tanımlanması için Çin Halk Cumhuriyeti Farmakopesi'nde spesifik amplifikasyon tanımlama yöntemleri listelenmiştir.

**Spesifik PCR:** Bir tıbbi droğun spesifik bölgeleri ile taşıdığı maddeleri arasındaki DNA dizileri farkına dayanan bir DNA tanımlama yöntemidir. Primerler, birkaç (spesifik PCR) yanlış eşleşme veya tek bir nükleotid polimorfizm yanlış eşleşmesi (alele özgü PCR veya ARMS-PCR) ile farklı bölgelere yerleştirilebilir. Bu yöntem aynı zamanda aynı PCR reaksiyon sisteminde (çoklu PCR) birkaç çift spesifik primer kullanarak birden fazla tıbbi droğu aynı anda belirleyebilir. Spesifik PCR'lar, tıbbi droğları materyallerini ve bunların taşıdığıları, karşılık gelen spesifik primerleri ile cins, tür, alt tür, varyant ve çeşit seviyelerinde ayırt edebilir. Örneğin, diğer *Dendrobium* türlerinin, *Dendrobii caulis* ile son derece benzer morfolojileri nedeniyle tanımlanması zordur. Bununla birlikte, sekiz ana ticari *Dendrobii caulis* türünün kloroplast trnL-F ve iç transkripsiyonlu spacer (ITS) dizilerinin karşılaştırılması, türler arasında ortak olan birkaç SNP tespit etmiş ve bu farklı gen lokusları tarafından türe özgü primerler tasarlanmıştır. Diğer benzer spesifik çalışmalar arasında *Aristolochia* türleri, *Ligularia fischeri* ve *Angelica dahurica*'nın farklılaştırılması yer almaktadır [32,33].

**PCR Restriksiyon-Fragman Uzunluğu Polimorfizmi (PCR-RFLP):** Genomun spesifik bir bölgesini amplifiye eder ve bunu, bir kısıtlama polimorfik profili oluşturmak için kısıtlama sindirimi takip eder. Spesifik bölge, evrensel veya spesifik primerler kullanılarak kolayca çoğaltılabilir. PCR-RFLP, restriksiyon sindirimi gerçekleştirerek Lonicerae Japonicae Flos droğunu taşıdığılarından ayırmak için kullanılmıştır. *Lonicera japonica* bir endonükleaz sindirim bölgesine sahiptir ve iki parçaya bölünürken, diğer *Lonicera* türleri aynı bölgede bu diziyeye sahip değildir; sindirim ürünleri inaktiftir ve jel elektroforez modellerinde tek bir bant olarak kalmıştır [34].

**Basit Dizi Tekrarları (SSR):** Kısa bir baz çifti motifinin tandem olarak birkaç ila birçok kez tekrarlandığı DNA yollarıdır (örneğin CAGCAGCAG). Bu diziler, tekrar sayısını değiştiren sık mutasyonlara maruz kalmaktadır [35]. Tekrarlar türler, çeşitler veya popülasyonlar arasında değişir ve poliakrilamid jel veya floresan kapiler elektroforez ile görselleştirilebilen farklı polimorfik modellere neden olur; bu, tıbbi droğların moleküler tanımlanması için, özellikle

çeşitlerin veya popülasyonların tanımlanmasında kullanılabilir. Bu yöntem *Dendrobium officinale* türlerinin saflığını değerlendirmek ve genetik çeşitliliğini araştırmak için de kullanılmaktadır [36]. Benzer bir yaklaşım *Epimedium sagittatum*, *Centella asiatica* ve *Panax ginseng* türlerini teşhis için de uygulanmıştır [12, 37].

**İzotermal Amplifikasyon:** Geleneksel PCR, çift sarmallı DNA'nın denatüre edilmesi, primerlerin ve yeni ipliklerin sentezlenmesi için termosikluslar yoluyla DNA parçalarını çoğaltır. İzotermal amplifikasyon, termodöngü olmadan DNA amplifikasyonuna izin veren bir tekniktir ve böylece DNA amplifikasyonu PCR makineleri olmadan elde edilebilir. Bu teknikler çoğunlukla laboratuvar ekipmanlarının sınırlı olduğu gelişmemiş bölgelerde viral ve bakteriyel enfeksiyonların yerinde tespiti için uygulanmaktadır. İzotermal amplifikasyon gerçekleştirmenin çeşitli yolları vardır. En köklü yöntemler nükleik asit dizisine dayalı amplifikasyon (transkripsiyon aracılı amplifikasyon olarak da bilinir), helikaza bağlı amplifikasyon, rekombinaz polimeraz amplifikasyonu (RPA), yuvarlanan daire amplifikasyonu, çoklu yer değiştirme amplifikasyonu, döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) ve iplikçik yer değiştirme amplifikasyonudur (SDA).

Son zamanlarda LAMP, trnK genine dayalı olarak *Curcuma longa*'yı *C. aromatica*'dan ayırarak tıbbi bitkileri teşhis etmek için uygulanmıştır [38]. LAMP ayrıca 18S rRNA genine dayalı olarak *Panax ginseng*'i *P. japonicus*'tan ayırmak için de kullanılmıştır [39].

### 2.2.3. DNA Mikrodizilimi

DNA mikrodizilimi, hedef genomdaki tekli veya çoklu lokusları hibridize etmek için işaretli nükleotid problemleri kullanan hibridizasyon tabanlı bir teknolojidir. Problemler, restriksiyon sindirimi veya sentetik oligonükleotidlerden elde edilen kısa nükleotid parçalarıdır. Problemlerin ve test edilen DNA örneklerinin hibridizasyonunun gerçekleştiği destekleyici bir matris üzerine sabitlenirler. Literatürde 16 *Dendrobium* türünün dahili transkripsiyon aralığını (ITS) çoğaltılmış ve bunları birden fazla bitki içeren bir reçetede tıbbi *Dendrobium* türlerini tanımlamak için prob olarak kullanılmıştır [40].



### 2.2.4 DNA Dizileme

DNA dizilimi, tanımlama için en kesin araçlardan biridir çünkü bu teknik, tanımlanmış bir lokustaki dizi varyasyonlarını doğrudan değerlendirebilmektedir. Dizileme maliyetlerindeki düşüşle birlikte, tıbbi bitkilerin DNA dizilemesi kullanılarak tanımlanması rutin bir uygulama haline gelmiştir. Tıbbi materyallerin tanımlanması için yaygın olarak kullanılan DNA bölgeleri arasında nükleer ITS ve 5S rDNA intergenik aralayıcı (5S), kloroplast psbA trnH intergenik aralayıcı (psbA-trnH), ribulosebisfosfat karboksilazın büyük alt birimi (rbcL), maturaz K geni (matK), trnL intron (trnL), trnLtrnF intergenik aralayıcı (trnL-F), mitokondriyal kontrol bölgesi (CR), sitokrom c oksidaz alt birimi 1 (COI) ve sitokrom b geni (Cyt b) bulunmaktadır. Bu DNA barkodlarının sadece biyoçeşitlilik ve koruma çalışmalarında değil, aynı zamanda tıbbi bitkilerin teşhisinde de yararlı olduğu kanıtlanmıştır. Örneğin, ITS bölgesi altı *Panax* türünü *Mirabilis jalap* ve *Phytolacca acinosa*'dan elde edilen taşışlarından ayırt edebilmektedir [41].

### 3. Sonuç

Günümüzde fitoterapiye ve tıbbi bitkilere olan ilgi gittikçe artmıştır. Tıbbi bitkilerin doğru teşhisi, güvenliğini ve etkinliğini sağlamak için kilit bir faktördür. Moleküler teknoloji, tıbbi bitkilerin familya, cins, tür, varyant ve çeşit dahil olmak üzere çeşitli taksonomik seviyelerde kesin olarak tanımlanması için güvenilir ve güçlü bir araç sağlar. Moleküler farmakognozi son yıllarda hızla gelişmiştir ve çeşit tanımlama, kaynak koruma, kalite oluşum mekanizmaları ve aktif bileşik üretimi konularında çok fazla ilerleme kaydedilmiştir.

Moleküler yöntemlerdeki maliyetin düşmesiyle birlikte, daha fazla moleküler marker geliştirilmektedir. Buna ek olarak, hızlı DNA ekstraksiyon yöntemleri, cep boyutunda PCR makineleri ve hızlı izotermal amplifikasyon tekniklerinin geliştirilmesiyle tıbbi bitkilerin anında yerinde moleküler olarak tanımlanması yakın gelecekte gerçek olabilecektir.

## KAYNAKLAR

1. Huang L Q, Xiao P G. (2008) *Molecular Pharmacognosy*. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 1–189
2. Huang LQ. (1995) Prospects for application of molecular biotechnology to pharmacognosy. *China J Chin Mater Med*. 11:643–645, 702.
3. Xie Z W. (2001) Evaluation of molecular pharmacognosy. *China J Chin Mater Med*, 26: 216.
4. Shaw PC, Jiang RW, Wong KL. Health food and medicine: combined chemical and molecular technologies for authentication and quality control. In: Ebeler SE, Takeoka GR, Winterhalter P, editors. *Authentication of food and wine*. Washington DC: American Chemical Society; 2007.
5. Shaw PC, Ngan FN, But PPH. Molecular markers in Chinese medicinal materials. In: Shaw PC, Wang J, But PPH, editors. *Authentication of Chinese medicinal materials by DNA technology*. Singapore: World Scientific; 2002.
6. Cui GH, Chen M, Huang LQ, Xiao SP, Li D. (2004) Study on genetic diversity of *Herba Cistanches* by RAPD, *China Journal of Chinese Materia Medica*, 8, 727-730
7. Hikaru S, Kiyoshi O, Satoru S, Masaharu M, Toshiyuki O, Hiroshi S, Tomoyoshi A, Toshio A, Kazuki SO, Toshiya M. (2008) Licorice  $\beta$ -amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 14204–14209.
8. Keinanen M, Oldham NJ. (2000) ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science*, 289, 295-297
9. Hou BK, Chen ZH. (2000) Progress of anti insect genetic engineering of plants. *Chinese Bulletin of Botany*, 17, 385-393.
10. Zhang L, Ding RX, Chai YR, Tang KX. (2004) Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 10, 6786-6791

11. Rol DK, Paradise EM, Ouellet M, Fisher KJ, Newman KL, Ndungu JM, Ho KA, Eachus RA, Ham TS, Kirby J, Chang MC, Withers ST, Shiba Y, Sarpong R, Keasling JD. (2006) Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 440, 940-943.
12. Wu Sakthipriya M, Vishnu SS, Sujith S, et al. (2018) Analysis of genetic diversity of *Centella asiatica* using SSR markers. *Int J Appl Sci Biotechnol.* 6:103–9.
13. Shimomura K, Sudo H, Saga H, et al. (1991) Shikonin production and secretion by hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Rep*, 10: 282–285
14. Bhadra R, Morgan J A, Shanks J V. (1998) Transient studies of light-adapted cultures of hairy root of *Catharanthus roseus*: Growth and indole alkaloid accumulation. *Biotechnol Bioeng*, 60: 670.
15. Sun B X, Yang G X, Wang Q L, et al. (2003) Study on *Panax ginseng* (Renshen) hairy root and glycoside production. *Chin Tradit Patent Med*, 25: 746–748
16. Du M, Liu J, Ding J Y, et al. (2000) Antioxidant ability determination of hairy roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. (Gancao) in vitro and in vivo. *J Plant Res Environ*, 9: 1–4
17. Du Y T, Chen J H, Xu J Y, et al. (2006) Influence of plant growth regulator in *Taxus chinensis* var. *Mairei* Callus (Nan-fang-hong-dou-shan) culture and biosynthesis of taxol. *Nat Prod Res Dev*, 18: 569–576
18. Zu Y G, Tang Z H, Yu J H, et al. (2003) Camptothecin and 10-Hydroxycamptothecin accumulate differentially under specific developmental control in *Camptotheca acuminata*. *Acta Bot Sin (English Version)*, 45: 494–499
19. Li, M., Jiang, C., Pui-Hay, P., Shaw, PC., Yuan, Y. (2019). Molecular Identification of Traditional Medicinal Materials. In: Huang, Lq. (eds) *Molecular Pharmacognosy*. Springer, Singapore.
20. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, et al. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531–5.
21. Welsh J, McClelland M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18:7213–8.

22. Cheung KS, Kwan HS, But PPH, et al. (1994) Pharmacognostical identification of American and oriental ginseng roots by genomic fingerprinting using arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *J Ethnopharmacol.* 42:67–9.
23. Lam K, Chan G, Xin GZ, Xu H, Ku CF, Chen JP, et al. (2015) Authentication of *Cordyceps sinensis* by DNA analyses: comparison of ITS sequence analysis and RAPD-derived molecular markers. *Molecules.* 20:22454–62.
24. Moon BC, Ji Y, Lee YM, Kang YM, et al. (2015) Authentication of *Akebia quinata* D ECNE. From its common adulterant medicinal plant species based on the RAPD-derived SCAR markers and multiplex-PCR. *Genes Genom.* 37:23–32.
25. Su C, Wong KL, But PPH, et al. (2010) Molecular authentication of the Chinese herb *Huajuhong* and related medicinal material by DNA sequencing and ISSR marker. *J Food Drug Anal.* 18:161–70.
26. Han K, Wang M, Zhang L, et al. (2018) Application of molecular methods in the identification of ingredients in Chinese herbal medicines. *Molecules.* 23:2728.
27. Kumar V, Roy BK. (2018) Population authentication of the traditional medicinal plant *Cassia tora* L. based on ISSR markers and FTIR analysis. *Sci Rep.* 8:10714.
28. Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407–14.
29. Ha WY, Shaw PC, Liu J, et al. (2002) Authentication of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* using amplified fragment length polymorphism (AFLP) and directed amplification of minisatellite region DNA (DAMD). *J Agric Food Chem.* 50:1871–5.
30. Datwyler SL, Weiblen GD. (2006) Genetic variation in hemp and marijuana (*Cannabis sativa* L.) according to amplified fragment length polymorphisms. *J Forensic Sci.* 51:371–5.
31. Passinho-Soares H, Felix D, Kaplan MA, et al. (2006) Authentication of medicinal plant botanical identity by amplified fragmented length polymorphism dominant DNA marker: inferences from the *Plectranthus* genus. *Planta Med.* 72:929–31.

32. Dechbumroong P, Aumnouypol S, Denduangboripant J, et al. (2018) DNA barcoding of *Aristolochia* plants and development of species-specific multiplex PCR to aid HPTLC in ascertainment of *Aristolochia* herbal materials. *PLoS One*. 13:e0202625.
33. Noh P, Kim W, Yang S, et al. (2018) Authentication of the herbal medicine *Angelicae Dahuricae Radix* using an ITS sequence-based multiplex SCAR assay. *Molecules*. 23:2134.
34. Jiang C, Yuan Y, Chen M, et al. (2013) Molecular authentication of multi-species honeysuckle tablets. *Genet Mol Res*. 12:4827–35.
35. Fondon JW III, Hammock EA, Hannan AJ, et al. (2008) Simple sequence repeats: genetic modulators of brain function and behavior. *Trends Neurosci*. 31:328–34.
36. Xie M, Hou B, Han L, et al. (2010) Development of microsatellites of *Dendrobium officinale* and its application in purity identification of germplasm. *Acta Pharm Sin*. 45:667–72.
37. Choi HI, Kim NH, Kim JH, et al. (2011) Development of reproducible EST-derived SSR markers and assessment of genetic diversity in *Panax ginseng* cultivars and related species. *J Ginseng Res*. 35:399.
38. Sasaki Y, Nagumo S. (2007) Rapid identification of *Curcuma longa* and *C. aromatica* by LAMP. *Biol Pharm Bull*. 30:2229–30.
39. Sasaki Y, Komatsu K, Nagumo S. (2008) Rapid detection of *Panax ginseng* by loop-mediated isothermal amplification and its application to authentication of ginseng. *Biol Pharm Bull*. 31:1806–8.
40. Zhang YB, Wang J, Wang ZT, et al. (2003) DNA microarray for identification of the herb of *dendrobium* species from Chinese medicinal formulations. *Planta Med*. 69:1172–4.
41. Ngan FG, Shaw PC, But PPH, et al. (1999) Molecular authentication of *Panax* species. *Phytochemistry*. 50:787–91.

**BÖLÜM 2**  
**KÖK HÜCRE BİYOLOJİSİNDE GELİŞEN MOLEKÜLER**  
**YAKLAŞIMLAR**

Dr. Öğr. Üyesi Esra GÖKÇE GÜNDÜZER<sup>1</sup>

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.10251342>

---

<sup>1</sup>Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye, esragokce@gazi.edu.tr, Orcid ID: 0000-0002-4474-7523



## GİRİŞ

Kök hücreler, kendilerini yenileme ve potansiyellerine bağlı olarak çeşitli tipteki hücrelere farklılaşma yetenekleriyle tanımlanırlar. Kök hücrelerin bu potansiyeli, çeşitli moleküler belirteçlerin değerlendirilmesi ve fonksiyonel analizler ile ortaya koyulabilir. Bu moleküler belirteçler kök hücrelerin transkripsiyonel, epigenetik ve metabolik durumlarının teşhisini içerir. Pek çok çalışmada kök hücrelerin gelişimsel durumlarını ve fonksiyonel kapasitelerini göstermek için farklı fonksiyonel analizler ve moleküler belirteçler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi, kök hücreler için standart tanımlama prosedürleri veya belirteçlerin oluşturulmasına yardımcı olacaktır.

Doku rejenerasyonuna yönelik kök hücre bazlı tedavilerin geliştirilmesinde kullanılacak kök hücre tipinin seçimi son derece önemli olduğu için; bu bölümde kök hücreler ve tanımlayıcı özellikleri, çeşitli kök hücre tipleri, kaynakları, kök hücrelerin klinikte kullanımı ve potansiyel riskleri incelenmiştir. Yerleşim ve farklılaşma özelliklerine göre yetişkin kök hücrelerden hematopoetik kök hücreler ve mezenkimal kök hücrelerin ayrımını sağlayan moleküler belirteçler üzerine odaklanılmıştır.

### 1. KÖK HÜCRE TANIMI

Kök hücreler, uygun sinyale göre kendini yenileyebilen, popülasyonlarını devam ettirebilen ve farklılaşma potansiyelleri ile birden fazla yetişkin hücre tipine ve birçok türde kararlı veya daha uzmanlaşmış bir hücre formuna dönüşebilen, hücrelerdir (Calloni et al., 2013; Reya et al., 2001). Kök hücrelerin kaderi kök hücre nişi veya mikroçevre tarafından salgılanan dış etkenler ve bu etkenlere yanıt olarak oluşan iç sinyallerin bir araya gelerek bütünleşmesi ile belirlenir (Karataş, 2022). Kök hücre araştırmaları, hızla gelişme kaydetmekte, farklılaşma ve kendini yenileme özellikleri dikkate alındığında tedavi ve rejeneratif stratejilerde kullanımları ile çeşitli hastalıkların anlaşılması ve yönetilmesinde, yeni kavramlar sağlamaktadır (Nazim ve Ahmad, 2023).

### 2. KÖK HÜCRELERİN TANIMLAYICI ÖZELLİKLERİ

Kök hücreler, çok hücreli organizmaların tümünde ilkel, farklılaşmamış, orijinal hücreleridir. Hücre bölünmesi yoluyla kendilerini yenileyebilmeleri ve çok çeşitli hücrelere farklılaşabilmeleri (pluripotensi) ile karakterize edilen kök



hücreler, dokuların, organların ve tüm organizmanın temelidir (Asal ve Güven, 2020; Arrighi, 2018). Doku ve organların gelişimi, büyümesi, bakımı ve onarımı için büyük önem taşımaktadırlar. Kendini yenileme ve birçok hücre tipine farklılaşabilme yetenekleri, hücresel tedavi yaklaşımları için kök hücreleri dikkat çekici hale getirmektedir (Calloni et al., 2013).

## 2.1 Kendini Yenileme

Kök hücrelerin, kendini yenileme özellikleri farklılaşmamış durumlarını korumalarını sağlamakta ve birçok kez bölünebilmelerine imkan tanımaktadır. Bu şekilde kök hücre sayısı gelişim sırasında artmakta, yetişkin vücudunda yaşamı boyunca ve travmalardan sonra hücre sayısının korunması sağlanmaktadır (Shenghui et al., 2009; Sekhar ve Bisht, 2006). Bu süreç iki farklı bölünme çeşidi ile düzenlenir. Bunlardan birincisi asimetrik bölünme, ikincisi ise simetrik bölünmedir.

**Asimetrik bölünme;** kök hücrenin ikiye bölünmesiyle birlikte sınırlı kendini yenileme potansiyeline sahip bir kök hücre ve ileride farklılaşacak olan progenitor hücreleri oluşturmasıyla gerçekleşir.

**Simetrik bölünme** ise, kök hücrelerin özelliklerine sahip iki özdeş yavru hücre oluşturmasıyla gerçekleşir.

Hücrelerin kendini yenileme kapasitesi, mikroçevresel uyarılar gibi hücre içi ve hücre dışı faktörlere bağlıdır. Kök hücre nişi adı verilen bu mikro ortamdaki gelen sinyaller kök hücre dinamiklerini kontrol ederek kök hücreleri korumakta ve işlevlerini düzenlemektedir (Asal ve Güven, 2020; Arrighi, 2018). Kromozomların uç kısımlarında yer alan, guanin açısından zengin tandem DNA tekrarları olan ve telomer adı verilen DNA zincirleri hücrelerin bölünebilme potansiyelini belirler. Telomer kısalması ile hücrenin bölünme yeteneği zamanla son bulur. Telomer uzunluğu fazla olan hücreler daha çok bölünebilme yeteneğine sahiptir. Telomer boy uzunluğunun korunması ise telomeraz enziminin aktifliğine bağlıdır (Sağsöz ve Ketani, 2008). Kök hücrelerin telomeraz enzim aktivitesi nispeten korunmuş durumda olduğundan çok sayıda bölünebilme yeteneğine sahiptirler (Brink et al., 2008; Hiyama ve Hiyama, 2007).

## 2.2 Farklılaşma (Potensi)

Kök hücrelerin farklı hücre tiplerine farklılaşma potansiyeli potansi olarak tanımlanır (Sekhar ve Bisht, 2006). Pluripotensi ise, hücrenin, organizmanın tüm hücre tiplerini üretebilmesi anlamına gelir (Arrighi, 2018).

Farklılaşma, çok hücreli organizmaları meydana getirmek için bir araya gelen hücrelerin, dokulara özgü görevleri yerine getirmek amacıyla geçirdikleri değişimlerdir. Hücre dışı matriks proteinleri, sitokinler ve büyüme faktörleri gibi çeşitli moleküller aracılığıyla gerçekleşen değişimler karmaşık yolların görev aldığı süreçleri içerir. Farklılaşmaya başlamadan önce hücre yeterli sayıya ulaşır, sonrasında çoğalma ile ilgili mekanizmalar devre dışı bırakılarak farklılaşma ile ilgili olanlar aktif hale gelir (Erden, 2014). Bu aşamada hücre bölünme evresinden çıkar (G0 fazı). Farklılaşmayı uyaran ve devam ettiren faktörlerin devre dışı kalması halinde hücre yeniden bölünme evresine girer (G1 fazı) (Kapinas et al., 2013; Akar et al., 2009; Lodish et al., 2004).

Farklılaşma potansiyellerine göre kök hücreler totipotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olarak gruplandırılabilir (Karataş, 2022).

**a) Totipotent kök hücreler,** bir oositin bir sperm tarafından dölleni ve zigotu oluşturması durumunda üretilmektedir (Mitalipov ve Wolf, 2009). Zigotun bütün bir organizmaya dönüşmesi ve gelişmesi için gerekli yapıları oluşturmak üzere hem embriyonik hem de ekstraembriyonik (germ hücreleri ve plasenta gibi fetüse bağlı) hücre tiplerine farklılaşma yeteneği vardır. Zigotta ilk birkaç bölünme sonrasında dört hücreli halde bulunan embriyoya kadar üretilen hücreler de totipotent özelliktedir (Karataş, 2022; Asal ve Güven 2020; Mitalipov ve Wolf, 2009; Sekhar ve Bisht, 2006).

**b) Pluripotent kök hücreler,** plasenta ve yolk kesesi gibi ekstraembriyonik yapıları oluşturamayıp üç germ tabakasına (endoderm, mezoderm ve ektoderm) farklılaşma kapasitesine sahip olan ancak bütün bir organizmaya dönüşemeyen hücrelerdir (Mitalipov ve Wolf, 2009). Embriyonik kök hücreler ve uyarılmış pluripotent kök hücreler örnek verilebilir (Takahashi ve Yamanaka, 2006).

**c) Multipotent kök hücreler,** birçok özelleşmiş hücreye dönüşebilen ancak belirli bir kökene ait olmayan hücrelerdir. Fetüs ya da yetişkin bir

bireydeki özel dokularda yer alan diğer kök hücrelerin tümü multipotent özelliktedir.

**d) Oligopotent kök hücreler**, lenfoid veya miyeloid gibi yalnızca birkaç hücre tipine farklılaşabilen ve oligopotensi özelliği gösteren hücrelerdir. Miyeloid kök hücre, beyaz kan hücrelerine bölünebilen ancak kırmızı kan hücrelerine bölünemeyen bir örnektir.

**e) Unipotent kök hücreler**, yalnızca bir hücre tipine farklılaşabilen ve kendi kendini yenileme özelliğine sahip kök hücrelerdir (Sekhar ve Bisht, 2006). Bu özellikleri ile rejeneratif tıpta terapötik kullanım için umut verici bir aday haline gelmişlerdir. Dermatositler bu alanda örnek olarak verilebilir. (Karataş, 2022; Asal ve Güven 2020, Zakrzewski et al., 2019).

Her biri farklı özelliklere sahip bu kök hücreler arasındaki karşılaştırmalar, bu özellikleri kontrol eden moleküler mekanizmalar hakkında bilgi edinmemizi sağlar.

Kök hücrelerin çeşitli durumlarda tıbbi tedavi amacıyla kullanılabilmesi ve hücre sel sinyalleme güvenli bir şekilde yönlendirilebilmesi için, bu hücrelerin düzenlenmesi ile ilgili bilgilere ihtiyaç vardır. Bu tür bilgiler gen ekspresyonu, protein ekspresyonu ve epigenetik çalışmalardan elde edilen sonuçların birleştirilmesi ile elde edilecektir. Bu kapsamda özellikle pluripotensi ve kendini yenileme mekanizmalarının aydınlatılması gerekmektedir (Jaishankar ve Vrana, 2009).

### 2.3 Klonalite

Klonalite, kültüre edilen bir hücre popülasyonunun kökenini tanımlamaktadır (Karataş, 2022). Kendini yenileme özelliği olan bir hücreden klonal popülasyon oluşturulur. Klonal analizde ise homojen bir hücre popülasyonu ile çalışılmalıdır. Kök hücrelerin içinde bulunduğu niş tek hücre analizini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle tek bir kök hücrenin hem moleküler hem de fonksiyonel analizinin eş zamanlı olarak yapılması önem taşımaktadır (Hope ve Bhatia, 2011).

### 2.4 Köklülük (Stemness)

Köklülük, çekirdek kök hücrenin kendini yenileme ve farklılaşmış nesiller oluşturma özelliklerinin altında yatan ortak moleküler süreçleri ifade

eder (Melton, 2014). Köklülük, bir hücrenin soyunu sürdürme, farklılaşmış hücreler meydana getirme, çoğalma ve yenilenme arasında bir denge sağlayarak çevresiyle etkileşime girme yeteneğini birleştirir (Aponte ve Caicedo, 2017). Birbirinden farklı hücresel mikro ortamlar veya nişlerde bulunan kök hücreler buldukları dokulara özel farklı fizyolojik gereksinimleri karşılayacak moleküler programlara sahip olsalar da, kök hücrelerin tümünü kapsayacak birtakım ortak genetik özelliklerin de olabileceği varsayılmaktadır (Melton, 2014).

Transkripsiyonel profillemeye ile embriyonik kök hücre, trofektoderm kök hücre, hematopoietic kök hücre ve nöral kök hücre popülasyonlarında zenginleştirilmiş birçok gen tanımlanmıştır. Transkripsiyonel profillemenin diğer kök hücrelere ve daha fazla organizmaya uygulanmasıyla kök hücreler için moleküler bir parmak izi geliştirilebileceği ortaya konulmuştur. Bu da fonksiyonel özelliklerle eş zamanlı olarak değerlendirildiğinde kök hücrelerin moleküler tanımı için daha kapsamlı bir dizi kriter sağlayabilir (Melton, 2014; Golding, 2012).

### 3. HÜCRE TİPLERİ

Kök hücreler, doku mühendisliği uygulamaları için uygun potansiyel kaynaklardır. Kök hücre araştırmalarında elde edilen son gelişmeler sayesinde yeni olası tedaviler ortaya çıkmıştır. Yaşlanmış, hasar görmüş, hastalıklı organlar veya dokular, doku mühendisliği ile tasarlanan alternatifleriyle değiştirilmektir. Yanık tedavisi, kemik iliği nakli, kornea bozukluklarının tedavisi gibi bazı durumlarda kök hücreler klinik tedavide kullanılmaktadır. Her bir kök hücre çeşidi çok özel ve önemli özelliklere sahip olmasına rağmen, her birinin kendine özgü kısıtlı yönleri bulunmaktadır. Bu sebeple kök hücre kullanımında ilk basamak tasarlanacak olan dokuya en uygun özellikteki kök hücre çeşidinin belirlenmesidir (Asal ve Güven, 2020).

#### 3.1 Embriyonik Kök Hücreler (EKH)

Embriyonik kök hücreler, döllenmeden 4 gün sonra embriyonun implantasyon öncesi aşaması olan, blastosistin iç hücre kütesinden (IHK) türetilirler (Zakrzewski et al., 2019). EKH'ler pluripotent özellikte olup germ hücre katmanında yer alan endoderm, mezoderm ve ektoderm tabakalarının üçüne de farklılaşabilme yeteneğine sahiptirler. Hem insan hem de fareden üretilen EKH'lerin her türlü hücreyi ürettiği ancak plasenta gibi ekstra

embriyonik hücrelerin oluşumuna katkıda bulunma potansiyellerinin olmadığı gösterilmiştir (Singh et al., 2016). EKH'lerin alkalın fosfataz ve telomeraz gibi enzimatik aktiviteleri de bulunmaktadır.

EKH'leri tanımlamada hücre yüzey proteinleri, sitokinler, transkripsiyon faktörleri ve özellikle EKH'lerde ifade edilen genlerden yararlanılmaktadır. Sitokinler, EKH'lerin kendi kendini yenileme ve farklılaşma mekanizmaları üzerinde etkilidir. Transkripsiyon faktörleri ise gerekli olan durumlarda organizmanın ihtiyaç duyduğu miktarda hücrede gen ifadesinin düzenlenmesinde görevlidir. İnsan EKH'lerinde seviye spesifik embriyonik antijen-3 (SSEA-3) ve 4 (SSEA-4) ile tümör reddi antijenleri (TRA-1-60 ve TRA-1-81), GCTM2, GCTM343, alkalın fosfataz, CD90, CD24 ve CD9 sıklıkla ifade edilen yüzey belirteçleridir (Adewumi et al., 2007; Skottman et al., 2005; Abeyta et al., 2004; Henderson et al., 2002; Reubinoff et al., 2000; Thompson et al., 1998) EKH'ler farklılaşmaya teşvik edildiğinde, bu antijenlerin gen ifadesi azalırken SSEA-1 gen ifadesi artmaktadır (Draper et al., 2002; Henderson et al., 2002). NANOG, OCT4, SOX2, KLF4, C-MYC ve LIN28 gibi ekspresyonu EKH'lere özgü olan transkripsiyon faktör genleri pluripotensiden sorumludur ve proteinleri yeniden programlamada görevlidirler (Mitalipov ve Wolf, 2009; Clark et al., 2004; Reubinoff et al., 2000).

EKH'ler, in vitro pluripotensi destekleyen transkripsiyonel aktivite ve epigenetik düzenleyiciler korunarak teoride sınırsız olarak kültüre edilebilirler. Bu özellikleri ile doku mühendisliği çalışmaları için umut vaat eden potansiyelleri ile dikkat çekicidirler (Howard et al., 2008). Her tür hücreyi üretme yeteneğine sahip EKH'ler olası bir tedavi aracı olabilirler. Ancak embriyoların kullanımı ve kök hücrelerin izole edilmesi sırasında embriyo zarar göreceği için, araştırmacılar arasında çok ciddi etik tartışmalara neden olmuştur. Bu nedenle klinikte kullanımı yoktur (Atilla ve Stubbs, 2017).

### **3.2 Uyarılmış (İndüklenmiş) Pluripotent Kök Hücreler (iPKH)**

İnsan EKH'lerinin kullanımına ilişkin etik tartışmalar Takahashi ve Yamanaka tarafından 2006 yılında iPKH'lerin bulunmasıyla son bulmuştur (Takahashi ve Yamanaka, 2006). iPKH'lerin üretilmesi kök hücre araştırmaları için çığır açıcı bir gelişmedir. Çünkü bu, etik kaygılarla EKH'lere ihtiyaç

duymadan somatik hücrelerin yeniden programlanmasıyla, pluripotent kök hücrelerin üretilmesi sağlanmıştır (Yu et al., 2007). Takahashi ve Yamanaka, EKH'lere benzer özelliklere sahip kök hücrelerin, eşzamanlı olarak OCT4, SOX2, C-MYC ve KLF4 genleri eklendiğinde fare fibroblastlarından üretilebileceğini ortaya koymuşlar ve bu hücreleri iPKH olarak adlandırmışlardır (Takahashi ve Yamanaka, 2006). 2007 yılında aynı dört geni insan fibroblastlarına uygulayarak insan iPKH'lerini oluşturmuşlardır (Takahashi et al., 2007). Eş zamanlı ve bağımsız olarak Thomson ve diğerleri farklı faktörleri (OCT4, SOX2, NANOG ve LIN28) kullanarak insan iPKH'leri üretmişlerdir (Yu et al., 2007). Lenfositlerden ve nöronlardan üretilen iPKH'ler de sonraki çalışmalar ile ortaya koyulmuştur (Kim et al., 2011; Loh et al., 2009). İPKH'ler ve EKH'lerin farklılaşmayı indükleme şekilleri ve kültür koşulları birbirinden farklıdır. Eş zamanlı olarak değerlendirilebilmeleri açısından İPKH ve EKH çalışmaları birbirine paralel şekilde gerçekleştirilmelidir (Yamanaka, 2012).

İlk çalışmalarda İPKH'ler, retrovirüsler ve lentivirüsler kullanılarak üretilmiştir. Bu yöntemde, vektör tarafından taşınan yeniden programlama faktörü genleri, konakçı genomuna entegre edilir. Lentivirüsler de benzer şekilde çalışır ancak daha az değişkenlik ve daha yüksek verimlilik gösterdiği bildirilmektedir. Ancak mutajenez ve immünojenisite gibi ilişkili riskler nedeniyle iPKH'leri oluşturmada ideal yaklaşım, konakçı genomuna vektör entegrasyonundan kaçınan, Sendai virüsü (SeV), plazmitler, transpozonlar, sentetik RNA'lar ve proteinlerin kullanımı gibi çeşitli protokoller rapor edilmiştir (Karagiannis et al., 2018; Yamanaka, 2012).

Mevcut bilgilerden pluripotensin dinamik bir durum olduğu ve gelişmekte olan herhangi bir hücre kaderinin çok sayıda moleküler faktör tarafından düzenlendiği anlaşılmaktadır. Bu süreçte, transkripsiyon faktörleri, bunların hedef gen promotörleri, miRNA'lar, kodlamayan RNA'lar, histon değiştirici proteinler ve bunlara karşılık gelen gen ekspresyonları gibi birçok farklı türde moleküler belirteç vardır. Bu belirteçler hücrelerin pluripotens düzeyini tanımlamak için araştırmacılar tarafından incelenmektedir (Singh et al., 2016).

İPKH'lerin kök hücre tedavilerinde, ilaç toksisite analizlerinde, hastalık modellemelerinde ve gen terapisinde birçok uygulaması vardır ve bu nedenle büyük önem taşırlar (Singh et al., 2016). İPKH'lerin kanser aşısı olarak

kullanımı son yıllarda gündemde olan dikkat çekici uygulamalardan biridir (Barati et al., 2021), İnaktif haldeki pluripotent kök hücreler hayvan modellerinde kolon (Li et al., 2009), akciğer (Atorki, 2016), ve yumurtalık kanserine (Zhang et al., 2012) karşı aşılardan üretilmesi amacıyla kullanılmıştır. Aşı üretim çalışmaları kök hücrelerin tıbbi uygulamalarında devrim niteliğindedir.

### 3.3 Yetişkin Kök Hücreler

Yetişkin kök hücreleri, bir doku veya organda bulunan, kendini yenileme ve farklılaşma özelliklerine sahip, farklılaşmamış hücrelerdir (Jaishankar ve Vrana, 2009). Multipotent özellikte olup buldukları dokuya ait hücre tiplerini oluşturma yeteneğine sahiptirler. Çeşitli nedenlerle kaybedilen hücrelerin yerine yenisini koyarak homeostazı korumada rol oynarlar (Asal ve Güven, 2020).

Yakın bir zamana kadar çalışmalardan elde edilen mevcut bilgiler, yetişkin kök hücrelerin kültürde bölünme yeteneğinin sınırlı olduğu, canlı vücudunda zor bulunduğu ve nispeten az sayıda hücre tipi oluşturabildiği yönündeydi (Mummery, C. et al. 2014). Yetişkin kök hücreleri, kültürde sonsuz olarak çoğaltılamasa da, embriyonik kök hücrelerin kullanımına yönelik olan etik kısıtlamaları yoktur. Ayrıca, bu hücrelerin bağışıklık reddi sorunu ortadan kaldırılarak onları hücre bazlı tedaviler için tercih edilen bir seçenek haline getirmiştir (Jaishankar ve Vrana, 2009). Yirmi birinci yüzyılın ilk on yılında hücrelerin vücudun birçok dokusunda tanımlanmasını sağlayan yeni belirteçlerin keşfedilmesi ve yetişkin kök hücrelerin farklılaşma yeteneklerinden ödün vermeden büyümesini destekleyen kültür koşulları ve proteinlerin bulunmasıyla bu görüş çarpıcı biçimde değişmiştir. Böylece yetişkin kök hücreler doku ve organ yenilenmesini sağlayabilecek tedavilerin araştırılmasında merkez haline gelmiştir. (Mummery et al., 2014).

Yetişkin kök hücreler, içinde buldukları mikroçevre şartlarına göre farklılaşırlar. Tedavi amaçlı doku kaynağı olarak kullanılabilmesi için plastisite ve vücut dışında proliferasyon özelliklerinin kuvvetlendirilmesi yönünde araştırmalar devam etmektedir (Coulombel et al., 2003). İyi bilinen yetişkin kök hücreler kemiklerde, yağ dokusunda, kanda, kasta, deride ve bağırsaklarda bulunmaktadır. En iyi çalışılan yetişkin kök hücreler çoğunlukla

hem hematopoietik hem de mezenkimal kök hücreleri kapsayan kemik iliğindedir (Asal ve Güven, 2020).

Yetişkin kök hücreler, yerleşim ve farklılaşma özelliklerine göre hematopoetik kök hücreler ve mezenkimal kök hücreler olarak incelenmektedirler (Erden, 2014).

### 3.3.1 Hematopoietik Kök Hücreler (HKH)

Bir orrganizmanın kan hücrelerini oluşturma süreci hematopoez olarak tanımlanır. Kendi kendini yenileyebilen ve kan hücrelerinin tümüne dönüşebilme potansiyeline sahip HKH'lerin gelişim ve farklılaşmaları da bu süreçte gerçekleşmektedir. Bu özellikleri ile HKH'ler farklılaşarak tüm kan dokusunu oluşturabilme yeteneğine sahiptirler (Dulak et al., 2015). HKH'lerin bu yeteneği, ilk kez 1960'larda bağışıklık sistemi ile ilgili hastalıkların tedavisinde kemik iliği transplantasyonlarında başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Günümüzde çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan HKH'ler kemik iliği, periferik kan veya kordon kanından elde edilirler (Lanza ve Klimanskaya, 2011). HKH'ler kanser, otoimmün hastalıklar ve metabolizma bozukluklarının dışında birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmakta, İPKH'lerden HKH'lerin üretilebilmesi için doku mühendisliği tekniklerinin geliştirilmesi yönünde çalışmalar devam etmektedir.

İlkel HKH'leri karakterize edebilecek moleküler belirteçlerin tanımlanması, onların içinde buldukları heterojen hücre havuzundan izolasyonunu kolaylaştıracaktır. HKH'ler CD34'ün ekspresyonuna bağlı olarak izole edilir. HKH'lerin pozitif yönde eğilim gösteren moleküler belirteçleri CD34, CD90, ve CD133; negatif moleküler belirteçleri ise CD38 ve lineage belirteçleridir. (Calloni et al., 2013).

### 3.3.2 Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)

MKH'ler ilk kez Fridenstein ve Petrakova tarafından 1966 yılında tanımlanmışlardır. Fridenstein, yaptığı kemik iliği kültüründe morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen hücre kolonilerinin olduğunu belirlemiştir. Bu hücrelerin kemik ve yağ hücrelerine farklılaşabildiğini keşfettikten sonra MKH adını vermişlerdir (Fridenstein et al., 1970; Fridenstein et al., 1966). MKH'ler kendini yenileme ve farklılaşma yeteneğine sahip olup multipotent özelliktedirler. Ayrıca MKH'ler plastiğe yapışan stromal dokuların bir parçası



oldukları için mezenkimal stromal hücreler olarak da adlandırılmaktadır (Fitzsimmons et al., 2018).

MKH'lerin farklı bir morfolojisi vardır ve belirli bir moleküler belirteç (CD molekülü) setini ifade ederler (Kobolak et al., 2016). Hücrelerin MKH olarak adlandırılabilmesi için; CD73, CD90 ve CD105 belirteçlerini eksprese etmesi ve CD34, CD45, CD14 veya CD11b ve CD79a veya CD19 için negatif olması gerekir (Asal ve Güven, 2020; Calloni et al., 2013). Ayrıca hücrelerin plastik yüzeylere yapışkan olmaları, çoğalma potansiyellerinin yüksek olması, kültür edildiklerinde fibroblast benzeri bir görünümde olmaları ve osteojenik, adipojenik ve kondrojenik olarak üç soya farklılaşma kapasitesine sahip olmaları gerekir (Kobolak et al., 2016; Lv et al., 2014; Phinney, 2012).

MKH'ler günümüze kadar birçok çalışmada yer almış olup doku mühendisliğinin çeşitli alanlarında kullanılmışlardır. Klinik sonuçlara göre önemli bir hücre kaynağı olarak görülmektedirler. Bu hücreler, büyük farklılaşma ve yüksek çoğalma kapasiteleri ile birlikte yetişkin vücudunda kolay izolasyona izin veren farklı kaynakları nedeniyle dikkat çekicidirler (Asal ve Güven 2020). MKH'lerin osteoblastlara, kondrositlere ve adipositlere ek olarak tenositlere, düz kas hücrelerine ve kemik iliğindeki stromal hücrelere farklılaşabildiği gösterilmiştir (Elahi et al., 2016).

Farklı doku ve organlardan MKH izole edildiğinde, farklı yönlerde farklılaşma potansiyeline sahip heterojen bir hücre karışımı elde edilir. Bununla birlikte dokulardaki MKH miktarı da fazla değildir. Örneğin kemik iliğinde MKH'ler toplam hücre sayısının %0,01 - %0,001'ini oluşturur. Bu nedenle, en ilkel MKH'lerin izole edilmesi ve uygun hücrelerin oluşturulması için farklı potansiyellere sahip alt popülasyonların tanımlanmasını sağlayacak belirteçlerin tanımı, MKH'lerin hücresel ve moleküler karakterizasyonunun aydınlatılabilmesi için gereklidir (Calloni et al., 2013).

MKH'ler çok sayıda dokuda bulunmasına rağmen, kemik iliğinden türetilen mezenkimal kök hücreler ve adipoz dokudan türetilen mezenkimal kök hücreler doku mühendisliği uygulamaları için daha yaygın olarak kullanılan kaynaklar olarak karşımıza çıkmaktadır (Asal ve Güven, 2020).

### **3.3.2.1 Kemik İliğinden Türetilen Mezenkimal Kök Hücreler**

Kemik iliğinden türetilen mezenkimal kök hücreler (Kİ-MKH'ler), kemik iliğinde yer alan ancak hematopoietik olmayan kök hücrelerdir ve

terapötik uygulamalarda kullanım için ideal kök hücre çeşitleridir (Kim et al., 2019; Mangialardi ve Madeddu, 2016; Kokabu et al., 2016). Potensi özelliklerini kaybetmeden uzun süre farklılaşma yeteneğinde olmaları en önemli özellikleridir. Tüm fibroblast işlev ve özelliklerine sahip olan Kİ-MKH'ler fibroblast benzeri hücre morfolojisi göstermektedirler (Karataş, 2022).

Kİ-MKH'lerin yakın zamana kadar tanımlanmış moleküler belirteçleri bulunmamaktaydı. Bu hücreler genellikle CD29, CD44, CD105 ve CD166 ekspresyonuyla dikkat çekici olup; CD14, CD34 ve CD45 gibi hematopoietik belirteçler açısından pozitif değildirler (Li et al., 2011). 2007 yılında ise, Gang ve diğerleri yaptıkları araştırma sonucunda, SSEA-4'ü insan kemik iliğinden türetilen MKH'ler için moleküler bir belirteç olarak tanımlamışlardır (Asal ve Güven, 2020; Gang et al., 2007). Başka bir araştırma grubu ise, hematopoietik kök hücreler (HKH'ler) ile karşılaştırıldığında, CD146'yı Kİ-MKH'lere özgü bir belirteç olarak tanımlamıştır (Delorme et al., 2008). Daha sonra farklı araştırmacılar tarafından tanımlanan MKH belirteçlerinin zıt kombinasyonları nedeniyle, Kİ-MKH'lerin karakterizasyonu ile ilgili zorluklar devam etmektedir (Lv et al., 2014; Calloni et al., 2013; Frenette et al., 2013).

İnsan kemik iliğinden türetilen MKH'ler kültürde kolaylıkla gelişim gösterir. Proteolitik enzimler kullanılarak pasajlandıklarında 7-12 pasaj boyunca çoğalırlar. Bu süre sonrasında insan MKH'leri hiçbir dönüşüm belirtisi olmadan yaşlanmaya ve çoğalma potansiyelinin kaybına (Wagner et al., 2008) yol açan bir dizi değişikliğe uğrarlar (Stenderup et al., 2003). Bu sınırlı büyüme potansiyelleri açısından klinik kullanımlarına ait sorunlar vardır. Yapılan bir çalışmada MKH'lerde ters transkriptazın (hTERT) zorla ekspresyonu ile osteojenik potansiyelleri korunarak uzun vadeli çoğalmalarının mümkün olduğu gösterilmiştir (Shi et al., 2002). Ancak uzayan bu sürecin MKH'lerin malign dönüşümüne neden olup olmayacağı henüz bilinmemektedir (Zipori, 2009).

Kİ-MKH'lerin aktiviteleri ile kan hücrelerini ve bağışıklık sistemini oluşturan farklı bir progenitör hücre popülasyonunu destekleyebilmeleri, ekstrasmedüler dokuların onarımını teşvik etmede rol alabilmeleri, kemik büyümesini ve yeniden şekillenmesini etkileyebilme yeteneğinde olmaları sebebiyle dikkate alınması gereken önemli bir MKH popülasyonudur (Chen et al., 2013; Frenette et al., 2013; Karsenty ve Ferron, 2012).

### 3.3.2.2 Adipoz Dokudan Türetilen Kök Hücreler

Adipoz dokudan MKH (AD-MKH) eldesi kemik iliğine göre daha kolay gerçekleştirilir. İşlemler daha az invaziv olup, az miktarda dokudan daha fazla sayıda kök hücre elde edildiği için son yıllarda daha çok tercih edilmektedir (Zhu et al., 2008; Gimble ve Guliak, 2003; Zuk et al., 2002). AD-MKH'ler diğer tüm MKH'ler gibi fibroblastik morfoloji gösteren, yüzeye bağımlı, spesifik yüzey antijenlerine (CD45-, CD31-, CD34+, CD49d+, v.b.) sahip, multipotent özellikte, stromal hücrelerdir (Zuk et al., 2002).

AD-MKH'ler, deri altı yağ birikintilerini içeren beyaz yağ dokusunun perivasküler bölgesinde bulunurlar (Kishi et al., 2010; Crisan et al., 2008). Yağ dokusu çok sayıda hücre tipini içerdiğinden AD-MKH'leri izole etmek için hücreler, yüzey belirteçlerinin ekspresyon profillerine göre ayrılırlar (Wankhade et al., 2016). Flow sitometri analizi ile, bu varsayılan progenitör hücreler, endotelial ve kan hücreleri gibi adipojenik olmayan hücrelerden ayırt edilebilirler (Rodeheffer et al., 2008). AD-MKH'ler tarafından ifade edilen yüzey belirteçleri CD13, CD29, CD44, CD58 ve CD166'dır. Diğer MKH'lerden farklı olarak AD-MKH'ler CD13, CD29, CD49d, CD73, CD90, CD133, MHC I ve MHC II'yi ifade ederler; ancak CD31, CD45 ve CD106 ifadesinin eksikliği ile de tanımlanırlar (Dai et al., 2016).

AD-MKH'lerin adipositlere, osteoblastlara, kondrositlere, miyositlere, nörositlere, endotelial hücrelere, düz kas hücrelerine ve diğer hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir (Dai et al., 2016). AD-MKH'ler bollukları, izolasyonlarındaki kolaylık ve tartışmasız doğaları nedeniyle rejeneratif tıp uygulamalarında tercih edilmektedirler (Crisan et al., 2008).

## 4. Kök Hücrelerin Klinikte Kullanımı ve Potansiyel Riskleri

Kök hücrelerin uzun yaşam süresine sahip olması, kendini yenileme ve farklılaşma özellikleri bu hücrelere sağlıklı veya patolojik durumlarda önemli bir rol sağlar (Hombach-Klonisch et al., 2008).

Kök hücrelerin doku mühendisliğinde kullanımı, tedavisi zor olan veya mümkün olmayan hastalıkların tedavisi için umut vaat etmektedir. Kök hücreler, tedavide direkt olarak veya nakil öncesi hücreler farklılaştırıldıktan sonra kullanılabilirler. Farklılaşma potansiyelleri ve düzenleyici etkileri sebebiyle tercih edilirler (Golchin ve Farahany, 2019). Kök hücreler, doku

mühendisliği çalışmalarında hastalık modelleme, ilaç tarama uygulamaları ve birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadırlar (Akbari et al., 2019; Low et al., 2019; Lungova et al., 2019; Ronaldson Bouchard et al., 2018).

Yetişkin mezenkimal kök hücreler, kemik onarımında en umut verici araçlardan biri olarak kabul edilirler (Gafni et al., 2004). Ancak kök hücrenin farklılaşma yeteneğindeki bir bozulma veya çoğalma özelliğinde kontrolünü kaybetmesi durumunda, bu hücreler potansiyel bir kanser hücresi üretimi sürecine girebilirler (Klonisch et al., 2008).

Yapılan bazı çalışmalarda, MKH'lerin bağışıklık sistemi tarafından tanınmaktan kaçtığı ve bağışıklık tepkilerini inhibe ettiği gösterilmiştir (Gao et al., 2016). Bu durum hem Kİ-MKH'lerde hem de AD-MKH'lerde tespit edilmiştir. MKH'lerin bu özelliklerinin bağışıklık sistemi hastalıkları ve rejeneratif tıp uygulamalarında klinik kullanımlarını kolaylaştıracağı düşünülmektedir (Gazit et al., 2019).

MKH'ler ile bağlantılı riskler, uzun süre yapılacak takipler ile belirlenebilir. Şimdiye kadar edinilen bilgiler, vücuda girdikten sonra MKH'lerin vücutta uzun süre saklanmadığı yönündedir. Yüksek ateş, enfeksiyon ve organ hasarına sebep olmuş olabileceğine dair bulguları olan çalışmalar olmakla birlikte, MKH'lerin kullanımıyla ilişkili risklere ışık tutacak çok sayıda çalışma halen devam etmektedir. Tamamlanan araştırmalarda MKH uygulanması ile malignite, toksisite ve ölüm gibi ciddi sağlık komplikasyonları arasında doğrudan bir ilişki görülmemiştir. (Fitzsimmons et al., 2018).

**KAYNAKÇA**

- Abeyta, M. J., Clark, A. T., Rodriguez, R. T., Bodnar, M. S., Pera, R. A. R., Firpo, M. T. (2004). Unique gene expression signatures of independently-derived human embryonic stem cell lines. *Human molecular genetics*, 13(6), 601-608.
- Adeyemi, O. B., Aflatoonia, L., Ahrlund-Richte, ... Glyn N. S. (2007). Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol* 25:803–816.
- Akar, A. R., Arat, M., Beksaç, M., Can, A., Çamurdanoğlu, B. Z., Çetinkaya, D. U., ... Şahin, G. (2009). *Türkiye Bilimler Akademisi Raporları*, 20. Ankara, 113s.
- Akbari, S., Sevinç, G. G., Ersoy, N., Basak, O., Kaplan, K., Sevinç, K., ... Erdal, E. (2019). Robust, long-term culture of endoderm-derived hepatic organoids for disease modeling. *Stem Cell Reports*, 13(4), 627-641.
- Aponte, P. M., Caicedo, A. (2017). Stemness in cancer: stem cells, cancer stem cells, and their microenvironment. *Stem cells international*, 2017.
- Arrighi, N. (2018). Definition and classification of stem cells. *Stem Cells*, 2018, 1-45.
- Asal, M., Güven, S. (2020). Stem cells: sources, properties, and cell types. In *Biomaterials for organ and tissue regeneration* (pp. 177-196). Woodhead Publishing.
- Atila, H. A., Stubbs, A. J. (2017). Amniyotik membran ve sıvı kaynaklı tedaviler–kök hücre tedavisi. *TOTBID Derg*, 16(3), 259-265.
- Barati, M., Akhondi, M., Mousavi, N. S., Haghparast, N., Ghodsi, A., Baharvand, H., ... Hassani, S. N. (2021). Pluripotent stem cells: cancer study, therapy, and vaccination. *Stem Cell Reviews and Reports*, 1-18.
- Brink, T. C., Sudheer, S., Janke, D., Jagodzinska, J., Jung, M., Adjaye, J. (2008). The origins of human embryonic stem cells: a biological conundrum. *Cells Tissues Organs*, 188(1-2), 9-22.
- Calloni, R., Cordero, E. A. A., Henriques, J. A. P., Bonatto, D. (2013). Reviewing and updating the major molecular markers for stem cells. *Stem cells and development*, 22(9), 1455-1476.
- Chen, Q., Liu, K., Robinson, A. R., Clauson, C. L., Blair, H. C., Robbins, P. D., ... Ouyang, H. (2013). DNA damage drives accelerated bone aging via an NF- $\kappa$ B-dependent mechanism. *Journal of Bone and Mineral Research*, 28(5), 1214-1228.
- Clark, A. T., Rodriguez, R. T., Bodnar, M. S., Abeyta, M. J., Cedars, M. I., Turek, P. J., ... Reijo Pera, R. A. (2004). Human STELLAR, NANOG, and GDF3 genes are expressed in pluripotent cells and map to chromosome 12p13, a hotspot for teratocarcinoma. *Stem Cells*, 22(2), 169-179.

- Coulombel, L. (2003). Adult tissue stem cells: definition, identification and therapeutic use. *Journées Annuelles de Diabetologie de L'hotel-dieu*, 1-16.
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C. W., Corselli, M., Park, T. S., ... Péault, B. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell*, 3(3), 301-313.
- Dai, R., Wang, Z., Samanipour, R., Koo, K. I., Kim, K. (2016). Adipose-derived stem cells for tissue engineering and regenerative medicine applications. *Stem cells international*, 2016.
- Delorme, B., Ringe, J., Gallay, N., Le Vern, Y., Kerboeuf, D., Jorgensen, C., ... Charbord, P. (2008). Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 111(5), 2631-2635.
- Draper, J. S., Pigott, C., Thomson, J. A., Andrews, P. W. (2002). Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture. *Journal of anatomy*, 200(3), 249-258.
- Dulak, J., Szade, K., Szade, A., Nowak, W., Józkwicz, A. (2015). Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochimica Polonica*, 62(3).
- Elahi, K. C., Klein, G., Avci-Adali, M., Sievert, K. D., MacNeil, S., Aicher, W. K. (2016). Human mesenchymal stromal cells from different sources diverge in their expression of cell surface proteins and display distinct differentiation patterns. *Stem cells international*, 2016.
- Erden, S. (2014). Kök Hücreler ve Klinikte Kullanımları. *Journal of New Results in Engineering and Natural Science*, 3, 1-8.
- Fitzsimmons, R. E., Mazurek, M. S., Soos, A., Simmons, C. A. (2018). Mesenchymal stromal/stem cells in regenerative medicine and tissue engineering. *Stem cells international*, 2018.
- Frenette, P. S., Pinho, S., Lucas, D., Scheiermann, C. (2013). Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annual review of immunology*, 31, 285-316.
- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., Lalykina, K. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Proliferation*, 3(4), 393-403.
- Friedenstein, A. J., Piatetzky-Shapiro, I. I., Petrakova, K. V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Development*, 16(3), 381-390.
- Gafni, Y., Turgeman, G., Liebergal, M., Pelled, G., Gazit, Z., Gazit, D. (2004). Stem cells as vehicles for orthopedic gene therapy. *Gene Therapy*, 11(4), 417-426.

- Gang, E. J., Bosnakovski, D., Figueiredo, C. A., Visser, J. W., Perlingeiro, R. C. (2007). SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood*, 109(4), 1743-1751.
- Gao, F., Chiu, S. M., Motan, D. A. L., Zhang, Z., Chen, L., Ji, H. L., ... Lian, Q. (2016). Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell death & disease*, 7(1), e2062-e2062.
- Gazit, Z., Pelled, G., Sheyn, D., Yakubovich, D. C., Gazit, D. (2019). Mesenchymal stem cells. In *Principles of regenerative medicine* (pp. 205-218). Academic Press.
- Gimble, J. M., Guilak, F. (2003). Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytherapy*, 5(5), 362-369.
- Golchin, A., Farahany, T. Z. (2019). Biological products: cellular therapy and FDA approved products. *Stem cell reviews and reports*, 15(2), 166-175.
- Golding, M. C. (2012). Generation of trophoblast stem cells. *Genomic Imprinting: Methods and Protocols*, 49-59.
- Henderson, J. K., Draper, J. S., Baillie, H. S., Fishel, S., Thomson, J. A., Moore, H., Andrews, P. W. (2002). Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem cells*, 20(4), 329-337.
- Hiyama, E., Hiyama, K. (2007). Telomere and telomerase in stem cells. *British journal of cancer*, 96(7), 1020-1024.
- Hombach-Klonisch, S., Panigrahi, S., Rashedi, I., Seifert, A., Alberti, E., Pocar, P., ... Los, M. (2008). Adult stem cells and their trans-differentiation potential—perspectives and therapeutic applications. *Journal of Molecular Medicine*, 86, 1301-1314.
- Hope, K., Bhatia, M. (2011). Clonal interrogation of stem cells. *Nature Methods*, 8(Suppl 4), S36-S40.
- Howard, D., Buttery, L. D., Shakesheff, K. M., Roberts, S. J. (2008). Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *Journal of anatomy*, 213(1), 66-72.
- Jaishankar, A., Vrana, K. E. (2009). Emerging molecular approaches in stem cell biology. *BioTechniques*, 46(5), 367-371.
- Kapinas, K., Grandy, R., Ghule, P., Medina, R., Becker, K., Pardee, A., ... Stein, G. (2013). The abbreviated pluripotent cell cycle. *Journal of cellular physiology*, 228(1), 9-20.
- Karagiannis, P., Takahashi, K., Saito, M., Yoshida, Y., Okita, K., Watanabe, A., ... Osafune, K. (2019). Induced pluripotent stem cells and their use in human models of disease and development. *Physiological reviews*, 99(1), 79-114.
- Karataş M. (2022) Hücre Biyolojisi. Nobel Akademik Yayıncılık 460, Ankara.
- Karsenty, G., Ferron, M. (2012). The contribution of bone to whole-organism physiology. *Nature*, 481(7381), 314-320.

- Kim, J., Lengner, C. J., Kirak, O., Hanna, J., Cassady, J. P., Lodato, M. A., ... Jaenisch, R. (2011). Reprogramming of postnatal neurons into induced pluripotent stem cells by defined factors. *Stem cells*, 29(6), 992-1000.
- Kim, J. W., Luo, J. Z., Luo, L. (2019). Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells as a New Therapeutic Approach for Diabetes Mellitus. In *A Roadmap to Non-Hematopoietic Stem Cell-based Therapeutics* (pp. 251-273). Academic Press.
- Kishi, K., Imanishi, N., Ohara, H., Ninomiya, R., Okabe, K., Hattori, N., ... Nakajima, T. (2010). Distribution of adipose-derived stem cells in adipose tissues from human cadavers. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery*, 63(10), 1717-1722.
- Klonisch, T., Wiechec, E., Hombach-Klonisch, S., Ande, S. R., Wesselborg, S., Schulze-Osthoff, K., Los, M. (2008). Cancer stem cell markers in common cancers—therapeutic implications. *Trends in molecular medicine*, 14(10), 450-460.
- Kobolak, J., Dinnyes, A., Memic, A., Khademhosseini, A., Mobasheri, A. (2016). Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods*, 99, 62-68.
- Kokabu, S., Lowery, J. W., Jimi, E. (2016). Cell fate and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem cells international*, 2016.
- Lanza, R., Klimanskaya, I. (Eds.). (2011). *Essential stem cell methods*. Academic Press.
- Li, S., L'Heureux, N., Elisseeff, J. H. (2011). *Stem cell and tissue engineering*. World Scientific.
- Li, Y., Zeng, H., Xu, R. H., Liu, B., Li, Z. (2009). Vaccination with human pluripotent stem cells generates a broad spectrum of immunological and clinical responses against colon cancer. *Stem cells*, 27(12), 3103-3111.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., ... Darnell, J. *Molecular Cell Biology 2004* WH Freeman and Company. Nueva York, cap, 1050p.
- Loh, Y. H., Agarwal, S., Park, I. H., Urbach, A., Huo, H., Heffner, G. C., ... Daley, G. Q. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 113(22), 5476-5479.
- Low, J. H., Li, P., Chew, E. G. Y., Zhou, B., Suzuki, K., Zhang, T., ... Xia, Y. (2019). Generation of human PSC-derived kidney organoids with patterned nephron segments and a de novo vascular network. *Cell stem cell*, 25(3), 373-387.
- Lungova, V., Chen, X., Wang, Z., Kendzioriski, C., Thibeault, S. L. (2019). Human induced pluripotent stem cell-derived vocal fold mucosa mimics



- development and responses to smoke exposure. *Nature communications*, 10(1), 4161.
- Lv, F. J., Tuan, R. S., Cheung, K. M., Leung, V. Y. (2014). Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem cells*, 32(6), 1408-1419.
- Mangialardi, G., Madeddu, P. (2016). Bone marrow-derived stem cells: a mixed blessing in the multifaceted world of diabetic complications. *Current diabetes reports*, 16, 1-12.
- Melton, D. (2014). 'Stemness': definitions, criteria, and standards. In *Essentials of stem cell biology* (pp. 7-17). Academic Press.
- Mitalipov, S., Wolf, D. (2009). Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Engineering of stem cells*, 185-199.
- Mummery, C., Van de Stolpe, A., Roelen, A.J. B., Clevers, H. (2014). *Adult Stem Cells: Generation of Self-Organizing Mini-Organs in a Dish*, *Stem Cells Scientific Facts and Fiction*, 2nd Edition, 279-290. Academic Press.
- Nazim, S. M., Ahmad, S. (2023). Stem cells in Urology. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 73(2), S69-S74.
- Phinney, D. G. (2012). Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: implications for cell therapy. *Journal of cellular biochemistry*, 113(9), 2806-2812.
- Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A., Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature biotechnology*, 18(4), 399-404.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), 105-111.
- Rodeheffer, M. S., Birsoy, K., Friedman, J. M. (2008). Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell*, 135(2), 240-249.
- Ronaldson-Bouchard, K., Ma, S. P., Yeager, K., Chen, T., Song, L., Sirabella, D., ... Vunjak-Novakovic, G. (2018). Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells. *Nature*, 556(7700), 239-243.
- Sağsöz, H., Ketani, M. A. (2008). Kök hücreler. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (2), 29-33.
- Sekhar, L., Bisht, N. (2006). Stem cell therapy. *Apollo Medicine*, 3(3), 271-276.
- Shenghui, H. E., Nakada, D., Morrison, S. J. (2009). Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annual Review of Cell and Developmental*, 25, 377-406.
- Shi, S., Gronthos, S., Chen, S., Reddi, A., Counter, C.M., Robey, P.G., Wang, C.Y. (2002) Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression. *Nat Biotechnol*, 20, 587-591

- Singh, V. K., Saini, A., Kalsan, M., Kumar, N., Chandra, R. (2016). Describing the stem cell potency: the various methods of functional assessment and in silico diagnostics. *Frontiers in cell and developmental biology*, 4, 134.
- Skottman, H., Mikkola, M., Lundin, K., Olsson, C., Strömberg, A. M., Tuuri, T., ... Lahesmaa, R. (2005). Gene expression signatures of seven individual human embryonic stem cell lines. *Stem cells*, 23(9), 1343-1356.
- Stenderup, K., Justesen, J., Clausen, C., Kassem, M. (2003) Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*, 33, 919–926.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *cell*, 131(5), 861-872.
- Takahashi, K., Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *cell*, 126(4), 663-676.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *science*, 282(5391), 1145-1147.
- Vansteenkiste, J. F., Cho, B. C., Vanakesa, T., De Pas, T., Zielinski, M., Kim, M. S., ... Altorki, N. (2016). Efficacy of the MAGE-A3 cancer immunotherapeutic as adjuvant therapy in patients with resected MAGE-A3-positive non-small-cell lung cancer (MAGRIT): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The lancet oncology*, 17(6), 822-835.
- Wagner, W., Horn, P., Castoldi, M., Diehlmann, A., Bork, S., Saffrich, R., Benes, V., Blake, J., Pfister, S., Eckstein, V., Ho, A.D. (2008) Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS ONE*, 3, e2213.
- Wankhade, U. D., Shen, M., Kolhe, R., Fulzele, S. (2016). Advances in adipose-derived stem cells isolation, characterization, and application in regenerative tissue engineering. *Stem cells international*, 2016.
- Yamanaka, S. (2012). Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell stem cell*, 10(6), 678-684.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., ... Thomson, J. A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *science*, 318(5858), 1917-1920.
- Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. *Stem cell research & therapy*, 10(1), 1-22.
- Zhang, Z. J., Chen, X. H., Chang, X. H., Ye, X., Li, Y., Cui, H. (2012). Human embryonic stem cells-a potential vaccine for ovarian cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(9), 4295-4300.

- Zhu, Y., Liu, T., Song, K., Fan, X., Ma, X., Cui, Z. (2008). Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, 26(6), 664-675.
- Zipori, D. (2009). *Biology of stem cells and the molecular basis of the stem state*. Humana Press, p 66.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., ... Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*, 13(12), 4279-4295.

## BÖLÜM 3

### DOĞAL KAYNAKLI SARS-COV-2 TEMEL PROTEAZ İNHİBİTÖRLERİ: COVID-19 TEDAVİSİNDE MOLEKÜLER YAKLAŞIMLAR

Dr. Öğr. Üyesi Tuğba GÜNBATAN<sup>1</sup>

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.10251346>

---

<sup>1</sup> Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı



## Giriş

Tarih boyunca Ebola, Zika, Nipah, SARS-CoV-16, Orta Doğu solunum sendromu (MERS)-CoV gibi koronavirüslerin (CoV) neden olduğu salgınlar da dahil olmak üzere çok sayıda ölümcül virüs salgını insanlığı etkilemiştir. Bununla birlikte, İspanyol gribi salgınından bu yana en önemli halk sağlığı acil durumu, yakın zamanda yaşanan SARS-CoV-2 (Covid-19) salgınıdır (1-5). SARS-CoV-2'nin 2019 yılı Aralık ayında Çin'in Wuhan kentinde tespit edilmesinden bu yana altı milyondan fazla insan ölmüş ve 600 milyondan fazla insan Covid-19'a yakalanmıştır (6). Dünya çapında Covid-19'a karşı başarılı aşılama programları mevcut olsa da Covid-19'u tedavi edecek antivirallerin geliştirilmesinde şu ana kadar çok az yol kat edilebilmiştir. Geliştirilen aşılar direnç, artan bulaşma ve kazanılmış bağışıklıktan kaçma potansiyeli ile endişe verici SARS-CoV-2 varyantlarının ortaya çıkma riski, SARS-CoV-2 enfeksiyonunun tedavisi için yeni antiviral ilaçların geliştirilmesinin önemini gözler önüne sermektedir (7, 8).

Coronavirüs, Nidovirales takımını, Coronaviridae familyası ve Coronavirinae alt familyasındandır. Coronavirinae alt familyası tıbbi ve veteriner hekimlik açısından öneme sahip virüsleri barındırır ve dört cins altında ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - ve  $\delta$ -CoV) sınıflandırılır. Büyük bir genomu çevreleyen sarmal bir protein kabuğuna sahip, kapsüllü, pozitif sarmallı bir RNA virüsüdür. Coronavirüsün transkripsiyonu, genomun her iki tarafını kodlayan çoklu subgenomik mRNA üretimi ile gerçekleşir (9).

SARS-CoV-2, 29.9 kb'lik tek sarmallı, segmentlere ayrılmamış RNA genomunda 3' poli-A kuyruk ve 5' başlık taşır. Poliprotein pp1a ve pp1ab, 5' genomunun 20 kb'lik kısmı tarafından kodlanan iki büyük açık okuma çerçevesi (ORF 1a/b) tarafından üretilir. Viral poliprotein pp1a ve pp1b, viral RNA sitoplazmaya salındığında oluşturulur (7, 8, 10). Bu viral poliproteinler daha sonra ana proteaz ( $M^{pro}$ ) olarak da bilinen Papain benzeri proteaz ( $PL^{pro}$ ) ve 3-kimotripsin benzeri proteaz ( $3CL^{pro}$ ) tarafından kesilir. Viral proteinler salındıktan sonra bir araya gelerek viral RNA'nın replikasyonunu katalize eden viral polimeraz RdRp kompleksini oluştururlar. Ekzositoz ile yeni nesil viryonlar enfekte olmuş hücreleri terk edip sonraki enfeksiyona hazır hale gelir (11-13). Yeni SARS-CoV-2 ilaç geliştirilmesinde de viral girişi hedef alan ACE2, RNA bağımlı RNA polimeraz ve  $M^{pro}$ 'lar odak noktası olmuştur.  $M^{pro}$  spesifitesi nedeniyle anti-Covid-19 ilaçlarının geliştirilmesine yönelik bu kritik hedefler arasında en önemli hedef olarak ortaya çıkmaktadır. İnsanlarda  $M^{pro}$ 'nun herhangi bir homoloğu tanımlanmadığından, insan proteazları üzerinde son derece zayıf inhibitör etkileri olan, etkili ve spesifik  $M^{pro}$  inhibitörlerinin geliştirilmesi, böylece  $M^{pro}$  inhibitörlerinin neden olduğu yan etkilerin azaltılması da mümkündür (14). Örneğin bir peptidomimetik  $M^{pro}$  inhibitörü

olan Nirmatrelvir, Covid-19'un tedavisi için Paxlovid ticari adı altında piyasaya sunulmuş ve 22 Aralık 2021'de SARSCoV-2 enfeksiyonu doğrulanmış yüksek riskli hastalar için FDA tarafından onaylanmıştır (15).

Son zamanlarda SARS-CoV-2'ye karşı M<sup>pro</sup> inhibitörleri bulmak veya geliştirmek için daha önce kullanılan antivirallerin araştırılması, yüksek verimli tarama (high-throughput screening) ile birleştirilmiş sanal tarama ve yapıya dayalı ilaç tasarımı gibi çoklu ilaç keşif stratejileri kullanılmaktadır. Ancak bitkiler yeni anti-CoV ajanların geliştirilmesi için en önemli kaynaklardan biri olmayı sürdürmektedir. Bu nedenle birçok araştırma grubu bitkilerde meydana gelen sekonder metabolitlerinden hareketle yeni antiCoV ajanları bulmaya çabalamaktadır. Bir dizi sentetik ve doğal bileşiğin, SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup>'yu kuvvetli derecede inhibe edebildiği bulunmuştur ve bu da yeni geniş spektrumlu anti-CoV ajanlarının geliştirilmesi için büyük potansiyel göstermektedir (14). Bu derlemede de SARS-CoV-2 ana proteazını hedef alan doğal kaynaklı bileşikler incelenmiştir.

### Fenolik bileşikler

*Rosmarinus officinalis* L.'den elde edilen rosmarinik asit M<sup>pro</sup>'yu 6.84 µM IC<sub>50</sub> değeriyle inhibe etmiştir. *Salvia miltiorrhiza* Bunge köklerinden izole edilen salvianolik asit A ise M<sup>pro</sup>'yu analogu rosmarinik asitten daha az inhibe etmektedir (IC<sub>50</sub> değeri 28.38 µM); bu durum salvianolik asitteki ekstra 3,4-dihidroksi fenil akrilat biriminin, M<sup>pro</sup> aktif bölgesine bağlanmada sterik engelleme neden olabileceğini düşündürmüştür (16).

Su ve arkadaşları flavonoid yapısındaki mirisetinin SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup>'a kovalent bağlanarak inhibe ettiğini tespit etmiş ve yapı aktivite araştırmaları ile güçlü antiviral özelliklere sahip mirisetin türevlerini (dihidromirisetin, bileşik 3, 7, 9, 10) belirlemiştir. Çalışma, pirogallol içeren doğal bileşiklerin M<sup>pro</sup>'ya karşı peptit olmayan kovalent inhibitörlerin tasarımı için bir şablon olabileceğini göstererek, hedeflenen kovalent ligandların tasarımında pirogallolün potansiyelini ortaya çıkarmıştır (17). Benzer şekilde bir başka araştırma grubu da mirisetinin M<sup>pro</sup>'yu 10 µM konsantrasyonda 0.645 µM IC<sub>50</sub> değeriyle inhibe ettiğini belirlemiştir (16). 5-deoksimirisetin olarak da bilinen robinetin ise M<sup>pro</sup>'yu 0.96 µM IC<sub>50</sub> değeriyle inhibe etmiştir. Aynı araştırmada incelenen bir diğer bileşik olan epigallokateşin gallat (EGCG) da SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> aktivitesini tamamen engellemeyi başarmıştır (IC<sub>50</sub> değeri 0.228 µM). Moleküler docking çalışmalarında bu bileşiğin Cys145'e kovalent bağlandığı anlaşılmıştır. Moleküldeki benzentriol kısmı, S1 alt bölgesindeki Gly143, Cys145'in omurga atomları ve Ser144'ün yan zinciri ile de çoklu hidrojen bağı etkileşimleri kurmaktadır. İkinci benzentriol kısmı ise Glu166 ve Phe140 arasındaki cebi işgal ederek bu bölgelerle hidrojen bağı ile etkileşir (16).

*Scutellaria baicalensis* Georgi, üst solunum yolu enfeksiyonlarında kullanılan geleneksel bir Çin ilacıdır ve SARS-CoV-2 ( $EC_{50}=0.74\mu\text{g/mL}$ ) dahil olmak üzere geniş spektrumlu antiviral aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Son zamanlarda *S. baicalensis*'teki baikalein ve skutellarein gibi flavonoidlerin, SARS-CoV-2  $M^{pro}$  inhibitörleri olduğu rapor edilmiştir. Örneğin Su ve ark., baikaleinin SARS-CoV-2 karşıtı aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiş ve X-ışını protein kristalografisi çalışmalarında baikaleinin aktif bölgedeki katalitik dyadın önünde bir kalkan görevi görerek substrat erişimini engellediği ve bu bakımdan bilinen diğer  $M^{pro}$  inhibitörlerinden önemli ölçüde farklı olduğunu gösterilmiştir (18). Wu ve ark. ise skutellareinin metillenmiş türevlerini sentezlemiş ve  $M^{pro}$  üzerindeki etkisini incelemiştir. Sentezlenen bileşikler arasından 4'-O-metilskutellarein'in,  $M^{pro}$ 'ya güçlü bir non-kovalent bağla bağlanarak inhibe edebileceği öngörülmüştür ( $IC_{50}=0.40\ \mu\text{M}$ ). Molekül üzerinde yapılan daha ileri SAR çalışmaları, A halkasındaki hidroksil gruplarının ve B halkasının hidrofobikliğinin, inhibitör aktivite açısından önemli olabileceğini göstermiştir (14, 19).

Lin ve ark., 1019 flavonoidi  $M^{pro}$ 'i inhibe edici aktivitesi bakımından değerlendirilmiş ve araştırmanın sonucunda dört bileşik [amentoflavon, 3,8'-biapigenin, pinosembrin 7-O-(3"-galloil-4",6"-(S)-heksahidroksidifenoil-  $\beta$ -D-glikoz (PGHG) ve jaseidin triasetat] 5-15  $\mu\text{M}$  aralığındaki  $IC_{50}$  değerleri ile ön plana çıkmıştır. Yapılan moleküler dinamik simülasyonlar, PGHG'nin bir galloil grubu yoluyla S1 bağlanma bölgesini tıkadığını ve  $M^{pro}$ 'da konformasyonel bir değişikliğe neden olduğunu öne sürmüştür. Hücre bazlı SARS-CoV-2 replikasyon testinde ise apigenin ve PGHG en güçlü inhibisyon göstermiştir (20).

*Toxicodendron succedaneum* (L.) Kuntze'dan izole edilen altı biflavonoid (amentoflavon, agatisflavon, robustaflavon, hinokiflavon, rusflavanon ve succedaneaflavanon)  $M^{pro}$ 'nun katalitik bölgesi ile etkileşim göstermiştir (-19.47 ile -27.04 kcal/mol). Moleküler dinamik simülasyon çalışmalarında SARS-CoV-2  $M^{pro}$  C- $\alpha$  atomları için ortalama karekök sapma değerlerinin 2.5 Å olması, bu biflavonoidlerin SARS-CoV-2  $M^{pro}$  ile güçlü bir kompleks oluşturabileceğini düşündürmüştür. Ancak amentoflavon (-27.04 kcal/mol) ve agatisflavon (-25.87 kcal/mol) katalitik bölgelerle daha güçlü bir şekilde etkileşime girmektedir. Ayrıca ortalama karekök dalgalanma değerleri  $M^{pro}$  enzimi ile bu iki biflavonoid kompleksinin oldukça stabil olduğunu ve konformasyonel dalgalanmaların daha az olduğunu ortaya çıkarmıştır (21).

Hossain ve ark., moleküler docking araştırmalarında 11 bileşiğin (kateşin galat, kersetin 3-O-malonilglukozit, rutin, isokerstin, hiperozit, kersetin-3-D-ksilozit, kaktisin, narsissozit, luteolin-7-O-rutinozit, sinarozit, kosmosiin)  $M^{pro}$ 'ya -8.0 ile -8.9 kcal/mol arasında değişen bağlanma afinitesi gösterdiğini



tespit etmiş ve moleküler dinamik simülasyonu ile bu bileşiklerin ortalama karekök sapma, ortalama kare kök dalgalanması, eylemsizlik yarıçapı, çözücü ile erişilebilen yüzey alanını ve hidrojen bağlarının sayısını analiz etmiştir. Kateşin galat ve kersetin 3-O-malonilglukozitin sırasıyla 4.723 ve 4.717'lük  $pIC_{50}$  değerleri ile  $M^{pro}$ 'ya karşı inhibitör potansiyele sahip olduğu anlaşılmıştır.  $M^{pro}$ -kateşin galat kompleksi ve  $M^{pro}$ -kersetin 3-O-malonilglukozit kompleksinin yapısal davranışı, bağlanma mekanizması ve yapısal esnekliğini anlamak için 100 ns boyunca moleküler dinamik simülasyon yapılmıştır. Bu bileşiklerin  $C\alpha$  atomlarının ortalama karekök sapsmaları hesaplanmış ve  $M^{pro}$ 'nun 45 ns'den 67 ns'ye kadar küçük bir dalgalanma gösterdiği ancak sonrasında denge durumunda kaldığı gözlenmiştir.  $M^{pro}$ -kateşin gallat kompleksi ise 8-35 ns aralığında yüksek bir dalgalanma göstermiş, daha sonra stabil bir konuma gelmiştir.  $M^{pro}$ -kersetin 3-O-malonilglukozit kompleksi ilk başta stabilite göstermiş ancak 45 ns sonra birkaç dalgalanma göstermiştir. Ancak 92 ns'de sonra tekrar kararlılık göstermiştir. Hidrojen bağı analizi yalnızca  $M^{pro}$  ve  $M^{pro}$ -kateşin gallatın molekül içi hidrojen bağına sahip olduğunu ancak  $M^{pro}$ -kersetin 3-O-malonilglukozit kompleksinin bu iki molekülden daha yüksek sayıda hidrojen bağı yaptığını ve bu durumun güçlü stabilite sağladığını göstermiştir (22).

Moleküler dinamik simülasyon çalışmaları (1.50  $\mu s$ ) ile çayda [*Camellia sinensis* (L.) Kuntze] bulunan 65 molekülün  $M^{pro}$  ile etkileşimi araştırılmıştır. Oolonghomobisflavan A, teasinensin D ve teaflavin-3-O-gallat'ın en iyi afinite gösterdiği anlaşılmıştır. Oolonghomobisflavan A molekülünün azanavir, darunavir, ve lopinavire kıyasla  $M^{pro}$  ile çok sayıda hidrojen bağı yaptığı ve daha yüksek MM-PBSA bağlanma enerjisi gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar oolonghomobisflavan A'nın SARS-CoV-2  $M^{pro}$  enzimi için bir inhibitör görevi görecektir potansiyel bir biyoaktif molekül olduğunu göstermiştir (23). Ghosh ve ark. ise yine çayda bulunan gallokateşin-3-gallatın, Covid-19  $M^{pro}$ 'nun yapısındaki amino asitlerinden E166, F140, H163, S144, C145, G113 (H-bağı) ve M49, L141, M165, E166, R188'e (hidrofobik etkileşimler) ile etkileştiğini (-9,0 kcal/mol) rapor etmiştir (24).

*Euphorbia hirta* L.'da bulunan 298 adet sekonder metabolitin in silico SARS-CoV-2  $M^{pro}$  inhibe etme potansiyelleri araştırılmıştır. Bu bileşikler arasında kemferol, luteolin, kersetin, izokersitrin, hiperozit, rutin, mirisetin-3-O-ramnozid, epikateşin-3-gallat ve korilagin -7.5 ve -9.2 aralığında değişen bağlanma enerjileri ile ön plana çıkmıştır (25).

Adem ve ark., çeşitli in silico teknikler kullanarak 81 bitkisel sekonder metabolitin SARS-CoV-2  $M^{pro}$ 'ya karşı etkinliğini araştırmıştır. Bileşiklerin SARS-CoV-2  $M^{pro}$ 'ya karşı etkileşim afiniteleri, molekül içi (kantum mekanik), moleküller arası (moleküler docking) ve uzaysal (moleküler dinamik)

simülasyonlar yoluyla değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, nelfinavir (pozitif kontrol) ile karşılaştırıldığında çalışılan bileşikler arasında hesperidin, rutin, diosmin ve apiin'in SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup>'ya karşı en etkili ajanlar olduğunu göstermiştir (26).

*Anastatica hierochuntica* L., *Citrus reticulata* Blanco ve *Kickxia aegyptiaca* (L.) Nabelek'in hidrolize sulu metanol ekstratlarından beş flavonoid aglikon izole edilmiş (taksifolin, pektolinarigenin, tangeretin, gardenin B ve hispidulin) ve SARS-CoV-2'e karşı etkileri araştırılmıştır. Pektolinarigenin ve tangeretin, sırasıyla 12.4 ve 2.5 µg/mL IC<sub>50</sub> değerleri ile en yüksek inhibisyon göstermiştir. Docking skorları -6.61 ile -5.74 kcal/mol aralığında değiştiği (tangeretin > taksifolin > gardenin B > hispidulin > pektolinarigenin) görülmüştür. Ayrıca tangeretin 4.09 ve 4.19 Å'da Glu166 amino asidi ile 2 pi-H bağının oluşması yoluyla SARS-CoV-2'nin M<sup>pro</sup> cebi içinde stabilize edildiği gösterilmiştir (27).

*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.'dan izole edilen bileşiklerin SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> ile etkileşimi in silico olarak değerlendirilmiştir. Özellikle flavonoit yapısındaki astragalin, izoramnetin, izoramnetin 3-O-glukozit, ve kersetin 5,4'-dimetil eter -7,0 kcal/mol'den düşük bağlanma enerjileri ile iyi bağlanma afinitesi göstermiştir. Bu bileşikler arasında astragalin, M<sup>pro</sup>'ya karşı en yüksek afinite (-8.7 kcal/mol) göstermiş ve düşük toksisite profilini sergilemiştir (28).

Rudrapal ve ark., polifenolik fitokimyasal bileşiklerin SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup>'a karşı aktivitesini moleküler docking ve moleküler dinamik çalışmalarla değerlendirmiştir. Sırasıyla taksifolin (docking skoru -9.449, bağlanma enerjisi -20.83 kcal/mol), eriodiktyol (docking skoru: -9.027 ve bağlanma enerjisi -21.66 kcal/mol), lökopolargonidin (docking skoru -7.252, bağlanma enerjisi -34.37 kcal/mol), morin (docking skoru -6.897 ve bağlanma enerjisi -33.25 kcal/mol) ve mirisetinin M<sup>pro</sup>'ya karşı en yüksek bağlanma afinitesi sergilediği bulunmuştur. Ayrıca çalışmada taksifolin ve eriodiktyol'un Cys 145, Ser 144, Gly 143, Asn 142, Leu141, Glu 166, Met 165, His 164, Tyr 54, Pro 52 ve Met 49 ile; lökopolargonidin'in Lys 157, Glu 167, Asp 164, Leu 162, Gly 163, Glu 269, Tyr 268, Tyr 273 ve Thr 301 ile; morin'in Gly 266, Asn 267, Thr 301, TYR 273, TYR 264 ve TYR 268 ile hidrojen bağı yaptığı öngörülmüştür (29).

Ayurvedik ilaçların bileşiminde bulunan *Phyllanthus emblica* L., *Phyllanthus niruri* Linn. ve *Tinospora cordifolia* (Willd.) Miers ex Hook.f. & Thomson'un taşıdığı 96 bileşiğin Covid-19 M<sup>pro</sup> ile etkileşimi değerlendirilmiştir. Amritozit (-60.35 kcal/mol), apigenin-6-C-glukozil-7-O-glukozit (-50.50 kcal/mol), pektolinarin (-54.02 kcal/mol) ve astragalin (-50.50 kcal/mol) en iyi bağlanma afinitesi göstermiştir (30).

*Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook.'nın rizomundan izole edilen bir flavonoid olan ugonin J'nin, SARS CoV-2 M<sup>pro</sup> üzerinde güçlü bir inhibitör

etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir ( $IC_{50}=0.94 \mu M$ ). Ayrıca, bu bileşiğin anti SARS-CoV-2 aktivitesi ve anti-inflamatuvar aktivitesi de in vitro olarak kanıtlanmıştır, bu da ugonin J'nin Covid-19 ile savaşmak için önde gelen bir bileşik olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (31).

Xiong ve arkadaşları, *Ginkgo biloba* L. yapraklarının SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup>'ya karşı güçlü inhibitör aktivite gösterdiğini rapor etmiş ve beşi biflavon olmak üzere izole edilen 20 bileşiğin SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> inhibe edici aktivitesini değerlendirmiştir. Elde edilen bulgular dört ginkgolik asidin nispeten güçlü SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> inhibitör aktivite gösterdiğine ( $IC_{50}<5\mu M$ ) işaret etmiştir. Daha ileri kinetik analizler ve moleküler docking çalışmaları, sciadopitinin SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup>'yu  $2.96 \mu M$   $K_i$  değeriyle güçlü bir şekilde inhibe edebildiğini göstermiştir. Ginkgetin, izoginkgetin, amentoflavon ve bilobetin gibi diğer biflavonlar da SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup>'yu 2.33 ila  $11.19 \mu M$  arasında değişen  $IC_{50}$  değerleri ile doza bağlı olarak inhibe etmiştir (32).

Nguyen ve ark., siyah sarımsak ekstresinin M<sup>pro</sup>'yu  $137 \mu g/mL$   $IC_{50}$  değeri ile inhibe ettiğini belirlemiştir. Çalışmanın devamında ise siyah sarımsakta bulunan 49 polifenolik bileşiğin aktivitesi araştırılmış ve 15 polifenolün 9 ile  $197 \mu M$  aralığında değişen  $IC_{50}$  değerleri ile M<sup>pro</sup>'yu inhibe ettiği anlaşılmıştır (33).

## Terpenler

*Isodon rubescens* (Hemsl.) H. Hara'den izole edilen ve ent-kauran diterpenoid yapısındaki oridonin  $4.67 \mu M$   $IC_{50}$  değeri ile önemli M<sup>pro</sup> inhibitör aktivite sergilemiştir. Moleküler docking çalışmaları bileşiğin Cys145'i hedef alarak M<sup>pro</sup>'ya kovalent bağlandığını göstermiştir. Bu etkileşim Glu166 omurgası ve hidroksil grubu arasındaki hidrojen bağı etkileşimi ve Met49, Met165, His41 ve His163'ün yan zincirleri ile hidrofobik etkileşimlerin desteğiyle de stabilize edilmektedir (16).

*Xylocarpus moluccensis* (Lam.) M. Roem'den elde edilen doğal terpenoidlerin SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> inhibe edici aktivitesi incelenmiştir. Altmış yedi terpenoid arasından angolensik asit metil ester, molukensin V, taiksilomolin F, godavarin J ve ksilomeksikanolid A -13.502 ile -15.52 kcal/mol arasında değişen docking skoru ve etkileşim afiniteleri ile ön plana çıkmıştır. Moleküler dinamik çalışmalarda gözlemlenen ortalama karekök sapması ve ortalama kare kök dalgalanması da kabul edilebilir aralıkta olup ortalama değerleri sırasıyla  $2.5 \text{ \AA}$  ve  $1.5 \text{ \AA}$ 'dur; ki bu da çalışılan terpenoidlerin M<sup>pro</sup>'ya sıkı bir şekilde bağlandıklarının göstergesidir. MM-GBSA ile hesaplanan uygun bağlanma güçleri angolensik asit metil ester ve molukensin V'da gözlenmiştir, serbest bağlanma enerjileri ( $\Delta G_{bind}$ ) sırasıyla  $-39.084$  ve  $43.160$  kcal/mol (31).

Kumar Enmozhi ve ark. çalışmalarında *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees'dan izole edilen andrografolit'in SARS-CoV-2 proteazın bağlanma cebine -3.094357 KJ/mol'lük docking skoru ile yüksek afinite gösterdiğini tespit etmiştir. Ayrıca bileşiğin aktif bağlanma cebindeki tüm bağlanma konformasyonlarının hem hidrojen bağı hem de tuz köprüsü etkileşimini içerdiği anlaşılmıştır. Bileşik, Gly143, Cys145 ve Glu166 olmak üzere 3 bölgeye dört hidrojen bağıyla bağlanmıştır (34).

### **Diğer bileşikler**

Stilbenoid yapısındaki piseatannol, *Picea abies* (L.) H.Karst. köklerinde bulunan bir resveratrol metabolitidir. Ayrıca palmye tohumlarında da bulunmaktadır. Piseatannolün  $M^{pro}$ 'yu 2.031  $\mu M$ 'lik bir  $IC_{50}$  değeriyle inhibe ettiği belirlenmiştir ancak ana molekül olan resveratrol ise bu enzimi inhibe edememektedir. Moleküler docking çalışmalarının sonuçları resveratrolde eksik olan kateşol halkalarından birinin  $M^{pro}$ 'nun P1 cebi (Cys145) ile etkileşime girmesi nedeniyle piseatannoldeki bu kateşol ünitesinin inhibitör aktivite açısından çok önemli olduğunu ileri sürmektedir (16).

More-Adate ve ark. GS-MS analizi sonucunda *Bauhinia variegata* L. yapraklarının su ve metanol ekstresindeki 57 bileşiği tespit etmiştir. Moleküler docking çalışmalarında bu bileşiklerden üçünün (2,5 dimetil 1-H pirol, 2,3 difenil siklopropil metil fenil sülfoksit ve benzonitril m fenetil) SARS'a karşı en yüksek bağlanma afinitesine (-5.719 ile -5.580 kcal/mol arasında değişen bağlanma afiniteleri) sahip olduğu gösterilmiştir. Prime MM/GBSA çalışmaları  $M^{pro}$ 'ya en yüksek bağlanma serbest enerjisiyle bağlanan (-64.377 kcal/mol) bileşiğin 2,3 difenil siklopropil metil fenil sülfoksit olduğunu göstermiştir. Komplekslerin bağlanma serbest enerjisi His, Gln ve Glu bölgelerinden güçlü bir şekilde etkilenmiştir (35).

*Reynoutria japonica* Houtt. ve *R. sachalinensis* Nakai rizomlarından elde edilen 25 bileşiğin, SARS-CoV-2 ana proteazın bağlanma bölgesi ile etkileşimine bakılmıştır. Vanikozit A, vanikozit B, prosiyanidin C1, prosiyanidin B2 3,3'-di-O-gallat ve emodin katalitik Cys145 ve His41 bölgesiyle etkileştiği gözlemlenmiştir. Ayrıca Gly143, Glu166, Gln189, His163 ve Thr190 gibi alanlarla da hidrojen bağı yaptıkları belirlenmiştir. Bu bileşiklerin Gold docking skorlarının da (Goldscore.Fitness) 90'dan yüksek olduğu hesaplanmıştır. Daha sonra bunlardan 11'i (vanikozit A, vanikosit B, resveratrol, piseid, emodin, epikateşin, epikateşin gallat, epigallokateşin gallat, prosiyanidin B2, prosiyanidin C1, prosiyanidin B2 3,3'-di-O-gallat), bitkilerden hazırlanan ekstratlar ve fraksiyonların aktivitesi bir floresan peptid substratı kullanılarak in vitro olarak test edilmiştir. Test edilen fitokimyasallar arasında vanikosit A ve vanikosit B'in SARS-CoV-2  $M^{pro}$ 'u sırasıyla 23.10 ve 43.59  $\mu M$   $IC_{50}$  değerleri ile orta derecede inhibe ettiği ile anlaşılmıştır. Bununla birlikte

bütanol fraksiyonları da SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup>'u önemli derecede inhibe etmiştir (*R. sachalinensis* için IC<sub>50</sub> = 4.031 µg/mL; *R. japonica* için IC<sub>50</sub> = 7.877 µg/mL) (36).

Verma ve ark., moleküler docking ve moleküler dinamik simülasyonları kullanılarak *Withania* türlerinde SARS-CoV-2'ye karşı potansiyel etki gösterecek bileşiklerin tespitine çalışmıştır. Bu amaçla *Withania* türlerinden elde edilen yetmiş üç doğal bileşik taranmıştır. Steroid yapısındaki 27-hidroksiwitanolit F (-11.5 kcal/mol), witanolit A (-11,4 kcal/mol) ve witakoagulin H (-11,1 kcal/mol) bileşikleri en yüksek bağlanma enerjisini göstererek öne çıkmıştır. Ayrıca, 50 ns'lik moleküler dinamik simülasyon ile witakoagulin-H'nin aktif bölge ile güçlü bağlanma afinitesine ve hidrojen bağı etkileşimlerine sahip olduğu anlaşılmıştır (37).

Rajagopal ve ark., in silico çalışmalarla *Curcuma longa* L.'dan izole edilen bileşiklerin Covid-19 M<sup>pro</sup> ile etkileşimini incelenmiştir. Siklokurkumin (-6.77 kcal/mol) Covid-19 M<sup>pro</sup> ile önemli ölçüde aktif etkileşim göstermiştir. Docking araştırmalarının sonuçları siklokurkumin'in, Covid-19 M<sup>pro</sup>'nun T26, H41 amino asitleri ile iki hidrojen bağı yaptığını göstermiştir (38). Benzer şekilde kurkuminoidler üzerinde yapılan bir diğer araştırmada da kurkuminoid ve tetrahidroksikurkumin'in M<sup>pro</sup>'ya minimum bağlanma afinitesi (sırasıyla -9.08 ve -8.07 kcal/mol) gösterdiği ve hidrojen bağı (T25, G166, T190) yaptığı gösterilmiştir (39).

Yine yapılan araştırmalarda paşimik asitin SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup>'yu 18.607 µmol/L IC<sub>50</sub> değeri ile inhibe ettiği belirlenmiştir (40). Saponin ve tanenlerin SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> ile etkileşimleri in silico olarak araştırılmış ve elajik asit, arjunik asit, teasapogenol ve öskafik asit -8.0 ile -8.4 kcal/mol docking skorları ile öne çıkmıştır (41). *Justicia adhatoda* L.'dan izole edilen alkaloid yapısındaki anisotin M<sup>pro</sup>'ya iyi bağlanma afinitesi (-7.9 kcal/mol) göstermiştir (42). *Sesamum indicum* L.'dan izole edilen lignan yapısındaki sesamin, sesaminol ve sesamolinin sırasıyla -8.2, -7.8 ve -7.7 kcal/mol'lük bağlanma enerjisi ile Covid-19 M<sup>pro</sup>'ya bağlandığı gösterilmiştir. Bu bileşikler, Covid-19 M<sup>pro</sup>'daki T26, H41, G143, H163, M165 amino asitleri ile kovalent bağ oluşturduğu öngörülmüştür (43). Aynı araştırmada *Ferula asafoetida* H.Karst.'dan izole edilen farnesiferol B'nin de M<sup>pro</sup>'daki bazı amino asitlerle [hidrojen bağı (T26, D187) ve hidrofobik etkileşimler (T25, H41, T54, N142, C145, M165, Q189)] etkileşim gösterdiği (-7.2 kcal/mol) tespit edilmiştir (43).

## Sonuç

Covid-19 salgını dünya çapında insan sağlığına ve can güvenliğine yönelik ciddi bir tehdit oluşturmuştur. Başarılı aşılama programları mevcut olsa da geliştirilen aşılarla direnç, artan bulaşma ve kazanılmış bağışıklıktan kaçma

potansiyeli ile endişe verici SARS-CoV-2 varyantlarının ortaya çıkma riski, SARS-CoV-2 enfeksiyonunun tedavisi için yeni antiviral ilaçların geliştirilmesinin önemini gözler önüne sermektedir. SARSCoV-2 de dahil olmak üzere CoV'lerle savaşmak için onaylanmış tüm hedefler arasında M<sup>pro</sup>'nun 3 boyutlu yapısı, CoV replikasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Bilinen hiçbir insan proteazı benzer bir bölme özgülüğüne sahip değildir, bu da M<sup>pro</sup>'yu klinik olarak etkili anti-SARS-CoV-2 ajanları geliştirmek için ideal bir hedef haline getirmektedir. Burada da çeşitli bitkisel kökenli SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> inhibitörleri kısaca derlenmeye çalışılmıştır. Burada sunulan bilgiler, araştırmacılara yeni anti-SARS-CoV-2 ajanları olarak daha etkili M<sup>pro</sup> inhibitörlerinin tasarlanması ve geliştirilmesi için temel bir referans sunabilecektir.

**KAYNAKLAR**

1. Lewnard, J.A., *Ebola virus disease: 11323 deaths later, how far have we come?* Lancet, 2018. **392**: p. 189-190.
2. Weaver, S.C., et al., *Zika virus: history, emergence, biology, and prospects for control.* Antiviral Res, 2016. **130**: p. 69-80.
3. Kulkarni, D.D., et al., *Nipah virus infection: current scenario.* Indian J Virol, 2013. **24**: p. 398-408.
4. Anderson, R.M., et al., *Epidemiology, transmission dynamics and control of SARS: the 2002–2003 epidemic.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2004. **359**: p. 1091-1105.
5. Oboho, I.K., et al., *2014 MERS-CoV outbreak in Jeddah—a link to health care facilities.* N Engl J Med, 2015. **372**: p. 846-854.
6. Zhou, P., et al., *Addendum: A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin.* Nature, 2020. **588**: p. E6.
7. Wang, Z., et al., *mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants.* Nature, 2021. **592**: p. 616-622
8. Constantinou Kurt Wibmer, et al., *SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma.* Nat Med, 2021. **27**: p. 622-625.
9. Sabbah, D.A., et al., *An Updated Review on SARS-CoV-2 Main Proteinase (MPro): Protein Structure and Small-Molecule Inhibitors.* Curr Top Med Chem, 2021. **21**(6): p. 442-460.
10. Hassan, A.O., et al., *A SARS-CoV-2 infection model in mice demonstrates protection by neutralizing antibodies.* Cell, 2020. **182**: p. 744–753.
11. Báez-Santos, Y.M., S.E.S. John, and A.D. Mesecar, *The SARS-coronavirus papain-like protease: structure, function and inhibition by designed antiviral compounds.* Antiviral Res, 2015. **115**: p. 21–38.
12. Grum-Tokars, V., et al., *Evaluating the 3Cl-like protease activity of SARS-Coronavirus: recommendations for standardized assays for drug discovery.* Virus Res, 2008. **133**: p. 63-73.
13. Zumla, A., et al., *Coronaviruses – drug discovery and therapeutic options.* Nat Rev Drug Discov, 2016. **15**: p. 327-347.
14. Hu, Q., et al., *The SARS-CoV-2 main protease (Mpro): Structure, function, and emerging therapies for COVID-19.* MedComm, 2022. **3**(3): p. e151.

15. FDA. *Frequently Asked Questions on the Emergency Use Authorization for Paxlovid for Treatment of COVID-19*. 2023 18.11.2023]; Available from: [www.fda.gov/media/155052](http://www.fda.gov/media/155052).
16. Krüger, N., et al., *Discovery of Polyphenolic Natural Products as SARS-CoV-2 Mpro Inhibitors for COVID-19*. *Pharmaceuticals* 2023. **16**(2): p. 190.
17. Su, H., et al., *Identification of pyrogallol as a warhead in design of covalent inhibitors for the SARS-CoV-2 3CL protease*. *Nat Commun*, 2021. **12**: p. 3623.
18. Su, H.-x., et al., *Anti-SARS-CoV-2 activities in vitro of Shuanghuanglian preparations and bioactive ingredients*. *Acta Pharmacol Sin*, 2020. **41**: p. 1167-1177.
19. Wu, Q., et al., *Discovery of 4'-O-methylscutellarein as a potent SARS-CoV-2 main protease inhibitor*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2022. **604**: p. 76-82.
20. Lin, L., et al., *Plant flavonoid inhibition of SARS-CoV-2 main protease and viral replication*. *iScience*, 2023. **26**(9): p. 107602.
21. Lokhande, K., et al., *Biflavonoids from *Rhus succedanea* as probable natural inhibitors against SARS-CoV-2: a molecular docking and molecular dynamics approach*. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 2022. **40**(10): p. 4376-4388.
22. Hossain, A., et al., *Identification of medicinal plant-based phytochemicals as a potential inhibitor for SARS-CoV-2 main protease (Mpro) using molecular docking and deep learning methods*. *Computers in biology and medicine*, 2023. **157**: p. 106785.
23. Bhardwaj, V.K., et al., *Identification of bioactive molecules from tea plant as SARS-CoV-2 main protease inhibitors*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2021. **39**(10): p. 3449-3458.
24. Ghosh, R., et al., *Evaluation of green tea polyphenols as novel corona virus (SARS CoV-2) main protease (Mpro) inhibitors - an in silico docking and molecular dynamics simulation study*. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2021. **39**(12): p. 4362-4374.
25. Cayona, R. and E. Creencia, *Phytochemicals of *Euphorbia hirta* L. and Their Inhibitory Potential Against SARS-CoV-2 Main Protease*. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2022. **8**: p. 801401.
26. Adem, Ş., et al., *Multidimensional in silico strategy for identification of natural polyphenols-based SARS-CoV-2 main*



- protease (Mpro) inhibitors to unveil a hope against COVID-19. Computers in biology and medicine, 2022. 145: p. 105452.*
27. Al-Karmalawy, A.A., et al., *Naturally Available Flavonoid Aglycones as Potential Antiviral Drug Candidates against SARS-CoV-2.* Molecules, 2021. **26**(21): p. 6559.
  28. Vicidomini, C., V. Roviello, and G.N. Roviello, *In Silico Investigation on the Interaction of Chiral Phytochemicals from Opuntia ficus-indica with SARS-CoV-2 Mpro.* Symmetry, 2021. **13**(6): p. 1041.
  29. Rudrapal, M., et al., *In silico screening of phytopolyphenolics for the identification of bioactive compounds as novel protease inhibitors effective against SARS-CoV-2.* Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 2022. **40**(20): p. 10437-10453.
  30. Murugesan, S., et al., *Targeting COVID-19 (SARS-CoV-2) main protease through active phytocompounds of ayurvedic medicinal plants - Emblica officinalis (Amla), Phyllanthus niruri Linn. (Bhumi Amla) and Tinospora cordifolia (Giloy) - A molecular docking and simulation study.* Computers in biology and medicine, 2021. **136**: p. 104683.
  31. Lokhande, K.B., et al., *Terpenoid phytocompounds from mangrove plant Xylocarpus moluccensis as possible inhibitors against SARS-CoV-2: In silico strategy.* Computational Biology and Chemistry, 2023. **106**: p. 107912.
  32. Xiong, Y., et al., *Discovery of naturally occurring inhibitors against SARS-CoV-2 3CLpro from Ginkgo biloba leaves via large-scale screening.* Fitoterapia, 2021. **152**: p. 104909.
  33. Nguyen, T.T.H., et al., *The Inhibitory Effects of Plant Derivate Polyphenols on the Main Protease of SARS Coronavirus 2 and Their Structure–Activity Relationship.* Molecules, 2021. **26**(7): p. 1924.
  34. Enmozhi, S.K., et al., *Andrographolide as a potential inhibitor of SARS-CoV-2 main protease: an in silico approach.* Journal of biomolecular structure & dynamics, 2021. **39**(9): p. 3092-3098.
  35. More-Adate, P., et al., *GC-MS profiling of Bauhinia variegata major phytoconstituents with computational identification of potential lead inhibitors of SARS-CoV-2 Mpro.* Computers in biology and medicine, 2022. **147**: p. 105679.
  36. Nawrot-Hadzik, I., et al., *Reynoutria Rhizomes as a Natural Source of SARS-CoV-2 Mpro Inhibitors-Molecular Docking and In Vitro Study.* Pharmaceuticals, 2021. **14**(8): p. 742.

37. Verma, S., C.N. Patel, and M. Chandra, *Identification of novel inhibitors of SARS-CoV-2 main protease (Mpro) from Withania sp. by molecular docking and molecular dynamics simulation*. Journal of computational chemistry, 2021. **42**(26): p. 1861–1872.
38. Rajagopal, K., et al., *Activity of phytochemical constituents of Curcuma longa (turmeric) and Andrographis paniculata against coronavirus (COVID-19): an in silico approach*. Future Journal of Pharmaceutical Sciences, 2020. **6**(1): p. 104.
39. Gupta, S., et al., *Identification of potential natural inhibitors of SARS-CoV2 main protease by molecular docking and simulation studies*. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 2021. **39**(12): p. 4334-4345.
40. Wu, Z., et al., *The inhibition of Mpro, the primary protease of COVID-19, by Poria cocos and its active compounds: a network pharmacology and molecular docking study*. RSC Advances, 2021. **11**(20): p. 11821-11843.
41. Falade, V.A., et al., *In silico investigation of saponins and tannins as potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease (Mpro)*. In Silico Pharmacology, 2021. **9**(1): p. 9.
42. Ghosh, R., et al., *Identification of alkaloids from Justicia adhatoda as potent SARS CoV-2 main protease inhibitors: An in silico perspective*. Journal of Molecular Structure, 2021. **1229**: p. 129489.
43. Natesh, J., et al., *Culinary spice bioactives as potential therapeutics against SARS-CoV-2: Computational investigation*. Computers in Biology and Medicine, 2021. **128**: p. 104102.



## **BÖLÜM 4**

### **BÜYÜK DOKU UYGUNLUK KOMPLEKSİ VE HLA GENLERİ**

Doç. Dr. Mustafa Türker DUMAN<sup>1</sup>

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.10251355>

---

<sup>1</sup> Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara



## Giriş

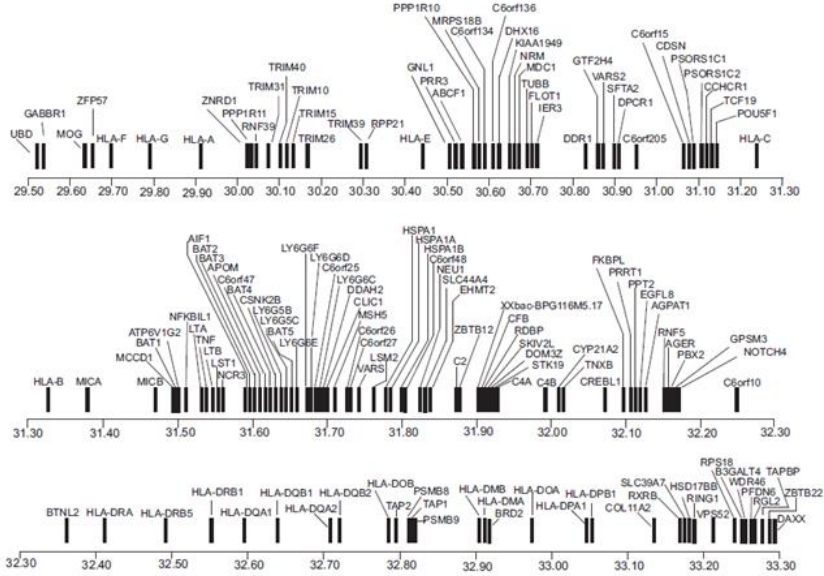
Omurgalılarda, doku uyumunun da aralarında olduğu bağışıklık sistemiyle ilgili genlerin oldukça yoğun olarak bulunduğu geniş bir kromozom bölgesi göze çarpmaktadır. Bu bölge; yapısı, kodlanan proteinlerin özellikleri, dokulardaki dağılımı, fonksiyonuna göre, sınıf I, II ve III olarak bölümlere ayrılmıştır. İnsanda, Human lökosit antijeni (HLA) olarak da bilinen, çekirdekli hücrelerin yüzeyinde eksprese olan hücre yüzey glikoproteinlerini (antijenleri) kodlayan genlerde bu bölgededir. HLA moleküllerinin temel görevi antijeni T lenfositlerine sunmak ve spesifik immün cevabı başlatmaktır. Viral enfeksiyonlara karşı savunmayı da düzenleyen HLA genlerini insanın diğer genlerinden ayıran önemli bir özellik, bunların bireyler, aileler ve popülasyonlar içindeki geniş çeşitliliğidir İmmunglobulin supergen ailesinin bir üyesi olan HLA genleri, açık ara genomdaki en polimorfik genlerdir. HLA antijenleri, doku ve organ nakillerinde oynadıkları rol nedeniyle uzun yıllardan beri detaylı olarak incelenmektedir.

## Büyük Doku Uygunluk Kompleksi, MHC

İnsanlarda Büyük Doku Uygunluk Kompleksi (The Major Histocompatibility Complex, MHC) ilk olarak genetik olarak uyumsuz fare suşlarında deri naklinin reddiyle tanımlanan genetik bölgedir. Kromozom 6p21'de lokalize olan 4 mega baz büyüklüğündeki bu bölgenin 200'ün üzerinde gen içerdiği bilinmektedir. Genomda en çok incelenen bölgelerden biri olan MHC bölgesi bir çok insanda tamamen dizilenmiştir<sup>1</sup>. Bu bölgedeki genlerin bir çoğu omurgalılarda adaptif immün cevaptan sorumludur, genlerin yaklaşık %20'si immünite ile ilişkilidir<sup>2</sup>. Human lökosit antijeni (HLA), bu genetik bölgenin çekirdekli hücrelerin yüzeyinde eksprese olan ve alloreaktiviteden sorumlu hücre yüzey glikoproteinlerini (antijenleri) kodlayan bölümdür. HLA moleküllerinin temel görevi, kendinden olan ve olmayanı ayırt ederek antijeni T lenfositlerine sunmak ve spesifik immün cevabı başlatmaktır<sup>3,4</sup>. HLA genlerinin doku ve organ transplantasyonunda çok önemli rol oynadığı bilinmektedir<sup>5</sup>. Transplantasyonda doku reddi organizmanın yabancı antijenlere karşı savunma mekanizmasının bir sonucudur, dolayısıyla nakledilen yabancı dokunun atılması immün sistemin yabancı antijene karşı normal bir yanıtıdır.

MHC bölgesi yapısı, kodlanan proteinlerin özellikleri, dokulardaki dağılımı, fonksiyonuna göre, sınıf I, sınıf II ve sınıf III olarak bölümlere ayrılmıştır<sup>6</sup>. HLA genleri Sınıf I ve sınıf II bölgelerinden kodlanmaktadır. Bu bölgeler için MHC yerine HLA da kullanılmaktadır. Sınıf III bölgesinde HLA genleri yoktur, C4a, C4b, C2 gibi kompleman sisteminin, TNF- $\alpha$  gibi sitokinlerin genleri bu bölgededir<sup>2</sup>(Şekil 1).

MHC insan genomunun gen sayısı açısından en yoğun bölgesidir, insan genomunun büyüklük olarak yaklaşık % 0.1'ine karşılık gelirken bu bölgedeki genler, tanımlanan genlerin % 0.6'sını oluşturur. Özellikle sınıf III genleri bazı bölgelerde, neredeyse hiç boşluk kalmayacak şekilde genomda sıralanmışlardır (Şekil 1)<sup>2</sup>.

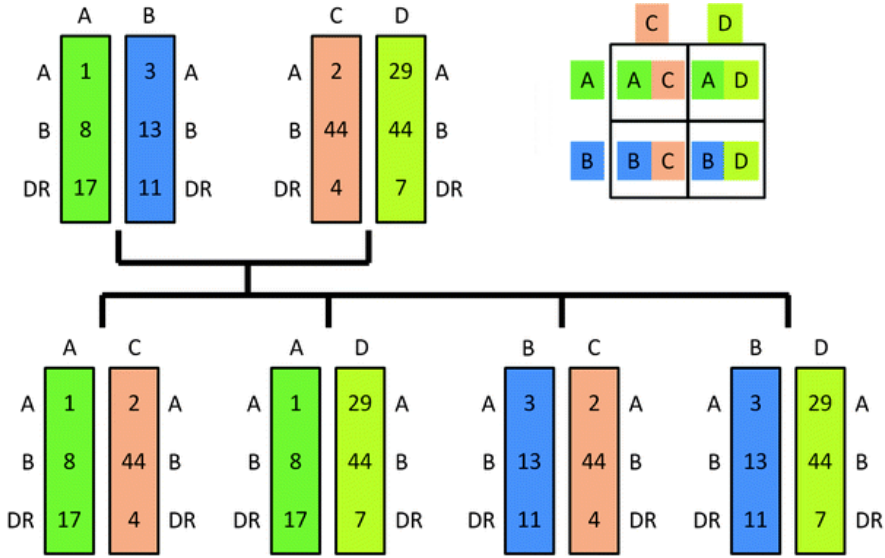


Şekil 1: MHC bölgesinden kodlanan genler<sup>2</sup>

HLA, immünglobulin süpergen ailesi (IgSF) diye bilinen bir molekül grubuna üyelerdir. Moleküllerin süpergen ailesi olarak sınıflandırılması antikorlar olarak da bilinen immünglobulinlerle taşıdıkları ortak yapısal özelliklere dayanmaktadır. Grup üyeleri arasında, hücre yüzey antijen reseptörleri, ko-reseptörler, immün sistemin ko-stimülatör molekülleri, antijen sunumunda yer alan moleküller, hücre adezyon molekülleri, bazı sitokin reseptörleri ve hücre-içi kas proteinleri yer almaktadır<sup>7</sup>. Immünglobulinler, T

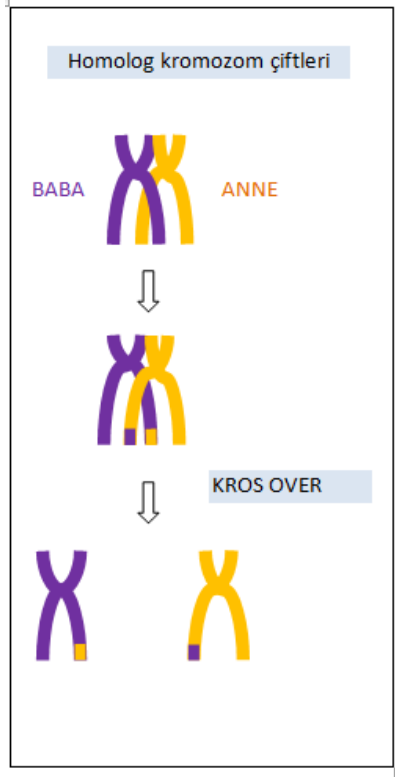
hücre reseptörleri, CD4, CD8 ve HLA moleküller bu ailede yer alan genler tarafından kodlanmaktadır.

HLA genleri Mendel yasalarına uygun olarak geçiş gösterirler ve eş-baskın (kodominant) olarak ifade edilirler (eksprese olurlar). Genlerinin birbirine fiziksel olarak yakın olmaları, beraber kalıtılmalarına (Bağlantı Dengesizliği, Linkage disequilibrium) ve bir HLA haplotipi oluşturmalarına neden olur (Şekil 2). MHC kalıtımında %1-3 oranında kros-over gözlenebilir (Şekil 3). Bağlantı Dengesizliği fiziksel olarak birbirlerine yakınlıklarından dolayı özellikle sınıf II genlerinde görülmektedir<sup>8</sup>.



**Şekil 2:** HLA genlerinin kalıtım modeli, babadan ve anneden gelen HLA haplotiplerinin çaprazlanmasıyla çocukta görülmesi beklenen haplotipler verilmiştir<sup>9</sup>.



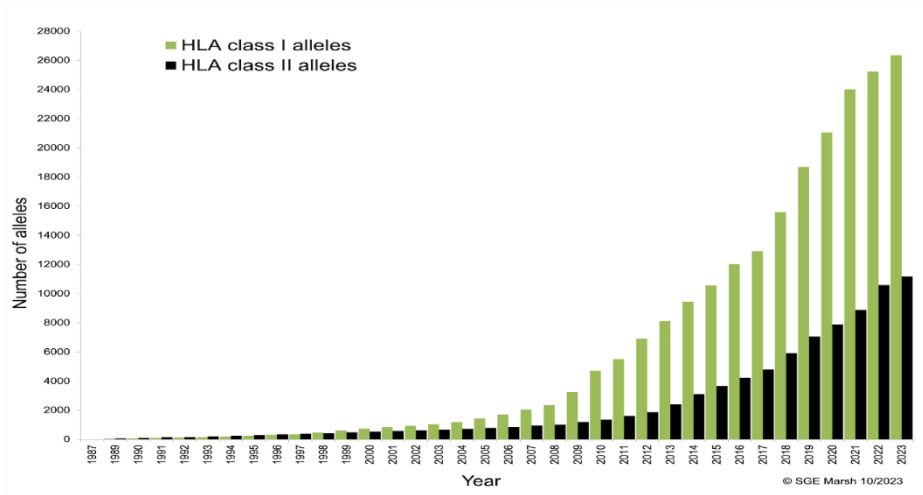


**Şekil 3:** Anne ve babadan gelen homolog kromozomlarda mayoz bölünme sırasında meydana gelen parça değişimi sonucunda oluşan genetik rekombinasyon (krossing over).

HLA sınıf I ve sınıf II genlerinin en dikkat çekici özellikleri açık ara genomdaki en polimorfik genler olmalarıdır (Şekil 4). MHC genlerinde görülen yüksek düzeyde polimorfizmler, mutasyonlar, gen duplikasyonları ve konversiyonlarıyla ortaya çıkan çeşitliliğin, insan göçleri sırasında yeni patojenlerle karşılaşıldığında güçlü bir seçim baskısına maruz kalmasıyla açıklanmaktadır<sup>2,10,11</sup>. Birçok farklı HLA Sınıf I ve Sınıf II moleküllerinden oluşan bir popülasyonun, enfeksiyonlara karşı daha dirençli olması, o popülasyonuna avantaj sağlamaktadır<sup>12,13</sup>. Tipik bir hücrede yaklaşık 100.000 MHC molekülü bulunmaktadır, tek bir hücrede belli bir peptidi taşıyan MHC molekülü sayısı 1-5.000 arasındadır<sup>8</sup>.

Transplantasyonda verici ve alıcının HLA antijenleri arasındaki uyumsuzluğun doku reddine yol açabilecek bir risk oluşturduğu uzun yıllardan

beri bilinmektedir<sup>5</sup>. HLA Tiplendirimi ile amaçlanan bu alellerin ve kodladıkları antijenlerin belirlenmesidir. HLA bölgesindeki polimorfizmleri belirlemek için çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Terasaki ve Mc Clelland tarafından bulunan 1964 serolojik yöntemler yaklaşık 50 yıldır kullanılmaktadır. Hüresel temelli bu yöntemlerin çeşitli teknik dezavantajları ve bu olağanüstü çeşitliliği karşılamada yetersiz kalmaları moleküler yöntemlerin ön plana çıkmasını sağlamıştır. Son 30 yılda rekombinant DNA teknolojisi, Sanger zincir sonlanma dizileme yöntemi, Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi moleküler genetik yöntemlerin kullanılmasıyla bu sıra dışı alelik çeşitlilik ortaya konulabilmiştir (Şekil 4)<sup>14</sup>. HLA daki genetik çeşitlilik, transplantasyon uyumunda, adli tıpta, antropolojik araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yazıda transplantasyondaki önemleri nedeniyle temel olarak sınıf I ve sınıf II bölgesindeki HLA genlerinden bahsedilecektir.



Şekil4: Tanımlanan sınıf I ve sınıf II alellerinin yıllara göre sayısı  
(<http://www.anthonynolan.com/HIG/index.html>)<sup>16</sup>

## MHC Sınıf I

MHC nin telomerik ucunda yer alan Sınıf I bölgesi *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C* olarak da tanınan klasik transplantasyon antijenlerini, klasik olmayan *HLA-E*, *HLA-F*, *HLA-G*, *MIC-A*, *MIC-B* antijenleri ve *HLA-H*, *J*, *K*, *L*, *X* olarak isimlendirilen çeşitli psödogenleri içerir. *HLA-A*, *HLA-B* ve *HLA-C* benzer özelliklere sahiptirler ve 6. kromozomda yan yana sıralanmışlardır. Bu

genlerin nöronlar hariç tüm çekirdekli hücrelerde eksprese oldukları bilinmektedir.

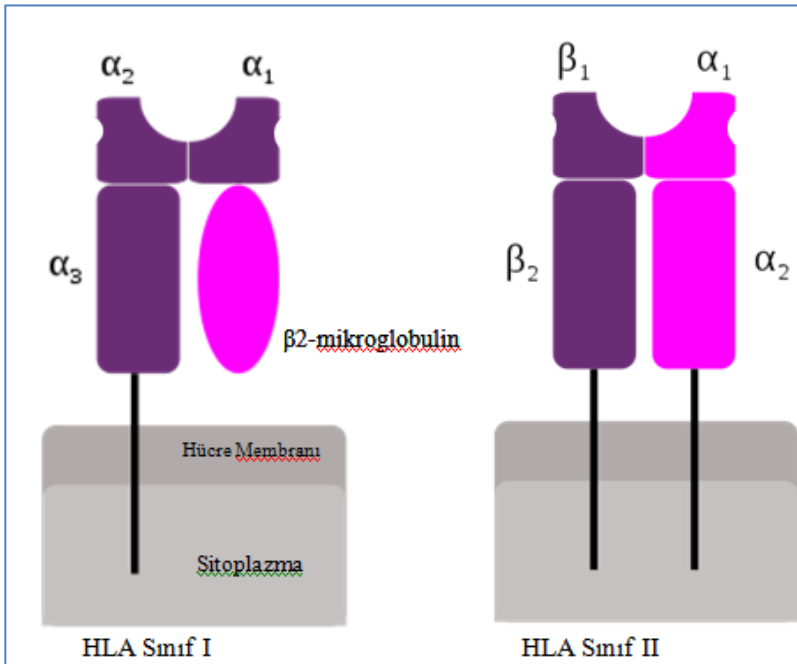
Sınıf I molekülleri, endoplazmik retikulum lümeninde türetilen peptidleri sunarak bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynamaktadır. Kendi sentezledikleri ve protezomları tarafından 8-9 amino asit (aa) uzunluğunda kesilen peptidlerini hücre yüzeylerinde sunarlar. Normalde T hücreleri kendi peptidlerini görmezden gelir çünkü bu peptidlere reaksiyon veren T hücre reseptörleri timusta negatif seleksiyona uğrayarak yok edilir. Viral bir enfeksiyonda, hücre viral DNA yı işlenerek oluşan viral proteinler hücre yüzeyinde MHC sınıf I tarafından sunulacaktır. Böyle bir durumda yabancı peptidlerin CD8+ T hücreleri tarafından algılanması, hücrenin ölümüne giden bir yol açacaktır. Sınıf I molekülleri yapısal olarak, bir ağır zincir ve bir hafif zincirden (beta-2-mikroglobulin,  $\beta 2m$ ) oluşan bir heterodimer bir proteindir. Beta 2 mikroglobulin molekülün üç boyutlu yapısının korunmasında rol almaktadır. Yaklaşık 45 kDa'lık ağır zincir zar içinde sabitlenmiştir, çözünmüş beta-2-mikroglobulin başka bir kromozom tarafından kodlanır ( 15q21-q22.2ç). Alfa zincirinin transmembran ve sitoplazmik kuyruğu  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  olarak adlandırılan üç domainden oluşmuştur. Hücrenin işlenmiş olduğu peptid,  $\alpha 1$  ve  $\alpha 2$  arasındaki peptid bağlama yarığında tutularak sunulur<sup>15</sup> (Şekil 5).

Ağır zinciri kodlayan gen 8 ekzon içerir. Ekzon 1 lider peptidi kodlarken, ekzon 2 ve 3,  $\alpha 1$  ve  $\alpha 2$  domainlerini, ekzon 4,  $\alpha 3$  domaini ekzon 5, transmembran bölgeyi ekzon 6 ve 7, sitoplazmik kuyruğu kodlar. Ekzon 2 ve 3 sınıf I moleküllerinde peptid bağlama özgünlüğü sorumludur. Bu bölgedeki HLA alellerindeki polimorfizmlerin büyük çoğunluğu 2. ve 3. ekzondaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Transplantasyonda doku uyumunu belirlemek için, moleküler yöntemlerle yapılan HLA sınıf I tiplendirmesinde, 2. ve 3. ekzonlar ana hedef olarak seçilmiştir. HLA-B bu güne kadar bildirilmiş, 9573 allel ve 5694 protein ile sınıf I bölgesindeki en polimorfik genidir.<sup>16</sup> Sınıf I bölgesindeki HLA genleri için bildirilen alel ve protein sayıları tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1:** MHC Sınıf I bölgesindeki genlerin alel sayıları ve kodladıkları farklı protein sayıları.

Gen	HLA Sınıf I					
	A	B	C	E	F	G
Alel	8012	9573	7995	350	91	157
Protein	4688	5694	4419	140	17	48

Sınıf I bölgesinden kodlanan MICA ve MICB, hücre yüzey glikoproteinleri olup, HLA sınıf I molekülleri ile az miktarda sekans homolojisi gösterebilirler,  $\beta_2m$  ile bağlantı kurmazlar. MICA endotel hücrelerde, barsak epitel hücrelerinde, deri kökenli fibroblastlarda, keratinositlerde ve monositlerde yapısal olarak ekspresyon edilir. MICA/B'ye karşı oluşan antikolar, potansiyel hedef hücreler üzerindeki ligandları aktive edebilirler ve NK hücre sitotoksitesinde rol oynarlar. MICA geni tanımlanan 68 alel ile oldukça polimorfiktir ve bu genin transplantasyondaki önemine ilişkin yayınlar bulunmaktadır<sup>17,18,19</sup>.



**Şekil 5:** HLA Sınıf I ve HLA Sınıf II antijenlerinin yapısı

## MHC Sınıf II

6. kromozomda sentromere yakın lokalize olan Sınıf II bölgesinde, *HLA-DPA1*, *HLA-DPB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DRA* *HLA-DRB1* olmak üzere 6 temel gen vardır. DRB bölgesinde *DRB1*' in yanı sıra *HLA-DRB3*, *HLA-DRB4*, *HLA-DRB5* genleri de bulunmaktadır. Bu genlere ilave olarak *HLA-DMA*, *HLA-DOB* genleri, psödogenler, antijen işlenmesinde rol alan *LMP1*, *LMP2*, *TAP1*, *TAP2* gibi genler yine sınıf II bölgesinden kodlanmaktadır.

MHC Sınıf II, alfa zinciri ( $\alpha 1$ - $\alpha 2$  domainler) ve beta zinciri ( $\beta 1$ - $\beta 2$  domainler) olarak adlandırılan iki transmembran proteinden oluşan simetrik bir moleküldür. Heterodimerdir molekülün Alfa zinciri *A* ve Beta zinciri *B* genlerinden kodlanır. Bu genler hücre dışı proteinlerden oluşan peptidleri sunarak immün sistemde önemli rol oynarlar. Peptidlerin tutulduğu yarık  $\alpha 1$  ve  $\beta 1$  arasındadır ve Sınıf I moleküllerinden farklı olarak sundukları peptidi, uçlara bağlamak yerine H bağları, van der Waals bağları ve elektrostatik etkileşimlerle ortadan bir kısıkaç gibi tutarlar. Bu sayede sınıf I deki 8,9 aa uzunluğundaki peptidler yerine daha uzun ve daha değişik tipte peptid bağlama esnekliğine kavuşurlar (Şekil 5). Sınıf II molekülleri, bakterilerden, patojenlerden, toksinlerden ya da endositik keseciklerde parçalanmış endositik patojenlerden köken almış endozomdan türetilen ve spesifik olmayan enzimlerle kesilen peptidleri sunarlar. Sınıf I den farklı olarak Sınıf II molekülleri dentritik hücreler, makrofajlar, B lenfositler gibi sadece antijen sunan hücrelerde (APC) eksprese olurlar. APC'ler MHC Sınıf II'ye bağlı peptid antijeni CD4+ T hücrelere sunarlar, bu hücreler APC yi aktive ederek, proliferasyonuna, oksidatif burst'a , sitokin salınımına yol açabilirler<sup>20</sup>.

HLA sınıf II beta zincir geni olan *HLA-DRB1* transplantasyonda, doku uyumu açısından önemlidir. Beta zinciri yaklaşık 26-28 kDa'luk bir protein kodlamaktadır. DR Beta zinciri peptide bağlanma özgülüğünü veren polimorfizimleri içerir. *DRB1* geni herkesde bulunurken, *DRB3*, *DB4*, *DRB5* için bu durum söz konusu değildir. *DRB1* 'in alelik varyantları *DRB3*, *DRB4* ve *DRB5* genlerinin biriyle bağlantılı olabilir, fakat aynı alellerin tek başına bulunmaları da mümkündür. *DRB1* geninin, *DRB3*, *DRB4* ve *DRB5* genlerinden yaklaşık 5 kat fazla eksprese olduğu bilinmektedir. Bu genler 6 ekzonludur, ekzon 1, lider peptidi ekzon 2 ve 3, iki hücre dışı domain bölgesini ekzon 4, transmembrane domaini ve ekzon 5 sitoplazmik kuyruğu kodlar. Sınıf II'de alel

farklılıklarının büyük kısmından, polipeptid zincirin birinci domaini kodlayan 2. ekzonlar sorumludur. Bu yüzden HLA sınıf II tiplendirmesi genellikle 2. ekzondaki farklılıklara odaklanmıştır. Bugüne kadar Sınıf II genlerinde, binlerce farklı alel bildirilmiştir. *HLA-DRB* geni 4530 alel ile sınıf II genleri içinde en polimorfik olandır. *DRB1* için bildirilmiş 3588 alel, 2315 farklı protein kodlamaktadır (Tablo 2)<sup>16</sup>.

**Tablo 2:**MHC sınıf II bölgesindeki genlerin alel ve kodladıkları protein sayıları.

Gen	HLA Sınıf II									
	<i>DR</i> <i>A</i>	<i>DR</i> <i>B</i>	<i>DQA</i> <i>I</i>	<i>DQB</i> <i>I</i>	<i>DPA</i> <i>I</i>	<i>DPB</i> <i>I</i>	<i>DM</i> <i>A</i>	<i>DM</i> <i>B</i>	<i>DO</i> <i>A</i>	<i>DO</i> <i>B</i>
Alel	65	453	688	2491	619	2393	58	82	92	63
Protein	14	298	337	1516	297	1399	9	9	14	16

### MHC Sınıf III

İnsanda Sınıf III bölgesi yaklaşık 700 kb'lık sınıf I ve sınıf II bölgesi arasında yer alan, 61 gen içeren insan genomunun gen açısından en yoğun bölgesidir. Bu bölge kodlanan proteinlerin çeşitliliği açısından sınıf I ve sınıf II den farklıdır. Sınıf III bölgesinde ısı şoku proteinleri ( Heat shock protein, HSP), tümör nekroz faktörü (TNF), kompleman faktörleri ( C4a, C4b, C2, Bf), 21 Hidroksilaz gibi proteinleri kodlayan genler yer almaktadır. Bu genler ve kodladıkları proteinler işlevsel ve yapısal olarak HLA moleküllerinden farklılık gösterebilirler immün yanıtın oluşum sürecindeki rolleri MHC' nin işlevsel bütünlüğünü düşündürmektedir<sup>21</sup>.

**KAYNAKLAR**

1. Horton R, Gibson R, Coggill P, Miretti M, Allcock RJ, Almeida J, et al. Variation analysis and gene annotation of eight MHC haplotypes: the MHC Haplotype .Project. *Immunogenetics* 2008;60:1–18.
2. Trowsdale J. The MHC, disease and selection. *J. Trowsdale / Immunology Letters* 137 2011; 1–8
3. Harari A, Cellerai C, Enders FB, Kostler J, Codarri L, Tapia G, et al. Skewed association of polyfunctional antigen-specific CD8 T cell populations with HLA-B genotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:16233–8.
4. McDevitt H. The discovery of linkage between the MHC and genetic control of the immune response. *Immunol Rev* 2002;185:78–85.
5. Klein J, Sato A: The HLA System— First of Two Parts. *N Engl J Med* 2000; 343(10):702-709, 2000
6. Petersdorf EW. Genetics of graft-versus-host disease: the major histocompatibility complex. *Blood Rev.* 2013; 27(1):1-12.
7. Barclay A. "Membrane proteins with immunoglobulin-like domains--a master superfamily of interaction molecules". *Semin Immunol* 2003;15 (4): 215–23.
8. Erten G, Deniz G: İmmünolojide gelişmeler V, Laboratuvardan kliniğe transplantasyon immünolojisi. Ekşioğlu Demiralp editor. *Transplantasyonda klasik ve klasik olmayan doku grupları. 1. Baskı. İstanbul:Medikal Yayıncılık; 2007. p.39-49*
9. Srinivas TR, Shoskes DA: *Kidney and Pancreas Transplantation A Practical Guide; The Histocompatibility Laboratory in Clinical Transplantation. Current Clinical Urology Series 10.1007/978-1-60761-642-9\_2. Springer Science and Business Media 2011*
10. Pieterney, S. B., and M. K. Oliver. The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity (Edinb)* 2006;96: 7–21.
11. Yeager, M., and A. L. Hughes. Evolution of the mammalian MHC: natural selection, recombination, and convergent evolution. *Immunol. Rev.* 1999;167: 45–58.
12. Moore, C. B., M. John, I. R. James, F. T. Christiansen, C. S. Witt, and S. A. Mallal.. Evidence of HIV-1 adaptation to HLA-restricted immune responses at a population level. *Science* 2002;296: 1439–1443.

13. Wills, C., and D. R. Green. A genetic herd-immunity model for the maintenance of MHC polymorphism. *Immunol. Rev.* 1995;143: 263–292.
14. Erlich H. HLA DNA typing: past, present, and future. *Tissue Antigens.* 2012;80(1):1-11.
15. Bjorkman PJ and Parham P: Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem* 1990;59:253-288.
16. Robinson J, Barker DJ, Georgiou X, Cooper MA, Flicek P, Marsh SGE IPD-IMGT/HLA Database Nucleic Acids Research (2020) 48 (D1): D948-D955
17. Hankey KG, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Klassen DK, Philosophie B, Bartlett ST, Groh V, Spies T, Mann DL: MIC expression in renal and pancreatic allografts. *Transplantation* 2002; 73:304-306.
18. Mizutani K, Terasaki P, Rosen A, Esquenazi V, Miller J, Shih RN, Pei R, Ozawa M, Lee J: Serial ten-year follow-up of HLA and MICA antibody production prior to kidney graft failure. *Am J Transplant* 2005; 5:2265-2272.
19. Zou Y, Stastny P, Susal C, Dohler B, Opelz G: Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *N Engl J Med* 2007;357:1293-1300.
20. Mangalam AK, Taneja V, David CS. HLA class II molecules influence susceptibility versus protection in inflammatory diseases by determining the cytokine profile. *J Immunol.* 2013;190(2):513-8
21. Xie T, Rowen L, Aguado B, Ahearn ME, Madan A, Qin S, Campbell RD, Hood L: Analysis of the gene-dense major histocompatibility complex class III region and its comparison to mouse. *Genome Res* 2003; 13(12):2621-2636





## BÖLÜM 5

### KANSER HEDEFLİ TEDAVİLERİNDE ANTİKOR-İLAÇ KONJUGATLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE KULLANIMI

Ecz. Rümeyşa DOĞAN<sup>1</sup>,  
Doç. Dr. Arzu ATALAY<sup>2,\*</sup>

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.10251372>

---

<sup>1</sup> Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup> Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, Türkiye ORCID: 0000-0003-1309-5291, [aatalay@ankara.edu.tr](mailto:aatalay@ankara.edu.tr)

\*Sorumlu Yazar



### **Kısaltmalar:**

**ADC:** Antikor-ilaç konjugatı (Antibody-drug conjugate)

**ADCC:** Antikor bağımlı hücre aracılı sitotoksisite (Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity)

**CDC:** Kompleman bağımlı sitotoksisite (Complement-dependent cytotoxicity)

**DAR:** İlaç-antikor oranı (Drug-Antibody Ratio)

**IgG:** Immünglobulin G

**mAb:** Monoklonal antikor (Monoclonal antibody)

**mTNBC:** Metastatik üçlü negatif meme kanseri (Metastatic triple negative breast cancer)

**NSCLC:** Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (Non small cell lung carcinoma)

**T-DM1:** Trastuzumab emtasine

Kanser, hücre bölünmesinin normal kurallarının dışına çıkarak kontrolsüz büyüme ve çoğalma gösteren hücreler ile karakterize, genetik ve çevresel koşulların etkisi altında olan çok faktörlü bir hastalıktır. Kanser patofizyolojisinin karmaşıklığı uygun ve etkin tedavi seçenekleri geliştirilmesini zorlaştırmaktadır. 2020 yılında dünyada yaklaşık olarak 10 milyon insan kanser sebebiyle ölmüştür (1). Bu da kanseri dünya çapında ikinci önde gelen ölüm sebebi olarak kayıtlara geçirmiştir (2).

Kanser tedavilerinde kullanılan sitotoksik ajanların sağlıklı hücreler üzerindeki etkileri, özellikle kanser hücrelerini hedefleyen özel moleküllerin geliştirilmesi, hedefli ilaç dağıtım sistemlerinin kullanılması ile önemli ölçüde azaltılabilir (3). Kanser hücrelerine ulaşan sitotoksik bir ajanın konsantrasyonu, normal vücut hücrelerine ulaşana kıyasla arttırılabilirse kanser hücrelerinin seçici olarak öldürülmesi ve böylelikle daha az yan etki ile etkin bir tedavi gerçekleştirilebilmesi sağlanabilir. Bu amaç doğrultusunda geliştirilmiş olan

birçok “hedefe yönelik terapi” yaklaşımı mevcuttur. Bu terapiler, kanser hücrelerinin çoğalmasa için önemli olan moleküler hedeflere, yolaklara ve normal hücrelerden farklı olarak kanser hücrelerinde ifade edilen spesifik moleküllere müdahale etmeye çalışır. Bu hedefler tercihen tümör hücrelerinin yüzeyinde veya hücre içinde ifade edilir. Böylelikle hedefli terapi, tümör hücrelerine seçicilikle bağlanan sitotoksik ajanlar üretme potansiyeli sunar, konakçaya daha düşük toksisite ile birleşerek daha büyük bir terapötik indeks kazandırır (4). Bu doğrultuda geliştirilmiş terapilerden biri de antikor-ilaç konjugatlarıdır.

Antikor-ilaç konjugatları (ADCs), bir bağlayıcı ile konjuge edilmiş monoklonal antikorun sitotoksik bir reaktif/yük ile birleştirilmesinden meydana gelmektedir (5). Antikor tabanlı hedefli bir tedavi şekli olan antikor-ilaç konjugatları, antikanser ilaçların minimum etkili dozunu (MED) azaltarak ve/veya maksimum tolere edilen dozu (MTD) arttırarak dar terapötik pencerelerini genişletme ve sınırlı klinik kullanımlarını değiştirme amacıyla antikorları kullanır. ADC tasarımında kullanılan kanser hücresine spesifik antikorlarla ilacın hedefleme kabiliyeti arttırılmaya çalışılır (4). Böylelikle sitotoksik ilaçların sağlıklı hücrelere verdiği zarar en aza indirilip daha etkin tedavi geliştirilmeye çalışılır.

## ANTİKOR-İLAÇ KONJUGATLARININ TEMEL ÖZELLİKLERİ

Antikor-ilaç konjugatları, **antikor**, **sitotoksik yük** (payload) ve **bağlayıcı** olmak üzere üç ana birimden oluşmaktadır. ADC’lerin ortaya atıldığı ilk tarihten itibaren bu tasarım sabit kalmış, bileşenlerin içeriği değişiklik göstermiştir. Değişen bileşenler son ürünün farmakolojik ve klinik özelliklerini değiştirmektedir. İdeal ADC arayışı da bu bileşenlerdeki değişiklikler ve geliştirmeler sağlanarak gerçekleştirilmektedir. Teorik olarak ideal bir ADC, tümörle ilişkili bir antijene spesifik ve uzun yarı ömre sahip bir monoklonal antikor, kan dolaşımında stabil olan ancak hedef bölgede kolayca bölünebilen, uygun konjugasyona izin veren bir bağlayıcı ve hücreye internalize olduktan sonra yükün konjugattan ayrımını gerçekleştirip hedef hücre ölümünü indükleyen yüksek toksik bir yükün kombinasyonuna dayanır (6).

Antikor-ilaç konjugatları tasarımında yapıdaki her bir bileşenin tasarımı ve seçimi önem teşkil etmektedir. Hedef antijen ve özgül antikor, sitotoksik

yük, bağlayıcı, konjugasyon kimyası ve ilaç-antikor oranı (DAR) gibi parametreler karmaşık geliştirme süreçlerine sahip olan ADC'lerin optimizasyonunda rol oynayan kritik faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır.

### ***Antikor***

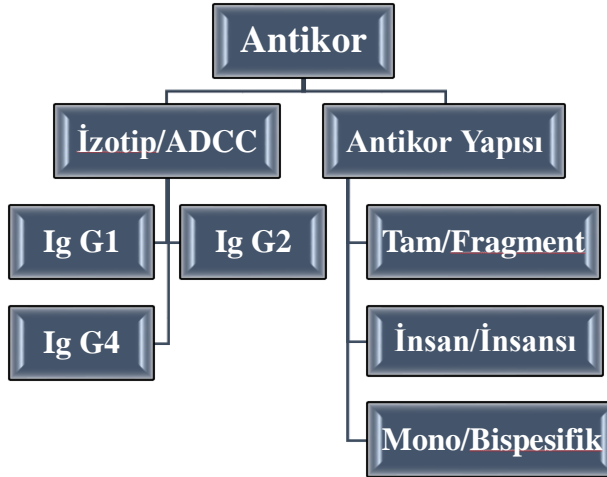
Başarılı bir ADC tasarımının ilk ve en önemli adımı antikor tarafından hedeflenecek uygun antijendir. Antijenin tasarımında dikkat edilecek en önemli kriter, hedef antijenin kanser hücrelerinde yüksek oranda ifade edilip sağlıklı hücrelerde çok az ya da hiç ifade edilmemesidir. Bu yüksek ifade oranının kanser hücreleri ile sınırlı olması hedeflenir. Eğer sağlıklı hücrelerde ifadesi bulunan bir antijen seçimi yapılacaksa, antijenin ifadesinin en azından ifadenin belirli bir doku tipi ile sınırlı olması istenir (7). İfadenin bu şekilde sınırlandırılması şartı, ADC'nin spesifik olmayan bağlanmalardan kaçınmasına ve normal hücrelere verilen zararın en aza indirilerek ADC'ler ile amaçlanan hedefli tedavinin gerçekleştirilmesindeki ilk adımı oluşturur. Preklinik ve klinik çalışmalarda, ADC tasarımı için hedef olarak seçilen , Non-Hodgkin lenfomaya karşı oluşturulan tedavilerde sıklıkla kullanılan CD19, CD20, CD22 gibi hücre yüzey belirteçleri, kolorektal kanserde CD326, meme kanserinde HER2, mesoteliomada mesotelin gibi birçok farklı antijen bu şartı sağlayan hedefler olarak karşımıza çıkar (8).

ADC geliştirilmesinde seçilecek antijenlerin hücre yüzeyinde konumlanması dolaşımdaki antikorlar tarafından hedeflenebilmesi için gerekli bir diğer kriterdir (9). Antijenin, ADC antikoru tarafından tanınmasının ardından uygun bir afiniteyle bağlanması makul bir tümör lokalizasyonu sağlayabilmek için gereklidir. Antijen antikor tarafından hedeflendikten sonra hücre içine internalize olabilme yeteneğine sahip olmalıdır. İnternalizasyon, antijen-ADC kompleksinin hücre içine girerek bileşenlerinden ayrılabilmesine ve etki yerine giderek hücre ölümünü indüklemesine imkân tanır. Fakat internalize olamayan ADC hedeflerinin varlığı bilinmektedir (10). Bu tip antijenlere özgü tasarlanan ADC'lerin güçlü bir seyirci-etkisi (Bystander effect) sayesinde hücreleri etkilediği, yüksek sistemik toksisite ve düşük etkinliğe neden olabilme riskine de sahip olduğuna dair bulgular mevcuttur (7).

ADC tasarımında, belirtilen özelliklere uygun olacak şekilde seçilen antijene karşı antikor geliştirilir. ADC'lerin mAb bileşeninden; hedef antijene özgül olması ve yüksek hedef bağlanma afinitesi göstermesi, immünojenisiteyi

minimal seviyede tutabilmek için insan, insansı ya da kimerik antikorların tercih edilmesi, düşük çapraz reaktivite sergilemesi, verimli internalizasyon özelliğine ve uzun bir dolaşım yarı ömrüne sahip olması istenir (11) .

Ayrıca bütün bir antikor ile ADC geliştirilebildiği gibi, efektör fonksiyonuna sahip olmayan fragment antikorlar kullanılarak da gelişen direnç mekanizmalarına karşı ADC tasarımları yapılabilmektedir (Şekil 1). Sadece Fab bölgesini bulunduran bu antikor fragmentleri (Fab'ler, scFv'ler vb.) antikorun yalnızca spesifik bir taşıyıcı olarak kullanılması temeline dayanır (12). Fragment antikorlar ADC oluşturulmasının yanı sıra bispesifik ya da paratropik antikorlar kullanılarak da antikorun hedefleme kabiliyetinin artırılması sağlanabilir (13). Bu bağlamda geliştirilen MEDI4276 isimli anti-HER2 biparatropik antikorundan oluşan antikor-ilaç konjugatı prelinik çalışmalarda oldukça etkili bulunmuştur (14). Tamamlanmış faz I-II klinik çalışması (NCT02576548) bulunan MEDI4276'nın, HER2 ifade eden meme ve mide kanseri hastalarında iki farklı epitopu hedefleyen yapısı sayesinde daha güçlü hedef yüzey kümelenmesi ile yüksek etkinlikte bir tedavi sağlayacağı düşünülmektedir.



Şekil 1. Antikor-ilaç konjugatı tasarımında antikor parametreleri

Onaylanan ve klinik çalışmalarda kullanılan ADC'lerin tümü insan immünoglobulin G moleküllerinden oluşmaktadır. IgG moleküllerinin 4 izotipi bulunmakla birlikte IgG1, IgG2 ve IgG4, ADC'lerin tasarımında sıklıkla tercih edilen tipleridir (15). IgG3, tümörü güçlü şekilde lizize uğratabilmesine karşın kısa serum yarı ömrü ve dolaşımdan hızlı şekilde temizlenme oranı nedeniyle ADC'lerin tasarımında tercih edilen bir izotip değildir. Genel olarak IgG1, IgG2 ve IgG4 molekülleri, hedef antijen için yüksek aviditeleri ve uzun serum yarı ömürleri nedeniyle tercih edilmektedir (15). Bu üç izotip içinden ise IgG2, monoklonal antikorun afinitesini ve internalizasyon potansiyelini geliştirme etkisi olduğu bilinen kovalent dimerler oluşturma yatkınlıkları nedeniyle; IgG1 ise immünoglobulin yapısındaki menteşe (hinge) bölgelerinin daha kolay indirgenerek konjugasyona izin verebilmesi nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir (16). Ayrıca, IgG izotipleri arasında değişen ikincil immün fonksiyonları harekete geçirme yetkinlikleri, seçilen izotipe göre farklı etkilere sahip ADC oluşumuna neden olur (17). IgG4 ve IgG2 izotiplerine kıyasla IgG1 ve IgG3 izotiplerinde ADCC ve CDC'nin etkilerinin çok daha güçlü olması da eklendiğinde ADC tasarımında sıklıkla tercih edilen immünoglobulin izotipi IgG1'dir.

Tüm bu özelliklerin ötesinde, ADC yaklaşımında antikorun kendisinin, fonksiyonel bir aktiviteye sahip olması gereklilik teşkil etmez (4). Klinikte kullanılan farklı formlar hastalara etkin tedaviler sunmaktadır. HER2 ifade eden ve meme kanseri tedavisinde klinikte sıklıkla kullanılan, FDA onaylı anti-HER2 monoklonal antikorunu trastuzumab'ın, DM1 isimli maytansoid türevi bir sitotoksik ilaçla konjuge halde kullanıldığı ADC formu, trastuzumab emtansine (Kadcyla®) piyasada mevcuttur. Öte yandan FDA onaylı başka bir ADC olan ve çeşitli hastalıklarda etkili tedavi sunan brentuximab vedotin, anti-CD30 antikorunu temelinde geliştirilmiş bir ADC'dir. Fakat brentuximab vedotinde, trastuzumab emtansinden farklı olarak, bünyesindeki monoklonal antikorun tek başına antitümör etkinliği yetersiz seviyededir(18,19). Bu nedenle ADC yaklaşımında, antikorun kendisinin fonksiyonel aktiviteye sahip olması gerekli değilken, antikorun bu özelliğinin ilave terapötik fayda sağlayabileceği düşünülmektedir.



## Sitotoksik Yük

ADC'nin bileşenlerinden bir diğeri olan yük (payload), özellikle kanser tedavisi için, yüksek toksisitesi nedeniyle monoterapi olarak uygulanması zor olan güçlü bir sitotoksik ajan olmalıdır. Terapötik etkinliğin görülebilmesi için yükün, nanomolardan dahi daha düşük konsantrasyonlarda yüksek toksisite gösterme gerekliliği antikorun yük taşıma kapasitesinin az olmasından ve uygulanan dozun yalnızca küçük bir kısmının hedef bölgeye ulaşabilmesinden kaynaklanır (15). ADC için uygun bir yükün şu özellikleri sağlaması gerekir;

- Yüksek sitotoksik aktivite göstermesi (IC50 ~0.01- 0.1 nM)
- Antikor ile konjugasyona imkan tanıyacak uygun fonksiyonel grupları buldurması ya da konjugasyon için modifiye edilebilmesi,
- Fizyolojik koşullar altında kabul edilebilir derecede suda çözünürlüğe sahip olması,
- Kan dolaşımında stabil olması,
- Apoptotik mekanizmaları indükleyerek hücre ölümünü gerçekleştirebilmesi.

Tüm bu özelliklere bağlı olarak ADC'lerde sitotoksik yük olarak kullanılabilen çeşitli bileşenler mevcuttur (Çizelge 1).

**Çizelge 1.** Etki mekanizmalarına göre antikor-ilaç konjugatlarında kullanılan sitotoksik yük çeşitleri

<b>Mikrotübül bozucu ajanlar</b>	Auristatin ve türevleri (MMAE, MMAF, vb.), Maytansinoid türevleri (DM1, DM4, vb)
<b>DNA hasarı oluşturan ajanlar</b>	Calicheamicin türevleri Camptothecin türevleri (SN38-Topoizomerez İnhibitörü) Duokarmisin türevleri Pirolobenzodiazepinler (PBD)
<b>Alternatif toksinler</b>	Apoptoz indükleyiciler (Bel-xL inhibitörleri) Transkripsiyon inhibitörleri (Amatoksinler..) Splaysozom inhibitörleri (Thailanstatin..)

Mikrotübül inhibitörlerinden olan maytansinoidler, mikrotübüllere bağlanıp mikrotübül dinamiklerini baskırlar ve sonucunda hücre döngüsünü G2/M fazında durdurarak apoptoza ve dolayısıyla hücre ölümüne neden olurlar. Ayrıca maytansin, sitotoksik yük olarak kullanım için bir gereklilik olan suda stabil ve uygun çözünürlük gibi diğer önemli kriterleri karşılamaktadır (20). Maytansinoidler, monometil auristatin E (MMAE) ve monometil auristatin F (MMAF) gibi farklı çeşitleri bünyesinde barındıran auristatin mikrotübül bozucu ajanlar, klinik geliştirmedeki ADC'lerin yaklaşık olarak % 70'inde kullanılarak en çok tercih edilen sitotoksik yük grubunu oluşturmaktadır (4).

DNA'ya zarar veren ajanlar, DNA'nın çift sarmalında hasara sebep olan kalikeamisinler, duokarmisinler gibi DNA alkilasyonu gerçekleştiren moleküller, rutin tedavide de kullanılan DNA'ya interkale olarak etki gösteren Camptothecin gibi topoizomera I inhibitörleri ve DNA'ya kovalent şekilde bağlanarak etki gösteren pirolobenzodiazepinler olmak üzere gruplanır (11). Güçlü bir DNA hasarı oluşturan Kalikeamisin DNA'nın küçük oluklarına bağlanıp DNA çift sarmalında hasara sebep olur. Klinik kullanımda olan Gemtuzumab ozogamisin ve inotuzumab ozogamisin'de kalikeamisin türevi bir sitotoksik yük tercih edilmiştir.

### **Bağlayıcı**

Antikor-ilaç konjugatı bileşenlerinden olan bağlayıcılar, sahip olduğu bağlantı bölgeleri sayesinde ADC bünyesindeki antikor ve sitotoksik yükü birleştirmek için kullanılır. **Bölünebilir** ve **bölünemez bağlayıcılar** olarak iki ana başlık altında incelenen bu bileşenlerden, dolaşım sırasında uygun stabilite göstermeleri, ADC hücre içine girdikten sonra ise sitotoksik yükü konjugattan ayırabilmeleri beklenir. ADC etki mekanizması kapsamında bağlayıcılar, sitotoksik ilacın hücreye güçlü şekilde verilebilmesinde büyük önem taşıdığı gibi son ürün toksisitesinin belirlenmesinde de görev alan kritik bir bileşendir. Sitotoksik yükün konjugattan salınım zamanlaması büyük önem taşır; dolaşıma erken salınan ilaç hedef dışı hücreleri etkileyerek sistemik toksisitenin yanı sıra düşük terapötik aralık oluşmasına sebebiyet verebilir. Bu nedenle ADC geliştirilmesinde kullanılacak bağlayıcı, antikorun ve sitotoksik yükün kimyasal yapısına, etki mekanizmalarına uygun olacak şekilde tercih edilmelidir.

Antikor-ilaç konjugatlarında kullanılan bağlayıcı çeşitlerinden biri olan bölünebilir bağlayıcılar, sitotoksik yükü konjugattan ayırabilmek için kanser hücreleri ile kan dolaşımı arasındaki ortam koşulu farklılıklarından yararlanırlar ve her bir bölünemez bağlayıcı kanser hücrelerine spesifik olan çeşitli hücre-içi koşullara cevap vererek etki eder (6). **Bölünebilir bağlayıcılar**, düşük pH'dan etkilenen aside dayanıksız bağlayıcılar (*hidrazon-bağlayıcılar*), proteolitik bölünmeye uğrayan proteaz-parçalabilir bağlayıcılar (*peptit bağlayıcılar*) ve hücre içindeki glutasyon seviyelerinde meydana gelen değişikliklerden etkilenen indirgenebilir bağlayıcılar (*disülfür bağlayıcılar*) olmak üzere üçe ayrılır (21).

Düşük pH'ya duyarlı bölünebilir bağlayıcılardan olan hidrazon, normal kan pH'sında stabil olup kanser hücreleri içindeki endozom, lizozom gibi hücrenel yapıların oluşturduğu asidik ortam sayesinde hidrolize uğrayarak sitotoksik yükü konjugattan serbest bırakır. FDA tarafından onaylanmış ilk antikor ilaç konjugatı olan, anti-CD33 antikorunun calicheamicin isimli sitotoksik bir ilaç ile konjuge edilerek kullanıldığı Gemtuzumab-ozogamicin (Mylotarg®) bölünebilir bir bağlayıcı olan hidrazon bağlayıcı kullanılarak üretilmiştir (22). Daha sonra toksisite göstermesi nedeniyle piyasadan çekilen Mylotarg'ın bu istenmeyen etkisi kullanılan bağlayıcının türüne dayandırılmıştır (21). Hidrazon bağlayıcının hedef doku dışındaki asidik ortam koşullarından etkilenecek şekilde dolaşımda sitotoksik ilacı konjugattan ayırması ve böylelikle sistemik toksisiteye neden oluşu hidrazon gibi aside duyarlı bölünebilir bağlayıcıların kullanımında sınırlayıcı bir faktör olarak karşımıza çıkar.

Hücre-içi proteazlara duyarlı olan proteaz-parçalanabilir bağlayıcılar bölünebilir bağlayıcıların bir diğer grubunu oluşturur. Peptit yapıdaki bölünebilir bağlayıcılar, çeşitli lizozomal proteazlar karşısında yapılarındaki dipeptit bağların bu enzimler tarafından tanınıp kesilmesiyle konjugattan ilacın serbestleştirilmesini sağlayarak etki ederler (23). Klinikte sıklıkla kullanılan Adcetris® (Brentuximab-vedotin)'in yanı sıra Polivy® (Polatuzumab-vedotin-piiq), Padcev® (Enfortumab-vedotin-ejfv) gibi FDA onaylı birçok ADC'de katepsin-B'ye karşı duyarlı dipeptit bağlayıcı olan valin-sitrülin bağlayıcı kullanılmaktadır (22). Bu peptit bağlayıcı, hücre-içi proteolitik aktivitenin optimum seviyede gerçekleşmesini sağlamak ve konjugatın uygun plazma stabilitesi gösterebilmesi için tasarlanmıştır. Valin-sitrülin, fenilalanin-lizin

gibi peptit bazlı bu bağlayıcılar, düşük pH'ya duyarlı bölünebilir bağlayıcılara oranla dolaşımda çok daha stabildir.

Kanser hücrelerinin sahip olduğu hipoksik ortam şartları, yüksek proliferasyon seviyelerine, hücre içinin dolaşıma oranla glutatyon gibi çeşitli tiyollerin yüksek konsantrasyonlarına sahip olmasına neden olur. Tümör hücrelerindeki glutatyon seviyeleri normal hücrelere oranla yaklaşık olarak 1000 kat daha yüksektir (21). Bu yüksek glutatyon seviyelerine duyarlı olan bölünebilir bağlayıcılar, konsantrasyon farkını yapılarındaki dilsülfür bağlarını indirgeyebilmek için kullanır ve böylelikle sitotoksik ilacı konjugattan ayırırlar.

Özellikle yeni geliştirilen konjugasyon teknolojileriyle uyum içinde çalışan ve bölünebilir bağlayıcılara oranla dolaşımda daha yüksek stabilite gösteren, ADC'lerin hedef dışı toksisite riskini azaltmayı hedefleyen bağlayıcı grubu bölünemez bağlayıcılar olarak adlandırılır. ADC geliştirilmesinde sıklıkla tercih edilen bu bağlayıcı sınıfı, konjugat hedef antijene bağlanıp internalizasyon gerçekleştikten sonra lizozomal enzimatik bir bozunma sayesinde sitotoksik yükü konjugattan ayırabilir. Sitotoksik ilacın salıverilmesi için konjugatın tam proteolitik degradasyonu gereklidir. Tam degradasyon sağlanmadan ilacın konjugattan ayırımına imkan vermedikleri için bölünemez bağlayıcılar, kimyasal olarak düzenlenmelerine rağmen sitotoksik etkinliklerini hedef dışı bölgede gösterebilen ilaçlar ile birlikte kullanılabilir (20). Tiyoeter ve maleimidokaproil (MC) gibi bileşikler bölünemez bağlayıcıların yaygın olarak kullanılan örneklerini oluştururlar. Meme kanseri tedavisinde kullanılan Kadcyla® (Trastuzumab emtasine)'da MCC (maleimidometil sikloheksan-1-karboksilat) bağlayıcı kullanılmıştır (22). Bölünemez bağlayıcılar bölünebilir bağlayıcılara oranla daha kararlı yapılardır, genellikle antikorun kendisinin degrades edilmesi birincil ilaç salım yolunu oluşturur (24).

Preklinik ve klinik çalışmalardaki ADC'lerden, onaylanarak kullanıma sunulmuş olan ADC'lere, farklı konjugatlarda çeşitli tipte bağlayıcılar kullanılmaktadır. Bağlayıcının seçimi hedef antijene, antikora ve kullanılacak ilaca göre belirlenebilmektedir. Temel olarak bağlayıcıların görevi, sitotoksik ilacın dolaşımda zarar görmeden hedef hücreye ulaştırılabilmesidir. Bu bağlamda ADC'nin diğer tüm bileşenlerinde olduğu gibi bağlayıcı seçimi de son ürünün farmakolojik ve farmakokinetik özellikleri açısından büyük önem taşır.

## Konjugasyon

Antikor-ilaç konjugatının temel bileşeni olan monoklonal antikor, bağlayıcı ile birleştirilmiş sitotoksik ilaca çeşitli yöntemlerle konjuge edilir. Konjugasyon, bu evreye kadar istenen kriterlere uygun şekilde seçilmiş tüm ADC bileşenlerinin bu aşamadan sonra da etkisini kaybetmemesi açısından önem arz eder. Bu aşamada ADC’lerde, sitotoksik ilacın etki yerindeki biyolojik aktivitesinin değişmemesi, antikorun yapısal bütünlüğünün bozulmaması, hedef antijeni tanıma ve bağlanma potansiyelinin değişmemesi beklenir. ADC geliştirilmesinde uygun konjugasyon stratejisinin belirlenmesi son ürünün terapötik potansiyelini etkileyen en önemli unsurlardan biridir.

Konjugasyon stratejisi seçilirken ADC’nin etkisini ve toksisitesini belirlemede kullanılan kritik bir terim karşımıza çıkar; “İlaç-antikor oranı (DAR, Drug-Antibody Ratio)”. DAR, bir monoklonal antikora bağlanan ilaç moleküllerinin sayısını belirtir. Kullanılan konjugasyon stratejisine göre değişen aralıkta DAR değerleri elde edilebilir, genellikle prelinik, klinik çalışmalarda ve onaylı ADC’ler arasında 0-8 arasında değişen DAR değerleri mevcuttur (26). Yüksek DAR değerleri, ADC’nin güvenlik profilini etkilerken, düşük DAR değerleri azalmış etkinlikle sonuçlanabilir (6).

Genellikle, konjugasyon stratejileri, antikorların üzerindeki lizin ve sistein gibi aminoasit rezidülerinin kullanıldığı **kimyasal konjugasyon** teknikleri ile bu tekniklerin dezavantajlarına karşı farklı teknolojilerin konjugasyon sürecine entegre edilmesiyle geliştirildiği **bölgeye-özgü konjugasyon** teknikleri olarak iki ana başlık altında incelenebilir (8). Kimyasal konjugasyon stratejilerinde bağlayıcı-sitotoksik ilaç ikilisine ait reaktif bir bölge, antikorun lizin rezidülerinin amin gruplarını içeren yan zincirleri kullanarak kovalent bağlarla birleştirilir (27). Lizinler, antikorların yüzeyinde buldukları ve ulaşılabilir olmaları nedeniyle antikorları ilaçlara bağlamak için sıklıkla kullanılır. Lizin amino grupları ile gerçekleştirilen konjugasyonda kararlı amid bağları oluşumunu sağlayan ve birincil aminlerle kolaylıkla reaksiyona girebilen N-hidroksisüksinimid(NHS) esterleri gibi ajanlar sıklıkla kullanılır (8). Farklı bağlayıcılar kullanılarak antikora lizin bağlanma bölgelerinden konjuge edilmiş çeşitli ADC’ler bulunmaktadır. Calicheamisin türevi bir sitotoksik ilacın hidrazon bir bağlayıcı vasıtasıyla, CD33’ü hedefleyen monoklonal antikorun lizin rezidüellerinden konjuge edilerek oluşturulduğu gemtuzumab-ozogamicin ve aynı bileşenlerin CD22’yi

hedefleyen bir monoklonal antikor ile konjugasyonuyla oluşturulduğu inotuzumab-ozogamicin lizin aminoasitleri kullanılarak konjuge edilmiş antikor ilaç konjugatlarıdır (25). Klinik kullanımda olan HER2'ye karşı hedeflenmiş bir monoklonal antikorun maytansinoid türevi bir sitotoksik ilaçla konjuge edilmesiyle oluşturulmuş ado-trastuzumab emtasine ise lizin rezidülerinden konjuge edilmiş bir ADC'dir. Ado-trastuzumab emtasine, NHS çapraz bağlayıcı bir ajan kullanılarak yan zincirlerinin konjugasyona hazır hale getirildiği iki aşamalı bir konjugasyon sürecinden sonra son halini almaktadır (28).

Kimyasal (stokastik) yöntemlerden bir diğeri olan sistein rezidüleri vasıtasıyla konjugasyon, ADC geliştirilmesinde en çok kullanılan konjugasyon stratejisidir (7). Bu yöntemde antikorların sistein rezidülerindeki disülfid bağlarının indirgenmesi sağlanarak serbest tiyol grupları oluşturulur ve konjugasyon bu serbest tiyol grupları üzerinden gerçekleşir. IgG1 antikor yapısında, 4 zincirler arası, 12 zincir içi olmak üzere toplam 16 disülfid bağı bulunur (7). Uygun koşullarda kolayca indirgenebilen zincirler arası 4 disülfid bağı konjugasyon için ana hedefleri oluşturur. 4 adet zincirler arası disülfid bağının çeşitli kimyasallarla muamele sonucu indirgenerek 8 adet serbest tiyol grubu meydana getirmesi hedeflenen 2-4 aralığında bir DAR değerinden 0-8 aralığında bir değer ile istenen sınırların dışına çıkabilmektedir. Fakat lizin aracılı konjugasyon stratejisine kıyasla sistein grupları ile konjugasyon sonucunda daha homojen bir DAR değeri elde edilir (25). DAR değerini istenen aralıkta tutabilmek için disülfid bağlarının indirgenme seviyeleri konjugasyon sırasında dikkatlice kontrol edilir. Bunun yanı sıra, sisteinlerden bazılarının serinlere dönüştürülerek, sadece istenen sayıda konjugasyon alanı bırakılarak konjugasyon bölgelerinin kontrol edildiği bölgeye özgü konjugasyon yöntemleri de mevcuttur (29).

Auristatin türevi bir sitotoksik ajanla konjuge edilmiş anti-CD30 antikor ilaç konjugatı olan brentuximab vedotinin konjugasyonu, sistein rezidüleri kullanarak gerçekleştirilmiştir (22). Auristatin türevi MMAE yapısındaki malemeido grupları ile indirgenme reaksiyonu sonucu ortaya çıkan serbest tiyol grupları arasında tiyoeter bağları oluşturularak bağlayıcı-ilaç yapısı antikora konjuge edilmiştir.

Kimyasal (stokastik) konjugasyon yaklaşımları kullanılarak farklı DAR değerlerini içeren heterojen ADC karışımları üretilmektedir (30). Antikor

başına düşen ilaç oranlarının değişken oluşu meydana gelen heterojen ADC'lerde, zayıf etkinlik ve yüksek toksisite görülür. Yüksek DAR değerlerine sahip ADC'lerin *in vitro* deneylerde karşılaşılan sonuçları güçlü sitotoksik etkinlik gösterdikleri yönüyle, bu ADC'lerin *in vivo* ortamda hızla elimine olduğu görülmüştür (31). Bu nedenle DAR değerinin belli sınırlar içinde tutulması ADC geliştirilmesi sırasında dikkat edilmesi gereken kritik noktalardan birini teşkil eder.

Heterojenliğe ek olarak kontrol altında tutulması gereken ve ADC'lerin aktivitesini etkileyen bir diğer parametre konjugasyon yeridir. Sistein gruplarından ziyade özellikle lizin kullanılarak gerçekleştirilen konjugasyonda, ilaç-bağlayıcı yapısının Fab ya da Fc kısmı gibi antikorun etkinliğini direkt etkileyecek kısımlara gelmemesi istenir. Fab bölgesinin birebir antijen bağlanmada yer alan kısmından gerçekleşen konjugasyon antikorun hedefe bağlanamamasına neden olurken, Fc kısmından gerçekleşen konjugasyon ise ikincil immün fonksiyonlar aracılığıyla yanıtı engeller. Bu nedenle rastgele konjugasyon yöntemleri kullanılarak üretilmiş ADC'lerde, heterojen ürünlerin izlendiğinden, kontrollü ya da homojen ürünleri oluşturmaya yönelik yaklaşımların kullanıldığı üretim ve saflaştırma adımlarını içeren kapsamlı ürün geliştirme süreçleri gereklidir.

Kimyasal (stokastik) konjugasyon yöntemlerinin eksiklikleri göz önüne alındığında ADC piyasası için yeni konjugasyon stratejilerinin büyük önem arz ettiği görülmektedir. Piyasada bulunan, onaylı ADC'lerin birçoğunda stokastik konjugasyon yöntemleri kullanılırken yeni geliştirilmekte olan ve faz aşamalarında bulunan ADC'lerin büyük bir kısmı bölgeye özgü konjugasyon yöntemleri kullanılarak üretilmiştir. Bölgeye özgü konjugasyon stratejileri antikora, sitotoksik ilacın istenen konumda, ve miktarda konjuge edilebilmesini ve sonucunda homojen DAR değerlerine sahip ADC'ler elde edilebilmeyi sağlamaktadır (30,32). İlacın bağlanma yeri, bağlayıcının yapısı ve sitotoksik ilaç sayısı düzenlenerek son ürünün farmakolojik, farmakokinetik özelliklerinin optimize edilebildiği ayarlanabilir bir sistem sağlayan bölgeye-özü konjugasyon stratejileri, konvansiyonel konjugasyon stratejilerine oranla yeni teknikler olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bölgeye-özü konjugasyon stratejilerinden sıklıkla kullanılanları; antikor üzerinde yapılan değişimleri içeren metotlar, doğal olmayan aminoasitlerin, şeker etiketlerinin eklenmesini içeren metotlar ve enzimatik

konjugasyon yöntemleri olarak farklı kategorilerde incelenebilir (33,34). Antikorlar üzerinde istenen bölgeye özgü olarak gerçekleştirilen mutasyon sayesinde antikor yapısında reaktif sistein eklenen THIOMAB stratejisi yeni ADC tasarımlarında karşılaşılan yaklaşımlardan biridir (35). Antikorların fonksiyonuna müdahale etmeden eklenen sisteinler sayesinde antikor başına yaklaşık 2 sitotoksik ilaç içeren homojen DAR değerine sahip ADC'lerin oluşması sağlanmaktadır. THIOMAB ile geliştirilen ilk ADC'lerde dolaşımda dekonjugasyon meydana gelmesi ürünün etkinliğini ve tekniğin üstünlüklerini sınırlamıştır. Daha sonra yüksek dekonjugasyon oranının ardındaki sebep çözümlenmiş, yeni ADC'lerde bu problem kontrol altına alınmıştır (36). Klasik konjugasyon yöntemleri ile elde edilen ADC'ler ile THIOMAB stratejisinin karşılaştırıldığı çalışmalar mevcuttur. Klasik yöntemlerle konjugasyonu sağlanmış, Trastuzumab-emptasine(DM1) ile THIOMAB teknolojisi ile üretilmiş THIO-Trastuzumab-DM1' in etkinliği ve güvenliliği *in vitro* ve *in vivo* olarak karşılaştırılmıştır (37). Çalışma sonrası THIO-Trastuzumab-DM1'in *in vivo* testlerde daha iyi etkinlik gösterdiği, sıçan ve maymunlarda gerçekleştirilen güvenlik çalışmalarında ise tolere edilebilirliğinin daha yüksek olduğu görülmüştür. THIOMAB stratejisi ile oluşturulmuş ADC'ler, genişletilmiş terapötik indeksleri sayesinde hedef patolojilerin tedavisinde ümit vaatmektedir.

ADC geliştirilmesinde kullanılan bir diğer strateji transglutaminazlar aracılı konjugasyon metodudur. Bu metotta, yapısında amin bulduran sitotoksik bir ilacı antikor üzerinde modifiye edilmiş glutamine bağlayabilmek için, glutaminin  $\gamma$ -karbonil amin grubu ile lizin yan zincirinin primer aminin arasında bağ oluşumunu indükleyen bakteriyel transglutaminazlar kullanılır (38). Transglutaminazların antikor yapısındaki mutasyona uğratılmamış doğal glutaminlerde bağ oluşumunu katalizleyememesi sayesinde yalnızca bölgeye-özü konjugasyon sağlanmış olur (39). Bu bağlamda, bazı araştırmacılar antikor üzerindeki sabit bölgelerin ulaşılabilir kısımlarına glutamin etiketlerini (LLQG sekansı) yerleştirerek(38), bir başka grup ise N297Q mutasyonu oluşturarak deglikolize ettikleri antikorlara sitotoksik yükleri konjuge edebilme amacıyla transglutaminazları kullanmış ve bölgeye-özü konjugasyon gerçekleştirmiştir (39). Çalışmalar sonucu, transglutaminaz kullanılarak gerçekleştirilen bölgeye-özü konjugasyonun ADC'lerin stabilitesini arttırdığı



ve homojen DAR değerlerine sahip ADC'lerin oluştuğu sonucu ortaya çıkmıştır.

ADC konjugasyon aşaması, ADC üretim sürecinde iyileştirilmesine yoğun şekilde odaklanılan bir aşamadır. ADC'lerin farmakokinetik profilini kontrol etmenin yollarından biri olarak görülen bu aşamanın zaman içinde geliştirilmesi sonucu elde edilen birçok farklı yöntem ile, artan etkinlik ve azalmış toksisiteye sahip homojen ilaç-antikor oranı içeren konjugatların eldesi hedeflenmektedir.

## **ANTİKOR-İLAÇ KOJUGATLARININ ETKİ MEKANİZMASI**

ADC'lerin oral biyoyararlanımları zayıftır ve bu nedenle intravenöz olarak uygulanırlar. Hedef dışı gerçekleşebilen spesifik olmayan bağlanmalar istenmeyen toksisitelere neden olabilir. Bu sebeple ADC bileşenlerinin her biri ideale en yakın özellikleri gösterecek şekilde seçilmelidir.

Antikor-ilaç konjugatı hedefe bağlandığında oluşan ADC-antijen kompleksinin çeşitli yollarla aktive ederek internalize olması beklenmektedir. İnternalizasyon, genellikle üç farklı şekilde gerçekleşir (9). Bunlardan ilki ADC'ler tarafından kullanıldığı ve hücre içi alımda merkezi yol olarak kabul edilen klatriin-aracılı endositozdur (7). Diğerleri ise kaveola-aracılı endositoz ve antijenden bağımsız olarak gerçekleşebilen pinositoz hücre içi alım yoludur.

Klatriin-aracılı endositozla ADC'nin hücre içine alınması, hücre zarının içe doğru gömülmesi ile başlayıp erken endozoma geçişle sonuçlanır. Erken endozomlarda ATP-bağımlı proton pompaları bulunmaktadır. ATP-bağımlı proton pompalarının oluşturduğu asidik ortam sayesinde, ADC'lerin bir bileşeni olan monoklonal antikorun, endozomlarda ifade edilen FcRn reseptörlere bağlanabilmesi kolaylaşır (9). Efektör fonksiyonuna sahip antikorlar ile geliştirilen ADC'lerin bir kısmı FcRn'lere bağlanarak hücre yüzeyine geri döndürülür. Buradaki ortam pH'sı, antikorun FcRn'den ayrılması ve sonucunda ADC'nin hücre dışına atılmasını sağlayan bir süreci tetikler. Bu mekanizma spesifik olmayan hücrelere internalize olan ADC'ler için normal hücrelerde gerçekleşebilecek istenmeyen toksisiteyi önlemede yararlı bir mekanizma olsa da ADC'lerin hedef hücrelerdeki etkinliği için istenmeyen bir durumdur. ADC'lere karşı gelişen direncin sebeplerinden biri olan FcRn aracılı

internalizasyon mekanizmasının ADC'ye olan etkisini engelleyebilmek için Fc kuyruğuna sahip olmayan antikorlar ile ADC tasarımı gerçekleştirilmektedir.

Erken endozomlardaki ADC'lerin, erken endozom ve lizozom hücrel kaynaşması gerçekleşmeden önceki durağı, erken endozomların geç endozomlara olgunlaştığı evredir. Ardından geç endozomlarda, lizozomlarla birleşme gerçekleşir; burada katepsin-B, plazmin gibi proteazların sağladığı asidik pH ile ADC'lerin bozunması ve bileşenlerine ayrılması kolaylaştırılır. Bu aşamada sitotoksik ilacın konjugattan ayrılması bağlayıcının sahip olduğu özelliklere göre değişiklik gösterir. Hücre içi spesifik koşullara yanıt verebilen bölünebilir bağlayıcılara sahip ADC'ler, lizozoma geçmeden sitotoksik yükü serbest bırakabilmektedir. Bu ADC'ler genellikle erken ya da geç endozomda bağlayıcıdan yükü ayırırlar. Hücrel koşullara bölünebilir bağlayıcılar kadar hassas olmayan ve tam proteolitik degradasyona ihtiyaç duyan bölünemez bağlayıcılar ise lizozomun sağladığı proteolitik koşullarda ancak sitotoksik yükü serbest bırakabilir. Asidik bir pH oluşturan lizozomal proton pompaları sayesinde ADC degradasyonu indüklenir ve ortamdaki proteazlar yardımıyla proteolitik degradasyon gerçekleşerek sitotoksik yükün konjugattan ayrımı sağlanır.

Bu metabolik yıkım süreçlerinden geçen ADC'nin konjugattan ayrılan sitotoksik yükü, lizozom lümeninden, etki bölgesine ulaşabilmek için, sitozole serbest bırakılır. Sitozoldeki sitotoksik ilaç etki mekanizmasına göre uygun hücrel bölgeye giderek hücre ölümünü gerçekleştirmek için apoptozu indükler. Auristatin ve maytansinoid türevleri gibi sitotoksik ilaçlar mikrotübüllere etki ederek apoptozu indüklerken, calicheamicin ve camptothecin türevleri DNA hasarına yol açmaktadır. Sitotoksik ilacın etki mekanizmasına göre hücrel mekanizmalar farklı şekillerde etkilenerek hücre ölümü indüklenir.

Konjugattan ayrılarak işlevsel hale gelen ve hedef hücre ölümünü gerçekleştiren sitotoksik yük, hidrofobik özelliklerine bağlı olarak komşu hücreler üzerinde de etkili olabilir. Çevre dokuda yer alan normal hücrelerin ya da komşu tümör hücrelerin, ADC sitotoksik bileşenini difüzyonla hücre içlerine alması ve sonucunda ADC nedenli bir hücre ölümü meydana gelmesi "Seyirci etkisi (Bystander effect)" olarak adlandırılmaktadır(7). Bu etki her ne kadar çevre tümör hücreleri için bir ölüm yolu olarak ilave fayda sağlasa da

ADC'lerin tümöre olan spesifikliğini etkileyen bir durum olarak karşımıza çıkar.

ADC'lerin internalize olabilmeleri, hücre içine ilaç salınımını gerçekleştirerek kanser hücrelerine karşı sitotoksik etki oluşturabilmeleri için gereklidir. Fakat konjugatın, hedef bölgeye ulaştığında, tümör çevresinde bulunan çeşitli proteolitik enzimlerin sebep olduğu ortam koşulları nedeniyle sitotoksik yükü konjugattan erken ayrılabilmesi mümkün hale gelebilir. Bu ADC'ler, sitotoksik yüklerin çeşitli difüzyon mekanizmalarıyla hücre içine alınarak ve aynı zamanda seyirci etkisine de neden olarak hücre ölümünü indükleyen, internalize olmayan ADC'ler olarak adlandırılmaktadır.

ADC'lerin mAb bileşeni, daha ADC-antijen kompleksi hücre içine internalize edilmeden çeşitli kompleman sistemlerini ve ikincil immün efektör fonksiyonları aktive ederek hedef hücreye karşı etkiyi başlatabilmektedir. Antikor aracılı immün efektör fonksiyonları arasında, kompleman bileşenlerinin aktivasyonu, immün efektör hücrelerin tümör bölgesine göçü, reseptör sinyalizasyonu veya ifadesinin azalması ile apoptozun indüklenmesi, kompleman-bağımlı sitotoksisite (CDC) , antikor-bağımlı hücre aracılı sitotoksisite (ADCC) ve antikor-bağımlı hücre aracılı fagositozun aktivasyonu bulunmaktadır (ADCP) (25).

## ANTİKOR-İLAÇ KONJUGATLARININ GELİŞİMİ

Antikor-ilaç konjugatları, çoklu bileşenlerin optimizasyonunu gerektiren karmaşık üretim aşamalarına rağmen hedefli tedavilere artan ihtiyacın bir sonucu olarak yıllar içinde büyük gelişme göstermiştir. Sitotoksik yük içeriği, konjugasyon yöntemi gibi üretim teknolojileri açısından ADC'ler üç nesile ayrılmaktadır. Üretilen birinci jenerasyon ADC'lerde görülen konjugasyon sonrası etkinlikte meydana gelen değişme, dolaşımda stabil olmayan bağlayıcı, antikora bağlı immünojenisite ve uygun olmayan dolaşım yarı ömrü gibi birçok istenmeyen özellikler ikinci ve üçüncü nesil ADC'lerin üretilmesine yol açmıştır. Böylelikle ADC üretim süreçleri üzerinde yapılan çalışmalar, gelişmeleri de beraberinde getirmiştir.

Birinci nesil ADC'ler, genellikle klasik bir kemoterapötik ve mürin bir antikorun parçalanamayan bir bağlayıcı ile konjuge edilmesinden oluşmaktadır. Bu ADC'lerdeki immünojenite gibi yan etkilerin yanı sıra kullanılan kemoterapötikten üstün herhangi bir etkinlik görülmemesi sebebiyle, daha fazla

geliştirilmesi gerekliliği doğmuştur. Bu sebeple mürin antikor yerine kullanılan hümanize monoklonal antikor sayesinde immünojenisite en aza indirilmiş ve Gemtuzumab ozogamicin gibi birinci nesil ADC'lerin klinik onay alabilmesi sağlanmıştır. Bu onaya rağmen birinci nesil ADC'lerdeki hedef-dışı toksisiteye sebep olabilen bağlayıcıların dolaşımda hidrolize olma sorunu ile kullanılan sitotoksik ilacın düşük yarı ömrü, hızlı klirensi gibi sorunlar devam etmiştir.

İkinci nesil ADC'ler, birinci nesil ADC'lerdeki problemler göz önüne alınıp geliştirilerek oluşturulmuştur. İnsansılaştırılmış ve çoğunlukla IgG1 izotipi antikorlar, daha etkili sitotoksik ilaçlar kullanarak geliştirilmiştir. IgG1 antikor izotipi ve toksik yük değiştirilerek üretilmiş Brentuximab vedotin gibi ilaçlar ikinci nesil ADC'leri temsil etmektedir. Bu nesilde, konjugasyona uygun antikor izotipi ve, çözünürlüğü yüksek ve antikor agregasyonunu indüklemeyen sitotoksik yük sayesinde birinci nesile oranla daha homojen DAR dağılımı sağlanabilen ADC'ler elde edilmiştir.

Üçüncü nesil ADC'lerin üretilmesi sürecinde ADC'lerin 3 temel bileşeni ve konjugasyon stratejilerinin geliştirilmesi önem kazanmıştır. Özellikle birinci ve ikinci nesildeki yetersiz ya da yüksek DAR, hedef dışı toksisiteye ve bazı ADC'lerin agregasyonu ile dolaşımdan hızlı temizlemelerine sebep olmuştur. Üçüncü nesil ADC'lerde, immünojenik reaksiyonları azaltmak ve kan dolaşımında daha uzun süre kalmasını sağlamak için daha hidrofil bağlayıcılar kullanılmıştır. Ayrıca, daha etkili yükler, tamamen insansılaştırılmış antikorlar ve bölgeye özgü bağlanma teknolojilerinin kullanılmasıyla üçüncü nesil ADC'ler geliştirilmiştir. Polatuzumab vedotin, Enfortumab vedotin, Fam-trastuzumab deruxtecan üçüncü nesil ADC örnekleridir. Her nesil, daha iyi hedefleme yeteneği, daha yüksek klinik etkinlik ve daha düşük immünojenite gibi iyileştirmeler sunarak kanser tedavisinde daha etkili bir seçenek haline gelmiştir. Bu ilaçların gelecekteki gelişmeleri, kanser tedavisinde daha da etkili ve güvenli seçenekler sunmaya devam etmesi beklenmektedir.

### ***ONAYLI VE KLİNİK ÇALIŞMALARDAKİ ANTİKOR-İLAÇ KONJUGATLARI VE ETKİNLİKLERİ***

ADC'ler, günden güne gelişmekte ve onkoloji alanında giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Farklı otoritelerce çeşitli onkolojik endikasyonlar için onay almış pek çok ADC biyoteknolojik ilaç sektöründe büyük bir pazar payına sahiptir. Halihazırda piyasada satışta bulunan ADC'lerin küresel

satışlarının 2026'da 16.4 milyar \$'ı aşacağı tahmin edilmektedir (40). Çizelge 3'te piyasada kullanılmakta olan başlıca ADC'ler ve bu ADC'lere özgü özellikler yer almaktadır.

2013 yılında FDA tarafından onaylanan Trastuzumab emtasine (T-DM1), güvenilirliği ve etkinliğini kanıtlayan EMILIA(NCT00829166) ve TH3RESA isimli iki adet faz 3 klinik çalışmasının sonuçlarını takiben piyasaya sürülmüştür (53). EMILIA klinik çalışmasında, 991 metastatik meme kanseri hastası, T-DM1 e karşı HER2+ meme kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan bir ilaç kombinasyonu (Lapatinib+Capecitabine) kullanılarak değerlendirilmiştir. T-DM1 ile tedavi edilen hastalarda Lapatinib + Capecitabine kombinasyonu ile tedavi edilenlere göre anlamlı derecede artmış progresyonsuz ve genel sağ kalım oranları görülmüştür. Yaklaşık sonuçlar, T-DM1 'e karşı hekimin HER2+ ileri evre meme kanseri hastalarında uygulanan ilaç protokolü tercihinin kullanıldığı TH3RESA klinik çalışmasında da elde edilmiştir. Hekimin tercihinine göre T-DM1 kullanan hastaların anlamlı derecede artmış sağ kalım oranları gösterdiği bulguları elde edilmiştir. Klinik çalışmalardan elde edilen veriler sonrasında, kemoterapi ile

**Çizelge 3.** Onaylı antikör-ilaç konjugatları ve özellikleri

<i>Antikor-İlaç Konjugatı</i>	<i>Hedef Antijen</i>	<i>mAb İzotipi</i>	<i>Yük Tipi</i>	<i>Bağlayıcı Tipi</i>	<i>Konjugasyon Metodu</i>	<i>Onay Tarihi</i>	<i>Endikasyon</i>	<i>Ref</i>
Gemtuzumab ozogamicin <b>Mylotarg®</b>	CD33	IgG4	Ozogamicin, Calicheamicin türevi	Bölünür	Lizin DAR: 2-3	FDA onay 2000, FDA piyasada n çekilme 2010, FDA yeniden onay 2017	Akut Myeloid Lösemi	(41, 42)
Brentuximab vedotin <b>Adcetris®</b>	CD30	IgG1	MMAE, Auristatin türevi	Bölünür	Sistein (Zincirler arası) DAR: 4	FDA 2011, EMA 2012	Hodgkin Lenfoma	(15, 43)
Trastuzumab emtansine <b>Kadcyla®</b>	HER2	IgG1	DM1, Maytansinoid türevi	Bölünmez	Lizin, DAR:3.5	FDA 2013, EMA 2013	HER2 Pozitif Metastatik Meme Kanseri	(28, 44)
Inotuzumab ozogamicin <b>Besponsa®</b>	CD22	IgG4	Ozogamicin, Calicheamicin türevi	Bölünür	Lizin, DAR:5-7	FDA 2017, EMA 2017	B-Hücre Akut Lenfoblastik Lösemi	(45)
Polatuzumab vedotin-piiq <b>Polivy®</b>	CD79b	IgG1	MMAE, Auristatin türevi	Bölünür	Sistein (Zincirler arası) DAR: 4	FDA 2019	Relaps ve Refrakter Büyük B-Hücre Lenfoma	(46)
Enfortumab vedotin <b>Padcev®</b>	Nectin4	IgG1	MMAE, Auristatin türevi	Bölünür	Cys, (Zincirler arası) DAR: 4	FDA 2019	Metastatik Ürotelyal Kanser	(15, 47)
Trastuzumab deruxtecan <b>Enhertu®</b>	HER2	IgG1	DXd Camptotecin türevi	Bölünür	Cys, (Zincirler arası) DAR: 8	FDA 2019	HER2 Pozitif Metastatik	(15, 48)

Sacituzumab govitecan-hziy <b>Trodelvy®</b>	TROP 2	IgG1	SN38 Camptothecin türevi	Bölünür	Cys (Zincirler arası) DAR: 8	FDA 2020	Meme Kanseri  İleri Evre 3'lü Negatif Meme Kanseri	(49)
Belantamab mafodotin- blmf <b>Blenrep®</b>	BCM A	IgG1	MMAF, Auristatin türevi	Bölünme z	-	FDA 2020	5ve 5+ İleri Evre Relaps ve Refrakte r Multipl Myeloma	(50, 51)
Moxetumoma b pasudotox <b>Lumoxiti®</b>	CD22		Pseudomonas ekzotoksin A, PE38	Bölünür	-	FDA 2018	Relaps ve Refrakte r Tüylü Hücreli Lösemi	(52)

kombinasyon halinde kullanılan tirozin kinaz inhibitörlerinden daha iyi tolere edilen T-DM1'in, adjuvan olarak trastuzumab almış fakat 6 ay içinde kanseri nüks etmiş hastalarda birinci seçenek olarak kullanılması gerektiği önerilmiştir (9).

Sacituzumab govitecan, epitelyal bir glikoprotein olan Trop-2'ye karşı geliştirilmiş bir monoklonal antikörün, camptothecin türevi bir ilaç olan irinotekanın aktif metaboliti SN38'e bölünür bağlayıcı vasıtasıyla konjuge edilmesiyle üretilmiş bir ADC'dir. Agresif klinik seyir ve zayıf prognoz gösteren metastatik üçlü negatif meme kanseri tedavisinde (mTNBC) kullanılmak üzere 22 Nisan 2020'de FDA hızlandırılmış onayı almıştır (54). Daha önce tedavi uygulanmış mTNBC hastalarının kullanımına izin verilen sacituzumab govitecan ile yapılan klinik çalışmaların sonuçları, sınırlı tedavi seçenekleri olan meme kanserinin farklı alt tipleri için de umut vaadedici olduğunu göstermiştir (55). IMMU-132-01 (NCT01631552) isimli Faz I ve II klinik çalışmasında daha önce en az iki farklı kanser tedavisi almış 108 üçlü negatif meme kanseri hastasına 10mg/kg Sacizutumab govitecan verilmiştir.

Hastalarda, %33.3 genel yanıt oranı ve medyan yanıt süresi 7.7 ay olarak ölçülürken, advers etki olarak mielosupresyon ve diyare görülmüştür (56). Yürütülen bir diğer klinik çalışma olan ASCENT (NCT02574455) Faz III'de 235 hastaya Sacizutumab govitecan, 233 hastaya ise hekimin tercih ettiği dört kemoterapi ajanı (kapesitabin, gemitabin, vinorelbin ve eribulin) verilmiş ve etkinlikleri ölçülmüştür. Sacizutumab govitecan ile tedavi sonucu medyan progresyonsuz sağkalım 5.6 ay iken, genel sağkalım oranı 12.1 ay olarak ölçülmüş; kemoterapötik ajanlarla tedavide medyan progresyonsuz sağkalım 1.7 ay, genel sağkalım oranı 6.7 ay olarak kaydedilmiştir (55). Kemoterapötik ajanları kullanan hastalarda görülen %5 'e karşın %35 objektif yanıt oranı elde edilen Sacituzumab govitecan tedavisinde görülen bu anlamlı uzun genel ve progresyonsuz sağ kalım oranları tedavi seçeneği kısıtlı metastatik üçlü negatif meme kanseri hastaları için önemli bir veri oluşturmaktadır.

Inotuzumab ozogamicin, DNA'ya hasar verici calicheamicin türevi bir ajanın CD22'yi hedefleyen monoklonal antikor ile konjugasyonundan meydana gelmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nden Avrupa'ya kadar birçok farklı ülkede relapse/refrakter B-hücresi akut lenfoblastik lösemi tedavisinde monoterapi olarak kullanımı onaylanmış bir ADC'dir. Küresel olarak onayını INO-VATE (NCT01564784) Faz III klinik çalışmalarının sonucunda elde etmiştir. Bu çalışmada 326 CD22+ B hücreli akut lenfoblastik lösemi hastasına, Inotuzumab ozogamicin ve klasik terapi protokolü (FLAG; fludarabine, cytarabine, ve granülosit koloni stimüle edici faktör) uygulanmıştır (9,57). Birinci ya da ikinci relapslarında olan bu hastalarda Inotuzumab ozogamicin tedavisinde görülen genel yanıt oranı %80'e karşı, standart terapide görülen %29.4'lük oranla kıyaslandığında anlamlı derece yüksek bulunmuştur (57). Progresyonsuz ve genel sağkalım oranları da 1.8'e 7.7 ay olarak, anlamlı şekilde Inotuzumab ozogamicin uygulanan hastalarda daha uzun olarak rapor edilmiştir. 2017 yılında FDA ve EMA tarafından onay alan bu ADC, nükseden veya standart kemoterapiye yanıt alınamayan ALL hastalarında monoterapi olarak iyi sonuçlar vermiştir. Inotuzumab ozogamicin ile gerçekleşen yeni çalışmalar, yeni ALL tanısı almış hastalarda tercih edilen ilk basamak tedavi olması yönündedir.

Onay almış ve kullanıma sunulmuş ADC'lerin yanı sıra klinik geliştirme aşamasında olan 80'den fazla aday ADC bulunmaktadır. Bu aday moleküllerden bazıları ileri klinik çalışmalara geçmiş ve çeşitli endikasyonların



tedavilerinde kullanılabilmek için kapsamlı testlere tabi tutulmaya devam etmektedir. Klinik çalışmalarını devam eden bazı ADC'ler ve özellikleri Çizelge 4'te yer almaktadır.

**Çizelge 4.** Klinik geliştirme aşamasındaki bazı ADC'ler ve özellikleri

ADC	Hedef	Endikasyon	Klinik Çalışma Aşaması	Klinik Çalışma Numarası
<i>Trastuzumab duocarmazine</i>	HER2	Metastatik Meme Kanseri	Faz III	NCT03262935
<i>Mirvetuximab soravtansine</i>	FOLR1	FOLR1+ Yumurtalık Kanseri	Faz III	NCT02631876
<i>BT1718</i>	MT1-MMP	NSCLC, Özofagus Kanseri, İleri Evre Solid Tümör	Faz I/II	NCT03486730
<i>Disitamab vedotin (RC48-ADC)</i>	HER2	Ürotelyal Karsinom	Faz II	NCT04879329
		Mide Kanseri	Faz III	NCT04714190
		Solid Tümör	Faz I	NCT02881138
<i>Tisotumab vedotin</i>	TF	Servikal Kanser	Faz III	NCT04697628
		Solid Tümör	Faz I/II	NCT03913741
<i>Datopotamab deruxtecan</i>	Trop2	NSCLC	Faz III	NCT04656652
		Üçlü Negatif Meme Kanseri	Faz I/II	NCT03742102
<i>Ladiratuzumab vedotin</i>	LIV1	Akciğer Kanseri (Alt Tipleri)	Faz II	NCT04032704
		Meme Kanseri	Faz I/II	NCT03310957
<i>PSMA ADC</i>	Prostat Spesifik Membran Antijeni	Prostat Kanseri	Faz II	NCT02020135 NCT01695044

	(FH(PS A)1)			
<b>Patritumab Deruxtecan (U3-1402)</b>	HER3	Metastatik Meme Kanseri	Faz II	NCT04699630
		Metastatik Kolorektal Kanser	Faz II	NCT04479436
		NSCLC	Faz II	NCT04619004

Antikor ilaç konjugatlarının monoterapi olarak etkinliklerinin yanı sıra farklı ilaçlarla kombine halde kullanıldığı tedaviler de klinik çalışmalarda araştırılmaktadır. Birçok farklı ilaç grubu kullanılarak elde edilen ADC kombinasyon tedavileri umut vaatmektedir. Kombinasyon tedavilerinin, etki mekanizmasına bağlı olarak ilaçların sinerjistik etkinliğinden faydalanıp terapötik etkinliğini geliştirme, ilaç direncini önleme ya da varolan direncini azaltma, sağkalım oranını artırma, tümör metastazını azaltma ya da önleme kapasitesine sahip olduğu düşünülmektedir(58).

İmmün düzenleyici etkileri keşfedilen ADC'lerin immünoterapötiklerle birlikte kullanılmasının tedavinin etkinliğini artırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur (59). Bunlardan biri immün kontrol noktası inhibitörü olan anti-PD-L1 antikoru pembrolizumab'ın enfortumab vedotin ile kombine edildiği klinik çalışmadır (NCT04223856). Bu faz III çalışmasıyla üretelyal kanserler üzerinde ADC-pembrolizumab kombinasyonunun etkinliği araştırılmaktadır. İmmün kontrol noktası inhibitörleri ile kombinasyonu araştırılan bir başka ADC, Brentuximab vedotin'dir. Hodgkin lenfoma hastaları üzerinde, ipilimumab ve nivolumab ile yürütülen Faz I/II çalışması ve yalnızca nivolumab ile devam eden Faz II çalışması mevcuttur (NCT01896999, NCT02758717). Nivolumab gibi PD-1 reseptörünü inhibe ederek programlı hücre ölümü yolağını inaktif hale getiren ilaçlarla kombine edilen ADC'nin, tek başına etkinliğine ek olarak Hodgkin lenfoma hastaları için tedavi yanıtını arttırdığı gösterilmiştir (60).

Klasik kemoterapi rejimi ile tedavi edilen relapse ya da refrakter haldeki lenfoblastik lösemi hastalarında monoterapi olarak Inotuzumab ozogamisin güçlü etkinlik göstermektedir (6). Standart kemoterapötik ajanlardan olan metotreksat ve sitarabin ile kombine halde kullanıldığı çalışmalar, akut

lenfoblastik lösemi tedavisinde ilk seçenek olarak değerlendirilmesini sağlamıştır. Ayrıca blinatumomab gibi immünoterapi ajanları ile de kombine edilerek klinik etkinliğinin arttırılmaya çalışıldığı faz çalışmaları da mevcuttur. Bunların yanı sıra yakın zamanda üçlü negatif meme kanseri tedavisinde hızlı kullanım onayı almış olan Sacituzumab govitecan'ın da kombinasyon çalışmaları bulunmaktadır. Üçlü negatif meme kanserinde bir PARP inhibitörü olan talazoparib ile kombine halde etkililiği araştırılmaktadır. Sacituzumab govitecan'ın sitotoksik yükü olan, topoizomeras inhibitörü olarak işlev gören SN-38, DNA kırıklarını indüklemektedir. Sacituzumab govitecan sayesinde hedef hücrede meydana gelen bu hasara, kanser hücrelerinin DNA tamir mekanizması olarak kullandıkları PARP yolağını inhibe eden talozaparip etkisinin ilave edildiği bu güçlü kombinasyon, Faz I/II çalışması olarak araştırılmaktadır (NCT04039230).

## GELECEK İÇİN ÖNGÖRÜLER

ADC'lerin antikanser ajanlar olarak başarısı, birçok araştırmacıyı ve ilaç şirketini, uygulama alanlarının sınırlarını onkolojinin ötesine çıkarmaya teşvik etmiştir. Çeşitli ilaçlarla yapılan kombinasyon tedavilerinin yanı sıra ADC'lerin immünomodülatör ajanlar, enfeksiyöz hastalıklara karşı kullanılan ilaçlar gibi, sitotoksik ilaçlar harici farklı yüklerle tasarlandığı yeni ADC'ler geliştirilmiştir.

Dünya çapında yayılan antibiyotik direnci insan hayatını tehdit eden ciddi bir sağlık problemi halini alması, sorunun çözümünde etkili yeni moleküllerin keşfedilmesinin yanı sıra varolan ilaçlarla daha güçlü tedaviler oluşturulmaya çalışılmasına neden olmuştur. Antikor ilaç konjugatlarını, antibiyotikleri kullanarak yeniden tasarlamak direnç sorununa karşı geliştirilmeye çalışılan tedavi yöntemlerinden biridir. Antikor-antibiyotik konjugatı (AAC) olarak adlandırılan bu tasarım, bakteri hücrelerindeki seçili antijenleri hedef alan bir antikora bir bağlayıcı ile uygun antibiyotiğin konjugasyonunu içermektedir. Bakteriyel enfeksiyonların en sık karşılaşılan nedenlerinden biri olan *Staphylococcus aureus* suşları fagositler gibi konak hücrede saklanarak antibiyotiklere dirençli güçlü enfeksiyonların oluşumu ve antibiyotiklere karşı duyarlılığın azalmasında rol oynamaktadırlar. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşları, bilinen tüm beta laktam antibiyotiklere karşı dirençlidir ve tedavisinde her ne kadar tedavi duyarlılığı

azalmış olsa da vankomisin, linezolid gibi ajanlar kullanılmaktadır. Bu enfeksiyonların tedavisinde daha güçlü tedavilere ihtiyaç duyulması, bakteri duvarına özgü teikoik asitleri hedefleyen antikora, hücre içinde yüksek birikim oranı gösteren güçlü bakterisidal etkili rifamycin türevi bir antibiyotığın bölünebilir bağlayıcıyla konjugasyonunu içeren AAC'nin geliştirilmesini sağlamıştır (61). Geliştirilen AAC'nin vankomisine karşı farelerde oluşturulan enfeksiyon modelinde etkinliği denenmiş, tek doz AAC'nin aynı anda başlatılan fakat günde iki defa verilen vankomisin tedavisinden daha güçlü etkinlik gösterdiği gözlemlenmiştir (61). Ayrıca THIOMAB teknolojisiyle gerçekleştirilen konjugasyon sayesinde homojen bir DAR (2) değerine sahip olan AAC güçlü etkinliğinin yanı sıra azalmış sistemik toksisite hedefiyle de tek antibiyotik tedavisinden üstündür.

Antikorlarla konjuge edilen bir diğer ilaç grubu da glukokortikoidlerdir (GC). Güçlü anti-inflamatuar etkilere sahip olan GC'ler, sistemik toksisiteye neden olabilir. GC'lerin neden olduğu bu sistemik yan etkileri azaltmak ve etkin bir tedavi sağlayabilmek için güçlü bir glukokortikoid olan flutikazon propiyonat, B hücrelerini hedef alan anti-CD74 antikoruna ile konjuge edilerek antikor-glukokortikoid konjugatı oluşturulmuştur (62). Bu konjugat ile güçlü etkilerine rağmen sistemik toksisiteye neden oldukları için kullanımları sınırlı olan flutikazon propiyonatın doz sınırlı etkilerini kontrol edebilmek amaçlanmıştır.

Kortizolden 30 kat daha güçlü anti-inflamatuar ve immün baskılayıcı etkileri olan deksametazon, antikor ile konjuge edilen bir diğer kortikosteroiddir. İnflamatuar faktörlerin ifadelerinin baskılanmasını sağlayarak etki gösteren deksametazonun aktivitesini arttırmak, ve toksisitesini sınırlamak için anti-CD163 antikoruna ile birleştirilmiştir. Anti-CD163 antikor-glukokortikoid konjugatının makrofajları hedeflediği ve TNF- $\alpha$  salınımını azalttığı *in vitro* deneylerde gözlenmiştir (63). Ayrıca konjuge olmayan deksametazonla, konjugatın *in vivo* etkinliği karşılaştırılmış ve antikor-deksametazon konjugatının sistemik toksisite göstermeden yaklaşık olarak 50 kat daha etkin olduğu bulgusuna ulaşılmıştır (25).

Onkolojinin ötesine yapılan ADC çalışmalarının yanında antikor tasarımını geliştirmeye yönelik ek stratejiler oluşturulmaya devam edilmektedir. Yeni konjugasyon stratejileri, monoklonal antikorlara alternatif fragmentler, farklı molar potens aralıklarına sahip sitotoksik yükler, etkin stabil

bağlayıcılar, yeni antijenik hedefler araştırılmakta ve ADC'lerin etkinliğini arttırmak için yeni etki mekanizmaları gibi yöntemler çalışmalara dahil edilmektedir.

Antikor ilaç konjugatları, Paul Ehrlich'in ortaya attığı "magic bullet" hipotezinden yola çıkarak gelişen, var olan ilaçların daha iyi farmakolojik profillere ve etkinliğe sahip yeni tedaviler olarak kullanılabilmesine imkân tanımaktadır. 2023 yılında 4 milyar \$'ı, 2026 yılına gelindiğinde ise 16.4 milyar \$'ı aşacağı tahmin edilen ADC pazarının, onkolojiden farklı alanlara da açılarak bu tahminleri aşacağı düşünülmektedir (6,40). Yapılan ve gelecekte yapılacak olan araştırmalar sayesinde ADC hedefli tedavilerin Paul Ehrlich'in vizyonunun ilerisinde gelişeceğine inanılmaktadır.

**Kaynaklar**

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, vd. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer* [Internet]. 15 Ağustos 2021;149(4):778–89. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
2. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 01 Ocak 2023;73(1):17–48. Available at: <https://doi.org/10.3322/caac.21763>
3. Mukherjee B, Satapathy BS, Mondal L, Dey NS, Maji R. Potentials and challenges of active targeting at the tumor cells by engineered polymeric nanoparticles. *Curr Pharm Biotechnol*. 2014/06/10. 2013;14(15):1250–63.
4. Chari R V, Miller ML, Widdison WC. Antibody-drug conjugates: an emerging concept in cancer therapy. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2014/03/29. 2014;53(15):3796–827.
5. Trail PA, Dubowchik GM, Lowinger TB. Antibody drug conjugates for treatment of breast cancer: Novel targets and diverse approaches in ADC design. *Pharmacol Ther*. 2017/08/02. 2018;181:126–42.
6. Chau CH, Steeg PS, Figg WD. Antibody-drug conjugates for cancer. *Lancet* [Internet]. 2019;394(10200):793–804. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31774-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31774-X)
7. Abdollahpour-Alitappeh M, Lotfinia M, Gharibi T, Mardaneh J, Farhadhosseinabadi B, Larki P, vd. Antibody-drug conjugates (ADCs) for cancer therapy: Strategies, challenges, and successes. *J Cell Physiol*. 2018/11/28. 2019;234(5):5628–42.
8. Perez HL, Cardarelli PM, Deshpande S, Gangwar S, Schroeder GM, Vite GD, vd. Antibody-drug conjugates: current status and future directions. *Drug Discov Today*. 2013/11/19. 2014;19(7):869–81.
9. Khongorzul P, Ling CJ, Khan FU, Ihsan AU, Zhang J. Antibody–Drug Conjugates: A Comprehensive Review. *Mol Cancer Res* [Internet]. 2020;18(1):3–19. Available at: <https://mcr.aacrjournals.org/content/molcanres/18/1/3.full.pdf>
10. Gébleux R, Stringhini M, Casanova R, Soltermann A, Neri D. Non-internalizing antibody-drug conjugates display potent anti-cancer

- activity upon proteolytic release of monomethyl auristatin E in the subendothelial extracellular matrix. *Int J cancer*. Nisan 2017;140(7):1670–9.
11. Fu Z, Li S, Han S, Shi C, Zhang Y. Antibody drug conjugate: the “biological missile” for targeted cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther*. Mart 2022;7(1):93.
  12. Kalinovsky D V, Kholodenko I V, Kibardin A V, Doronin II, Svirshchevskaya E V, Ryazantsev DY, vd. Minibody-Based and scFv-Based Antibody Fragment-Drug Conjugates Selectively Eliminate GD2-Positive Tumor Cells. *Int J Mol Sci*. Ocak 2023;24(2).
  13. Shim H. Bispecific Antibodies and Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy: Technological Considerations. *Biomolecules*. Şubat 2020;10(3).
  14. Pegram MD, Hamilton EP, Tan AR, Storniolo AM, Balic K, Rosenbaum AI, vd. First-in-Human, Phase 1 Dose-Escalation Study of Biparatopic Anti-HER2 Antibody-Drug Conjugate MEDI4276 in Patients with HER2-positive Advanced Breast or Gastric Cancer. *Mol Cancer Ther*. Ağustos 2021;20(8):1442–53.
  15. Drago JZ, Modi S, Chandarlapaty S. Unlocking the potential of antibody–drug conjugates for cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2021; Available at: <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00470-8>
  16. Zhang A, Fang J, Chou RY, Bondarenko P V, Zhang Z. Conformational difference in human IgG2 disulfide isoforms revealed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Biochemistry*. 2015/03/03. 2015;54(10):1956–62.
  17. Lucas AT, Price LSL, Schorzman AN, Storrie M, Piscitelli JA, Razo J, vd. Factors Affecting the Pharmacology of Antibody-Drug Conjugates. *Antibodies* (Basel, Switzerland). Şubat 2018;7(1).
  18. Forero-Torres A, Leonard JP, Younes A, Rosenblatt JD, Brice P, Bartlett NL, vd. A Phase II study of SGN-30 (anti-CD30 mAb) in Hodgkin lymphoma or systemic anaplastic large cell lymphoma. *Br J Haematol* [Internet]. 2009;146(2):171–9. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2141.2009.07740.x>
  19. Younes A, Gopal AK, Smith SE, Ansell SM, Rosenblatt JD, Savage KJ,

- vd. Results of a Pivotal Phase II Study of Brentuximab Vedotin for Patients With Relapsed or Refractory Hodgkin's Lymphoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 2012;30(18):2183–9. Available at: <https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2011.38.0410>
20. Ponziani S, Di Vittorio G, Pitari G, Cimini AM, Ardini M, Gentile R, vd. Antibody-Drug Conjugates: The New Frontier of Chemotherapy. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020;21(15):5510. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32752132>
21. Lu J, Jiang F, Lu A, Zhang G. Linkers Having a Crucial Role in Antibody-Drug Conjugates. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2016;17(4):561. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27089329>
22. Joubert N, Beck A, Dumontet C, Denevault-Sabourin C. Antibody–Drug Conjugates: The Last Decade. *Pharmaceuticals* [Internet]. 2020;13(9):245. Available at: <https://www.mdpi.com/1424-8247/13/9/245>
23. Su Z, Xiao D, Xie F, Liu L, Wang Y, Fan S, vd. Antibody–drug conjugates: Recent advances in linker chemistry. *Acta Pharm Sin B* [Internet]. 2021;11(12):3889–907. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211383521001143>
24. Strohl WR, Strohl LM, editörler. 15 - Antibody-drug conjugates. İçinde: *Therapeutic Antibody Engineering* [Internet]. Woodhead Publishing; 2012. s. 345–595. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781907568374500154>
25. Lambert JM. Typical Antibody–Drug Conjugates. İçinde: *Antibody-Drug Conjugates (ADCs) in Clinical Development: Fundamentals, Drug Development, and Clinical Outcomes to Target Cancer* [Internet]. 2016. s. 1–32. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119060727.ch1>
26. Ou J, Si Y, Goh K, Yasui N, Guo Y, Song J, vd. Bioprocess development of antibody-drug conjugate production for cancer treatment. *PLoS One* [Internet]. 2018;13(10):e0206246–e0206246. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30352095>
27. Sadiki A, Vaidya SR, Abdollahi M, Bhardwaj G, Dolan ME, Turna H, vd. Site-specific conjugation of native antibody. *Antib Ther* [Internet].



- 2020;3(4):271–84. Available at: <https://doi.org/10.1093/abt/tbaa027>
28. Lambert JM, Chari RVJ. Ado-trastuzumab Emtansine (T-DM1): an antibody–drug conjugate (ADC) for HER2-positive breast cancer. ACS Publications; 2014.
  29. Yao H, Jiang F, Lu A, Zhang G. Methods to Design and Synthesize Antibody-Drug Conjugates (ADCs). *Int J Mol Sci* [Internet]. 2016;17(2):194. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26848651>
  30. Gauzy-Lazo L, Sassoon I, Brun M-P. Advances in Antibody–Drug Conjugate Design: Current Clinical Landscape and Future Innovations. *SLAS Discov Adv Sci Drug Discov* [Internet]. 2020;25(8):843–68. Available at: <https://doi.org/10.1177/2472555220912955>
  31. Sun X, Ponte JF, Yoder NC, Laleau R, Coccia J, Lanieri L, vd. Effects of Drug-Antibody Ratio on Pharmacokinetics, Biodistribution, Efficacy, and Tolerability of Antibody-Maytansinoid Conjugates. *Bioconjug Chem*. Mayıs 2017;28(5):1371–81.
  32. Behrens CR, Liu B. Methods for site-specific drug conjugation to antibodies. *MAbs* [Internet]. 2014;6(1):46–53. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24135651>
  33. Perez HL, Cardarelli PM, Deshpande S, Gangwar S, Schroeder GM, Vite GD, vd. Antibody–drug conjugates: current status and future directions. *Drug Discov Today* [Internet]. 2014;19(7):869–81. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135964461300398X>
  34. Zhou Q. Site-Specific Antibody Conjugation for ADC and Beyond. *Biomedicines* [Internet]. 2017;5(4):64. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29120405>
  35. Junutula JR, Raab H, Clark S, Bhakta S, Leipold DD, Weir S, vd. Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. *Nat Biotechnol*. 2008/07/22. 2008;26(8):925–32.
  36. Beck A, Goetsch L, Dumontet C, Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of antibody–drug conjugates. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2017;16(5):315–37. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.268>
  37. Junutula JR, Flagella KM, Graham RA, Parsons KL, Ha E, Raab H, vd. Engineered thio-trastuzumab-DM1 conjugate with an improved

- therapeutic index to target human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2010/09/02. 2010;16(19):4769–78.
38. Strop P, Liu S-H, Dorywalska M, Delaria K, Dushin RG, Tran T-T, vd. Location Matters: Site of Conjugation Modulates Stability and Pharmacokinetics of Antibody Drug Conjugates. *Chem Biol* [Internet]. 2013;20(2):161–7. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074552113000331>
39. Jeger S, Zimmermann K, Blanc A, Grünberg J, Honer M, Hunziker P, vd. Site-specific and stoichiometric modification of antibodies by bacterial transglutaminase. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2010/11/27. 2010;49(51):9995–7.
40. do Pazo C, Nawaz K, Webster RM. The oncology market for antibody-drug conjugates. *Nat Rev Drug Discov.* 2021/03/26. 2021;
41. Bross PF, Beitz J, Chen G, Chen XH, Duffy E, Kieffer L, vd. Approval Summary. Gemtuzumab Ozogamicin Relapsed Acute Myeloid Leuk [Internet]. 2001;7(6):1490–6. Available at: <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/clincanres/7/6/1490.full.pdf>
42. Appelbaum FR, Bernstein ID. Gemtuzumab ozogamicin for acute myeloid leukemia. *Blood* [Internet]. 2017;130(22):2373–6. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2017-09-797712>
43. de Claro RA, McGinn K, Kwitkowski V, Bullock J, Khandelwal A, Habtemariam B, vd. U.S. Food and Drug Administration Approval Summary: Brentuximab Vedotin for the Treatment of Relapsed Hodgkin Lymphoma or Relapsed Systemic Anaplastic Large-Cell Lymphoma. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2012;18(21):5845–9. Available at: <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/clincanres/18/21/5845.full.pdf>
44. Von Minckwitz G, Huang C-S, Mano MS, Loibl S, Mamounas EP, Untch M, vd. Trastuzumab emtansine for residual invasive HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2019;380(7):617–28.
45. Lamb YN. Inotuzumab ozogamicin: first global approval. *Drugs.* 2017;77(14):1603–10.
46. Sehn LH, Herrera AF, Matasar MJ, Kamdar M, Assouline S, Hertzberg M,

- vd. Polatuzumab vedotin (Pola) plus bendamustine (B) with rituximab (R) or obinutuzumab (G) in Relapsed/refractory (R/R) diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): updated results of a phase (Ph) Ib/II study. *Blood*. 2018;132(Supplement 1):1683.
47. Challita-Eid PM, Satpayev D, Yang P, An Z, Morrison K, Shostak Y, vd. Enfortumab vedotin antibody–drug conjugate targeting nectin-4 is a highly potent therapeutic agent in multiple preclinical cancer models. *Cancer Res*. 2016;76(10):3003–13.
48. Ogitani Y, Aida T, Hagihara K, Yamaguchi J, Ishii C, Harada N, vd. DS-8201a, a novel HER2-targeting ADC with a novel DNA topoisomerase I inhibitor, demonstrates a promising antitumor efficacy with differentiation from T-DM1. *Clin Cancer Res*. 2016;22(20):5097–108.
49. Fenn KM, Kalinsky K. Sacituzumab govitecan: antibody-drug conjugate in triple-negative breast cancer and other solid tumors. *Drugs Today (Barc)* [Internet]. 2019;55(9):575–85. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31584574>
50. GlaxoSmithKline. FDA approves GSK’s BLENREP (belantamab mafodotin-blmf) for the treatment of patients with relapsed or refractory multiple myeloma. News release.
51. Markham A. Belantamab Mafodotin: First Approval. *Drugs*. 2020;80.
52. Dhillon S. Moxetumomab Pasudotox: First Global Approval. *Drugs* [Internet]. 2018;78(16):1763–7. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30357593>
53. Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, vd. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2012/10/02. 2012;367(19):1783–91.
54. FDA. FDA grants accelerated approval to sacituzumab govitecan-hziy for metastatic triple negative breast cancer [Internet]. 2020. Available at: <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-grants-accelerated-approval-sacituzumab-govitecan-hziy-metastatic-triple-negative-breast-cancer>
55. Bardia A, Hurvitz SA, Tolaney SM, Loirat D, Punie K, Oliveira M, vd. Sacituzumab Govitecan in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2021/04/22. 2021;384(16):1529–41.
56. Bardia A, Mayer IA, Vahdat LT, Tolaney SM, Isakoff SJ, Diamond JR,

- vd. Sacituzumab Govitecan-hziy in Refractory Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2019;380(8):741–51. Available at: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1814213>
57. Kantarjian HM, DeAngelo DJ, Stelljes M, Martinelli G, Liedtke M, Stock W, vd. Inotuzumab Ozogamicin versus Standard Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* [Internet]. 2016;375(8):740–53. Available at: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1509277>
58. Bayat Mokhtari R, Homayouni TS, Baluch N, Morgatskaya E, Kumar S, Das B, vd. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*. 2017/04/15. 2017;8(23):38022–43.
59. Gerber HP, Sapra P, Loganzo F, May C. Combining antibody-drug conjugates and immune-mediated cancer therapy: What to expect? *Biochem Pharmacol*. 2015/12/22. 2016;102:1–6.
60. Herrera AF, Moskowitz AJ, Bartlett NL, Vose JM, Ramchandren R, Feldman TA, vd. Interim results of brentuximab vedotin in combination with nivolumab in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Blood* [Internet]. 2018;131(11):1183–94. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2017-10-811224>
61. Lehar SM, Pillow T, Xu M, Staben L, Kajihara KK, Vandlen R, vd. Novel antibody–antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus*. *Nature* [Internet]. 2015;527(7578):323–8. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature16057>
62. Brandish PE, Palmieri A, Antonenko S, Beaumont M, Benso L, Cancilla M, vd. Development of Anti-CD74 Antibody–Drug Conjugates to Target Glucocorticoids to Immune Cells. *Bioconjug Chem* [Internet]. 2018;29(7):2357–69. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00312>
63. Graversen JH, Svendsen P, Dagnæs-Hansen F, Dal J, Anton G, Etzerodt A, vd. Targeting the hemoglobin scavenger receptor CD163 in macrophages highly increases the anti-inflammatory potency of dexamethasone. *Mol Ther*. 2012/05/31. 2012;20(8):1550–8.



## BÖLÜM 6

### DİFFÜZ MİDE KANSERLERİNİN MOLEKÜLER TEMELLERİ

Biyolog Dr. Aynur IŞIK<sup>1</sup>,

Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN<sup>2</sup>

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.10251380>

---

<sup>1</sup> Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, aynur.isik14@gmail.com, aynur.isik@hacettepe.edu.tr

<sup>2</sup> Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, [hakkitastan@gazi.edu.tr](mailto:hakkitastan@gazi.edu.tr)

\*Sorumlu Yazar: Aynur IŞIK; aynur.isik14@gmail.com



## GİRİŞ

Mide kanseri 2020 yılında yayımlanan Küresel Kanser Gözlemevi (GLOBOCAN) verilerine göre en sık görülen beşinci kanserdir. Mide kanseri insidansı son elli yılda görülen istikrarlı düşüşe rağmen, kansere bağlı ölümlerin dördüncü nedenidir. Doğu Asya'da özellikle Çin, Moğolistan, Japonya ve Kore'de insidans yüksektir. Tüm mide kanserlerinin yarısı bu bölgelerde teşhis edilmektedir. Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa'da ve Afrika oranlar genellikle düşük seyredir. Mide tümörlerinin %90'ı kötü huyludur ve vakaların %95'inden fazlasını adenokarsinomlar oluşturur [1].

Mide kanseri 40 yaşından önce nadiren görülür. Risk yaşla birlikte artar ve yetmişli yaşlarda en üst seviyeye ulaşır. Erkeklerde mide kanseri görülme sıklığı ve ölüm oranı daha yüksektir. Mide kanseri, çeşitli faktörlerin etkileşimi sonucunda ortaya çıkan karmaşık bir hastalıktır. *Helicobacter pylori* (H. pylori) enfeksiyonu, düşük sosyoekonomik durum, yüksek miktarda tuzlu ve tütülenmiş gıda tüketimi, beslenme alışkanlıkları (özellikle düşük meyve ve sebze tüketimi ve lif alımı), tütün ve alkol kullanımı, fiziksel aktivitenin azlığı, obezite, radyasyon maruziyeti, gastroözofageal reflü hastalığı, aile öyküsü ve genetik yatkınlık gibi birçok faktör mide kanseri riskini etkileyebilir. Ancak, mide kanserinin kesin etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. [2] [3, 4]

Mide kanserlerinin büyük çoğunluğu sporadik olarak ortaya çıkar; yalnızca vakaların %10-15'i ailesel birikim gösterir, %1-3'ü herediter sendromlarla ilişkilidir [5].

Erken evre mide kanserleri (karsinomun in situ olduğu evre 0 ), zamanında gerçekleştirilen cerrahi uygulamalar ile etkin bir şekilde kontrol edebilir ve hatta tedavi edebilir. Bu hastalarda cerrahi sonrası hastalık-spesifik 5 yıllık sağ kalım oranı %90'dan fazladır [6]. Ancak erken evre mide kanserinin teşhisi zordur, belirti göstermez ya da semptomlar hastalığa özgü değildir. Disfaji, kilo kaybı, gastrointestinal kanama, anemi ve kusma gibi semptomlar ileri evre mide kanserinin varlığında ortaya çıkar [7].

Mide kanserlerinin morfolojik özelliklerinin heterojenliği nedeniyle günümüze kadar birçok histolojik sınıflandırma önerilmiştir (Borrmann, Lauren, Ming ve Goseki, Dünya Sağlık Örgütü) [2]. Batı ülkelerinde en sık kullanılan mide kanseri sınıflandırması Lauren ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırmasıdır. Lauren sınıflamasına göre, mide kanserleri intestinal ve diffüz tip olarak iki ana kategoriye ayrılır. Bu sınıflamada, vakaların yaklaşık



%16'sı iki grubun özelliklerini de taşıdığı için sınıflandırılmaz mikst olarak kabul edilir [8]. Lauren sınıflandırması, farklı epidemiyolojik, klinikopatolojik profillere ve biyolojik davranışlara sahip alt tipleri ayırabildiği için hala yaygın olarak kabul görmekte ve kullanılmaktadır [9].

İntestinal tip mide karsinomu, yaşlı hastalarda yüksek tuzlu diyet, sigara, obezite, alkol tüketimi ve *H. pylori* enfeksiyonu gibi çevresel faktörlerle daha yakın ilişkilidir. Öte yandan, diffüz tip mide karsinomları genç hastalarda daha sık görülmekte ve genetik faktörlerle ilişkilendirilmektedir. İntestinal tip mide karsinomu, Correa kaskadı ile açıklanan yaygın bir varyanttır. Bu kaskatın ilk basamağında, çevresel etkiler sonucu gastrit; daha sonra atrofik gastrit, intestinal metaplazi, displazi ve karsinom oluşumu görülür. Son üç lezyon (atrofik gastrit, intestinal metaplazi ve displazi) prekanseröz lezyonlar olarak kabul edilir [10, 11]

2014 yılında Kanser Genom Atlası projesi (*The Cancer Genome Atlas*, TCGA) kapsamında 295 primer mide adenokarsinomu altı farklı moleküler platformda analiz edilerek incelenmiştir. Bu araştırma sonucunda önerilen yeni sınıflandırılmada *Epstein-Barr* virüsü (EBV) pozitif tümörler (%8,8), mikrosatellit instabil tümörler (%21,7), genomik stabil tümörler (%19,7) ve kromozomal instabiliteye sahip tümörler (%49,8) olmak üzere dört alt tip belirlenmiştir. Genomik stabil mide kanserleri, tüm mide kanserlerinin %20'sini oluşturmaktadır. Histolojik ve klinik açıdan değerlendirildiğinde, diffüz mide kanseri özelliklerini sergilemektedir. Bu grupta, moleküler altyapı *CDH1* (Epitelyal kaderin) mutasyonları, *RHOA* (Ras homolog gen ailesi A üyesi) mutasyonları ve *CLDN18-ARHGAP26* genleri arasındaki gen füzyonundan oluşmaktadır. [12].

### **Diffüz mide kanseri histolojisi ve ilişkili genler**

Diffüz tip mide kanseri histolojisinde belirgin glandüler yapılar genellikle bulunmaz hücre duvarı yıkılmış ve fibrotik hale gelmiştir [13]. Adezyon moleküllerinden yoksun tümör hücreleri tek tek ya da küçük hücre kümeleri şeklinde mukozanın arkasında gelişir. Bu alt tip, belirgin bir sınır olmaksızın geniş bir alana yayılma potansiyeline sahiptir. İntrasitoplazmik müsin birikimi nedeniyle hücre çekirdeği çepere doğru itilmiş taşlı yüzük hücreli karsinomlar, Lauren sınıflamasına göre diffüz tip içinde değerlendirilir. Bununla birlikte tümörlerin tamamında taşlı yüzük hücreleri bulunmaz [14].

Diffüz tip mide tümörlerinde adezyon ve hücre hareketliliğinde etkili proteinleri sentezleyen genlerdeki mutasyonlar, infiltratif ve zayıf kohezyon gösteren histolojinin oluşumuna katkıda bulunur. Diffüz tip mide kanseri epidemiyolojisine uygun olan TCGA sınıflamasının genomik stabil alt grubunda yüksek oranda somatik *CDH1* mutasyonları (vakaların %37'si), *RHOA* mutasyonları (vakaların %15'i) ve *CLDN18 - ARHGAP* füzyonları ( vakaların % 15'i ) tespit edilmiştir. Ayrıca mutasyonlar karşılıklı birbirini dışlar (mutually exclusive).[15]

### **E-Cadherin/*CDH1***

*CDH1* geni, 16q22.1 kromozom bölgesinde yer alır. Gen tarafından sentezlenen 4,5 kb'lık mRNA'nın translasyonu sonucu E-cadherin glikoproteini kodlanır. E-cadherin beş tandem tekrarlı ekstraselüler alan, bir transmembran alan ve bir karboksi-terminal sitoplazmik alandan oluşan  $Ca^{2+}$  bağımlı hücre-hücre adezyon molekülüdür. E-cadherin embriyogenezi kontrol eder, hücre büyümesini denetler, epitel polariteyi ve doku mimarisini korunmasında görevli tümör supresör genidir [16].

$\beta$ -katenin, E-cadherini aktin hücre iskeletine bağlayan bir adaptör proteindir. Fizyolojik koşullar altında, sitoplazmik  $\beta$ -katenin, APC/GSK3 $\beta$ /Axin/CK1 bozulma kompleksine bağlanarak inaktif durumda kalır ve ubiquitinyasyon için fosforilasyona uğrar. Wnt sinyali açıkken GSK3 $\beta$  kompleksi fosforilasyonunu inhibe ederek  $\beta$ -kateninin degrade olmasını engeller. Sitoplazmada biriken  $\beta$ -kateninin çekirdeğe geçmesi için gerekli kritik eşiğe ulaşır.  $\beta$ -katenin çekirdekte TCF-4/LEF-1 transkripsiyon faktörlerine bağlanarak Wnt hedefi genler olan c-Myc, siklinler, MMP gibi genlerin sentezini indükler. Bu durum kontrolsüz hücre çoğalmasına ve büyümesine yol açar. E-cadherinin ortamda bulunmaması katenin-katenin kompleksinin bozulmasına ve sitoplazmik  $\beta$ -kateninin artışına yol açar. Serbest kalan  $\beta$ -kateninin TCF'ye bağlanarak Wnt sinyalini aktive etmek için çekirdeğe giren  $\beta$ -katenin olduğu yönünde bir öneriler vardır. Dengeli Wnt/ $\beta$ -katenin/E-cadherin sinyali, onkogenezi teşvik eden kontrolsüz hücre proliferasyonu engeller [17].

Hereditör Diffüz Gastrik Kanser (HDGC), erken yaşta başlayan diffüz mide kanseri ve invaziv lobüler meme kanserinin yüksek prevalansı ile karakterize edilen otozomal dominant kanser sendromudur. Diffüz tip mide kanserinin ailesel birikim gösterdiği 50 yıl önce fark edilmiştir. 1998 yılında

Yeni Zelandalı Maori ailelerine genetik bağlantı analizi yapılarak sendroma germline *CDH1* (OMIM \*192090) gen mutasyonlarının neden olduğu bulunmuştur [18] Kısa sürede benzer özellikleri paylaşan farklı etnik kökenli birçok aile tanımlanmıştır. Uluslararası Gastrik Kanseri Bağlantı Konsorsiyumu (IGCLC) tarafından 2019 yılında hazırlanan güncellenmiş kılavuza göre genetik test kriterleri; Bireyde patojenik germline *CDH1* veya *CTNNA1* varyantının varlığı yada birinci/ ikinci derece akrabalarında bir veya daha fazla diffüz tip mide kanseri vakasının tespit edilmesidir [19].

## RHOA

Rho GTPazlar, Ras GTPaz süper ailesine ait sinyal proteinleridir. Ras homolog gen ailesi A üyesi (RhoA), küçük bir G protein kodlar. Hücre büyümesi, sağ kalım, polarite, adezyon, göç, sitokinez, farklılaşma hücre iskelet dinamiği, transkripsiyon gibi pek çok hücrel süreçlerde etkilidir. RhoA, aktif olmayan GDP'ye bağlı ve aktif GTP'ye bağlı durumlar arasında geçiş yapar. Bu yollar GTPaz aktive edici proteinler (GAP'ler), guanin nükleotid değişim faktörleri (GEF'ler) ve Rho GDP ayrışma inhibitörleri (GDI'ler) sıkı bir şekilde kontrol edilir. GAP'ler, sinyal iletimini engellemek için GTPaz hidrolizini teşvik eder. GEF'ler, sinyal iletimini uyarmak için GTPaz yüklemeye reaksiyonunu katalize eder ve GDI'ler, GDP'ye bağlı Rho GTPaz'a bağlanarak GDP'nin ayrışmasını engeller, böylece sinyal yollarının aktivasyonunu inhibe eder [20, 21].

RHOA'nın GTP'ye bağlı aktif formu Rho ile ilişkili protein kinaz (ROCK) gibi aşağı akış efektörlerini aktive ederek sinyalleri iletir. Mide kanseri hücrelerinde, RHOA ve ROCK, hücre göçü, invazyon ve metastazda hücre iskeleti dinamiğinin düzenlenmesi ile ilişkilendirilmiştir. Büyük ölçekli genom dizileme projeleri, *RHOA*'nın tekrarlayan mutasyonlarının neredeyse sadece diffüz tipe özgü olduğunu ortaya çıkarmıştır [22].

RHOA proteinindeki Tyr42, Arg5 ve Gly17 gibi mutasyona eğilimli sıcak noktalar RHOA'nın substrat proteinine veya GTP'ye bağlandığı evrimsel süreçte büyük ölçüde korunmuş fonksiyonel alanlarıdır.[23]

## CLAUDİN18

Epitel ve endotelin temel işlevi, organizmadaki farklı bölümleri ayırmak ve bunlar arasındaki madde alışverişini düzenlemektir. Hücreler arası sıkı bağlantı bölgeleri (tight junction) suyun, iyonların ve moleküllerin paraselüler difüzyonuna izin verirken proteinler ve lipidlerin apikal yüzeyde tutar ve bazolateral alana geçişini engeller. Hücre polaritesini korunması ve hücre sinyalleşmesinde de rol oynarlar. Okludin ve klaudin proteinleridir sıkı bağlantı bölgelerinin önemli proteinleridir [24]

Farklı kanser türleri ve evrelerindeki çeşitli ekspresyon paternleri ve çelişkili rolleri dışında, claudinlerin ekspresyonu dokuya spesifiktir . Bazı claudinler sadece normal dokuda çok az veya sadece kanserli dokuda eksprese edilir. Claudinler normal dokularda sıkı bağlantı (tight junction) kompleksi içinde gömülü halde bulunur malign transformasyon sırasında claudinlerin epitoplari tümör hücrelerinin yüzeyinde belirgin hale gelir [25]. Claudinler eksprese edildiği dokulardan kaynaklanan kanserlerde aşağı regüle edilirken, daha az eksprese edilmiş dokulardan kaynaklanan kanserlerde yukarı regüle edilir. Bu mekanizmalar aracılığıyla, claudinlerin inflamasyon, büyüme, hayatta kalma, proliferasyon, epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), metastaz, terapi direnci ve kanser kök hücresi dahil olmak üzere tümör gelişiminin tüm adımlarında rol oynadığına inanılmaktadır. [25, 26]

*CLAUDİN18 (CLDN18)* geni genomda 3q22 lokalizasyonunda yer alır. Gen altı ekzon ve beş intronik bölgeden meydana gelir. İki ayrı promotöre sahip iki farklı birinci ekzon *CLAUDİN18.1* ve *CLAUDİN18.2* proteinlerini sentezler. *CLDN18* proteini klasik claudin proteinlerine benzer şekilde dört transmembran alan, iki hücre dışı döngüsel alan (ECL 1 ve ECL 2), sitoplazmik alandan oluşur. N terminal ve C terminal bölgeleri sitozolde yer almaktadır [27, 28]. İki protein arasında ilk 69 amino asitin farklı olması ekstraselüler matrikste bulunan birinci ilmek yapısını değiştirir [29] *CLDN18.1* akciğer *CLDN18.2* mideye spesifik sentezlenir. *CLDN18.2* midenin farklılaşmış hücrelerinde sentezlenirken boyun bölgesinde bulunan kök hücre zonunda ifade edilmez [30]. *CLDN18.2* normal dokuda sınırlı ve hücreye spesifik ifade edilen ve hücre zarında lokalize olan kolay ulaşılabilir ideal bir antikor temelli ilaç hedefidir. [31]. Yeni bir kimerik immünoglobulin G1 antikorunu olan IMAB362 (zolbetuximab veya claudiximab), *CLDN 18.2*'ye bağlandıktan sonra efektör

hücreler antikora bağlı hücrel sitotoksiteyi aktive eder. Bu değişiklik apoptozu indükler ve hücre çoğalmasını baskılar. [32]

*CLDN 18.2*, primer mide kanserleri ve metastazlarında genellikle eksprese edilir. *CLDN 18.2* pankreas, yemek borusu, yumurtalık ve akciğer tümörlerinde ektopik olarak ifade edilir [30].

### **ARHGAP26**

RhoA GTPaz aktive edici protein 26 (*ARHGAP26*, *GRAF*) beşinci kromozomun q kolunda yer alır. [33] 23 ekzona sahip gen proteini epitel dokularda ifade edilir ancak mezenkimal kökenli dokularda ifadesi tespit edilememiştir[34].

*GRAF* proteini BAR alanı, PH alanı, RhoGAP alanı, serin/prolin açısından zengin alan ve karboksi ucunda Src homology 3 (SH3) alanlarını içerdiği tahmin edilmektedir [35] BAR alanı ökaryotlarda aktin dinamiği ve membran yeniden şekillendirilmesinde görevlidir. GTPaz aktive edici protein (GAP) alanı, hem Cdc42 hem de RhoA'nın in vitro GTP hidrolizini kontrol eder. Rho ailesi GTPazları, yukarı akış düzenleyicisi olarak, *GRAF*'ın fonksiyon kaybı, *RHOA'nın* fizyolojik aşağı regülasyonunu önleyebilir ve tümör süpresör gen p21'in baskılanmasına yol açabilir. *GRAF* kusurlu hücre S fazına ilerler. *GRAF* proteininin SH3 alanı, integrin bölgelerinde bulunan reseptör olmayan bir tirozin kinaz FAK'ın COOH terminalindeki prolinde zengin bölgeye bağlanabilir. FAK, hücre büyümesi, çoğalması, hayatta kalması ve göçünün modülasyonunda önemli bir rol oynar. *FAK*'ın aşırı eksprese edilmesi veya yapısal olarak aktif olması neoplastik hücrelerin hareketliliğini, invazivlik ve proliferasyonu artırır [36].

### **CLAUDİN18-ARHGAP26 füzyonu**

*CLDN18* geninin beşinci ekzonu ile *ARHGAP26* geninin on ikinci ekzonu arasında oluşan gen füzyonu sonucunda *CLDN18* promotörü altında 75,6 kDa büyüklüğünde kimerik bir protein sentezlenmektedir. *CLDN18-ARHGAP26* proteininde *CLDN18*'in transmembran alanı ve C terminalinde bulunan GTPaz aktive edici protein (GAP) alanı korunur, kaderin ve integrinlerle etkileşim sağlayan PDZ-bağlayıcı motifler bulunmaz. [37]

*CLDN18-ARHGAP26* füzyonu mide kanseri hücrelerinin göç kabiliyetleri önemli ölçüde artırır. Ayrıca bu hücreler sık kullanılan tedavi

seçeneklerinden oksaliplatin ve 5-florourasile karşı dirençli olduğu da rapor edilmiştir. CLDN18-ARHGAP26 gen füzyonuna sahip hastaların kötü sağ kalım, ilerlemiş tümör evresi ve zayıf ilaç yanıtı görülür [38]. 40 yaş altı mide kanseri tanısı almış hastaların dahil edildiği başka bir kohorta, CLDN18-ARHGAP26 füzyonu hastaların % 13,5'inde tespit edilmiştir. Bu olguların tamamı diffüz tip, tümör çapı büyük, çoklu lenf nodu metastazları olan ileri evre tümördür [39].

### **Diffüz mide kanserinin tedavisinde moleküler hedefler**

İmmünoterapi, mide kanseri hastaları için en yeni tedavilerden biridir. İmmünoterapi, aktif ve pasif bağışıklık tepkisine yol açan iki yöntem ile uygulanır. Aktif yöntemde, hasta bireyin bağışıklık sistemi kanser hücreleriyle mücadele etmeye programlanır [40]. Kanser aşılı ve kimerik antijen reseptörü (CAR-T) hücre tedavisi, aktif immünoterapinin örnekleridir. Diğer taraftan, laboratuvarında üretilen monoklonal antikorlar (mAb) gibi çeşitli immünoterapi ajanları pasif immünoterapide kullanılabilir. Bu tedavi grubunda yer alan sitokin tedavileri, immün kontrol nokta inhibitörleri, onkolitik virüs tedavileri, kanser aşılı ve adoptif T hücre transferi gibi çeşitli tedavi yöntemleriyle klinik uygulamalarda başarı sağlamıştır[41]. Tümör immünoterapisi ve hedefe yönelik tedavilerdeki yeni yaklaşımlar kemoterapiye direnç, tümör ilerlemesi ve nüksü gibi karşılaşılan başarısızlıkları da aşma potansiyeline de sahiptir [28]

Epidermal büyüme faktörü reseptörü HER2'nin amplifikasyonu veya aşırı ekspresyonu hücre sağ kalımını, proliferasyonunu ve metastazı destekler. Bu sebeple HER2 proteini, başta meme kanseri olmak üzere farklı kanser türlerinde terapötik bir hedef haline gelmiştir. Anti-HER2 fonksiyonlarına sahip birkaç monoklonal antikor geliştirilmiştir. Diffüz tip mide kanserlerinde HER2 pozitifliği nadirdir ve pozitif olgular HER2 hedefli tedavilerden sınırlı fayda sağlarlar [42, 43]

Anjiyogenez mide kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde kanser büyümesi ve metastatik yayılmanın kontrolünde anahtar bir rol oynamaktadır. Bu nedenle anjiyogenezin inhibisyonu, onkolojik araştırmalarda büyük ilgi görmüştür [44]. Özellikle vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) hedeflemesi önemli bir tedavi stratejisi olarak kabul edilir. VEGF tümör hücreleri tarafından üretilen ve endotelial hücrelerin büyümesini uyaran

bir anjiyojenik faktördür. Kan damarlarının geçirgenliğini artırır, endotel hücrelerin apoptozunu azaltır, stromal proteolizi aktive eder ve endotel hücrelerinin proliferasyonunu ve göçünü teşvik eder. VEGF ailesi vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörlerine VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3 resöptörlerine bağlanır [45]. Ramucirumab, VEGFR-2'yi hedefleyen en önemli anti-anjiyojenik monoklonal antikordur. Ramucirumab, ileri evre mide kanseri tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır [46]. Klinik veriler, diffüz tip mide kanseri hastalarında intestinal tiple kıyaslandığında ramucirumabın etkinliğinin daha düşük olduğunu göstermektedir [43].

Diffüz tip mide kanserinde umut verici hedeflenebilir moleküller faz 2 klinik denemeleri başarı ile tamamlanan CLND18.2 antikoru (zolbetuksimab) ve anti-FGFR2-IIIb (Fibroblast büyüme faktörü resöptörü) antikoru (bemarituzumab) olmuştur [43].

.

## Kaynaklar

1. Baccili Cury Megid, T., et al., *Gastric Cancer: Molecular Mechanisms, Novel Targets, and Immunotherapies: From Bench to Clinical Therapeutics*. Cancers (Basel), 2023. **15**(20).
2. Dicken, B.J., et al., *Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions*. Ann Surg, 2005. **241**(1): p. 27-39.
3. Sung, H., et al., *Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA: a cancer journal for clinicians, 2021. **71**(3): p. 209-249.
4. Ilic, M. and I. Ilic, *Epidemiology of stomach cancer*. World J Gastroenterol, 2022. **28**(12): p. 1187-1203.
5. Oliveira, C., et al., *Familial gastric cancer: genetic susceptibility, pathology, and implications for management*. Lancet Oncol, 2015. **16**(2): p. e60-70.
6. Suzuki, H., et al., *High rate of 5-year survival among patients with early gastric cancer undergoing curative endoscopic submucosal dissection*. Gastric Cancer, 2016. **19**(1): p. 198-205.
7. Da, B., et al., *High-risk symptoms do not predict gastric cancer precursors*. Helicobacter, 2019. **24**(1): p. e12548.
8. Lauren, P., *The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification*. Acta Pathol Microbiol Scand, 1965. **64**: p. 31-49.
9. Garcia-Pelaez, J., et al., *Histological and mutational profile of diffuse gastric cancer: current knowledge and future challenges*. Mol Oncol, 2021. **15**(11): p. 2841-2867.
10. Correa, P., *Gastric cancer: overview*. Gastroenterol Clin North Am, 2013. **42**(2): p. 211-7.
11. Ansari, S., et al., *Diffuse Gastric Cancer: A Summary of Analogous Contributing Factors for Its Molecular Pathogenicity*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(8).
12. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma*. Nature, 2014. **513**(7517): p. 202-9.
13. GENEL, A.M.K., *Hereditör Mide Kanserleri*. 2017.



14. Monster, J.L., et al., *Diffuse gastric cancer: Emerging mechanisms of tumor initiation and progression*. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2022. **1877**(3): p. 1887-19.
15. Iyer, P., et al., *Diffuse gastric cancer: histologic, molecular, and genetic basis of disease*. *Transl Gastroenterol Hepatol*, 2020. **5**: p. 52.
16. Gall, T.M. and A.E. Frampton, *Gene of the month: E-cadherin (CDH1)*. *J Clin Pathol*, 2013. **66**(11): p. 928-32.
17. Shenoy, S., *CDH1 (E-Cadherin) Mutation and Gastric Cancer: Genetics, Molecular Mechanisms and Guidelines for Management*. *Cancer Manag Res*, 2019. **11**: p. 10477-10486.
18. Guilford, P., et al., *E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer*. *Nature*, 1998. **392**(6674): p. 402-5.
19. Carneiro, F., *Familial and hereditary gastric cancer, an overview*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2022. **58-59**: p. 101800.
20. Zhang, L., et al., *The role of GTPase-activating protein ARHGAP26 in human cancers*. *Mol Cell Biochem*, 2021.
21. Cherfils, J. and M. Zeghouf, *Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs*. *Physiol Rev*, 2013. **93**(1): p. 269-309.
22. Karlsson, R., et al., *Rho GTPase function in tumorigenesis*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1796**(2): p. 91-8.
23. Kakiuchi, M., et al., *Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma*. *Nat Genet*, 2014. **46**(6): p. 583-7.
24. Gonzalez-Mariscal, L., et al., *Tight junction proteins*. *Prog Biophys Mol Biol*, 2003. **81**(1): p. 1-44.
25. Eichner, M., et al., *In Colon Epithelia, Clostridium perfringens Enterotoxin Causes Focal Leaks by Targeting Claudins Which are Apically Accessible Due to Tight Junction Derangement*. *J Infect Dis*, 2017. **217**(1): p. 147-157.
26. Li, J., *Targeting claudins in cancer: diagnosis, prognosis and therapy*. *Am J Cancer Res*, 2021. **11**(7): p. 3406-3424.
27. Zhong, W., et al., *Development of a Humanized VHH Based Recombinant Antibody Targeting Claudin 18.2 Positive Cancers*. *Front Immunol*, 2022. **13**: p. 885424.
28. Chen, J., et al., *Targeting CLDN18.2 in cancers of the gastrointestinal tract: New drugs and new indications*. *Front Oncol*, 2023. **13**: p. 1132319.

- 29.Niimi, T., et al., *claudin-18, a novel downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodomain transcription factor, encodes lung- and stomach-specific isoforms through alternative splicing*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(21): p. 7380-90.
- 30.Tureci, O., et al., *Claudin-18 gene structure, regulation, and expression is evolutionary conserved in mammals*. Gene, 2011. **481**(2): p. 83-92.
- 31.Zhu, G., et al., *Targeting CLDN18.2 by CD3 Bispecific and ADC Modalities for the Treatments of Gastric and Pancreatic Cancer*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 8420.
- 32.Bednarz-Misa, I., et al., *Distinct Local and Systemic Molecular Signatures in the Esophageal and Gastric Cancers: Possible Therapy Targets and Biomarkers for Gastric Cancer*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(12).
- 33.Hildebrand, J.D., J.M. Taylor, and J.T. Parsons, *An SH3 domain-containing GTPase-activating protein for Rho and Cdc42 associates with focal adhesion kinase*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(6): p. 3169-78.
- 34.Borkhardt, A., et al., *The human GRAF gene is fused to MLL in a unique t(5;11)(q31;q23) and both alleles are disrupted in three cases of myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia with a deletion 5q*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 9168-73.
- 35.Lundmark, R., et al., *The GTPase-activating protein GRAF1 regulates the CLIC/GEEC endocytic pathway*. Curr Biol, 2008. **18**(22): p. 1802-8.
- 36.Qian, J., et al., *Abnormal methylation of GRAF promoter Chinese patients with acute myeloid leukemia*. Leuk Res, 2011. **35**(6): p. 783-6.
- 37.Yao, F., et al., *Recurrent Fusion Genes in Gastric Cancer: CLDN18-ARHGAP26 Induces Loss of Epithelial Integrity*. Cell Rep, 2015. **12**(2): p. 272-85.
- 38.Shu, Y., et al., *Prognostic significance of frequent CLDN18-ARHGAP26/6 fusion in gastric signet-ring cell cancer*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 2447.
- 39.Nakamura, Y., K. Shitara, and J. Lee, *The Right Treatment of the Right Patient: Integrating Genetic Profiling Into Clinical Decision Making in Advanced Gastric Cancer in Asia*. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2021. **41**: p. 1-8.

40. Sukri, A., A. Hanafiah, and N.R. Kosai, *The Roles of Immune Cells in Gastric Cancer: Anti-Cancer or Pro-Cancer?* Cancers (Basel), 2022. **14**(16).
41. Entezam, M., et al., *Current progress and challenges of immunotherapy in gastric cancer: A focus on CAR-T cells therapeutic approach.* Life Sci, 2023. **318**: p. 121459.
42. Basile, D., et al., *State-of-the-Art of Monoclonal Antibodies for the Treatment of Gastric Cancer.* Biologics, 2021. **15**: p. 451-462.
43. Ooki, A. and K. Yamaguchi, *The dawn of precision medicine in diffuse-type gastric cancer.* Ther Adv Med Oncol, 2022. **14**: p. 17588359221083049.
44. Hironaka, S., *Anti-angiogenic therapies for gastric cancer.* Asia Pac J Clin Oncol, 2019. **15**(4): p. 208-217.
45. Mawalla, B., et al., *Treatment outcome of anti-angiogenesis through VEGF-pathway in the management of gastric cancer: a systematic review of phase II and III clinical trials.* BMC research notes, 2018. **11**(1): p. 1-7.
46. Xiao, B., W. Wang, and D. Zhang, *Risk of bleeding associated with antiangiogenic monoclonal antibodies bevacizumab and ramucirumab: a meta-analysis of 85 randomized controlled trials.* OncoTargets and therapy, 2018: p. 5059-5074.

## **BÖLÜM 7**

### **KANSER TEDAVİSİNDE RNA İNTERFERAZIN UYGULANABİLİRLİĞİ: GÜNCEL DURUM**

Arş. Gör. Dr. Çiğdem DÖNMEZ<sup>1</sup>

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.10251384>

---

<sup>1</sup>Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı,  
Zonguldak, Türkiye. donmezcgdm@gmail.com, Orcid ID: 0000-0002-2310-2718



## GİRİŞ

Günümüzde kanser önemli bir küresel sağlık sorunudur. Her yıl kanser araştırmalarına büyük bir bütçe ayrılmasına rağmen kanser, küresel ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır (Mansoori ve diğerleri, 2014). Geleneksel cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi kanser tedavisinde kullanılan yaklaşımlardır. Bununla birlikte, bu yaklaşımlar uzun vadeli mali, fiziksel ve zihinsel yük ile ilişkilidir. Bu nedenle hastalığın tanı, tedavi ve takibinde yeni ve daha etkili yaklaşımların keşfedilmesi büyük önem taşımaktadır (Tian ve diğerleri, 2021).

RNA interferaz (RNAi), mikroRNA'ların (miRNA) ve küçük engelleyici RNA'ların (siRNA) aracılık ettiği translasyon sonrası düzenleyici bir süreçtir. miRNA ve siRNA, RNAi aracılığıyla kanserle ilişkili herhangi bir genin/mRNA'nın ekspresyonunu yüksek özgüllükle engelleyebilir, dolayısıyla hedefe yönelik tedaviler için dikkate değer bir terapötik araç olabilir (Kara ve diğerleri, 2022).

RNAi mekanizmasının anlaşılması ve bu alandaki ilerlemeler, birçok yeni RNAi bazlı ilacın klinik deneme aşamalarına geçmesine yol açmıştır. Yakın zamanda dört siRNA bazlı terapötik (patisiran, givosiran, lumasiran ve inclisiran), ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Ayrıca, faz III klinik çalışmaları devam eden yedi siRNA aday (vutrisiran, nedosiran, inclisiran, fitusiran, teprasiran, cosdosiran ve tivanisiran) bulunmaktadır (Zhang ve Bahal, 2021). Bu durum, hedefe yönelik terapötiklerde yeni bir çağın başlangıcını işaret etmektedir (Traber ve Yu, 2023). Bununla birlikte, RNAi teknolojisinin kanser tedavisi için klinik kullanımı, RNazlar tarafından hızlı bozunma ve vücuttan temizlenme, yetersiz hücre veya doku penetrasyonu, zayıf endozomal kaçış, bağışıklık tepkisinin uyarılması ve yan etkilere neden olan hedef dışı etkiler nedeniyle engellenmektedir (Wang ve diğerleri, 2017; Dowdy, 2017; Segal ve Slack, 2020; Ganju ve diğerleri, 2017, Kara ve diğerleri, 2022). Ancak, bu sorunları çözmek ve farklı antikanser ilaçları ile birlikte dağıtımlarını gerçekleştirmek için, kimyasal modifikasyonlar ve özel olarak tasarlanmış bir takım nanotaşıyıcı bazlı ilaç dağıtım yöntemlerinin geliştirilmesi, araştırmacıların bu engelleri aşmasına yardımcı olmuştur (Maguregui ve Abe, 2020; Smith ve diğerleri, 2022).

## KANSER TANISINDA RNAi

Son yıllarda yapılan birçok çalışma, miRNA ekspresyon paternindeki değişikliklerin moleküler bir imza görevi görmekte olduğu ve kanser teşhisini pekiştirmek için tamamlayıcı bir araç olarak kullanılabilmesi yönündedir (Qadir ve Faheem, 2017; Li ve diğerleri, 2018; Hanna ve diğerleri, 2019). miRNA'ların ekspresyon profillerinin analizi, sağlıklı ve kanserli dokular arasında ayırım yapılmasına, dokunun kökeninin tanımlanmasına ve belirli bir kanserin alt türü hakkında son derece doğru bilgilerin sağlanmasına olanak sağlamaktadır (De Palma ve diğerleri, 2022; Lee ve Dutta 2009; Shao ve diğerleri, 2019).

Dolaşımdaki miRNA'lar çeşitli kanserlerin tanısında etkili bir biyobelirteç olabilir. Örneğin, dolaşımdaki miR-21'in yüksek ekspresyonu, kolorektal kanser (Zhang, Hu, Du ve Du, 2021), akciğer kanseri (Tian ve diğerleri, 2016; Kumar ve diğerleri, 2020), meme kanseri (Adhami ve diğerleri, 2018) ve pankreas kanseri (Kadera ve diğerleri, 2013) gelişimine yakınlıkla güçlü bir ilişkiye sahiptir.

184 serviks kanseri, 186 servikal intraepitelyal neoplazi hastası ve 193 sağlıklı kontrol deneginden oluşan bir çalışmada, dört miRNA seviyesinin (miR-195, miR-16-2, miR-2861 ve miR-497) serviks kanseri hastalarının serumunda normal kontrollerle karşılaştırıldığında farklı şekilde eksprese edildiğini bulmuşlar ve bunları serviks kanserinin tespiti için yeni invaziv olmayan biyobelirteçler olarak değerlendirmişlerdir (Zhang ve diğerleri, 2015). 86 prostat kanseri hastasını kapsayan buna benzer başka bir çalışmada ise, miR-146a-5p, miR-24-3p ve miR-93-5p'nin kontrollere kıyasla prostat kanseri hastalarının serumunda önemli ölçüde daha yüksek eksprese edildiği bulunmuştur (Zhang, Liu, Zou, Geng ve diğerleri, 2021).

Bugüne kadar miRNA profiline dayalı olarak kanser teşhisini destekleyen iki test geliştirilmiştir. Bunlardan biri, 10 farklı miRNA'nın (miR-223-3p, miR-146b-5p, miR-146b, miR-375, miR-31-5p, miR-551b, miR-155-5p, miR-204-5p, miR-138-1-3p, miR-29b-1-5p) ekspresyonunu değerlendirerek tiroid kanseri tipinin belirlenmesine olanak sağlayan ThyraMIR testidir. Diğeri ise, K-RAS geninde mutasyon olmayan kolorektal kanserli hastalarda kullanılan öngörücü tanı testi miRpredX-31-3p'dir. Bu testte miR-31-3p ekspresyonunun değerlendirilmesi kolon tümörlerinden alınan

FFPE (Formalinle Sabitlenmiş Parafine Gömülü) doku örneklerinde gerçeğeleştirilir (Smolarz ve diğerleri, 2022).

## **KANSER TEDAVİSİNDE RNAi**

RNAi, spesifik gen susturulması için evrimsel olarak korunmuş bir mekanizmadır. RNAi mekanizmasının anlaşılması ile RNAi'nin kanser tedavisinde kullanımıyla ilgili birçok tatmin edici ve umut verici çalışma geliştirilmiştir. Genel olarak bu çalışmalarda, tümör apoptozunun inhibisyonu, onkogen susturulması, tümör anjiyogenez faktörlerinin inhibisyonu ve kemorezistansın azaltılması ile ilgili genlerin susturulmasına odaklanılmıştır (de Jesus ve diğerleri, 2023). Örneğin, Zhu ve diğerleri (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, akciğer kanseri hücrelerinde apoptozun ve kemoterapi direncinin azaltılmasından sorumlu olan PHB1 genini susturmak için siRNA iletimi için hibrit lipid/polimer nanopartiküller kullanmıştır. PHB1 geninin susturulması, tümör hücrelerinin büyümesini önemli ölçüde inhibe etmiştir (Zhu ve diğerleri, 2015). Başka bir çalışmada ise, 5637 ve T24 insan mesane kanseri hücre hatlarında mutant tümör baskılayıcı gen p53'ün RNAi ile susturulmasının, mesane kanserinde G2 fazı hücre döngüsü durmasını, apoptozun indüklenmesiyle ilişkili olan hücre çoğalmasını ve canlılığının belirgin inhibisyonunu indüklediği bildirilmiştir. Bu bulgular, mutant p53'ü hedef alan RNA müdahalesinin, mesane kanserinin tedavisi için umut verici bir terapötik strateji olabileceğini göstermiştir (Zhu ve diğerleri, 2013).

miRNA'lar, evrim sırasında korunmuş birçok genin ifadesinin düzenlenmesinde rol oynayan bir grup küçük tek sarmallı RNA molekülüdür (Lee ve diğerleri, 2010; Smolarz ve diğerleri, 2022). Önceki araştırma sonuçları, ilgili miRNA'ların ekspresyonundaki düzenleyici bozukluklar ile çeşitli kanser türlerinin ortaya çıkışı arasında bir bağlantı olduğunu göstermektedir (Peng ve Croce, 2016).

miRNA'lar tümör gelişimindeki işlevine bağlı olarak, onkogenlerin veya apoptozu indükleyen genlerin ekspresyonunu inhibe eden tümör baskılayıcı miRNA'lar ve onkogenezi aktive eden veya baskılayıcı genlerin ekspresyonunu inhibe eden onkogenik miRNA'lar olarak sınıflandırılır (Chen ve diğerleri, 2014). Bu nedenle, kanser hücrelerinde onkogenik miRNA'ların baskılanmasını veya tümör baskılayıcı miRNA'ların yükseltilmesini hedefleyen RNAi bazlı tedaviler geliştirilerek, kanserin ilerlemesinin herhangi bir aşamasında tedavi



amaçlı kullanılabilir (Maduri, 2015). Örneğin; Si ve diğerleri (2007) tarafından yapılan bir çalışmada, normal meme dokularıyla karşılaştırıldığında, meme tümörlerinde daha fazla eksprese edildiği bilinen miR-21'in tümör oluşumundaki rolünü değerlendirmek için meme kanseri MCF-7 hücreleri anti-miR-21 oligonükleotitleriyle transfekte edilmiştir. Transfeksiyon sonrasında anti-miR-21'in hem *in vitro* hücre büyümesini hem de ksenograft fare modelinde tümör büyümesini baskıladığı ve miR21'in bir onkogen olarak işlev gördüğü bildirilmiştir (Si ve diğerleri, 2007).

EMT çok adımlı metastatik kademenin ilk adımı olduğundan, kanser hücresi metastazı EMT'nin bloke edilmesiyle etkili bir şekilde önlenebilir (Maduri, 2015). Bu bağlamda yapılan bir çalışmada, miR-200 ailesine ait miRNA'lar kullanılarak e-kaderinin transkripsiyonel baskılayıcılarını kodlayan ZEB1 ve ZEB2 genlerinin RNAi tarafından susturulmasıyla, epitelyal-mezenkimal geçişin NMuMG hücrelerinde inhibe edildiği bildirilmiştir (Korpal ve diğerleri, 2008).

miRNA'ların ekspresyon paterni kanser tedavisi sırasında tamamen değişebilir. miRNA'ların ekspresyon paterninde meydana gelen bu değişim tedavi için öngörücü bir belirteç olarak kullanılabilir. Örneğin; Kahraman ve diğerlerinin (2018) 21 agresif üçlü negatif meme kanseri vakası ve 21 kontrol üzerinde genom çapında mikrodizi kullanarak yaptıkları çalışmada, miR-126-5 ve miR-34a'nın neoadjuvan kemoterapiden sonra patolojik tam yanıt için güvenilir tanısal ve öngörücü belirteçler olduğunu bildirmişlerdir (Kahraman ve diğerleri, 2018).

Tedaviden sonra veya tedavi sırasında miRNA ekspresyon profili değişiklikleri de hastalığın prognozunu değerlendirilmesinde öngörücü bir belirteç olarak düşünülebilir. Yapılan bir çalışmada, kemoterapiye yanıt olarak küçük hücreli dışı akciğer kanseri hasta prognozunu değerlendirilmesinde miR-638'in klinik önemi araştırılmıştır. Kemoterapi sonrasında serum miR-638 düzeyleri artan hastaların, serum miR-638 düzeyleri azalan hastalara göre önemli ölçüde daha uzun hayatta kalma süresi gösterdiği ortaya çıkmıştır. miR-638 seviyelerinin küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalarının hayatta kalmasıyla ilişkili olduğu ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri prognozu için potansiyel bağımsız bir belirleyici olarak değerlendirilebileceği bildirilmiştir (Wang ve diğerleri, 2015).

## ANTİKANSER İLAÇLARIN ETKİNLİĞİNİ ARTIRMADA RNAi

Klinik ortamlarda kombinasyon kemoterapisi, kanseri tedavi etmek için birden fazla kemoterapötik ajanın gruplandırılmasını ifade eder. Kombinasyon stratejisi sadece terapötik verimliliği arttırmaz, aynı zamanda ilaçların sitotoksitesinden kaynaklanan yan etkileri de azaltır (Komarova ve Boland, 2013). RNAi terapötiklerinin diğer anti-kanser terapötikleriyle kombinasyon halinde kullanılmasının, kanser hücrelerini ilaca karşı duyarlı hale getirerek veya kanser hücrelerinin gelişme yeteneğini baskılayarak sonuçları iyileştirdiği gösterilmiştir (Xiao ve diğerleri, 2017). Bu bağlamda; MDR1 genini hedef alan siRNA'ların, doksorubisine dirençli insan hepatoselüler karsinoma Bel-7402/ADM hücrelerinde MDR1 mRNA ekspresyonunu etkili bir şekilde susturduğu ve ksenograft tümör modelinde doksorubisine karşı çoklu ilaç direncini tersine çevirdiği bildirilmiştir (Yang ve diğerleri, 2016).

Birçok antikanser terapötik ajan, kanser hücrelerinde apoptozun indüksiyonu yoluyla etki eder, dolayısıyla azalan apoptoz, ilaç direncini destekler. Bu nedenle, kanser hastalarında ilaç direnci, kanser hücrelerinde azalmış apoptozla da ilişkilendirilebilir. Dolayısıyla, kanserli hücrelerin apoptoza karşı artan direncinin, kanserli hücrelerin ayırt edici özelliği olduğu ve kanseri tedavi etmeye yönelik terapötik yaklaşımların geliştirilmesi için kullanılabileceği sonucuna varılabilir (Kumar ve diğerleri, 2022). Yapılan bir çalışmada, mesane kanseri hücrelerinde kemoterapinin etkinliğini arttırmak için siRNA yoluyla antiapoptotik genlerin inhibisyonu incelenmiştir. siRNA ile inhibisyonun ardından hücreler sisplatin veya mitomisin C ile muamele edilmiştir. Araştırmacılar, hedeflenen antiapoptotik genlerin başarılı bir şekilde engellenmesiyle mesane kanseri hücrelerinin sisplatin ve mitomisin C'ye karşı yeniden duyarlı hale geldiğini bildirmiştir (Kunze ve diğerleri, 2012). Benzer şekilde başka bir araştırma grubu, siRNA aracılı olarak livin geninin susturduklarında tümör hücrelerinde apoptozun başarılı bir şekilde indüklendiğini bildirmiştir (Crnkovic-Mertens ve diğerleri, 2003).

Genetik düzeyde, birçok gen, hücrelerin kanserden korunmasında hayati rol oynar ve bu tür genlerdeki herhangi bir mutasyon, kanserin tedavisinde aksamaya neden olur. Yapılan araştırmalar, bağışıklık tepkisiyle ilgili genlerin potansiyel bir hedef olabileceğini ve kanser hücrelerinin aracılık ettiği bağışıklık baskılamasının tersine çevrilmesinin kanser tedavisinde etkili bir

yaklaşım olabileceğini göstermiştir (Farkona ve diğerleri, 2016; Kumar ve diğerleri, 2022). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, doksorubisinin PD-1 hedefli siRNA ile kombinasyonunun immünojenik hücre ölümünün indüklemesi ve immünosupresyonun tersine çevrilmesi üzerindeki etkisini incelenmiştir. Tümöre infiltre eden T lenfositlerinde belirgin bir artış olduğu, PD-1 hedefli siRNA tarafından interferon- $\gamma$  ekspresyonunun iyileştirildiği ve doksorubisinin immünojenik hücre ölümü etkisinde önemli bir artışa neden olduğu bildirilmiştir (Chen ve diğerleri, 2020).

Kanser hücreleri, metastatik yayılımının yanı sıra çoğalmak, yeterli oksijen ve besin ihtiyaçlarını karşılamak ve atık ürünleri uzaklaştırmak için anjiyojenik moleküllerin desteğiyle yeni kan damarları geliştirir. Bu nedenle, anjiyojenik moleküllerin aktivitesinin engellenmesi kanserlerin tedavisine yönelik ilaçları güçlendirmek için de kullanılabilir. Örneğin, VEGF siRNA ve antikanser ilaçların kombinasyonunun, ilaçların tek başına uygulanmasıyla karşılaştırıldığında daha iyi antitümör aktivitesine sahip olduğu rapor edilmiştir. VEGF siRNA-kemo dirençli gen kombinasyonlarının da anjiyogenezini etkili bir şekilde inhibe ettiği bildirilmiştir (Tekade ve diğerleri, 2016; Kumar ve diğerleri, 2022).

## KANSER TEDAVİSİ İÇİN RNAi'NİN KLİNİK UYGULAMASINI ENGELLEYEN SINIRLAMALAR

*In vitro* ve *in vivo* modellerde tümör ilerlemesinin baskılanmasında RNAi kullanımının umut verici sonuçlarına rağmen, klinik tedavide uygulanması hala beklemededir. Bunların klinik kullanımını sınırlayan ana engeller arasında (i) RNazlar tarafından hızlı bozunma ve vücuttan temizlenme (kararsızlık), (ii) yetersiz hücre veya doku penetrasyonu, (iii) zayıf endozomal kaçış, (iv) bağışıklık tepkisinin uyarılması ve (v) yan etkilere neden olan hedef dışı etkiler yer alır (Wang ve diğerleri, 2017; Dowdy, 2017; Segal ve Slack, 2020; Ganju ve diğerleri, 2017, Kara ve diğerleri, 2022).

Genel olarak biyolojik sıvılarda RNA bazlı terapötikler çok kararsızdır ve endojen nükleazlar tarafından parçalanmaya karşı oldukça hassastır. Enjeksiyonu takiben, çıplak oligonükleotidlerin kan dolaşımında birkaç dakikalık yarılanma ömrü gösterdiği rapor edilmiştir (Soutschek ve diğerleri, 2004; Shin ve diğerleri, 2018; Kara ve diğerleri, 2022). Parçalanmış RNAi daha sonra böbrek tarafından filtrelenir ve fagositler ve retiküloendotelial sistem

tarafından alınır (Hickerson ve diğerleri, 2008; Sarett ve diğerleri, 2015). Retiküloendotelyal sistemde fagozom, yabancı nükleik asitlerin fagositozu ile oluşturulur; burada oligonükleotidler, nükleazlar tarafından parçalanarak lizozomla bütünleşir (Ganju ve diğerleri, 2017; Ku ve diğerleri, 2016; Juliano ve diğerleri, 2009, Kara ve diğerleri, 2022).

RNAi tedavisi için RNAi moleküllerinin hedef hücrenin sitoplazmasına ulaşması gerekir. RNAi moleküllerinin büyük moleküler ağırlık, düşük stabilite, negatif yük ve yüksek yapısal sertlik gibi fizikokimyasal özellikleri sitoplazmik dağıtımını zorlaştırır (Whitehead ve diğerleri, 2009). Hücre zarlarının bir bileşeni olan lipit çift katmanı, küçük ve hafif hidrofobik moleküllerin pasif difüzyonuna izin verirken büyük ve yüklü moleküllerin geçişini engeller. RNAi molekülleri de negatif yüklü olduğundan ve suda çözünemediğinden pasif olarak hücrelere giremez (Ahmadzade ve diğerleri, 2018). Ancak bu sınırlama, endositoz yoluyla transmembran taşınmasıyla aşılr (Meade ve Dowdy, 2007). RNAi moleküllerinin dokuya alımı başka bir zorluktur. Bunun için RNAi moleküllerinin damarın endotelyum-sıkı bağlantı noktalarından geçmesi gerekir. Bu bağlamda, tümör damarlarının sızdıran ve süresiz özelliklerinden dolayı RNAi moleküllerinin transmembran geçişi normal dokulara göre daha kolay gerçekleşir (Wang ve diğerleri, 2010). Ancak tümör mikro damar sisteminin, damarların düzensiz organizasyonu ve heterojen aşırı geçirgenliği de dahil olmak üzere kendi fizyolojik engelleri vardır (Danquah ve diğerleri, 2011).

Küçük moleküllü ilaçların aksine, RNA terapötikleri hücre zarı lipit çift katmanını pasif difüzyonla geçmek için çok büyük, yüklü ve hidrofildir. Bunun yerine çeşitli endositoz biçimleriyle hücrelere alınırlar. Endozomlar ayrıca RNA terapötiklerinin büyük çoğunluğunun (~%99) sitoplazmaya girmesini önleyen çift katmanlı bir lipit bariyerinden oluşur. Endositozun ardından erken endozomlar geç endozomlara olgunlaşır ve daha sonra lizozomlarla birleşir (Dowdy, 2023). Lizozomlarda ise spesifik enzimler tarafından parçalanırlar. Bu nedenle RNA bazlı terapötiklerin etkili bir şekilde iletilmesinde sınırlayıcı bir adım, endozomal kaçışı kolaylaştırmak ve terapötiklerin sitozolik dağıtımını sağlamaktır (Varkouhi, 2011).

Yüksek dozda RNAi'nin doğuştan gelen bağışıklık tepkisini ve sitokin üretimini indüklediği rapor edilmiştir (Meng ve Lu, 2017). Eksojen siRNA'ların veya miRNA'ların yabancı doğası nedeniyle, konakçı sistem bunları patojen

olarak kabul eder. Bu nedenle, vücudun bağışıklık sisteminin doğuştan gelen bağışıklık tepkisi, bu RNA'ları ortadan kaldırmak ve bölgeye özgü birikimlerini engellemek için sistemik siRNA veya miRNA iletimi üzerine tetiklenebilir (Kara ve diğerleri, 2022). Bu nedenle, RNAi kaynaklı doğuştan gelen bağışıklık uyarımı, özellikle klinik çalışmalarda RNAi güvenliğini ve etkinliğini de azaltabilir (Valenzuela ve diğerleri, 2015).

Hedef dışı etki, siRNA'ların veya miRNA'ların biyolojik rollerinin anlaşılmasını zorlaştırması ve RNA bazlı terapötiklerin güvenliğini tehlikeye atması nedeniyle RNA terapileri açısından bir başka önemli endişe olarak ortaya çıkmıştır. siRNA bazlı RNAi mekanizmasında spesifik olarak sadece hedef genin etkilendiği bilinmesine rağmen ne yazık ki bazen spesifik olmayan hedef dışı etkiler de mümkün olabilmektedir. Bu da hedef dışı genlerin istenmeyen gen susturulmasına neden olabilir (Kara ve diğerleri, 2022). Bu nedenle, bu tür hedef dışı etkileri azaltacak veya ortadan kaldıracak stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır.

## **KANSER TEDAVİSİNDE RNAi'NİN KLİNİK UYGULAMASINI KOLAYLAŞTIRAN SON GELİŞMELER**

RNAi tedavisinin yukarıda ifade edilen çeşitli sınırlamalarının üstesinden gelebilmek amacıyla araştırmacılar çeşitli modifikasyonlar bulmaya odaklanmıştır. Bu araştırmaların bir sonucu olarak, bu sınırlamaların çoğuna çözüm bulunmuştur. siRNA'ların nükleazlar tarafından bozunması problemi, siRNA sentezi için kimyasal olarak modifiye edilmiş oligonükleotit yapı bloklarının kullanılmasıyla veya siRNA'ların kimyasal modifikasyonu ile aşılmaktadır (Kara ve diğerleri, 2022). Benzer şekilde, siRNA'ların dağılım yarı ömrü de siRNA'ların tokoferol, kolesterol ve diğer lipitlere konjugasyonu ile arttırılmıştır (Nishina ve diğerleri, 2008; Wolfrum ve diğerleri, 2007; Kara ve diğerleri, 2022). siRNA'ların zayıf endozomal kaçış sorunu ise, siRNA'ların endozomal salınım sinyal peptidine veya bir nanotaşıyıcıya bağlı nükleer lokalizasyon sinyal peptidine konjuge edilmesiyle aşılmıştır (Detzer ve diğerleri, 2009; Liu ve Franzen, 2008, Kara ve diğerleri, 2022)

## **SONUÇ**

Deneyisel kanıtlar RNAi bazlı tedavilerin kanser tedavisinde son derece etkili olduğunu göstermiş olsa da, bu tedavilerin kliniğe başarılı bir şekilde geçiş yapabilmesi için bunların etkinliğini ve güvenliğini doğrulayan daha fazla

klirik öncesi çalışma yapılması gerekmektedir. RNAi terapötikleri ile devam eden klinik çalışmalar, bu terapötiklerin güvenli olabileceğini ve çeşitli kanserlerde daha ileri klinik uygulamalara girebileceğini düşündürmektedir.

**KAYNAKLAR**

1. Adhami, M., Haghdoost, A. A., Sadeghi, B., & Malekpour Afshar, R. (2018). Candidate miRNAs in human breast cancer biomarkers: a systematic review. *Breast Cancer*, 25, 198-205.
2. Ahmadzada, T., Reid, G., & McKenzie, D. R. (2018). Fundamentals of siRNA and miRNA therapeutics and a review of targeted nanoparticle delivery systems in breast cancer. *Biophysical reviews*, 10, 69-86.
3. Chen, S., Li, D., Du, X., He, X., Huang, M., Wang, Y., ... & Wang, J. (2020). Carrier-free nanoassembly of doxorubicin prodrug and siRNA for combinationally inducing immunogenic cell death and reversing immunosuppression. *Nano Today*, 35, 100924.
4. Chen, Y., Fu, L. L., Wen, X., Liu, B., Huang, J., Wang, J. H., & Wei, Y. Q. (2014). Oncogenic and tumor suppressive roles of microRNAs in apoptosis and autophagy. *Apoptosis*, 19, 1177-1189.
5. Crnkovic-Mertens, I., Hoppe-Seyler, F., & Butz, K. (2003). Induction of apoptosis in tumor cells by siRNA-mediated silencing of the livin/ML-IAP/KIAP gene. *Oncogene*, 22(51), 8330-8336.
6. Danquah, M. K., Zhang, X. A., & Mahato, R. I. (2011). Extravasation of polymeric nanomedicines across tumor vasculature. *Advanced drug delivery reviews*, 63(8), 623-639.
7. de Jesus, D. K. O., da Silva Neto, J. F., & de Godoy, S. M. (2023). RNAi gene therapy in Cancer treatment. *Brazilian Journal of Development*, 9(05), 15008-15019.
8. De Palma, F. D. E., Salvatore, F., Pol, J. G., Kroemer, G., & Maiuri, M. C. (2022). Circular RNAs as potential biomarkers in breast cancer. *Biomedicines*, 10(3), 725.
9. Detzer, A., Overhoff, M., Wünsche, W., Rompf, M., Turner, J. J., Ivanova, G. D., ... & Sczakiel, G. (2009). Increased RNAi is related to intracellular release of siRNA via a covalently attached signal peptide. *Rna*, 15(4), 627-636.
10. Dowdy, S. F. (2017). Overcoming cellular barriers for RNA therapeutics. *Nature biotechnology*, 35(3), 222-229.
11. Dowdy, S. F. (2023). Endosomal escape of RNA therapeutics: How do we solve this rate-limiting problem?. *Rna*, 29(4), 396-401.

12. Farkona, S., Diamandis, E. P., & Blasutig, I. M. (2016). Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer?. *BMC medicine*, *14*(1), 1-18.
13. Ganju, A., Khan, S., Hafeez, B. B., Behrman, S. W., Yallapu, M. M., Chauhan, S. C., & Jaggi, M. (2017). miRNA nanotherapeutics for cancer. *Drug discovery today*, *22*(2), 424-432.
14. Hanna, J., Hossain, G. S., & Kocerha, J. (2019). The potential for microRNA therapeutics and clinical research. *Frontiers in genetics*, *10*, 478.
15. Hickerson, R. P., Vlassov, A. V., Wang, Q., Leake, D., Ilves, H., Gonzalez-Gonzalez, E., ... & Kaspar, R. L. (2008). Stability study of unmodified siRNA and relevance to clinical use. *Oligonucleotides*, *18*(4), 345-354.
16. Juliano, R., Bauman, J., Kang, H., & Ming, X. (2009). Biological barriers to therapy with antisense and siRNA oligonucleotides. *Molecular pharmaceuticals*, *6*(3), 686-695.
17. Kadera, B. E., Li, L., Toste, P. A., Wu, N., Adams, C., Dawson, D. W., & Donahue, T. R. (2013). MicroRNA-21 in pancreatic ductal adenocarcinoma tumor-associated fibroblasts promotes metastasis. *PloS one*, *8*(8), e71978.
18. Kahraman, M., Röske, A., Laufer, T., Fehlmann, T., Backes, C., Kern, F., ... & Schrauder, M. G. (2018). MicroRNA in diagnosis and therapy monitoring of early-stage triple-negative breast cancer. *Scientific reports*, *8*(1), 11584.
19. Kara, G., Calin, G. A., & Ozpolat, B. (2022). RNAi-based therapeutics and tumor targeted delivery in cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *182*, 114113.
20. Komarova, N. L., & Boland, C. R. (2013). Calculated treatment. *Nature*, *499*(7458), 291-292.
21. Korpál, M., Lee, E. S., Hu, G., & Kang, Y. (2008). The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(22), 14910-14914.
22. Ku, S. H., Jo, S. D., Lee, Y. K., Kim, K., & Kim, S. H. (2016). Chemical and structural modifications of RNAi therapeutics. *Advanced drug delivery reviews*, *104*, 16-28.



23. Kumar, S., Sharawat, S. K., Ali, A., Gaur, V., Malik, P. S., Kumar, S., ... & Guleria, R. (2020). Identification of differentially expressed circulating serum microRNA for the diagnosis and prognosis of Indian non-small cell lung cancer patients. *Current problems in cancer*, 44(4), 100540.
24. Kumar, K., Rani, V., Mishra, M., & Chawla, R. (2022). New paradigm in combination therapy of siRNA with chemotherapeutic drugs for effective cancer therapy. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*, 3, 100103.
25. Kunze, D., Erdmann, K., Froehner, M., Wirth, M. P., & Fuessel, S. (2012). siRNA-mediated inhibition of antiapoptotic genes enhances chemotherapy efficacy in bladder cancer cells. *Anticancer research*, 32(10), 4313-4318.
26. Lee, Y. S., & Dutta, A. (2009). MicroRNAs in cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 4, 199-227.
27. Lee, L. W., Zhang, S., Etheridge, A., Ma, L., Martin, D., Galas, D., & Wang, K. (2010). Complexity of the microRNA repertoire revealed by next-generation sequencing. *Rna*, 16(11), 2170-2180.
28. Li, X., Kleeman, S., Coburn, S. B., Fumagalli, C., Perner, J., Jammula, S., ... & Fitzgerald, R. C. (2018). Selection and application of tissue microRNAs for nonendoscopic diagnosis of Barrett's esophagus. *Gastroenterology*, 155(3), 771-783.
29. Liu, Y., & Franzen, S. (2008). Factors determining the efficacy of nuclear delivery of antisense oligonucleotides by gold nanoparticles. *Bioconjugate chemistry*, 19(5), 1009-1016.
30. Maduri, S. (2015). Applicability of RNA interference in cancer therapy: current status. *Indian Journal of Cancer*, 52(1), 11-21.
31. Maguregui, A., & Abe, H. (2020). Developments in siRNA modification and ligand conjugated delivery to enhance RNA interference ability. *ChemBioChem*, 21(13), 1808-1815.
32. Mansoori, B., Shotorbani, S. S., & Baradaran, B. (2014). RNA interference and its role in cancer therapy. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 4(4), 313.
33. Meade, B. R., & Dowdy, S. F. (2007). Exogenous siRNA delivery using peptide transduction domains/cell penetrating peptides. *Advanced drug delivery reviews*, 59(2-3), 134-140.

34. Meng, Z., & Lu, M. (2017). RNA interference-induced innate immunity, off-target effect, or immune adjuvant?. *Frontiers in immunology*, 8, 331.
35. Nishina, K., Unno, T., Uno, Y., Kubodera, T., Kanouchi, T., Mizusawa, H., & Yokota, T. (2008). Efficient in vivo delivery of siRNA to the liver by conjugation of  $\alpha$ -tocopherol. *Molecular therapy*, 16(4), 734-740.
36. Peng, Y., & Croce, C. M. (2016). The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, 1(1), 1-9.
37. Qadir, M. I., & Faheem, A. (2017). miRNA: a diagnostic and therapeutic tool for pancreatic cancer. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 27(3).
38. Sarett, S. M., Kilchrist, K. V., Miteva, M., & Duvall, C. L. (2015). Conjugation of palmitic acid improves potency and longevity of siRNA delivered via endosomolytic polymer nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(9), 3107-3116.
39. Segal, M., & Slack, F. J. (2020). Challenges identifying efficacious miRNA therapeutics for cancer. *Expert opinion on drug discovery*, 15(9), 987-991.
40. Shao, X., Huang, P., Shi, L., Lei, L., Cao, W., Chen, Z., ... & Zheng, Y. (2019). MicroRNA and LncRNA Expression Profiles in Human Estrogen Receptor Positive Breast Cancer. *Clinical laboratory*, 65.
41. Shin, H., Park, S. J., Yim, Y., Kim, J., Choi, C., Won, C., & Min, D. H. (2018). Recent advances in RNA therapeutics and RNA delivery systems based on nanoparticles. *Advanced Therapeutics*, 1(7), 1800065.
42. Si, M. L., Zhu, S., Wu, H., Lu, Z., Wu, F., & Mo, Y. Y. (2007). miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*, 26(19), 2799-2803.
43. Smith, E. S., Whitty, E., Yoo, B., Moore, A., Sempere, L. F., & Medarova, Z. (2022). Clinical applications of short non-coding RNA-based therapies in the era of precision medicine. *Cancers*, 14(6), 1588.
44. Smolarz, B., Durczyński, A., Romanowicz, H., Szyłło, K., & Hogendorf, P. (2022). miRNAs in cancer (review of literature). *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2805.
45. Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., ... & Vornlocher, H. P. (2004). Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, 432(7014), 173-178.

46. Tekade, R. K., Tekade, M., Kesharwani, P., & D'Emanuele, A. (2016). RNAi-combined nano-chemotherapeutics to tackle resistant tumors. *Drug discovery today*, 21(11), 1761-1774.
47. Tian, L., Shan, W., Zhang, Y., Lv, X., Li, X., & Wei, C. (2016). Up-regulation of miR-21 expression predicate advanced clinicopathological features and poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Pathology & Oncology Research*, 22(1), 161-167.
48. Tian, Z., Liang, G., Cui, K., Liang, Y., Wang, Q., Lv, S., ... & Zhang, L. (2021). Insight into the prospects for RNAi therapy of cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 644718.
49. Traber, G. M., & Yu, A. M. (2023). RNAi-based therapeutics and novel RNA bioengineering Technologies. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 384(1), 133-154.
50. Valenzuela, R. A. P., Suter, S. R., Ball-Jones, A. A., Ibarra-Soza, J. M., Zheng, Y., & Beal, P. A. (2015). Base modification strategies to modulate immune stimulation by an siRNA. *ChemBioChem*, 16(2), 262-267.
51. Varkouhi, A. K., Scholte, M., Storm, G., & Haisma, H. J. (2011). Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *Journal of Controlled Release*, 151(3), 220-228.
52. Wang, F., Lou, J. F., Cao, Y., Shi, X. H., Wang, P., Xu, J., ... & Wang, H. (2015). miR-638 is a new biomarker for outcome prediction of non-small cell lung cancer patients receiving chemotherapy. *Experimental & molecular medicine*, 47(5), e162-e162.
53. Wang, J., Lu, Z., Wientjes, M. G., & Au, J. L. S. (2010). Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers. *The AAPS journal*, 12, 492-503.
54. Wang, T., Shigdar, S., Al Shamaileh, H., Gantier, M. P., Yin, W., Xiang, D., ... & Duan, W. (2017). Challenges and opportunities for siRNA-based cancer treatment. *Cancer letters*, 387, 77-83.
55. Whitehead, K. A., Langer, R., & Anderson, D. G. (2009). Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nature reviews Drug discovery*, 8(2), 129-138.
56. Wolfrum, C., Shi, S., Jayaprakash, K. N., Jayaraman, M., Wang, G., Pandey, R. K., ... & Stoffel, M. (2007). Mechanisms and optimization of in vivo

- delivery of lipophilic siRNAs. *Nature biotechnology*, 25(10), 1149-1157.
57. Xiao, B., Ma, L., & Merlin, D. (2017). Nanoparticle-mediated co-delivery of chemotherapeutic agent and siRNA for combination cancer therapy. *Expert opinion on drug delivery*, 14(1), 65-73.
58. Yang, H., Ding, R., Tong, Z., Huang, J., Shen, L., Sun, Y. U., ... & Meng, X. (2016). SiRNA targeting of MDR1 reverses multidrug resistance in a nude mouse model of doxorubicin-resistant human hepatocellular carcinoma. *Anticancer Research*, 36(6), 2675-2682.
59. Zhang, N., Hu, X., Du, Y., & Du, J. (2021). The role of miRNAs in colorectal cancer progression and chemoradiotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 134, 111099.
60. Zhang, Y., Zhang, D., Wang, F., Xu, D., Guo, Y., & Cui, W. (2015). Serum miRNAs panel (miR-16-2\*, miR-195, miR-2861, miR-497) as novel non-invasive biomarkers for detection of cervical cancer. *Scientific reports*, 5(1), 17942.
61. Zhang, M. M., Bahal, R., Rasmussen, T. P., Manautou, J. E., & Zhong, X. B. (2021). The growth of siRNA-based therapeutics: Updated clinical studies. *Biochemical pharmacology*, 189, 114432.
62. Zhang, S., Liu, C., Zou, X., Geng, X., Zhou, X., Fan, X., ... & Zhu, W. (2021). MicroRNA panel in serum reveals novel diagnostic biomarkers for prostate cancer. *PeerJ*, 9, e11441.
63. Zhu, H. B., Yang, K., Xie, Y. Q., Lin, Y. W., Mao, Q. Q., & Xie, L. P. (2013). Silencing of mutant p53 by siRNA induces cell cycle arrest and apoptosis in human bladder cancer cells. *World journal of surgical oncology*, 11(1), 1-11.
64. Zhu, X., Xu, Y., Solis, L. M., Tao, W., Wang, L., Behrens, C., ... & Shi, J. (2015). Long-circulating siRNA nanoparticles for validating Prohibitin1-targeted non-small cell lung cancer treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(25), 7779-7784.



## BÖLÜM 8

### MOLEKÜLER BİYOLOJİDE BİYOİNFORMATİK VE OMİK TEKNOLOJİLERİ

Biyolog Bilgehan MİLLİDERE<sup>1</sup>

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.10251392>

---

<sup>1</sup> Biyolog, Biyoinformatik Analisti , Viagen; Aşağı Öveçler Mahallesi 1324.cad.  
No:39/A Çankaya/ANKARA [bilgehanmil@gmail.com](mailto:bilgehanmil@gmail.com)



**Biyobilişim** veya **Biyoenformatik**, özellikle moleküler biyoloji ile bilgisayar teknolojisini ve bununla ilişkili veri işleme tabanlı program ve aygıtlarını bünyesinde bulunduran bilimsel, önemli bir disiplin olarak bilinir. Bir başka tanımlama yaklaşımına göre biyoinformatik, biyolojik ve moleküler biyolojik yöntemlerle elde edilen karmaşık verilerin derlenmesi, analiz edilmesi, yorumlanması olarak ifade edilebilir. Buradan hareketle biyoinformatik, bilgisayar bilimi ve biyoloji bilimi arasındaki ortak yüzeyde disiplinler arası bir araştırma alanıdır. Biyoinformatik aynı zamanda; biyolojik verilerin elde edilmesi ve saklanması için veritabanlarının oluşturulması, DNA, RNA ve protein gibi biyolojik makromoleküllerle ilgili bilginin depolama, erişim, kullanım ve dağıtımını için bilgisayarın kullanıldığı teknolojidir. Omik teknolojilerinde kullanılan omik terimi ise, Latince -ome ekinden türemiş olup, 'pek çok', anlamına gelmekte ve eklenildiği adın temsil ettiği yapı veya oluşumların 'bütünü', temsil etmektedir. Bu nedenle omik teknolojileri içerikli yapılan çalışmalarda bir veya birkaç ölçüm değil, incelenen matriksin tümünde pek çok ölçüm gerçekleştirilmektedir. Günümüzde pek çok omik teknolojisi bulunmaktadır. Bunlardan genomik; herhangi bir canlının bütün yapısal ve işlevsel fonksiyonlarını kodlayan tüm genlerini teker teker tanımlayarak bu genlerin birbirleri ve çevre ile etkileşimlerini, zaman, yer ve miktar olarak üretim ve aktivasyonlarının kontrolünü bütünsel olarak inceleyen ve ortaya çıkarılan bilgiyi bilgisayar ve veri tabanlarında işleyen, anlamlandıran ve saklayan bilim dalı olarak tanımlanırken; proteomik, farklı koşullarda hücre, doku veya vücut sıvılarındaki proteinlerin kantitatif olarak analiz edilme teknolojisi olarak tarif edilmektedir.

## **BİYOİNFORMATİK**

Uygulamalı matematik, bilgisayar bilimleri ve istatistiğin bilişim teknolojilerinden faydalanarak moleküler biyolojinin kavramsallaştırılması, büyük boyuttaki biyolojik verilerin düzenlenmesi ve anlaşılmasını sağlayan bilim dalıdır. Basitçe moleküler biyoloji için biyoinformatik bir bilgi yönetim sistemi olup bir çok pratik uygulama alanına sahiptir (1). Biyoinformatik yöntemleri ile elde edilen biyolojik veriler, gün geçtikçe çoğalmaktadır (2).

Biyoinformatik modern biyolojinin iki temel bilgi yaklaşımını içermektedir:



1.Genetik bilgi akışı: Bir organizmanın DNA'sı incelenerek özelliklerinin belirlenmesinden, incelenen bu organizma türünün oluşturduğu toplulukların karakteristik özelliklerine kadar olan bilgi akışını içerir.

2.Deneysel bilgi akışı: Biyolojik vakalar gözlemlenerek elde edilen bilgiler, tarif edici matematiksel modeller ile ortaya konur, daha sonra bu modellerin doğru olup olmadığı, yeni kurgulanan deneyler ile doğrulanır.

Son zamanlarda, temel biyolojik araştırmaların klinik tıp uygulamaları ve klinik tıp bilgi sistemleri üzerindeki etkisi daha da belirleyici olmuş ve bugün yeni kuşak epidemiyolojik, tanı, teşhis ve tedavi amaçlı modüllerin ortaya çıkmasına yol açmıştır. Biyoinformatik tabanlı çalışmalar, temel bilimsel araştırmalara yönelik olduğu belirlenmekle beraber, önümüzdeki dönemlerde, klinik araştırmalardaki bilgi akışı için vazgeçilmez olacağı açıktır. Örneğin hastaların uygulanan tedavileri çerçevesinde, tıbbi genetik kayıtlarında giderek artan bir sıklıkla DNA dizilim bilgileri yer almaya başlamış ve bu durum gittikçe daha da aracağı açık olarak görülmektedir. Buradan hareketler. Biyoinformatik tabanlı araştırmalar için geliştirilen algoritmaların, çok yakında klinik bilgi sistemlerine entegre olması beklenmektedir (2).

Bu alanı kısaca tanımlamanın bir yolu da, Biyoinformatik araçların kullanıldığı genel Biyolojik ve Moleküler Biyoloji ile ilgili araştırma konularını özetlemek olabilir:

### **Metodolojik çalışmalar**

1. DNA sıralama ve dizilimi araştırmaları
2. Protein sıralama ve dizilimi araştırmaları
3. Makromoleküler yapılar olan DNA, RNA, proteinler ile ilgili üç boyutlu yapı araştırmaları
4. Potansiyel terapötik maddeler, aktif peptidler, ribozimler vs gibi nispeten küçük moleküllerin kendi ligandlarıyla etkileşimlerinin araştırılması
5. Heterojen biyolojik veritabanlarının entegrasyonu
6. Biyolojik enformasyonun paylaşımının kolaylaştırılması
7. Bilgisayar ile otomize edilmiş veri analizi ve iletimi
8. Etkileşimde bulunan gen ürünleri için bilgi ağları oluşturulması

9. Kimyasal reaksiyonlardan, hücrelerarası haberleşmeye kadar pek çok biyolojik aktivite akış sürecinin matematiksel modellenmesi ve simülasyonu
10. Geniş çaplı biyolojik araştırmalardan (GENOM projeleri gibi) çıkan sonuçların analizi

### **Moleküler Biyolojideki çalışmalar**

1. Proteinlerin yapılarının ve fonksiyonlarının belirlenmesi
2. Biyolojik aktiviteyi arttıran ya da engelleyen küçük moleküllerin tasarlanması
3. Karışık genetik fonksiyon ya da regülasyon (düzenlenme) faaliyetlerinin tanımlanması
4. Tıbbi ya da endüstriyel hedefli yeni makromoleküller üretilmesi
5. Genetik faktörlerin, ortaya çıkabilecek olan hastalık yatkınlığına etkilerinin ortaya çıkarılması

### **BİYOİNFORMATIĞIN AMACI**

Biyoinformatiğin amaçları, üç (3) temel yalaşım ile açıklanabilir. Birincisi, biyolojik ya da moleküler Biyoloji tabanlı verilere araştırmacıların kolaylıkla ulaşabileceği şekilde düzenlemek ve yeni veriler elde edildikçe hızlı bir şekilde var olan verilere eklenerek yeni güncellemelerin yapılarak kaydetmektir. İkinci amacı, veri bankalarında biriktirilen verilerin, incelemesi yapılabilmeye kadar, herhangi bir şekilde kullanılmaları durumunda, bu verilerin anlamlı duruma gelmesini sağlayan yeni araçlar ve yeni kaynaklar geliştirmektir. Biyoinformatiğin son amacı ise üretilen bu araçların ör- yeni veri tabanını işleyecek programların geliştirilmesi gibi, kullanılarak verileri analiz etmek ve biyolojik olarak anlamlı ve farklı amaçlar için kullanılabilir bilgiler haline dönüştürmektir (3). Buradan hareketle biyoinformatik, Biyoloji ve Moleküler Biyolojide çalışılan konunun ör- canlı bir hücreyi ve bu hücrenin moleküler seviyedeki fonksiyonlarını ile ilgili verilerinin işlenmesi ile, bu konuların daha iyi anlaşılması sağlanmış olur. Biyoinformatikte kullanılan ve işlenen, bilgi kaynaklarını tüm genom verileri, genom dizileri, makromoleküler yapılar, ham DNA dizileri ve protein dizileri olarak gruplandırmak olabilir.

## **BIYOİNFORMATİĞİN KAPSAMI**

Biyoinformatik alan itibarıyla genellikle, iki alt alandan meydana gelmektedir denilebilir. İlki, bilişimsel (computational) araçlar ile veritabanlarının gelişmesi, genişletilmesi diğeri ise yaşayan sistemleri daha iyi anlayabilmek için biyolojik bilginin oluşturulmasında ve bu araç veritabanlarının kullanımını, işlenmesini kapsamaktadır. Bu iki alt alan birbirine bağımlı, tamamlayıcı, destekleyici bir yol izleyerek çalışmaktadır. Araçların geliştirilmesi aşaması, bilgisayar yazılımları oluşturulması, biyolojik veritabanlarının oluşturulması ve çeşitlenmesi gibi; dizi analizi, fonksiyon analizi ve yapı analizi bölümlerini kapsamaktadır. İfade edilen araçların ise, moleküler biyoloji ve genomik çalışmalarının üç farklı alanında kullanılmakta olduğunu görmekle beraber bu alanlar moleküler fonksiyon analizleri, moleküler yapı analizleri ve moleküler dizi analizlerini içermektedir. Biyolojik verilerin analizinde karşımıza çıkan sorun ve zorluklar, çoğunlukla yeni ve daha iyi hesaplama analiz programlarını içeren araçlarının geliştirilmesini sağlamıştır (4).

## **BIYOİNFORMATİK VERİTABANLARI**

Biyolojik ve Moleküler Biyoloji tabanlı verilerin depolanması, saklanması, oluşturulması ve sistemdeki bulunan bu verilerin güncellenmesi için biyolojik bir veri tabanı kullanılmaktadır. Biyolojik veri tabanı, bahsedilen işlemleri yapabilmesi için tasarlanmış bilgisayar yazılımı ile bütünlük oluşturan bir veri yığıdır. Bir veri tabanı, tek bir dosyada çok sayıda kayıttan oluşun ve bu kayıtların her birinin de aynı bilgi setini içermesi gerekmektedir (5). Biyolojik ve Moleküler Biyoloji tabanlı çalışmalarda, kullanıcıların bu veritabanında saklanan bilgilerden faydalanabilmesi için iki özelliğin daha olması gerekmektedir: 1- Bilgiye kolay erişim, 2- sadece özel bir biyolojik soruya cevap vermek için ihtiyaç duyulan bilgiyi ayırmaya yarayan bir yöntem olması beklenir. Bu iki özellikten hareketle; kullanılabilir nükleotid dizilerinin erişimine açık olan üç temel veritabanı bulunmaktadır. Bu üç veritabanı şu şekilde verilmektedir (6);

- 1- Avrupa biyoinformatik Enstitüsü tarafından oluşturulan EMBL(İngiltere-1982)
- 2- NCBI tarafından oluşturulan Genbank (Amerika-1982)

3- Japonya tarafından oluşturulan DDBJ(Japonya–1988) Bu veritabanları aynı sekansları kullanmaktadırlar ancak bu sekansları açıklarken farklı formatlardan faydalanmaktadırlar.

Protein dizi verileri ile ilgili başlıca hizmet sağlayan veritabanları ise aşağıda verilmektedir;

1. GenBank
2. Swiss-Prot
3. EMBL Matematiksel Biyoloji: Matematikle ilişkili biyolojik süreçler ve sistemler için istatistiksel modelleme

## OMİK TEKNOLOJİLERİNE GENEL BAKIŞ

Omik (omics) sözcüğü, Latince’de–ome sesinden türetilmiş olup her şey, bütünlük, bütün gibi anlamlara gelmektedir (7). Bahsedilen ek, kelimelerin sonuna gelerek (genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi) genler, proteinler, transkriptler ve metabolitler gibi belirli bir grup molekülün küresel bir şekilde araştırıldığı disiplinleri isimlendirilmek üzere kullanılmaktadır (7). Bu disiplinlerin önüne gelen “meta” eki ise, çok çeşitli türlerin bir arada bulunduğu topluluklar üzerinde gerçekleştirilen analizleri (metagenomik, metatranskriptomik ve metaproteomik) ifade etmektedir (7). Omik bilimleri, pek çok bilginin analizine dayanmaktadır ve verilerin yorumlanması için yine biyoinformatik analiz yöntemleri kullanılmaktadır. Analiz edilen bu verilerin birbirleriyle ilişkilendirilmesi, yani multi-omik analizler, hücrelerin fonksiyonu, çok yönlülüğü ve biyoteknoloji alanında kullanılmaları ile ilgili geniş bilgiler sağlamaktadır. 1920’li yıllarda genome kelimesinden türetilen omik terimi 1980’li yıllarda genomik olarak tanımlanmıştır. 1990’lara geldiğinde yaygınlaşmış 2000’li yıllara geldiğinde ise genomik önünü açtığı omik teknolojileri, nutri-genomik, transkriptomik, proteomik, metabolomik, lipidomik, connectomik, lipoproteinomik, immunolomik, glikomik vb. pek çok farklı çalışma alanlarına yayıldığı görülmektedir.

## OMİK TEKNOLOJİLERİ

Herhangi bir organizmanın işlevsel ve yapısal fonksiyonlarını kodlayan bütün genleri ve bu genlerin birbirleri ve çevreleri ile etkileşimleri ve bunların kontrolünü genomik sağlamaktadır (8). Genomik araştırma alanlarına göre, iki gruba ayrılmakta olup bunlar; fonksiyonel genomik ve yapısal genomik olarak

bilinir. Fonksiyonel genomun amacı da genlerin ekspresyonunu biçim, miktar ve zaman açısından genom düzeyinde inceleyerek genlerin fonksiyonlarının öğrenilmesinin yanında organizma açısından öneminin anlaşılmasına da yardımcı olmaktadır. Yapısal genomik ise genetik ve fiziksel haritalama ve DNA baz dizilerinin belirlenmesi yöntemleriyle organizmaların genetik bilgilerinin ortaya konulması sağlamaktadır. Proteom terimi belirli yer ve zamanda bir canlının sahip olduğu ve ifade ettiği bütün farklı proteinlerin toplamı olarak bilinir ve proteom olarak ifade edilir. Proteomik ise, belirli bir zamanda belirli bir yerde bulunan tüm proteinlerin konumlarını (buldukları yerlerini), yapılarını, transkripsiyon sonrası modifikasyonlarını, doku ve hücrelerdeki fonksiyonlarını, diğer proteinlerle ve makro moleküllerle olan etkileşimlerini açıklamaktadır. Metabolomik ise; dokularda, hücrelerde ve fizyolojik sıvılarda karbohidratlar, lipid, vitaminler, hormonlar ve diğer hücre bileşenlerinden ortaya çıkan küçük moleküllü metabolitlerin belirli bir zaman diliminde yüksek verimli teknolojiler kullanılarak tanınması ve miktarının belirlenmesini içerir. Genomik ve proteomik disiplinleri bir organizmanın “ne olabileceğini” açıklarken metabolomik ise “gerçekte ne olduğunu” bilgisini ortaya koymaktadır. Bu sebeple, tüm metabolitlerin detaylı ve kantitatif olarak ölçümü (metabolomik), hastalık teşhisi veya toksik ajanların fenotip üzerindeki etkilerini belirlemede en ideal yöntem olarak görülmektedir (8).

## GENOMİK

Gen bilimi teknolojisi manasına da gelmekte olan genomik, bir canlının ve yahut türün genomunda yer alan bütün genetik yapıtaşlarının belirlenmesi, dizi analizi yapılarak gen haritasının çıkarılması gibi DNA yapı ve işlevlerinin geniş bir şekilde incelenmesi genomik teknolojisi olarak açıklanmaktadır (9). Genetik, bir genin yapı ve işleyişini incelerken genomik, genomdaki tüm genlerin kısaca DNA'nın analiz edilmesi ile etki ve işleyişlerini inceleyen disiplindir. Genomik bilimi aracılığıyla farklı canlılara has genetik bilgiler karşılaştırılabilmekte, organizmalar arasındaki evrimsel benzerlikler araştırılabilmekte ve canlıların ürettikleri proteinlerin sayıları, türleri ve bunların fonksiyonları hakkında bilgi sahibi olunabildiği görülmektedir (9). Genomik disiplini araştırma alanlarına göre yapısal ve fonksiyonel olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Yapısal genomik ve fonksiyonel genomik olmak üzere iki alt birime ayrılan Genomik disiplininde, DNA'nın dizi bilgisinin

belirlenmesi ile ilgili çalışmaları yapısal genomik incelerken fonksiyonel genomik DNA'da anlatım yapan (ekspresyon) bölgelerin ürünleri olan mRNA'ların analizlerini incelemektedir (10).

## **YAPISAL GENOMİK**

DNA baz dizilerinin belirlenmesi, genetik ve fiziksel haritalama yöntemleri gibi çalışmalar sayesinde organizmaların genetik bilgilerinin ortaya konulması sağlamaktadır. Genlerin, kromozomlar üzerinde yerleştiği lokusların gösterilmesine genom haritalaması denmektedir. Hem genetik hem de fiziksel haritalama yöntemleri ile yapılabilen genom haritalanması sayesinde, belirli genlerin yine yerleri belirli bir kromozom üzerindeki yerlerinin birbirlerine olan mesafeleri belirlenebilirken, ilaveten genlerin lineer bir düzene sahip olabilmesi amacıyla grafiksel haritalama işlemi de rak yapılabilmektedir. Aynı zamanda, matematiksel olarak bir genomun analizi de diyebileceğimiz bu metot, gen lokuslarının bulunmasında moleküler biyolojik yöntemler ile karmaşık analiz ve istatistiklerin kullanılması şeklinde de tarif edilebilir. En genel anlamı ile, lokalizasyonu aranan gen ile lokalizasyonu bilinen bir genetik belirleyicinin (marker)'ın, nesiller arasında birlikte kalıtılmasının test edilmesi temeline dayanmaktadır. Bu yapılan analizler, özellikle genetik hastalıkların tanısında son derece önemli bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Genomik DNA'nın bütününe bölümlere ayırarak kozmid, maya yapay kromozomları (YAC) veya bakteri yapay kromozomları (BAC) gibi vektörlere taşınarak her kromozomun bir kitaplığının oluşturulması ve bütün kromozomlar seviyesinde birbirini takip eden klonların belirlenmesi ile oluşturulan harita yöntemine ise Fiziksel haritalama denmektedir (11). Genomik DNA'nın klonlanmış parçalarının düzenlenmesiyle oluşturulan fiziksel ya da moleküler haritalar, baz çifti sayılarına göre ayarlanmaktadır. Genetik haritadan farklı olarak fiziksel haritalama, direkt olarak DNA'yı oluşturan bazların sırasını belirleyebilmektedir. Böylece genlerin fiziksel yapıları net olarak ortaya konulabilmektedir. Bu alanda pek çok fiziksel haritalama yöntemi bulunmakla beraber öne çıkan üç tanesi en önemlileri arasında olarak kabul edilirler. Bunlar; 1- Marker içeren bir probun hibridizasyonu ile marker bölgelerinin haritalandığı floresan in situ hibridizasyon 2-Restriksiyon endonükleazlarınca tanınan dizilerin pozisyonlarının belirlendiği restriksiyon haritalaması, ve 3- PCR ile genomik

DNA fragmentlerinin incelenerek kısa sekansların haritalandığı etiketli sekans bölgesi (STS) haritalamasıdır (11).

## GENOMİK VERİ TABANLARI

Kolayca erişilebilen, sıklıkla kullanılan, üç tane genom veri tabanı bulunmaktadır. Bunların haricinde, kullanılmakta olan ve farklı amaçlara hizmet eden birçok veri tabanına da ulaşmak mümkündür (12);

### NCBI

En çok bilinen, en popüler olan ve sıklıkla kullanılan biyolojik veri tabanıdır. İçerdiği bilgi yoğunluğu ve çeşidi bakımından en az Ensembl kadar zengin bir veri tabanıdır. Kullanıcıya sunulan belirtim tabloları ve bu tabloların görsel sunumu, Ensembl'a ve UCSC'ye göre daha az olduğu bilinmektedir. NCBI aynı zamanda, genomik bilgiler ile ilgili olan diğer veri tabanlarına veya uygulamalarına yönlendiren bağlantıları barındırması araştırmacılar için farklı veri tabanlarına aynı anda ulaşma imkanı sağlamaktadır. NCBI veri tabanının geniş bir veri tabanı olma özelliği bakımından en önemli sunduğu imkanlardan biri de; genom dizilerinin yanında protein yapı tahminlerini de içeren bir veri tabanı sunmasıdır (12).

### NCBI ALT VERİ TABANLARI

PubMed, OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), Nücleotide (Nükleotit Veri Tabanı), GSS Bölümü (Genome Survey Sequence), Protein, Genome, Structure, Taxonomy, SNP (tek nükleotit varyasyonları), HomoloGene, RefSeq ve BLAST şeklinde NCBI alt tabanları bulunmaktadır.

BLAST arama sonuçlarının karşılaştırılmasında kullanılan bazı değişkenler bulunmaktadır. Bu değişkenler şu şekilde ifade edilebilirler (12);

- Maksimum Skor (Maximum Score)
- Toplam Skor (Total Score)
- Sorgulama Kapsamı (Query Coverage)
- E-Değeri (E-Value)
- Maksimum Benzerlik (Maximum Identity)

## **UCSC**

Genomların basit bir dizi olarak görselleştirilmesi nedeniyle, sıklıkla tercih edilen ve kullanılan bir veri tabanıdır. Her seviyeden kullanıcının rahatlıkla kullanabileceği bir veri tabanı olması bakımından öne çıkmaktadır. Bu veri tabanında, birçok belirtim seçeneği bulunur ve bu belirtimleri grafiksel olarak ta incelemek mümkün olmaktadır. UCSC veri tabanı , BLAT dizi hizalamasına göre arama uygulamasını, içinde barındırmakla beraber,. BLAST uygulamasına göre, daha hızlı ve daha iyi sonuç verebilen, Veri tabanı içerisindeki organizmaların, referans dizilimlerine ve oluşturulmakta olan dizilimlere ulaşılabilme imkânında sunmaktadır (13).

## **ENSEMBL**

ENSEMBL; İçinde barındırdığı bilgi yoğunluğu ve bilgi çeşitleri bakımından zengin bir veri tabanıdır. Ayrıca ENSEMBL, genomik bilgiler ile ilgili olan diğer veri tabanlarına veya uygulamalara yönlendiren bağlantıları barındırmaktadır. Bu veri tabanı, Organizmaların genetik özelliklerinin yanı sıra, birçok uygulamayı da içinde bulundurmaktadır. UCSC gibi direk olarak eklenebilecek kullanıcı odaklı belirtim seçenekleri azdır ancak ileri seviyedeki kullanıcıların görselleştirebilecekleri pek çok seçenek bulunmakla birlikte kullanıcıların kendi özel belirtimlerini genom üstüne eklemesi mümkün olmaktadır (14).

## **FONKSİYONEL GENOMİK**

Genomik bilgiye biyolojik bir anlam kazandırmayı amaçlayan, genlerin fonksiyonlarına, ekspresyonlarına ve birbirleriyle olan iletişimlerine anlam kazandıracak genom ölçekli sistematik yaklaşımları içine alan bir disiplindir (15).

## **TRANSKRİPTOMİK**

Transkriptomiks, hücre genomundan transkripsiyon yolu ile meydana gelen Mrna transkriptlerinin eş zamanlı olarak incelenmesi olarak ifade edilebilir (16). Günümüzde transkriptomik analizleri sayesinde, gıdalarda ve insan vücudunda besin maddelerinin izlenmesi kolay hale gelmiş durumdadır. Bu yöntemler ile mineraller, vitaminler, makro bileşenler, çeşitli fitokimyasallar ve metabolizma ürünleri saptanabilmektedir. Bunlara ek olarak,



Hücre gelişimi ve farklılaşması gibi biyolojik olayların dahi transkriptomik teknolojisi ile açıklanabildiği söylenmektedir. Ayrıca bu metodlar ile gıdalarda bulunan çeşitli bileşenlerin gen ekspresyonunu nasıl değiştirdiği de açıklanabilmektedir (17). Genlerin fonksiyonlarının öğrenilmesinin yanı sıra, organizma açısından önemlerinin anlaşılmasına da transkriptomik imkan sağlamaktadır. DNA fonksiyonunu mRNA'lar aracılığıyla gösterdiği için transkriptomik çalışmalarını, mRNA'lar üzerinden yürütmektedir. Belirli bir zamanda, bir hücre ya da dokudaki mRNA'ların tümüne transkriptom denilmektedir. Transkriptomik ise; hücre genomundan transkripsiyonla oluşan mRNA transkriptlerinin eş zamanlı incelenmesine olarak açıklanabilir. Bir örnekte bulunan RNA miktarına bağlı olarak, genlerin seçilmiş bir alt grubunun veya tamamının ekspresyon düzeyini ölçmeyi hedeflemektedir (18). Bir organizmaya ait hücre ve dokularda, iki farklı durum olması, örneğin hastalık ve fizyolojik süreç gibi durumlarda mRNA'larının karşılaştırılması ve kıyaslamaları ile önemli bilgiler sağlanmaktadır. Bu şekildeki karşılaştırmalar sayesinde hangi durumda, hangi genlerin aktivite kazandığı öğrenilebilmektedir. Fakat, hastalık ya da fizyolojik süreçlerle ilgili genleri tespit etmek bu genlerin hangi oranlarda kullanıldığı hakkında kesin bir bilgi verememektedir (19). mRNA her zaman proteine çevrilmez ve mRNA düzeyleri kodlanmış proteinlerin aktivitesini yansıtmaz. Bu doğrusal olmayan ilişkinin bazı nedenleri bulunmaktadır. Bu nedenler aşağıda verilmektedir (20).

- Post-translasyonel modifikasyonlar (PTM),
- mRNA'dan hızlı yıkım ya da etkin olmayan translasyon,
- bazı proteinlerin aktivite kazanabilmek için başka moleküllerle kompleks yapmasının gerekmesi,
- alternatif splicing ya da alternatif PTM nedeniyle bir mRNA'nın birden fazla proteinin sentezine yol açması,
- RNA interferans
- proteinlerin yıkım hızı gibi nedenler olabilmektedir

## PROTEOMİKS

Proteomik, belirli şartlar altında belirli bir biyolojik sistemin, dokunun veya organizmanın genomda sentezlediği tüm proteinlerinin aynı zaman içerisinde yapı ve fonksiyonlarının belirlenmesine denilmektedir. Bir insan hücreindeki protein sayısının 100.000'den fazla olduğu bilinmekle birlikte, tüm bu toplam protein yapısına proteom denilmektedir. Genoma göre daha dinamik olduğu bilinen proteom, hücre tipine ve hücrenin fizyolojik durumuna göre büyük oranda değişiklik gösterebilmektedir. Bu sebepten, proteomik araştırmalarının genomik çalışmalara göre daha karmaşık ve zor olduğu olduğu ileri sürülmektedir(19). Proteomiks; sadece genler tarafından kodlanan polipeptid yapıları değil, aynı zamanda protein sentezinden sonra meydana gelen modifikasyonlarda “Farklı proteinler” in oluşmasına neden olmaktadır (21). Proteomiks; belli bir yerde ve zamanda bulunan bütün proteinlerin yapılarını, yerleşimlerini ve miktarlarını, translayon sonrası modifikasyonlarını, doku ve hücrelerdeki fonksiyonlarını, başka proteinlerle ve makro moleküllerle olan iletişimini açıklamaktadır (8,19,21). Proteomik araştırmalarının hedefleri şu şekilde sıralanabilir (22);

- Genom ve Proteom = komplementer veri sağlamaktadır.
- mRNA düzeyleri, kodlanmış proteinin aktivitesini yansıtmamaktadır.
- mRNA ekspresyon düzeyleri, protein ekspresyon düzeyleri ile iyi bağıntılanamamaktadır.

## PROTEOMİKS ÇALIŞMALARINDA KULLANILAN TEKNİKLER VE ANALİZ PRENSİPLERİ

Proteomiks araştırmaları, proteinlerin yapı ve fonksiyonlarının, birbirleriyle iletişimlerinin ve hastalıklardaki rollerinin daha hızlı, güvenilir, ve etkili bir şekilde belirlenebilmesi için yeni yöntemler ve ileri yazılım ve biyoinformatik teknolojileri geliştirilmiştir. Kütle spektrometresinin gelişmesinin ardından ve insan genomunun tümünün dizisinin belirlenmesinden itibaren ise proteomikte önemli bir döneme girilmiştir. Proteinlerin ayrılması ve tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan, proteomiks teknikleri arasında ilk olarak akla gelen iki önemli teknik; İki boyutlu jel elektroforezi ve kütle spektrometresidir. Son yıllarda bu metodların ilerletilmesi ve yeni metodolojilerin de ortaya konulması sayesinde, proteomiks teknolojisinde büyük ilerlemeler kaydedilmektedir. Proteomiks çalışmalarında

kompleks protein karışımlarının kullanılan örnekten izole edilmesi, proteinlerin ayrılması ve ardından karakterizasyonu ve tanımlanması ana basamaklardır (23).

### **PROTEOMİK VERİLERİNİN BİYOİNFORMATİK ANALİZİ**

Teknolojik gelişmelerle birlikte gerçekleşen yeni metodlar, insan ve diğer canlılara has büyük miktarlarda genomik, transkriptomik, ve proteomik verinin biyoinformatik analizinde, karmaşık uygulamalar içermektedir . biyoinformatik analiz içerikli proteomiks araştırmalarında, veri analizi kritiktir ve çoğunlukla en çok zaman alan basamak olarak bilinmektedir. Proteomiks ile ilgili biyoinformatik metodolojiler hızla ilerleme kaydetmekte ve hızlı bir şekilde yeni analiz yöntemleri bu kapsama dahil olmaktadır (24). Ücretsiz ve kullanım sınırlaması olmayan yazılımlardan başka, patentli yazılımlar da hali hazırda bulunmaktadır. Bahsedilen kaynaklara örnek olarak, MS/MS veri analizi için Proteome Discoverer, SIEVE Software, Mascot Daemon, MaxQuant, ve Trans-Proteomic Pipeline, metabolik yol analizleri için Cytoscape ve Ingenuity, ve gen ontoloji analizi için ise Gene Ontology, GOEAST, ve DAVID Biyoinformatik Kaynakları verilebilmektedir. Protein dizileri ve fonksiyonlarına yönelik önemli protein veritabanları arasında Human Protein Atlas, PeptideAtlas, SRM Atlas, SwissProt, neXtProt, PRIDE, ve UniProt örnek gösterilebilmektedir. Bahsi geçen veritabanları, Avrupa Biyoinformatik Enstitüsü tarafından, Avrupa Komisyonu 7. Çerçeve Programı (FP7) ile desteklenen proje başlatılmış olan ProteomeXchange Konsorsiyumu ile birbirine bağlanmıştır. Veritabanı taramasının başarısı, deneysel prosedürlerden elde edilen verilerin ve veritabanının kalitesine ve veritabanını taramak için kullanılan yöntemin orantılı olmasına bağlı olmaktadır (25).

### **PROTEOMİKSİN UYGULAMA ALANLARI**

Proteomiks, protein seviyesindeki çalışmalarla, Biyolojik , Moleküler Biyoloji temelli olayların ve patolojik mekanizmaların daha iyi yorumlanabilmesini , tamamlayıcı terapötik hedeflerin ve yöntemlerin geliştirilebilmesini hedeflemektedir. Bu hedefler doğrultusunda proteomiks araştırmalarının faydalı olabileceği pek çok farklı alandan bahsedile bilinmektedir. Proteomiks çalışmalarının uygulama alanları, hastalıkların erken tanısı, farklı evrelerinin tanımlanabilmesi, tedavi amaçlı uygulamaların daha iyi

değerlendirilebilmesi için yeni ve etkili biyobelirteçlerin geliştirilmesi yer almaktadır (23). Bir biyobelirtecin taşınması gereken özelliklerin, belirli bir hastalık için özgün olması, bu hastalığın erken tanısını mümkün kılması, hastalık gelişimi ile miktarında değişim oluşabilmesi, ilaç tedavisine yanıtın izlenebilmesine olanak tanınması, oluşabilecek biyolojik materyalde çalışılabilmesi, duyarlı, tekrarlanabilir ve kolay uygulanabilir bir teknik ile belirlenebilmesi olması gerektiği söylenmektedir (24). Sınırlı bir hastalıkla ilişkili protein belirteçlerin, hastalığın tanısında, prognozun değerlendirilmesinde, ve uygun tedavi metodlarının belirlenmesi önem taşımaktadır (25). Yapılan araştırmalar, istenen duyarlılık ve özgünlüğün artık tek bir biyobelirteç yerine, hastalıkların farklı yönlerini yansıtabilecek “biyobelirteç panelleri” ile gerçekleştirilebileceğini göstermektedir. Proteomiks metodolojileri ile, protein modifikasyon farklılıklarının araştırılabilmesi ve oluşan verilerin yeni biyobelirteçlerin tanımlanmasında kullanılabilmesi imkanı hale gelmektedir (25).

## METABOLOMİKS

Metabolomiks, metabolit denilen belirli bir biyokimyasal sürece has, o sürecin ürünü olarak oluşan kimyasal parmak izlerini inceleyen bilim dalı olarak tanımlanmaktadır. Metabolomiks, hücrenin metabolit profilinin çıkarılması olarak da tarif edilebilir (21). Metabolomik araştırmalarında uygulanan yöntem, küçük moleküllerin tanımlanması ayrılması ve kantitatif olarak saptanması aşamalarını içermektedir. Bu moleküller, aminoasitler, nükleik asitler, organik asitler, vitaminler, alkaloidler, peptitler, karbonhidratlar, polifenoller, mineraller veya organizma tarafından sentezlenen, sindirilen veya kullanılan başka kimyasal maddeleri olarak bilinirler (26). Bir organizmada bulunan metabolizmanın hepsine metabolom denilmektedir, Metabolomdaki küçük molekülü metabolitlerin analitik teknikler kullanılarak teşhis edilmesi, tanımlanması ve miktarının belirlenmesine ise metabolomiks olarak adlandırılmaktadır (27). Metabolit profillemeye çalışmaları için LC-MS, GC-MS, CE-MS ve NMR metodları ile oluşturulan verinin bilgisayar destekli bir ön işlemden geçirilmesi, araştırma aşamalarında yapılabilme ihtimali olan hataları, zaman kaybını ve gözden kaçabilecek metabolitlerin tespit edilememesi sorunlarını minimuma indirebilmektedir. Bu sebeple, yapılan araştırmalarda yüzlerce metabolitin

tanımlanmasında ve ayrılmasında yazılım ve veribankası desteği kaçınılmaz hale gelmektedir (27). Son zamanlarda, bir hastalığın moleküler biyolojik mekanizmasının anlaşılması bilinmesinde sadece genom analizinin ya da yalnızca proteom analizinin yeterli olmadığı, bunun yerine metabolomik çalışmaların da yer aldığı bütünsel bir değerlendirmenin gerekliliğine olan düşünce gittikçe artmaktadır (8). Metabolitlerin seviyesi, hücresel fonksiyonların işleyişini aydınlatmaktadır ve böylece genetik veya çevresel değişikliklere dayalı hücrenin veya dokunun fenotipinde tanımlanması imkanı olmaktadır. Uzun süredir tıbbi tanı ve tedavi amaçlı metabolit analizleri uygulanmasına rağmen, pek çok metabolitin analiz edilmesi ve profillenmesi hedefi ile kullanılacak tekniklerin geliştirilmesi için yapılan çalışmalar son zamanlarda yeni yeni artmakta olduğu görülmektedir. Metabolik araştırmalar arasında, Enzim substrat ilişkisi değerlendirmede, biyobelirteç tespitinde, ilaç aktivite çalışmalarında, metabolik yolak analizlerinde ve daha pek çok hedefe yönelik çalışmalar sayılabilir (28).

### **Metabolomik Uygulamalar**

Metabolomik çalışmalar metabolitlerin ayrımını sağlayan metabolit ayrım teknikleri (gaz kromatografisi, sıvı kromatografisi ve kapiler elektroforez), metabolitlerin tanımlanmasını amaçlayan metodlar (Kütle spektroskopisi ve nükleer manyetik rezonans spektroskopisi), metabolitlerin teşhisini ve saptanmasını sağlayan yazılım veri bankası kullanımını ve istatistiksel değerlendirme aşamalarından oluşmaktadır (29).

### **METABOLOMİK ÇALIŞMALARDA YAZILIM VE VERİBANKASI**

Metabolomik çalışmaları içeren uygulamalar biyobelirteç tanısında, enzim substrat ilişkisi değerlendirmede, ilaç aktivite çalışmalarında, metabolik yolak analizlerinde ve daha birçok amaca hizmet eden araştırmalarda günümüzde sıkça kullanılmaktadır (30). Metabolit profillemeye çalışmaları için LC-MS, GC-MS, CE-MS ve NMR yöntemleri ile meydana gelen verinin bilgisayar destekli bir ön işleminden geçirilmesi araştırma sürecinde zaman kaybını, olası hataları ve var oldukları halde gözden kaçabilecek metabolitlerin tespit edilememesi sıkıntılarını minimuma indirmektedir. Metabolit profillemeye araştırmalarının veribankası kullanılmadan yapılması imkansız olmaktadır

(27). Binlerce metabolitin kütle değerlerinin birer birer taranması, tandem-kütle spektrometresi parçalanma ürünlerinin incelenmesi veya NMR verilerinin birer birer incelenmesi profillemeye araştırmalarında zamanın harcanmasına ve iř gücünün verimsiz kullanılmasına neden olmaktadır. Bahsedilenlere ek olarak tanı ve teşhis edilen her bir metabolitle ilgili klinik bilgiye, yayınlara, kimyasal ve fiziksel özelliklere ve hatta bu metabolitin katıldığı metabolik yollarla ilgili bilgilere dahi tek bir kaynaktan ulaşılabilmek veribankalarının kullanımını cazip hale getiren etmenlerden birkaçını oluşturmaktadır. Fakat aranılan ve anlam ifade eden veya edebilme ihtimali olan her bir metabolitin veribankalarına kayıtlı olmadığı nedeni ile metabolomik veribankaları genomik veya proteomik veribankaları kadar detaylı ve tamamlanmış bilgiyi henüz tam içermemektedir (31). Metabolomik Derneđi ([www.metabolomicsociety.org](http://www.metabolomicsociety.org)) tarafından yapılan ayrıma göre metabolomik veribankaları; karşılaştırmalı metabolomik veribankaları, metabolik yolak veribankaları, kimyasal özellikler ve spesifik kimyasallara ait veribankaları, ilaç ve metabolitleri veribankaları ve spektral veribankaları olarak ayrılmaktadır. Fakat bu sınıflandırma sistemini pek çok veribankası iç içe bir şekilde bulundurmaktadır ve çoğu veribankası birden fazla hedefe hizmet edebilmektedir (27).

Metabolit hedef analizlerinde (targeted metabolomics) iki farklı grup arasında (örneğin hasta grup ve sağlıklı grup) hedeflenen metabolitlerin düzeylerindeki farklılaşma tanınarak sonuç çıkarılmaya çalışılmaktadır (32). Metabolitlerin kütlelerini bilmek metabolit hedef analizleri gibi uygulamalarda istenilen en büyük avantaj olmaktadır. Çünkü kütle bilinen metabolitler yüksek ayırım gücüne sahip cihazlarla ayrılp TOF gibi yüksek kesinlikte çalışan bir kütle analizörü ile analiz edildiğinde karşılaştırılan gruplar arasındaki metabolit düzeylerini karşılaştırma imkanı vererek , bu açıdan önemli veri analiz karşılaştırılması yapılabilmektedir. Ayrıca binlerce metabolitin ayrılp taranarak yapılarının anlaşıldığı metabolit profillemeye araştırmalarında metabolitlerin bekletilme zamanları ve kütlelerinin veri tabanlarından bularak eldeki numuneler ile karşılaştırmak, zaman ve iř gücü kaybını en aza indirmek açısından önemli avantajlar elde edilmesine neden olmaktadır (33).

Dünyadaki ilk yerleşim birimlerinden biri olan Türkiye coğrafyası, Asya ve Avrupa kıtaları arasında yer almış, yıllarca insanların dünyaya yayılmasında bir köprü konumunda bulunmuştur. Bu bakımdan Türkiye'deki genetik

çeşitliliğin yapısını ve derecesini anlamak, insan çeşitliliğini anlamak bakımından önemlidir. Türkiye Genom Projesi çalışmaları, Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) ve Türkiye Biyoteknolojileri Enstitüsü önderliğinde hastalıklara yol açan genetik nedenlerin belirlenmesine yönelik başlatılmıştır. Aralık 2017'den beri yürütülen projenin başlangıç aşamasındaki hedefi 100 sağlıklı bireyin tüm genomunun dizilenmesi olarak belirlenmiştir. Bu projenin ikinci aşamasındaysa, toplumdaki hastalıklara dair çalışmalar yapılabilmesi adına 100.000 tüm genom dizileme çalışmasında yüzde 40'ının nadir hastalıklar, yüzde 30'unun kompleks hastalıklar ve yüzde 30'unun kanserli vakalardan oluşan örneklerin dizilemesi planlanmıştır. Proje kapsamında, başta genetik temelli hastalıklar olmak üzere kanser ve metabolik hastalıkların çalışılması amacıyla Aziz Sancar Araştırma Geliştirme Merkezi'nde (ASAGEM) Genom Araştırmaları Laboratuvarı hizmete açılmıştır. Bu merkezde beş yıl sürecek Türkiye Genom Projesi (TGP) pilot fazı başarı ile tamamlanmıştır. İkinci faz kapsamında ise 1.500 sağlıklı ve nadir hastalık teşhisi alan bireylerin tüm genom ve mikrobiyom analizleri gerçekleştirilecektir. Projenin bu hedefler doğrultusunda 2023 yılında tamamlanması hedeflenmektedir.

## KAYNAKLAR

- 1-Luscombe, N. M., Greenbaum, D., and Gerstein, M., "What is bioinformatics? An introduction and overview, 2001, Yearbook of Medical Informatics, 1(83-100).
- 2- Reichhardt T., It's sink or swim as a tidal wave of data approaches, 1999, Nature, 399(6736), pp. 517-20.
- 3- Bednar, M., 2000, DNA Microarray Technology and Application, Med Sci Monid, 6(4): 796–800
- 4-Aebersold R,Cravatt BF, Proteomics--advances, applications and the challenges that remain. Trends Biotechnol, 2002. 20(12 Suppl): p. S1-2.
- 5- Polanski, A., Kimmel, M., 2007. Bioinformatics, Springer
- 6- Kaya H.B., Soya S., Akkale C., Tanyolaç B. (2012). Biyoteknoloji ve Biyoinformatik, Moleküler Biyoloji 16(2). [https://www.researchgate.net/publication/280041396\\_Biyoteknoloji\\_ve\\_Biyoinformatik/stats](https://www.researchgate.net/publication/280041396_Biyoteknoloji_ve_Biyoinformatik/stats)
- 7- Davies H, 2010. A role for "omics" technologies in food safety assessment. Food Control, 21(12), 1601-1610.
- 8-Başaran E, Aras S, Cansaran-Duman D. Genomik, Proteomik, Metabolomik kavramlarına genel bakış ve uygulama alanları. Turk Hij Deney Biyol Derg. 2010; 67: 85-96.
- 9-Öztürkoğlu Budak, Dönmez (2012). Gıda Biliminde Yeni Omik Teknolojileri. *GIDA*, 37 (3): 173-179. <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/78826>
- 10- McNamara, L.E., Sjostrom, T., Meek, R.M., Oreffo, R.O., Su, B., Dalby, M.J. ve diğerleri. (2012) Metabolomics: a valuable tool for stem cell monitoring in regenerative medicine. J R Soc Interface, 9 (73), 1713-1724
- 11- Ahmad Y,Lamond AI, A perspective on proteomics in cell biology. Trends Cell Biol, 2014. 24(4): p. 257-64.
- 12-Son D. Ç., (2020) Konu 3: Biyoenformatiğe Giriş ve Biyolojideki Uygulamaları [Ders notları]. <https://acikders.tuba.gov.tr/course/view.php?id=49>
- 13- Kent WJ. BLAT - the BLAST-like alignment tool. *Genome Res.* 2002 Apr;12(4):656-64



- 14- Villas-Bôas SG, Roessner U, Hansen MAE, Smedsgaard J, Nielsen J: Metabolome Analysis: An Introduction. USA, Wiley,2007
- 15- Sarwal M and Alemi F. Genomics and Microarray. In: Lotze M and Thomson A (eds). Measuring Immunity Basic Science and Clinical Practise. Great Britain: Elsevier; 2005. 697-706
- 16- Mutch DM, Wahli W, Williamson G. 2005. Nutrigenomics and nutrigenetics; the emerging faces of nutrition. FASEB J 19: 1602-1616.
- 17- Ordovas JM, Corella D. 2004. Nutritional Genomics. Annu Rev Genomics Hum Gene, 5;71-118.
- 18- Gündoğdu AK, Karahan AG. Nutrigenomik Teknolojileri. SDÜ Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi, 2008; 33 (4): 183-191.
- 19- Del Boccio P and Urbani A. Homo sapiens proteomics: clinical perspectives. Ann Ist Super Sanita 2005; 41: 479-82
- 20- Bal H. S., Budak F. (2012). Genomik, Proteomik Kavramlarına Genel Bakış ve Uygulama Alanları. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 39 (1)65-69, 2013. <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/421138>
- 21- Carbonaro M, 2008. Proteomics: Present and future in food quality evaluation. Trend Food Sci Tech, 15; 209-216
- 22- Özen Demiralp, D. F., İğci, N., Peker, S., Ayhan, B., (2014) Temel Proteomik Stratejiler. Ankara Üniversitesi Yayınevi. 11: 86-89. <https://dspace.ankara.edu.tr/xmlui/handle/20.500.12575/69483>
- 23- Ahmad Y, Lamond AI, A perspective on proteomics in cell biology. Trends Cell Biol, 2014. 24(4): p. 257-64
- Ahmad, W. (2013) Overlapped metabolic and therapeutic links between Alzheimer and diabetes. Mol Neurobiol, 47 (1), 399-424.
- 24- Angel TE, Aryal UK, Hengel SM, Baker ES, et al., Mass spectrometry-based proteomics: existing capabilities and future directions. Chem Soc Rev, 2012. 41(10): p. 3912-28
- 25-Şanlıoğlu A. D. (2016) Proteomiks ve Stratejileri. *Tıbbi Genetik ve Klinik Uygulamaları* 23.Bölüm [https://www.researchgate.net/publication/311868416\\_Proteomiks\\_ve\\_Stratejileri](https://www.researchgate.net/publication/311868416_Proteomiks_ve_Stratejileri)
- 26- Wishart DS. 2008. Metabolomics: applications to food science and nutrition research. Trend Food Sci Tech, 19; 482-493.

- 27- Celebier M, Ibanez C, Simo C, Cifuentes A. A Foodomics approach: CE-MS for comparative metabolomics of colon cancer cells treated with dietary polyphenols. *Methods Mol Biol.* 2012; 869:185-95.
- 28- Madsen R, Lundstedt T, Trygg J. Chemometrics in metabolomics--a review in human disease diagnosis. *Anal Chim Acta.* 2010; 659:23-33.
- 29- Patti, G.J., Yanes, O., Siuzdak, G. (2012) Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13 (4), 263-269
- 30- Griffiths, W.J., Koal, T., Wang, Y., Kohl, M., Enot, D.P., Deigner, H.P. (2010) Targeted metabolomics for biomarker discovery. *Angew Chem Int Ed Engl*, 49 (32), 5426-5445.
- 31- Tsoka S, Ouzounis CA. Metabolic database systems for the analysis of genome-wide function. *Biotechnol Bioeng.* 2003; 84:750-5
- 32- Dudley E, Yousef M, Wang Y, Griffiths WJ. Targeted metabolomics and mass spectrometry. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2010; 80:45-83.
- 33- Nevedomskaya E, Derks R, Deelder AM, Mayboroda OA, Palmblad M. Alignment of capillary electrophoresis-mass spectrometry datasets using accurate mass information. *Anal Bioanal Chem.* 2009; 395:2527-33.



## BÖLÜM 9

### **METAGENOMİKS ALANINDAKİ GELİŞMELER: MİKROBİYAL ÇEŞİTLİLİĞİN VE İŞLEVSEL YAKLAŞIMLARIN ANLAŞILMASI**

Dr. Öğr. Üyesi Betül AYDIN<sup>1</sup>

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.10251397>

---

<sup>1</sup> Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye. barslan@gazi.edu.tr, Orcid ID: 0000-0002-9092-1350



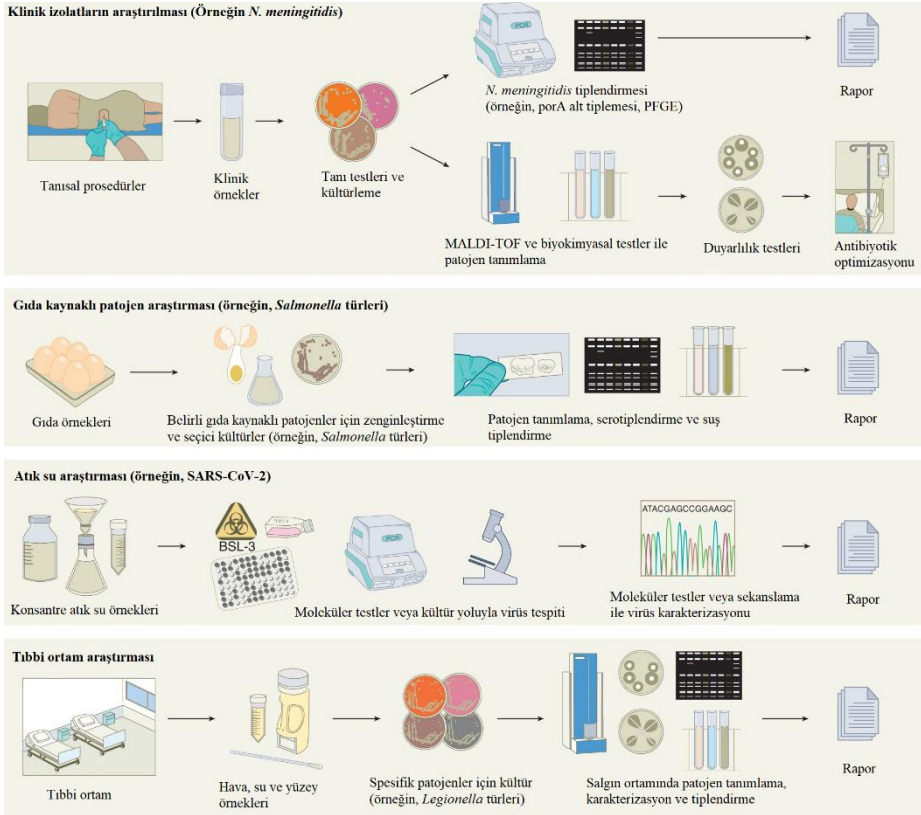
## GİRİŞ

Mikrobiyal ekolojide çığır açan bir alan olan metagenomik, genetik materyalin doğrudan çevresel örneklerden araştırılmasını sağlayarak mikrobiyal topluluklara ilişkin anlayışımızda devrim yaratmıştır. Bu derleme, metodolojilere, uygulamalara ve gelecekteki adımlara odaklanarak metagenomik alanındaki son gelişmelere kapsamlı bir genel bakış sunmaktadır. Mikrobiyal ekosistemlerin karmaşıklığını çözmedeki kolektif rollerini vurgulayarak örnek toplama, DNA ekstraksiyonu ve yüksek verimli dizileme teknolojilerinin ayrıntıları açıklanmaya çalışılmıştır. Bu araştırma, 16S rRNA gen dizilimi ve shotgun metagenomiği karşılaştırarak taksonomik profil oluşturma tekniklerini incelemekte ve bunların avantaj ve zorluklarını vurgulamaktadır. Fonksiyonel metagenomik üzerine özel bir bölümde biyoteknoloji ve endüstri için önemi olan yeni enzimlerin, yolakların ve metabolik işlevlerin ortaya çıkarılmasındaki uygulamalar sunulmaktadır. Karasal ekosistemlerden insan mikrobiyomuna kadar çeşitli ortamlarda metagenomiklerin incelenmesi, sağlık, hastalık ve çevresel süreçlere mikrobiyal düzeydeki katkıları anlamamız üzerindeki geniş kapsamlı etkisini ortaya koymaktadır. Bu ilerlemelere rağmen, veri analizi karmaşıklıkları, numune kontaminasyonu ve referans veri tabanlarındaki sınırlamalar gibi zorluklar devam etmektedir. Derleme, bu zorlukların üstesinden gelmeye hazır yeni teknolojileri tartışarak ve metagenomiğin gelecekteki potansiyel uygulamalarını özetleyerek son bulmaktadır. Mikrobiyal ekolojide güçlü bir araç olan metagenomik, mikrobiyal çeşitlilik ve işlev algımızı şekillendirmeye devam ederek bilimsel disiplinler arasında yeni keşiflerin ve uygulamaların önünü açmaktadır.

## 1. METAGENOMİĞİN TANIMI

Metagenomik alanı, mikrobiyolojide önemli bir paradigma değişimi olarak ortaya çıkmış ve çeşitli ortamlarda yaşayan mikrobiyal toplulukların genomik yapıları hakkında benzersiz bilgiler sunmuştur. Bir disiplin olarak metagenomiks, çevresel örneklerde bulunan kolektif genetik materyalin kapsamlı analizine izin vererek geleneksel mikrobiyolojik yaklaşımların sınırlamalarını aşmakta ve böylece mikrobiyal çeşitliliğin benzeri görülmemiş bir ölçekte keşfedilmesini sağlamaktadır. Şu an patojen araştırmalarının büyük bir kısmı çevreden alınan örneklerin kültürlenmesi sonrası biyokimyasal veya

moleküler yöntemlerle tanımlanması ve tiplendirmesine dayanmaktadır (1). Çeşitli ortamlardan patojen tespitinin yapılması ile ilgili günümüzde rutinde uygulanan iş akış şeması Şekil 1’de gösterilmiştir. "Metagenomik" terimi ilk olarak 1998 yılında Handelsman ve arkadaşları tarafından, mikrobiyal çalışmaları laboratuvarında yetiştirilen izolatlarla sınırlayan kültür temelli yöntemlerden ayrılmayı ifade etmek üzere ortaya atılmıştır (2). Metagenomik, çevresel örneklerden DNA'nın doğrudan çıkarılmasını ve analiz edilmesini içermekte ve karmaşık mikrobiyal topluluklar içindeki genetik potansiyelin anlık görüntüsünü sağlamaktadır. Bu devrim niteliğindeki yaklaşım o zamandan beri mikrobiyal ekolojide bir mihenk taşı haline gelmiş ve daha önce kültürü yapılamayan mikroorganizmaların keşfedilmesini ve karmaşık mikrobiyal etkileşimlerin ortaya çıkarılmasını kolaylaştırmıştır.



**Şekil 1.** Mevcut patojen araştırmaları için kullanılan iş akışları (Ko vd. 2022)

Metagenomiğin önemi, doğal ortamlarda bulunan mikrobiyal çeşitliliğin yalnızca bir kısmını yakalayabilen kültüre bağlı yöntemler gibi geleneksel

mikrobiyolojik tekniklerin sınırlamalarını aşma yeteneğinde yatmaktadır (3). Metagenomik, belirli bir ekosistemdeki genomik rezervin bütünsel bir görünümünü sağlayarak, araştırmacıların yeni taksonları tanımlamasına, topluluk dinamiklerini değerlendirmesine ve mikroorganizmaların kolektif genomlarında kodlanan işlevsel potansiyeli ortaya çıkarmasına olanak tanımaktadır.

Ayrıca metagenomik, mikrobiyal toplulukların çeşitli ekolojik süreçlerdeki rolünün anlaşılmasında çok önemli bir rol oynamaktadır. Metagenomik yaklaşımların kullanıldığı çalışmalar, mikroorganizmaların besin döngüsüne, karbon tutulumuna ve diğer temel biyojeokimyasal döngülere katkılarını ortaya koymuştur (4). Ayrıca tıp, tarım ve çevresel izleme dahil olmak üzere çeşitli alanlarda uygulama alanı bulan metagenomik, disiplinler arası çalışmalarda da etkin bir şekilde kullanılmaktadır.

## 2. METAGENOMİĞİN TARİHSEL GELİŞİMİ

Metagenomiğin kökeni 20. yüzyılın sonlarına kadar uzanmakta ve tek başına mikrobiyal türlerin kültüre edilmesine dayanan geleneksel mikrobiyolojik yöntemlerden bir geçiş dönemine işaret etmektedir. Metagenomiğin tarihsel gelişimi birkaç temel aşamada özetlenebilir.

- ❖ "Metagenomik" terimi ilk olarak 1998 yılında Handelsman ve arkadaşları tarafından ortaya atılmıştır ve tüm mikrobiyal toplulukların kolektif genomlarını doğrudan doğal ortamlarında incelemeye yönelik kavramsal bir değişimi yansıtmaktadır (2).
- ❖ İlk yıllarda, shotgun dizileme teknikleri kullanılarak çevresel DNA örneklerinin tamamının dizilenmesine odaklanan çevresel genomik alanında öncü çalışmalar yapılmıştır. Özellikle, Craig Venter ve meslektaşları tarafından yürütülen Küresel Okyanus Örnekleme Keşif Gezisi, deniz mikrobiyal topluluklarını küresel ölçekte incelemek için metagenomik yaklaşımlar uygulamış ve okyanus ekosistemlerinde zengin bir genetik çeşitliliği ortaya çıkarmıştır (5).
- ❖ Yeni nesil dizileme platformlarının (örn. Illumina, Roche 454) geliştirilmesi gibi yüksek verimli dizilemedeki teknolojik ilerlemeler, uygun maliyetli ve hızlı dizileme yetenekleri sağlayarak metagenomik çalışmaların hızlandırılmasında önemli bir rol oynamıştır (6).



- ❖ Belirleyici gen dizilemesinin, özellikle de bakteri ve arke topluluklarının analizi için 16S rRNA geninin kullanılmaya başlanması, metagenomiğin temel taşlarından biri haline gelmiş ve araştırmacıların mikrobiyal toplulukların taksonomik bileşimini karakterize etmesini sağlamıştır (7).
- ❖ Fonksiyonel genleri ve yolları tanımlamak için çevresel DNA'nın klonlanmasını ve heterolog ekspresyonunu içeren fonksiyonel metagenomik, mikrobiyal toplulukların metabolik potansiyelinin araştırılmasında önem kazanmıştır (8).
- ❖ Metagenomiklerin kapsamlı biyoinformatik araçlar ve algoritmalarla entegrasyonu, veri analizi, yorumlama ve anlamlı biyolojik çıkarımların elde edilmesi için çok önemli hale gelmiştir (9).

Genomik çağ, toprak, okyanuslar ve insan mikrobiyomu da dahil olmak üzere çeşitli ortamlarda metagenomik çalışmalarda bir artışa tanık olmuş ve mikrobiyal çeşitlilik, evrim ve ekolojik etkileşimleri anlamamıza katkıda bulunmuştur.

### 3. METAGENOMİK METODOLOJİLERİ

Dinamik bir alan olan metagenomik, örnek toplama, DNA ekstraksiyonu, yüksek verimli dizileme teknolojileri ve gelişmiş biyoinformatik araçları kapsayan bir dizi metodoloji kullanır.

#### 3.1.Örnek Toplama ve Muhafaza Etme

Koruyucular ve kriyoprotektanların kullanımı gibi örnek koruma tekniklerindeki son gelişmeler, toplama sırasında mikrobiyal DNA'nın bütünlüğünün korunmasında etkili olmuştur (10). Sahaya uygun örnekleme kitlerindeki gelişmeler, zorlu ortamlardan yüksek kaliteli metagenomik verilerin toplanmasını kolaylaştırmıştır (11).

#### 3.2.DNA Ekstraksiyon Yöntemleri

DNA ekstraksiyon protokollerinin optimizasyonu, boncuk çırpma, enzimatik lizis ve manyetik boncuk tabanlı yaklaşımların entegrasyonu ile sağlanmıştır (12). Belirli ortamlar veya mikrobiyal taksonlar için uyarlanmış ekstraksiyon kitlerinin geliştirilmesindeki ilerlemeler, ekstrakte edilen DNA'nın verimini ve saflığını artırmıştır (13).

### **3.3.Yüksek Verimli Sekanslama Teknolojileri**

Illumina'nın metagenomik çalışmalarda devam eden hakimiyeti, PacBio ve Oxford Nanopore gibi uzun okumalı dizileme teknolojilerinin ortaya çıkmasıyla tamamlanmış ve karmaşık topluluk profili için gelişmiş çözünürlük sağlanmıştır (14). Tek hücre dizileme teknolojilerinin uygulanması, karmaşık topluluklar içindeki bireysel mikrobiyal hücrelerin genomik karakterizasyonuna olanak sağlamıştır (15).

### **3.4.Veri Analizi İçin Biyoinformatik Araçlar**

QIIME, mothur ve MEGAN gibi gelişmiş biyoinformatik işlem hatları, metagenomik veri kümelerinin taksonomik profilinin çıkarılmasını ve işlevsel ek açıklamalarının yapılmasını kolaylaştırmıştır (16, 17). Makine öğrenimi algoritmalarının entegrasyonu, araştırmacıların metagenomik verilerden daha derin analizler çıkarmasını sağlayarak topluluk kompozisyonu ve metabolik potansiyel hakkında daha doğru tahminler yapılmasını mümkün kılmıştır (18).

### **3.5.Tek Hücre Metagenomiği**

Tek hücre genomisindeki gelişmeler, araştırmacıların karmaşık topluluklar içindeki bireysel mikroorganizmaların genetik rezervini keşfetmelerine olanak tanıyarak nadir ve yetiştirilemeyen taksonlar hakkında bilgi sağlamıştır (15). Mikroakışkan platformlar ve kombinatoriyal indeksleme yöntemleri, tek hücre izolasyonu ve dizilemesini kolaylaştırarak farklı ortamların incelenmesi için daha erişilebilir hale getirmiştir (19).

## **4. MİKROBİYAL ÇEŞİTLİLİĞİN İNCELENMESİNDE METAGENOMİK YAKLAŞIMLAR**

Metagenomik, çeşitli ekosistemlerdeki mikrobiyal çeşitliliğin karmaşık dokusunu çözmek için güçlü bir araç olarak ortaya çıkmıştır. Gelişmiş dizileme teknolojileri ve biyoinformatik analizler kullanan araştırmacılar, taksonomik kompozisyonu karakterize etmek, topluluk dinamiklerini anlamak ve mikrobiyal toplulukların genomik potansiyelini ortaya çıkarmak için çeşitli yaklaşımlar uygulamıştır.

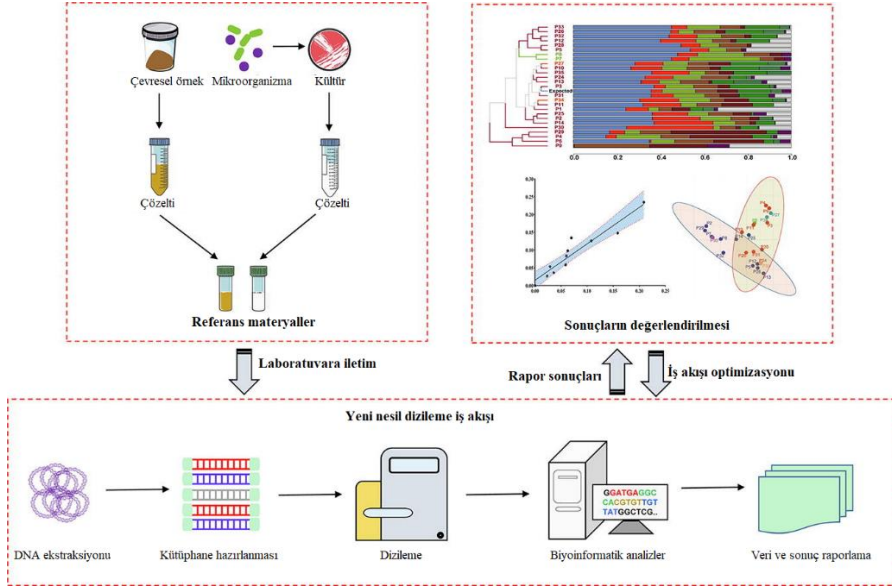
### **4.1.Taksonomik Profil Oluşturma**

Yeni nesil dizileme platformlarının sağladığı shotgun metagenomik, mikrobiyal toplulukların daha önce görülmemiş çözünürlüklerde taksonomik

sınıflandırılmasını kolaylaştırmıştır (18). MetaPhlan ve Kraken gibi hesaplama araçlarındaki gelişmeler, metagenomik veri kümelerinde taksonomik profillemenin doğruluğunu ve hızını artırmıştır (20).

#### 4.2.16S rRNA Gen Dizileme

Shotgun metagenomiklerin üstünlüğüne rağmen, 16S rRNA gen dizilimi mikrobiyal topluluklar içindeki bakteriyel ve arkeal çeşitliliğin profilini çıkarmak için değerli bir araç olmaya devam etmektedir (21). Çevresel veya kültüre edilmiş bir örneğin laboratuvara geldikten sonra dizileme sonuçlarının alınmasına kadar olan süreç Şekil 2’de gösterilmiştir. DADA2 ve QIIME 2 gibi geliştirilmiş primer tasarımı ve biyoinformatik işlem hatları, 16S rRNA genine dayalı taksonomik atamaların doğruluğunu artırmıştır (22, 23).



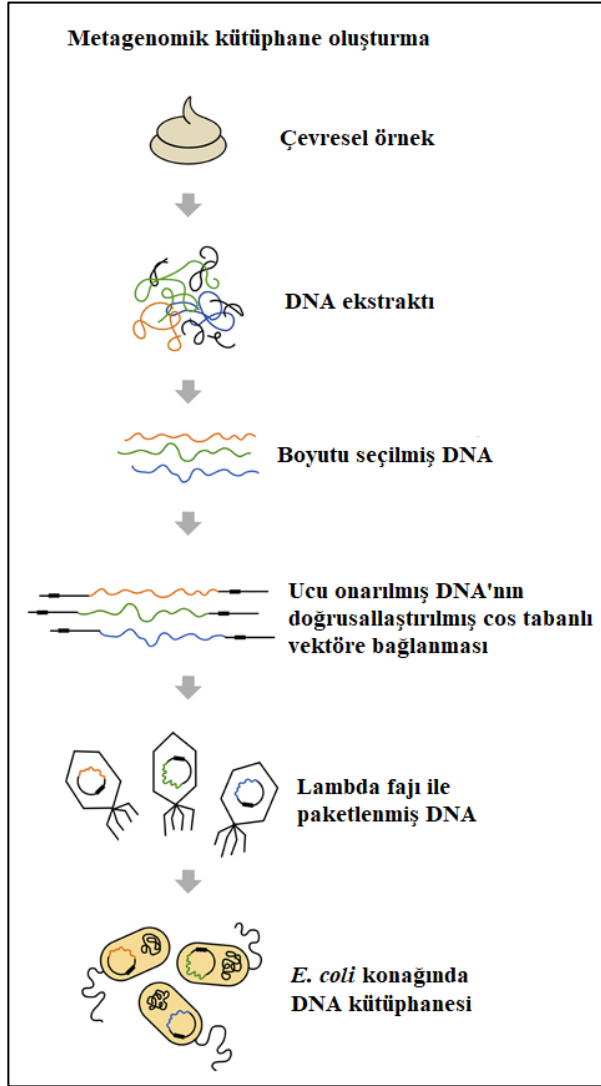
**Şekil 2.** Çevresel veya kültüre edilmiş bir örneğin laboratuvara geldikten sonra dizileme sonuçlarının alınmasına kadar olan süreç (21)

#### 4.3.Gelişmiş Çözünürlük için Uzun Okumalı Dizileme

PacBio ve Oxford Nanopore gibi uzun okumalı dizileme teknolojilerinin ortaya çıkışı, metagenomik çalışmalarda gelişmiş çözünürlük sağlayarak karmaşık mikrobiyal topluluklardan tam genomların bir araya getirilmesini mümkün kılmıştır (24). Uzun okumalı dizileme özellikle genomik yapıların çözümlenmesinde, genom yeniden düzenlemelerinin tespit edilmesinde ve kültüre edilemeyen mikroorganizmaların yakalanmasında etkili olmuştur (25).

## 5. FONKSİYONEL METAGENOMİK

Fonksiyonel metagenomik, metagenomik metodolojilerin ön saflarında yer almakta ve karmaşık mikrobiyal toplulukların içinde gömülü olan genetik potansiyeli ve fonksiyonel çeşitliliği ortaya çıkarmak için doğrudan bir yol sunmaktadır. Yeni enzimlerin keşfinden metabolik yolların keşfine kadar, fonksiyonel metagenomik, çeşitli ortamlardaki mikroorganizmaların yeteneklerine bir bakış açısı sağlamaktadır. Klonlama stratejilerindeki gelişmeler, çevresel DNA'nın etkin bir şekilde yakalanmasını kolaylaştırarak heterolog konakçılarda işlevsel genlerin ifade edilmesine olanak sağlamıştır. Fonksiyonel metagenomik, kodlanmış proteinlerin işlevlerini incelemek için mikrobiyal topluluklardan DNA izole edilmesi, DNA parçalarının klonlanması, genlerin taşıyıcı bir konakta ifade edilmesi ve enzimatik faaliyetlerin taranmasını içermektedir. Fonksiyonel yaklaşım, çevresel metagenomlardan klonlanmış DNA içeren fiziksel kütüphaneler olan metagenomik kütüphanelerin oluşturulması ile başlamaktadır. Cozmid veya fozmid tabanlı kütüphaneler, büyük ve tutarlı insert boyutları ve yüksek klonlama verimlilikleri nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir. Metagenomik kütüphane oluşturulmasında sıklıkla izlenen iş akışında DNA önce ilgili çevresel örnekten çıkarılır, daha sonra boyutu seçilir, ucu onarılır ve cos tabanlı bir vektöre bağlanır, böylece *Escherichia coli*'nin daha sonra transdüksiyonu için lambda fajı tarafından paketlenmesine izin verilir (26). Metagenomik kütüphane oluşturma aşamaları Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3. Metagenomik kütüphane oluşturma aşamaları (26)

Bir metagenomik kütüphane oluşturulduktan sonra, ilgilenilen genleri ortaya çıkarmak için yüksek verimle taramalar (fonksiyonel veya dizi bazlı taramalar) yapılması gerekir. Genlerin fonksiyonlarını anlamak için metagenomik kütüphanelerdeki hedef genler, onları görselleştirmek (tespit etmek) ve işleve tayin edilmelerini doğrulamak için ilgili bir deney düzeninde ifadelendirilir. Bugüne kadar gerçekleştirilen metagenomik çalışmalarının çoğunda, klonlama konağı olarak *Escherichia coli* kullanılmıştır çünkü bu konak için genişletilmiş bir genetik araç kiti mevcuttur.

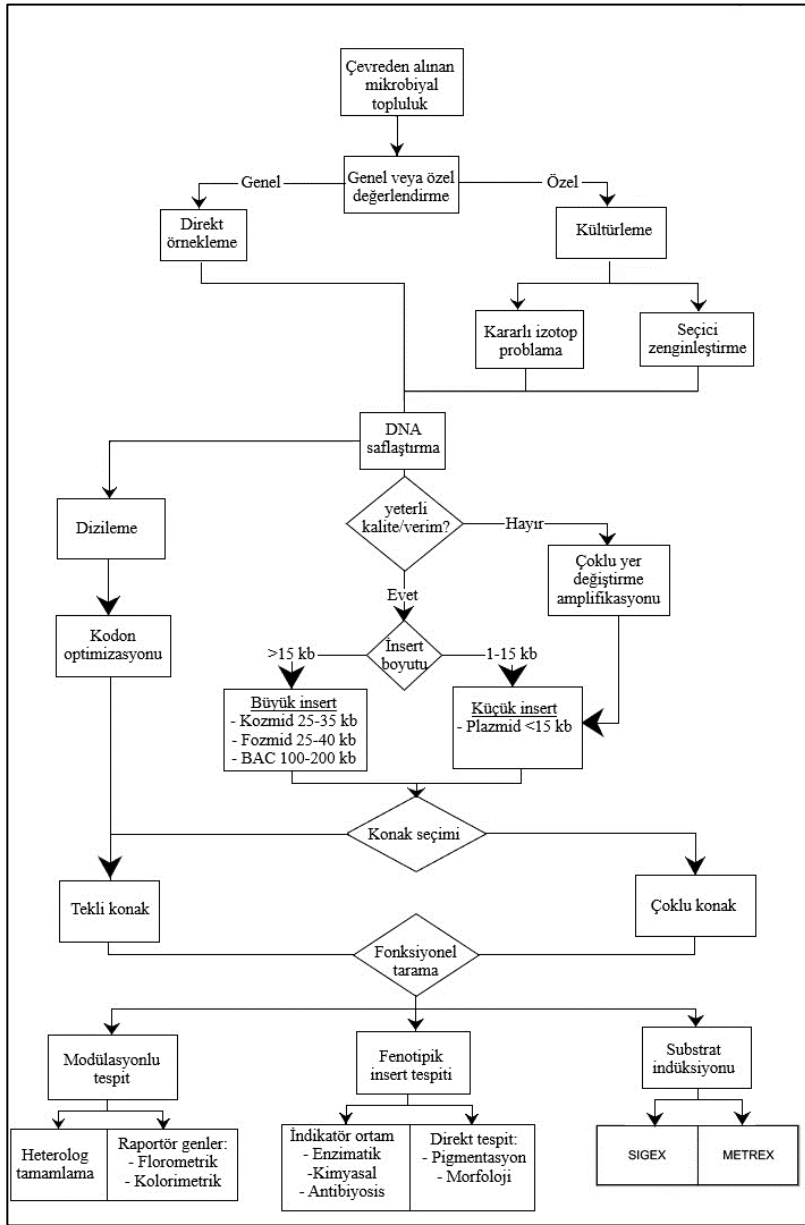
Yerleştirilmesi gereken DNA parçasının boyutuna bağlı olarak, farklı vektörler kullanılmaktadır. Küçük parçalar için (<15 kb) plazmidler, daha büyük parçalar için kozmidler (15-40 kb), fozmidler (25-45 kb) ve/veya bakteriyel yapay kromozomlar (BAC'ler) (100-200 kb) başarıyla kullanılmaktadır (27, 28). Metagenomik kütüphane materyalini ana organizmada ifade etmek için tek konaklı ifade ve çok konaklı ifade olmak üzere iki strateji uygulanmaktadır. Her ne kadar çoğu fonksiyonel ifade taraması tek bir konakçı ile gerçekleştirilmiş olsa da son yıllarda çok konaklı gen ifadesine doğru bir geçiş yaşanmaktadır. Herhangi bir fonksiyon temelli metagenomik değerlendirmenin başarısını belirleyen, bir metagenomik kütüphanede ifade edilen genleri tespit etme, izole etme ve karakterize etme becerisidir (29). Metagenom içindeki genlerin fonksiyonunu belirlemek için üç genel fonksiyon tespit stratejisi bulunmaktadır (30):

(1) Bireysel klonların spesifik fenotiplerinin doğrudan tespiti: Bireysel klonların enzimatik işlevlerini tanımlamak için, kimyasal boyalar ve enzim substratlarının çözünmeyen veya kromofor içeren türevleri büyüme ortamına dahil edilebilir. Bu basit aktiviteye dayalı yaklaşıma örnek olarak, proteaz substratı olarak yağsız süt içeren indikatör agar üzerinde proteaz aktivitesi sergileyen rekombinant *E. coli* klonlarının tespiti verilebilir.

(2) Konak suşların veya mutantların heterolog tamamlayıcılığı: Sadece hedeflenen geni barındıran ve ilgili gen ürününü aktif bir biçimde üreten rekombinant klonlar büyüebilir. Bu şekilde, taramada yüksek bir seçicilik elde edilir. Son örneklerden biri, buzul örneklerinde bulunan mikrobiyal topluluklardan elde edilen metagenomik kütüphanelerden DNA polimeraz kodlayan genlerin tanımlanmasıdır. Bu çalışmada DNA polimeraz I'in 5'-3'ekzonükleaz alanında soğuğa duyarlı ölümcül bir mutasyon taşıyan bir *E. coli* mutanı, metagenomik kütüphaneler için konak olarak kullanılmıştır. 20°C büyüme sıcaklığında sadece DNA polimeraz aktivitesi sağlayan bir genle tamamlanan rekombinant *E. coli* suşları büyüebilmektedir. Bu şekilde, DNA polimerazları kodlayan yeni genler geri kazanılmış ve neredeyse hiç yanlış pozitif klon elde edilmemiştir (31).

(3) İndüklenmiş gen ekspresyonu: Uchiyama ve arkadaşları (2005) yeni katabolik genlerin tanımlanması için substrat kaynaklı gen ifadesi tarama sistemini (SIGEX) tanıtmışlardır. Bu yöntem, katabolik gen ifadesinin genellikle ilgili substratlar tarafından indüklendiği ve çoğu durumda katabolik

genlerin yakınında bulunan düzenleyici unsurlar tarafından kontrol edildiği bilgisine dayanmaktadır. SIGEX'in yüksek verimli olması için, floresanla aktive edilen hücre ayırma yoluyla sıvı kültürlerde pozitif klonların seçilmesine olanak tanıyan, shotgun klonlama için kullanılabilen bir operon-tuzak gfp-ekspresyon vektörü oluşturulmuştur. SIGEX'in faydası, bir yeraltı suyu metagenom kütüphanesinden aromatik hidrokarbon kaynaklı genlerin klonlanması ve ardından genom-informatik analizi ile gösterilmiştir (32). Buna benzer bir sistem de metabolitle düzenlenen ekspresyon (METREX) sistemidir. Bu yöntemde metagenomik DNA, bakteriyel çoğunluk algılamayı (Quorum sensing) indükleyen bileşikler için bir biyosensör içeren bir konakçı hücrede bulunmaktadır. Metagenomik klon bir çoğunluk algılama indükleyicisi üretirse, hücre yeşil floresan protein (GFP) üretir ve floresan mikroskobu ile tanımlanabilir veya floresanla aktive edilen hücre ayırma ile yakalanabilir (33). Başlıca fonksiyonel metagenomik değerlendirme stratejilerine şematik genel bakış Şekil 4'te özetlenmiştir.



Şekil 4. Başlıca fonksiyonel metagenomik değerlendirme stratejileri (29)

## 6. METAGENOMİK UYGULAMA ALANLARI

Metagenomik, çevre biliminden insan sağlığına kadar çeşitli alanlarda uygulama alanı bularak tamamen keşifsel bir araç olarak çıkış noktasını aşmıştır. Ekosistemlere mikrobiyal katkıların gizemlerinin çözülmesinden



insan mikrobiyomunun inceliklerine ışık tutmaya kadar, mikrobiyal dünyayı anlamak için vazgeçilmez bir kaynak haline gelmiştir (Şekil 5).



Şekil 5. Metagenomik uygulama alanları

### 6.1.Çevresel Mikrobiyoloji

Metagenomik, toprak, su ve hava gibi çeşitli ortamlardaki mikrobiyal topluluk yapılarının ve işlevlerinin aydınlatılmasında çok önemli olmuştur (34). Uygulamalar arasında çevresel pertürbasyonlara yanıt olarak mikrobiyal çeşitlilikteki değişikliklerin izlenmesi, besin döngüsünün incelenmesi ve biyoremediasyonda yer alan mikroorganizmaların tanımlanması yer almaktadır (35).

### 6.2.İnsan Mikrobiyom Çalışmaları

İnsan mikrobiyomunun metagenomik analizleri, farklı vücut bölgeleriyle ilişkili mikrobiyal toplulukların bileşimi ve işlevsel potansiyeli hakkında bilgiler sağlamıştır (36). Uygulamalar, bağırsak mikrobiyomunun metabolizma, bağışıklık ve nörolojik fonksiyon üzerindeki etkisi üzerine yapılan çalışmalar da dahil olmak üzere mikrobiyomun sağlık ve hastalıktaki rolünü anlamaya kadar uzanmaktadır (37).

### 6.3.Klinik Tanı ve Patojen Tespiti

Metagenomik yaklaşımlar bulaşıcı hastalıkların teşhisi için kullanılmakta ve spesifik hedefe yönelik testlere gerek kalmadan patojenlerin tanımlanmasına olanak sağlamaktadır (38). Uygulamalar viral, bakteriyel ve

fungus enfeksiyonlarının tespitini içermekte ve daha kapsamlı ve objektif teşhis yaklaşımlarına imkan vermektedir (39).

#### **6.4. Biyoteknolojik Keşifler**

Metagenomik, biyoteknoloji, tarım ve endüstrideki uygulamalarla yeni enzimlerin, biyosentetik yolların ve biyoaktif bileşiklerin keşfine katkıda bulunmaktadır (40). Uygulamalar, endüstriyel süreçler için yeni biyokatalizörlerin, antimikrobiyal ajanların ve enzimlerin geliştirilmesini kapsamaktadır (41).

#### **6.5. Antibiyotik Direnci Sürveyansı**

Metagenomik, çevresel ve klinik ortamlarda antibiyotik direnç genlerinin sürveyansında önemli bir rol oynamaktadır (42). Uygulamalar arasında direnç genlerinin yayılımının izlenmesi, çeşitliliğinin anlaşılması ve antibiyotik direncinin azaltılmasına yönelik stratejilerin belirlenmesi yer almaktadır (43).

#### **6.6. Arkeal ve Viral Ekoloji**

Metagenomik, arkeal ve viral ekoloji anlayışımızı genişleterek çeşitli ekosistemlerdeki rollerini ortaya çıkarmıştır. Uygulamalar arasında viral toplulukların araştırılması, konakçı organizmalarla etkileşimleri ve ekosistem dinamikleri üzerindeki etkileri yer almaktadır (44).

### **7. METAGENOMİK ANALİZLERDE YAŞANAN ZORLUKLAR VE GELECEK HEDEFLERİ**

Metagenom analizleri mikrobiyal toplulukları anlamamızda devrim yaratmıştır, ancak alan olgunlaştıkça, metagenomiğin bir sonraki aşamasını şekillendiren çeşitli zorluklar ve gelecekteki araştırmalar için heyecan verici yollar ön plana çıkmıştır. Metagenomik analizler sırasında karşılaşılan zorluklar ve bu zorlukların çözümü için sunulan öneriler Şekil 6'da özetlenmiştir.

<b>Veri Entegrasyonu ve Standardizasyonu</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Standartlaştırılmış protokoller oluşturma</li> <li>• Sağlam analitik çerçeveler geliştirme</li> </ul>
<b>Suş Seviyesi Çözünürlüğü</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uzun okumalı dizileme</li> <li>• Gelişmiş biyoinformatik algoritmalar geliştirilmesi</li> </ul>
<b>Fonksiyonel Anlamlandırma ve Tahmin Etme</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Deneysel verilerin entegrasyonu</li> <li>• Makine öğrenimi teknikleri</li> <li>• Daha sofistike algoritmaların geliştirilmesi</li> </ul>
<b>Dinamik Zamansal ve Mekânsal Analizler</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Boylamsal çalışmalar</li> <li>• Gelişmiş görüntüleme teknolojilerinin dahil edilmesi</li> </ul>
<b>Metagenomların Karanlık Maddesinin Ortaya Çıkarılması</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Derin öğrenme algoritmaları gibi yeni biyoinformatik araçların araştırılması</li> <li>• İşlevsel karakterizasyon çabalarının artması</li> </ul>
<b>Etik Konular ve Veri Gizliliği</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Etik çerçevelerin, şeffaf veri paylaşımı uygulamalarının ve kamu katılımının geliştirilmesi,</li> </ul>

**Şekil 6.** Metagenomik analizler sırasında karşılaşılan zorluklar ve bu zorlukların çözümü için sunulan öneriler

### 7.1. Veri Entegrasyonu ve Standardizasyonu

Farklı veri kümelerini entegre etmek ve çalışmalar arasında analiz işlem hatlarını standartlaştırmak, dizileme teknolojilerindeki ve biyoinformatik yöntemlerindeki farklılıklar nedeniyle bir zorluk olmaya devam etmektedir (45). Standartlaştırılmış protokoller oluşturma ve sağlam analitik çerçeveler geliştirme çabaları, metagenomik çalışmaların karşılaştırılabilirliğini ve tekrarlanabilirliğini artıracaktır (46).

### 7.2. Suş Seviyesi Çözünürlüğü

Mikrobiyal topluluklarda suş düzeyinde çözünürlük elde etmek, metagenomik verilerin karmaşıklığı ve mevcut dizileme teknolojilerinin sınırlamaları nedeniyle engellenmektedir (47). Uzun okumalı dizileme ve gelişmiş biyoinformatik algoritmalarındaki ilerlemeler, mikrobiyal popülasyon dinamikleri ve işlevsel potansiyel hakkında içgörüler sunarak suş düzeyinde çeşitliliğin çözülmesine katkıda bulunacaktır (48).

### **7.3.Fonksiyonel Anlamlandırma ve Tahmin Etme**

Metagenomik verilerin doğru fonksiyonel açıklamasının yapılması ve mikrobiyal toplulukların metabolik potansiyelinin tahmin edilmesi zorlu görevler olmaya devam etmektedir. Deneysel verilerin entegrasyonu, makine öğrenimi teknikleri ve daha sofistike algoritmaların geliştirilmesi, karmaşık mikrobiyal ekosistemlerin işlevsel yönlerini deşifre etme yeteneğimizi artıracaktır (17).

### **7.4.Dinamik Zamansal ve Mekânsal Analizler**

Doğal yaşam alanlarındaki mikrobiyal toplulukların zamansal ve mekânsal dinamiklerini anlamak, sınırlı örnekleme sıklığı ve çözünürlüğü nedeniyle zorluklar arz etmektedir. Boylamsal çalışmalar ve gelişmiş görüntüleme teknolojilerinin dahil edilmesi, mikrobiyal toplulukların zaman ve mekân içinde nasıl değiştiğinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır (49).

### **7.5.Metagenomların Karanlık Maddesinin Ortaya Çıkarılması**

Metagenomik verilerin önemli bir kısmı, genellikle "karanlık madde" olarak adlandırılan bilinmeyen veya karakterize edilmemiş mikrobiyal dizileri temsil eder. Derin öğrenme algoritmaları gibi yeni biyoinformatik araçların araştırılması ve işlevsel karakterizasyon çabalarının artması, metagenomların anlaşılması zor bileşenlerine ışık tutarak mikrobiyal çeşitlilik ve işlevin daha kapsamlı bir şekilde anlaşılmasına katkıda bulunacaktır (14).

### **7.6.Etik Konular ve Veri Gizliliği**

Metagenomik verilerin artan hacmi, veri gizliliği, mülkiyeti ve hassas bilgilerin sorumlu kullanımı ile ilgili etik kaygıları gündeme getirmektedir. Etik çerçevelerin, şeffaf veri paylaşımı uygulamalarının ve kamu katılımının geliştirilmesi, metagenomiklerin etik ortamının yönlendirilmesinde kritik öneme sahip olacaktır (50).

## **8. TARTIŞMA**

Sonuç olarak, metagenomik, çeşitli ekosistemlerdeki mikrobiyal yaşamın karmaşık dokusunu çözen dönüştürücü bir alan olarak ortaya çıkmıştır. İnsan vücudundaki mikrobiyal toplulukların keşfinden çevresel habitatların karmaşık dinamiklerine kadar, metagenomik analizler mikrobiyal dünyaya

ilişkin anlayışımızı derinleştirmiştir. Kayda değer başarılarla rağmen, sürekli yenilik ve iş birliği gerektiren zorluklar devam etmektedir.

İnsan Mikrobiyom Projesi gibi girişimler aracılığıyla elde edilen metagenomik verilerin entegrasyonu ve standardizasyonu, çalışmalar arasında karşılaştırılabilirliği ve tekrarlanabilirliği teşvik etmek için gereklidir. Genlerin fonksiyonlarını açıklama ve tahmin etme konusundaki zorlukların üstesinden gelmek, mikrobiyal metabolizmanın sınırlarını açığa çıkararak biyoteknoloji ve çevre bilimindeki ilerlemelere rehberlik edecektir.

Mikrobiyal toplulukların dinamik doğası, zamansal ve mekânsal analizlere daha fazla odaklanılmasını gerektirmekte ve bu toplulukların çevresel değişikliklere nasıl uyum sağladığına ve yanıt verdiğine dair içgörüler sağlamaktadır. Metagenomların karanlık maddesi olan bilinmeyen ve karakterize edilmemiş dizileri keşfetmek, yenilikçi biyoinformatik araçların geliştirilmesini ve derin öğrenme algoritmalarının uygulanmasını gerektiren heyecan verici bir sınır olmaya devam etmektedir.

Bu zorlukların üstesinden gelirken, metagenomiğin geleceği büyük umut vaat etmektedir. Teknoloji, analitik yöntemler ve disiplinler arası iş birliklerindeki ilerlemeler, benzeri görülmemiş bir keşif çağını başlatacaktır. Ekolojik soruların ele alınmasından kişiselleştirilmiş tıbbın geliştirilmesine kadar, metagenomik mikrobiyal dünya anlayışımızı ve bunun insan sağlığı ve çevre üzerindeki derin etkilerini şekillendirmede itici bir güç olmaya devam edecektir.

Önümüzdeki yıllarda, metagenomik yolculuk şu anda keşfettiğimiz alanların ötesine geçecek, bilgimizin sınırlarını zorlayacak ve mikroorganizmalar ile çevreleri arasındaki karmaşık ilişkilere dair yeni içgörüler sağlayacaktır. Üstesinden gelinen her zorlukla birlikte, metagenomik bizi mikrobiyal evrenin kapsamlı bir anlayışına daha da yaklaştırarak bilimsel yenilik ve toplumsal fayda için zengin fırsatlar sunmaktadır.

**KAYNAKÇA**

1. Ko, K. K., Chng, K. R., & Nagarajan, N. (2022). Metagenomics-enabled microbial surveillance. *Nature Microbiology*, 7(4), 486-496.
2. Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., & Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, 5(10), R245-R249.
3. Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2004). Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annual Review of Genetics*, 38, 525-552.
4. Tringe, S. G., von Mering, C., Kobayashi, A., Salamov, A. A., Chen, K., Chang, H. W., ... & Rubin, E. M. (2005). Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, 308(5721), 554-557.
5. Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., ... & Nelson, W. C. (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304(5667), 66-74.
6. Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., ... & Rothberg, J. M. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057), 376-380.
7. Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., ... & Gordon, J. I. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457(7228), 480-484.
8. Lorenz, P., & Eck, J. (2005). Metagenomics and industrial applications. *Nature Reviews Microbiology*, 3(6), 510-516.
9. Raes, J., Foerstner, K. U., & Bork, P. (2007). Get the most out of your metagenome: computational analysis of environmental sequence data. *Current Opinion in Microbiology*, 10(5), 490-498.
10. Wilhelm, L., Singer, G. A., Fasching, C., Battin, T. J. & Besemer, K. (2013). Microbial biodiversity in glacier-fed streams. *The ISME Journal*, 7(8), 1651-1660.
11. Hultman, J., Waldrop, M. P., Mackelprang, R., David, M. M., McFarland, J., Blazewicz, S. J., ... & Jansson, J. K. (2015). Multi-omics of permafrost, active layer and thermokarst bog soil microbiomes. *Nature*, 521(7551), 208-212.
12. Ayoib, A., Hashim, U., Gopinath, S. C. B. & Md Arshad, M. K. (2017). DNA extraction on bio-chip: history and preeminence over conventional and solid-phase extraction methods. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(22), 8077-8088.
13. Tsuji, S., Takahara, T., Doi, H., Shibata, N., & Yamanaka, H. (2019). The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA

- analysis—A review of methods for collection, extraction, and detection. *Environmental DNA*, 1(2), 99-108.
14. Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature Biotechnology*, 35(9), 833-844.
  15. Lasken, R. S. (2012). Genomic sequencing of uncultured microorganisms from single cells. *Nature Reviews Microbiology*, 10(9), 631-640.
  16. Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., ... & Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5), 335-336.
  17. Huson, D. H., Beier, S., Flade, I., Górski, A., El-Hadidi, M., Mitra, S., ... & Tappu, R. (2016). MEGAN community edition-interactive exploration and analysis of large-scale microbiome sequencing data. *PLoS Computational Biology*, 12(6), e1004957.
  18. Pasolli, E., Schiffer, L., Manghi, P., Renson, A., Obenchain, V., Truong, D. T., ... & Waldron, L. (2017). Accessible, curated metagenomic data through ExperimentHub. *Nature Methods*, 14(11), 1023-1024.
  19. Kang, D. D., Li, F., Kirton, E., Thomas, A., Egan, R., An, H., & Wang, Z. (2019). MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies. *PeerJ*, 7, e7359
  20. Segata, N., Waldron, L., Ballarini, A., Narasimhan, V., Jousson, O., & Huttenhower, C. (2012). Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. *Nature Methods*, 9(8), 811-814.
  21. Han, D., Gao, P., Li, R., Tan, P., Xie, J., Zhang, R., & Li, J. (2020). Multicenter assessment of microbial community profiling using 16S rRNA gene sequencing and shotgun metagenomic sequencing. *Journal of Advanced Research*, 26, 111-121.
  22. Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581-583.
  23. Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., ... & Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852-857.
  24. Brown, C. T., Hug, L. A., Thomas, B. C., Sharon, I., Castelle, C. J., Singh, A., ... & Banfield, J. F. (2015). Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria. *Nature*, 523(7559), 208-211.

25. Haro-Moreno, J. M., López-Pérez, M., & Rodríguez-Valera, F. (2021). Enhanced recovery of microbial genes and genomes from a marine water column using long-read metagenomics. *Frontiers in Microbiology*, 2410.
26. Lam, K. N., Cheng, J., Engel, K., Neufeld, J. D., & Charles, T. C. (2015). Current and future resources for functional metagenomics. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1196.
27. Angelov, A., Mientus, M., Liebl, S., & Liebl, W. (2009). A two-host fosmid system for functional screening of (meta) genomic libraries from extreme thermophiles. *Systematic and Applied Microbiology*, 32(3), 177-185.
28. Kakirde, K. S., Parsley, L. C., & Liles, M. R. (2010). Size does matter: application-driven approaches for soil metagenomics. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(11), 1911-1923.
29. Ekkers, D. M., Cretoiu, M. S., Kielak, A. M. & Van Elsas, J. D. (2012). The great screen anomaly—a new frontier in product discovery through functional metagenomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 1005–1020.
30. Simon, C. & Daniel, R. (2009). Achievements and new knowledge unraveled by metagenomic approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(2), 265–276.
31. Simon, C., Herath, J., Rockstroh, S., & Daniel, R. (2009). Rapid identification of genes encoding DNA polymerases by function-based screening of metagenomic libraries derived from glacial ice. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(9), 2964-2968.
32. Uchiyama, T., Abe, T., Ikemura, T., & Watanabe, K. (2005). Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. *Nature Biotechnology*, 23(1), 88-93.
33. Williamson, L. L., Borlee, B. R., Schloss, P. D., Guan, C., Allen, H. K., & Handelsman, J. (2005). Intracellular screen to identify metagenomic clones that induce or inhibit a quorum-sensing biosensor. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 6335-6344.
34. Delmont, T. O., Quince, C., Shaiber, A., Esen, Ö. C., Lee, S. T., Rappé, M. S., ... & Eren, A. M. (2018). Nitrogen-fixing populations of Planctomycetes and Proteobacteria are abundant in surface ocean metagenomes. *Nature Microbiology*, 3(7), 804-813.
35. Dombrowski, N., Donaho, J. A., Gutierrez, T., Seitz, K. W., Teske, A. P., & Baker, B. J. (2016). Reconstructing metabolic pathways of hydrocarbon-



- degrading bacteria from the Deepwater Horizon oil spill. *Nature Microbiology*, 1(7), 1-7.
36. Lloyd-Price, J., Mahurkar, A., Rahnavard, G., Crabtree, J., Orvis, J., Hall, A. B., ... & Huttenhower, C. (2017). Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. *Nature*, 550(7674), 61-66.
37. Shreiner, A. B., Kao, J. Y., & Young, V. B. (2015). The gut microbiome in health and in disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, 31(1), 69.
38. Naccache, S. N., Federman, S., Veeraraghavan, N., Zaharia, M., Lee, D., Samayoa, E., ... & Chiu, C. Y. (2014). A cloud-compatible bioinformatics pipeline for ultrarapid pathogen identification from next-generation sequencing of clinical samples. *Genome Research*, 24(7), 1180-1192.
39. Gu, W., Deng, X., Lee, M., Sucu, Y. D., Arevalo, S., Stryke, D., ... & Chiu, C. Y. (2021). Rapid pathogen detection by metagenomic next-generation sequencing of infected body fluids. *Nature Medicine*, 27(1), 115-124.
40. Prayogo, F. A., Budiharjo, A., Kusumaningrum, H. P., Wijanarka, W., Suprihadi, A., & Nurhayati, N. (2020). Metagenomic applications in exploration and development of novel enzymes from nature: a review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1), 1-10.
41. Robinson, S. L., Piel, J., & Sunagawa, S. (2021). A roadmap for metagenomic enzyme discovery. *Natural Product Reports*, 38(11), 1994-2023.
42. Forsberg, K. J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E. M., Sommer, M. O., & Dantas, G. (2012). The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science*, 337(6098), 1107-1111.
43. Sukhum, K. V., Diorio-Toth, L., & Dantas, G. (2019). Genomic and metagenomic approaches for predictive surveillance of emerging pathogens and antibiotic resistance. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 106(3), 512-524.
44. Sommers, P., Chatterjee, A., Varsani, A., & Trubl, G. (2021). Integrating viral metagenomics into an ecological framework. *Annual Review of Virology*, 8, 133-158.
45. Franzosa, E. A., McIver, L. J., Rahnavard, G., Thompson, L. R., Schirmer, M., Weingart, G., ... & Huttenhower, C. (2018). Species-level functional profiling of metagenomes and metatranscriptomes. *Nature Methods*, 15(11), 962-968.
46. Knight, R., Vrbanac, A., Taylor, B. C., Aksenov, A., Callewaert, C., Debelius, J., ... & Dorrestein, P. C. (2018). Best practices for analysing microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*, 16(7), 410-422.

47. Segata, N. (2018). On the road to strain-resolved comparative metagenomics. *MSystems*, 3(2), 10-1128.
48. Anyansi, C., Straub, T. J., Manson, A. L., Earl, A. M., & Abeel, T. (2020). Computational methods for strain-level microbial detection in colony and metagenome sequencing data. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1925.
49. Faust, K., Lahti, L., Gonze, D., De Vos, W. M., & Raes, J. (2015). Metagenomics meets time series analysis: unraveling microbial community dynamics. *Current Opinion in Microbiology*, 25, 56-66.
50. Woolley, J. P., Kirby, E., Leslie, J., Jeanson, F., Cabili, M. N., Rushton, G., ... & Brookes, A. J. (2018). Responsible sharing of biomedical data and biospecimens via the “Automatable Discovery and Access Matrix”(ADA-M). *NPJ Genomic Medicine*, 3(1), 17.



**BÖLÜM 10**  
**İŞİTME KAYBI GENETİĞİ**

Doç. Dr. Duygu DUMAN<sup>1</sup>

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.10251403>

---

<sup>1</sup> Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Odyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye,  
Ankara Üniversitesi Nadir Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi, Ankara,  
Türkiye



İşitme kaybının genetik temellerine ilişkin bilgiler hızla geliştikçe, klinisyenin hastayı yönetmedeki rolü işitsel fenotipin özelliklerini tanımlamanın ötesine geçmiştir. Bazı durumlarda işitme kaybı, kritik tıbbi müdahalenin gerekli olduğu (örn:Jervell ve Lange Nielsen sendromu) veya rehabilitasyon stratejileri üzerinde önemli bir etkisi olabilecek (örn: Usher sendromu) bir sendromun ilk belirtisi olabilir. Klinisyenlerin işitme kaybının genetiği hakkında bilgi sahibi olması hastaların uygun uzmanlara zamanında sevk edilmeleri ve ilgili durumların yönetimini kolaylaştıracaktır. Bugün ilerleyen teknoloji sayesinde genetik testler ile hastalara tanı koyarak genetik danışma vermek ve ailelerin işitme kaybından etkilenmemiş çocuk sahibi olmasını sağlamak mümkündür. Gen düzenleme teknolojileri ile genetik nedenli işitme kayıplı bireylerin tedavi edilebilmesi üzerinde çalışmalar sürmektedir.

## **KALITSAL İŞİTME KAYBININ EPİDEMİYOLOJİSİ**

İşitme kaybı en sık görülen duyuşal bozukluktur. Dünya genelinde her beş kişiden biri işitme kaybı ile yaşamaktadır. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre dünya çapında tahminen 466 milyon insan (nüfusun % 5.5'i) işitme kaybına sahiptir ve bu sayının 2050 yılında 900 milyona çıkması beklenmektedir (<https://www.who.int/health-topics/hearing-loss>). Başlangıç yaşı farklılık gösterebilir. Doğuştan sensörinöral işitme kaybı, yenidoğan taramalarına göre her 500 canlı doğumda bir ortaya çıkmaktadır. İşitme kaybının bilinen birçok genetik ve çevresel nedeni vardır. Rubella, sitomegalovirüs gibi teratolojik ajanlar, menenjit, kabakulak gibi enfeksiyonlar, ototoksik ilaçlar, akustik travma, erken doğum ve düşük doğum ağırlığı, işitme kaybına sebep olabilen çevresel nedenlerdir. 19. Yüzyıl başlarından itibaren doğuştan veya dil gelişimi öncesi ortaya çıkan işitme kayıplarında ailesel nedenlerin önemli olduğu gösterilmiştir (1). Epidemiyolojik çalışmalar, dünya genelinde işitme kayıplarının yarısından fazlasından genetik nedenlerin sorumlu olduğunu göstermektedir (2).

Genetik nedenli işitme kayıpları, kalıtım şekline, başlama yaşına, odyolojik karakterlere, vestibüler fonksiyon bozukluklarının varlığı ve yokluğuna, sebep genin lokalizasyonu ve/veya türüne göre çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir.

Kalıtım şekline göre; tek genli kalıtım ve çok genli kalıtım olarak iki grupta sınıflandırılır. Tek genli kalıtım otozomal resesif (%70-80), otozomal dominant (%10-20), X'e bağlı (%1-2) ve mitokondrial (%0-20) olarak gruplandırılır. Çok genli kalıtım ise kromozomal anomaliler ve oligogenik kalıtım olarak ayrılmaktadır (3).

Türkiye'de segragasyon analizi ile yapılan epidemiyolojik çalışmaya göre; Türkiye'de işitme kayıplı olguların %23,2'sinde çevresel nedenli ve %76,8'inde genetik nedenli işitme kaybı saptanmıştır. Genetik olguların %93,4'ünden resesif ve %6,6'sından da dominant kalıtımın sorumlu olduğu gösterilmiştir (4).

Fenotipe yansımasına göre işitme kayıpları sendromik ve sendromik olmayan işitme kaybı olarak iki grupta incelenebilir.

### SENDROMİK İŞİTME KAYIPLARI

İşitme kaybının klinik başka anomalilerle birlikteliği sendromik işitme kaybı olarak adlandırılır. Genetik nedenli işitme kaybının yaklaşık %30'unu sendromik işitme kaybı oluşturmaktadır. İşitme kaybına, göz, pigment, sinir, böbrek, iskelet anomalilerin eşlik ettiği 400'den fazla sendrom tanımlanmıştır (5). Sendromik işitme kayıpları otozomal resesif, otozomal dominant, X'e bağlı veya mitokondrial kalıtım gösterebilmektedir. Sık görülen sendromlar arasında Pendred Sendromu, Usher Sendromu, Jervell ve Lange-Nielsen Sendromu, Waardenburg Sendromu, Brankio-Oto-Renal Sendrom (BOR), Alport Sendromu bulunmaktadır (Tablo I).

**Tablo I.** Sık görülen sendromik işitme kayıpları ve işitme kaybına eşlik eden ana klinik bulguları

Sendrom	Ana özellikleri
Pendred	Tiroid fonksiyon bozukluğu
Usher	Görme kaybı
Jervell ve Lange Nielsen	Kalp problemleri
Waardenburg	Pigment anomalileri
Brankiyo-Oto-Renal	Brankiyal kistler ve üriner sistem anomalileri
Alport	Böbrek problemleri

Kearns-Sayre, Pearson , MELAS (miyoklonik epilepsi, laktik asidoz, felç benzeri ataklar), MERRF (düzensiz kırmızı lifli mitokondriyal ensefalomiyopati), Leber'in kalıtsal optik nöropatisi (LHON) sendromlarına mitokondriyal mutasyonlar neden olur (7). Birkaç sendromik işitme kaybı formu X'e bağlıdır (8). Bazı genlerdeki mutasyonlar hem sendromik hem de sendromik olmayan işitme kaybına neden olabilirler. Birçok sendromda işitme kaybı orta düzeyde veya değişken bir bulgu olup, bir kısmında da oldukça nadir görülmektedir.

Sensörinöral işitme kaybı sendromik olmayan işitme kaybını taklit eden bir sendromun ilk belirtisi olabilir (9). Bu nedenle işitme kaybı olan bir çocukta öykü ve fizik muayene ayrıntılı olmalı ve klinik genetik değerlendirme yapılmalıdır. Sık görülen sendromların bulgularından olan retinitis pigmentosa (Usher sendromu), guatr ve hipotiroidi (Pendred sendromu), iki göz renginde farklılık, saçların erken beyazlaşması, kabızlık (Waardenburg sendromu), senkop aritmiler ve ailede ani ölüm öyküsü (Jervell ve Lange Nielsen sendromu), hipertansiyon, böbrek yetmezliği (Alport sendromu) sorgulanmalıdır. İç kulağın bilgisayarlı tomografisinde genişlemiş vestibüler kanal bulgusu olması Pendred sendromu, elektrokardiyografide uzun QT aralığının saptanması Jervell ve Lange Nielsen sendromu için tanı koydurabilecek testlerdir.

**Pendred sendromu**, sensörinöral işitme kaybı, tiroid fonksiyon bozukluğu ve kokleanın gelişimsel anomalileri ile karakterize otozomal resesif bir sendromdur. İşitme kayıplarının en sık görülen sendromik formudur. Konjenital kalıtsal işitme kaybının %10'unu oluşturmaktadır (10). İşitme kaybı çoğunlukla konjenital ve ileri- çok ileri derecedir, vestibüler disfonksiyon eşlik edebilir. En sık görülen iç kulak anomalisi, genişlemiş vestibüler kanaldır. Guatr tam olarak penetran değildir ve tipik olarak ergenliğe kadar ortaya çıkmaz. Bu nedenle Pendred sendromu sıklıkla guatrın başlangıcından önce nonsendromik işitme kaybı olarak adlandırılabilir .

Bu sendroma, bir iyon taşıma proteini olan pendrin proteinini kodlayan *SLC26A4* genindeki biallelik mutasyonlar sebep olmaktadır. Bu gendeki mutasyonlar sıklıkla genişlemiş vestibüler kanal, monodini displazisi, koklear hipoplazi gibi iç kulak anomalilerinin eşlik ettiği sendromik olmayan işitme kaybı ile de ilişkilendirilmiştir. Bugüne kadar bu gende 600'ün üzerinde mutasyon bildirilmiştir (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac>).



**Usher sendromu** sensörinöral işitme kaybı ve görme kaybının birlikteliği ile karakterize otozomal resesif bir sendromdur. İşitme kaybına vestibüler bozukluklar eşlik edebilir. Görme kaybına periferal (yan) görüşün kaybı ve az aydınlatılmış alanlarda görme zorluğu (gece körlüğü) ile karakterize retinitis pigmentosa (RP) adı verilen ilerleyici retinal bozulmalar sebep olur. İşitme ve görme kaybının birlikte eşlik ettiği 50'den fazla sendrom tanımlanmıştır ancak Usher sendromu sağır-kör vakaların %50'sini oluşturmasıyla en sık görülenidir (11). Sağır popülasyonunun %3-6'sının, retinitis pigmentozalı hastaların %8- 33'ünün Usher olduğu tahmin edilmektedir. Sendromun genel görülme sıklığı 100.000 canlı doğumda 3.5-6.2'dir (12).

Usher sendromu klinik ve genetik olarak heterojendir. Klinik olarak retinitis pigmentosa başlangıç yaşı ve vestibüler bozukluk olup olmamasına göre birbirinden ayrılabilen üç farklı tipi ve sebep olan gen ve gen bölgelerine (lokus) göre de alt tipleri bulunmaktadır (Tablo II). En sık görülen formu olan tip 2'de işitme kaybına vestibüler bozukluk eşlik etmez ve RP yaşamın ilk veya ikinci yarısında ortaya çıkabilir. En ağır formu tip 1'dir. Usher sendromuna sebep olan bazı genler aynı zamanda sendromik olmayan işitme kaybına da sebep olabilmektedir. İşitme kayıplı hastalarda retinitis pigmentoza bulunması Usher sendromunu sendromik olmayan işitme kaybından ayıran en önemli özelliktir. Retinitis pigmentozaya anormal veya kaydedilemeyen elektoretinogram (ERG) ile tanı koyulabilmektedir. Usher genlerinde mutasyon bulunan sendromik olmayan işitme kayıplı hastalara ERG yapılmadan Usher sendromunu dışlamak mümkün değildir.

**Tablo II.** Usher sendromu klinik ve genetik alt tipleri, sorumlu genler

Klinik bulgular	Usher Sendrom Tipi (Usher sendromlu vakalar içindeki %)	Gen/Lokus (Kendi tipi arasındaki %)	Sendromik olmayan form	
Çok ileri işitme kaybı; vestibüler bozukluk; çocukluk çağında başlayan RP	USH I (%33-44)	<b>1A</b>	Bilinmiyor/ 14q32	yok
		<b>1B</b>	<i>MYO7A</i> (%50)	DFNB2 DFNA11
		<b>1C</b>	<i>USH1C</i> (%7)	DFNB18
		<b>1D</b>	<i>CDH23</i> (%25)	DFNB12
		<b>1E</b>	Bilinmiyor/ 21q21	yok
		<b>1F</b>	<i>PCDH15</i> (%15)	DFNB23
		<b>1G</b>	<i>SANS</i> (%7)	yok
		<b>1H</b>	Bilinmiyor/ 15q22-23	yok
		<b>1J</b>	<i>CIB2</i>	DFNB48
		<b>1K</b>	Bilinmiyor/ 10p11.21-q21.1	yok
Orta-Şiddetli işitme kaybı; normal vestibüler fonksiyon; geç başlangıçlı RP	USH II (%56-67)	<b>2A</b>	<i>USH2A</i> (%80)	yok
		<b>2B</b>	Bilinmiyor/ 3p23-24.2	yok
		<b>2C</b>	<i>VLGR1</i> ( <i>GPR98</i> ) (%15)	Refleks nöbetler
		<b>2D</b>	<i>WHRN</i> (%5)	DFNB31
İlerleyici işitme kaybı; değişken vestibüler fonksiyon; değişken başlangıç yaşlı RP	USH III (%2-4)	<b>3A</b>	<i>CLRN1</i>	yok

**Waardenburg sendromu (WS)** 1951 yılında sensörinöral işitme kaybına eşlik eden deride, saçta ve/veya gözde pigment anomalileri ve distopia kantorum (gözlerde iki iç kantus arasındaki mesafenin geniş olması) bulgularıyla tanımlanmıştır. Daha sonra distopia kantorum olmayan hastaların tanımlanmasıyla ve bulgulara ekstremite anomalileri ve Hirschburg sendromu eşlik edip etmemesine göre klinik olarak 4 farklı tipte gruplanmıştır. WS1 ve WS2 sendromun en yaygın türleridir. WS1 hastaları konjenital sensörinöral işitme kaybı, pigment anomalisi ve distopia kantorum ile karakterizedir. Geniş burun kökü, kısa filtrum ve kısa retropozisyonel maksilla da WS1 hastalarında sık görülen kraniyofasiyal özelliklerdir. WS2 vakaları, WS1'dekine benzer semptomlar gösterir, ancak distopia kantorumdan yoksundur. WS3 hastaları, tüm birincil fenotiplere ek olarak bazen kas-iskelet displazisi, ekstremite kas displazisi ve dirsek (parmak) eklem kontraktürü dahil olmak üzere iskelet anomalileri gösterir. Bazı WS3 vakaları ayrıca zihinsel engellilik ve mikrosefali ile kendini gösterir. WS4, WS2'ye benzer fenotiplere sahiptir, ancak sıklıkla Hirschsprung hastalığı ile ilişkilidir ve sıklıkla konjenital megakolon ve gastrointestinal atrezi eşlik eder. Farklı nedensel genlere dayanarak, WS2; WS2A, B, C, D ve E olarak ve WS4; WS4A, B ve C olarak alt gruplara ayrılır (Tablo III) (13)

Hastalık genel olarak otozomal dominant kalıtlı ancak nadir de olsa resesif formları bulunmaktadır. Sendromun eksik penetrasyon oranının yaklaşık %20 olduğu göz önüne alındığında, gerçek insidansın genel popülasyonda 1/42000 olduğu tahmin edilmektedir. Doğuştan işitme kaybı olan tüm hastaların yaklaşık %2-5'ini ve sağır nüfusun 0.9-2.8'ini oluşturmaktadır. Hastalarda genellikle her iki kulakta simetrik olarak ortaya çıkan konjenital şiddetli sensörinöral tip işitme kaybı bulunmaktadır. Ancak tek taraflı, simetrik olmayan ve değişik şiddetlerde işitme kaybı formları da bildirilmiştir. *PAX3* genlerinde mutasyon olan hastaların yaklaşık yarısında klinik tipten bağımsız olarak işitme kaybı mevcuttur. *SOX10* mutasyonlu hastalarda işitme kaybı daha yaygın ve daha şiddetlidir. Bu nedenle, hastaları işitme kaybı riski hakkında en iyi şekilde bilgilendirmek için moleküler analiz yoluyla WS'nin klinik tanısını doğrulamak ve kapsamlı genotip-fenotip karşılaştırmaları yapmak önemlidir (14).

**Tablo III.** Waardenburg sendromu tipleri ve genetik özellikleri

Klinik bulgular	Waardenburg Sendromu Tipi	Gen/Lokus	Kahtım biçimi	
İşitme kaybı, pigmentasyon anomalileri, distopia kantorum var	WS I	<i>PAX3</i>	Otozomal dominant	
İşitme kaybı, pigmentasyon anomalileri, distopia kantorum yok	WS II	2A	<i>MITF</i>	Otozomal dominant
		2B	Bilinmiyor/1p21-p13.3	Otozomal dominant
		2C	Bilinmiyor/8p23	Otozomal dominant
		2D	<i>SNAI2</i>	Otozomal resesif
		2E	<i>SOX10</i>	Otozomal dominant
Tip 1 bulgularına ek olarak ekstremite anomalileri	WS III (Klein-Waardenburg sendromu)	<i>PAX3</i>	Otozomal dominant veya resesif	
Tip 2 bulgularına ek olarak Hirschsprung hastalığı	WS IV (Shah-Waardenburg sendromu)	4A	<i>EDNRB</i>	Otozomal dominant veya resesif
		4B	<i>EDN3</i>	Otozomal dominant veya resesif
		4C	<i>SOX10</i>	Otozomal dominant

**Brankiyo-Oto-Renal Sendrom**, sensörinöral, iletim veya mikst tip işitme kaybı, dış, orta ve iç kulakta yapısal bozukluklar, brankiyal fistüller veya kistler ve hafif hipoplaziden tam yokluğa kadar değişen böbrek anomalileri ile

karakterize otozomal dominant bir hastalıktır. İşitme kayıplılar arasında görülme sıklığı yaklaşık %2 'dir. Olguların %75' inde işitme kaybı, %60'ında brankiyal kist veya fistüller, %30-60'ında pinna anomalileri ve %80'inde üriner sistem anomalileri görülmektedir. İşitme kayıpları hafif-ileri arasında değişken, stabil veya ilerleyici, çoğu zaman geç başlangıçlı ve mikst tiptedir. Bugüne kadar *EYAI*, *SIX1* ve *SIX5* genlerindeki heterozigot mutasyonların sendroma sebep olduğu gösterilmiştir (15). Olguların %40'ında sorumlu gen *EYA* 'dir. Bilinen nedensel genlerin üçü de embriyolojik gelişimde önemli rol oynamakta ve diğer genlerin aktivitesini düzenlemektedir. Sendromun erken tanımlanması, ürolojik ve renal anormalliklerin teşhis ve yönetimini hızlandırmak ve etkilenen bireylerin uygun gözetimini sağlamak için önemlidir.

**Jervell ve Lange Nielsen sendromu** doğuştan çok ileri derecede işitme kaybı ve EKG'de uzamış QT aralığı ile karakterize otozomal resesif bir sendromdur. İşitme engelliler arasında sıklığı % 0.3-6'dır. Bu sendroma, kalp ve iç kulağın normal fonksiyonun kritik bir bileşeni olan hücre zarları boyunca potasyum iyonlarının akışını kontrol eden potasyum kanallarının oluşumu ve işlevini düzenleyen proteinleri kodlayan *KCNE1* ve *KCNQ1* genlerindeki mutasyonlar sebep olmaktadır (16). Bu genlerdeki heterozigot mutasyonlar işitme kaybı olmadan uzun QT'ye sebep olabilirler (Romano-Ward sendromu). Bu hastalarda koklear implantasyon kontraendike değildir, ancak cerrahi sırasında özel önlemler gerekli olabilir. (17). Doğuştan çok ileri derecede işitme kaybı olan çocuklarda EKG çekilmesi bu hastalığın yol açabileceği ölüm riskinden kaçınmayı sağlayacaktır.

**Alport sendromu** ilerleyici böbrek hastalığı, oküler bozukluklar ve sensörinöral işitme kaybı ile karakterizedir. İşitme kaybı çoğunlukla geç başlangıçlı ve yüksek frekanslarda daha şiddetli olabilir. Bu sendroma böbrekte glomüler bazal membranın yapısını oluşturan temel protein olan tip 4 kollejeni kodlayan *COL4A3*, *COL4A4* ve *COL4A5* genlerindeki mutasyonlar sebep olmaktadır. Bu genler iç kulakta baziler membranda, spiral ligamanın kısımlarında ve stria vaskülariste ifade olmaktadır. Vakalarının yaklaşık %85'i X'e bağlıdır ve *COL4A5* genindeki mutasyonlardan kaynaklanır. Yaklaşık %15'i otozomal resesiftir (*COL4A3*, *COL4A4*), otozomal dominant geçiş nadirdir (*COL4A3*). *COL4A3* ve *COL4A4* genlerinde iki genli kalıtım da gösterilmiştir (18).

## SENDROMİK OLMAYAN İŞİTME KAYBI

İşitme kaybına kulak ve vestibüler sistem hastalıkları dışında başka klinik veya laboratuvar bulgusu eşlik etmiyorsa sendromik olmayan işitme kaybı olarak adlandırılır. Genetik nedenli işitme kayıplarının yaklaşık %70'i bu gruba girmektedir. Sendromik olmayan işitme kaybı gen bölgeleri "DFN" olarak kısaltılır. DFNA otozomal dominant, DFNB otozomal resesif, DFNX X'e bağlı kalıtım gösteren lokusları belirtmektedir.

İç kulağın karmaşık yapısı ve işlevi yüzlerce farklı proteinin görev alması ile sağlanabilmektedir. Normal işitmeyi sağlayan yüzlerce farklı protein bulunmaktadır ve bunlardan herhangi birindeki bir mutasyon işitme kaybına neden olabilir. Bu nedenle işitme kayıplarının genetiğini aydınlatmak zor olmuştur. İlk sendromik olmayan işitme kaybı geni olan *GJB2*, 1997'de tanımlandıktan sonra birçok gen ortaya çıkarılmıştır (19).

Sendromik olmayan işitme kaybı nedeni olan genler içinde en önemli yeri "konnesin 26 (*GJB2*)" tutmaktadır. Konnesinler, iyon ve moleküllerin hücrelerarası geçişini sağlayan aralıklı bileşkekelerin proteininin alt ünitelerini kodlayan bir gen ailesidir. Bu ailenin bir üyesi olan *GJB2* geni bir aralıklı bileşke proteini olan konnesin 26 proteinini kodlar. Birçok toplumda bu gendeki mutasyonların genetik nedenli işitme kaybının %50'sini oluşturduğu bildirilmiştir (20). Kuzey Amerika, Avrupa ve Akdeniz'de bu gendeki en çok rastlanan mutasyon altılı guanin serisinden birinin delesyonuyla oluşan c.35delG mutasyonudur (21). Bugüne kadar bu gen içinde 400'den fazla mutasyon bildirilmesine rağmen c.35delG mutasyonu beyaz ırkta tüm mutasyonların yaklaşık %60-70'ini kapsamaktadır. Bu mutasyonun taşıyıcılığı Avrupalı beyazlarda %2-4 arasındadır (21). Sağlıklı Türk toplumunda ise %1.8 olarak bulunmuştur (22). Belirli popülasyonlarda *GJB2* geninde diğer sık görülen mutasyonlara, Aşkenazi Yahudilerinde c.167delT (23), Japonlarda c.235delC (24), Hintlilerde (25) ve Avrupalı romanlarda (26) c.71G>A, Moğollarda c.-23+1G>A (27), ve Guatemalahlarda c.132G>A (28) örnek verilebilir. Türk işitme kayıplı bireylerde *GJB2* mutasyonlarının konjenital veya prelingual sendromik olmayan işitme kayıplı olguların yaklaşık %20'sinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (29). *GJB2* genindeki mutasyonların büyük kısmı erken başlangıçlı ileri veya çok ileri derecede işitme kaybına neden olur. Genetik nedenlerin sıklığı ve dağılımı neredeyse her toplumda farklılık göstermektedir.

İşitme engellilerin arasında akraba evliliğinin oranı Türkiye ortalamasının üzerindedir. *GJB2* mutasyonları taşıyanlar arasında bu oran Türkiye ortalamasına yakınken *GJB2* mutasyonları olmayanlarda %55 gibi yüksek bir oranda bulunmuştur (30). Ayrıca akraba evliliğinin yüksek oranda olduğu doğu bölgelerimizde (%72.4) işitme kayıplı bireylerde *GJB2* mutasyonlarının oranı %17.2 iken, akraba evliliğinin daha düşük olduğu batı bölgelerimizde (%39.5) bu oran %31.4'tür (4). Bu veriler, coğrafik izolasyon ve akraba evliliğinin etkileri sonucunda Türkiye'de işitme kaybı nedeni olan otozomal resesif gen değişimlerinin bölgesel öneme sahip olduğunu, çok sayıda gen değişiminin küçük oranlarda bulunduğunu düşündürmektedir. Otozomal resesif işitme kaybı nedeni olarak bugüne kadar gösterilen 78 farklı genin büyük çoğunluğu Hindistan, Pakistan, Kuzey Afrika ülkeleri gibi eş akrabalığının yüksek olduğu toplumlarda tek tek ailelerde tanımlanmıştır.

Bugüne kadar 124 genin sendromik olmayan işitme kaybı yaptığı gösterilmiştir. Bunlardan 51 tanesi otozomal dominant, 78 tanesi otozomal resesif ve 5 tanesi X'e bağlı, 1 tanesi mitokondriyal kalıtım göstermektedir (<https://hereditaryhearingloss.org>). Sendromik olmayan işitme kaybına neden olan genler oldukça geniş bir heterojeniteye sahiptir. Bu genlerin bir kısmı hem otozomal resesif hem de otozomal dominant işitme kaybı ile ilişkilendirilmiştir. (*TECTA*, *GJB2*, *GJB6*, *TMC1*, *MYO6*, *MYO7A*). Klonlanan genlerin protein ürünleri; iyon kanalları, membran proteinleri, transkripsiyon faktörleri ve yapısal proteinlerdir.

*GJB2*'yi takiben, *SLC26A4*, *STRC*, *MYO15A*, *TMPRSS3*, *TMC1*, *ILDRI* ve *CDH23*'teki mutasyonlar, farklı kohortlarda nispeten sık olarak bildirilmiştir (31,32). İşitme kaybı hem genetik hem de klinik olarak çok heterojen olduğundan, fenotipten hangi genin bozulduğunu tahmin etmek kolay değildir. Bununla birlikte, bazı işitme kaybı biçimleri, belirli gen mutasyonlarının nedensel olduğunu düşündürebilir. Örneğin, *STRC* (33), *MPZL2* (34), *OTOG* ve *OTOGL* (35)'deki mutasyonlar tipik olarak hafif ila orta derecede işitme kaybı ile ilişkilidir. *OTOF* (36), *DIAPH3* (37) ve *PJKV* (38) mutasyonları, dış tüy hücresi fonksiyonu korunurken iç tüy hücrelerinin ve işitsel sinir fonksiyonunun etkilendiği nonsendromik işitsel nöropati spektrum bozukluğunda tespit edilir. *OTOF* mutasyonlu hastaların koklear implantasyon için iyi adaylardır; bu nedenle, *OTOF* mutasyonlarının tespiti nonsendromik işitsel nöropati spektrum bozukluğu olan hastalar için faydalıdır (39).

Mitokondriyal DNA mutasyonları aminoglikozit ototoksitesisi ve maternal kalıtılan bilateral ileri-çok ileri, ilerleyici sensörinöral işitme kayıpları ile ilişkilendirilmiştir. Mitokondriyal DNA'daki *12SrRNA* geninde bulunan m.A1555G mutasyonu en yaygın ve iyi bilinen mitokondriyal mutasyondur. Özellikle İspanya ve Uzak Doğu ülkelerinde önemli bir sendromik olmayan işitme kaybı nedenidir. Türk hastalarla yapılan çalışmada bu mutasyonun sıklığı % 1.8 bulunmuştur (40). Bu mutasyona sahip kişilerde aminoglikozit kullanımı olmadan da postlingual başlangıçlı, önce yüksek frekansları tutan ilerleyici sensörinöral işitme kaybı ortaya çıkabilir. *MTTS1* genindeki m.7445A>G değişimi işitme kaybı ve palmoplantar keratoderma ile ilişkilidir. *MTTL1*'deki m.3243A>G varyasyonu mitokondriyal ensefalomiyopati, laktik asidoz ve inme benzeri atakların (MELAS), anneden kalıtılan diyabet ve sağırılık sendromu (MIDD) ve kronik ilerleyici dış oftalmoplejinin (CPEO) en sık nedenidir.

X'e bağlı işitme kaybı, sendromik ve sendromik olmayan vakaların yaklaşık %1 - %2'sini oluşturur. Bugüne kadar, X'e bağlı sendromik olmayan işitme kaybı için altı lokus (DFNX1-6) ve beş gen (DFNX1 için *PRPS1*, DFNX2 için *POU3F4*, DFNX4 için *SMPX4*, DFNX5 için *AIFM1* ve DFNX6 için *COL4A6*) tanımlanmıştır. Sendromik formlar için, bazıları sendromik olmayan formlarda da yer alan en az 15 gen tanımlanmıştır. X'e bağlı sendromik olmayan sensörinöral işitme kaybının en yaygın nedeni, DFNX2 lokusunda yer alan *POU3F4*'tür (41, 42). DFNX2, X'e bağlı sendromik olmayan işitme kaybının %50'sinden sorumludur (43, 44). DFNX2'in en sık görülen klinik özellikleri, koklear hipoplazi, soğanlı iç işitsel kanallar, genişlemiş iç akustik kanal ve stapes cerrahisi sırasında stapes kaçağıdır (45).

DNA dizileme teknolojisindeki son gelişmeler, artık etkilenen bir kişinin etiyolojik değerlendirmesi sırasında bilinen tüm işitme kaybı genlerini bir kerede taramamıza izin veriyor. Bu çalışmalar, vakaların yaklaşık %50'sinde nedensel bir DNA varyantının tanımlanabileceğini göstermektedir (46). Etiyolojik olarak bilinmeyen bazı vakalar çevresel faktörlerden kaynaklanabilirken, ailesel sendromik olmayan işitme kaybı olan iyi tanımlanmış kohortlarda bile, ailelerin yaklaşık %30'u çözümsüz kalmaktadır (31). Bu, işitme kaybı için birçok nadir genin keşfedilmeyi beklediğini göstermektedir. Farelerde yapılan araştırmalar, sağırılık genlerinin toplam sayısının 1.000'e ulaşabileceğini göstermektedir (47).



**KAYNAKLAR**

1. Ruben, RJ. The history of genetics of hearing impairment. *Ann N Y Acad Sci*, 1991; 630:6-15
2. Morton, NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann NY Acad Sci*, 1991; 630:16-31
3. Nance, WE. The genetics of deafness. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 2003; 9(2):109-119
4. Tekin, M., Arici, ZS. Genetic epidemiological studies of congenital/prelingual deafness in Turkey: population structure and mating type are major determinants of mutation identification. *Am J Med Genet*, 2007; 143A(14): 1583-1591
5. Kalatzis, V., Petit, C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum Mol Genet*, 1998; 7:1589-1597
6. Gettelfinger, JD., Dahl, JP. Syndromic Hearing Loss: A Brief Review of Common Presentations and Genetics. *J Pediatr Genet*, 2018;7(1):1-8
7. Kokotas, H., Petersen, MB., Willems PJ. Mitochondrial deafness. *Clin Genet*, 2007; 71(5): 379-91
8. Corvino, V., Apisa, P., Malesci, R., Laria, C., Auletta, G., Franzé, A. X-Linked Sensorineural Hearing Loss: A Literature Review. *Curr Genomics*, 2018;19(5):327-338
9. Bademci, G., Cengiz, FB., Foster, Ii J., Duman, D., Sennaroglu, L., Diaz-Horta, O., Atik, T., Kirazli, T., Olgun, L., Alper, H., Menendez, I., Loclar, I., Sennaroglu, G., Tokgoz-Yilmaz, S., Guo, S., Olgun, Y., Mahdih, N., Bonyadi, M., Bozan, N., Ayral, A., Ozkinay, F., Yildirim-Baylan, M., Blanton, SH., Tekin, M. Variations in Multiple Syndromic Deafness Genes Mimic Non-syndromic Hearing Loss. *Sci Rep*, 2016; 26;6:31622
10. Wémeau JL., Kopp P. Pendred syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2017;31(2):213-224
11. Nikolopoulos, TP., Lioumi, D., Stamataki, S., O'Donoghue, GM.. Evidence-based overview of ophthalmic disorders in deaf children: a literature update. *Otol Neurotol*, 2006; 27(2 Suppl 1):1-24

12. Yan, D., Liu, XZ. Genetics and pathological mechanisms of Usher syndrome. *J Hum Genet*, 2010;55: 327-335
13. Ahmed Jan, DN., Mui, RK., Masood, S. Waardenburg Syndrome. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC; 2021
14. Huang, S., Song, J., He, C., Cai, X., Yuan, K., Mei, L., Feng, Y. Genetic insights, disease mechanisms, and biological therapeutics for Waardenburg syndrome. *Gene Ther*, 2021; Feb 25. doi: 10.1038/s41434-021-00240-2
15. Krug, P., Morinière, V., Marlin, S., Koubi, V., Gabriel, HD., Colin, E., Bonneau, D., Salomon, R., Antignac, C., Heidet, L. Mutation screening of the EYA1, SIX1, and SIX5 genes in a large cohort of patients harboring branchio-oto-renal syndrome calls into question the pathogenic role of SIX5 mutations. *Hum Mutat*; 2011 32(2):183-90
16. Schwartz, PJ., Spazzolini, C., Crotti, L., Bathen, J., Amlie, JP., Timothy, K., Shkolnikova, M., Berul, CI., Bitner-Glindzicz, M., Toivonen, L., Horie, M., Schulze-Bahr, E., Denjoy, I. The Jervell and Lange-Nielsen syndrome: natural history, molecular basis, and clinical outcome. *Circulation*. 2006; 14;113(6):783-90
17. Siem, G., Früh, A., Leren, TP., Heimdal, K., Teig, E., Harris, S. Jervell and Lange-Nielsen syndrome in Norwegian children: aspects around cochlear implantation, hearing, and balance. *Ear Hear*, 2008; 29, 261–290
18. Mencarelli, MA., Heidet, L., Storey, H., van Geel, M., Knebelmann, B., Fallerini, C., Miglietti, N., Antonucci, M. F., Cetta, F., Sayer, J. A., van den Wijngaard, A., Yau, S., Mari, F., Bruttini, M., Ariani, F., Dahan, K., Smeets, B., Antignac, C., Flinter, F., Renieri, A. Evidence of digenic inheritance in Alport syndrome. *J. Med. Genet*, 2015;52: 163-174,
19. Kelsell, DP., Dunlop, J., Stevens, H. P., Lench, N. J., Liang, J. N., Parry, G., Mueller, R.
- F. Leigh, IM. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, 1997; 387(6628): 80-83
20. Bitner-Glindzicz, M. Hereditary deafness and phenotyping in humans. *Br Med Bull*, 2002; 63: 73-94

21. Gasparini, P., Rabionet, R., Barbujani, G., Melchionda, S., Petersen, M., Brøndum-Nielsen, K., Metspalu, A., Oitmaa, E., Pisano, M., Fortina, P., Zelante, L., Estivill, X. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG. *Eur J Hum Genet*, 2000; 8(1): 19-23
22. Tekin, M., Akar, N., Cin, ğ., Blanton, S. H., Xia, X. J., Liu, X. Z., Nance, W. E., Pandya, A. Connexin 26 (GJB2) mutations in the Turkish population: implications for the origin and high frequency of the 35delG mutation in Caucasians. *Hum Genet*, 2001; 108(5): 385-389
23. Morell, R.J., Kim, H.J., Hood, L.J., Goforth, L., Friderici, K., Fisher, R., Van Camp, G., Berlin, C.I., Oddoux, C., Ostrer, H., Keats, B., Friedman, T.B. Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. *N Engl J Med*, 1998; 19;339(21):1500-5
24. Ohtsuka, A., Yuge, I., Kimura, S., Namba, A., Abe, S., Van Laer, L., Van Camp, G., Usami, S. GJB2 deafness gene shows a specific spectrum of mutations in Japan, including a frequent founder mutation. *Hum Genet*, 2003; 112(4):329-33
25. Maheshwari, M., Vijaya, R., Ghosh, M., Shastri, S., Kabra, M., Menon, P.S. Screening of families with autosomal recessive non-syndromic hearing impairment (ARNSHI) for mutations in GJB2 gene: Indian scenario. *Am J Med Genet A*, 2003; 15;120A(2):180-4
26. Alvarez, A., del Castillo, I., Villamar, M., Aguirre, L.A., González-Neira, A., López-Nevot, A., Moreno-Pelayo, M.A., Moreno, F. High prevalence of the W24X mutation in the gene encoding connexin-26 (GJB2) in Spanish Romani (gypsies) with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *Am J Med Genet A*, 2005; 1;137A(3):255-8
27. Tekin, M., Xia, X.J., Erdenetungalag, R., Cengiz, F.B., White, T.W., Radnaabazar, J., Dangaasuren, B., Tastan, H., Nance, W.E., Pandya, A. GJB2 mutations in Mongolia: complex alleles, low frequency, and reduced fitness of the deaf. *Ann Hum Genet*, 2010;74(2):155-64
28. Carranza, C., Menendez, I., Herrera, M., Castellanos, P., Amado, C., Maldonado, F., Rosales, L., Escobar, N., Guerra, M., Alvarez, D., Foster, J 2nd., Guo, S., Blanton, S.H., Bademci, G., Tekin, M. A Mayan founder

- mutation is a common cause of deafness in Guatemala. *Clin Genet*, 2016; 89(4):461-465
29. Tekin, M., Boğoçlu, G., Arıcan, ST., Orman, MN., Taştan, H., Elsobky, E., Elsayed, S., Akar, N. Evidence for single origins of 35delG and delE120 mutations in the GJB2 gene in Anatolia. *Clin Genet*, 2005; 67(1): 31-37
30. Tekin, M., Duman, T., Boğoçlu, G., İncesulu, A., Çomak, E., İlhan, İ., Akar, N. Spectrum of GJB2 mutations in Turkey comprises both Caucasian and Oriental variants: roles of parental consanguinity and assortative mating. *Hum Mutat*, 2003; 21(5):552-553
31. Bademci, G., Foster, J 2nd., Mahdieh, N., Bonyadi, M., Duman, D., Cengiz, FB., Menendez, I., Diaz-Horta, O., Shirkavand, A., Zeinali, S., Subasioglu, A., Tokgoz-Yilmaz, S., Huesca-Hernandez, F., de la Luz Arenas-Sordo, M., Dominguez-Aburto, J., Hernandez-Zamora, E., Montenegro, P., Paredes, R., Moreta, G., Vinueza, R., Villegas, F., Mendoza-Benitez, S., Guo, S., Bozan, N., Tos, T., Incesulu, A., Sennaroglu, G., Blanton, SH., Ozturkmen-Akay, H., Yildirim-Baylan, M., Tekin, M. Comprehensive analysis via exome sequencing uncovers genetic etiology in autosomal recessive nonsyndromic deafness in a large multiethnic cohort. *Genet Med*, 2016 ;18(4):364-71
32. Yan, D., Tekin, D., Bademci, G., Foster, J 2nd., Cengiz, FB., Kannan-Sundhari, A., Guo, S., Mittal, R., Zou, B., Grati, M., Kabahuma, RI., Kameswaran, M., Lasisi, TJ., Adedeji, WA., Lasisi, AO., Menendez, I., Herrera, M., Carranza, C., Maroofian, R., Crosby, AH., Bensaid, M., Masmoudi, S., Behnam, M., Mojarrad, M., Feng, Y., Duman, D., Mawla, AM., Nord, AS., Blanton, SH., Liu, XZ., Tekin, M. Spectrum of DNA variants for non-syndromic deafness in a large cohort from multiple continents. *Hum Genet*, 2016; 135(8):953-61
33. Verpy, E., Masmoudi, S., Zwaenepoel, I., Leibovici, M., Hutchin, TP., Del Castillo, I., Nouaille, S., Blanchard, S., Lainé, S., Popot, JL., Moreno, F., Mueller, RF., Petit, C. Mutations in a new gene encoding a protein of the hair bundle cause non-syndromic deafness at the DFNB16 locus. *Nat Genet*, 2001; 29(3):345-9
34. Bademci, G., Abad, C., Incesulu, A., Rad, A., Alper, O., Kolb, SM., Cengiz, FB., Diaz-Horta, O., Silan, F., Mihci, E., Ocak, E., Najafi, M., Maroofian, R., Yilmaz, E., Nur, BG., Duman, D., Guo, S., Sant, DW.,

- Wang, G., Monje, PV., Haaf, T., Blanton, SH., Vona, B., Walz, K., Tekin, M. MPZL2 is a novel gene associated with autosomal recessive nonsyndromic moderate hearing loss. *Hum Genet*, 2018; 137(6-7):479-486
35. Oonk, AM., Leijendeckers, JM., Huygen, PL., Schraders, M., del Campo, M., del Castillo, I., Tekin, M., Feenstra, I., Beynon, AJ., Kunst, HP., Snik, AF., Kremer, H., Admiraal, RJ., Pennings, RJ. Similar phenotypes caused by mutations in OTOG and OTOGL. *Ear Hear*, 2014; 35(3):e84-91
36. Varga, R., Kelley, PM., Keats, BJ., Starr, A., Leal, SM., Cohn, E., Kimberling, WJ. Non-syndromic recessive auditory neuropathy is the result of mutations in the otoferlin (OTOF) gene. *J Med Genet*, 2003; 40(1):45-50
37. Schoen, CJ., Emery, SB., Thorne, MC., Ammana, HR., Sliwerska, E., Arnett, J., Hortsch, M., Hannan, F., Burmeister, M., Lesperance, MM. Increased activity of Diaphanous homolog 3 (DIAPH3)/diaphanous causes hearing defects in humans with auditory neuropathy and in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010; 107(30):13396-401
38. Delmaghani, S., del Castillo, FJ., Michel, V., Leibovici, M., Aghaie, A., Ron, U., Van Laer, L., Ben-Tal, N., Van Camp, G., Weil, D., Langa, F., Lathrop, M., Avan, P., Petit, C. Mutations in the gene encoding pejvakin, a newly identified protein of the afferent auditory pathway, cause DFNB59 auditory neuropathy. *Nat Genet*, 2006 ;38(7):770-8
39. Nishio, SY. and. Usami SI. Outcomes of cochlear implantation for the patients with specific genetic etiologies: a systematic literature review. *Acta Otolaryngol*, 2017; 137(7): p. 730-742
40. Tekin, M., Duman, T., Boğoçlu, G., İncesulu, A., Çomak, E., Fitoz, S., Yılmaz, E., İlhan, İ., Akar, N. Frequency of mtDNA A1555G and A7445G mutations among children with prelingual deafness in Turkey. *Eur J Pediatr*, 2003; 162(3): 154-158
41. Nance, WE., Setleff, R., McLeod, A., Sweeney, A., Cooper, C., McConnell, F. X-linked mixed deafness with congenital fixation of the stapedial footplate and perilymphatic gusher. *Birth Defects Orig Artic Ser*, 1971 ;07(4):64-9

42. Bademci, G., Lasisi, A., Yariz, KO., Montenegro, P., Menendez, I., Vinueza, R., Paredes, R., Moreta, G., Subasioglu, A., Blanton, S., Fitoz, S., Incesulu, A., Sennaroglu, L., Tekin, M. Novel domain-specific POU3F4 mutations are associated with X-linked deafness: examples from different populations. *BMC Med Genet*, 2015 ;16:9
43. Petersen, MB., Wang, Q., Willems PJ. Sex-linked deafness. *Clin Genet*, 2008; 73(1): p. 14-23
44. Huang, BQ., Zeng, JL., Yuan, YY., Dai, P. A novel mutation in *POU3F4* in a Chinese family with X-linked non-syndromic hearing loss. *J Otol*, 2015;10(2):78-82
45. Gong, WX., Gong RZ., Zhao, B., HRCT and MRI findings in X-linked non-syndromic deafness patients with a POU3F4 mutation. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2014; 78(10): p. 1756-62
46. Sloan-Heggen, CM., Bierer, AO., Shearer, AE., Kolbe, DL., Nishimura, CJ., Frees, KL., Ephraim, SS., Shibata, SB., Booth, KT., Campbell, CA., Ranum, PT., Weaver, AE., Black-Ziegelbein, EA., Wang, D., Azaiez, H., Smith, RJH. Comprehensive genetic testing in the clinical evaluation of 1119 patients with hearing loss. *Hum Genet*, 2016 ;135(4):441-450
47. Ingham, NJ., Pearson, SA., Vancollie, VE., Rook, V., Lewis, MA., Chen, J., Buniello, A., Martelletti, E., Preite, L., Lam, CC., Weiss, FD., Powis, Z., Suwannarat, P., Lelliott, CJ., Dawson, SJ., White, JK., Steel, KP. Mouse screen reveals multiple new genes underlying mouse and human hearing loss. *PLoS Biol*, 2019 ;17(4):e3000194



## BÖLÜM 11

### İMMÜNÖTERAPİ İÇİN GELİŞTİRİLEN ANTİKORLAR

Biyolog İlayda ENGİN<sup>1</sup>,

Biyolog Ayşe Gökçe ERMAN KILINÇ<sup>2</sup>,

Prof. Dr. Erkan YILMAZ<sup>3</sup>

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.10251411>

---

<sup>1</sup> Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Gümüşdere Kampüsü, Gümüşdere Mah. Keçiören 06135 Ankara, Türkiye. [eyilmaz@ankara.edu.tr](mailto:eyilmaz@ankara.edu.tr)

<sup>2</sup> Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Gümüşdere Kampüsü, Gümüşdere Mah. Keçiören 06135 Ankara, Türkiye. [eyilmaz@ankara.edu.tr](mailto:eyilmaz@ankara.edu.tr)

<sup>3</sup> Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Gümüşdere Kampüsü, Gümüşdere Mah. Keçiören 06135 Ankara, Türkiye. [eyilmaz@ankara.edu.tr](mailto:eyilmaz@ankara.edu.tr)





## 1. GİRİŞ

MÖ 430'da Yunan tarihçi ve General Thucydides, Atina'daki veba salgınından kutulan kişilerin hastalığa ikinci kez yakalanmadığını kaydetmesinin immünolojik bir gözlemin ilk kaydı olduğu savunulur. Modern immünolojinin başlangıcı ise Louis Pasteur'un hastalıklara mikropların neden olduğunu öne sürmesi ve Robert Koch'un bunu kanıtlarıyla doğrulaması ile başlar. Yapılan bu ilk immünolojik gözlemler immün sisteminin tanımlanmasını sağladığı gibi sistemin istilacı mikroorganizmalara karşı bir savunma mekanizması olduğu tanımlarına yol açtı (1).

Vücudumuz, sürekli olarak bulaşıcı organizmalara ve bu organizmaların ürettiği toksik ürünlere maruz kalır. Ortaya çıkan bu antijenlere karşı organizmayı korumak immün sistemin temel işlevidir (2). Konak savunması, doku homeostazının ve sistem bütünlüğünün korunmasında immün sistemin işlevlerinden sadece biridir. Ancak immün sistemi sadece bulaşıcı mikroorganizmalara karşı konak savunması sağladığı düşünülmemelidir. Gelişme, üreme ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik süreçlerde ve metabolizma, merkezi sinir sistemi, kardiyovasküler sistem gibi pek çok vücut sistemiyle yakından ilişkilidir (1). Bu sistem, lefoid organların, hücrelerin, hümorale faktörlerin ve sitokinlerin etkileşiminden oluşan bir ağdır ve vücuda giren virüsleri, yabancı hücreleri, makromolekülleri uzaklaştırmak ve etkisiz hale getirmek için bir dizi mekanizma geliştirmiştir (2,3). İmmün sistemin geliştirdiği mekanizmaların temel özelliklerinden biri de vücudumuzun hiçbir noktasının gözetimden kesilmemesidir. Vücudu gözetme işlevi proteinler ve çeşitli hücreler tarafından gerçekleştirilir (4). Hepsinin oluşturduğu farklı mekanizmalara temelde iki farklı kategoriye ayrılır; adaptif immün sistem ve doğuştan gelen immün sistem (2).

Doğuştan gelen veya spesifik olmayan immün sistem zararlı uyarıcılara karşı ilk savunma hattını oluşturur. Makrofajlar tarafından fagositoz, lakrimal hücreler tarafından lizozim salgılanması ve doğal öldürücü hücreler tarafından liziz gibi mekanizmaları içeren hücrelerin aracılık ettiği bir yanıt oluşur (5). Doğuştan gelen immün sistem tekrar ve tekrar yabancı moleküllere maruz kalınarak geliştirilemez. Bu durumun tam aksine adaptif, yani sonradan edinilmiş immün sistem yeniden maruz kalma ile uyarlanabilir ve güçlendirilir (2).

Adaptif immün sistemin çevreyi araştırmak için kullandığı hücre yüzeyi reseptörlerini sentezleyen veya spesifik olarak yabancı moleküllere bağlanan proteinler salgılayan lenfosit adı verilen hücreler aracılık eder (4). Adaptif immün sistemin özelliği hedeflenen efektör yanıtın T ve B hücreleri üzerindeki antijene özgü reseptörlerin kullanılmasıdır. İlk aşamada, bir antikora bağlanabilen herhangi bir molekül olan antijenin, lenfoid dokunun özelleşmiş bölgelerinde meydana gelen hücre aktivasyonuna ve farklılaşmasına neden olan antijene özgü T veya B hücrelerine sunulması ve hücre tarafından tanınması meydana gelir. İkinci aşamada ise, yanıt lenfoid dokudan ayrılan ve hastalık bölgesine yönlendirilen aktive edilmiş T hücresi ile ya da aktive edilmiş B hücrelerinden antikorun salınması ile gerçekleşir (3). Bu hücrelerden salgılanan antikora bağlanabilen herhangi bir moleküle ise antijen adı verilmektedir. Antikorlar, immünooglobulin olarak da adlandırılabilirdiği gibi temelde farkları vardır. Bilinen bir antijene bağlanabilen moleküle antikor denilirken bağlanma hedefinin bilinip bilinmediğine bakılmayan protein grubuna ise immünooglobulin denilir. Ancak çoğu zaman iki terim de birbirleri yerine kullanılabilir (2).

İmmün sistemin çeşitli elemanlarının ve onu aktive edici veya baskılayıcı etkiye sahip çeşitli yaklaşımların kullanılması ile gerçekleştirilen tedaviye immünoterapi denilmektedir. Kişinin immün sisteminin yönlendirildiği bu tedavi yaklaşımı son yıllarda oldukça fazla ilgi odağı olmasına rağmen ilk immünoterapi girişimini 1868 yılında Wilhelm Busch tarafından gerçekleştirildiğini görüyoruz. Yumuşak doku kanseri bir hastasının tümör bölgesini bakteriler ile enfekte ederek tümör baskılanmasının meydana gelip gelmeyeceğini gözlemlemek istemiştir. 1891 yılında ise aynı etkiyi gözlemlemek isteyen William Bradley Coley, hem canlı hem de inaktif bakterilerin tümör içine enjeksiyonu ile tedavi uygulamıştır. Ameliyat edilemeyecek kötü huylu tümöre sahip hastasında uyguladığı bu immünoterapi ile tam iyileşme görülmüştür (6,7). İmmünoterapiye dair ilk çalışmaların hemen ardından 1975 yılında George Köhler ve Cesar Milstein tarafından hibridoma teknolojisi geliştirilmiştir (8). Bu teknolojinin geliştirilmesi ile birlikte ilk monoklonal antikorların (mAb) üretimi gerçekleşmiş ve sitotoksik T hücre fonksiyonunu inhibe eden muromonab-CD3'ün FDA tarafından onay almıştır. Böylece ilk kez bir monoklonal antikor tedavide kullanılmaya başlandı (9).

Özellikle kansere yönelik çalışılan immünoterapi aynı zamanda otoimmün hastalıklar, enfeksiyonlar, alerjiler gibi çeşitli hastalıkların tedavisi için de kullanılmaktadır (6). Ancak en çok çalışılan ve en büyük pazar payına sahip olan kanser immünoterapisinde kullanılan monoklonal antikörlerin piyasa değeri 2021 yılında yaklaşık 50 milyar doları bulurken bu değer 2025 yılında 70 milyar dolara çıkacağı beklenmektedir.

İmmünoterapinin birçok farklı tipi bulunmaktadır. Bunlar arasında adoptif hücre transferi, immün kontrol noktası inhibitörleri, kanser aşılı, küçük moleküller gibi çeşitli yaklaşımlar bulunmaktadır (6). Bu seminer çalışmasında ise immünoterapi tiplerinden biri olan monoklonal antikörler ve tedavide uygulanabilirliği için hümanizasyonu ele alınmıştır. Monoklonal antikörler antijenin tek bir epitopuna spesifik olarak bağlanan ve B hücrelerinin tek klonu tarafından sentezlenen antikörlerdir (10).

Bu tedavi yaklaşımındaki en önemli sorunların başında mAb'ların insan dışında farklı bir immün sistemde üretiliyor olmasıdır. Örneğin; fare, tavşan keçi gibi sistemlerden üretilmiş mAb'ların hepsi immünoterapi uygulamalarının ardından insanda ciddi yan etkilere ve hatta ölümcül klinik semptomlara neden olan bir immün yanıt gelişir. Anti-antikör yanıtı (AAR) olarak da bilinen bu duruma immünojenisite denir ve antijenin insan veya farklı bir hayvanda immün yanıtın meydana gelmesi olarak tanımlanmaktadır. İmmünoterapi uygulamaları için en büyük problem olan immünojenisitenin azaltılması, hatta ortadan kaldırılması için hümanizasyon yapılmaktadır (2,11). Hümanize antikörlerin üretilmesinin ilk adımı kimerik antikörlerin geliştirilmesi ile olmuştur. Antikörlerin Fc bölgeleri immün cevabın gelişmesinde önemli rol oynamaktadır (2). Bu bölgenin insan dışında farklı bir hayvana ait olması durumunda antijene bağlanan antikörün uygun immün cevap geliştirmesi mümkün olmayacaktır. Aynı zamanda başka bir canlıya ait antikörün Fc bölgesi insan için ciddi bir antijenik etkiye sahiptir. Kimerik antikör üretimindeki temel sebep de bu sinyal iletim mekanizmasının çalışmasında kilit bir görev görmesidir. Monoklonal antikörün üretildiği canlı sisteme ait Fc bölgesi ile insana ait Fc bölgesinin değiştirilmesi ile kimerik antikörler üretilmektedir. Hümanize antikörler ise insan antikörüne fare complementarity-determining region (CDR) bölgelerinin rekombinant DNA teknolojisi ile eklenmesi ile üretilen antikörlerdir ve CDR-aşılı antikörler olarak da bilinmektedirler. Son olarak ise insan antikörünün üretimi yapılmaktadır.

Yapıları tamamen insana ait olan bu antikorlar faj gösterimi veya transgenik hayvan platformları ile üretilmektedirler (12). Bu seminer çalışmasında monoklonal antikorların nasıl hümanize edildiği ve immünoterapide kullanım alanları ele alınacaktır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

İmmünoglobulin G (IgG) yapısındaki antikorlar, immün sistem tarafından yabancı olarak algılanan moleküllere karşı B hücrelerinden sentezlenirler. Antikorların yapıları ve fonksiyonları hakkında yeni bilgilere ulaşıldıkça rekombinant hale getirilmeleri ve kullanım alanları yaygınlaşmış ve antikorların yapıları ile ilgili yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaya başlanmıştır (13). Özellikle immünoterapide antikorların kullanımı ile birlikte meydana gelen yan etkileri azaltmak ve hastalığın tedavisi için gerekli immün yanıtın uygun bir şekilde oluşturulması için hümanizasyonun gerekliliği öne çıkmaktadır. Hümanizasyondan öne ise tedavide kullanılacak antikorun spesifikliği büyük önem taşımaktaydı (11). Özellikle kanser terapilerinde kullanılan kemoterapi gibi uygulamaların yeterli spesifikliğe sahip olmaması ve kanser hücreleri ile sağlıklı hücrelerinde zarar görmesine yol açtığı için immünoterapide kullanılan mAb'ler dikkat çekmekteydi. Monoklonal antikorların sadece tek bir antijenin, tek bir epitopuna bağlanma özellikleri ile tedavide aranan spesifikliği sağlıyordu (10).

Bu ihtiyaçları karşılamak adına antikorlara değişik formlar ve işlevler kazandırılmıştır. Hümanizasyonun ve immünoterapi için öneminin daha iyi kavranabilmesi için antikorların yapısının iyi anlaşılması gereklidir.

### 2.1. Antikorun Yapısı

Glikoprotein yapıdaki antikorlar 'Y' şekli ile sembolize edilen IgG'lerdir ve dört polipeptid zincirden oluşmaktadır. Bunlar 'Y' şeklindeki antikor yapısının hem sağ hem de sol tarafında iki hafif zincir ve iki ağır zincir şeklinde yerleşmiştir (13). Hafif zincir yaklaşık 25 kDa iken ağır zincir yaklaşık 50 kDa ağırlığındadır. Hafif ve ağır zincirleri birbirlerine ve her 'Y' şekilli yapıyı sağlayan her iki ağır zincir de birbirlerine disülfid bağları ile bağlanmıştır. Hem hafif hem de ağır zincirler aynı zamanda değişken ve sabit bölgelerden oluşmaktadır. Bu nedenle bir antikorun hafif zincirleri iki değişken bölge (VL) ve iki sabit bölge (CL) içermektedir. Aynı şekilde ağır zincirler de iki VL'den oluşurken CL bölgeleri ise üç tanedir (14).

Antikorların üç fonksiyonel bölgesi bulunmaktadır. Bu üç fonksiyonel kısım; antijen bağlanma fragmanı (Fab), fragman kristalize edilebilir bölge (Fc) ve hinge bölgesinden oluşmaktadır.

### **2.1.1. Antijene Bağlanma Bölgesi (Fab)**

Bir antikorun her iki tarafında bir tane olmak üzere toplam iki tane Fab bölgesi bulunmaktadır. Bu bölge ağır ve hafif zincirin birer tane değişken ve sabit bölgesinden oluşmaktadır. Bir Fab bölgesindeki VL bölgesi antikorun, antijenin spesifik epitopuna bağlandığı bölgedir (2). Fab bölgesinde bulunan VL ve CL bölgelerinin bir alt bölümünde çerçeve bölgesi (FR) ve tamamlayıcı bölgeler (CDR) yer almaktadır. Her değişken bölgenin içerisinde dört tane FR bölgesi bulunur (15). En önemli işlevi CDR bölgelerinin stabilizasyonunu sağlamakla birlikte antikorun doğru katlanmasına da yardımcı olmaktadır. Bu nedenle korunmuş bölgelerdir. Doğrudan antijen-antikor bağlanmasında görev almazlar. Ancak CDR bölgelerinin antijene bağlanmasında FR bölgesinin yapısındaki esneklik veya sertliğin etkileri olduğu gösterilmiştir (16).

### **2.1.2. Tamamlayıcı Bölgeler (CDR)**

Antikor hümanizasyonu için en önemli alanlardan biri CDR bölgeleridir. Değişken bölgenin tek bir zincirinde üç tane CDR bölgesi bulunmaktadır. Bir antikorda tek bir Fab bölgesinde altı, antikorun tamamında ise on iki CDR bölgesi yer almaktadır. Bir araya gelen altı CDR bölgesi antijeni bir parmak gibi kavrayacak paratop adı verilen bağlanma bölgesini oluşturur. Hiperdeğişken bölgeler olarak da adlandırılan bu bölgele antikorun, antijenin epitopunu tanıdığı alanlardır ve çok yüksek dizi çeşitliliği göstermektedir (13).

### **2.21. Kristalizedilebilir Bölge (Fc)**

Spesifik olarak Fc reseptörlerine ve çeşitli immün hücrelerine bağlanarak antijene karşı uygun immün yanıtın meydana gelmesini sağlayan Fc bölgesidir. İmmünoterapide kullanılması durumunda insan dışında başka bir canlıya ait olan Fc bölgesi doğru immün yanıtı geliştiremez. Çünkü uygun reseptörlere veya immün hücrelerine bağlanamayacaktır. Bununla birlikte glikozilasyonu hümanizasyon aşamasında büyük önem taşımaktadır. Fc bölgesi toplam dört CH bölgesinden oluşur (17).

### 2.3.1.Hinge Bölgesi

Fab ve Fc bölgelerinin CH'leri arasında bulunan bir uzantı bölgesidir. Yapısının esnek olması sayesinde antikorun antijene bağlanma yollarını ve şekillerini çeşitlendirebilmektedir. Örneğin; antikorun iki antijene çapraz bağlanması, aynı antijen üzerindeki iki farklı epitopa bağlanmayı sağlaması ve daha fazla sayıda epitopu bağlama özelliği kazanması gibi işlevleri vardır. Antikora bütün bu farklı bağlanma kombinasyonlarına olanak sağlanması için gerekli segmental esnekliği verir.

### 2.2.Monoklonal Antikor (mAb)

Antikor sentezleyen B hücrelerinin tek bir klonundan elde edilen hücreler monoklonal olarak adlandırılmaktadır (10). mAb'ler çok çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır. Örneğin, hücre biyolojisi, immünoloji ve in vivo görüntüleme tekniklerinde kullanılmaktadır. Uygun immün yanıt oluşturmak için bağlanacakları antijeni yalnızca tek bir epotopundan tanır. Antikor yapısında, antikorun insan dışında farklı bir immün sistem içerisinde geliştirilmesi dışında hiçbir farklılık göstermemektedir.

#### 2.2.1.Hibridoma teknolojisi

MAB üretimi için en çok kullanılan geleneksel bir yöntemdir. Köhler ve Milstein tarafından ilk kez 1975 yılında mAb üretimi için keşfedilmiştir. Bu keşif biyoteknoloji alanında antikor kullanımını ve üretimini genişleten en önemli gelişmelerden biri olmuştur. Antikor üreten B hücrelerinin immortal hale getirilerek maliyeti oldukça düşük ve sınırsız üretim temeline dayanmaktadır (18).

İstenilen monoklonal antikorun bağlanacağı antijen fare veya tavşan gibi deney hayvanlarından birine immünize edilir. Yaklaşık üç kez immünizasyonun ardından immünize edilen hayvanın dalağındaki pre-B hücreleri izole edilir. Hücreleri immortalize edebilmek için myeloma hücreleri ile füzyon edilmelidir. Bu nedenle füzyondan yaklaşık bir hafta önce F0 hücreleri oluşturmak için antikor sentezleyemeyen, hipoksantin-guanin fosforibosiltransferaz (HGPRT) geninden yoksun myeloma hücreleri HAT besiyerine karşı duyarlı hale getirilir. Daha sonra myeloma hücreleri ile toplanan B hücreleri santrifüjlenerek kaynaştırılır. Bu işlen HAT varlığında yapılır. Füzyonun gerçekleşebilmesi için iki farklı hücrenin membranlarının birbirine kaynaşması polietilen glikol (PEG) ile yapılır. Elde edilen hücreler

kültürlerirken HAT ortamında kültürlenir. 14. Günün sonunda HGPRT genine sahip hücreler yani hibridomalar hayatta kalırken füzyonu gerçekleşmemiş myeloma hücreleri ölür. Daha sonra dilüsyon işlemi ELISA plakalarda yapılarak kuyuya düşen tek bir hibridoma kolonisi monoklonal olarak kabul edilerek kültürü yapılır (19).

Oluşturulan mAb üreten hibridoma klonlarından antikor üretimi ve saflaştırılması gerçekleştirilir.

### **2.3. Antikor Hümanizasyonu**

İnsanlarda üretilmeyen antikorların immünoterapide kullanılabilmesi için insan antikorlarına benzerliklerinin artırılması gereklidir. Hümanize edilecek antikorlar mAb'lerdir. Bu antikorları geliştirme süreci tamamen insan olmayan bir sistemde gerçekleştiğinden antikorların hümanizasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır (20). Hümanize antikorun ilk adımı tedavide kullanılan antikorlara gelişen immün yanıtı azaltabilmek adına kimerik antikorların üretilmesi ve uygulanması ile başladı. Kısa bir süre sonra da immünojenisitenin azalması için insan temelli antikorda daha az bölgenin fare veya diğer hayvanlara ait olması gerektiğinin ve CDR bölgelerinin işlevinin daha iyi anlaşılması ile birlikte hümanize antikor kavramı ortaya çıkmıştır (11).

#### **2.3.1. İmmünojenisite**

Bir antijenin vücutta immün yanıtı neden olmasına immünojenisite denir. İnsan harici çeşitli hayvanlardan üretilen mAb'ların tedavide kullanılamamasının nedeni bu antikorların vücut tarafında bir antijen olarak algılanıp immün yanıt geliştirmesidir (21). Aynı zamanda insanda üretilmemiş mAb'ın Fc bölgesi, insan Fc reseptörlerine bağlanamayacağı için antijene uygun immün yanıtın oluşması engellenecek ve ciddi bir antijenik molekül olacaktır. Bu yüzden bir fare mAb'ının birden fazla dozda hastaya uygulanması ciddi klinik semptomlara neden olur. İmmün sistem antijen olarak görülen fare mAb'larına karşı antikor geliştirmeye başlar. Bu durum İnsan anti-fare antikor yanıtı (HAMA) olarak bilinmektedir. Tedavi sırasında gelişen AAR nedeniyle vücut tedaviye karşı bir bağışıklık kazanmış olur ve uzun süreli tedavi mümkün olamaz. (11). İmmünojenisitenin fare antikorundan kimerik, hümanize ve insan antikoruna gidildikçe azaldığını görmekteyiz.



### 2.3.2.Kimerik Antikorlar

İnsan dışında farklı hayvan türlerinden elde edilen antikorun değişken bölgesi ile insan antikorunun sabit bölgelerinin birleştirilmesi sonucu üretilmiştir. Antikor hümanizasyonundan önceki ilk basamak olan kimerik antikorlar şu anda FDA tarafından kullanım onayı almış mAb'ların yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır. (22,23)

İstenen antikor için uygun antijen ile bağıklık kazandırılmış fareden elde edilen B hücreleri hibridoma yapmak için myeloma hücreleri ile füzyon edilir. Hibridomalardan elde edilecek DNA dizilerinden fareye ait VH ve VL'yi kodlayan dizileri ticari olarak satılan universal primer setleri kullanılarak PCR ile izole edilir. İnsan immüoglobulin sabit bölgeleri olan CL ve CH dizileri bulunan ticari bir vektöre elde edilen fare değişken bölgesine ait diziler klonlanır (24). Elde edilen kimerik IgG dizilerini taşıyan vektör HEK293T gibi memeli hücrelerine transfekte edilir. Hücre kültüründe sentezlenmeye başlayan kimerik IgG'lerin en yüksek ekspresye olduğu hücre klonu seçilir. Sentezlenen kimerik IgG'ler kültür süpernatantından toplanarak saflaştırılması yapılır (23). Son aşamada elde edilen mAb'nin değişken bölgeleri hedeflenen antijene spesifik fare değişken bölgelerini ve insan sabit bölgelerini içeren bir antikordur.

### 2.3.3.CDR veya SDR-Aşılı Hümanize Antikorlar

Hümanize antikorlar, insan olmayan bir antikorun CDR bölgelerinin insan antikorunun değişken bölgelerine aşılması temeline dayanmaktadır. CDR aşılması sırasın mAb'nin üretildiği canlıya ait çerçeve bölgesi kalıntıları korunarak hümanize edilmektedir. Yine de immün yanıtın oluşması tam olarak engellenemez ve hümanize antikora karşı ARR meydana gelir. Olumsuz yanıtın en aza indirilmesi için son yıllarda yeni bir antikor hümanizasyonu yaklaşımı geliştirildi. İnsan Fr bölgesinin üzerine, yine insan CDR kalıntıları bulunan ve sadece özgüllük belirleme rezidülerinin (SDR) aşılmasına dayanıyor (25).

Üretilen hibridoma hücrelerinden elde edilen DNA dizisinden, insan dışında antikorun üretilmiş olduğu antikorun CDR bölgeleri izole edilir. Küçük CDR fragmentleri insan değişken bölgesinin üzerine klonlanır. Fare CDR bölgelerinin içerisinde SDR alanları bulunur. Ancak Fr bölgesinin çoğu insana ait diziler içerirken CDR bölgelerinin hemen yanlarındaki fareye ait kalıntılar da antijen-ligand bağlanmasında önemli olduğu için o bölgeler korunarak

vektöre klonlama yapılmaktadır. CDR aşılama ile hümanize antikorların üretimine uygun bir memeli hücresine aktararak başlanır. Aynı şekilde SDR aşılama ile elde edilecek hümanize antikorlar da PCR klonlaması ile vektör hazırlanır. Yalnızca CDR –aşılama fare CDR kalıntılarının korunmasının aksine sadece SDR bölgelerinin klonlaması yapılırken CDR kalıntıları ve FR bölgesi tamamen insana aittir (25,26).

### **2.3.5.Kimerik ve Hümanize Antikorlar Arasındaki Fark**

Kimerik antikorlar hümanize antikorlar değildir. Kimerik antikorlar farklı bir hayvana ait değişken bölgeye ve insana ait sabit bölgeye sahipken hümanize antikorlarda CDR veya SDR bölgeleri haricinde tamamen insana aittir. Kimerik antikorlar büyük bir insana ait olmayan bölgeye sahipken hümanize antikorlarda yalnızca küçük bir kısım insana ait değildir. Kimerik antikorların immünojenisiteyi çok yük olduğundan immün yanıt oluşturma riskleri çok yüksektir. Ancak hümanize antikorlarda düşük immünojenisite sayesinde risk çok daha azdır. Kimerik antikorlar, hümanize antikorlara kıyasla çok daha ucuzdur.

### **2.3.6.İnsan Antikorları**

İmmünoterapide kullanılan mAb'lar son yıllarda immünojenisiteyi azaltılması için çeşitli modifikasyonlara uğradı ve tamamen insan antikorları üretebilmek adına insan IgG sekansları birçok farklı veri tabanında mevcuttur. İnsan antikorları iki platform tarafından üretilebilmektedir; faj gösterimi ve transgenik hayvanlar.

#### **2.3.6.1.Faj Gösterimi**

İnsan antikorunu üretmek için kullanılan faj gösterimi sadece insan antikorları üretmekle kalmaz. Bununla beraber immünojenik olmayan veya hibridoma gibi teknolojilerle elde edilemeyecek küçük moleküllere karşı da antikor geliştirmemize olanak tanır. 1985 yılında bakteriyofaj içine klonlanan DNA dizilerinin fajın yüzeyinde ifade edildiğinin keşfedilmesi ile birlikte PCR amplifikasyonu ile birleştirilerek 1980'lerin sonlarında bu sistem klonlanan immünooglobulinleri sentezleyebiliyordu (27).

Faj gösteriminde yapılacak ilk adım kütüphane oluşturmaktır. Bunu ticari olarak satın alınabileceği gibi kütüphane oluşturmak da mümkündür. İnsan B hücrelerinden mRNA izolasyonu yaptıktan sonra ter transkripsiyon ile cDNA eldesi yapılır. PCR ile cDNA'lardan VH ve VL izolasyonları yapılır.

PCR da kullanılan primer seti ticari olarak satılan ve evrensel primerlerdir. Bu neden PCR sonunda elimizde binlerce farklı antikor kodlayabilecek dizi bulunur. Her bir dizi M13 adlı faja klonlanır. Böylece binlerce farklı değişken bölgeye sahip bir kütüphane oluşturulmuş olur. Daha sonra istenilen insan mAb'nın spesifik olarak bağlanacağı antijen sistemin yüzüne immobilize edilir. Ardından faj kütüphanesi sistemden geçirilerek uygun antikor dizisini taşıyan faj tespit edilir. Yıkama ile bağlanma göstermeyen fajlar uzaklaştırılırken aranan fajın seçimi yapılır. Daha sonra DNA dizisi fan işe tekrar izole edilerek uygun bir vektör aracılığıyla memeli hücresine transfekte edilerek süpernatanttan IgG toplaması yapılır.

### 2.3.6.2. Transgenik Hayvan Platformu

İnsan antikorlarının üretilmesinde kullanılan transgenik hayvanlardan elde edilen mAb'ların hümanizasyona ihtiyacı ve antikor karakterizasyonu için afnitesi gibi deneyler bulunmamaktadır. İlk olarak transgenik hayvan kullanarak antikor üretimi 1989 yılında Brüggemann ve arkadaşları gerçekleştirmiştir. Mikroenjeksiyon yaparak farelerin döllenmiş yumurtalarına ağır zincir hinge bölgesi ve sabit bölgesi ve değişken bölge genlerini içeren vektörle transgenik hayvan modeli oluşturmuşlardır. Sadece %4'ü insan sabit geninin eksprese edebiliyordu. (28). 1997'de Mendez ve arkadaşları, maya yapay kromozomlarını fare embriyonik kök hücrelerine aktardı ve bunları IgH ve IgK nakavt farelerle hibritleyerek, in vivo olarak yalnızca insan antikorlarını eksprese eden tamamen insanlaştırılmış XenoMouse fareleri elde etti. Farenin kendi antikorlarının insan antikorlarına müdahale etme sorununu çözmesine ve fare Fc'sinin olmamasına rağmen, Ig alt tiplerinin dönüşüm verimliliği ve antikor evriminde yüksek frekanslı mutasyon oranı oldukça düşüktü (29).

Hümanize fareler tarafından üretilen 22 kadar monoklonal antikor, pazarlama için onay almıştır.

### 2.4. Antikor Glikozilasyonu

Antikorlar, her bir ağır zincirin asparagin 297'sine (Asn297) bağlı tek bir N-bağlı glikana sahiptir. İnsanlar da dört IgG alt sınıfı ve 36 olası antikor glikanı bulunmaktadır ve bunların 30'dan fazlası kütle spektrometrisi ile gözlemlenmiştir. Faj gösterimi ile monoklonal antikor üretiminde memeli hücrelerine transfekte edilmesinin sebebi, özellikle HEK293T hücre hattına transfekte edilir. Hek293T insan embriyonik böbrek hücre hattıdır ve

kullanımının sebebi antikör üretimi sırasında Fc bölgesinde ağır zincirlere bağlanan glikan yapının insana ait olması gerekesidir. Bu bölge molekül için bir imza görevi görmektedir ve insanda kullanılacak bir antikörün fare glikan yapısı taşıması immün cevaba neden olup immün sistemimizin antikora karşı anti-antikör cevap geliştirmesine neden olacaktır. Bu yüzden antikörlerin hümanizasyonunda glikan yapısının da insana ait olması önem taşımaktadır (30,31)

### **2.5.İmmünoterapide Hümanize Antikörlerin Kullanımı**

İmmünoterapide kullanılan mAb'lar yapılarına göre isimlerinin sonuna ekler almaktadırlar. Kimerik antikörler '-ximab', hümanize antikörler '-zumab' ve insan antikörleri ise '-umab' ekini almaktadırlar.

1997 yılında FDA tarafından onay alan ilk kimerik antikör olan Rituximab, kan kanseri, otoimmün hastalıklar gibi pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. B hücrelerinin yüzeyinde bulunan CD20 proteinine karşı geliştirilmiştir ve bağlanması sonucunda hücre ölümünü tetikler. Cetuximab ise metastatik kolorektal kanser, baş ve boyun kanseri gibi epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ile ilişkili hastalıkların tedavisinde kullanılan kimerik bir monoklonal antikördür.

Multipl skleroz hastalığının tedavisinde kullanılan Daclizumab ilk hümanize antikördür. T hücrelerinin IL-2 reseptörünün CD25 birimine bağlanır ve inhibe eder. Trantuzumab, meme kanseri ve mide kanserini tedavi etmede HER2 reseptörüne bağlanarak hücre duplikasyonunu yavaşlatan bir hümanize monoklonal antikördür.

Terapötik olarak kullanım onayı alan ve faj gösterimi teknolojisi ile üretilen ilk insan antikörü olan Adalimumab, TNF inhibitörü tamamen insan monoklonal antikördür. Romatoid artrit ve Crohn hastalığı tedavisinde kullanılmaktadır. Aynı zamanda ilk tamamen insan antikörü da Adalimumab'dır. Panitumumab'da EGFR'a karşı geliştirilen transgenik fareler kullanılarak üretilmiş ilk insan antikörüdür.

### **Son Yıllarda Antikörler**

1 Kasım 2021 itibarıyla, Amerika Birleşik Devletleri veya Avrupa Birliği'nde 2021 yılında toplam 11 antikör tedavisine ilk onay verilmiştir. Bunlar evinacumab, dostarlimab, loncastuximab, amivantamab, aducanumab, tralokinumab, anifrolumab, bimekizumab, tisotumab vedotin, regdanvimab,

REGEN- COV2 gibi antikordur. Ancak yedi ürünün ilk küresel onayları, Japonya (pabinafusp alfa), Çin (disitamab vedotin, penpulimab, zimberelimab), Avustralya (sotrovimab, REGEN-COV2) veya Kore Cumhuriyeti (regdanvimab) dahil olmak üzere başka yerlerde verilmiştir (32). 2022 Kasım ortası itibarıyla 12 antikor terapötğine ilk onaylar verilmiştir. Bunlar; tebentafusp (Kimmtrak), faricimab (Vabysmo), sutimlimab (Enjaymo), relatlimab (Opdualag), tixagevimab/cilgavimab (Evusheld), mosunetuzumab (Lunsumio), teclistamab (TECVAYLI), spesolimab (SPEVIGO), tremelimumab (Imjudo; durvalumab ile kombinasyon), nirsevimab (Beyfortus), mirvetuksimab soravtansin (ELAHERE™) ve teplizumab (TZIELD)), 4 bispesifik antikor ve 1 ADC dahil olarak belirlenmiştir. İki bispesifik antikor (cadonilimab ve ozoralizumab) dahil olmak üzere ek yedi ürün adayı ilk olarak 2022'de Çin veya Japonya'da onaylanmıştır.

Veriler, COVID-19'a yönelik antikorlar hariç tutulduğunda, son aşama ticari klinik hattının geçen yıl ~%20 büyüdüğünü göstermektedir.

### COVID-19 Müdahaleleri

COVID-19 salgınının üçüncü yılı sona ererken, şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2), Omicron gibi endişe verici değişkenlerin dolaşımında kalması nedeniyle küresel bozulmaya neden olmaya devam etmektedir. Kasım 2022 itibarıyla, Johns Hopkins Üniversitesi Sistem Bilimi ve Mühendisliği Merkezi (coronavirus.jhu.edu/map) tarafından tutulan COVID-19 Kontrol Paneli, dünya çapında toplam vaka ve ölümlerin 630 milyonu ve 6,6 milyonu aştığını göstermektedir. Ancak halk sağlığı önlemleri (örneğin maske kullanımı), aşıların yaygın olarak bulunması ve hastalığa yönelik ilaçların geliştirilmesi nedeniyle vakalar ve ölümler artık 2021 ve 2022 başlarına göre çok daha düşük seviyelerde meydana gelmektedir.

Değişen pandemi koşulları, özellikle de Omicron varyantının ortaya çıkışı, 2022 yılında anti-SARS-CoV-2 antikor geliştirme manzarasını önemli ölçüde değiştirip Omicron varyantının yüksek sıklığı nedeniyle, 2020 ve 2021'de acil kullanım izinleri (EUA'lar) verilmiştir.

Kasım 2022'nin başı itibarıyla yalnızca iki anti-SARS-CoV-2 antikor ürün adayı, bebtelovimab ve Evusheld (cilgavimab ile birlikte paketlenmiş tixagevimab), FDA'dan, EUA'ya sahipti. Bebtelovimab ilk olarak 11 Şubat 2022'de, pozitif COVID-19 testi olan yetişkinlerde ve pediatrik hastalarda (12

yaş ve üzeri, en az 40 kilogram ağırlığında) hafif ile orta dereceli COVID-19 tedavisi için bir EUA yayınlamıştır.

Antikor tedavilerine 2022'de ABD veya AB'de ilk onay verilmiştir. Devam eden pandemiye rağmen, Kasım 2022 ortasına kadar ABD veya AB'de ilk onayı verilen yıllık antikor terapötiklerinin sayısı, hem 2018 hem de 2021'de elde edilen 13 ürünlük rekora yakındı.

Kasım 2022 ortası itibarıyla bu iki bölgede ilk onayları verilen 12 yeni antikor bazlı tedavi şunlardır: tebentafusp (Kimmtrak), faricimab (Vabysmo), sutimlimab (Enjaymo), relatlimab (Opdualag), tixagevimab/cilgavimab (Evusheld), mosunetuzumab (Lunsumio), teclistamab (TECVAYLI), spesolimab (SPEVIGO), tremelimumab (Imjudo; durvalumab ile kombinasyon), nirsevimab (Beyfortus), mirvetuximab soravtansine (ELAHERE™) ve teplizumab (TZIELD). Yeni onaylanan 12 ilacın eşit sayıdaki kısmı kanser (6 ürün) ve kanser dışı (6 ürün) endikasyonlarına yöneliktir. Özellikle 2022 onayları arasında 4 bispesifik (tebentafusp, faricimab, mosunetuzumab ve teclistamab) ve bir antikor-ilaç konjugatı (ADC) olan mirvetuksimab soravtansin yer almaktadır. Dört bispesifik maddenin tamamı, halihazırda onaylanmış antikor terapötikleri arasında benzersiz olan antijen kombinasyonlarını hedefler. Mirvetuksimab soravtansin ve bağışıklık kontrol noktası modülatör antikor relatlimab ayrıca şu anda piyasada bulunan antikor terapötikleriyle karşılaştırıldığında benzersiz antijenleri (sırasıyla folat reseptörü (FR)  $\alpha$  ve LAG3) hedeflemektedir (33).

### **Antikor Piyasasının Görünümü (2022-2032)**

2022 yılı itibarıyla, küresel antikor pazarının büyüklüğü 197,3 milyar ABD doları değerinde olup, önümüzdeki on yıl içinde %11,9'luk muhteşem bir yıllık bileşik büyüme oranı sergileyeceği tahmin edilmektedir. Piyasanın 2032 yılı sonuna kadar 3 kat artarak 608 milyar ABD doları değerindeki değerlemeyi aşması beklenmektedir.

### **3. TARTIŞMA VE SONUÇ**

İlk kez kanser tedavisinde kullanılan immünoterapi tümör bölgesine bakteri enjeksiyonundan hedefe spesifik olan monoklonal antikorlara kadar yıllar içerisinde büyük gelişime ve değişime uğradı. Günümüzde immünoterapinin de en çok kullanıldığı alan olan kansere karşı bugüne kadar birçok farklı tedavi yaklaşımı denenmiştir. Hala çok yağın bir şekilde kullanılan

kemoterapi uygulaması kanseri yok etmedeki başarısının yanında çok ciddi yan etkilere sahiptir. Bu yan etkilerin en büyük sebebi tedavinin hedeflenemiyor oluşundan kaynaklanır. Monoklonal antikolar ise antijenin tek bir epitopuna bağlanabilme özellikleri nedeniyle tam spesifiktirler. Bu nedenle kemoterapide olduğu gibi kanser hücreleriyle birlikte kişinin sağlıklı hücrelerine de olumsuz etkide bulunarak tahribata neden olmaz. Geliştirildiği antijenin tek bir bölgesinden bağlanarak sadece hedefine yönelir. İmmünoterapide kullanılan monoklonal antikoların yan etkiler oldukça azdır.

Henüz geliştirilmeye ihtiyacı olan monoklonal antikoların karşılaştığı AAR sonucunda uygulanan tedavinin süresi kısalmakta ve yetersiz kalmaktadır. Buna karşı çözüm yolu olarak ise kullanılan monoklonal antikoların hümanize edilerek immün sistem tarafından antijen olarak algılanmasının ve ona karşı immün yanıt gelişmesinin önüne geçilmeye çalışılmıştır. Kimerik antikolar her ne kadar hümanize antikolar olmasalar da günümüzde sıklıkla kullanılırlar. Örneğin, Cetuximab kansere karşı en çok kullanılan kimerik monoklonal antikolardan biridir. Buna rağmen yapısındaki değişken bölgeler fare temelli olduğundan tedaviye başladıktan bir süre sonra Cetuximab'a karşı anti-antikor yanıtı gelişmeye başlar. Böylece kimerik monoklonal antikora karşı kişinin vücudu antikor geliştirir. Bu direnci tersine çevirmek adına pek çok çalışma yapılmıştır. Cohen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kullanılan Cetuximab'ın yirminci güne kadar tümör hacmini azalttığı ancak sonrasında direncin gelişmesiyle beraber tümörde hızlı bir büyümenin meydana geldiği bildirilmiştir (34).

Bu nedenle hümanizasyon bir adım iler giderek insan antikoruna sadece CDR bölgelerinin aşılması başlamıştır. İmmünojenisitesi çok daha düşük olduğu için direnç mekanizması devreye girmeden uzun dönem tedaviler sürdürülebilmektedir. Yine de AAR meydana gelmesi tamamen ortadan kaldırılamamıştır. CDR aşılması sırasında korunan fareye ait kalıntı bölgelerine karşı immün yanıt oluşu gözlenmiştir. Hümanize bir antikor olan Trastuzumab'a karşı da direnç geliştirdiği Lu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada gösterilmiştir (35).

İnsan antikolarının üretimi direnç mekanizmasını fazlasıyla ortadan kaldırmıştır. Faj gösterimi ile elde edilen insan antikoları çok çeşitli ve hibridoma gibi teknolojilerle elde edilemeyecek antikolar üretilmesine olanak tanımıştır. Bununla beraber transgenik hayvan platformları da hümanizasyon

aşamasına ihtiyaç duyulmadan insan antikoru üretilmesini sağlamasıyla son yıllarda oldukça popüler hale gelmiştir. Ancak transgenik hayvan platformlarında kullanılan hayvanların kendi IgG dizileri devreye girebilmekte ve üretilen insan antikorun etki edebilmektedir. Bu sorun farenin kendisine özgü IgG dizilerinin nakavt edilerek sadece insan IgG dizilerini ifade etmesi sağlanarak Xenomouse modeli oluşturulmuştur. Bu sayede Barok ve arkadaşları tamamen insan antikoru üreten Xenomouse fareleri ile Panitumumab üretimini bildirmiştir (36).

Transgenik hayvan platformları henüz gelişmeye ihtiyacı olan bir sistemlerdir. İnsan antikorlarının üretimi sağlanmış olsa bile antikorların antijenlere afinitelerinde çok ciddi azalmalar görülmüştür. Aynı zamanda değişken bölge dizilerinin yüksek mutasyona uğrama kapasiteleri onlara on binlerce farklı antijeni tanıma şansı verir. Ancak bu mutasyon kapasitesinin transgenik farelerde düştüğü ve elde edilen antikorların çeşitliliğinde azalma olduğu bildirilmiştir.

Monoklonal antikorlar immünoterapi de en yaygın kullanılan moleküllerdir. Spesifik olmaları, hedeflenebilirlikler ve az yan etkiye neden olmaları ile ilgi odakları haline gelmişlerdir. Günümüzde immünoterapide kullanılan monoklonal antikorların hümanizasyonu ile hastalıkların tedavisin de ve hastanın yan etkilere daha az maruz kalmasını sağlamasıyla önümüzdeki yıllarda da giderek daha fazla çalışılacak ve geliştirilecek bir alandır.



**KAYNAKLAR**

1. Sattler S. The Role of the Immune System Beyond the Fight Against Infection. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2017 [cited 2022 Apr 18];1003:3–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28667551/>
2. Lane D. *Antibodies* (Book). 1988.
3. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet* [Internet]. 2001 Jun 2 [cited 2022 Apr 14];357(9270):1777–89. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673600049047/fulltext>
4. Nicholson LB. The immune system. *Essays Biochem* [Internet]. 2016 Oct 31 [cited 2022 Apr 14];60(3):275. Available from: </pmc/articles/PMC5091071/>
5. Previterra ML. Mechanotransduction in the immune system. *Cell Mol Bioeng*. 2014;7(3):473–81.
6. Varadé J, Magadán S, González-Fernández Á. Human immunology and immunotherapy: main achievements and challenges. *Cell Mol Immunol* 2020 184 [Internet]. 2020 Sep 2 [cited 2022 Apr 21];18(4):805–28. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41423-020-00530-6>
7. Barbaros B, Dikmen M. Kanser İmmünoterapisi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilim Enstitüsü Derg*. 2015;31(4):177–81.
8. Waldmann TA. Immunotherapy: past, present and future. *Nat Med* 2003 93 [Internet]. 2003 Mar 1 [cited 2022 May 26];9(3):269–77. Available from: <https://www.nature.com/articles/nm0303-269>
9. Todd PA, Brogden RN. Muromonab CD3. *Drugs* 1989 376 [Internet]. 2012 Nov 15 [cited 2022 May 26];37(6):871–99. Available from: <https://link.springer.com/article/10.2165/00003495-198937060-00004>
10. Breedveld FC. Therapeutic monoclonal antibodies. *Lancet*. 2000 Feb 26;355(9205):735–40.
11. Saldanha JW. Humanization of recombinant antibodies. *Recomb Antibodies Immunother*. 2009;3–19.
12. Wallace GR. (4) Monoclonal antibodies as therapeutic agents. *Pharm J* [Internet]. 1994 [cited 2022 Apr 14];252(6790):715–8. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-30273-7\\_5](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-30273-7_5)
13. Chiu ML, Goulet DR, Teplyakov A, Gilliland GL. *Antibody Structure*

- and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies* 2019, Vol 8, Page 55 [Internet]. 2019 Dec 3 [cited 2022 Apr 21];8(4):55. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4468/8/4/55/htm>
14. E Z CC, H Y CA, J HB, E OE. The use of antibodies in the treatment of infectious diseases. *Rev Artic Singapore Med J*. 2009;50(7):663–73.
  15. Dondelinger M, Filée P, Sauvage E, Quinting B, Muyldermans S, Galleni M, et al. Understanding the significance and implications of antibody numbering and antigen-binding surface/residue definition. *Front Immunol*. 2018 Oct 16;9(OCT):2278.
  16. Ovchinnikov V, Louveau JE, Barton JP, Karplus M, Chakraborty AK. Role of framework mutations and antibody flexibility in the evolution of broadly neutralizing antibodies. *Elife* [Internet]. 2018 Feb 14 [cited 2022 May 27];7. Available from: [/pmc/articles/PMC5828663/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5828663/)
  17. King DJ, Therapeutics C, Slough, UK. *Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies*. 1998.
  18. Farhan ul Haque Saeed A, Ashraf Awan S. *Advances in Monoclonal Antibodies Production and Cancer Therapy*. *MOJ Immunol* [Internet]. 2016 Jul 15 [cited 2022 May 27];Volume 3(Issue 4). Available from: <https://medcraveonline.com/MOJI/MOJI-03-00099.php>
  19. Mitra S, Tomar PC. Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects. *J Genet Eng Biotechnol* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 May 27];19(1):159. Available from: [/pmc/articles/PMC8521504/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8521504/)
  20. Clavero-Álvarez A, Di Mambro T, Perez-Gavero S, Magnani M, Bruscolini P. Humanization of Antibodies using a Statistical Inference Approach. *Sci Reports* 2018 81 [Internet]. 2018 Oct 4 [cited 2022 Apr 21];8(1):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-32986-y>
  21. Harding FA, Stickler MM, Razo J, DuBridg RB. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: Residual immunogenicity resides in the CDR regions. *MAbs* [Internet]. 2010 May [cited 2022 May 27];2(3):256. Available from: [/pmc/articles/PMC2881252/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2881252/)
  22. Mohammed R, Milne A, Kayani K, Ojha U. How the discovery of rituximab impacted the treatment of B-cell non-hodgkin's lymphomas. *J*

- Blood Med. 2019;10:71–84.
23. Shin SU. Chimeric antibody: potential applications for drug delivery and immunotherapy. *Biotherapy* [Internet]. 1991 Jan [cited 2022 May 26];3(1):43–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2009213/>
  24. Kim HY, Tsai S, Lo SC, Wear DJ, Izadjoo MJ. Production and Characterization of Chimeric Monoclonal Antibodies against *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei* Using the DHFR Expression System. *PLoS One* [Internet]. 2011 [cited 2022 May 26];6(5). Available from: [/pmc/articles/PMC3090420/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2009213/)
  25. Kashmiri SVS, De Pascalis R, Gonzales NR, Schlom J. SDR grafting—a new approach to antibody humanization. *Methods*. 2005 May 1;36(1):25–34.
  26. Williams DG, Matthews DJ, Jones T. Humanising Antibodies by CDR Grafting. *Antib Eng*. 2010;319–39.
  27. Lonberg N. Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2008 Aug [cited 2022 Apr 27];20(4):450–9. Available from: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
  28. Bruggemann M, Caskey HM, Teale C, Waldmann H, Williams GT, Surani MA, et al. A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy chains from transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1989 [cited 2022 May 27];86(17):6709–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2505258/>
  29. Mendez MJ, Green LL, Corvalan JRF, Jia XC, Yang XD, Gallo ML, et al. Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Nat Genet* [Internet]. 1997 Feb [cited 2022 May 27];15(2):146–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9020839/>
  30. Jennewein MF, Alter G. The Immunoregulatory Roles of Antibody Glycosylation. *Trends Immunol* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2022 Apr 26];38(5):358–72. Available from: <http://www.cell.com/article/S1471490617300273/fulltext>
  31. Rudd PM, Elliott T, Cresswell P, Wilson IA, Dwek RA. Glycosylation and the immune system. *Science* (80- ). 2001 Mar 23;291(5512):2370–6.

32. Kaplon H, Chenoweth A, Crescioli S, Reichert JM. Antibodies to watch in 2022. *MAbs* [Internet]. 2022;14(1):1–45. Available from: <https://doi.org/10.1080/19420862.2021.2014296>
33. Kaplon H, Crescioli S, Chenoweth A, Visweswarajah J, Reichert JM. Antibodies to watch in 2023. *MAbs* [Internet]. 2023;15(1):1–42. Available from: <https://doi.org/10.1080/19420862.2022.2153410>
34. Cohen AS, Geng L, Zhao P, Fu A, Schulte ML, Graves-Deal R, et al. Combined blockade of EGFR and glutamine metabolism in preclinical models of colorectal cancer. *Transl Oncol*. 2020 Oct;13(10):100828.
35. Lu Y, Zi X, Zhao Y, Mascarenhas D, Pollak M. Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2001 Dec 19 [cited 2022 May 27];93(24):1852–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11752009/>
36. Barok M, Joensuu H, Isola J. Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and drug resistance. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2014 Mar 5 [cited 2022 May 27];16(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24887180/>



## BÖLÜM 12

### HALOFİTLERİN MOLEKÜLER ADAPTASYONU

Dr. Öğr. Üyesi Gökçen BAYSAL FURTANA<sup>1</sup>  
Dr. Öğr. Üyesi Fahriye ÖCAL ÖZDAMAR<sup>2</sup>

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.10251417>

---

<sup>1</sup>Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Teknikokullar, ANKARA.  
gbaysal@gazi.edu.tr Orcid ID: 0000-0001-6931-2430

<sup>2</sup> Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Teknikokullar, ANKARA.  
fahriyeocal@gazi.edu.tr Orcid ID: 0000-0003-0584-2242



## 1. Tuzluluk Problemi ve Halofitler

İklim değişikliği ve artan antropojenik faaliyetler sonucunda ortaya çıkan toprakta tuzlanma problemi, sürdürülebilir tarımı, ekolojik dengeyi ve gelecekteki gıda güvenliğini tehdit eden ciddi bir çevre sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Artan insan nüfusunu beslemek için, zaten kuraklık tehlikesiyle karşı karşıya olan dünyanın birçok bölgesindeki tarım alanlarında sulama için kalitesiz, tuzla kirlenmiş yeraltı suyunun kullanılması, uygun olmayan drenaj ile birlikte yanlış tarımsal metodların uygulanması toprak tuzluluğunu daha da artırmaktadır (Minhas ve ark., 2019; Rahman ve ark., 2021). İklim değişikliğinin kaçınılmaz sonuçlarından olan, düzensiz yağışlar, seller, sıcaklık artışları, buzulların erimesi, tatlı su kaynaklarının tükenmesi, tekrarlanan kuraklıklar insanlığı tehdit eden yeni normaller haline gelmeye başlamıştır. Bu olumsuz koşulların pek çoğu halihazırda yüksek kuraklık, su kıtlığı ve tuzluluk gibi problemlerle mücadele veren alanlarda sürdürülebilir doğal kaynakların devamlılığı için önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (Kumar ve ark., 2019). Tuzluluktan kaynaklanan toprak yapısı ve kalitesinin bozulması, dünya genelinde tarım amaçlı kullanılan 5,2 milyar hektarlık alanın 3,6 milyar hektarını olumsuz yönde etkilemekte, küresel tarımı tehlikeye atmaktadır. Bu konuda yapılan araştırmalar, dünya nüfusunun 2050 yılına kadar 9,7 milyara ulaşacağını, bu durumun % 70 daha fazla gıda üretimini zorunlu kılacağını ve zaten daralan tarım alanları üzerinde ekstra bir baskı uygulayacağını öngörmektedir (Rahman ve ark., 2021; Abdellaoui ve ark., 2023). Toprakta çeşitli nedenlerle ortaya çıkan tuzluluk problemi her yıl yaklaşık 1,5 Mha ekilebilir alanı tehdit etmektedir. Bu da 21. yüzyılın ortalarına kadar tarım için kullanılabilen arazilerin % 50'sinin kaybedilme riski ile karşı karşıya olduğu gerçeğini bize açık bir şekilde göstermektedir (Mansour ve Hassan, 2022; Arzani ve ark., 2023). Dünya Toprak Veri Tabanı (Harmonized World Soil Database, HWSD) kayıtlarına göre, yaklaşık 424 milyon hektar üst toprağın (0-30 cm), 833 milyon hektar alt toprağın (30-100 cm) tuzdan etkilendiği bildirilmektedir. Tuzluluktan etkilenen tüm toprakların yaklaşık %65'i hafif, %20'si orta, %5'i yüksek ve %10'u ise aşırı tuzlu topraklar olarak kategorize edilmektedir (Anonymous, 2021). Hem toprak kalitesine ve hem de ürün verimine ağır zararlar veren tuzluluk, özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde daha büyük problemlere neden olmaktadır (Kumar ve ark., 2019).



Toprak özelliklerinde büyük değişikliklere neden olan yüksek tuz konsantrasyonları, aşırı kütle yoğunluğuna, toprağın sıkışmasına, toprak yapısının zayıflamasına, kil dağılımında düzensizliğe ve yüzey kabuklanmasına neden olmaktadır (Rengasamy, 2016). Bununla birlikte, tuzluluğun etkisiyle ortaya çıkan zayıf hidrolik iletkenlik, topraktaki su hareketini ciddi şekilde engelleyerek bitkilerde büyüme geriliğine ve verim azalmasına yol açmaktadır (Yuan ve ark., 2018). Tuzluluktan etkilenen bölgelerde yetişen bitkilerde toprak çözeltilisinin osmotik potansiyelinin yüksek olması nedeniyle bitkinin su alımı güçleşmektedir. Ayrıca toksik etki yapan iyonların yüksek seviyelerde birikmesi bitkilerde, iyonik dengesizlik, bozulmuş gaz değişim performansı, su dengesinin kaybı, metabolit seviyelerinde değişiklikler ve hücresel bölmelerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) aracılık ettiği oksidatif hasarın oluşumu gibi farklı fizyolojik anormalliklere neden olmaktadır (Kumar ve ark., 2019; Rahman ve ark., 2021). Aşırı tuza maruz kalan bitkilerde turgor kaybı, stoma iletkenliği ve fotosentez hızında azalma, besin dengesizliği, biyokütlenin azalması ve büyümenin yavaşlaması gibi etkiler görülmektedir. Çimlenme, fide aşaması, vejetatif ve generatif gelişim dönemleri de dahil olmak üzere bitkinin tüm hayat evrelerini olumsuz etkileyen tuz stresi oldukça karmaşık bir abiyotik streştir (Sevgi ve Leblebici, 2023).

Bitkiler, yaşamlarını olumsuz etkileyen stres koşulları ile karşı karşıya kaldıklarında hayatta kalabilmek için sinyal iletim yollarını aktive ederler. Bu amaçla da tek tek veya birlikte hareket eden bir dizi stres algılama mekanizmasını kullanırlar (Kumar ve ark., 2019). Bunlar:

- **Fiziksel algılama:** Stresin mekanik etkilerinin tüm bitki veya hücresel düzeyde algılanması.
- **Biyofiziksel algılama:** Hücre enzimlerinin ve diğer biyokimyasal bileşenlerin yapısındaki veya işlevindeki değişikliklerin algılanması.
- **Metabolik algılama:** Enzimatik ve/veya elektron transfer reaksiyonlarının bozulmasına tepki olarak sentezlenen yan ürünlerin (aşırı ROS üretimi) algılanması.
- **Biyokimyasal algılama:** Stres faktörüne özgü proteinlerin varlığının algılanması.

- **Epigenetik algılama:** DNA ve/veya RNA moleküllerinin yapısındaki değişikliklerin genetik dizide herhangi bir değişiklik olmadan algılanması.

Abiyotik streslere karşı bitki tarafından geliştirilen mücadele yöntemleri ve hayatta kalabilme becerisi, biyokimyasal ve moleküler seviyedeki olaylar dizisi tarafından kontrol edilmektedir. Büyüme ortamında maruz kaldığı bu olumsuz duruma karşı, bitkinin içsel dengelerini, protein ve membran yapılarını koruyabilmesi için çeşitli savunma mekanizmalarını kullandığı bilinmektedir (Kumar ve ark., 2019). Bitkiler, tuzluluğun zararlı etkilerine karşı koymak için iyon alımı, taşınımı, seyreltilmesi ve bölmelendirilmesi, ozmotik koruyucu bileşiklerin ve uyumlu çözünen bileşiklerin biyosentezi, fitohormonların ve antioksidan bileşiklerin sentezi ve aktivasyonu gibi bazı temel mekanizmaları yeniden düzenleyebildikleri gibi bazı morfolojik ve anatomik adaptasyonlar da göstermektedirler (Abobatta, 2020; Rahman ve ark., 2021).

Geleneksel tarımda üretimi yapılan ve glikofitlere (tuza hassas) dahil olan pek çok bitki, tuzluluğa karşı tolerans eşiği düşük türler olup, bu tip topraklarda hayatta kalmak için tuz tolerans potansiyelini kullanamamaktadır. Oysaki, Dünya florasının sadece %2'sini oluşturan ve halofitler (tuzcul bitkiler) grubunda yer alan bazı bitkiler, seçici iyon alımı, Na bölmelendirilmesi, içsel iyon dengesinin ayarlanması, tuz bezi, tuz kesesi oluşumları ve gelişmiş antioksidan özellikler ile ilginç bir şekilde aşırı tuzlu topraklarda bile hayatta kalabilmekte ve neslini devam ettirebilmektedir (Flowers ve Colmer, 2008; Patel ve ark., 2020; Rahman ve ark., 2021). Dünyada 120 familya, 550 cins içinde yer alan yaklaşık 3000 tür bitkinin halofit olduğu bilinmektedir. Bu bitkilerin büyük bir kısmı “Kazayağgiller” olarak bilinen Chenopodiaceae familyasında yer almaktadır (Kumar ve ark., 2019). Genel olarak kök bölgesindeki yüksek tuzluluğa dayanan halofit bitkiler arasında da tuz toleransı açısından önemli genetik farklılıkların olduğu, buna bağlı olarak farklı gruplara ayrılmasının uygun olacağı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Sengbusch, 2003; Flowers ve Colmer, 2008; Youssef, 2009; Hasanuzzaman ve ark., 2014; Shukla ve ark., 2023). Tuzlu koşullar altında büyümeyi devam ettirme yeteneklerine dayanarak Sengbusch (2003) halofitlerin aşağıdaki kategorilere göre gruplandırılmasını önermiştir.

- **Zorunlu (Obligat) halofitler:** Yaşam döngüsü boyunca ancak sürekli olarak yüksek tuza maruz kalmaları halinde yeterli büyüme ve gelişme

gösterebilen halofitlerdir. Yalnızca tuzlu habitatlarda yetişirler. Çoğunlukla Chenopodiaceae familyasında yer alan türler bu kategoriye girmektedir.

- **Seçici (Fakültatif) halofitler:** Genellikle düşük tuzlu habitatlarda bulunan, ancak tuzsuz ortamlarda da gelişebilen, tuzlu topraklarda kolayca yerleşen ancak yalnızca büyümenin son dönemlerinde tuzluluk stresi hafif olduğunda en iyi gelişimi gösteren türleri içermektedir.
- **Hidro-halofitler:** Deniz kıyısındaki ıslak arazilerde ve tuzlu bataklıklarda bulunan halofitlerdir.
- **Kserohalofitler:** Kurak ve tuzlu bölgelerde yetişen, yaprak yüzeyinde tuz salgılamak için tuz keseleri bulunan, “sukkulent” olarak ta isimlendirilen etli gövdeye sahip bitkilerdir.
- **Deniz fanerogamları:** Karasal halofitlerden farklı olarak tohum taşıyan, denizde yaşayan ve yaşam döngülerini tamamen deniz suyuna batmış halde tamamlayan türlerdir.

Yüksek tuzluluğa karşı mücadele edebilmelerini sağlayan çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik mekanizmaları kullanabilme özelliklerinin yanı sıra sahip oldukları özel morfolojik yapılar halofitler için önemli bir avantajdır. Sürekli maruz kaldıkları tuzluluğa dayanmalarını sağlayan morfolojik özellikleri arasında sukkulent yapıda olma, iyi gelişmiş su depolayan dokulara, kalın, etli ve sulu yapraklara, mumsu kütikül tabakaya, fazla tuzu uzaklaştırmak için görevli hücrelere, bezlere ve tüylere sahip olma sayılabilir (Koyro ve ark., 2008; Kumar ve ark., 2019). Halofitlerin tuzluluğun olumsuz etkilerini azaltmak ve hayatını devam ettirebilmek için kullandıkları mekanizmalar ise tuzu almama, tuzu bitki bünyesinden uzaklaştırma, tuzu seyreltme, ozmotik ayarlama (vakuolde inorganik tuzların (çoğunlukla NaCl) ve sitoplazmada organik çözünenlerin birikmesi), iyon homeostazı ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) detoksifikasyonu olarak sayılabilir (Kumar ve ark., 2019).

Yapılan çalışmalarda büyüme ortamındaki yüksek tuz konsantrasyonlarına rağmen rahatlıkla yaşamını sürdürebilen halofit bitkilerde stresi algılamada görev yapan sinyal bileşenlerini kodlayan genlerin tanımlanmasının ve karakterizasyonun önemli olduğu sonucu ortaya konmuştur. Ayrıca, moleküler düzeyde, strese bağlı savunma yollarının uyarılmasından birkaç gen ailesi sorumlu olduğu da vurgulanmıştır (Himabindu ve ark., 2016; Böhm ve ark., 2018; Kumar ve ark., 2019, Guo ve ark., 2020; Li

ve ark., 2020; Rahman ve ark., 2021). Glikofit bitkiler ile aralarında moleküler farklılıklar olan halofitlerin tolerans ile ilişkili genlerinin ve üstün performansından sorumlu olan moleküler yönlerinin aydınlatılmasına yönelik yapılacak çalışmaların iklim değişikliği çağında küresel gıda güvenliğini sağlamak ve sürdürülebilir tarımı korumak için oldukça önemli olduğu bildirilmiştir (Barros ve ark. 2021).

## **2. Halofitlerde Tuzluluğun Etkisini Azaltan Mekanizmalar**

### **2.1. Ozmotik Düzenleme**

Denge oluşturan uygun ozmotik bileşikler, kimyasal olarak çeşitli organik bileşiklerden oluşan bir grup yüksüz, polar, doğada çözünebilir ve yüksek konsantrasyonlarda bile hücrel metabolizmaya karışmayan bileşiklerdir. İnorganik bileşiklerin aksine, daha yüksek hücrel konsantrasyonlarda dahi toksik değildirler (Nahar ve ark., 2016; Niaziyan ve ark., 2021). Stres koşulları altında sentezlenen, düşük dış su potansiyellerinde hücre sitoplazmasında biriken sakkaroz, malat ve oksalat gibi organik bileşikler ile prolin, ektoin, trehaloz, polioller, fruktan ve kuaterner amonyum bileşikleri (QAC) (glisinbetain, alanin betain, prolin betain, kolin- O -sülfat, hidroksiprolin betain ve pipekolat betain gibi) bu grupta yer almaktadır (Singh ve ark., 2015). Tuz stresi altındaki bitkilerde ozmotik bileşik birikiminin temel işlevi, sitoplazma ve vakuol arasındaki ozmotik dengeyi korumak, iyon toksisitesini azaltarak hücrel bileşenlerin ve enzimlerin tuz hasarından korunmasını sağlamaktır. Ayrıca, üretilen tehlikeli ROS'ları temizleyerek ve önemli antioksidatif enzimleri koruyarak bitkilerdeki antioksidatif savunma sistemini de güçlendirmektedir (Hasanuzzaman ve ark., 2014, 2019).

Organik bileşiklerin sentezi ve birikimi yoluyla yüksek tuz konsantrasyonuna sahip hücre vakuölü ile sitoplazma arasındaki dengenin korunması, tuzdan etkilenen topraklarda halofitlerin performansının belirlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Söz konusu maddeler tuzlu koşullar altında bitkiyi korumaktadır. Örneğin; sükroz, kloroplastları korurken prolin de proteinlerin bütünlüğünü sağlamaktadır.

Prolin biyosentezi Glutamat ve Ornitin yolu olmak üzere iki yolla gerçekleşmektedir. Prolin, glutamattaki  $\Delta 1$  -pirolin-5-karboksilat sentetaz (P5CS) ve  $\Delta 1$ -pirolin5-karboksilat redüktaz (P5CR) tarafından katalize edilen  $\Delta 1$ -pirolin-5-karboksilat (P5C) ara maddesi aracılığıyla glutamatik asitten

üretilmektedir (Dar ve ark., 2016). Ancak alternatif bir yolda prolin, Orn- $\delta$  - aminotransferaz yoluyla Prolin -5-karboksilata (P5C) transaminasyona uğrayan ornitinden (Orn) de sentezlenmektedir ( $\delta$ -OAT; Verbruggen ve Hermans, 2008). Prolin oluşumunun stres toleransına çeşitli şekillerde yardımcı olduğu bildirilmiştir. Proteinlerin bütünlüğünü sağlayarak ve enzim aktivitesini artırarak moleküler bir şaperon görevi görür (Ghosh ve ark., 2022). Prolinin antioksidan özelliğinin ROS temizleyici olarak faydalı olduğu da gözlemlenmiştir (El-Badri ve ark., 2021). Tuz stresi altındaki bitkilerde prolin biyosentezi, fizyolojik, moleküler ve genetik mekanizmaları kapsayan çok yönlü bir tepkiyi içermektedir. Prolin birikimi, bitkilerde tuz toleransının artırılmasında önemli bir rol oynar ve işleyiş mekanizması, bitkinin tuzlu ortamlara adaptasyonunu kolaylaştırmak için gen ifadesinin düzenlemesini içermektedir.

Tuz stresi koşulları altında glisinbetain (GB),  $\beta$ -alanin betain, prolin-betain, kolin- O -sülfat gibi kuaterner amonyum bileşiklerinin biriktiği bildirilmiştir (Koyro ve ark., 2012). Bu bileşikler arasında GB, kloroplastta genellikle diğerlerine kıyasla daha fazla miktarda bulunmaktadır. Hücrelere su akışını düzenleyerek hücre içi ozmotik dengenin korunmasına yardımcı olmaktadır (Ranganayakulu ve ark., 2013). Tilakoid membraların korunması, fotosentetik aktivitenin ve stoma iletkenliğinin sürekliliği ve fotorespirasyonun azaltılması açısından fayda sağlamaktadır. Glisinbetain sentezi, bazı halotolerant bitkilerde betain aldehiti glisinbetain'e dönüştüren BADH geni tarafından kodlanan betain aldehit dehidrojenazın (BADH) katalizini içermektedir (Jia ve ark., 2002). BADH enziminin aşırı ifadesiyle yapılan transgenik yaklaşımlar, stresli koşullar altında daha iyi tolerans sağlamaktadır (Sulpice ve ark., 2003). Yeni bir BADH geni olan ScBADH ile transforme edilen Arabidopsis bitkileri, tuz stresi altında SOD, prolin ve GB biriktirebilmiştir (Wang ve ark., 2016). Dolayısıyla BADH'nin bitkilerde MAPK yoluyla tuz stresinin olumsuz etkilerine karşı pozitif düzenleyici olarak görev yaptığı söylenebilir. Bununla birlikte, GB tuz stresinde fosfatın taşınmasına yardımcı olan  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  seviyelerini koruyarak iyon kanallarını ve taşıyıcıları düzenlemektedir (Haruta ve Sussman, 2012; Wei ve ark., 2017; Yuan ve ark., 2014).

Tuz stresine maruz kalan bitkiler şeker (örn. glikoz, fruktoz, trehaloz) ve nişasta gibi karbonhidratları biriktirmektedir (Parida ve ark., 2004). Stresin

olumsuz etkilerini azaltmak için ozmo-koruyucu olarak görev yapan ve ROS'un temizlenmesinde de rol oynayan şekerlerin stresin şiddetine paralel olarak miktarlarının önemli ölçüde arttığı rapor edilmiştir (Kerepesi ve Galiba, 2000; Gangola ve Ramadoss, 2018).

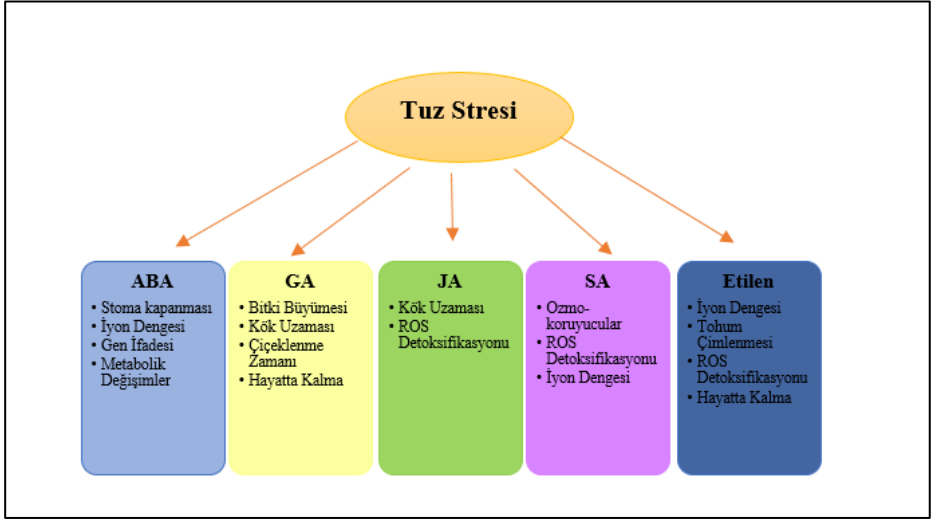
Pinitol, mannitol, miyo-inositol ve sorbitol gibi şeker alkolleri de ozmotik dengeyi ayarlayarak stres koşullarının hafifletilmesinde etkili bir rol oynamaktadır. Bunlar aynı zamanda polioller olarak da bilinir. Mannitol, ozmotik düzenlemeye yardımcı olur ve stresin ürettiği oksijen radikallerinin uzaklaştırılmasında görev alır (Kaya ve ark., 2013). Sorbitol, fotosentez sırasında üretilen bir ozmo-koruyucudur (Wu ve ark., 2010). D-Ononitol ise osmolit görevi gören ve kuraklık stresi sırasında bitkilerde su kaybını azaltan bir şeker alkolüdür. *Mesembryanthemum crystallinum*'dan gelen miyo-inositol O-metiltransferaz geni tütüne aktarıldığında, D-ononitol üretiminin arttığı ve bunun da bitkinin kuraklığa ve tuza karşı direncinin artmasına neden olduğu bildirilmiştir (Vinocur ve Altman, 2005). Pinitol, miyo-inositolün metilasyonu ile üretilen ve birçok halofitik türde bulunan bir şeker alkolüdür. Ononitol epimerizasyonu aynı zamanda pinitol oluşumuyla da sonuçlanmaktadır (Sengupta ve ark., 2008; Slama ve ark., 2015; Dumschott ve ark., 2019).

Farklı halofit bitkiler ile yapılan çeşitli çalışmalarda artan tuzlulukla birlikte şekerlerin, serbest amino asitlerin ve prolin içeriğinin arttığı bildirilmiştir (Dagar ve ark. 2004; Khot ve Joshi 2006; Santhanakrishnan ve ark., 2014; Parida ve ark., 2016; Skorupa ve ark., 2019; Abdallah ve ark., 2020).

## 2.2. Hormonal Düzenleme

Bitkilerde tuz stresine karşı tepki ve adaptasyon mekanizmalarının oluşabilmesi, absisik asit (ABA), gibberellik asit (GA), jasmonik asit (JA), salisilik asit (SA) ve etilen dahil olmak üzere birçok fitohormonun entegrasyonunu ve koordinasyonunu gerektirmektedir (Şekil 1). ABA, stomaların kapanmasının düzenlenmesi, iyon homeostazisi, tuz stresine duyarlı gen ekspresyonu ve metabolik değişiklikler de dahil olmak üzere tuz stresine karşı tepkilerin düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir hormondur. JA, yüksek tuzluluğa maruz kalma durumunda kök uzamasının engellenmesi ve antioksidatif enzimlerin aktivasyonunda rol oynar. Tuzluluk GA'ların birikimini azaltarak bitki büyümesinin ve kök uzamasının engellenmesine,

çiçeklenmenin gecikmesine ve bu durum metabolizmayı yavaşlattığı için bitkinin yüksek tuzluluk altında hayatta kalmasını desteklemektedir. Etilenin tuz stresi toleransı üzerindeki etkisi türe veya gene özgüdür. Etilen, detoksifikasyon mekanizmalarını indükleyerek tuz stresine maruz kalan bitkilerde hayatta kalmayı destekler. SA ise ozmo-koruyucuların birikmesine, antioksidatif enzimlerin uyarılmasına ve tuz stresi altında iyon dengesinin iyileştirilmesine katkıda bulunur (Zhao ve ark., 2020).



**Şekil 1.** Bitkilerde Tuz Stresine Adaptasyonun Düzenlenmesinde Fitohormonların Biyolojik Fonksiyonları (Zhao ve ark., 2020'den tercüme edilerek alınmıştır).

Tuzluluk stresi, bitki köklerinde önemli miktarda ROS (Reactive Oxygen Species) birikmesine neden olmaktadır (Nath ve ark., 2019; Niu ve ark., 2018). Bu ROS'un ana kaynağı, plazma membranına bağlı bir enzim kompleksi olan NADPH Oksidazdır. Ozmotik ve iyonik stresler, hücrede H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında artışa neden olmaktadır. Strese duyarlı bitkilerde bu esnada ABA devreye girerek hızlı stoma kapanmasını engellemekte ve NADPH oksidazı uyararak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimini sınırlandırmaktadır (Zhao ve ark., 2020). Bu nedenle, kök ABA içeriğinde tuzluluğun neden olduğu artış, stoma kapanmasını tetikleyen "ROS dalgası" oluşturmak için kritik bir öneme sahiptir (Mittler ve Blumwald, 2015).

JA ile ilgili yapılan transkriptomik çalışmalar, birçok JA biyosentez geninin tuz stresi altında yukarı doğru düzenlendiğini ve JA sinyal yolunun tuz stresine duyarlı genlerin düzenlenmesinde rol oynadığını ortaya çıkarmıştır

(Ma ve ark., 2006; Geng ve ark., 2013). Arabidopsis'te, yüksek tuzluluk altında kök uzamasının engellenmesi için JA sinyal yolunun gerekli olduğu bildirilmiştir (Valenzuela ve ark., 2016).

Tuzlu ortam koşullarında yetiştirilen Arabidopsis fidelerinin endojen GA miktarındaki azalmanın, negatif düzenleyici olan DELLA proteininin birikimi sonucu olduğu tespit edilmiştir (Achard ve ark., 2006; Magome ve ark., 2008). DELLA proteinlerinin yüksek tuzluluk altında büyümeyi kısıtlayarak bitkilerin hayatta kalmasını desteklediği fikri öne çıkmaktadır.

Etilen hormonu bitkilerde indüklediği metabolik reaksiyonlar sırasında tuz stresine toleransta da rol oynamaktadır. Etilen öncüsü 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asidin (ACC) uygulanması tuz stresi toleransını artırırken (Cao ve ark., 2006), ETR1, EIN4, EIN2 ve EIN3 gibi etilen sinyal yolu ile ilişkili genlerdeki mutasyonlar yüksek tuzluluğa karşı aşırı duyarlılığa yol açmaktadır (Wang ve ark., 2007; Zhang ve ark., 2011). Etilenin tuz stresi toleransı üzerindeki olumlu etkisine büyük ölçüde ROS'ları üreten ve temizleyen faktörlerin regülasyonu da aracılık etmektedir.

SA'nın tuz stresi toleransındaki rolü, glisinbetain, prolin ve poliaminler gibi ozmo-koruyucuların birikimini sağlaması (Misra ve Misra, 2012) ve yüksek tuzluluk altında antioksidan enzim aktivitelerini arttırması yeteneği ilişkilendirilmiştir (Szepesi, 2005). Bitkilerin SA ile ön-muamelesi, NaCl kaynaklı K<sup>+</sup> dışarı akışını ve H<sup>+</sup> içeri akışını azaltmakta, bitkilerin yüksek tuzluluğa adaptasyonunu desteklemektedir (Jayakannan ve ark., 2013).

### 2.3. Antioksidan Enzim Aktiviteleri ile Düzenleme

Bitkilerde antioksidan mekanizmalar ile tuz toleransının mekanizması kapsamlı bir şekilde yapılan pek çok çalışmada araştırılmış ve antioksidan sistemlerin tuzun neden olduğu oksidatif stresi azaltmadaki önemli rolü ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmalar, tuza toleranlı bitkilerin tuz stresine tepki olarak artan antioksidan aktivite sergilediğini ortaya koymuştur. Bu da bitkinin tuzluluğu tolere etme yeteneğinde antioksidanların önemine işaret etmektedir (Ludwiczak ve ark., 2023; Frary ve ark., 2010; Wang ve ark., 2020). Antioksidan sistemler süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POD), glutatyon redüktaz (GR), askorbik asit (AsA) ve glutatyon (GSH) gibi enzimatik ve enzimatik olmayan bileşenleri içermektedir (Li ve ark., 2020; Zhang ve ark., 2023). Bu antioksidan enzimlerin aktiviteleri tuz stresi ile



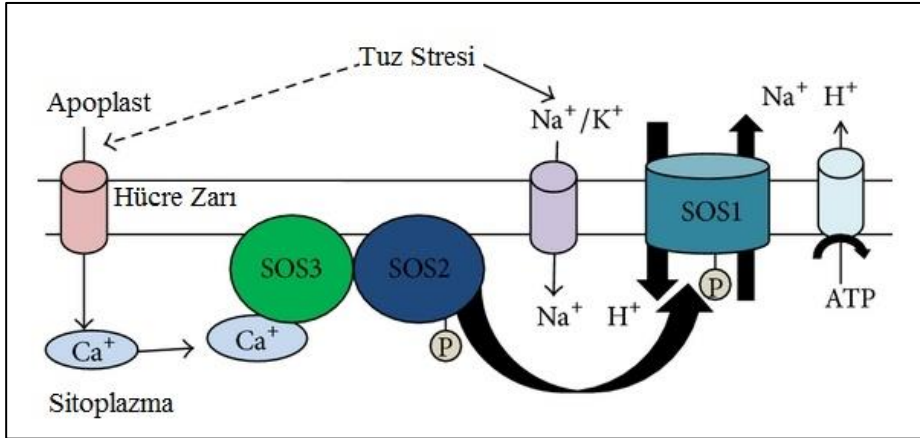
birlikte artmaktadır. Yapılan çalışmalarda, ThHSFA1 ve GmCIPK2 gibi spesifik genlerin aşırı ekspresyonunun, reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyelerini modüle ederek ve antioksidan enzim aktivitelerini de artırarak tuz toleransını arttırdığı gösterilmiştir (Li ve ark., 2020; Zhang ve ark., 2023). Fotosentetik genlerin koordinasyonu ve lipit metabolizmasının düzenlenmesinin, bitkilerde antioksidan savunma sistemini güçlendirmede ve tuz toleransına aracılık etmede rol oynadığı bildirilmiştir (Wang ve ark., 2020; Zhao ve ark., 2017). Ayrıca tuz stresine tepki olarak antioksidan, fenol, flavonoid ve protein seviyelerinin arttığı ve bitkinin tuzluluğu tolere etme yeteneğine katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (Gupta ve Wao, 2022). Sonuç olarak, bitkilerde tuz toleransının antioksidan mekanizmaları, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemlerin karmaşık etkileşimini, gen regülasyonunu ve dış faktörlerin etkisini içermektedir. Bu mekanizmalar, tuzun neden olduğu oksidatif stresin etkilerinin azaltılmasında önemli bir rol oynar ve bitkinin tuzluluğa karşı toleransını artırır.

## 2.4. Moleküler Düzenleme

Halofitler, tuz bakımından zengin topraklarda hücrelerinin gelişimini ve fonksiyonlarını düzenleyebilen birçok ayrıcalıklı özelliğe sahiptir. Tuz stresine adaptasyonun sağlanması karmaşık gen ağlarının ve proteinlerin düzenlenmesini içine alan bir mekanizmadır. Halofitlere tuz toleransını kazandıran birtakım genler tanımlanmıştır; bunlar arasında plazma zarı üzerindeki katyon/proton antiporterleri (SOS1, SOS2, SOS3), vakuolar membran ve plazma membranında P5CS ve NHX1 ve vakuolar H<sup>+</sup>-ATPazlar ve potasyum taşıyıcıları bulunmaktadır. Tuz stresinin, hücre içi iyonik homeostazın korunmasında rol oynayan genlerin ifadesini değiştirdiği bildirilmiştir (Shabala ve ark., 2013; Joshi ve ark., 2015; Himabindu ve ark., 2016).

İyon dengesinin sağlanması ve tuz toleransının oluşturulmasında, SOS sinyal yolağının önemi bilinmektedir (SOS: Salt Overly Sensitive) (Hasegawa ve ark., 2000; Sanders, 2000). SOS sinyal yolağı (Şekil 2) üç ana proteinden oluşmaktadır, bunlar SOS1, SOS2 ve SOS3'dür. SOS1, hücre zarı Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiportörünü kodlayarak hücreye Na<sup>+</sup> akışını düzenlemek ve Na<sup>+</sup>'un kökten uzun mesafeli taşınmasını sağlamak ile görevlidir (Shi ve ark., 2000; Shi ve ark., 2002). SOS2 geni, bir serin/treonin kinaz tarafından kodlanmakta olup ve

tuz stresiyle aktive edilen  $\text{Ca}^+$  sinyalleri tarafından oluşturulmaktadır (Liu ve ark., 2000). SOS3 ise  $\text{Ca}^{2+}$  bağlayıcı bir proteindir.



**Şekil 2.** Tuz stres yanıtlarında SOS yolağı (Gupta ve Huang, 2014, Öcal Özdamar, 2018).

SOS2 proteininin C-terminal düzenleyici bölgesi, SOS3 proteini için bir etkileşim bölgesi olarak işlev görmektedir (Şekil 2). SOS2 ve SOS3 proteinleri arasındaki bu etkileşim kinaz aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır (Guo ve ark., 2020). Kinaz aktivasyonu, SOS1 proteinini fosforile ederek taşıma aktivitesini artırır (Quintero ve ark., 2002). SOS3 proteini, SOS2 proteininin otoinhibisyonunu devre dışı bırakarak onunla etkileşime girer ve aktive eder. Böylece SOS3-SOS2 kompleksi, hücre zarında SOS1'i fosforile ettiği bölgeye yüklenir (Şekil 2). Fosforillenmiş SOS1 proteini, hücre dışına  $\text{Na}^+$  akışını artırarak hücredeki  $\text{Na}^+$  toksisitesini azaltır. Sitoplazmadaki iyon konsantrasyonunun düşük seviyede tutulması, bitkiler için hayati önem taşımaktadır, çünkü tuzlulukla artan  $\text{Na}^+$  konsantrasyonu, bitkiyi ölüme kadar götürebilmektedir. Bu nedenle membranlardan iyon taşınımı, sitoplazmada iyon konsantrasyonunun korunmasında bütünleyici bir rol oynamaktadır (Sairam ve Tyagi, 2004).

Halofitlerde tuz toleransının sağlanmasının önemli bir yolu da, sitozolde bulunan fazla  $\text{Na}^+$  iyonunun azaltılarak hücre içi  $\text{K}^+$  iyonunun korunması ve sitoplazmik iyon toksisitesinin engellenmesidir. Plazma membranında SOS1, hücrelerdeki fazla  $\text{Na}^+$ 'nın azalmasına neden olurken vakuolar membranda bulunan NHX,  $\text{Na}^+$ 'un vakuollere alınmasına da aracı olmaktadır (Himabindu

ve ark., 2016). Vakuollerin bu antiporterleri aynı zamanda  $K^+$ 'nın tutulmasında da rol oynamaktadır (Barragán ve ark., 2012). Bu antiporterlerin tuz toleransının yanı sıra pH bakımı ve hücre genişlemesi, membran trafiği, iyon homeostazisi ve stoma iletkenliği gibi temel işlevleri de bulunmaktadır (Himabindu ve ark., 2016; Reguera ve ark., 2013).

Yapılan pek çok çalışma ile, tuzluluğa dayanıklı bitkilerin geliştirilmesine yönelik ilerlemeler sağlanmış olmakla birlikte henüz tam olarak hedeflenen sonuca ulaşamamıştır. Bu nedenle, bitki dokusuna, içinde bulunduğu gelişim aşamasına ve maruz kaldığı çevresel koşullara göre ifadesi düzenlenen türe özgü tolerans genlerinin araştırılması gerekmektedir. Halofitlerin moleküler profilinin incelenmesi, glikofitlere kıyasla farklılıkların belirlenmesine katkıda bulunabileceği gibi, glikofit özelliğe sahip ekonomik ürünlerin topraktaki tuzlanmaya karşı dayanımının artırılmasını amaçlayan araştırmalar için yol gösterici olabilecektir.

**KAYNAKÇA**

- Abdallah, M.M.-S., El Sebai, T.N., Ramadan, A.A.E.-M., El-Bassiouny, H.M.S. (2020). Physiological and biochemical role of proline, trehalose, and compost on enhancing salinity tolerance of quinoa plant. *Bull. Natl. Res. Cent.* 44, 96. <https://doi.org/10.1186/s42269-020-00354-4>.
- Abdellaoui, R., Elkelish, A., El-Keblawy, A., Mighri, H., Boughalleb, F., Bakhshandeh, E. (2023). Editorial: Halophytes: salt stress tolerance mechanisms and potential use. *Front. Plant Sci.* 14, 1218184. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1218184>.
- Abobatta, W.F. (2020). Plant Responses and Tolerance to Extreme Salinity: Learning from Halophyte Tolerance to Extreme Salinity. In: Hasanuzzaman, M., Tanveer, M. (eds) *Salt and Drought Stress Tolerance in Plants. Signaling and Communication in Plants*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-40277-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-030-40277-8_7)
- Achard, P., Cheng, H., Grauwe, L. D., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Der Straeten, D. V., Peng, J., Harberd, N. P. (2006). Integration of Plant Responses to Environmentally Activated Phytohormonal Signals. *Science*. <https://doi.org/0091>.
- Anonymous, (2021). GSASmap | Global Soil Partnership | Food and Agriculture Organization of the United Nations (fao.org) <https://www.fao.org/global-soil-partnership/gasmap/en>, Erişim Tarihi: 22.11.2023.
- Arzani, A., Kumar, S., Mansour, M.M.F. (2023). Editorial: Salt tolerance in plants: molecular and functional adaptations. *Front. Plant Sci.* 14, 1280788. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1280788>
- Barragán V., Leidi, E.O., Andrés, Z., Rubio, L., Luca, A.D., Fernández, J.A., Cubero, B., Pardo J.M. (2012). Ion exchangers NHX1 and NHX2 mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in Arabidopsis. *Plant Cell*, 24:1127-1142.
- Barros, N.L.F., Marques, D.N., Tadaiesky, L.B.A., de Souza, C.R.B. (2021). Halophytes and other molecular strategies for the generation of salt-tolerant crops. *Plant Physiology and Biochemistry*, 162, 581-591. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.03.028>

- Böhm, J., Messerer, M., Müller, H.M., Scholz-Starke, J., Gradogna, A., Scherzer, S., Maierhofer, T., Bazihizina, N., Zhang, H., Stigloher, C., Ache, P., Al-Rasheid, K.A.S., Mayer, K.F.X., Shabala, S., Carpaneto, A., Haberer, G., Zhu, J.K., Hedrich, R. (2018). Understanding the molecular basis of salt sequestration in epidermal bladder cells of *Chenopodium quinoa*. *Curr. Biol.*, 28, 3075–3085.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.08.004>.
- Cao, W., Li, J., He, X., Mu, R., Zhou, H., Chen, S., Zhang, J. (2006). Modulation of ethylene responses affects plant salt-stress responses. *Plant Physiology*, 143(2), 707-719. <https://doi.org/10.1104/pp.106.094292>.
- Dagar, J. C., Tomar, O. S., Kumar, Y., Yadav, R. K. (2004). Growing three aromatic grasses in different alkali soils in semi-arid regions of northern India. *Land Degradation and Development*, 15, 143–151.
- Dar, M. I., Naikoo, M. I., Rehman, F., Naushin, F., Khan, F. A. (2016). Proline accumulation in plants: roles in stress tolerance and plant development. In: *Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies*. eds. N. Iqbal, R. Nazar and N. A. Khan (New Delhi: Springer), 155-166.
- Dumschott, K., Dechorgnat, J., Merchant, A. (2019). Water deficit elicits a transcriptional response of genes governing D-pinitol biosynthesis in soybean (*Glycine max*). *Int. J. Mol. Sci.* 20:2411. doi: 10.3390/ijms20102411.
- El-Badri, A. M., Batool, M., AA Mohamed, I., Wang, Z., Khatab, A., Sherif, A. (2021). Antioxidative and metabolic contribution to salinity stress responses in two rapeseed cultivars during the early seedling stage. *Antioxidants*. doi: 10:1227. doi: 10.3390/antiox10081227.
- Flowers, T.J., Colmer, T. (2008). Salinity tolerance in halophytes. *New Phytol.*, 179, 945–963. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02531.x>
- Frary, A., Göl, D., Keleş, D., Ökmen, B., Pinar, H., Şığva, H., Doğanlar, S. (2010). Salt tolerance in *Solanum pennellii*: antioxidant response and related QTL. *BMC Plant Biology*, 10, 58. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-58>
- Gangola, M. P., Ramadoss, B. R. (2018). “Sugars play a critical role in abiotic stress tolerance in plants,” in *Biochemical, Physiological and Molecular*

- Avenues for Combating Abiotic Stress Tolerance in Plants. ed. S. H. Wani (Amsterdam, The Netherlands: Academic Press), 17-38.
- Geng, W.Y.R., Wu, C. Wei Wee, F. Xie, X. Wei, P. Mei Yeen Chan, C. Tham, L. Duan, J.R. (2013). Dinneny A spatio-temporal understanding of growth regulation during the salt stress response in Arabidopsis. *Plant Cell*, 25: 2132-2154.
- Ghosh, U. K., Islam, M. N., Siddiqui, M. N., Cao, X., Khan, M. A. R. (2022). Proline, a multifaceted signalling molecule in plant responses to abiotic stress: understanding the physiological mechanisms. *Plant Biol.* 24, 227-239. doi: 10.1111/plb.13363.
- Guo, Q., Meng, L., Han, J., Mao, P., Tian, X., Zheng, M., Mur, L.A. (2020). SOS1 is a key systemic regulator of salt secretion and K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> homeostasis in the recretohalophyte *Karelinia caspia*. *Environ. Exp. Bot.*, 177, 104098. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104098>.
- Gupta, B., Huang, B. (2014). Mechanism of salinity tolerance in plants: Physiological, biochemical, and molecular characterisation. *International Journal of Genomics*, 214, 1-18.
- Gupta, S., Wao, A. (2022). Effect of salinity stress on phytochemical characteristics of centella asiatica. *Journal of Applied and Natural Science*, 14(2), 684-691.
- Haruta, M., Sussman, M. R. (2012). The effect of a genetically reduced plasma membrane protonmotive force on vegetative growth of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 158, 1158-1171. doi: 10.1104/pp.111.189167.
- Hasanuzzaman, M., Alam, M. M., Rahman, A., Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Fujita, M. (2014). Exogenous proline and glycine betaine mediated upregulation of antioxidant defense and glyoxalase systems provides better protection against salt-induced oxidative stress in two rice (*Oryza sativa* L.) varieties. *Biomed. Res. Int.* 757219. doi: 10.1155/2014/757219
- Hasanuzzaman, M., Anee, T. I., Bhuiyan, T. F., Nahar, K., Fujita, M. (2019). "Emerging role of osmolytes in enhancing abiotic stress tolerance in rice," in *Advances in Rice Research for Abiotic Stress Tolerance*. eds. M. Hasanuzzaman, M. Fujita, K. Nahar and J. K. Biswas (Amsterdam: Woodhead Publications), 677-708.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M.M., Bhowmik, P.C., Hossain, M.A., Rahman, M.M., Prasad, M.N., Ozturk, M., Fujita, M. (2014). Potential

- use of halophytes to remediate saline soils. *Biomed Res Int.*, Article ID:589341. <https://doi.org/10.1155/2014/589341>
- Hasegawa, P., Bressan, R.A., Zhu, J.K., Bohnert, H.J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51, 463-499.
- Himabindu, Y., Chakradhar, T., Reddy, M.C., Kanygin, A., Redding, K.E., Chandrasekhar, T. (2016). Salt-tolerant genes from halophytes are potential key players of salt tolerance in glycophytes. *Environ. Exp. Bot.*, 124, 39–63. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.11.010>.
- Jayakannan, N., Bose, M., Babourina, J., Rengel O., Z., Shabala, S. (2013). Salicylic acid improves salinity tolerance in arabidopsis by restoring membrane potential and preventing salt-induced K<sup>+</sup> loss via a gork channel. *Journal of Experimental Botany*, 64(8), 2255-2268. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert085>.
- Jia, G.-X., Zhu, Z.-Q., Chang, F.-Q., Li, Y.-X. (2002). Transformation of tomato with the BADH gene from *Atriplex* improves salt tolerance. *Plant Cell Rep.* 21, 141-146.
- Joshi, R., Mangu, V. R., Bedre, R., Sanchez, L., Pilcher, W., Zandkarimi, H. (2015). “Salt adaptation mechanisms of halophytes: improvement of salt tolerance in crop plants,” in *Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants*, ed G. K. Pandey (New York, NY: Springer), 243-279.
- Kaya, C., Sonmez, O., Aydemir, S., Ashraf, M., Dikilitas, M. (2013). Exogenous application of mannitol and thiourea regulates plant growth and oxidative stress responses in salt-stressed maize (*Zea mays* L.). *J. Plant Interact.* 8, 234-241. doi: 10.1080/17429145.2012.725480.
- Kerepesi, I., Galiba, G. (2000). Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Crop Sci.* 40, 482-487. doi: 10.2135/cropsci2000.402482x.
- Khot, S. S., Joshi, A. J. (2006). Accumulation of organic and inorganic solutes in *Salicornia brachiata* Roxb., an edible succulent halophyte growing at Navlakhi port. *Ecol. Environ. Conserv.* 12, 699-703.
- Koyro, H. W., Ahmad, P., Geissler, N. (2012). Abiotic stress responses in plants: an overview. In *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*. eds. P. Ahmad and M. Prasad (New York, NY: Springer), 1-28.

- Koyro, H.-W., Geißler, N., Hussin, S., Debez, A., Huchzermeyer, B. (2008). Strategies of Halophytes to Survive in a Salty Environment. In: Khan, N.A., Singh, S. Abiotic stress and plant responses. I.K. International Publishing House, Neu-Delhi
- Kumar, A., Mann, A., Lata, C., Kumar, N., Sharma, P.C. (2019). Salinity-induced Physiological and Molecular Responses of Halophytes. In: Dagar, J., Yadav, R., Sharma, P. (eds) Research Developments in Saline Agriculture. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-5832-6\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-13-5832-6_10)
- Li, J., Yuan, F., Liu, Y., Zhang, M., Liu, Y., Zhao, Y., Wang, B., Chen, M. (2020). Exogenous melatonin enhances salt secretion from salt glands by upregulating the expression of ion transporter and vesicle transport genes in *Limonium bicolor*. *BMC Plant Biol.*,20, 1–11, <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02703-x>.
- Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, CS., Zhu, J. K. (2000). The Arabidopsis thaliana SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), 3730-3734.
- Ludwiczak, A., Ciarkowska, A., Dehnavi, A., Cárdenas-Pérez, S., Piernik, A. (2023). Growth stage-, organ- and time-dependent salt tolerance of halophyte *Tripolium pannonicum* (jacq.) dobroc. *Life*, 13(2), 462. <https://doi.org/10.3390/life13020462>
- Ma, S., Gong, Q., Bohnert, H.J. (2006). Dissecting salt stress pathways, *Journal of Experimental Botany*, 57 (5): 1097-1107, <https://doi.org/10.1093/jxb/erj098>.
- Magome, H., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kamiya, Y., Oda, K. (2008). The DDF1 transcriptional activator upregulates expression of a gibberellin-deactivating gene, GA2ox7, under high-salinity stress in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 56(4), 613-626.
- Mansour, M.M.F., Hassan, F.A.S. (2022). How salt stress-responsive proteins regulate plant adaptation to saline conditions? *PlantMol. Biol.*, 108, 175–224. <https://doi.org/10.1007/s11103-021-01232-x>
- Minhas, P., Qadir, M., Yadav, R. (2019). Groundwater irrigation induced soil sodification and response options. *Agric. Water Manag.*, 215, 74–85. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2018.12.030>



- Misra, N., Misra, R. (2012). Salicylic acid changes plant growth parameters and proline metabolism in *Rauwolfia serpentina* leaves grown under salinity stress. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 12(12), 1601-1609.
- Mittler, R., Blumwald, E. (2015). The roles of ROS and ABA in systemic acquired acclimation. *Plant Cell* 27, 64-70.
- Nahar, K., Hasanuzzaman, M., Fujita, M. (2016). Roles of Osmolytes in plant adaptation to drought and salinity. In: *Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies*. eds. N. Iqbal, R. Nazar and N. A. Khan (New Delhi: Springer), 37-68.
- Nath, M., Bhatt, D., Jain, A., Saxena, S. C., Saifi, S. K., Yadav, S., Negi, M., Prasad, R., Tuteja, N. (2019). Salt stress triggers augmented levels of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and ROS and alter stress-responsive gene expression in roots of CBL9 and CIPK23 knockout mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany*, 161, 265-276. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.10.005>.
- Niazian, M., Sadat-Noori, S. A., Tohidfar, M., Mortazavian, S. M. M., Sabbatini, P. (2021). Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) vs. Flavodoxin (Fld): two important genes for enhancing plants stress tolerance and productivity. *Front. Plant Sci.* 12:695110. doi: 10.3389/fpls.2021.650215.
- Niu, M., Huang, Y., Sun, S., Sun, J., Cao, H., Shabala, S., Bie, Z. (2017). Root respiratory burst oxidase homologue-dependent  $\text{H}_2\text{O}_2$  production confers salt tolerance on a grafted cucumber by controlling  $\text{Na}^+$  exclusion and stomatal closure. *Journal of Experimental Botany*, 69(14), 3465-3476. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx386>.
- Öcal Özdamar, F. (2018). "Patlıcanda (*Solanum melongena* L.) tuz stresine dayanım ile dışsal  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve NO uygulamalarının etkileşimleri üzerinde araştırmalar, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji. Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Parida, A. K., Das, A. B., Mohanty, P. (2004). Investigations on the antioxidative defense responses to NaCl stress in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: differential regulations of isoforms of some antioxidative enzymes. *Plant Growth Regul.* 42, 213-226. doi: 10.1023/B:GROW.0000026508.63288.39.

- Parida, A. K., Veerabathini, S. K., Kumari, A., Agarwal, P. K. (2016). Physiological, anatomical and metabolic implications of salt tolerance in the halophyte *Salvadora persica* under hydroponic culture condition. *Frontiers in Plant Science*, 7, 351.
- Patel, M.K., Kumar, M., Li, W., Luo, Y., Burritt, D.J., Alkan, N., Tran, L.-S.P. (2020). Enhancing salt tolerance of plants: from metabolic reprogramming to exogenous chemical treatments and molecular approaches. *Cells*, 9, 2492. <https://doi.org/10.3390/cells9112492>
- Quintero, F. J., Ohta, M., Shi, H. Zhu, J.K., Pardo, J. M. (2002). Reconstitution in yeast of the Arabidopsis SOS signaling pathway for Na<sup>+</sup> homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (13), 9061-9066.
- Rahman, M.M., Mostofa, M.G., Keya, S.S., Siddiqui, M.N., Ansary, M.M.U., Das, A.K., Rahman, M.A., Tran, L.S.-P. (2021). Adaptive mechanisms of halophytes and their potential in improving salinity tolerance in plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 10733. <https://doi.org/10.3390/ijms221910733>
- Ranganayakulu, G. S., Veeranagamallaiah, G., Chinta, S. (2013). Effect of salt stress on osmolyte accumulation in two groundnut cultivars (*Arachis hypogaea* L.) with contrasting salt tolerance. *African J. Plant Sci.* 7, 586-592. doi: 10.5897/AJPS11.063.
- Reguera, M., Peleg, Z., Abdel-Tawab, Y.M., Tumimbang, E.B., Delatorre, C.A., Blumwald, E. (2013) Stress-induced cytokinin synthesis increases drought tolerance through the coordinated regulation of carbon and nitrogen assimilation in rice. *Plant Physiol* 163:1609-1622.
- Rengasamy, P. (2016). Soil chemistry factors confounding crop salinity tolerance—A review. *Agronomy*, 6(4), 53. <https://doi.org/10.3390/agronomy6040053>
- Sairam, R.K., Tyagi, A. (2004). Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science*, 86(3), 407-421.
- Sanders, D. (2000). Plant biology: The salty tale of Arabidopsis. *Current Biology*, 10(13), 486-488.
- Santhanakrishnan, A., Robinson, A. K., Jones, S., Low, A. A., Gadi, S., Hedrick, T. L., Miller, L. A. (2014). Clap and fling mechanism with interacting porous wings in tiny insect flight. *Journal of Experimental Biology*, 217(21), 3898-3909.

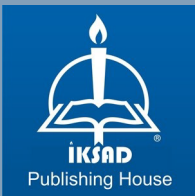
- Sengbusch, P. (2003). Halophytes Botanik online. University of Hamburg
- Sengupta, S., Patra, B., Ray, S., and Majumder, A. L. (2008). Inositol methyl transferase from a halophytic wild rice, *Porteresia coarctata* Roxb. (Tateoka): Regulation of pinitol synthesis under abiotic stress. *Plant Cell Environ.* 30, 1442-1459. doi: 10.1111/j.1365-3040.2008.01850.x.
- Sevgi, B., Leblebici, S. (2023). Tuz stresinin bitkiler üzerindeki etkileri ve geliştirilen tolerans mekanizmaları. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 11(3), 1498-1519. <https://doi.org/10.29130/dubited.1171221>
- Shabala, S. (2013). Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. *Ann. Bot.* 112, 1209-1221. doi:10.1093/aob/mct205
- Shi, H. M. Ishitani, C. Kim, A.D., Zhu, J.K. (2000). The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6896-6901.
- Shi, H., Quintero, F. J, Pardo, J. M., Zhu, J. K. (2002). The putative plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter SOS1 controls long-distance Na<sup>+</sup> transport in plants, *Plant Cell*, 14(2), 465-477.
- Shukla, M., Vineeth, T.V., Chichmalatpure, A.R, Vibhute, S.D. (2023). Halophytes: Classification and Potential Uses. *Just Agriculture*, 3(8), 215-224.
- Singh, M., Kumar, J., Singh, S., Singh, V. P., Prasad, S. M. (2015). Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 14, 407-426. doi: 10.1007/s11157-015-9372-8.
- Skorupa, M., Gołębiewski, M., Kurnik, K., Niedojadło, J., Kęsy, J., Klamkowski, K., Wojcik, K., Treder, W., Tretyn, A., Tyburski, J., (2019). Salt stress vs. salt shock – the case of sugar beet and its halophytic ancestor. *BMC Plant Biol.* 19, 57. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1661-x>.
- Slama, I., Abdelly, C., Bouchereau, A., Flowers, T., Savoure, A. (2015). Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. *Ann. Bot.* 115, 433-447. doi: 10.1093/aob/mcu239.

- Sulpice, R., Tsukaya, H., Nonaka, H., Mustardy, L., Chen, T. H. H., Murata, N. (2003). Enhanced formation of flowers in salt-stressed *Arabidopsis* after genetic engineering of the synthesis of glycinebetaine. *Plant J.* 36, 165-176. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01873.x.
- Szepesi, Á. (2005). Role of salicylic acid pre-treatment on the acclimation of tomato plants to salt-and osmotic stress. *Acta Biologica Szegediensis*, 49(1-2), 123-125.
- Valenzuela, C. E., Miranda, G. S., Holuigue, L., Figueroa, C. R., Figueroa, P. M. (2016). Salt stress response triggers activation of the jasmonate signaling pathway leading to inhibition of cell elongation in *Arabidopsis* primary root. *Journal of Experimental Botany*, 67(14), 4209-4220. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw202>.
- Verbruggen, N., Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35, 753-759. doi: 10.1007/s00726-008-0061-6.
- Vinocur, B., Altman, A. (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr. Opin. Biotech.* 16, 123-132. doi: 10.1016/j.copbio.2005.02.001.
- Wang, F. W., Wang, M. L., Guo, C., Wang, N., Li, X. W., Chen, H. (2016). Cloning and characterization of a novel betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Suaeda corniculata*. *Genet. Mol. Res.* 15:(2). doi: 10.4238/gmr.15027848.
- Wang, H., Liang, L., Liu, B., Huang, D., Liu, S., Runjin, L., Chen, Y. (2020). Arbuscular mycorrhizas regulate photosynthetic capacity and antioxidant defense systems to mediate salt tolerance in maize. *Plants*, 9(11), 1430. <https://doi.org/10.3390/plants9111430>.
- Wei, D., Zhang, W., Wang, C., Meng, Q., Li, G., Chen, T. H. (2017). Genetic engineering of the biosynthesis of glycine betaine leads to alleviate salt-induced potassium efflux and enhances salt tolerance in tomato plants. *Plant Sci.* 257, 74-83. doi: 10.1016/j.plantsci.2017.01.012.
- Wu, L. Y., Ma, Z. M., Fan, X. L., Zhao, T., Liu, Z. H., Huang, X. (2010). The anti-necrosis role of hypoxic preconditioning after acute anoxia is mediated by aldose reductase and sorbitol pathway in PC12 cells. *Cell Stress Chaperon* 15, 387-394. doi: 10.1007/s12192-009-0153-6.

- Youssef, A.M. (2009). Salt tolerance mechanisms in some halophytes from Saudi Arabia and Egypt. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 5, 191-206.
- Yuan, C., Feng, S., Wang, J., Huo, Z., Ji, Q. (2018). Effects of irrigation water salinity on soil salt content distribution, soil physical properties and water use efficiency of maize for seed production in arid Northwest China. *Int. J. Agric. Biol. Eng.*, 11, 137–145. <https://doi.org/10.25165/j.ijabe.20181103.3146>
- Yuan, F., Yang, H., Xue, Y., Kong, D., Ye, R., Li, C. (2014). OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  increases vital for osmosensing in Arabidopsis. *Nature* 514, 367-371. doi: 10.1038/nature13593.
- Zhang, L., Li, Z., Quan, R., Li, G., Wang, R., Huang, R. (2011). An ap2 domain-containing gene, *ese1*, targeted by the ethylene signaling component *ein3* is important for the salt response in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 157(2), 854-865. <https://doi.org/10.1104/pp.111.179028>.
- Zhang, S., Khan, A., Zhao, L., Feng, N., Zheng, D., Shen, X. (2023). Effect of GABA on seed germination and seedling growth of rapeseed under salt stress. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3132215/v1>
- Zhao, P., Rong, C., Xu, P., Wu, J., Mao, J., Chen, Y., Xiang, C. (2017). *Athb17* enhances stress tolerance by coordinating photosynthesis associated nuclear gene and *atsig5* expression in response to abiotic stress. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/srep45492>.







ISBN: 978-625-367-439-7