

MOLEKÜLER BİYOLOJİDE YENİ YAKLAŞIMLAR

EDİTÖR
Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN



İKSAD
Publishing House

MOLEKÜLER BİYOLOJİDE YENİ YAKLAŞIMLAR

EDİTÖR

Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN

YAZARLAR

Prof. Dr. Bala Gür DEDEOĞLU

Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN

Prof. Dr. E. Sümer ARAS

Prof. Dr. İlker BÜYÜK

Prof. Dr. Mehmet Ali ERGÜN

Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Prof. Dr. Pelin MUTLU

Doç. Dr. Damla AMUTKAN MUTLU

Doç. Dr. Nefise AKÇELİK

Doç. Dr. Neslihan BAL

Dr. Öğr. Üyesi Esra GÖKÇE GÜNDÜZER

Dr. Öğr. Üyesi Deniz AŞLAR ÖNER

Dr. Senem NOYAN

Arş. Gör. Recep ÇELİK

Biyolog Sema Nur AĞARAN

Aslıhan AKKAYA

Aybüke OKAY

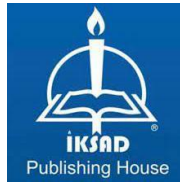
Ezgi ÖZDEMİR

Fatma Zeynep BOZKURT

Gülizar AYDOĞDU

Hussein Abbas LAZİM MALİKİ

Nasrine BEKHEDDA



Copyright © 2025 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 Pubicator: 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 – 2025©

ISBN: 978-625-378-305-1

Cover Design: İbrahim KAYA

September / 2025

Ankara / Türkiye

Size: 16x24cm

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....1

BÖLÜM 1

**MEME KANSERİNDE ÖSTROJEN RESEPTÖRÜ (ER) VE
BÜYÜME SİNYAL YOLAKLARI ARASINDAKİ ÇİFT YÖNLÜ
MOLEKÜLER KARŞILIKLI ETKİLEŞİMİN (CROSSTALK)
VARLIĞI**

Dr. Senem NOYAN , Prof. Dr. Bala Gür DEDEOĞLU.....3

BÖLÜM 2

**KANSER TEDAVİSİNDE YENİ BİR STRATEJİ OLARAK
FERROPTOZ MEKANİZMASINI DÜZENLEYEN
KODLAMAYAN RNA'LARI HEDEFLEYEN KÜÇÜK
MOLEKÜLLER**

Ezgi ÖZDEMİR

Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN.....41

BÖLÜM 3

KANSER TEDAVİSİNDE ZEİN TABANLI NANOTAŞIYICILAR

Aslıhan AKKAYA

Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN.....75

BÖLÜM 4

**MOLEKÜLER BİYOLOJİDE YENİ NESİL GENOMİK
YAKLAŞIMLAR: KLİNİK VE ARAŞTIRMA
PERSPEKTİFLERİ**

Dr. Öğr. Üyesi Deniz AŞLAR ÖNER.....101

BÖLÜM 5

**ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNİN KANSER
ÜZERİNDEKİ ROLÜ**

Gülizar AYDOĞDU.....131

BÖLÜM 6

İKLİM DEĞİŞİKLİĞİ VE EPİGENETİK BİYOBELİRTEÇLER

Dr. Öğr. Üyesi Esra GÖKÇE GÜNDÜZER

Biyolog Sema Nur AĞARAN.....153

BÖLÜM 7

DİYABET, OBEZİTE VE KOMPLİKASYONLARINDA KÖK HÜCRELERİN KULLANIMI VE MOLEKÜLER MEKANİZMALARI

Dr. Öğr. Üyesi Esra GÖKÇE GÜNDÜZER

Hussein Abbas LAZİM MALİKİ.....177

BÖLÜM 8

HÜCRE DIŞINA AÇILAN KAPI: EKSOZOMLARIN BİLEŞENLERİ, BİYOGENEZİ VE İŞLEVSEL ROLÜ

Prof. Dr. İlker BÜYÜK, Aybüke OKAY

Prof. Dr. E. Sümer ARAS.....221

BÖLÜM 9

PRENATAL VE POSTNATAL DÖNEMDE GENETİK TANI: KROMOZOMAL BOZUKLUKLARDAN MOLEKÜLER TESTLERE

Prof. Dr. İlker BÜYÜK, Prof. Dr. Mehmet Ali ERGÜN

Aybüke OKAY, Prof. Dr. E. Sümer ARAS.....265

BÖLÜM 10

***Salmonella* Typhimurium’da AI-2 SENTEZİNDE CsrA’nın DÜZENLEYİCİ ROLÜ**

Doç. Dr. Nefise AKÇELİK, Nasrine BEKHEDDA

Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK.....307

BÖLÜM 11

RNA İNTERFERANS TABANLI NANOTEKNOLOJİK TAŞIYICI SİSTEMLERİN KANSER TEDAVİSİNDEKİ ROLÜ

Fatma Zeynep BOZKURT

Prof. Dr. Pelin MUTLU.....347

BÖLÜM 12

ALZHEİMER HASTALIĞINDA DEĞİŞEN miRNA PROFİLLERİ

Arş. Gör. Recep ÇELİK.....367

BÖLÜM 13

BÖCEKLERLE YAPILMIŞ MOLEKÜLER ÇALIŞMALARA KISA BİR GİRİŞ

Doç. Dr. Damla AMUTKAN MUTLU

Doç. Dr. Neslihan BAL.....377

ÖNSÖZ

Tüm Bilim dallarında olduğu gibi, Moleküler Biyoloji alanında da, son yıllar içerisinde, dikkat çekici ve etkileyici gelişmeler olduğu bilinmektedir. Moleküler Biyoloji temelli çalışmaların bu denli geniş yelpazede gerçekleştirilmesinin temel nedenleri arasında, sonuç odaklı ve detaylı verilere ulaşılmasını sağlayan yeni nesil Moleküler Biyoloji Tekniklerinin geliştirilmesi, Yapay Zeka'nın bu alanda da yaygın şekilde kullanılması olarak sayılabilir. Bu temelden hareketle; Moleküler Biyoloji alanındaki ileri düzeydeki teknikler ile yapılan çalışmalar, Bilim insanlarına, bilimsel bilgilere ulaşma konusunda daha fazla kolaylık ve destek sağladığını da görmekteyiz. Moleküler Biyoloji alanında bulunan farklı disiplinlerin, kendi içinde yapılacak çalışmalarda bilimsel katkı ve etkilerinin daha da artırılması için, bu alanda gerçekleştirilen güncel yeni yaklaşımlara ihtiyacı olması sonucunu doğurmaktadır. Her geçen gün bilim'deki ve özellikle Moleküler Biyoloji alanındaki gelişmeleri takip etmek ve bu alandaki çalışmalara yeni yaklaşım bakış açılarının oluşturulması, bilimin gerekliliği haline gelmesine neden olmaktadır.

Bizde bu bakış açısı ile “Moleküler Biyolojide Yeni Yaklaşımlar” kitabımızda, kendi alanında son derece yetkin ve etkin bilim insanlarının, kendi çalışma alanlarına, Moleküler Biyolojideki yeni yaklaşımları da ekleyerek , güncel ve bilim camiasında kullanılabilecek bir kitap haline getirilmesi hedeflenmektedir. Böylece, bu alanda yada alan dışı bilim insanlarının, Moleküler Biyolojideki yeni yaklaşımlardan haberdar edilmesi ve bu kitap aracılığı ile genç bilim insanlarına kendi çalışma alanları ile ilgili yeni yaklaşımlarının neler olduğunu ortaya koyarak ,bu alandaki araştırmacılara, bu kitabın yol gösterici olabileceği de tarafımızca düşünülmektedir.

Bu kitabın hazırlanma aşamasında, kitap bölümlerinin yazarlıklarını yapan kıymetli bilim insanı akademisyen arkadaşlarıma, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyeleri ve Biyoloji bölümümüz tüm öğrencilerine sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, bu kitabı eşim, çocuklarım, anne ve babama ithaf ettiğimi de belirtmek isterim

Saygılarımla. 15.09.2025

Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN

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

BÖLÜM 1

MEME KANSERİNDE ÖSTROJEN RESEPTÖRÜ (ER) VE BÜYÜME SİNYAL YOLAKLARI ARASINDAKİ ÇİFT YÖNLÜ MOLEKÜLER KARŞILIKLI ETKİLEŞİMİN (CROSSTALK) VARLIĞI

Dr. Senem NOYAN¹, Prof. Dr. Bala Gür DEDEOĞLU²

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.17108942>

¹ Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, Türkiye

² Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, Türkiye

GİRİŞ

Memeli hücreleri çevresel etkilere cevaben farklı fizyolojik amaçları gerçekleştirmek için pek çok sinyal iletim sistemlerini aktif hale getirebilirler (1). Bu esneklik normal hücrelerde doğru biçimde farklılaşma ve çevresel etkilere karşı hayatta kalmak için önemli iken kanser hücrelerinde genellikle anti kanserojenik ilaçlara karşı direnç kazanımını da içeren ilaç direnci ile sonuçlanır.

Meme kanseri tanısı ve terapisindeki son yeniliklere karşın 2020 yılında % 11,7 oranında yeni teşhis edilen kanser türü olarak kadınlarda önemli malignansiler arasında yerini korumakta olup 2023 yılında bu oranın artarak %30 oranında yeni teşhis olacağı öngörülmektedir (2). Meme kanseri heterojenik bir hastalık olup farklı tümör özellikleri farklı tedavi cevaplarını oluşturmaktadır. Son yıllarda moleküler biyoloji temel alınarak yapılan meme kanseri sınıflandırılmasına paralel olarak araştırmacılar tarafından tümör oluşumu, korunması ve yayılmasında yer alan süreçleri kontrol eden sinyal yolları incelenmeye başlanmıştır. Tümör gelişiminde gerekli olan ve sonradan çeşitli düzenlemelerle edinilen özelliklerden olan hücre çoğalmasının sürekliliği, büyüme kontrol mekanizmalarından kaçış, hücre ölümüne direnç, sınırsız çoğalma kapasitesi, genomik dengesizlik, invazyon ve yayılma gibi mekanizmalar değerlendirilmiştir.

Meme kanseri, klasik olarak histopatolojik özellikleri (ER, PR ve HER2 ifade durumları) kullanılarak farklı klinik alt tiplere sınıflandırılmıştır. Hormon reseptör pozitif (HR+), HER2 reseptör pozitif (HER2+) ve her iki reseptör negatif olarak ayrılan bu alt tipler farklı biyolojik davranışlar ve tedavi duyarlılığı göstermektedir.

Östrojen reseptörü (ER) ve büyüme faktör reseptörü (GFR) iletim sistemleri meme kanserinde % 85 oranında hayatta kalım ve büyümeyi kontrol eden ana sinyal iletimleridir (1). Klinik uygulamalarda, ER α ve HER2 varlığı uygulanacak tedavi stratejisini belirlemek amacıyla biyobelirteç olarak onaylanmıştır (3). Meme kanserinin yaklaşık % 70 'inde ER α ifade olur (4) ve ER ifadesini engellemek amacıyla pek çok endokrin terapi geliştirilmiştir (4). HER2+ meme kanserinde GFR sistemini hedef alan ilaçlar geliştirilmiştir. Ancak, özgün sinyal iletim sistemlerini hedef alan terapilerin esas etkisi yeterli olmamıştır. Bu durumu örneklendirmek gerekirse tamoxifen meme kanserinde ölüm oranını üçte bir oranında azaltır ancak tamoxifen tedavisi alan üçte birlik

dilimde yer alan kadınlarda 15 yıl içerisinde hastalık nükseder (4). HER2 sinyal ağının karmaşıklığı ilaç direnci için önemli bir bakış açısı oluşturur. Son on yılda, endokrin terapi alanında hormon reseptör pozitif (HR+) hastalar için önemli gelişmeler sağlanmıştır. 2000 yılında tamoxifen, arimidex gibi ilaçların tek başına ya da birlikte kullanımının yanında anastrozol kullanımının postmenapoz döneminde HR+ hastalarda tamoxifene alternatif oluşturabileceği rapor edilmiştir (5). O zamandan beri, yapılan denemelerde aramotaz inhibitörlerinin yararlı olabileceği gösterilmiştir (6,7).

Östrojen reseptörü (ER) ve büyüme faktör reseptörü sinyal sistemi arasındaki moleküler karşılıklı etkileşim endokrin terapide direnç gelişimine katkı sağlar (8). Östrojen aracılı klasik ER aktivasyonuna ek olarak, büyüme faktörü reseptör sistemleri bileşenleri ile etkileşimi alternatif bir iletim sinyalini başlatır. Bu direnç sistemine karşılık olarak HER2+ ve ER+ vakalarda endokrin terapi ile birlikte trastuzumab, lapatinib gibi anti-HER2 ilaçlarının kullanımı gerçekleştirilmiştir.

Diğer bir büyüme faktör sinyal sistemi olan insulin büyüme faktörü (IGF) yolağı ile ER arasında da benzer bir durum söz konusudur. IGF, ER sinyalini etkinleştirir ve endokrin terapiye direnç gelişimine katkı sağlar (9). IGF sistemi 4 tip reseptör, 3 ligand ve 6 adet ligand bağlayıcı proteinden oluşur: insulin reseptör (IR), IGF reseptör tip 1 (IGF1R), IR ve IGF1R arasındaki hibrit reseptörler ile IGF-1, IGF-2 ve insulin ve ligand bağlayıcı proteinler (IGFBP-1/IGFBP-6). Tümör büyüebilmek amacıyla insulin ve IGF-1 reseptörlerini ifade eder ve bu reseptörler PI3K/Akt ve MAPK sinyal yollarını etkinleştirir. Meme kanseri hücrelerinde IGF1R iletim sisteminin inhibisyonu proliferasyonun durdurulması ve apoptozun uyarılması ile sonuçlanır (10). Bu bulgular eşliğinde IGF1R ve ER yollarını hedef alan stratejilerin birlikte kullanımı endokrin terapilere direnç oluşumunu geciktirebileceği ya da bu dirençten koruyabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır.

Östrojen Reseptörü (ER)

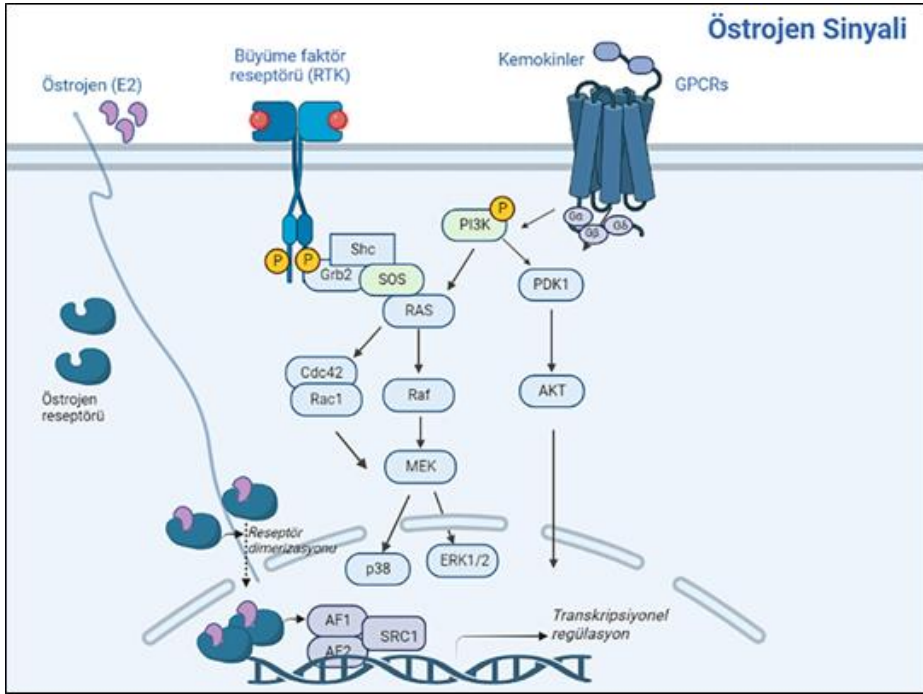
Meme kanseri hastalarının çoğunun ölüm hızı tümörlerin östrojen reseptörü taşıması ile ilişkilidir (11). Hücre çoğalması ve büyümesi gibi pek çok hücre fonksiyonu destekleyen ligand düzenleyici transkripsiyon faktörlerinden olan östrojen reseptörü, *ESR1* geni tarafından kodlanan ER α ve *ESR2* geni ile ifade olan ER β olmak üzere iki farklı reseptörden oluşur (12,13).

Steroid hormon olan östradiol (E2) ER α ve ER β 'nın başlıca ligandıdır ve normal koşullarda hücre çoğalması ve farklılaşmasını kontrol eder (14). Östradiol ile etkinlik kazanan ER α , hücre çoğalması ve apoptozdan kaçış uyarımında önemli rol oynamaktadır (15). Östradiolun biyolojik etkisi hem çekirdekte genomik transkripsiyonel etki aracılığıyla hem de ER α ile çekirdek dışında genomik olmayan etkileşim ile gerçekleşir.

ER sinyal iletim sistemi

ER⁺ meme kanseri hücrelerinde, östrojen genomik ya da genomik olmayan ER aktivitesi ile hücre büyümesi ve hayatta kalımı düzenler. Bu durum ER α ve ER β 'yı içeren iki tip nüklear reseptör ve GPR-30 olarak da bilinen GPER (G protein coupled receptor) ile sağlanır (4,16). Östrojen reseptörleri arasında, ER α meme malignitelere katkı sağlayan temel oyuncudur. Meme dokusunda ER β , ER α ile birlikte ifade edilme eğilimindedir ve ER α 'nın hücre büyümesindeki fonksiyonunu baskılar (4,17). Östrojenin hızlı sinyal iletimi ER α ve ER β 'yı içeren membran östrojen reseptörleri ile alakalıdır. 1990'ların ortalarında birçok laboratuvar birbirinden bağımsız olarak vasküler ve kanser hücrelerinden klonladıkları ve GPR30 adı verilen "G protein coupled" reseptörü raporlamıştır. 2005 yılında GPR30 östrojen bağlayıcı hücre içi membran proteini olarak tanımlanmıştır. Plazma membranında yer alan GPER, östrojeni bağlar ve erken östrojen sinyalinin oluşmasını sağlar (18). Pek çok çalışma GPER'in meme kanserinde hücre büyümesi ve migrasyonunu desteklediğini savunmaktadır (Şekil 1) (19,20). Bununla birlikte, GPR30 fonksiyonu hala tartışma konusudur ve aydınlatılmaya ihtiyaç duymaktadır. Bu noktada temel olarak ER α fonksiyonuna odaklanacağız.

ER α , 66 kDa ağırlığında olup DNA bağlanma domaini ve iki transkripsiyonel aktivatör domain (AF1, AF2) içeren ligand bağlı nüklear reseptörü kodlar (21). AF1 östrojen bağımsızdır ve büyüme hormonları aracılığıyla fosforile olarak aktive olurken; AF2 östrojeni bağlayan bölgeyi içerir ve ligand bağlanması ile etkinleşir (22). ER α nüklear lokalizasyon sinyali ve nüklear taşıma sinyali içermesi sebebiyle çekirdek içinde ve dışında fonksiyon gösterir. Çekirdekte yer almasına ek olarak ER α plazma membranında, sitoplazmada ve mitokondride bulunmaktadır (23,24).



Şekil 1. Östrojen sinyal iletim sistemi.

ER α fonksiyonu iki kısımda sınıflandırılır: genomik ve genomik olmayan yol. Klasik genomik ER transkripsiyon mekanizmasında, ER α reseptörüne E2 bağlandığında reseptörün konfirmasyonu değişir. Aktif ER dimerize olur ve dimer direkt ya da dolaylı olarak östrojen yanıt elementlerine (ERE) bağlanarak hücre çoğalması ve devamlılığında yer alan genleri hedef alır (25).

ER pozitif meme kanseri tedavisinde aromataz inhibitörleri ya da anti-östrojen etkisi gösteren moleküller ile E2 sentezinin kapatılması ilk seçenek olmasına rağmen yaygın olarak hormonal terapiye karşı direnç oluşur ve hücre bu direnci IGF1R ve EGFR/HER2 reseptör fonksiyonunu artırarak yansıtır (26). ER, AP-1 (aktivatör protein-1), SP-1 (spesifik protein -1), NF- κ B gibi diğer transkripsiyon faktörleri ile bağlanarak gen ifadesini sağlamaktadır. Bu alternatif genomik yolak, klasik olmayan ER genomik yolağı olarak bilinir. ER bu yol aracılığıyla birçok reseptör tirozin kinaz (RTK) (örneğin HER2, IGF1R) ve MAPK ya da AKT gibi downstream sinyal yolları ile hızlı etkileşime girmekte ve hücrenin devamlılığı sağlanmaktadır.

ER ve diğer sinyal iletim molekülleri arasındaki etkileşim ER α 'nın lokalizasyonunu ve aktivitesini düzenler (27). ER α ve sinyal yolağındaki diğer elemanların transkripsiyon sonrası modifikasyonları (fosforilasyon, metilasyon gibi), ER ve diğer sinyal sistemleri arasındaki karşılıklı etkileşimin dinamiğini değiştirir. 66 kDa ağırlığındaki ER α (ER α -66)'ya ek olarak, ER "alternative splicing" mekanizması ve farklı bir promotör kullanarak 36 kDa ağırlığında (ER α -36) başka bir variantı kodlar. ER α -36, DNA bağlanma bölgesi ve ligand bağlanma bölgesi içerirken transaktivasyon domainlerini içermemektedir (28). ER α -36 genellikle plazma membranında ve sitoplazmada yer alır ve genomik olmayan yol ile fonksiyon gösterir (28). ER α -66'nın antagonist olması sebebiyle endokrin terapide ilaç direnci mekanizmalarından birini oluşturur.

ER 'yi hedefleyen terapiler

Östrojen reseptör alfa (ER α), meme kanserinin dörtte üçünde ifade göstermektedir. Östrojen tümör başlangıcında ve ilerlemesinde temel hormon ve aynı zamanda ligandır. ER α biyolojisindeki anlaşılır gelişme akılcı tasarımların ve kadınlarda farklı klinik seyir izleyen ve ER α ifadesi olan tümörlerde östrojenik sinyalleri çeşitli düzeylerde durdurabilen farmakolojik ajanların oluşmasına katkı sağlamıştır. Meme kanserine neden olan kesin mekanizma tam olarak tespit edilmemesine rağmen hormonların vakaların %70'inde belirleyici rolü olduğu kabul edilmiştir (29) ve şu anki kemoprevensiyon stratejileri meme kanserinde hormon cevaplarını hedef almaktadır. Östrojen meme dokusunda normal ve malignant hücrelerin proliferasyonunda hücre bölünmesini düzenleyici olarak belirlenmiştir (30). Antiöstrojenik ilaçlarda iki temel sınıf olan SERM (seçici östrojen reseptör modülatörü) ve AI (Aromataz inhibitörü) günümüzde meme kanseri tedavisinde kullanılmaktadır.

Tamoxifen sitrat (TAM) ilk geliştirilen SERM olup östrojen reseptörüne (ER) bağlanan östrojen ile yarışır (31). TAM, 30 yılı aşkın bir süredir klinikte meme kanseri tedavisinde tekrarlama ve kontralateral neoplazide riski azaltmak amacıyla kullanılmaktadır. İnvaziv ve non-invaziv meme kanserlerinde görülen risk azalması tamoxifen'in 1998 yılında "US Food and Drug Administration (FDA)" kurumu onayı ile sonuçlanmıştır.

Meme dokusunda yüksek östrojen seviyesinin yanı sıra yüksek aromataz seviyesinin de meme kanseri riskini artırdığı bilinmektedir. Bu nedenle

aromataz inhibisyonunun östrojen üretimi ve östrojen ilişkili meme karsinogenezinde azalma yaratması beklenir. Klinik denemelerde test edilen pek çok antiöstrojenik ajan, endokrin yolağını ve ER(+) meme kanseri gelişimini baskılar. Bu grup ajanların tüm meme kanserinde %20-30 oranında görülen ve kötü prognoz gösteren ER(-) meme kanserinde etkileri yoktur. Bu nedenle, bu alt tipin tedavisinde ve korumada yeni yolakların, biyobelirteçlerin ve ajanların belirlenmesi değerlidir.

Fulvestrant diğer bir östrojen antagonistidir ve aynı zamanda “pure” anti-östrojen olarak anılmaktadır. Fulvestrant, AI ve tamoxifen gibi endokrin terapilere cevap vermeyen ilerlemiş metastatik meme kanseri vakalarında kullanılmaktadır (32). Fulvestrant ve sitoplazmadaki ER α etkileşimi ER α ’nın degradasyonu ile sonuçlanır.

İnsan epidermal büyüme hormon faktör reseptörü – 2 (HER2)

Normal ve kanserli hücrelerde hücrel resöptörler, sinyallerin hücre dışından hücre içine iletiminden sorumludur. Bu sinyallerin büyüme, proliferasyon, sağkalım gibi birçok etkileri vardır. Reseptör aktivasyonu ve sinyaller normal hücrelerde sıkıca regüle edilir. HER (ErbB) ailesi sinyal yolunun zamansız aktive edildiği durum kanser hücrelerinin büyüme ve yayılmasıyla sonuçlanmaktadır.

HER ailesi reseptör yapısı, hücre yüzeyinde ekstrasellüler domain, transmembran domain ve intrasellüler domain şeklinde olup reseptör domainlerinin her biri HER sinyal yolunda farklı işlevlerden sorumludur. Ekstrasellüler domain ligand bağlamakta, intrasellüler domain ise tirozin kinaz aktivitesine sahip ve reseptör altında yer alan sinyal yolunu aktive etmektedir. HER (ErbB) birbiri ile yakın ilişkili 4 reseptörden oluşan bir ailedir. EGFR (erbB1), HER2/neu (erbB2), HER3 (erbB3) ve HER4 (erbB4) tirozin kinaz aktivitesini kullanarak hücre bölünmesi ve apoptoz inhibisyonu, metastaz gibi tümör büyümesini sağlayan süreçlere katkı sağlar. Bu özellikleri ile kanser tedavisinde ve korumasında etkili ajanlardır. Bloklanabilen erbB sinyal yolağının meme kanseri tedavisinde ve kanserden korunmada umut verici olabileceği düşünülmektedir.

Meme kanserinde hücre çoğalmasının sürekliliğini sağlayan mekanizmalardan biri de HER2 sinyal yolağıdır. *HER2 (ErbB2)* geni aşırı ekspresyonunun meme kanserinde görülme sıklığı %25-30 dur. HER2, HER

ailesine ait membran reseptörü olup homo ya da heterodimer oluşumu ile tirozin kinaz fonksiyonunu aktif hale getirir. Bu reseptör 3 temel sinyal yoloğunun aktifleşmesinde rol alır: Ras/Raf/MAPK, JAK/Stat ve PI3K/Akt/mTOR (33). Bu üç yolak büyüme ve hücrenin varlığını sürdürmesi, çoğalma, bölünme, metabolizma ve yayılması gibi hücresel fonksiyonlar içerir.

HER1-4 ailesi ve diğer tirozin kinaz reseptörleri

HER2 (ErbB2- HER2/neu) ‘nin aşırı ifadesi invaziv hücre büyümesi ve kötü prognoz ile ilişkilidir (34). HER2, hücre dışı sinyalleri algılayarak (büyüme faktörleri gibi) hücre büyümesi ve hayatta kalım sürecinde yer alan sinyalleri aktifleştiren transmembran tirozin kinaz reseptörünü (RTK) kodlar. Tirozin kinaz reseptör ailesi hücre dışı ligand bağlayıcı domain, transmembran domain ve fonksiyonel bir hücre içi kinaz domaininden oluşur. HER ailesinin diğer üyeleri olan HER1 (EGFR), HER3 ve HER4 ile birlikte HER2 hücre büyümesi, apoptozun baskılanması, hücresel adezyon ve migrasyonun artışı ve anjiyogenezin desteklenmesini kontrol eder. HER ailesi içinden HER2, ligand bağlanma domainini yitirmiştir ve sinyalin algılanması dimerizasyon partnerine bağlıdır. Ayrıca HER3 ‘ün hücre içi kinaz domainin olmaması sebebiyle bu reseptörün aktivasyonu homo/heterodimer yaptığı diğer reseptörlere bağlıdır (35,36).

HER2-HER3 heterodimeri HER2+ meme kanserinde hücre büyümesi ve angiojenezde baskın rol almaktadır (37). HER2 ve HER3 ‘ün aşırı ifadesi meme kanseri vakalarından alınan örnekler ile koreledir (38). HER1 fonksiyonunun meme kanserinden ziyade akciğer kanseri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. HER1, HER2 ve HER3 ‘ün aksine HER4 meme kanserinde iyi prognoz ile ilişkilidir (39).

ErbB ailesi pek çok farklı liganda bağlanır (Tablo 1). Örneğin; Heregulinler EGF ailesinin üyeleri arasında olup Heregulin 1–4, dört farklı gen tarafından kodlanır. Heregulin 1 ve 2 Erbb3 (HER3) ile etkileşime girer. ErbB ailesi ligandlarının öncül formları membran bağlıdır ve hücre dışı kısımları ADAM (a disintegrin and metalloprotease) ailesi üyeleri tarafından proteolitik kesime uğrarlar (40). Bu ailenin en belirgin üyeleri ADAM10 ve ADAM17’dir (41). Bazı ligandlar özgün reseptör altı cevaplar ile ilişkilidir. Örneğin; EGF’nin bağlanması hücre büyümesini tetiklerken (42), betacellucin hücre büyümesi ve farklılaşmasını düzenler (43). Son zamanlarda yapılan

çalışmalardan biri, peptidaz D olarak da bilinen prolidaz'ın HER2 ligandı olabileceğini önermektedir. İmmunoprespitasyon yöntemiyle prolidaz'ın tercihen var olan HER2 homodimerine bağlandığı ve HER2 ile Src ilişkisini yıkararak HER2 altında yer alan sinyal iletimini blokladığı ortaya çıkarılmıştır (44).

Tablo 1. ErbB tirozin kinaz ailesinin ligandları.

Ligand	HER2	EGFR	HER3	HER4
TGF α	–	✓	–	–
Amphiregulin (AR, AREG)	–	✓	–	–
EGF	–	✓	–	–
Betacellucin (BTC)	–	✓	–	–
Heparin binding EGF like growth factor	–	✓	–	–
Epigen (EPG)	–	✓	–	–
Epiregulin (EPR)	–	✓	–	–
Heragulin	–	–	1 ve 2	1,2,3,4

Yağ hücrelerinden türemiş olan peptid hormon olarak bilinen leptin reseptörünün (Ob-R) insan embriyonik böbrek hücrelerinde (HEK-293T) dolaylı olarak JAK2 aracılığıyla HER2'yi fosforladığı ve RAS sinyal iletimini başlattığı gösterilmiştir (45). Leptin aracılığıyla HER2'in fosforlanması ve bu duruma cevap olarak hücre büyümesindeki artış meme kanseri hücre hattı olan MCF7 ve SKBR3 hücrelerinde de gözlenmiştir (46). Diğer bir HER2 ko-reseptörü ise hücre dışı N-terminal ve membran bağlı C-terminal ucunun heterodimeri ile oluşan MUC1'dir. Muc1 diğer kanser tipleriyle birlikte meme kanserinde de aşırı ifade edilir (47). MUC1-C terminal alt ünitesi (MUC1-C) EGFR, HER2 ve diğer reseptör tirozin kinazlar ile etkileşim halindedir. MUC1 ve HER2 kompleksindeki artış heregulin aracılığıyla uyarıldığını gösterir ve γ -catenin ile MUC1-C'nin translokasyonu sonucunda MUC1-C çekirdeğe ulaşır. Bu nedenle, meme kanserinde HER2'nin aşırı ifadesi çekidekte MUC1-C ve γ -catenin seviyelerinin artışı ile ilişkili olması şaşırtıcı değildir. Tümör hücrelerinde, protein kinaz sentezinin artması da onkojenik transformasyonda etkili olmaktadır. Örneğin; meme karsinomalarında da HER2/neu sentezi artmaktadır. Son yıllarda hız kazanan hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarında tümör hücresi büyüme faktörü reseptörlerini bloke eden monoklonal antikolar (örneğin, Herceptin, Pertuzumab) veya doğrudan tirozin kinaz aktivitesini

inhibe eden ilaçlar (örneğin, Imatinib, Lapatinib) ile klinik çalışmalar yürütülmektedir.

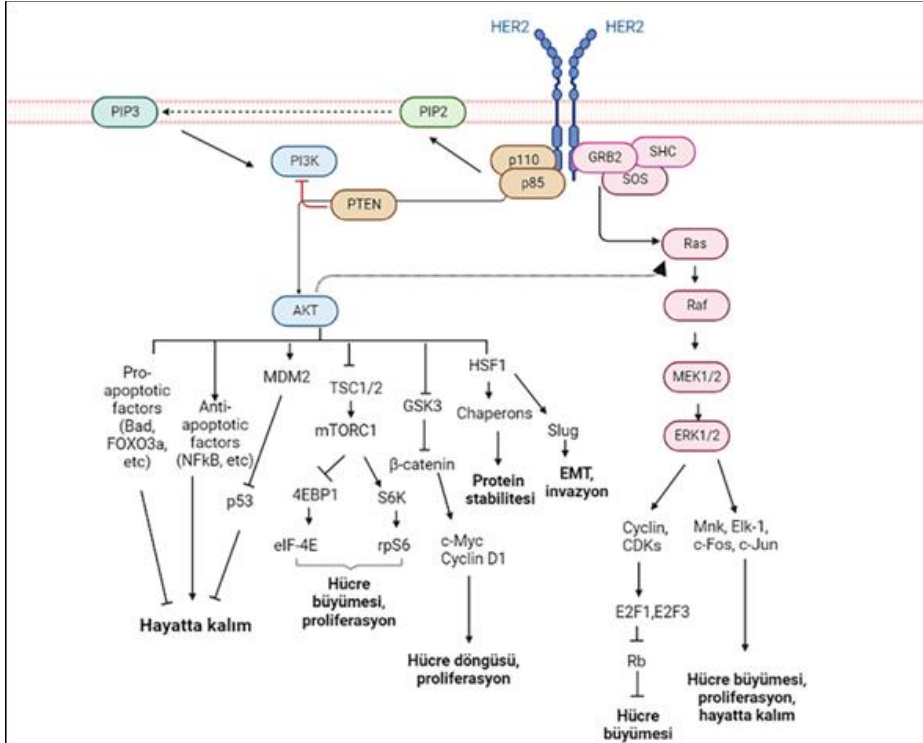
HER2 sinyal iletim sistemi

HER sinyal iletim sisteminin altında PI3K/Akt/mTOR ve RAS/RAF/MEK/ERK olmak üzere iki temel sinyal yolağı yer almaktadır. Yakın olan reseptörler tirozin kinaz aktivasyonu ile C- terminal tirozinin fosforlanmasını sağlarlar. HER2'nin sitoplazmik domain içerisinde sayısız fosforilasyon bölgesi mevcuttur. En yaygın olarak üzerinde çalışılan fosforilasyon bölgeleri RAS/MAPK sinyal yolağını aktive eden tirozin (Tyr) 1139, 1222 ve 1248 'dir. Bu bölgelerin yanında Tyr1196 ise PI3K/Akt sistemini etkinleştirir (48). HER2'nin yeni bulunan bölgeleri ile birlikte fosforilasyon durumu anti-HER2 ilaçlarıyla yapılan tedaviye verilen cevabı değiştirmesi ilginç bir not olarak verilebilir.

HER2'nin fosforilasyonu ile aktive olan önemli sinyal iletim sistemlerinden biri RAS/MAPK yolağıdır (Şekil 2) (49). Bu sistem meme kanserinde hücre büyümesi, proliferasyon, migrasyon gibi hücresel süreçlerle bağlantılıdır (50,51). Bu yolakta ilk basamak, GRB2 proteinin fosforile HER2'in C-terminal bölgesine bağlanmasıdır. GRB2 bağlandığında adaptör protein SOS etkinleşir ve RAS üzerinde GDP'nin GTP'ye dönüşmesi ile RAS aktif hale geçer. Aktif RAS, ERK1 ve ERK2'nin aktivasyonu ve fosforilasyonunu başlatır (52,53). ERK proteinlerinin aktivasyonu Elk-1, c-Fos, c-Jun gibi pek çok transkripsiyon faktörünün fosforlanmasına yol açar. Bu transkripsiyon faktörleri hücre büyümesi, farklılaşması, proliferasyonu, hayatta kalım ve migrasyonu içeren genlerin ifadesinin düzenlenmesini sağlar (52,54,55).

HER2 dimerizasyonu ile aktif hale gelen ikinci iletim sistemi PI3K/Akt yolağıdır. PI3K/Akt/mTOR sinyali protein sentezi, hücre büyümesi, hayatta kalımı ve hücresel metaboizmada kritik rol oynar (35). Aynı zamanda meme kanseri endokrin direncine yol açar. HER sinyal sisteminin aktivasyonu PI3K'nın düzenleyici alt ünitesi olan p85 ve katalitik alt ünitesi p110 aracılığıyla algılanır (56) (Şekil 2). Katalitik alt ünite sırasıyla *PIK3CA*, *PIK3CB* ve *PIK3CD* tarafından kodlanan p110 α , p110 β ve p110 δ isoformlarına sahiptir. *PIK3A* mutasyonları meme kanserinde sık görülen bir durumdur (35). PI3K PTEN ve fosfotazlar tarafından baskılanan serin/treonin kinaz AKT 'ı

fosforlar (35,56,57). Meme kanseri malignansisinde PTEN kaybı diğer sık görülen durumdur. PI3K ve AKT altında serin/treonin kinaz olan mTOR çalışır (58). Katalitik kinaz alt ünitesinin fonksiyonu ile hücre metabolizması, büyümesi ve hayatta kalım süreçlerinde mTOR rol alır.



Şekil 2. HER2 sinyal iletim sistemi. HER2 fosforilasyonu ile aktive olan PI3K ve MAPK yolları gösterilmiştir.

HER2'yi hedefleyen terapiler

HER2 (ErbB2) gen amplifikasyonu ve aşırı ifadesi ile ilişkili olarak artan protein seviyesi meme kanseri içerisinde %15-20 civarında görülür ve genellikle HER2 negatif tümörler ile kıyaslandığında kötü prognoz ile koreledir (59). HER2 kanser yolağını hedefleyen araştırmalar ile terapilerde gelişme sağlanmıştır. Trastuzumab (Herceptin, Genentech Inc. San Francisco) HER2 proteininin ekstraselüler domainine'e karşı hazırlanan rekombinant monoklonal bir antikordur. Trastuzumab halen metastatik meme kanseri (MBC) tedavisinde HER2 odaklı terapide kullanılan FDA onaylı ilaçtır.

Normal hücrelerde aktivasyon süreci sıkı şekilde kontrol edilmektedir (reseptör internalizasyonu gibi) ve böylece hücre büyümesi kontrol altında tutulmaktadır. Kanserde HER reseptörleri kontrolsüz aktive olmakta, böylece kontrol edilemeyen hücre büyümesi ve tümör hücrelerinin yayılımı gerçekleşmektedir. HER reseptörlerinin fazla ifade edilmesi veya hücre yüzeyinde fazla reseptörün varlığı sinyallerin artmasına neden olmaktadır. Genetik mutasyonlar da HER reseptör üretimine yol açabilir ve hatta reseptörü ligand bağlanmaksızın aktive edebilir. Pertuzumab (Perjeta, Genentech) diğer bir FDA onaylı monoklonal antikor olup HER2 hücre dışı ligand domaine bağlanır ve ligand bağımlı HER2-HER3 dimerizasyonunu durdurur (60,61). Lapatinib (Tykerb, GlaxoSmithKline) seçici ve geri dönüşümlü HER1 ve HER2 tirozin kinaz inhibitörüdür. Lapatinib uygulaması HER1, HER2 ve HER3'ün fosforilasyonunu engeller böylece AKT ve ERK aktivasyonu durdurulmuş olur (62). Lapatinib, HER2'yi ubiquitinasyondan korur, böylece HER2 hücre membranında birikir ve homodimerizasyonu ile aktivasyonu engellenmiş olur.

İnsülin benzeri büyüme faktörü reseptör tip 1 (IGF1R)

İnsülin benzeri büyüme faktörü reseptör tip 1 (IGF1R) tirozin kinaz reseptörü olup insülin reseptörü (IR) ile % 70 homoloji gösterir. Bu yüksek homolojiye rağmen IGF1R'nin IR'den ayrılan özgün karakteristik özellikleri ile farklı bir reseptör olduğu ortaya çıkmıştır (26). Özellikle kanser biyolojisinde, IGF1R'nin IR'den farklı ve önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. İki reseptör arasındaki farklılıkları basitleştirmek gerekirse; IGF1R'nin mitoz, transformasyon ve apoptozdan kaçışta baskın reseptör olduğu söylenebilir. Ayrıca IGF1R hücre adezyonunda ve hayatta kalımında rol oynar (63).

IGF1R iletim sistemi

IGF sistemi hem mitotik ve hem de göç edebilme özelliğine sahiptir ve malignitelerin yanında normal gelişimde de önemli rol oynar (64). IGF sinyal sisteminin bileşenlerinin ifadesi ve aktivasyonu anjiyogenez, proliferasyon, metaztaz ve apoptoz direncine katkı sağlar (65). Bu özellikleri nedeniyle, IGF sistemi ilgi çekici terapötik hedef haline gelir (66,67). IGF sistemi insülin

reseptörü (IR) ve IGF reseptör tip I (IGF1R) ve IGF-I, IGF-II ve insulin ligandlarını içeren iki yakın ilişkili reseptörden oluşur.

IGF1R ligand bağlayıcı ve hücre içi tirozin kinaz domain içeren iki transmembran β alt üniteden ve iki hücre dışı α alt üniteden oluşur. $\alpha\beta$ zincirleri disülfid bağları ile bağlanır ve dimer oluşturur. Ligand (IGF-I, IGF-II) β alt ünitelerinin konformasyonun değişimine ve kendini fosforlaması ile sonuçlanan tirozin kinaz aktivitesinin başlamasına neden olan hücre dışı α alt ünitesine bağlandığında IGF1R 'nin aktivasyonu başlar. Zincirler arası fosforilasyon IRS-1 ve IRS-2'de içeren sayısız "docking" proteinin aktivasyonuna ve güçlendirilmesine olanak sağlar. Bu proteinler IGF1R sinyalinin hücre içine taşınmasını sağlayacak fosforilasyon akışını başlatır. PI3K'nın aktivasyonu ile başlatılmış IRS-1 mTOR aktivasyonu aracılığıyla protein sentezinin artırmasını sağlayan Akt'ın fosforilasyonuna neden olur. Ek olarak, Akt fosforilasyonu apoptozdan korunma ile sonuçlanan BAD fosforilasyonuna ve inaktivasyonuna sebep olur. Paralel biçimde, IRS-1 ya da Shc'nin fosforilasyonu Ras'ın aktivasyonuna ve Raf-1/MEK/ERK yolağının başlamasına neden olan Grb2/SOS'u kuvvetlendirir. IR/IGF1R hibrid reseptörü benzer şekilde IGF1R reseptörü işaret eder ve kanserleşme sürecine katkı sağlar (68). IR'nin alternatif spliced versiyonu olan IR-A bağlanır ve IGF-II aracılığıyla aktif hale gelir (69). Son yıllarda, IGF ligandlarının her iki izoforma da bağlanabildiği gösterilmiştir (70).

ER ve büyüme faktörleri arasındaki karşılıklı etkileşim (crosstalk)

Meme kanserinde hücre çoğalması ve varlığını sürdürmesinde ER ve HER2 sinyal yolları baskın rol almaktadır. Bu nedenle bu sinyal yollarını hedef alan terapiler etkin olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte hem endokrin hem de anti-HER2 terapilerine karşı oluşan direnç temel klinik sorunlardan biridir. ER ve HER2 sinyal yolları arasındaki çift yönlü moleküler karşılıklı etkileşim varlığı ilgi uyandırmaktadır.

Son zamanlarda HER sinyal yolağını etkin şekilde kapatabilen ilaçlar klinik uygulamalarda yerini almaktadır. Monoklonal antikorlar olarak bilinen bu ilaçlardan FDA onaylı olanlar trastuzumab, pertuzumab, trastuzumab emtasin'dir (T-DM1). Bu ajanların etkinliğine rağmen HER2+ tümörlerde HER sinyal yoloğının yeniden aktif olması ya da alternatif kaçış yollarının etkin

hale gelmesi ile direnç oluşmaktadır. Klinik öncesi ve klinik çalışmalarla meme kanserinde ER ve HER2 ifadesi arasında ters etki olduğu gösterilmiştir (71). Meme kanserinde klinik öncesi modellerde HER2'nin HER sinyalindeki blokajı ile ER seviyesinin arttığı gösterilmiştir (72).

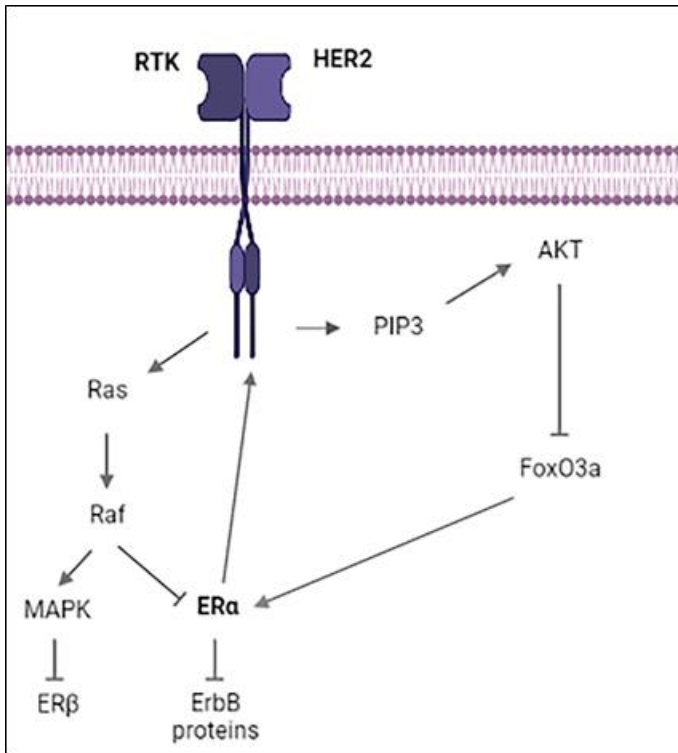
Çoğu zaman HER2 diğer RTK'lar ile heterodimer oluşturur, bu nedenle HER2 sinyal yolağı EGFR, HER3 ve HER4 yolaklarından tam olarak ayrılamaz. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, HER2'nin Mucin 1 ve Leptin reseptörü ile de etkileşime girdiği gösterilmiştir (73). Ek olarak, ER, Androjen reseptör (AR) gibi hormon reseptörleri ile karşılıklı etkileşimi gözlemlenmiştir (72,74,75) ve bu durumun meme kanserinde tedaviye karşı direnç oluşumuyla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür. Bazı çalışmalar meme kanserinde ER α 'nın IGF1R'ye bağlanarak sinyal iletimini aktifleştirmesiyle büyüme faktör yolları ile çekirdek dışında bulunan ER α arasında mekanik bir bağlantı olduğunu tahmin etmektedir (15). IGF1R hücre farklılaşması ve çoğalmasını içeren hücresel işlemlerde önemli bir sinyal yolağıdır (26). EGFR tip 1 reseptör tirozin kinaz olup apoptozdan korunma, yayılma ve hücre çoğalması gibi biyolojik süreçlerde yer alır (76). İlginç biçimde hem IGF1R ve hem de EGFR MAPK/Akt 'ın etkin olduğu ortak bir alt sinyal yolağını başlatırlar. Estradiol'un meme kanserinde IGF1R, EGFR ve MAPK içinde bulunduğu pek çok sinyal molekülünü hızlıca aktif hale getirdiği bilinmektedir (77). Ek olarak büyüme faktör reseptörleri, intraselüler proteinler ve sitoplazma ya da çekirdekte bulunan steroidler arasındaki karşılıklı etkileşim kanser hücre büyümesini düzenler (78). Genomik olmayan ER α etkisi ve büyüme faktörü reseptör iletimi arasındaki karşılıklı etkileşim endokrin direnç oluşma mekanizmalarından biridir (79). ER'nin genomik olmayan transaktivasyonunda AP-1 ko-aktivatörü görev alır ve ER'yi aktif hale getirerek IGF1R iletim sistemini tetikler ve bu iletim sistemi altında yer alan MAPK ve Akt yolları açılır.

Östrojen Reseptörü (ER) ve HER2 arasındaki crosstalk

Östrojen reseptörü (ER) meme tümörlerinin %60'ından fazlasında ifade edilir (80). Meme tümörlerinde HER2 ve ER ifadesinin birlikte ifade profili gösterdiği durum düşük olmasından dolayı, genelde HER2 ve ER arasında ters korelasyon olduğu gözlenmiştir (71). İki östrojen reseptörü olan ER α ve ER β , nükleer reseptörler ve ligand bağlı transkripsiyon faktörleridir (21,81). ER α 'nın

meme kanseri hücrelerinin proliferasyonu ve hayatta kalımını sağladığı gösterilmişken (72) ER β 'nın bu fonksiyonları durdurduğu belirtilmiştir (82,83). HER2 sinyal iletim sisteminin ER ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Şekil 3). *In vitro* hücre kültürü çalışmalarında, HER2 ya da EGFR aracılı MAPK aktivasyonunun ER α ifadesini baskıladığı gösterilmiştir (84,85). HER2/PI3K sinyal sisteminin aktifleşmesinin ardından FoxO3a Akt aracılı fosforlanır ve inaktif hale geçer ve çekirdek dışına çıkar. ER α gen ifadesi direkt olarak FoxO3a aracılığıyla kontrol edilir. Ek olarak, yapılan “knockdown” deneyleri ile AKT3'ün yok olmasının ER α protein ifadesini teşvik ettiğini göstermişlerdir (86).

Ligand bağlanması sonrasında, ER α ErbB protein ailesini direkt ya da dolaylı olarak aktive edebilir ya da RTK ifadesini azaltabilir (72). Bu etkileşim hücrelerin HER2/ER değişimi yoluyla tek tip ilaç kullanımı sonrası oluşan direncin muhtemel nedenine işaret eder (72).



Şekil 3. ER ve HER2 sinyalleri arasındaki karşılıklı etkileşim (crosstalk).

İnsulin benzeri büyüme faktörü reseptör tip 1 (IGF1R) ile ER ve HER2 arasındaki karşılıklı etkileşim

Kanser ve insulin benzeri büyüme faktör -1 reseptörü (IGF1R) arasındaki ilk ilişki 20 yıl öncesine dayanır. Meme tümörlerinde IGF1R'nin aşırı ifadesi % 87 civarındadır (87). Farklı pek çok çalışma, IGF1R hücre büyümesi, invazyon ve metastaz üzerinde düzenleyici etkisi olduğunu belirtmiştir (88). Çok yakın geçmişte, ilaç direnci vasıtasıyla HER2 ve IGF1R arasında karşılıklı etkileşim varlığı gösterilmiştir. HER2'den bağımsız olarak, IGF1R PI3K/Akt sinyal yolağını aktive eder ve hücre prliferasyonunu sağlar. Her iki reseptörden birinin hedeflenmesi diğerinin aktivasyonunun artmasına neden olduğu gözlenmiştir (89). Trastuzumab dirençli meme kanseri hücre hatlarında IGF1R ve HER2 ya da IGF1R ve HER2 / HER3 heterodimerizasyonu görülmüştür (90). Karışıklığın diğer bir kısmı ise, Worthington ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada vurgulanmıştır. Çalışmada, HER2'in IGF-1'in salgılanmasını artıran IGF bağlayıcı protein 3 (IGFBP3)'ün ifadesini azalttığı ve böylece IGF1R sinyal iletim sistemini indüklediği gözlenmiştir (91).

Meme kanseri hücrelerinde östrojenin proliferatif etkisi ER'ın büyüme faktör sinyal sistemi bileşenlerinin ifadesinin düzenlenmesine katkı sağlayabilir. Çalışmalar tamoxifen gibi anti-östrojenlerin IGF aracılı büyümeyi engellediğini ve anti-IGF stratejilerinin östrojen aracılı büyümeyi durdurabileceğini göstermiştir. Pek çok çalışmada östrojenin IGF sinyal sisteminde etkili olduğunu ve IGF sinyalinin östrojen varlığına duyarlı olduğunu bildirilmiştir.

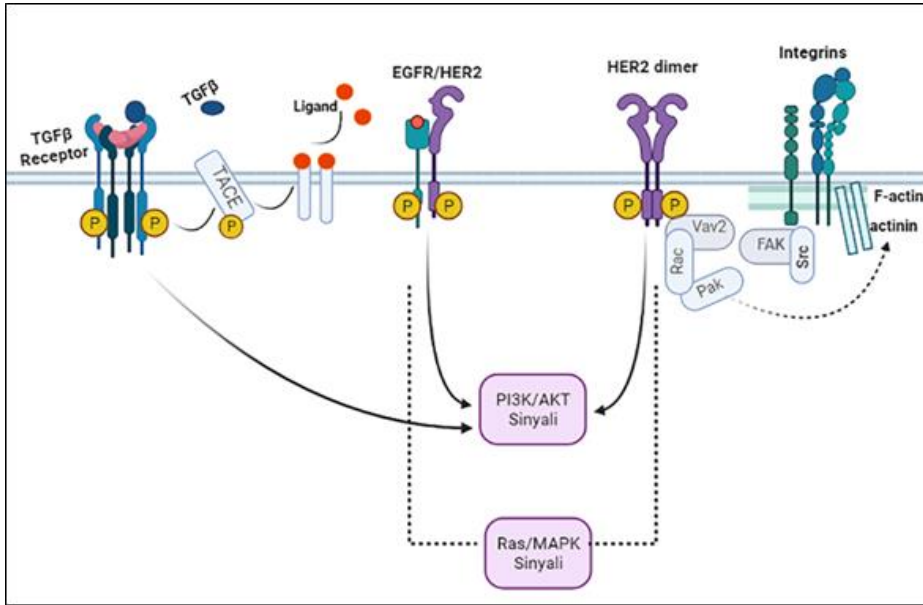
Östrojen meme kanseri hücrelerinde hem IGF1R hem de IRS-1 ifadesini artırarak IGF sinyalini ve reseptör altında yer alan yolakları etkinleştirir (92). MCF-7L hücrelerinde östrojenin IRS-1 ifadesini düzenlediği gösterilmiştir. Östrojen varlığında tümör büyümeye başladığında, sadece IRS-1 seviyesinin yükselmediği aynı zamanda fosforlandığı belirtilmektedir. Bu tümörler aynı zamanda IRS-1 aracılı sinyal iletim sistemini indükleyen yüksek miktarda fosforile MAPK içerir. Östrojen uzaklaştırıldığında tümör büyümesi durur ve IRS-1 ifadesi ve MAPK aktivitesi azalır (92). Bu durum IGF1R ve IRS-1 ve östrojen arasında sinerjistik bir ilişki olduğunu gösterir. Östrojen artışı büyüme faktör iletim sistemi bileşenlerini pozitif etkilemesinin yanında bazı bileşenleri negatif etkiler. Östrojen meme kanseri hücrelerinde büyümeyi durduran IGFBP3'ün ifadesini azaltır (93,94). Ayrıca östrojen IGF-IIR ifadesini azaltır.

IGF-IIR IGF-II'ye yüksek afinite gösterir ancak hücre dışı sinyale aktarılabilir. Böylece reseptörün meme kanseri proliferasyonunu engellemesine neden olur (94).

Östrojen hücre büyüme sinyalini artırırken anti-östrojenler ters etki göstererek büyüme faktör bileşenlerinin ifadesini azaltırlar. Böylece anti-östrojenler IGFBP3 ifadesini artırarak IGF sinyalini durdururlar (93) ve IGF1R ve IRS-1 ifadesini azaltırlar (95,96). Anti-östrojenler aynı zamanda ER'ın IGF odaklı ligand bağımsız aktivasyonunu engelleyerek IGF1R ve IRS-1 fosforilasyonunu da azaltır. Bu mekanizma iki yolak arasındaki karşılıklı etkileşimin karmaşıklığına ışık tutar. Östrojen IGF sinyal bileşenlerinin ve IGF sinyali için gerekli c-fos, c-jun, c-myc gibi transkripsiyon faktörlerinin ifadesini düzenler (97). Östrojen aynı zamanda siklin D1, p21 gibi hücre döngüsü elemanlarının ifadesini de kontrol eder (64). IGF ve ER hücre döngüsünde sinerjetik etki gösterir.

Transforming büyüme faktör Beta (TGF- β) ve HER2 arasındaki karşılıklı etkileşim

Sitokin transforming büyüme faktör beta (TGF- β), gelişim, farklılaşma, immün cevap ve tümör oluşumunu içeren sayısız sürecin içinde yer alır (98). Aşırı HER2 ifadesi olan memeli hücreleri TGF- β ile muamele edildiğinde, aktif TGF- β reseptörü PI3K'yı aktive eder. Ayrıca, TGF- β reseptörüne bağlı TGF- β EGFR öncü ligandın kopmasına neden olan TACE'nin fosforilasyonunu uyarır. Böylece EGFR/HER2 heterodimerizasyonu sağlanır ve reseptör altında yer alan yolakların açılmasına yol açar (99). Bu hücrelerde HER2/actin/actinin kompleksi Pak1, Rac1, Vav2 ile ilişkilidir (100) (Şekil 4). Pak1 hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini tetikleyen hücre iskeleti elemanlarıyla etkileşime girdiği bilinen Rac1'in temel efektörüdür (101). EGFR aktivasyonu Src-FAK yolağını tetikler, FAK integrin α_6 , β_1 , β_4 ve HER2 ile kompleks oluşturur, dolayısıyla TGF- β sinyali adezyon, migrasyon ve hücre morfolojisi ile alakalı olan integrin sinyali ile bağlantı kurmuş olur (99,102). Hücre hareket kabiliyetinin yukarıda bahsedilen yolağa bağlı olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda, bu yolak aracılığıyla TGF- β uygulaması sonucunda hücrelerin programlanmış hücre ölümünün bir formu olan anoikis'e karşı direnç kazandığı gözlenmiştir (100).



Şekil 4. (TGF- β) ve HER2 sinyali arasındaki karşılıklı etkileşim (crosstalk).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Meme kanserinde hormonal ajanlar ile terapötik cevap için önemli olan HER reseptör ailesinin de içinde yer aldığı diğer reseptör aileleri ve ER arasındaki karşılıklı etkileşim önemlidir (103). Meme kanseri hücrelerindeki östrojenin biyolojik etkisi ER α ve ER β olarak bilinen iki reseptör aracılığıyla sağlanır. Östrojenin ER'a bağlanması reseptörün fosforilasyonunu başlatır. Proteinler ile reseptör dimerizasyonu tetiklenir ve reseptörün DNA promotor bölgelere bağlanması kolaylaşır (104). Aktif olan ER östrojen cevap elementlerini (ERE) ve promotor bölgelerini içeren genlerin transkripsiyonunu ayarlar (Klasik genomik sinyal iletim sistemi) (104). ER kompleksi aynı zamanda c-fos/c-Jun gibi diğer transkripsiyon faktörlerinin koaktivasyonu aracılığıyla gen transkripsiyonunu sağlar (klasik olmayan sinyal iletim sistemi) (105). Genomik östrojen sinyal sistemi IGF1R, siklin D1, IGF-II ve VEGF gibi tümör gelişiminde önemli proteinleri kodlayan genlerin ifadesini uyarır (104,105). EGFR ve HER2 içeren pek çok gen östrojen sinyali ile azalır. ER aynı zamanda membran östrojen sinyali olarak da bilinen genomik olmayan mekanizma ile hücre fonksiyonları düzenler (103). Burada ER ve büyüme faktörü reseptörleri arasında karşılıklı etkileşim meydana geldiği görülür. ER'nin bir kısmı sitoplazma, mitokondri ve plazma membranı gibi çekirdek

dışındaki yapılarda yer alır. Bu durum ER'in işlevsel olarak büyüme faktörü ligandı gibi davrandığına işaret eder. Plazma membranı ile ilişkili ER siklik AMP gibi ikincil mesajcılarının seviyesini artırır (106) ve IGF1R, EGFR ve HER2 gibi çeşitli tirozin kinaz reseptörleri aktifleşir (107,108). ER ve büyüme faktör reseptörleri arasındaki karşılıklı etkileşim çift yönlüdür. MAPK ve Akt gibi birçok kinaz ER'nin spesifik bölgelerini fosforlar ve bu durum ligand bağımsız ER aktivasyonuna sebep olur. Örneğin; MAPK ile fosforlanan AIB1 ER-bağımlı transkripsiyonu artırır (109) ve AIB1'in aşırı ifadesi HER2 ile transfekte edilmiş MCF7 hücrelerinde (MCF7-HER2+) tamoxifen bağlı ER'yi antagonist etki yerine östrojen ile agonist etkiye çevirir (110). Bu bulgu ER ve büyüme faktör reseptörleri arasındaki karşılıklı etkileşimin tamoxifen direncinde önemli rolü olduğunu göstermektedir. MCF7-HER2⁺ hücrelerinde gefitinib gibi tirozin kinaz inhibitörleri ve anti-HER2 antikorları ER ve HER2 arasındaki karşılıklı etkileşimi elimine eder ve hücre yeniden tamoxifene karşı duyarlı hale gelir.

Araştırma bulguları meme kanserinde büyümenin, östrojen reseptörü (ER) ve bir çok büyüme faktörü reseptör sinyal sisteminin koordinasyonu ile düzenlendiğini öne sürmektedir. ER ve büyüme faktörü reseptör sinyal iletim sisteminin özellikle meme kanserinde endokrin terapiye direnç oluşum mekanizmalarından biri olan EGFR ile arasındaki karşılıklı etkileşimin varlığı bilinmektedir (111,112). EGFR/HER2 sinyal iletim sisteminin aktivasyonu tümör hücrelerinde apoptoz inhibisyonu, hücre büyümesinin uyarımı, invazyon ve anjiyogenezin artırılması gibi çeşitli etkilerin oluşmasına neden olan kinaz sinyal basamaklarını başlatır. Hücre büyümesi ve hayatta kalması PI3K/Akt ve Erk1/2 MAPK iletim sistemlerinin aracılığıyla olur. Bu kinazlar fosforile olup ER'yi ya da AIB1 gibi ko-regülatör elementleri aktive etmesi nedeniyle bazı tümörlerde ER aktivasyonu için önemlidir (109,113).

HR⁺ meme kanseri vakalarında hormonal uygulamalara rağmen, endokrin terapiye karşı gelişen direnç mekanizmaları hala klinik bir problemdir (114). Faz III klinik denemeler HR⁺ tümörlerin %30'unun aromataz inhibitörlerine (AI) cevap verebildiğini göstermiştir. Buna ek olarak, başlangıçta AI'ya cevap veren tümörlerin bir süre sonra bu ilaca direnç kazandığı ve hastalığın ilerlemesinin durdurulamadığı belirlenmiştir (115). Hormonal terapiye karşı ER ifadesinin azaltılması, ER mutasyonları, ER koregülatörlerinin alternatif ifade edilmesi gibi pek çok direnç mekanizması

önerilmiştir. HER reseptör ailesi üyeleri (EGFR, HER2, HER3, HER4) hormon direncinde etkili rol alır. Özellikle HER2 aşırı ifadesi pre-klinik modellerde endokrin terapiye direnç gelişimini sağlar (104). HER2 ligandsız bir reseptör olup diğer HER üyeleri ile dimerizasyonu sonucunda aktifleşir ve proliferasyon, hayatta kalım gibi hücrel süreçler tetiklenir. HR+ ve HER2+ tümörler ER'nin genomik ve genomik olmayan mekanizması ile büyüme hormon iletim sistemi arasında tehlikeli bir döngü kurarlar ve bu durum hücre proliferasyonunu ve hayatta kalımı artırır. Bu iki reseptörden biri kapatıldığında diğerinin aktif hale gelmesi nedeniyle her iki reseptörü de hedef alabilen akılcı terapiler geliştirilmelidir.

ER ve meme kanseri biyolojisinde önemli yeri olan HER ailesi dışındaki diğer reseptör aileleri arasındaki karşılıklı etkileşim önemlidir. Steroid hormonlar ve büyüme faktörlerinin kanser hücrelerinin büyümesi üzerindeki etkisinin ortaya çıkması ile tirozin kinaz reseptörleri ve nükleer reseptörler arasındaki karşılıklı etkileşim önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir. Meme, endometrial ve uterus gibi dokular hem estradiol hem de IGF (insulin benzeri büyüme faktörü) cevabı verirler. Örneğin, MCF7 meme kanseri hücre hattında ER ve IGF1R reseptörleri yer almaktadır. İlginç bir şekilde, her iki reseptör de aynı anda uyarıldığında IGF1R ve ER editif ya da sinerjistik etki gösterir. Bu durum farklı yapısal ailelerde yer alan bu reseptörlerin arasında karşılıklı bir etkileşim olabileceğini göstermiştir (116).

ER sinyalinin geneli östradiol ile meydana gelirken, aynı zamanda IGF yolağı gibi diğer büyüme hormon iletim sistemleri de ER sinyaline katkı sağlar. Östradiol'ün ER'a bağlanması reseptörün fonksiyonuna etki edecek pek çok değişiklik ile sonuçlanır. IGF reseptör aracılı sinyal MAPK ve PI3K/Akt yollarını aktive eder. MAPK'nin ER'yi aktivasyonu sonucunda AF-1 domainin Ser¹¹⁸ kısmından fosforladığı gösterilmiştir (117). Bu bilgiler doğrultusunda, temel olarak aktif MAPK AF-1 domain'in fosforilasyonunu artırır ancak, AF-1 ya da AF-2 domaininde mutant Ala¹¹⁸ bahsedilen durumu engeller (118). Benzer şekilde, PI3K yolağında Akt aracılı AF-1 domainin Ser¹⁶⁷ 'den fosforlanması ER'ın aktive ettiği gösterilmiştir (119). Östrojen ve IGF-I arasındaki sinerji hem normal ve hem de kanserli meme ve uterusu görülür (64). Meme kanseri hücrelerinde, IGF-I ER'ın transkripsiyonel aktivitesini artırdığı gibi aynı zamanda ER'nin transkripsiyonel hedefi olan progesteron reseptör ifadesini de artırabilir (64). İlave olarak, IGF-I MCF-7L

hücrelerinde östradiol yokluğunda ER'ın aktivitesini artırır (120). Ligandlar ile birlikte yapılan uygulamalar ER'nin transkripsiyonel aktivitesini tek ligand ile yapılabilecek orana daha fazla artırır. IGF-1 aktivitesini bloklayan insülin benzeri büyüme faktör bağlayıcı protein -1 (IGFBP1)'in IGF aracılı ER aktivasyonunu engellediği gösterilmiştir (64).

Meme kanseri tedavisinde ER'ı hedeflemenin başarılı uygulamalardan biri olduğu açıktır. Yakın zamana kadar tek başına tamoxifen gibi anti-östrojenik ilaç kullanımının faydalı olmadığı kombine terapilerin gerekli olduğuna kanaat getirilmiştir. Büyüme faktör reseptör sisteminin ER fonksiyonu üzerindeki etkisi bu yolları hedeflenmesinin de fayda sağlayabileceği fikrini doğurmuştur. İlk bulgular anastrozolün trastuzumab ile birlikte kullanımının tek başına kullanımından daha yararlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca anastrozol ile IGF1R tirozin kinaz inhibitörünün (NVP-AEW541) birlikte kullanımının meme kanseri hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (10). Bu bilgiler doğrultusunda, tirozin kinaz büyüme faktör reseptörü ve ER'ı hedefleyen tedavi ajanlarının birlikte kullanımının klinikte ER/HER2 karşılıklı etkileşimi açısından terapötik fırsat sağlayabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. C. Chen, W.T. Baumann, R. Clarke, J.J. Tyson, Modeling the estrogen receptor to growth factor receptor signaling switch in human breast cancer cells., *FEBS Lett.* 587 (2013) 3327–34. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.08.022>.
2. R.L. Barbieri, Breast, Yen Jaffe's *Reprod. Endocrinol. Physiol. Pathophysiol. Clin. Manag.* Eighth Ed. 419 (2019) 248-255.e3. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47912-7.00010-X>.
3. N. Patani, L.-A. Martin, M. Dowsett, Biomarkers for the clinical management of breast cancer: international perspective., *Int. J. Cancer.* 133 (2013) 1–13. <https://doi.org/10.1002/ijc.27997>.
4. E. a Musgrove, R.L. Sutherland, Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer., *Nat. Rev. Cancer.* 9 (2009) 631–43. <https://doi.org/10.1038/nrc2713>.
5. M. Baum, A.U. Budzar, J. Cuzick, J. Forbes, J.H. Houghton, J.G.M. Klijn, T. Sahmoud, Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial., *Lancet (London, England).* 359 (2002) 2131–9. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09088-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09088-8).
6. B. Thürlimann, A. Keshaviah, A.S. Coates, H. Mouridsen, L. Mauriac, J.F. Forbes, R. Paridaens, M. Castiglione-Gertsch, R.D. Gelber, M. Rabaglio, I. Smith, A. Wardley, A. Wardly, K.N. Price, A. Goldhirsch, A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer., *N. Engl. J. Med.* 353 (2005) 2747–57. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052258>.
7. P.E. Goss, J.N. Ingle, S. Martino, N.J. Robert, H.B. Muss, M.J. Piccart, M. Castiglione, D. Tu, L.E. Shepherd, K.I. Pritchard, R.B. Livingston, N.E. Davidson, L. Norton, E.A. Perez, J.S. Abrams, P. Therasse, M.J. Palmer, J.L. Pater, A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer., *N. Engl. J. Med.* 349 (2003) 1793–802. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032312>.
8. S. Massarweh, R. Schiff, Unraveling the mechanisms of endocrine

- resistance in breast cancer: new therapeutic opportunities., *Clin. Cancer Res.* 13 (2007) 1950–4. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2540>.
9. C.L. Loprinzi, D.L. Barton, R. Qin, Nonestrogenic management of hot flashes., *J. Clin. Oncol.* 29 (2011) 3842–6. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.37.5865>.
 10. J. Lisztwan, A. Pornon, B. Chen, S. Chen, D.B. Evans, The aromatase inhibitor letrozole and inhibitors of insulin-like growth factor I receptor synergistically induce apoptosis in in vitro models of estrogen-dependent breast cancer., *Breast Cancer Res.* 10 (2008) R56. <https://doi.org/10.1186/bcr2113>.
 11. S. Mook, L.J. Van 't Veer, E.J. Rutgers, P.M. Ravdin, A.O. van de Velde, F.E. van Leeuwen, O. Visser, M.K. Schmidt, Independent prognostic value of screen detection in invasive breast cancer., *J. Natl. Cancer Inst.* 103 (2011) 585–97. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr043>.
 12. P. Ascenzi, A. Bocedi, M. Marino, Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health., *Mol. Aspects Med.* 27 (2006) 299–402. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2006.07.001>.
 13. D.P. McDonnell, J.D. Norris, Connections and regulation of the human estrogen receptor., *Science.* 296 (2002) 1642–4. <https://doi.org/10.1126/science.1071884>.
 14. E. V Jensen, V.C. Jordan, The estrogen receptor: a model for molecular medicine., *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 1980–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12796359> (accessed January 13, 2015).
 15. S.S. Skandalis, N. Afratis, G. Smirlaki, D. Nikitovic, A.D. Theocharis, G.N. Tzanakakis, N.K. Karamanos, Cross-talk between estradiol receptor and EGFR/IGF-IR signaling pathways in estrogen-responsive breast cancers: focus on the role and impact of proteoglycans., *Matrix Biol.* 35 (2014) 182–93. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.09.002>.
 16. N. Nass, T. Kalinski, Tamoxifen resistance: from cell culture experiments towards novel biomarkers., *Pathol. Res. Pract.* 211 (2015) 189–97. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2015.01.004>.
 17. S. Hayashi, H. Eguchi, K. Tanimoto, T. Yoshida, Y. Omoto, A. Inoue, N. Yoshida, Y. Yamaguchi, The expression and function of estrogen

- receptor alpha and beta in human breast cancer and its clinical application., *Endocr. Relat. Cancer.* 10 (2003) 193–202. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12790782> (accessed September 22, 2015).
18. M. Barton, Position paper: The membrane estrogen receptor GPER--Clues and questions., *Steroids.* 77 (2012) 935–42. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.04.001>.
19. N.C. Lucki, M.B. Sewer, Genistein stimulates MCF-7 breast cancer cell growth by inducing acid ceramidase (ASAHI) gene expression., *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 19399–409. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.195826>.
20. A.L. Scaling, E.R. Prossnitz, H.J. Hathaway, GPER mediates estrogen-induced signaling and proliferation in human breast epithelial cells and normal and malignant breast., *Horm. Cancer.* 5 (2014) 146–60. <https://doi.org/10.1007/s12672-014-0174-1>.
21. G. Arpino, L. Wiechmann, C.K. Osborne, R. Schiff, Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance., *Endocr. Rev.* 29 (2008) 217–33. <https://doi.org/10.1210/er.2006-0045>.
22. S. Ali, D. Metzger, J.M. Bornert, P. Chambon, Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region., *EMBO J.* 12 (1993) 1153–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8458328> (accessed September 22, 2015).
23. M. Razandi, A. Pedram, S.T. Park, E.R. Levin, Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors., *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 2701–12. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205692200>.
24. E.R. Levin, R.J. Pietras, Estrogen receptors outside the nucleus in breast cancer., *Breast Cancer Res. Treat.* 108 (2008) 351–61. <https://doi.org/10.1007/s10549-007-9618-4>.
25. S. Nilsson, S. Mäkelä, E. Treuter, M. Tujague, J. Thomsen, G. Andersson, E. Enmark, K. Pettersson, M. Warner, J.A. Gustafsson, Mechanisms of estrogen action., *Physiol. Rev.* 81 (2001) 1535–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11581496> (accessed December 18, 2014).

26. R. Baserga, F. Peruzzi, K. Reiss, The IGF-1 receptor in cancer biology., *Int. J. Cancer.* 107 (2003) 873–7. <https://doi.org/10.1002/ijc.11487>.
27. C.K. Osborne, R. Schiff, Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer., *Annu. Rev. Med.* 62 (2011) 233–47. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-070909-182917>.
28. X. Su, X. Xu, G. Li, B. Lin, J. Cao, L. Teng, ER- α 36: a novel biomarker and potential therapeutic target in breast cancer., *Onco. Targets. Ther.* 7 (2014) 1525–33. <https://doi.org/10.2147/OTT.S65345>.
29. M.D. Althuis, J.H. Fergenbaum, M. Garcia-Closas, L.A. Brinton, M.P. Madigan, M.E. Sherman, Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: a systematic review of the literature., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13 (2004) 1558–68. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15466970> (accessed December 28, 2014).
30. V. Pelekanou, G. Leclercq, Recent insights into the effect of natural and environmental estrogens on mammary development and carcinogenesis., *Int. J. Dev. Biol.* 55 (2011) 869–78. <https://doi.org/10.1387/ijdb.113369vp>.
31. E.K. Shanle, W. Xu, Selectively targeting estrogen receptors for cancer treatment., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) 1265–76. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.08.001>.
32. D.R. Woode, H.S. Aiyer, N. Sie, A.L. Zwart, L. Li, N.P. Seeram, R. Clarke, Effect of Berry Extracts and Bioactive Compounds on Fulvestrant (ICI 182,780) Sensitive and Resistant Cell Lines., *Int. J. Breast Cancer.* 2012 (2012) 147828. <https://doi.org/10.1155/2012/147828>.
33. P. Eroles, A. Bosch, J.A. Pérez-Fidalgo, A. Lluch, Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways., *Cancer Treat. Rev.* 38 (2012) 698–707. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.11.005>.
34. S. Ahmed, A. Sami, J. Xiang, HER2-directed therapy: current treatment options for HER2-positive breast cancer., *Breast Cancer.* 22 (2015) 101–16. <https://doi.org/10.1007/s12282-015-0587-x>.
35. H.P. Kourea, V. Zolota, C.D. Scopa, Targeted pathways in breast cancer: molecular and protein markers guiding therapeutic decisions., *Curr. Mol. Pharmacol.* 7 (2014) 4–21.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25563853> (accessed September 22, 2015).
36. C.J. Witton, J.R. Reeves, J.J. Goings, T.G. Cooke, J.M.S. Bartlett, Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer., *J. Pathol.* 200 (2003) 290–7. <https://doi.org/10.1002/path.1370>.
 37. M.D. Marmor, Y. Yarden, Role of protein ubiquitylation in regulating endocytosis of receptor tyrosine kinases., *Oncogene.* 23 (2004) 2057–70. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207390>.
 38. N.E. Hynes, H. a Lane, ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors., *Nat. Rev. Cancer.* 5 (2005) 341–54. <https://doi.org/10.1038/nrc1609>.
 39. S.M. Tovey, C.J. Witton, J.M.S. Bartlett, P.D. Stanton, J.R. Reeves, T.G. Cooke, Outcome and human epidermal growth factor receptor (HER) 1-4 status in invasive breast carcinomas with proliferation indices evaluated by bromodeoxyuridine labelling., *Breast Cancer Res.* 6 (2004) R246-51. <https://doi.org/10.1186/bcr783>.
 40. N. Rocks, G. Paulissen, M. El Hour, F. Quesada, C. Crahay, M. Gueders, J.M. Foidart, a Noel, D. Cataldo, Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer., *Biochimie.* 90 (2008) 369–79. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.08.008>.
 41. M. Dang, N. Armbruster, M.A. Miller, E. Cermenno, M. Hartmann, G.W. Bell, D.E. Root, D.A. Lauffenburger, H.F. Lodish, A. Herrlich, Regulated ADAM17-dependent EGF family ligand release by substrate-selecting signaling pathways., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 9776–81. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307478110>.
 42. F.F.T. Barros, D.G. Powe, I.O. Ellis, A.R. Green, Understanding the HER family in breast cancer: interaction with ligands, dimerization and treatments., *Histopathology.* 56 (2010) 560–72. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2010.03494.x>.
 43. R. Pinkas-Kramarski, A.E. Lenferink, S.S. Bacus, L. Lyass, M.L. van de Poll, L.N. Klapper, E. Tzahar, M. Sela, E.J. van Zoelen, Y. Yarden, The oncogenic ErbB-2/ErbB-3 heterodimer is a surrogate receptor of the epidermal growth factor and betacellulin., *Oncogene.* 16 (1998) 1249–58. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201642>.
 44. L. Yang, Y. Li, Y. Zhang, Identification of prolidase as a high affinity

- ligand of the ErbB2 receptor and its regulation of ErbB2 signaling and cell growth., *Cell Death Dis.* 5 (2014) e1211. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.187>.
45. A. Eisenberg, E. Biener, M. Charlier, R. V Krishnan, J. Djiane, B. Herman, A. Gertler, Transactivation of erbB2 by short and long isoforms of leptin receptors., *FEBS Lett.* 565 (2004) 139–42. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.03.089>.
46. D. Soma, J. Kitayama, H. Yamashita, H. Miyato, M. Ishikawa, H. Nagawa, Leptin augments proliferation of breast cancer cells via transactivation of HER2., *J. Surg. Res.* 149 (2008) 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2007.10.012>.
47. P. Mukhopadhyay, S. Chakraborty, M.P. Ponnusamy, I. Lakshmanan, M. Jain, S.K. Batra, Mucins in the pathogenesis of breast cancer: implications in diagnosis, prognosis and therapy., *Biochim. Biophys. Acta.* 1815 (2011) 224–40. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2011.01.001>.
48. R. Roskoski, The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer., *Pharmacol. Res.* 79 (2014) 34–74. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.11.002>.
49. a Dittrich, H. Gautrey, D. Browell, a Tyson-Capper, The HER2 Signaling Network in Breast Cancer-Like a Spider in its Web., *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 19 (2014) 253–70. <https://doi.org/10.1007/s10911-014-9329-5>.
50. D.A. Fruman, C. Rommel, PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities., *Nat. Rev. Drug Discov.* 13 (2014) 140–56. <https://doi.org/10.1038/nrd4204>.
51. C. a Castaneda, H. Cortes-Funes, H.L. Gomez, E.M. Ciruelos, The phosphatidyl inositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer., *Cancer Metastasis Rev.* 29 (2010) 751–9. <https://doi.org/10.1007/s10555-010-9261-0>.
52. E. Aksamitiene, A. Kiyatkin, B.N. Kholodenko, Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance., *Biochem. Soc. Trans.* 40 (2012) 139–46. <https://doi.org/10.1042/BST20110609>.
53. A. De Luca, M.R. Maiello, A. D’Alessio, M. Pergameno, N. Normanno, The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role

- in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches., *Expert Opin. Ther. Targets.* 16 Suppl 2 (2012) S17-27. <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.639361>.
54. A. Kasza, Signal-dependent Elk-1 target genes involved in transcript processing and cell migration., *Biochim. Biophys. Acta.* 1829 (2013) 1026–33. <https://doi.org/10.1016/j.bbarm.2013.05.004>.
 55. Y. Romeo, X. Zhang, P.P. Roux, Regulation and function of the RSK family of protein kinases., *Biochem. J.* 441 (2012) 553–69. <https://doi.org/10.1042/BJ20110289>.
 56. E. Paplomata, R. O'Regan, The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers., *Ther. Adv. Med. Oncol.* 6 (2014) 154–66. <https://doi.org/10.1177/1758834014530023>.
 57. T. Maehama, J.E. Dixon, The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate., *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 13375–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9593664> (accessed August 12, 2015).
 58. S.A. Wander, B.T. Hennessy, J.M. Slingerland, Next-generation mTOR inhibitors in clinical oncology: how pathway complexity informs therapeutic strategy., *J. Clin. Invest.* 121 (2011) 1231–41. <https://doi.org/10.1172/JCI44145>.
 59. A. Ocaña, J.J. Cruz, A. Pandiella, Trastuzumab and antiestrogen therapy: focus on mechanisms of action and resistance., *Am. J. Clin. Oncol.* 29 (2006) 90–5. <https://doi.org/10.1097/01.coc.0000190274.00570.0a>.
 60. T.T. Junttila, R.W. Akita, K. Parsons, C. Fields, G.D. Lewis Phillips, L.S. Friedman, D. Sampath, M.X. Sliwkowski, Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941., *Cancer Cell.* 15 (2009) 429–40. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.03.020>.
 61. D.B. Agus, R.W. Akita, W.D. Fox, G.D. Lewis, B. Higgins, P.I. Pisacane, J.A. Lofgren, C. Tindell, D.P. Evans, K. Maiese, H.I. Scher, M.X. Sliwkowski, Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth., *Cancer Cell.* 2 (2002) 127–37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12204533> (accessed September 22, 2015).

62. L. Liu, J. Greger, H. Shi, Y. Liu, J. Greshock, R. Annan, W. Halsey, G.M. Sathe, A.-M. Martin, T.M. Gilmer, Novel mechanism of lapatinib resistance in HER2-positive breast tumor cells: activation of AXL., *Cancer Res.* 69 (2009) 6871–8. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4490>.
63. M. Kanatani, T. Sugimoto, J. Kano, K. Chihara, IGF-I mediates the stimulatory effect of high phosphate concentration on osteoblastic cell proliferation., *J. Cell. Physiol.* 190 (2002) 306–12. <https://doi.org/10.1002/jcp.10067>.
64. D.H. Fagan, D. Yee, Crosstalk between IGF1R and estrogen receptor signaling in breast cancer., *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 13 (2008) 423–9. <https://doi.org/10.1007/s10911-008-9098-0>.
65. S. Tanno, Y. Mitsuuchi, D.A. Altomare, G.H. Xiao, J.R. Testa, AKT activation up-regulates insulin-like growth factor I receptor expression and promotes invasiveness of human pancreatic cancer cells., *Cancer Res.* 61 (2001) 589–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11212254> (accessed August 11, 2015).
66. S.G. Bonnette, D.L. Hadsell, Targeted disruption of the IGF-I receptor gene decreases cellular proliferation in mammary terminal end buds., *Endocrinology.* 142 (2001) 4937–45. <https://doi.org/10.1210/endo.142.11.8500>.
67. C. Alexia, G. Fallot, M. Lasfer, G. Schweizer-Groyer, A. Groyer, An evaluation of the role of insulin-like growth factors (IGF) and of type-I IGF receptor signalling in hepatocarcinogenesis and in the resistance of hepatocarcinoma cells against drug-induced apoptosis., *Biochem. Pharmacol.* 68 (2004) 1003–15. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.05.029>.
68. G. Pandini, R. Vigneri, A. Costantino, F. Frasca, A. Ippolito, Y. Fujita-Yamaguchi, K. Siddle, I.D. Goldfine, A. Belfiore, Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor overexpression in breast cancers leads to insulin/IGF-I hybrid receptor overexpression: evidence for a second mechanism of IGF-I signaling., *Clin. Cancer Res.* 5 (1999) 1935–44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10430101> (accessed September 25, 2015).
69. F. Frasca, G. Pandini, P. Scalia, L. Sciacca, R. Mineo, A. Costantino, I.D.

- Goldfine, A. Belfiore, R. Vigneri, Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells., *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 3278–88. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=84122&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (accessed September 25, 2015).
70. A. Denley, J.M. Carroll, G. V Brierley, L. Cosgrove, J. Wallace, B. Forbes, C.T. Roberts, Differential activation of insulin receptor substrates 1 and 2 by insulin-like growth factor-activated insulin receptors., *Mol. Cell. Biol.* 27 (2007) 3569–77. <https://doi.org/10.1128/MCB.01447-06>.
71. G. Konecny, G. Pauletti, M. Pegram, M. Untch, S. Dandekar, Z. Aguilar, C. Wilson, H.-M. Rong, I. Bauerfeind, M. Felber, H.-J. Wang, M. Beryt, R. Seshadri, H. Hepp, D.J. Slamon, Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer., *J. Natl. Cancer Inst.* 95 (2003) 142–53. <https://doi.org/10.1093/jnci/95.2.142>.
72. M. Giuliano, M. V Trivedi, R. Schiff, Bidirectional Crosstalk between the Estrogen Receptor and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Signaling Pathways in Breast Cancer: Molecular Basis and Clinical Implications., *Breast Care (Basel)*. 8 (2013) 256–62. <https://doi.org/10.1159/000354253>.
73. D.W. Kufe, MUC1-C oncoprotein as a target in breast cancer: activation of signaling pathways and therapeutic approaches., *Oncogene*. 32 (2013) 1073–81. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.158>.
74. K.M. Chia, J. Liu, G.D. Francis, A. Naderi, A feedback loop between androgen receptor and ERK signaling in estrogen receptor-negative breast cancer., *Neoplasia*. 13 (2011) 154–66. <https://doi.org/10.1593/neo.101324>.
75. A. Naderi, L. Hughes-Davies, A functionally significant cross-talk between androgen receptor and ErbB2 pathways in estrogen receptor negative breast cancer., *Neoplasia*. 10 (2008) 542–8. <https://doi.org/10.1593/neo.08274>.
76. A.I. Tsonis, N. Afratis, C. Gialeli, M.-I. Ellina, Z. Piperigkou, S.S. Skandalis, A.D. Theocharis, G.N. Tzanakakis, N.K. Karamanos, Evaluation of the coordinated actions of estrogen receptors with

- epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor receptor in the expression of cell surface heparan sulfate proteoglycans and cell motility in breast cancer cells., *FEBS J.* 280 (2013) 2248–59. <https://doi.org/10.1111/febs.12162>.
77. R.J. Pietras, Interactions Between Estrogen and Growth Factor Receptors in Human Breast Cancers and the Tumor-Associated Vasculature, *Breast J.* 9 (2003) 361–373. <https://doi.org/10.1046/j.1524-4741.2003.09510.x>.
78. E.M. Fox, J. Andrade, M.A. Shupnik, Novel actions of estrogen to promote proliferation: integration of cytoplasmic and nuclear pathways., *Steroids.* 74 (2009) 622–7. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2008.10.014>.
79. R.I. Nicholson, S.R. Johnston, Endocrine therapy--current benefits and limitations., *Breast Cancer Res. Treat.* 93 Suppl 1 (2005) S3-10. <https://doi.org/10.1007/s10549-005-9036-4>.
80. V. St-Laurent, M. Sanchez, C. Charbonneau, A. Tremblay, Selective hormone-dependent repression of estrogen receptor beta by a p38-activated ErbB2/ErbB3 pathway., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 94 (2005) 23–37. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2005.02.001>.
81. C. a Green, M.B. Peter, V. Speirs, a M. Shaaban, The potential role of ER beta isoforms in the clinical management of breast cancer., *Histopathology.* 53 (2008) 374–80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2008.02968.x>.
82. Y. Omoto, H. Eguchi, Y. Yamamoto-Yamaguchi, S. Hayashi, Estrogen receptor (ER) beta1 and ERbeta2/beta2 inhibit ERalpha function differently in breast cancer cell line MCF7., *Oncogene.* 22 (2003) 5011–20. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206787>.
83. C. Lattrich, A. Stegerer, J. Häring, S. Schöler, O. Ortmann, O. Treeck, Estrogen receptor β agonists affect growth and gene expression of human breast cancer cell lines., *Steroids.* 78 (2013) 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.10.014>.
84. C.J. Creighton, A.M. Hilger, S. Murthy, J.M. Rae, A.M. Chinnaiyan, D. El-Ashry, Activation of mitogen-activated protein kinase in estrogen receptor alpha-positive breast cancer cells in vitro induces an in vivo molecular phenotype of estrogen receptor alpha-negative human breast tumors., *Cancer Res.* 66 (2006) 3903–11.

- 5472.CAN-05-4363.
85. A.S. Oh, L.A. Lorant, J.N. Holloway, D.L. Miller, F.G. Kern, D. El-Ashry, Hyperactivation of MAPK induces loss of ER α expression in breast cancer cells., *Mol. Endocrinol.* 15 (2001) 1344–59. <https://doi.org/10.1210/mend.15.8.0678>.
86. N. Grabinski, K. Möllmann, K. Milde-Langosch, V. Müller, U. Schumacher, B. Brandt, K. Pantel, M. Jücker, AKT3 regulates ErbB2, ErbB3 and estrogen receptor α expression and contributes to endocrine therapy resistance of ErbB2(+) breast tumor cells from Balb-neuT mice., *Cell. Signal.* 26 (2014) 1021–9. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.01.018>.
87. T.O. Nielsen, H.N. Andrews, M. Cheang, J.E. Kucab, F.D. Hsu, J. Ragaz, C.B. Gilks, N. Makretsov, C.D. Bajdik, C. Brookes, L.M. Neckers, V. Evdokimova, D.G. Huntsman, S.E. Dunn, Expression of the insulin-like growth factor I receptor and urokinase plasminogen activator in breast cancer is associated with poor survival: potential for intervention with 17-allylamino geldanamycin., *Cancer Res.* 64 (2004) 286–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14729636> (accessed September 23, 2015).
88. M. V Karamouzis, A.G. Papavassiliou, Targeting insulin-like growth factor in breast cancer therapeutics., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 84 (2012) 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2012.02.010>.
89. P. Haluska, J.M. Carboni, C. TenEyck, R.M. Attar, X. Hou, C. Yu, M. Sagar, T.W. Wong, M.M. Gottardis, C. Erlichman, HER receptor signaling confers resistance to the insulin-like growth factor-I receptor inhibitor, BMS-536924., *Mol. Cancer Ther.* 7 (2008) 2589–98. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0493>.
90. X. Huang, L. Gao, S. Wang, J.L. McManaman, A.D. Thor, X. Yang, F.J. Esteva, B. Liu, Heterotrimerization of the growth factor receptors erbB2, erbB3, and insulin-like growth factor-i receptor in breast cancer cells resistant to herceptin., *Cancer Res.* 70 (2010) 1204–14. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3321>.
91. J. Worthington, M. Bertani, H. Chan, B. Gerrits, J.F. Timms, Transcriptional profiling of ErbB signalling in mammary luminal epithelial cells--interplay of ErbB and IGF1 signalling through IGFBP3

- regulation., *BMC Cancer*. 10 (2010) 490. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-490>.
92. A. V Lee, J.G. Jackson, J.L. Gooch, S.G. Hilsenbeck, E. Coronado-Heinsohn, C.K. Osborne, D. Yee, Enhancement of insulin-like growth factor signaling in human breast cancer: estrogen regulation of insulin receptor substrate-1 expression in vitro and in vivo., *Mol. Endocrinol.* 13 (1999) 787–96. <https://doi.org/10.1210/mend.13.5.0274>.
 93. H. Huynh, X. Yang, M. Pollak, Estradiol and antiestrogens regulate a growth inhibitory insulin-like growth factor binding protein 3 autocrine loop in human breast cancer cells., *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 1016–21. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.2.1016>.
 94. T. Nickerson, H. Huynh, M. Pollak, Insulin-like growth factor binding protein-3 induces apoptosis in MCF7 breast cancer cells., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237 (1997) 690–3. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7089>.
 95. A.J. Stewart, B.R. Westley, F.E. May, Modulation of the proliferative response of breast cancer cells to growth factors by oestrogen., *Br. J. Cancer.* 66 (1992) 640–8. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1977408&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (accessed September 26, 2015).
 96. M. Salerno, D. Sisci, L. Mauro, M.A. Guvakova, S. Ando, E. Surmacz, Insulin receptor substrate 1 is a target for the pure antiestrogen ICI 182,780 in breast cancer cells., *Int. J. Cancer.* 81 (1999) 299–304. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10188734> (accessed September 26, 2015).
 97. S. Morishita, K. Niwa, S. Ichigo, M. Hori, T. Murase, J. Fujimoto, T. Tamaya, Overexpressions of c-fos/jun mRNA and their oncoproteins (Fos/Jun) in the mouse uterus treated with three natural estrogens., *Cancer Lett.* 97 (1995) 225–31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7497467> (accessed October 4, 2015).
 98. D.R. Principe, J. a Doll, J. Bauer, B. Jung, H.G. Munshi, L. Bartholin, B. Pasche, C. Lee, P.J. Grippo, TGF- β : duality of function between tumor prevention and carcinogenesis., *J. Natl. Cancer Inst.* 106 (2014) djt369. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt369>.

99. S.E. Wang, B. Xiang, R. Zent, V. Quaranta, A. Pozzi, C.L. Arteaga, Transforming growth factor beta induces clustering of HER2 and integrins by activating Src-focal adhesion kinase and receptor association to the cytoskeleton., *Cancer Res.* 69 (2009) 475–82. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2649>.
100. S.E. Wang, I. Shin, F.Y. Wu, D.B. Friedman, C.L. Arteaga, HER2/Neu (ErbB2) signaling to Rac1-Pak1 is temporally and spatially modulated by transforming growth factor beta., *Cancer Res.* 66 (2006) 9591–600. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2071>.
101. R.H. Daniels, G.M. Bokoch, p21-activated protein kinase: a crucial component of morphological signaling?, *Trends Biochem. Sci.* 24 (1999) 350–5. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01442-5](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01442-5).
102. L. Kass, J.T. Erler, M. Dembo, V.M. Weaver, Mammary epithelial cell: influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007) 1987–94. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.06.025>.
103. C.K. Osborne, R. Schiff, Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications., *J. Clin. Oncol.* 23 (2005) 1616–22. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.10.036>.
104. A. Prat, J. Baselga, The role of hormonal therapy in the management of hormonal-receptor-positive breast cancer with co-expression of HER2., *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 5 (2008) 531–42. <https://doi.org/10.1038/ncponc1179>.
105. P.J. Kushner, D. a Agard, G.L. Greene, T.S. Scanlan, A.K. Shiau, R.M. Uht, P. Webb, Estrogen receptor pathways to AP-1., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 74 (2000) 311–7. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(00\)00108-4](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(00)00108-4).
106. S.M. Aronica, W.L. Kraus, B.S. Katzenellenbogen, Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 8517–21. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=44637&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (accessed February 15, 2015).
107. C. Morelli, C. Garofalo, M. Bartucci, E. Surmacz, Estrogen receptor-alpha regulates the degradation of insulin receptor substrates 1 and 2 in

- breast cancer cells., *Oncogene*. 22 (2003) 4007–16.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206436>.
108. S. Kahlert, S. Nuedling, M. van Eickels, H. Vetter, R. Meyer, C. Grohe, Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway., *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 18447–53.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M910345199>.
109. J. Font de Mora, M. Brown, AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor., *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 5041–7. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.14.5041-5047.2000>.
110. J. Shou, S. Massarweh, C.K. Osborne, A.E. Wakeling, S. Ali, H. Weiss, R. Schiff, Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer., *J. Natl. Cancer Inst.* 96 (2004) 926–35. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh166>.
111. C.K. Osborne, V. Bardou, T. a. Hopp, G.C. Chamness, S.G. Hilsenbeck, S. a. W. Fuqua, J. Wong, D.C. Allred, G.M. Clark, R. Schiff, Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer., *J. Natl. Cancer Inst.* 95 (2003) 353–61. <https://doi.org/10.1093/jnci/95.5.353>.
112. R.I. Nicholson, R.A. McClelland, J.F. Robertson, J.M. Gee, Involvement of steroid hormone and growth factor cross-talk in endocrine response in breast cancer., *Endocr. Relat. Cancer*. 6 (1999) 373–87.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10516852> (accessed February 12, 2015).
113. S.-H. Hong, M.L. Privalsky, The SMRT Corepressor Is Regulated by a MEK-1 Kinase Pathway: Inhibition of Corepressor Function Is Associated with SMRT Phosphorylation and Nuclear Export, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 6612–6625. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.17.6612-6625.2000>.
114. A. Ring, M. Dowsett, Mechanisms of tamoxifen resistance., *Endocr. Relat. Cancer*. 11 (2004) 643–58. <https://doi.org/10.1677/erc.1.00776>.
115. J. Bonnetterre, B. Thürlimann, J.F. Robertson, M. Krzakowski, L. Mauriac, P. Koralewski, I. Vergote, A. Webster, M. Steinberg, M. von Euler, Anastrozole versus tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in 668 postmenopausal women: results of the Tamoxifen or Arimidex Randomized Group Efficacy and Tolerability study., *J. Clin.*

- Oncol. 18 (2000) 3748–57. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.41.3302>.
116. Z. Yu, W. Gao, E. Jiang, F. Lu, L. Zhang, Z. Shi, X. Wang, L. Chen, T. Lv, Interaction between IGF-IR and ER induced by E2 and IGF-I., *PLoS One*. 8 (2013) e62642. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062642>.
117. G. Bunone, P.A. Briand, R.J. Miksicek, D. Picard, Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation., *EMBO J*. 15 (1996) 2174–83. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=450141&to=ol=pmcentrez&rendertype=abstract> (accessed September 25, 2015).
118. G.B. Tremblay, A. Tremblay, N.G. Copeland, D.J. Gilbert, N.A. Jenkins, F. Labrie, V. Giguère, Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta., *Mol. Endocrinol*. 11 (1997) 353–65. <https://doi.org/10.1210/mend.11.3.9902>.
119. T. Simoncini, A. Hafezi-Moghadam, D.P. Brazil, K. Ley, W.W. Chin, J.K. Liao, Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase., *Nature*. 407 (2000) 538–41. <https://doi.org/10.1038/35035131>.
120. A. V Lee, C.N. Weng, J.G. Jackson, D. Yee, Activation of estrogen receptor-mediated gene transcription by IGF-I in human breast cancer cells., *J. Endocrinol*. 152 (1997) 39–47. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1520039>.

BÖLÜM 2

KANSER TEDAVİSİNDE YENİ BİR STRATEJİ OLARAK FERROPTOZ MEKANİZMASINI DÜZENLEYEN KODLAMAYAN RNA'LARI HEDEFLEYEN KÜÇÜK MOLEKÜLLER

Ezgi ÖZDEMİR¹,
Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN^{2*}

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.17113795>

¹ Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, Türkiye

² Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, Türkiye,
dcansaran@yahoo.com

*Sorumlu Yazar

KISALTMALAR

ROS: Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)

GPX4: Glutasyon Peroksidaz 4 (Glutathione Peroxidase 4)

SLC7A11: Solute Carrier Family 7 Member 11

GSH: Glutasyon (Glutathione)

FIN: Ferroptoz İndükleyicisi (Ferroptosis Inducer)

PUFA: Çoklu Doymamış Yağ Asitleri (Polyunsaturated Fatty Acids)

LOX: Lipoksijenaz (Lipoxygenase)

NSCLC: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri (Non-Small Cell Lung Cancer)

HCC: Hepatosellüler Karsinom (Hepatocellular Carcinoma)

FSP1: Ferroptosis Suppressor Protein 1

DFO: Demir şelatör ilacı (Deferoxamine)

NRF2: Nuclear Factor Erythroid 2–Related Factor 2

TFR1: Transferrin Receptor 1

DMT1: Divalent Metal Transporter 1

CoQ10: Coenzyme Q10

ETC: Elektron Taşıma Zinciri (Electron Transport Chain)

miR: MicroRNA

ceRNA: Yarışan Endojen RNA (Competing Endogenous RNA)

HMOX1: Heme Oxygenase 1

GİRİŞ

Kanser, kontrolsüz hücresel çoğalma, hücre ölümüne direnç ve genomik kararsızlık ile karakterize olan çok yönlü bir hastalıktır. Kanser hücrelerinin son yıllarda giderek daha fazla dikkat çeken özelliklerden biri, apoptoz gibi geleneksel hücre ölümü biçimlerinden kaçma yeteneğidir. Bu durum, direnci atlatabilen ve tümör hücrelerini seçici olarak ortadan kaldıracı yeni terapötik yaklaşımlar geliştirmek amacıyla alternatif hücre ölüm mekanizmaları hedefli yeni terapötiklerin geliştirilmesine yönelik acil bir ihtiyaç yaratmıştır. Bu bağlamda ferroptoz yolağı, demir metabolizması ve lipid peroksidasyonuna ilişkili bir hücre ölüm yolu olarak kanser hücresi eradikasyonu ve yeni hedefli kemoterapötiklerin geliştirilmesi için farklı bir yol sunmaktadır (1).

Büyük ölçüde kaspaz bağımlı olan ve DNA parçalanması ve kromatin yoğunlaşması ile yönlendirilen apoptoz hücre yolundan farklı olarak ferroptoz yolağı, lipid reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimi ile apoptotik profil göstermeyen, demir bağımlı bir hücre ölümü yoludur. Ferroptoz yolağı, hücre redoks profili, membranlardaki çoklu doymamış yağ asitlerinin mevcudiyeti, glutatyon peroksidaz 4 (GPX4) aktivitesi ve hücre içi demir seviyeleri tarafından düzenlenir. Birçok tümör hücresi değişmiş demir metabolizması, artmış oksidatif stres ve düzensiz antioksidan sistemler sergileyerek, ferroptotik tetikleyicilere karşı normal hücrelerden daha savunmasız hale getirmesi ile ferroptoz hücre ölüm yolağı özellikle onkolojide umut vericidir. Bu nedenle, ferroptoz yolağının hedeflenmesi, bazı kanserlerde kemoterapi, radyoterapi ve hatta immünoterapiye karşı ilaç direncin üstesinden gelme potansiyeline sahiptir (1).

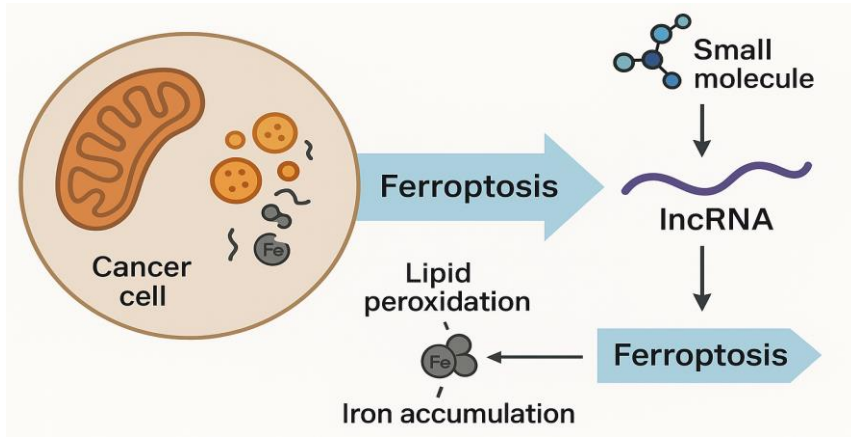
Ferroptoz yolağının moleküler düzenleyicileri arasında yer alan küçük moleküller ve uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar) tanı ve tedavi amaçlı son yıllarda oldukça dikkat çekmektedir (2). Hızla gelişen araştırma ortamında, küçük molekül modülatörleri ferroptoz yolağının incelenmesinde etkili olmuştur ve terapötik araçlar olarak oldukça fazla umut vaat etmektedir. Bazı moleküller kanser hücrelerinde seçici olarak ferroptoz yolağını indükleyebilirken, diğerleri normal dokuları koruyabilen veya nörodejenerasyon gibi kanser dışı hastalıklarda kullanılabilen inhibitörler olarak görev yapabilmektedir. Ayrıca, lncRNA'ların ferroptoz yolağı ilişkili anahtar genleri modüle ederek veya p53, NRF2 ve SLC7A11 gibi sinyal yolak

elemanlarıyla etkileşime girerek ferroptotik yanıtların düzenlenmesinde kritik roller oynadığını ortaya koymuştur (3). Bununla birlikte, küçük moleküller ve lncRNA'ların ferroptoz yolağı üzerinde nasıl etkileşime girdiğine dair veri özellikle farklı kanser türlerinde sınırlı kalmaktadır.

Ferroptoz yolağının düzenlenmesinde küçük moleküller ve lncRNA'lar arasındaki etkileşimin belirlenmesi ve farklı kanser türlerindeki profilin aydınlatılması oldukça önemlidir. Ferroptoz yolağı başlangıçta demire bağımlılığı ve lipid peroksit birikimine dayalı olarak tanımlanmış olsa da sonraki araştırmalar apoptozda gözlenen oksidatif stres ve nekroptoz da görülen mitokondriyal disfonksiyon gibi diğer hücre ölümü yöntemleriyle çeşitli moleküler özellikleri paylaştığını göstermiştir (4). Diğer ölüm yolakları ile örtüşen özellikler genellikle farklı hücre ölümü biçimleri arasındaki sınırları bulanıklaştırır ve ferroptoz yolağı bağımsız bir mekanizma olarak mı yoksa daha geniş bir oksidatif hücre ölümü spektrumunun bir parçası olarak mı kabul edilmesi gerektiği konusunda bilim camiasında tartışmalara yol açmıştır. Ayrıca, evrensel olarak kabul edilmiş biyobelirteçlerin eksikliği ve ferroptoz yolağı sinyalinin dinamik doğası, tanımlanmasını ve sınıflandırılmasını daha da karmaşık hale getirmektedir. Kavramsal belirsizliğin bir başka alanı da uzun kodlamayan RNA'ların (lncRNA'lar) rolü ve işlevsel sınıflandırmasında yatmaktadır. LncRNA'lar geleneksel olarak protein kodlama potansiyeli olmayan 200 nükleotitten daha uzun transkriptler olarak tanımlansa da bu tanım yeni etki mekanizmaları belirlendikçe gelişmektedir. LncRNA'lar, kromatin yeniden modelleme, transkripsiyonel düzenleme, RNA süngerleme ve hatta belirli koşullar altında peptit kodlama dahil olmak üzere çeşitli modlar aracılığıyla işlev görebilir (5). Bu durum, lncRNA'ların transkripsiyon faktörleri, sinyal yolları veya diğer kodlamayan RNA'lar ile karmaşık ve genellikle tam olarak anlaşılamayan etkileşimler yoluyla süreci destekleyebildiği veya engelleyebildiği ferroptoz yolağında özellikle önemli hale gelmektedir. Ferroptoz yolağı ve lncRNA'larla ilgili kavramsal zorluklara ek olarak, ferroptoz yolağı regülasyonunda yer alan modülatör moleküllerin kategorizasyonu da tutarsızlıklar göstermektedir. Erastin ve RSL3 gibi bazı küçük moleküller, sırasıyla sistem Xc- ve GPX4 üzerindeki etkileri nedeniyle yaygın olarak ferroptoz yolağı indükleyicileri olarak tanınırken, ferrostatin-1 ve liproksstatin-1 gibi diğerleri lipid peroksitleri temizleyerek inhibitör görevi

görür. Bununla birlikte, bu iyi karakterize edilmiş ajanların ötesinde, birçok bileşik demir metabolizması, glutatyon sentezi veya NRF2 sinyali gibi yollar aracılığıyla dolaylı olarak ferroptoz yolağını etkiler (6).

Bu bölüm, kanserde ncRNA aracılı ferroptoz yolağı düzenlemesinin altında yatan mevcut moleküler mekanizmaları aydınlatmayı ve küçük moleküllerin bu süreci modüle etmek için terapötik ajanlar olarak potansiyelini araştırmayı ve kanser tedavisinde hassasiyet için yeni bir strateji sunmayı amaçlamaktadır (Şekil 1). Bu nedenle, ferroptoz yolağının düzenlenmesinde bu moleküllerin mekanik hedeflerine ve işlevsel sonuçlarına dayalı standart bir sınıflandırma yaklaşımı benimsenmiştir. Bu sınıflandırmanın netleştirilmesi, farklı kanser türleri ve deneysel modellerdeki bulguların doğru bir şekilde yorumlanması ve karşılaştırılması için önemlidir. Bu bölümde, ferroptoz yolağının karmaşıklığı ve mevcut terapötik potansiyeli, en sık rastlanılan meme, akciğer ve karaciğer kanserlerine odaklanarak, küçük moleküllerin ve uzun kodlamayan RNA'ların kanserde ferroptoz yolağının düzenlenmesi için nasıl etkileşime girdiğine dair kapsamlı bir bakış açısı sağlayacaktır. Kitap bölümünde ferroptoz yolağı ile ilgili genel bilgilerden sonra, küçük molekül modülatörleri ve lncRNA'lar, biyolojik mekanizma ve kanser hastalığındaki rolleri sunulacaktır. Son bölümde ise kanser türlerinde ferroptoz yolağı düzenleyicilerine ilişkin son araştırma verileri karşılaştırmalı olarak verilecektir. Ayrıca mevcut araştırmalardaki boşluklar ve gelecekteki çalışmalar için potansiyel yönler vurgulanacaktır. Bu çalışma, moleküler biyoloji, farmakoloji ve kanser araştırmaları perspektiflerini bütünleştirerek, ferroptoz yolağının düzenlenmesine ilişkin bilgi sunmayı ve hedefe yönelik kanser tedavileri için yenilikçi yaklaşımlar geliştirilmesine detaylı bilgi sunmaktadır.



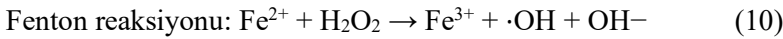
Şekil 1: Kanser tedavisinde yeni bir strateji olarak ferroptoz mekanizmasını düzenleyen lncRNA hedefleyen küçük moleküller.

1. FERROPOZ YOLAĞI

Ferroptoz, apoptoz, nekroptoz ve otofaji gibi diğer hücre ölümü biçimlerinden mekanik, morfolojik ve biyokimyasal olarak farklılık gösteren, son yıllarda tanımlanmış, demire bağlı bir düzenlenmiş hücre ölümü biçimidir. İlk olarak 2012 yılında inhibitor özellikli küçük moleküllerin yüksek verimli taranması sırasında keşfedilen ferroptoz yolağı, o zamandan beri kanser biyolojisi, nörodejenerasyon, iskemi-reperfüzyon hasarı ve enflamatuar hastalıklarda çok önemli bir süreç olarak ortaya çıkmıştır. Ferroptoz yolağının belirleyici özelliği, özellikle hücresel membranların çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) içinde lipid peroksitlerin birikmesi, membran destabilizasyonuna ve hücre lizisine yol açmasıdır (Şekil 2) (7).

alarak lipid radikalleri oluşturmasıyla başlar. Bu radikaller moleküler oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksil radikalleri üretir, bunlar da komşu PUFA'ları oksitleyerek membran hasarını artıran bir zincirleme reaksiyonu yayar. Membran fosfolipidlerinin peroksidasyona duyarlılığı büyük ölçüde açıl zinciri bileşimleri, özellikle de araşidonik asit ve adrenik asit gibi omega-6 PUFA'lardaki bis-allik hidrojen atomlarının varlığı tarafından belirlenir (9).

Demir bu süreçte merkezi bir katalitik rol oynar. Hücre içi demir hem demir (Fe^{2+}) hem de ferrik (Fe^{3+}) formlarda bulunur ve homeostazı bir protein ağı tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir. Transferrin, transferrin reseptörüne (TFR1) bağlanarak demir alımına aracılık eder ve demir daha sonra divalent metal taşıyıcı 1 (DMT1) aracılığıyla hücrelere taşınır. Hücre içinde demir ferritinde depolanabilir veya ferroportin yoluyla dışarı atılabilir. Ferroptoz yolağı, TFR1'in yukarı regülasyonu ve ferritinin aşağı regülasyonu (veya ferritinofaji yoluyla degradasyonu) kararsız demir havuzunu artırarak Fenton reaksiyonları yoluyla ROS üretimini artırır (9).



Oluşan hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) oldukça reaktiftir ve lipid peroksidasyonunu başlatır. Demirin bu redoks döngüsü ferroptoz yolağı demire bağımlılığının temelini oluşturur ve deferoksamin (DFO) gibi demir şelatörlerinin neden güçlü ferroptoz yolağı inhibitörleri olduğunu açıklar (6).

Demir, DNA sentezi, enerji metabolizması ve epigenetik düzenleme için gerekli olduğundan, kanserde özellikle agresif tümörler sıklıkla demir bağımlılığı sergiler. Bu metabolik özellik, onları ferroptoz yolağı tetikleyicilerine karşı daha savunmasız hale getirir ve seçici terapötik hedefleme için bir fırsat sunar (11).

Antioksidan savunma mekanizmaları

Hücreler, lipid peroksitlerin ve ROS'un birikmesini önlemek için antioksidan bir savunma sistemi kullanır. Bu sistemin merkezinde, indirgeyici bir kofaktör olarak glutasyonu (GSH) kullanarak lipid hidroperoksitleri (L-OOH) karşılık gelen alkollerine (L-OH) indirgeyen glutasyon peroksidaz 4 (GPX4) bulunur (12). Bu enzimatik reaksiyon, membran lipidlerindeki redoks dengesini korumak için gereklidir:



GPX4 ifadesi ve aktivitesi sıkı bir şekilde düzenlenir ve inaktivasyonu, kimyasal inhibitörlerle (örn. RSL3) veya GSH tükenmesi yoluyla kontrolsüz lipid peroksidasyonuna ve ferroptozu yol açar (13).

GSH sentezi, SLC7A11 (xCT) ve SLC3A2'den oluşan Xc-antiporter sistemi aracılığıyla ithal edilen sistin mevcudiyetine bağlıdır. Erastin gibi inhibitörler bu taşınmayı engelleyerek hücre içi sistin ve ardından GSH'yi tüketir. Bu da GPX4 işlevini tehlikeye atarak hücreleri ferroptozu karşı hassaslaştırır (13).

Son araştırmalar GPX4'ten bağımsız antioksidan sistemleri, özellikle de FSP1-CoQ10 eksenini tanımlamıştır. Eskiden AIFM2 olarak bilinen ferroptoz baskılayıcı protein 1 (FSP1), ubikinonu (CoQ10) membranlarda lipid peroksidasyonunu durduran lipofilik bir antioksidan olan ubikinole indirger. FSP1, GPX4'e paralel olarak çalışır ve ferroptoz direnci için alternatif bir mekanizma sağlar. Daha da önemlisi, FSP1'i aşırı eksprese eden kanser hücreleri ferroptotik ölümden kaçabilir ve bu da FSP1'i umut verici bir ilaç hedefi olarak işaret eder (14).

Katkıda bulunan diğer sistemler arasında tetrahidrobiopterin üretimini düzenleyen GCH1-BH4 ekseni ve antioksidan gen ifadesini ve demir metabolizmasını kontrol eden NRF2 yolu bulunmaktadır (15). Bu sistemler arasındaki etkileşim, ferroptozu karşı çok katmanlı savunmayı ve kanserde bunu terapötik olarak hedeflemenin karmaşıklığını vurgulamaktadır.

Mitokondri ve enerji metabolizması

Mitokondri, ferroptoz yolağına karşı hücresel duyarlılığın belirlenmesinde önemli düzenleyici roller oynar. Mitokondri, redoks homeostazına, demir kullanımına ve ferroptoz yolağı ile ilgili yollarla geniş metabolik akışlara katkıda bulunur (15).

Birçok çalışma, özellikle oksidatif stres veya metabolik düzensizlik altında mitokondriyal disfonksiyonun ferroptoz duyarlılığını artırdığını göstermiştir. Mitokondrinin ferroptoz yolağına birincil katkılarından biri, kompleks I ve III'teki elektron sızıntısının süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) oluşumuyla sonuçlanabildiği elektron taşıma zinciridir (ETC). Süperoksit ayrıca hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturmak için reaksiyona

girebilir ve bu da serbest Fe^{2+} varlığında lipid peroksidasyonunu yönlendiren fenton reaksiyonlarına katılır (15).

Ayrıca mitokondri, her ikisi de redoks dengesini korumak için gerekli olan NADPH ve glutatyon biyosentezinde çok önemlidir. Sitrat sentaz veya akonitaz gibi trikarboksilik asit (TCA) döngüsünde yer alan mitokondriyal enzimlerin inhibisyonu, NADPH kullanılabilirliğini azaltır ve GSH-GPX4 eksenini bozar, böylece hücreleri ferroptozla yakın hale getirir (15).

Mitokondriyal demir-kükürt kümesi biyogenezinin ferroptoz yolağını etkilediğine dair kanıtlar da vardır. Mitokondriyal demir depolanması ve kullanımının bozulması sitozolik aşırı demir yüklenmesine yol açarak ROS oluşumunu artırır. Öte yandan, bazı mitokondriyal türevli metabolitler (α -ketoglutarat gibi) lipid metabolizmasını ve demir akışını etkileyerek dolaylı olarak ferroptoz yolağına modüle edebilir (15).

Bazı kanser hücreleri, özellikle prostat kancerinde doğrudan bir GPX4 inhibitörü olan RSL3 uygulandığında, mitokondriden bağımsız ferroptotik etki sergilemektedir. Buna karşılık, GSH tükenmesine bağlı olan erastin kaynaklı ferroptoz, mitokondriyal membran potansiyelinin ve ATP üretiminin azalmasını ayrıca mitokondriyal oksidatif stresi oluşumuna neden olur (16). Bu nedenle mitokondri, bir indükleyici gibi hücrenin metabolik durumuna bağlı olarak ferroptotik sinyallerin hem sensörleri hem de amplifikatörleri olarak işlev görür.

Mitokondrinin ferroptoz yolağında rolleri giderek daha fazla araştırılmakta ve konu üzerinde bilginin derinleşmesi için daha fazla araştırma gerektiren birkaç ilgi çekici soruyu gündeme getirmektedir. Kritik sorulardan biri, özellikle bu yaklaşımın yeni bir kanser tedavisi stratejisi olarak potansiyeli göz önüne alındığında, kanser hücresi mitokondrilerinin ferroptozu indüklemek için nasıl seçici olarak hedeflenebileceğidir. Buna ek olarak, mitokondrinin hedeflenmesinin ferroptoz geçiren hücreleri kurtarıp kurtaramayacağını belirlemeye yönelik ilgi giderek artmakta ve potansiyel olarak yeni düzenleyici kontrol noktaları ortaya çıkmaktadır. Bir diğer önemli araştırma alanı, mitokondriyal metabolik yeniden programlama ve ferroptoz arasındaki ilişkiyi, özellikle de bu süreçlerin eşzamanlı olarak çalışılıp çalışmadığını ve birbirlerini etkileyip etkilemediğini içerir. Bu soruların ele alınması, mitokondrinin

ferroptoz yolağındaki çok yönlü rolüne ışık tutacak ve kanser tedavisinde ferroptozun yenilikçi uygulamalarının önünü açabilecektir (15).

ROS üretimi ve oksidatif stres

Reaktif oksijen türleri (ROS) oksijenden türetilen kimyasal olarak reaktif moleküllerdir. Hücresel metabolizmanın normal yan ürünleri olmalarına ve sinyalizasyonda rol oynamalarına rağmen, aşırı ROS birikimi DNA'ya, proteinlere ve lipitlere zarar verebilir. Ferroptoz yolağı a, özellikle lipid ROS olmak üzere membran hasarının ana yürütücüleridir (17).

Mitokondriyal ROS'a ek olarak, ferroptoz sırasında önemli bir ROS kaynağı da NADPH oksidaz (NOX) ailesidir. Bu enzimler elektronları NADPH'den moleküler oksijene aktararak süperoksit veya hidrojen peroksit oluşturur (18). NOX izoformları arasında NOX1, NOX2 ve NOX4 ferroptoz yolağı düzenlemesine dahil edilmiştir. Özellikle NOX1 aktivitesi, lipid peroksidasyonunu artırdığı kolorektal ve pankreatik kanser hücrelerinde ferroptotik duyarlılıkla ilişkilidir (18).

Oksidatif strese katkıda bulunan bir diğer unsur da fosfolipidlerdeki PUFA'ları enzimatik olarak oksitleyen lipoksijenaz (LOX) ailesidir. ALOX5 ve ALOX15 gibi LOX'lar ferroptotik sinyaller olarak işlev gören spesifik lipid hidroperoksitlerin oluşumunu kolaylaştırır. LOX'ların ferroptozda temel veya yardımcı olduğu konusunda farklı görüşler olsa da, ferroptoz eğilimli tümörlerde sıklıkla ifade seviyeleri artar ve potansiyel terapötik hedeflerdir (19).

Oksidatif stres, artmış mitokondriyal aktivite, metabolik yeniden programlama ve enflamatuar mikro ortamlar ile birçok kanser türünde meydana gelen bir özelliktir. Sonuç olarak, tümör hücreleri kronik oksidatif baskı altındadır ve bu da onları, özellikle antioksidan sistemler tehlikeye girdiğinde, daha fazla ROS aracılı lipid hasarına karşı daha savunmasız hale getirir (20). Daha da önemlisi, *GPX4*, *SLC7A11* ve *GCLM* gibi antioksidan yanıt genlerini düzenleyen NRF2 transkripsiyon faktörü, oksidatif stres adaptasyonunun ana düzenleyicisidir. NRF2 aktivasyonu normal dokuları ferroptozdan koruyabilirken, kanserlerdeki hiperaktivasyonu genellikle ferroptoz direnci de dahil olmak üzere tedavi direncine yol açar (21). Bu nedenle, ROS üretimi ve antioksidan tamponlama kapasitesi arasındaki etkileşim, ferroptoz

duyarlılığının kritik bir belirleyicisidir ve kanserde terapötik uygulamaların ana eksenini temsil eder.

Düzenlenmiş hücre ölümünün farklı bir formu olan ferroptoz yolağı, tümör malignitesini inhibe etme potansiyeli nedeniyle kanser tedavisi için umut verici bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır. Araştırmalar, lncRNA'ların epigenetik modifikasyonlar yolu ile kanser hücrelerinde ferroptoz duyarlılığını düzenlediğini göstermektedir. Bu nedenle, kanser hücrelerinin ilaç veya aday molekül uygulaması sonrası verdiği transkriptomik cevabı belirlemek teşhis ve tedavideki başarı potansiyelini artırmaktadır. Kansere yönelik bir tedavi geliştirmek için kanserdeki işlevi bozulmuş yolakların ve hücreleri kanserleşme sürecine sürükleyen moleküler mekanizmaların iyi anlaşılması gerekmektedir. lncRNA'lar, kanser biyolojisinde önemli bir düzenleyici rol oynar. Transkripsiyonel, post-transkripsiyonel ve epigenetik seviyede gen ifadesini düzenleyen lncRNA'lar, çeşitli kanserlerde onkojenik ya da tümör baskılayıcı işlevler üstlenebilir (22). Ayrıca lncRNA'lar kanser başlangıcı, metastaz ve ilaç direncinde önemli roller oynamaktadır. Bu nedenle ilaç adayları bir molekülün moleküler mekanizması ve terapötik etkinliğini belirlemeye odaklı çalışmalarda lncRNA'ların rolünün belirlenmesi de oldukça önemlidir.

2. FERROPTOZ YOLAĞI ÜZERİNE UZUN KODLAMAYAN RNA'LARIN (lncRNA) TERAPÖTİK ETKİSİ

Uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar), protein kodlamayan, uzunluğu 200 nükleotidi aşan bir RNA molekülü sınıfıdır. Bir zamanlar transkripsiyonel “gürültü” olarak dikkate alınmayan lncRNA'lar artık gen ifadesi, epigenetik modülasyon, RNA süngerleme ve protein iskelesi dahil olmak üzere çok çeşitli hücresel süreçlerde yer alan önemli düzenleyici unsurlar olarak kabul edilmektedir. Kanser hastalığında, lncRNA'lar tümör başlangıcı, ilerlemesi, metastaz ve tedaviye direnç süreçlerine katkıda bulunur (23).

Son yıllarda, lncRNA'lar ferroptoz yolağının düzenlenmesinde rol oynadığına dair çalışmalar yapılmış olup elde edilen sonuçlarda ferroptotik sinyalleme için yukarı akış modülatörleri veya aşağı akış efektörleri olarak hareket ettikleri belirlenmiştir. lncRNA'lar, öncelikle demir metabolizması proteinleri, lipid düzenleyicileri ve antioksidan sistemlerle etkileşimleri yoluyla ferroptozu teşvik edebilir veya baskılayabilir (24).

LncRNA'ların demir metabolizması üzerine etkileri

Demir metabolizması ferroptoz yolağında birincil düzenleyici eksenlerden biridir ve birkaç lncRNA'nın demir taşıma ve depolama proteinlerinin ifadesini veya stabilitesini etkilediği belirlenmiştir. Örneğin, lncRNA PVT1'in (Plazmasitoma Varyant Translokasyonu 1), TFR1 mRNA'yı stabilize ederek bazı kanserlerde demir birikimini teşvik ettiği böylece demir alımını artırdığı ve hücreleri ferroptozu duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (2). Aksine, LINC00336 gibi diğer lncRNA'lar, hidrojen sülfid metabolizmasında rol oynayan bir enzim olan CBS'yi hedefleyen miR-6852'yi süngerleştirerek ferroptoz inhibitörleri olarak hareket eder. Bu eksen aracılığıyla, LINC00336 dolaylı olarak demir homeostazını ve ROS dengesini düzenler (25). Ayrıca, lncRNA ZFAS1'in DMT1'i düzenleyerek hepatoselüler karsinomda demir alımını artırdığı, lncRNA GABPB1-AS1'in ise ferritin ağır zincir (FTH1) ifadesini baskılayarak hepatoselüler karsinomda ferroptozu sebep olduğu bildirilmiştir (26). Bu etkileşim, lncRNA'ların demir depolanması, alımı ve salınımı üzerindeki çok katmanlı etkisini göstermektedir.

LncRNA'ların lipid peroksidasyonu üzerine etkileri

Lipid peroksidasyonu ferroptoz yolağının ayırt edici bir özelliğidir ve düzenlenmesi, PUFA'ların fosfolipidlere dahil edilmesine aracılık eden ACSL4 (Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4) ve LPCAT3 gibi enzimleri içerir. LncRNA'lar bu enzimlerin ifadesini veya aktivitesini modüle edebilir, böylece oksitlenmiş lipidlerin birikimini dolaylı olarak etkileyebilir (27). Bir diğer örnek, farklı kanser türlerinde aşırı ifade edilen ve ACSL4 ifade seviyesinin baskılanmasına bağlı ferroptoz yolağının da baskılandığı gösteren lncRNA NEAT1'dir. NEAT1, aksi takdirde ACSL4 mRNA'yı hedef alan miR-34a-5p'yi süngerleştiren rakip bir endojen RNA (ceRNA) olarak işlev görür. NEAT1, bu mikroRNA'yı inhibe ederek düşük ACSL4 seviyelerini ve lipid peroksidasyonunu korur ve böylece ferroptozu baskılar (28). Bu bulgular, lncRNA'ların hücre zarlarının lipid bileşimine yaptığı etkiyi, oksidatif hasara ve hücre ölümüne duyarlılığını etkilediğini işaret etmektedir.

LncRNA'ların antioksidan savunma üzerine etkileri

LncRNA'ların ferroptoz yolağını düzenlediği önemli bir yol olan antioksidan mekanizmayı, özellikle de *GPX4*, *SLC7A11* ve *FSP1* gibi genleri

modüle etmektedir. Örneğin, lncRNA LINC00618'in SLC7A11'i baskılayarak hücreleri ferroptoz duyarlı hale getirdiği, böylece sistin alımını ve GSH sentezini bozduğu bilinmektedir (29). Ek olarak, çeşitli malignitelerde sıklıkla ifade seviyesi artan lncRNA TUG1, negatif düzenleyicilerin epigenetik susturulması yoluyla GPX4 ifadesini teşvik ederek ferroptozu inhibe eder (30). Bir başka örnek de miR-106b-5p/NRF2 eksenini üzerinden hareket eden lncRNA H19'dur. H19, ana bir antioksidan düzenleyici olan NRF2'nin ifade seviyesini artırır, böylece birkaç ferroptoz koruyucu genin transkripsiyonunu artırır ve kanser hücrelerinde oksidatif strese karşı direnç sağlar (31). LINC00472 olarak da bilinen tümör baskılayıcı lncRNA P53RRA, akciğer, karaciğer, kolon, böbrek ve meme kanserleri dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde aşağı regüle edilir. Akciğer kanserinde, sitozolde Ras GTPaz aktive edici protein bağlayıcı protein 1 (G3BP1) ile etkileşime girer. Bu sitozolik P53RRA-G3BP1 etkileşimi, p53'ü G3BP1 kompleksinden uzaklaştırır. Buna karşılık, p53 çekirdekte tutulur ve hücre döngüsünün durmasına, apoptoz ve ferroptozu yol açar. P53RRA, SLC7A11'in aşağı regülasyonu da dahil olmak üzere çeşitli metabolik genlerin transkripsiyonunu etkileyerek ferroptoz ve apoptozu teşvik eder. Ek olarak, P53RRA erastin kaynaklı ferroptozu, lipid ROS ve demir konsantrasyonlarını artırır (32).

lncRNA'ların çekirdek ferroptoz düzenleyicilerini kontrol etme potansiyeli, onları özellikle ferroptoz yolağını modüle eden küçük moleküller ile birlikte terapötik hedefleme için umut veren adaylar haline getirmektedir.

3. FARKLI KANSER TİPLERİNDE FERROPTOZ YOLAĞININ LNCRNA ARACILI DÜZENLENMESİ

Epigenetik modifikasyonlar yoluyla ncRNA'lar kanser hücrelerinde ferroptoz yolağının duyarlılığını düzenlemektedir. Ferroptoz yolağının temel mekanizmaları korunmuş olsa da düzenleyici ağlar ve ferroptozu yatkınlık kanser türleri arasında farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar dokuya özgü gen ifadesi, redoks durumu, onkojenik sinyalizasyon, demir metabolizması ve kodlamayan RNA profilleri gibi faktörler tarafından şekillendirilir. Kansere özgü ferroptoz yolağının düzenlenmesinin anlaşılması, kişiselleştirilmiş kanser tedavisinde ferroptoz yolağı temelli yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesini sağlar. Bu kapsamda meme kanseri, akciğer kanseri ve karaciğer kanseri

türlerinde ferroptozu düzenleyen lncRNA'ları hedefleyen küçük moleküllerin teşhis ve tedavide kullanım potansiyeli sunulacaktır.

Meme kanseri, dünya genelinde kadınlar arasında en yaygın görülen maligniteye sahip olup, moleküler alt tiplere göre oldukça heterojen bir yapıya sahiptir. Son yıllarda, klasik tedavi yaklaşımlarına karşı gelişen direnç mekanizmaları, alternatif hücre ölümü türlerine yönelik araştırmaları artırmıştır. Bu kapsamda, ferroptoz yolağının meme kanserinde önemli bir hedef olabileceği düşünülmektedir. Özellikle, ferroptoz yolağını düzenleyen lncRNA ve küçük moleküllerin etkileşimi, tümör hücrelerinin yaşam döngüsü, ilaç direnci ve tedaviye yanıtı üzerinde belirleyici roller üstlenmektedir (33). Gerçekleştirilen bir çalışmada lncRNA H19, embriyonik gelişim ve büyümenin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı ve çeşitli genetik bozukluklarının ortaya çıkmasıyla yakından ilişkili olduğu belirlenmiştir. lncRNA H19, birçok tümör dokusunda yüksek oranda ifade edilmektedir ve tümör gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (34). Elde edilen sonuçlar, lncRNA H19 aşırı ekspresyonunun meme kanseri hücrelerinin tümörijenik özelliklerini desteklediğini göstermiştir (35). Bu nedenle, lncRNA H19 meme kanseri tedavisi için potansiyel bir hedef olarak görülmektedir. Metforminin antitümör etki mekanizmasını araştırmayı amaçlayan bir grup araştırmacı, metforminin lncRNA H19'un ifade seviyesinin baskılanabildiğini belirlemişlerdir. Sonuçlar ayrıca metforminin lncRNA H19 aracılığıyla otofajiyi inhibe ederek ferroptozu indükleyebildiğini göstermekte, olup bu da metforminin antitümör etkisinin belirlenmesinde lncRNA H19'un rolüne ışık tutmaktadır (36).

Akciğer kanserinin en yaygın histolojik alt tipi olan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC), insan sağlığı açısından ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Bu doğrultuda, yapılan birçok çalışma geleneksel Çin bitkisi *Curcuma aromatica* Salisb.'den elde edilen ve doğal bir molekül olan β -elemene'nin, NSCLC dahil çeşitli kanser türlerinde, hücre ölüm yollarını aktive ederek, hücre döngüsünü durdurarak ve hücre proliferasyonunu baskılayarak önemli bir antikanser potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (37). β -elemene ve erlotinib kombinasyon tedavisi, ferroptoz yolağı indükleyerek erlotinib dirençli NSCLC hücrelerinin proliferasyonunu baskılamış ve kombinasyon tedavisi ile indüklenen lncRNA H19'un yüksek ekspresyonu ferroptozun düzenlenmesinde rol oynamıştır. Bu sonuçlar

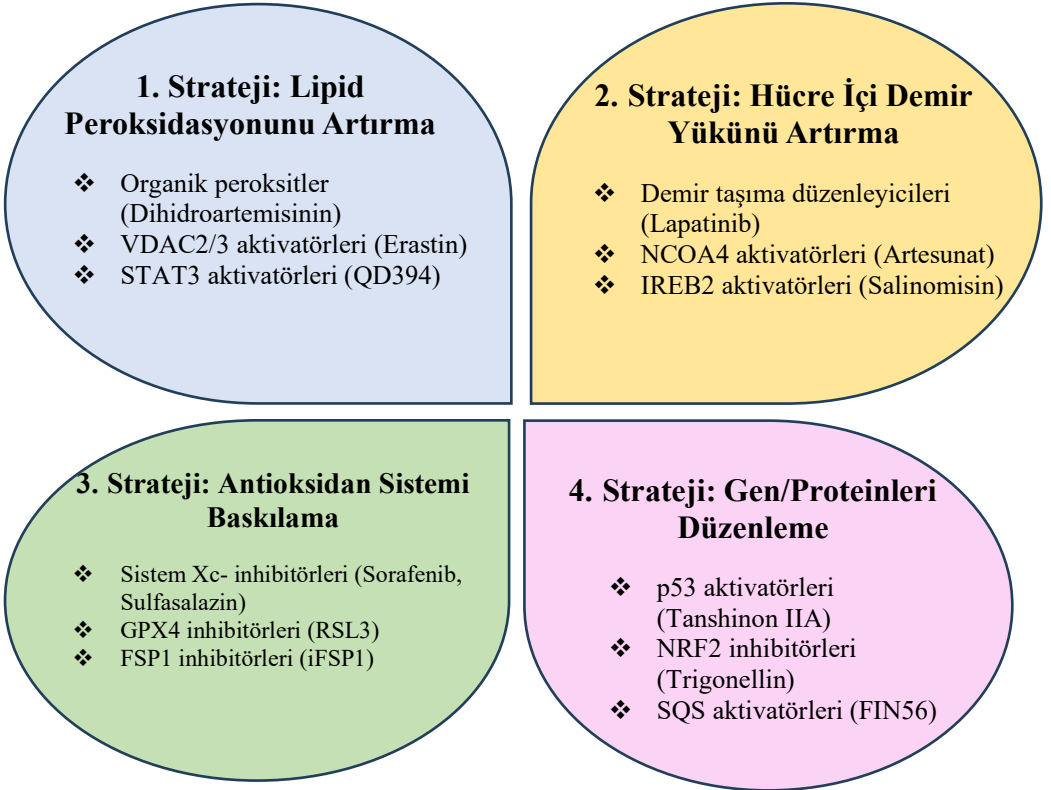
doğrultusunda, β -elemene ve erlotinib kombinasyon tedavisinin, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde lncRNA H19 aracılığıyla ferroptoz yolağını indüklediği ortaya çıkarılmıştır (38). lncRNA MNX1-AS1'in akciğer kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin gelişimi ve ilerlemesinde rol oynadığını göstermiştir. Bu bağlamda yapılan bir çalışmada lncRNA MNX1-AS1'in ifade seviyesinin düşürülmesi, NSCLC hücrelerinde RSL3 ile tetiklenen ferroptozu artırmış; buna bağlı olarak hücre canlılığı azalmış, ROS ve MDA seviyeleri yükselmiştir. Ayrıca, lncRNA MNX1-AS1'in ifade seviyesinin düşürülmesi, NSCLC hücrelerinin sınıf II FIN olan RSL3 duyarlılığını artırmıştır. Elde edilen veriler, lncRNA MNX1-AS1'in akciğer kanseri için özellikle ferroptoz yolağını indükleyici ilaçların kombinasyonunda potansiyel bir terapötik hedef olabileceğini göstermektedir (39).

Yapılan bir diğer çalışmada karaciğer kanserinde erastinin, lncRNA GABPB1-AS'nın ifade seviyesini artırdığı gösterilmiştir (40). Bu artış, lncRNA GABPB1'in translasyonunun baskılanmasına, dolayısıyla Peroxiredoxin-5 (*PRDX5*) geninin ifade seviyesinin azalmasına ve hepatosellüler karsinom (HCC) hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) hızla birikmesine yol açmıştır. Oluşan bu etki hücresel antioksidan düzeyini ve hücre canlılığını önemli seviyede inhibe etmiştir. Bu bulgular, erastin ile indüklenen ferroptoz yolağı sürecinde lncRNA GABPB1 ile antisens lncRNA GABPB1-AS1 arasında mekanistik bir ilişki olduğunu ortaya çıkarmış ve ferroptoz yolağı temelli tedaviler açısından erastin ile uyarılan HCC hücreleri için umut vaat eden terapötik hedefler sunduğunu göstermektedir (40).

Elde edilen bulgular ışığında, küçük moleküllerin ferroptoz yolağını düzenlemek için lncRNA'ları hedeflediğini ve kanser tedavisi için yeni stratejiler sunacağını göstermektedir. Bu nedenle, kanserde lncRNA aracılı ferroptoz düzenlemesinin altında yatan moleküler mekanizmayı aydınlatmayı ve küçük moleküllerin bu süreci modüle etmek için terapötik ajanlar olarak potansiyelini araştırmayı ve kanser tedavisinde hassasiyet için yeni bir strateji sunmayı amaçlamaktadır. Bu kapsamda farklı küçük moleküllerin ferroptoz yolağında etki potansiyeline dair bilgiler aşağıda sunulmuştur.

4. FERROPTOZ YOLAĞI ÜZERİNE KÜÇÜK MOLEKÜLLERİN DÜZENLEYİCİ ROLLERİ

Küçük moleküller kanser başta olmak üzere diğer hastalıklarda ferroptoz yolağını seçici olarak indükleyebilen potansiyel terapötik ajanlar olarak görev yaparlar. Küçük moleküller, sistem Xc-, GPX4, lipid metabolizması enzimleri, demir düzenleyicileri ve ROS üretim yolları dahil olmak üzere ferroptoz yolağı ile ilgili temel hedefleri doğrudan veya dolaylı olarak modüle edebilir (41). Genel olarak, ferroptoz yolağını etkileyen küçük moleküller, indükleyiciler, inhibitörler ve çoklu veya daha az tanımlanmış mekanizmalar yoluyla hareket edebilen doğal moleküller sınıfı olarak gruplandırılırlar (Şekil 3).



Şekil 3. Kanser hücrelerinde ferroptoz yolağını indükleme hedefleri ve küçük moleküller (41). Dört ana strateji, lipid peroksidasyonu artırma, demir yükünü tetikleme, antioksidan sistemi baskılama ve gen/proteinleri düzenleme üzerinden çeşitli küçük moleküller (inhibitör ve aktivatörler) ile ferroptoz indüklenmektedir.

A) Ferroptoz Yolağı İndükleyici Küçük Moleküller

Ferroptoz indükleyici moleküller (FIN) moleküler hedeflerine göre kategorize edilir (Tablo 1). Sınıf I FIN'ler esas olarak hücre içi GSH miktarını tüketir, Sınıf II FIN'ler GPX4'ü hedef alarak inaktivasyonlarını sağlar, Sınıf III FIN'ler GPX4 ve endojen antioksidan CoQ10 seviyesini düşürür, Sınıf IV FIN'ler kararsız demir havuzu (LIP)'nu artırarak veya demiri oksitleyerek lipid peroksidasyonunu indükler (42).

Tablo 1. Ferroptoz yolağını indükleyen küçük moleküllerin hedef proteinlere, etki mekanizmalarına ve ilişkili tümör tiplerine göre sınıflandırılması (42).

Hedef	Molekül/ İlaç	Etki Mekanizması	Tümör Tipi
Sınıf I FIN			
SLC7A11	Erastin	SLC7A11'i inhibe eder, sistin alımını engeller, VDAC2/3 ile birleşir.	Gliom, akciğer kanseri, fibrosarkom, melanom, meme kanseri, serviks kanseri, RCC
	Piperazin erastin	SLC7A11'i inhibe eder ve sistin alımını engeller.	Fibrosarkom
	İmidazol keton erastin	SLC7A11'i inhibe eder ve sistin alımını engeller.	DLBCL
	Sülfasalın	SLC7A11'i inhibe eder.	Meme kanseri, glioblastom, fibrosarkom, NSCLC, prostat kanseri
	Sorafenib	SLC7A11'i inhibe eder.	AML, HCC, NSCLC, RCC
	Glutamat	SLC7A11'i inhibe eder.	-

GCL	Buthionin sülfoksimin	GCL'yi inhibe eder ve GSH sentezini azaltır	Melanom, nöroblastom
GSH	Sisteinaz	Sistein ve sistini parçalayarak GSH seviyelerini azaltır.	Prostat kanseri, KLL, pankreas kanseri
	Sisplatin	GSH ile birleşerek GPX4'ü inaktive eder	Over kanseri, pankreas kanseri, NSCLC, ürotelyal kanser
Sınıf II ve III FIN			
GPX4	RSL3	GPX4'ü doğrudan inhibe eder	Fibrosarkom, NSCLC, pankreas kanseri, lösemi
	FIN56	SQS'yi aktive eder ve CoQ10'u azaltır	Fibrosarkom
	ML162 (DP17), DP112, ML210(DP110), DP113	GPX4'ü kovalent olarak inhibe eder	-
	Altretamin	GPX4'ü inhibe eder	Lenfoma, sarkom over kanseri
	FINO2	Fe ²⁺ ve PUFA'ları okside eder, ROS birikimini teşvik eder; dolaylı olarak GPX4'ü inaktive eder	Fibrosarkom
Sınıf IV FIN			
Demir	Heme	HMOX1 ekspresyonunu	Glioblastom, lösemi

		artırır ve LIP'yi yükseltir	
	Withaferin A	HMOX1 ekspresyonunu artırır, orta dozda LIP'yi yükseltir, yüksek dozda GPX4'ü inaktive eder	Meme kanseri, nöroblastom
	BAY 11-7085	HMOX1 ekspresyonunu artırır ve LIP'yi yükseltir	CRC, serviks kanseri
	Artesunat	Fe ²⁺ 'yi okside eder, ROS birikimine neden olur, ferritofajiyi indükler	Pankreas kanseri
	Dihidroartemisin	Fe ²⁺ 'yi okside eder, ROS birikimine neden olur, ferritofajiyi indükler ve ferritin sentezini inhibe eder	Over kanseri
	Siramesin, lapatinib	SLC40A1'i azaltır, transferrin ve LIP'yi artırır	Meme kanseri
	Neratinib	SLC40A1'i azaltır, transferrin ve LIP'yi artırır	Meme kanseri, CRC
	Salinomisin	SLC40A1'i azaltır, transferrin ve LIP'yi artırır	Çeşitli solid tümör tipleri
Diğer			
ROS	BAY 87-2243	Mitokondriyal kompleks I ile birleşerek ROS üretimini artırır	NSCLC

FSP1	FSP1	CoQ10'un FSP1 tarafından indirgenmesini inhibe eder	Fibrosarkom, NSCLC
HMGCR	Statinler	Lipidler düşürücü ajan olarak CoQ10'la birleşir; onkoloji denemelerinde	Meme kanseri, AML, HCC, MM, fibrosarkom, NSCLC
Nrf2	Trigonellin, brusatol	Nrf2'yi inhibe eder	HCC, NSCLC

• Erastin

Erastin ilk tanımlanan sınıf I FIN grubundadır. Sistem Xc'nin fonksiyonel alt birimi olan SLC7A11'i inhibe ederek hücre içi sistin seviyesini düşürmektedir. Böylece glutatyon sentezini ve GPX4 aktivitesi azalır. Ortaya çıkan dengesiz ortam ROS birikimine ve lipid peroksidasyonuna yol açar. Sonuç olarak erastin, ferroptotik hücre ölümünü tetikler (42).

• RSL3

RSL3, GPX4'e doğrudan bağlanarak inhibe eder ve bu duruma bağlı olarak lipid peroksitlerin hızla birikmesine neden olan güçlü bir Sınıf II ferroptoz yolağı indükleyicisidir. Erastinin aksine, RSL3 sistem Xc'yi atlar ve GSH açısından zengin ortamda etkinlik gösterir. RSL3 özellikle yüksek PUFA içeriğine ve düşük antioksidan kapasiteye sahip hücre hatlarında etkilidir (43).

• FIN56

FIN56, iki yönlü mekanizma ile ferroptoz yolağını indükler. Bunlar, GPX4 degradasyonu ile ROS üretimini artırır ve koenzim Q10 azalmasını teşvik ederek antioksidan savunmasının bozulmasıdır. Böylece FIN56, hücreyi ferroptotik ölüme götüren önemli bir sınıf III FIN grubunda yer almaktadır (44).

- **Withaferin A**

Kanser hücreleri, normal hücrelere kıyasla demire daha fazla ihtiyaç duyar. Bu nedenle artmış demir bağımlılığı, kanser hücrelerini ferroptoz yolağı indüksiyonuna karşı daha duyarlı hale getirir. Withaferin A gibi sınıf IV FIN'ler, hücre içi serbest demir havuzunu (LIP) veya demir oksit düzeylerini artırarak lipid peroksit üretimini teşvik eder ve böylece ferroptozu tetikleyerek kanser tedavisinde yeni tedavi yaklaşım olanağı sunar. Withaferin A, GPX4'ü inaktive etmenin yanı sıra HMOX1 aracılığıyla hem hücre içi yıkımı artırarak LIP düzeyini yükseltir hem de ferroptoz sürecini başlatır (42).

B)Ferroptoz İnhibitörü Küçük Moleküller

- **Ferrostatin-1 (Fer-1)**

Fer-1, lipid peroksit radikallerini baskılayarak ferroptoz yolağını inhibe eden lipofilik bir radikal yakalayıcı antioksidandır. Membran lipid oksidasyonunu önler ve ferroptozu karşı korur. Fer-1, hücreleri GPX4 inhibisyonu ile indüklenen ferroptoz sürecinden kurtardığı da gösterilmiştir (45).

- **Liproksstatin-1**

Liproksstatin-1, Fer-1 ile benzer mekanizma ile çalışır ancak daha iyi stabiliteye ve etkinliğe sahiptir. Liproksstatin-1, GPX4 eksikliği olan hücrelerde lipid ROS birikimini engelleyerek önemli bir ferroptoz inhibitörü olarak görev yapar (46, 47).

- **Deferoksamin (DFO)**

DFO, kararsız demir havuzunu azaltan ve Fenton reaksiyonu kaynaklı ROS oluşumunu sınırlayan bir demir şelatörüdür. Ferroptoz ölüm yoluna spesifik değildir ancak demir katalizli lipid peroksidasyonunu etkili bir şekilde önler (48).

Sonuç olarak ferroptoz inhibitörleri öncelikle kanser gibi birçok hastalıkta ferroptotik yanıtın özgüllüğünü araştırmak ve nörodejenerasyon ve iskemik hasar gibi ferroptozun doku hasarına neden olduğu hastalıklarda potansiyel etkin moleküller olarak kullanılır. Aynı zamanda ferroptoz inhibitörleri, kanser tedavisi sırasında hedef dışı kanserli olmayan dokuları ferroptozdan korumak için de kritik öneme sahiptir (49).

C) Biyolojik Organizmalardan Elde Edilen Moleküllerin Ferroptoz Yolağı Üzerindeki Etki Profili

Biyolojik organizmalardan (bitki, mantar vb.) elde edilen çok sayıda molekül, ferroptoz modülatörleri olarak tanımlanmış ve kanser başta olmak üzere birçok hastalık modelinde yeni tedavi stratejisi oluşturulması için potansiyelleri değerlendirilmiştir (50).

- **Atranorin**

Atranorin, glioblastoma ve üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde ferroptoz yolağı indükleyicisi olarak likenlerden elde edilen bir sekonder metabolit olduğu gerçekleştirilen çalışmalar ile belirlenmiştir (51, 52) Atranorin meme kanseri hücrelerinde demir, lipid peroksidasyonu ve ROS seviyelerini arttırdığı ve T-GSH/GSSG oranını azalttığı belirlenmiştir (51). Sonuç olarak, atranorinin glutatyon yolunu ve ferroptoz yolağını indükleyerek anti-kanser etki potansiyeli ortaya konmuştur (51).

- **Vulpinik asit**

Liken türlerinden izole edilen bir başka molekül olan vulpinik asit, pro-oksidan ve anti-proliferatif etki göstermektedir (53). Yapılan çalışmada vulpinik asitin luminal A meme kanserinde lipid reaktif oksijen türlerini, lipid peroksidasyonunu ve hücre içi Fe^{2+} düzeyini artırırken glutatyon düzeyini azaltarak ferroptoz yolağını indüklediği gösterilmiştir (53). Çalışma sonucunda elde edilen bulgular, anti-neoplastik bir ajan olan vulpinik asitin ferroptoz yolağı üzerinden luminal A hedefli meme kanserini potansiyel olarak tedavi edebileceğini göstermektedir (53).

- **Kurkumin**

Kurkumin, *Zingiber officinale*'den elde edilen bir diarilheptanoid kurkuminoiddir. Kurkumin güçlü antikanser, antibiyotik, antienflamatuar, antioksidan ve yaşlanma karşıtı özellikler göstermektedir (54). Yapılan bir çalışmada, küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerinin kurkumin uygulaması ile Beclin-1 ve LC3 seviyelerinde artış ve p62 seviyelerinde azalma yoluyla ferroptozu tetiklediği belirlenmiştir. Ayrıca, GPX4, SLC7A11 ve GSH seviyeleri azalırken demir, ROS ve lipid peroksidasyon seviyeleri önemli ölçüde artmıştır (55).

- **Kapsaisin**

Kapsaisin, homovanillik asitten türetilen bir benzil alkaloid olup Solanaceae familyasına ait Capsicum cinsi bitkilerden elde edilir (56). Yapılan çalışmalar, bu molekülün SLC7A11/GPX4 yolu üzerinden ferroptoz yolağını indüklediğini ortaya koymuştur. Özellikle, küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hatlarında yapılan analizlerde, kapsaisin uygulamasının hücre canlılığını azalttığı, toplam Fe²⁺ düzeyini artırdığı, *SLC7A11* ve *GPX4* mRNA düzeylerini düşürdüğü ve glutatyon içeriğini azalttığı gösterilmiştir (57).

Ferroptoz yolağı hedefli tedavi yaklaşımı, geleneksel tedavi uygulamalarına göre dirençli kanser hücrelerini ortadan kaldırmak için umut verici bir yaklaşım sunar. Özellikle glutatyon metabolizması, demir homeostazı ve antioksidan savunma mekanizmaları gibi yaşamsal süreçlere bağımlı olan kanser hücreleri, ferroptoz yolağının hedeflenmesiyle seçici biçimde yok edilebilir. Bu da kemoterapiye direnç, nüks ve metastaz gibi onkolojideki temel problemlere yeni çözümler geliştirilmesini mümkün kılar. Ferroptoz yolağını kontrollü şekilde aktive edebilen veya baskılayabilen moleküllerin keşfi, yalnızca kanser tedavisinde etkinliği artırmakla kalmaz aynı zamanda sağlıklı dokuların korunması ve yan etkilerin azaltılması açısından da stratejik bir avantaj sağlar. Bu nedenle ferroptoz yolağının kanserde daha derinlemesine anlaşılması, hem moleküler hedefli tedavilerin geliştirilmesi hem de kişiselleştirilmiş onkolojik yaklaşımların önünü açmak adına büyük önem taşımaktadır.

5. KANSER TEDAVİSİNDE FERROPTOZ YOLAĞININ KLİNİK KULLANIM POTANSİYELİ

Ferroptoz yolağı, çeşitli kanserlerde, özellikle de apoptoz ve geleneksel kemoterapötik ajanlara karşı direnç geliştirmiş tümörlerde alternatif terapötik stratejiler sunabilecek yeni bir programlı hücre ölümü biçimi olarak giderek daha fazla kabul görmektedir. Demir metabolizması ve lipid peroksidasyonuna bağımlılığı, meme, akciğer ve karaciğer kanserleri gibi düzensiz oksidatif stres yolları sergileyen kanserler için özellikle önemlidir. Son yıllarda gerçekleştirilen araştırmalar, ferroptoz yolağının düzenlenmesinde küçük moleküllerin ve uzun kodlamayan RNA'ların rolünün belirlenmesi üzerine odaklanmaktadır. Ferroptoz yolağını düzenleyen *GPX4*, *SLC7A11*, *ACSL4* ve *FSP1* gibi gen ve moleküllerin modülasyonu yoluyla, kanser hücrelerinin

hassasiyetinin artırılabilceğine dair veriler elde edilmiştir. Örneğin meme kanserinde, metforminin lncRNA H19'un ifadesini azaltabildiğini ve otofajinin baskılanması yoluyla ferroptoz yolağını indükleyebildiğini göstermektedir (36). Benzer şekilde, NSCLC hücrelerinde lncRNA H19 ve lncRNA MNX1-AS1 özellikle RSL3 ve β -elemene gibi küçük moleküller ile birlikte kullanıldığında, ferroptotik duyarlılığı önemli ölçüde etkilediği gösterilmiştir (38). Hepatoselüler karsinom üzerine gerçekleştirilen bir çalışmada, lncRNA GABPB1-AS1, erastin uygulamasını takiben PRDX5 ifadesini baskılayarak ferroptozu artırdığı, ROS birikimine ve hücre canlılığının azalmasına yol açtığı belirlenmiştir (40). Ferroptoz yolağının kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarında umut veren stratejik hedef olabileceğini işaret etmektedir. Ancak, elde edilen bulguların klinik uygulamalara aktarılmasında bazı zorluklar devam etmektedir. Bu zorluklar arasında güvenilir ferroptoz yolağı biyobelirteçlerinin eksikliği, tümöre özgü ferroptoz yolaklarının sınırlı düzeyde anlaşılması ve kanserli olmayan dokularda lipid peroksidasyonuna bağlı potansiyel toksisite riskleri yer almaktadır. lncRNA'ların küçük moleküllerle etkileşerek ferroptoz yolağını nasıl modüle edebildiğini ve bu etkileşimin moleküler mekanizmasının belirlenmesini ve klinik uygulamalar üzerine daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Bu alanda umut veren ilerlemeler olmasına rağmen, çalışmaların çoğu *in vitro* veya erken *in vivo* modellerle sınırlı kalmıştır. Bu nedenle, gelecekteki çalışmalar, bu düzenleyici ağların terapötik uygulanabilirliğini ve güvenilirliğini değerlendirebilmek için, hastadan türetilmiş ksenograft modelleri veya klinik biyopsi örnekleri üzerine odaklı çalışmalara yönelmelidir.

SONUÇ

Ferroptoz yolağı üzerine odaklı stratejiler klinik uygulamalara henüz entegre edilmemiş olsa da, mekanistik ve deneysel bulgular bu hücre ölüm biçiminin mevcut kanser tedavilerini önemli ölçüde güçlendirebileceğini göstermektedir. Ferroptoz yolağı, apoptoz veya immün terapiye dirençli kanser hücrelerini ortadan kaldırmak için kullanılabilecek benzersiz bir hücre ölümü tipidir. Demir, lipid metabolizması ve redoks dengesine duyarlılığı, ferroptozla bağlı olan ölüm yolunu farklı metabolik profillere ve tümör mikro ortamlarına son derece uyarlanabilir hale getirmekte olup bu da geleneksel tedavilere göre önemli bir avantaj sunmaktadır. Küçük moleküllerin ve lncRNA'ların ikili

düzenleyici rolleri ve kritik ferroptoz yolağında görev alan genler ve proteinler üzerindeki etkileri, çok hedefli terapötik strateji planlamalarına yol açmaktadır. Hem küçük molekül modülatörlerini hem de lncRNA'ları birlikte kullanan tedaviler, sinerjik etki sağlayarak tümör baskılanmasını en üst düzeye çıkarırken ilaç direnci ve yan etkileri en aza indirebilmektedir. Ayrıca, ferroptoz yolağının bağışıklık sistemiyle olan etkileşiminin daha derinlemesine anlaşılması, bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri veya kanser aşıları ile kombinasyon tedavilerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Bu yaklaşım yalnızca ferroptoz yolağının terapötik etkinliğini artırmakla kalmaz, aynı zamanda bağışıklık sistemi tarafından zayıf şekilde tanınan tümörlerin daha güçlü immün yanıtlarla hedeflenmesini mümkün kılarak, immün aracılı tümör eliminasyonunu desteklemektedir.

Gelecekte ferroptoz yolağının terapötik potansiyelini yansıtacak çalışma alanları arasında ilk olarak, farklı kanser türlerinde ferroptoz yolağı ile ilişkili lncRNA'ların sistematik bir haritalamasıdır. Yüksek verimli dizileme, CRISPR tabanlı tarama ve kapsamlı transkriptomik analizler, ferroptoz direnci veya duyarlılığına dahil olan yeni lncRNA'ları tanımlamasına imkan verecektir. İkinci olarak, ferroptoz ile otofaji ve apoptoz gibi diğer hücre ölüm yolları arasındaki etkileşim özellikle lncRNA düzeyinde daha fazla dikkat edilmelidir. Bu ölüm yollarının etkileşime girme profilinin anlaşılması, birden fazla ölüm mekanizmasını aynı anda modüle eden kombinasyon tedavilerinin geliştirilmesine olanak sunacaktır. Üçüncü olarak, ferroptoz yolağı için güvenilir biyobelirteçlerin geliştirilmesine yönelik gittikçe artan bir ihtiyaç bulunmaktadır. Ferroptoz yolağı duyarlılığını öngörebilecek lncRNA veya metabolik belirteçlere dayalı biyolojik göstergelerin tanımlanmasını içeren çalışmalar önem kazanacaktır. LncRNA temelli biyobelirteçler, hasta sınıflandırması ve tedaviye yanıtın izlenmesi açısından büyük önem taşıyacaktır. Son olarak, ilaç geliştirme araştırmaları ve denemeleri ferroptoz yolağı modülatörlerinin dağıtımını ve özgüllüğünü desteklemelidir. Nanopartikül bazlı ilaç taşıma sistemleri veya tümöre özgü lncRNA hedefli tedaviler, hedef dışı etkileri en aza indirirken terapötik etkinliği artıracaktır. Böylece, hipoksi ve immün infiltrasyon gibi tümör mikroçevre faktörlerinin ferroptoz duyarlılığını şekillendirmedeki rolünün belirlenmesi mümkün olacaktır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma TUBİTAK 125Z245 nolu proje ve 2022-1-TR01-KA220-VET-000088373 kodlu Avrupa Birliği Projesi tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Wu Y, Yu C, Luo M, Cen C, Qiu J, Zhang S, et al. Ferroptosis in Cancer Treatment: Another Way to Rome. *Front Oncol.* 2020, 25;10:571127.
2. Wen Y, Lei W, Zhang J, Liu Q, Li Z. Advances in understanding the role of lncRNA in ferroptosis. *PeerJ.* 2024;12(8).
3. Zheng J, Guo J, Wang Y, Zheng Y, Zhang K, Tong J. Bioinformatic Analyses of the Ferroptosis-Related lncRNAs Signature for Ovarian Cancer. *Front Mol Biosci.* 2022, 18;8:735871.
4. Lei P, Bai T, Sun Y. Mechanisms of Ferroptosis and Relations With Regulated Cell Death: A Review. *Front Physiol.* 2019, 10(FEB):139.
5. Mattick JS, Amaral PP, Carninci P, Carpenter S, Chang HY, Chen LL, et al. Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2023, 3;24(6):430–47.
6. Du Y, Guo Z. Recent progress in ferroptosis: inducers and inhibitors. *Cell Death Discovery.* 2022, 29;8(1):1–10.
7. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell.* 2012, 25;149(5):1060–72.
8. KEGG Pathway Database. Ferroptosis – Homo sapiens (human). Kyoto (Japan): Kyoto University Bioinformatics Center; c1995–2024.
9. Rochette L, Dogon G, Rigal E, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Lipid Peroxidation and Iron Metabolism: Two Corner Stones in the Homeostasis Control of Ferroptosis. *International Journal of Molecular Sciences* 2023. 2022, 27;24(1):449.
10. He YJ, Liu XY, Xing L, Wan X, Chang X, Jiang HL. Fenton reaction-independent ferroptosis therapy via glutathione and iron redox couple sequentially triggered lipid peroxide generator. *Biomaterials.* 2020, 1;241:119911.
11. Brown RAM, Richardson KL, Kabir TD, Trinder D, Ganss R, Leedman PJ. Altered Iron Metabolism and Impact in Cancer Biology, Metastasis, and Immunology. *Front Oncol.* 2020, 9;10:476.

12. Costa I, Barbosa DJ, Benfeito S, Silva V, Chavarria D, Borges F, et al. Molecular mechanisms of ferroptosis and their involvement in brain diseases. *Pharmacol Ther.* 2023, 1;244:108373.
13. Zhang W, Liu Y, Liao Y, Zhu C, Zou Z. GPX4, ferroptosis, and diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2024, 1;174:116512.
14. Bersuker K, Hendricks JM, Li Z, Magtanong L, Ford B, Tang PH, et al. The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis. *Nature.* 2019, 21;575(7784):688–92.
15. Liu Y, Lu S, Wu L lei, Yang L, Yang L, Wang J. The diversified role of mitochondria in ferroptosis in cancer. *Cell Death & Disease.* 2023, 14;14(8):1–12.
16. Ghoochani A, Hsu EC, Aslan M, Rice MA, Nguyen HM, Brooks JD, et al. Ferroptosis inducers are a novel therapeutic approach for advanced prostate cancer. *Cancer Res.* 2021, 1;81(6):1583–94.
17. Endale HT, Tesfaye W, Mengstie TA. ROS induced lipid peroxidation and their role in ferroptosis. *Front Cell Dev Biol.* 2023, 1;11:1226044.
18. Laurent E, McCoy JW, Macina RA, Liu W, Cheng G, Robine S, et al. Nox1 is over-expressed in human colon cancers and correlates with activating mutations in K-Ras. *International journal of cancer.* 2008, 1;123(1):100.
19. Xie B, Guo Y. Molecular mechanism of cell ferroptosis and research progress in regulation of ferroptosis by noncoding RNAs in tumor cells. *Cell Death Discovery.* 2021, 12;7(1):1–10.
20. Kuo CL, Ponneri Babuharisankar A, Lin YC, Lien HW, Lo YK, Chou HY, et al. Mitochondrial oxidative stress in the tumor microenvironment and cancer immunoescape: foe or friend? *J Biomed Sci.* 2022, 1;29(1):74.
21. Song X, Long D. Nrf2 and Ferroptosis: A New Research Direction for Neurodegenerative Diseases. *Front Neurosci.* 2020, 21;14:484266.
22. Jiang MC, Ni JJ, Cui WY, Wang BY, Zhuo W. Emerging roles of lncRNA in cancer and therapeutic opportunities. *Am J Cancer Res.* 2019, 9(7):1354.
23. Ahmad M, Weiswald LB, Poulain L, Denoyelle C, Meryet-Figuire M. Involvement of lncRNAs in cancer cells migration, invasion and

- metastasis: cytoskeleton and ECM crosstalk. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2023, 18;42(1):1–14.
24. Ou S, Nie X, Qiu X, Jin X, Wu G, Zhang R, et al. Deciphering the mechanisms of long non-coding RNAs in ferroptosis: insights into its clinical significance in cancer progression and immunology. *Cell Death Discovery*. 20, 18;11(1):1–10.
 25. Wang M, Mao C, Ouyang L, Liu Y, Lai W, Liu N, et al. Long noncoding RNA LINC00336 inhibits ferroptosis in lung cancer by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell Death & Differentiation*. 2019, 20;26(11):2329–43.
 26. Ju Y, Lv Y, Liu X, Lu J, Shi Y, Guo H, et al. Role of long non-coding RNAs in the regulation of ferroptosis in tumors. *Front Immunol*. 2025, 16:1568567.
 27. Ding K, Liu C, Li L, Yang M, Jiang N, Luo S, et al. Acyl-CoA synthase ACSL4: an essential target in ferroptosis and fatty acid metabolism. *Chin Med J*. 2023, 5;136(21):2521–37.
 28. Li K, Yao T, Zhang Y, Li W, Wang Z. NEAT1 as a competing endogenous RNA in tumorigenesis of various cancers: Role, mechanism and therapeutic potential. *Int J Biol Sci*. 2021, 17(13):3428–40.
 29. Wang Z, Chen X, Liu N, Shi Y, Liu Y, Ouyang L, et al. A Nuclear Long Non-Coding RNA LINC00618 Accelerates Ferroptosis in a Manner Dependent upon Apoptosis. *Molecular Therapy*. 2020, 29(1):263.
 30. Zhan M, Xu H, Yu G, Chen Q, Yang R, Chen Y, et al. Androgen receptor deficiency-induced TUG1 in suppressing ferroptosis to promote benign prostatic hyperplasia through the miR-188-3p/GPX4 signal pathway. *Redox Biol*. 2024.
 31. Zhang R, Pan T, Xiang Y, Zhang M, Xie H, Liang Z, et al. Curcumenol triggered ferroptosis in lung cancer cells via lncRNA H19/miR-19b-3p/FTH1 axis. *Bioact Mater*. 2022, 1;13:23–36.
 32. Balihodzic A, Prinz F, Dengler MA, Calin GA, Jost PJ, Pichler M. Non-coding RNAs and ferroptosis: potential implications for cancer therapy. *Cell Death & Differentiation*. 2022, 14;29(6):1094–106.
 33. Ge A, He Q, Zhao D, Li Y, Chen J, Deng Y, et al. Mechanism of ferroptosis in breast cancer and research progress of natural

- compounds regulating ferroptosis. *J Cell Mol Med.* 2023, 1;28(1):e18044.
34. Matouk IJ, Halle D, Raveh E, Gilon M, Sorin V, Hochberg A. The role of the oncofetal H19 lncRNA in tumor metastasis: orchestrating the EMT-MET decision. *Oncotarget.* 2015, 7(4):3748.
 35. Lottin S, Adriaenssens E, Dupressoir T, Berteaux N, Montpellier C, Coll J, et al. Overexpression of an ectopic H19 gene enhances the tumorigenic properties of breast cancer cells. *Carcinogenesis.* 2002, 1;23(11):1885–95.
 36. Chen J, Qin C, Zhou Y, Chen Y, Mao M, Yang J. Metformin may induce ferroptosis by inhibiting autophagy via lncRNA H19 in breast cancer. *FEBS Open Bio.* 2022, 1;12(1):146–53.
 37. Zhai B, Zhang N, Han X, Li Q, Zhang M, Chen X, et al. Molecular targets of β -elemene, a herbal extract used in traditional Chinese medicine, and its potential role in cancer therapy: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2019, 1;114:108812.
 38. Xu C, Jiang ZB, Shao L, Zhao ZM, Fan XX, Sui X, et al. β -Elemene enhances erlotinib sensitivity through induction of ferroptosis by upregulating lncRNA H19 in EGFR-mutant non-small cell lung cancer. *Pharmacol Res.* 2023.
 39. Chi X, Feng L, Wang L, Yu S, Wei M, Zhang Q, et al. Downregulation of lncRNA MNX1-AS1 promotes the ferroptosis and apoptosis of non-small cell lung cancer. *Int J Med Sci.* 2025, 22(5):1052–63.
 40. Qi W, Li Z, Xia L, Dai J, Zhang Q, Wu C, et al. LncRNA GABPB1-AS1 and GABPB1 regulate oxidative stress during erastin-induced ferroptosis in HepG2 hepatocellular carcinoma cells. *Scientific Reports.* 2019, 7;9(1):1–12.
 41. Yin L, Liu P, Jin Y, Ning Z, Yang Y, Gao H. Ferroptosis-related small-molecule compounds in cancer therapy: Strategies and applications. *Eur J Med Chem.* 2022, 15;244:114861.
 42. Nie Q, Hu Y, Yu X, Li X, Fang X. Induction and application of ferroptosis in cancer therapy. *Cancer Cell International.* 2022, 7;22(1):1–19.
 43. Yuan J, Liu C, Jiang C, Liu N, Yang Z, Xing H. RSL3 induces ferroptosis by activating the NF- κ B signalling pathway to enhance the

- chemosensitivity of triple-negative breast cancer cells to paclitaxel. *Sci Rep*. 2025, 1;15(1):1654.
44. Zhang X, Guo Y, Li H, Han L. FIN56, a novel ferroptosis inducer, triggers lysosomal membrane permeabilization in a TFEB-dependent manner in glioblastoma. *J Cancer*. 2021, 12(22):6610.
45. Skouta R, Dixon SJ, Wang J, Dunn DE, Orman M, Shimada K, et al. Ferrostatins inhibit oxidative lipid damage and cell death in diverse disease models. *J Am Chem Soc*. 2014, 26;136(12):4551–6.
46. Fan BY, Pang YL, Li WX, Zhao CX, Zhang Y, Wang X, et al. Liproxstatin-1 is an effective inhibitor of oligodendrocyte ferroptosis induced by inhibition of glutathione peroxidase 4. *Neural Regen Res*. 2020, 1;16(3):561.
47. Zilka O, Shah R, Li B, Friedmann Angeli JP, Griesser M, Conrad M, et al. On the Mechanism of Cytoprotection by Ferrostatin-1 and Liproxstatin-1 and the Role of Lipid Peroxidation in Ferroptotic Cell Death. *ACS Cent Sci*. 2017, 3(3):232–43.
48. Wang S, Luo J, Zhang Z, Dong D, Shen Y, Fang Y, et al. Iron and magnetic: new research direction of the ferroptosis-based cancer therapy. *Am J Cancer Res*. 2018, 8(10):1933.
49. Angeli JPF, Shah R, Pratt DA, Conrad M. Ferroptosis Inhibition: Mechanisms and Opportunities. *Trends Pharmacol Sci*. 2017, 1;38(5):489–98.
50. Zheng K, Dong Y, Yang R, Liang Y, Wu H, He Z. Regulation of ferroptosis by bioactive phytochemicals: Implications for medical nutritional therapy. *Pharmacol Res*. 2021, 1;168:105580.
51. Ensoy M, Cansaran-Duman D. Targeting Ferroptosis with Small Molecule Atranorin (ATR) as a Novel Therapeutic Strategy and Providing New Insight into the Treatment of Breast Cancer. *Pharmaceuticals*. 2024, 1;17(10):1380.
52. Majchrzak-Celińska A, Kleszcz R, Studzińska-Sroka E, Łukaszyk A, Szoszkiewicz A, Stelcer E, et al. Lichen Secondary Metabolites Inhibit the Wnt/ β -Catenin Pathway in Glioblastoma Cells and Improve the Anticancer Effects of Temozolomide. *Cells*. 2022, 1;11(7):1084.
53. Alkan AH, Ensoy M, Cansaran-Duman D. A new therapeutic strategy for luminal A-breast cancer treatment: vulpinic acid as an anti-

- neoplastic agent induces ferroptosis and apoptosis mechanisms. *Medical Oncology*. 2024, 1;41(9).
54. Kotha RR, Luthria DL. Curcumin: Biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects. *Molecules*. 2019, 13;24(16).
55. Tang X, Ding H, Liang M, Chen X, Yan Y, Wan N, et al. Curcumin induces ferroptosis in non-small-cell lung cancer via activating autophagy. *Thorac Cancer*. 2021, 13;12(8):1219–30.
56. Chapa-Oliver AM, Mejía-Teniente L. Capsaicin: From Plants to a Cancer-Suppressing Agent. *Molecules*. 2016, 27;21(8):931.
57. Liu XY, Wei DG, Li RS. Capsaicin induces ferroptosis of NSCLC by regulating SLC7A11/GPX4 signaling in vitro. *Sci Rep*. 2022, 12(1):11996.

BÖLÜM 3

KANSER TEDAVİSİNDE ZEİN TABANLI NANOTAŞIYICILAR

Aslıhan AKKAYA¹, Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN^{2*}

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.17113829>

¹ Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, Türkiye,

² Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, Türkiye,
dcansaran@yahoo.com

*Sorumlu Yazar: Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN

1.GİRİŞ

Yeşil kaynaklar (bitkisel ve tarım kaynaklı maddeler), uygun maliyetiyle, elde edilebilirlik kolaylığıyla, yenilenebilir olması ve kolay işlenebilirliği gibi avantajlarından dolayı umut vericidir. Özellikle tarım kaynaklarından elde edilen bitki kaynaklı atıkların kullanılabilir olması ve değerlendirme çalışmaları bu yönden devam etmektedir. Zein, tarımda mısır mahsulü atıklarından elde edilir ve birçok kullanım özelliğiyle zeinin gıda ve sağlık gibi endüstrisi gibi birçok alanda kullanımı ile ilgili çalışmalar vardır (1).

Günümüzde modern ilaçların formülasyonunda bulunan başlıca farmasötik bileşiklerin ve türevlerinin %25'i doğal kaynaklardan elde edilmektedir. Bitkisel kaynaklardan elde edilen proteinlerin sağlık alanında ilaç taşıma sistemlerinde ve doku mühendisliğindeki kullanımı umut vericidir. Zein, tarımsal mısır mahsullerinin ekstraksiyonundan veya yan ürün işlenmesinden kaynaklanan endüstriyel atıklardan elde edilmektedir (2). Zein hammaddesi elde edilebilirliği yüksek ve işlenmesi kolay bir hammaddedir. Sağlık endüstrisinde ilaç iletim sistemlerinde kullanılmasının ana sebebi hem hidrofobik hem de hidrofilik malzeme veya ilaçlarla etkileşimi sağlayabilen yapıda olmasıdır. Biyoyumlu, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve amfifiliklik gibi olumlu özelliklerle karakterizedir. Bu özellikler ile 1985 yılında Genel Olarak Güvenli Olarak Tanınan (GRAS) sınıfa giren Zein, tıbbi kullanımlarda etkili ve güvenli bir biyomateryal olabileceği gösterilmiştir (3,4).

Kansere yönelik tedavilerde en bilinen yöntemler olarak cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi kullanılmaktadır (5). Kanseri tedavisinde, antikanser kemoterapötik ilaçlar, kanser hastaları için umut vadeden ve hastalığın tedavisinde ilerlemeyi önleyerek hastalığın seyrinde kritik önem taşıyan geleneksel tedavilerden biridir. Bu nedenlerle günümüzde kemoterapi kanser tedavisinde halen en sık başvuru yöntemlerinden biridir. Ancak, birincil tedavi yöntemi ve yaşam kalitesini arttırmaya yönelik etkisinin yanında çeşitli dezavantajları da beraberinde getirmektedir (6). Kemoterapötikler, hücre proliferasyonu ve tümör gelişimini engelleyerek metastazı engeller. Normal hücrelere de bu yönlü etkileri olması ise kemoterapinin birincil dezavantajlarından biridir. Bu ilaçlar, kardiyotoksisite, miyelotoksisite ve böbrek toksisitesi gibi yan etkiler yaratırlar (7). Bazı kemoterapötik ilaçların büyük moleküler yapıda olması sebebiyle damar sisteminden (40-50 mm) geçemez ve bu durum çoklu ilaç direncine (MDR) yol açabilir (8). İlaçların

çözünürlük sorunu ve düşük biyoyararlanımı gibi durumlar sonucunda ilacın etkinliği düşer ve etkili bir tedavi gerçekleşmez. Temel olarak bu nedenlerden dolayı Faz I klinik aşamadaki kemoterapötik ilaçların %95'inden fazlası Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayı alamadığı bildirilmiştir (9). Bu tedavi yöntemi kanserin ilerlemesini önlemeye yöneliktir ve etkili bir çözüm sunmaz. Kanser metastaz yaptığında, çoğu standart terapötiklerin etkinliği yetersiz kalmaktadır. Bu nedenlerle etkili ve güvenli tedavi biçimleri bulmak kritik öneme sahiptir.

Nanoteknolojinin kemoterapötik ilaç dağıtımının bir yolu olarak kullanılması ile kanser hücrelerini spesifik hedefleyen, kanser mikroçevresini tanıyıp birikim gösterebilen ve bu yollarla ilaçların etkinliğini arttıran, geleneksel tedavilerdeki başlıca sorunların üstesinden gelebilen yeni bir teknoloji doğmuştur (9). Bu nedenle kanser tedavisinde nanopartiküller, ilgi çekici konu olmaya başlamıştır. Son yıllarda artan araştırmalar, kemoterapötik ilaçların etkinliğini arttırmak üzere farklı nano formülasyonlarda ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi üzerinedir. Bu amaç doğrultusunda, kemoterapötik ilaçların tasarlanmasında birçok farklı malzeme geliştirilmiştir (10).

2. KANSER TEDAVİSİNDE NANOTAŞIYICI SİSTEMLER

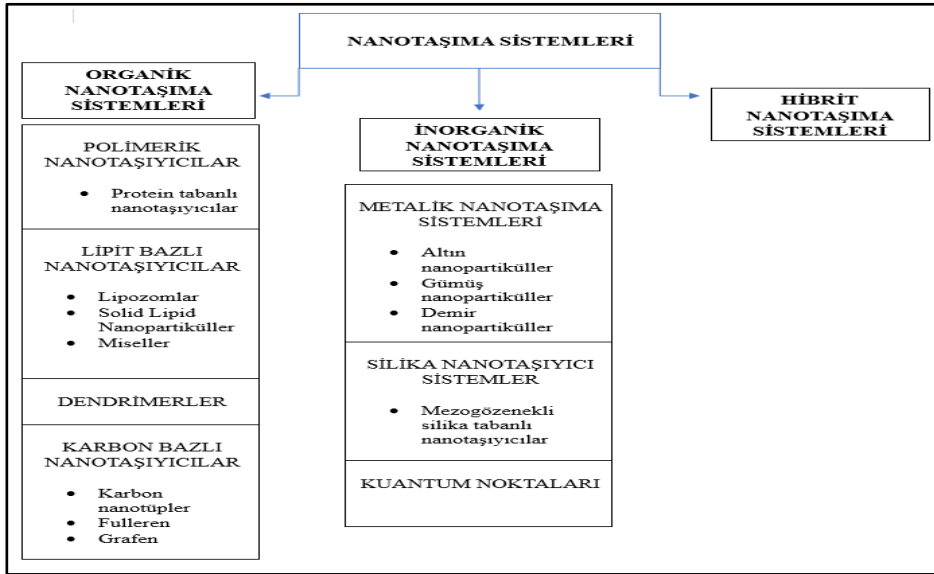
Nanotaşıyıcı sistemler, kontrollü ilaç salım sistemleri olarak da bilinmektedir. Nanokapsülasyonlar, aktif bileşiklerin terapötik aralık içinde belirlenmiş konsantrasyonlarda salımına izin verir. Ayrıca bu nanoyapıların belirli modifikasyonlarla değiştirilmesiyle, salım dozunun ayarlanmasına imkân verir. Böylece dozajın ayarlanmasıyla ilacın yan etkileri minimum düzeyde olarak etkinliği artırılmış olur (11).

Nanotaşıyıcılar içerisine hapsedilen ilacın stabilitesini, hücresel alımını ve çözünürlüğünü arttırarak, serbest verilen ilaçlara göre etkinliğini arttırabilir. İlacın bu tür taşıyıcı sistemler yardımıyla kontrollü bir şekilde salımı gerçekleşir. Kontrollü salımla birlikte verilen ilacın yaratabileceği toksik etki düzenlenerek hedef dokuda ilaç birikimi sağlanır (12). Normal parçacıkların 1 ila 10 μM arasında değişen büyüklükleri nedeniyle, hücreler tarafından alımı zordur. Ancak nanometre boyutlarındaki nanopartiküller, boyutu nedeniyle ilacın hücreler tarafından alımını kolaylaştırır (13). Tüm bu avantajları bir araya getirerek nanopartikül tabanlı sistemlerin özgüllüğü arttırılabilir ve sağlıklı dokuların korunması ve istenen bölgeye istenilen doz ve zamanlamada ilacın iletilmesi sağlanır. Kemoterapötik bileşikler kapsülleme verimliliği

sayesinde, toksik etkileri olan ilaçlar daha düşük dozlarda kullanılabilir ve bu şekilde etkinliği arttırılabilir. Ayrıca arttırılmış ilaç alabilme kapasitesi sonucunda, birden fazla ilacın nanopartiküle yüklenerek sinerjistik etkilerinin oluşturulmasında istenilen etkilerin yakalanması sağlanır (9). Nanopartiküller ilaçların hedefli ve kontrollü dağıtımına olanak vererek toksik etkisi yüksek olan ilaçların tedavi seçeneği olarak kullanılmasında umut vadetmektedir. Bu sistemler ayrıca kanserli bölgede olan ilaca direnç mekanizmaları (MDR) üzerinde terapötik etkinlik sağlayabilmektedir. Bu çok yönlü ilaç taşıyıcılarının verimliliği (taşıma kapasitesi, partikül büyüklüğü vs.), mühendislik yöntemleri ile yüzey alanları değiştirilerek kolayca arttırılabilir. Nanopartikül teknolojisi ile hedefe özgü ve belki de kişiye özel tedavilerin kapıları açılabilir. Daha uzun sürede ve etkili terapötik etki sağlaması bakımından nanopartiküllere dayalı ilaç sistemleri artık yenilikçi ve tercih edilen bir yaklaşımdır (14).

2.1. Nanotaşıyıcı Sistemler ve Alt Türleri

Nanotaşıyıcı sistemlerin alt türleri; polimer bazlı sistemler, lipit bazlı sistemler, dendrimerler, karbon nanotüpler, kuantum noktaları, mezogözenekli silika nanotaşıyıcı sistemler (SPION) ve katı lipit nanotaşıyıcı sistemlerdir. Bu nanopartiküller nano ölçekteki boyutları ile geleneksel biyomalzemelerden ayrılırlar. Nanotaşıyıcı sistemlerin en önemli özellikleri arasında, küçük boyutluluk, geniş yüzeysel alan, artan biyolojik hareketlilik ve kimyasal aktiflik yer alır (13). Nanotaşıyıcı sistemler temel özelliklerine göre organik, inorganik ve hibrit nanotaşıyıcı sistemler olmak üzere 3 ana gruba ve benzer özelliklerine göre diğer alt gruplara ayrılmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1. Nanotaşıma Sistemleri ve Alt Türleri

Kimyasal gerekliliklerine göre nanotaşıyıcı sistemler temel olarak organik ve inorganik olarak sınıflandırılır. Organik nanopartiküller, yüksek biyoyumluluk ve biyobozunurluk ile karakterizedir. Doğal biyomalzemeler kolayca bozunarak vücut tarafından hızla metabolize edilebilir, ancak özellikle protein bazlı doğal malzemelerden ötürü beraberinde bağışıklık tepkisi getirmektedir (15). En yaygın olarak bilinen organik bazlı nanotaşıyıcı sistem olan lipozomların çift katmanlı fosfolipit tabakası vardır ve hem hidrofobik hem de hidrofilik ilaçları kapsülleyebilir. Tek katmanlı lipozomlar ise miseller olarak sınıflandırılır. Polimerik nanopartiküller de biyoyumlu doğal polimerlerden elde edilen oldukça güvenilir bir ilaç taşıma yoludur. Etkili bir ilaç taşıma yolu sağlayarak en fazla incelenen sistemlerdir. İnorganik nanopartiküller terapötik ajanlar için uygun içsel stabilite sağlamanın yanında uygun optik ve elektronik özellikler göstermektedir (16). Metalik nanopartiküller içerisinde yer alan altın veya gümüş gibi nanopartiküller hedeflenen ilaç taşımanın yanında görüntüleme açısından da benzersiz optik özelliklere sahiptir. Metalik nanopartiküller hücresel alımı artırarak sistemik toksisiteyi azaltması bakımından umut vericidir. Hibrit nanotaşıyıcı sistemler hem organik hem de inorganik nanotaşıyıcı sistemlerin avantajlarının birleştirilmesiyle oluşturulan özel yapılardır. Hibrit nanotaşıyıcı sistemlere

örnek olarak lipozomla kaplı kolloidal altın nanotaşıma sistemleri ve süperparamanyetik demir oksit çekirdek ile kaplanmış polimerik nanotaşıyıcılar örnek verilebilir.

2.2. Polimerik Nanotaşıyıcı Sistemler

Polisakkaritler ve proteinler doğal biyopolimerler olarak adlandırılır ve bitkiler ve mikroorganizmalar gibi biyolojik kaynaklardan elde edilir (17,18). Polimerik nanotaşıyıcılar, etkili ilaç taşıma sistemleri olarak kabul edilen nano küreler ve nano kapsüller olarak kategorize edilebilir. Hayvansal ve bitkisel kaynaklı proteinler, güvenilirlik, yüksek kaplama kapasitesi, yüksek etkinlik bakımından umut vadetmektedir. Sürekli olarak ilaç salımını geliştirmede, ilaç stabilitesini ve ilaç çözünürlüğünü arttırmada belirgin avantajlara sahiptir. Ayrıca ilaç taşıma sistemlerinde verimlilik, boyuta, şekle ve diğer doğal özelliklere bağlı olarak değişir. Çapları 10 ila 1000 nm arasında değişebilen polimerik nanomalzemeler, etkili bir dağıtım için uygun özelliklere sahiptir (10).

Protein tabanlı nanotaşıyıcılar; ayrıştırılabilir, metabolize edilebilir ve belirli ilaçlara bağlanması için işlevselleştirilmesi kolaydır. Bu gibi özellikleri ile biyopolimerik taşıyıcı sistemler öne çıkmaktadır. Yüksek biyoyumluluk ve biyolojik olarak parçalanabilirlik özellikleri nedeniyle, aljinat ve kitosan gibi doğal polimerler, nanotaşıyıcıların sentezlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitkiler, uzun zamandır insanlar tarafından çeşitli ilaç, tıbbi ve gıda endüstrilerinde kullanımı güvenli bulunan kaynak sıkıntısı yaşanmayan hammaddedir. Ayrıca insanlara hastalıkların bitki kaynaklarından bulaşma olasılığı çok düşüktür. Bu nedenle bitki bazlı nanotaşıyıcıların üretilmesi üzerine çalışmalar hız kazanmaktadır. Zein nanotaşıyıcılar, son yıllarda dikkatleri üzerine çeken mısır bitkisi endospreminde bulunan bir proteindir. Yüksek hidrofobisite nedeniyle bitki proteinlerinde, ek kimyasal işlemler gerektirmeden kararlı nanoyapılar sentezlenebilir. Zein, ilaç taşıyıcı olarak kullanımında, benzersiz özellikleri ortaya çıkan kullanışlı bir biyomateryaldir (19).

2.3. İlaç Taşıyıcı Sistemler Olarak Bitkisel Kaynaklı Polimerik Zein Nanotaşıyıcılar

Zein, mısır endospreminde genellikle mısır gluten unundan toz halinde üretilen bir proteindir. Protein yapılı doğal bir maddeden üretilmesi sonucu ise belirli avantajları beraberinde getirmektedir. Bunlardan en önemlileri ise; biyolojik bozunurluk, biyouyumluluk ve düşük toksisitedir. Bitki bazlı bir protein olması ile, düşük maliyetli olması, döngüsel olarak ekonomiye fayda sağlaması ve çeşitli özellikleri ile nanotıp, biyomedikal ve biyoteknoloji gibi birçok alanda potansiyelinin olması gelmektedir (20). Sentezlenmesi aşamasında, organik çözücülerden uzak kalınarak en yeşil çözücü olan su kullanılır ve çevreye en az zararda bulunabilecek nanotaşıyıcılar oluşturulur. Zein, alkol ve su içeren çözeltilerde 150-550 nm büyüklük aralığında nanotaşıyıcılar oluşturur. Protein yapısından dolayı hidrofobik ilaçlar için uygun bir kontrollü ilaç taşıma sistemidir (21).

2.4. Zein Nanotaşıyıcı Sistemlerin Yapısal ve Karakteristik Özellikleri

Zein, farklı bir protein yapısına sahip olup, diğer protein yapılarına kıyasla polar olmayan aminoasit kalıntılarının yüksek oranda olmasıyla bilinmektedir. Proteinlerde genellikle bol miktarda bulunan hidrofilik aminoasitler olan Triptofan, Arginin ve Histidin gibi aminoasitler, Zeinde çok az miktarda bulunur. Hidrofobik amino asit kalıntıları olarak; Lösin (~%20), Prolin (~%10) ve Alanin (~%10) içerir. Hidrofilik amino asit kalıntıları olarak ise yaklaşık %21-%26 Glutamik asit içeriğine sahiptir (22,23) Bu protein içeriği, Zeine benzersiz bir çözünürlük özelliği sunmaktadır. Zein saf suda çözünmezken, su-alkol, su-aseton ve alkali çözeltilerde çözünür. Ancak genel anlamda zein, izoelektrik noktası 6.2-6.8 aralığında olan amfifilik bir proteindir. Bu özelliği, Zeinin çözünürlüğünü ve ilaç yükleme kabiliyetini etkilemektedir. Fizyolojik pH'ta zein agregasyonu, gelişmiş hidrofilik etkileşimler ve azalmış elektrostatik itmeler nedeniyle meydana gelir. Bununla beraber düşük veya yüksek pH ortamında zein yüzey yükü farklılaşır. Zein, asidik pH'ta genel bir pozitif yük alırken, bazik pH ortamında da negatif yüklü hale gelir (20).

Zein proteini farklı peptit bileşimi içermektedir ve moleküler ağırlık, çözünürlük gibi özelliklerine göre dört ana gruba ayrılabilir: α -zein, β -zein, γ -

zein ve δ -zein. Zein, bunların bir karışımını içerir ve ortalama moleküler ağırlığı 10-30 kDa'dır. İçeriğindeki ana peptid bileşimi, mısırdaki bulunan toplam prolamin içeriğinin yaklaşık %80'ini temsil eden α -zeindir. Bu protein fraksiyonunun ortalama moleküler ağırlığı 19-22 kDa'dır ticari zeinde en bol olan α -zeindir. En bol bulunan ikinci fraksiyon, zeinin %10-15'ini temsil eden ve ortalama moleküler ağırlığı 17-18 kDa'ya sahip olan β -zeindir (24).

α -zein oldukça homolog tekrarlanan birimlerden oluşur ve yüksek miktarda α -heliks yapı içerir. Zein monomerlerinin silindirik model, kurdele benzeri model, saç tokası modeli ve süper sarmal yapı modeli gibi çeşitli yapı modelleri önerilmiştir. Tek bir α -helix yapısı, 21 sürekli tekrarlar şeklindedir ve her bağ ve dönüşlerinde glutamin aminoasidi vardır. Bu zengin dönüşlerdeki ilmeklerde glutamin nedeniyle bol miktarda amin fonksiyonelliği vardır (25).

2.4.1. Zeinin Silindir Yapı Modeli

Silindir modeli, zeinin %70 metanol sulu çözeltisinde birimlerinin ve α -heliks içeriğinin analizine dayanır. Silindir modeli, α -zein 'in ilk geliştirilen yapısal modellerinden biridir Silindir modeline göre, homolog tekrar biçiminde 9 a-sarmal birimi, a-sarmallarını birbirine bağlayan dönüşler yaparak silindirik bir yapı oluşturacak şekilde topolojik olarak bitişik ve anti paralel olarak düzenlenmiştir. Esas olarak a-sarmallar hidrofobik bir yapıya sahiptir. Ancak çok az polar amino asit içeriği, silindir benzeri yapının zengin üst ve alt dönüşlerinde glutamin kalıntılarına sahip hidrofilik yapıyı oluşturur. Hidrofilik glutamin kalıntıları açısından zengin üst ve alt yüzeyler dışında hidrofobik davranış gösterir (26).

2.4.2. Zeinin Şerit Yapı Modeli

Şerit modeli, sarmal eksene dik olarak 9-10 bitişik anti paralel a-sarmalın doğrusal istiflenmesine dayanır. Bu iki boyutlu şerit benzeri yapı, hidrofilik uçlar ve hidrofobik kenarlarla düzenlenir ve α -zein stabilitesini artırır. Hidrofilik dış yapılar ve hidrofobik yüzeylere sahip bu ince prizma modeli, zein moleküllerinin hidrofilik ve hidrofobik yüzeyler üzerindeki yönelimlerini ve ayrıca zeinin tek moleküllerden nanopartikül oluşumuna kadar kendi kendine birleşmesini anlamak için kullanılmıştır (25).

Düşük veya yüksek pH'da zein yüzey yükü değişir: asidik pH'da pozitif yük alırken, bazik pH'da negatif yüklü hale gelir. Bu durumun nedeni Zeinin

moleküler yapısına bağlanabilir. Zein yapısındaki her bir aminoasit blokları alfa heliks yapılarının düzenli tekrarları sonucu oluşur. Bu düzenli tekrarların her bir dönüşünde bol miktarda bulunan glutamin aminoasidi yapıya amin fonksiyonelliği katmaktadır. Yapılan bir çalışmada, α -heliks yapısının farklı asidik ve bazik pH ortamlarında yapısal ve reolojik özelliklerindeki değişim, Fourier Dönüşümü Kızılötesi (FT-IR) ölçümü ile incelenmiştir ve α -heliks yapısında bulunan glutamin kalıntıları, asidik veya bazik ortamlarda önemli bir deamidasyon oluştuğunu göstermiştir (27). Zein, α -heliks yapısındaki glutamin hem çok asidik hem de bazik pH'larda önemli bir deamidasyonunu nedeniyle farklı pH seviyelerinde farklı davranış göstermesi açıklanabilmiştir. Bu özelliği nedeniyle Zein, farklı pH seviyesinde farklı yüzey yapısına getirilebilir.

2.4.3. Yapısal Bağlar

Zein moleküllerinde %50-%60 oranında α -heliks bulunur ve geri kalanı dönüş ve rastgele bobinlerdir. Bir zein molekülünün her birincil yapısı, 9 kez tekrarlanan 20 amino asit kalıntısından oluşur. Fiziksel özelliklerin analizi, tekrar parçaları içeren amino asit dizisinin her iki tarafında α -helikslerden oluştuğunu göstermektedir. Heliks bölgeleri, çok sayıda polar amino asit ve birkaç hidrofobik amino asit kalıntısından oluşur ve dönüş bölgeleri glutamin aminoasidi açısından zengindir (28). Zein'in yapısal modeli, polar glutamin kalıntıları ile birleştirilmiş dokuz komşu, topolojik olarak antiparalel homolog sarmaldan oluşan silindirik bir yüzey göstermektedir. Van der Waals kuvveti, molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağ Zein yapısını stabilize eder. Sarmal yapılar ve silindirik başlık arasında, yan zincirlerin birleşmesine izin veren ve moleküller arası istiflenmeyi bir düzlemde teşvik eden glutamin bakımından zengin dönüşler bulunur (29).

2.4.4. Zein Fonksiyonel Gruplara Bağlanma Profili

Zeinin işlevselliği, aminler, amidler, hidroksiller, karboksilatlar ve fenoller gibi çok sayıda fonksiyonel grup tarafından verilir (26). Zeinin üçüncül yapısı nedeniyle kalıntılardan gelen aminler peptit zincirlerine daha fazla maruz kalır. Zeinin çapraz bağlanması, formaldehit, glutaraldehit, süksinik asit, sitrik asit ve öjenol gibi kimyasal çapraz bağlama maddeleri kullanılarak elde edilebilir.

2.6. Zein Nanotaşıyıcıların Sentez Yöntemleri

Sentez sırasında zein protein yapısını oluşturan birimler, bir çekirdek oluşturur ve katman yapısı oluşturacak şekilde üst üste kümelenerek serbest zeini yavaşça üzerine toplar. Zein nanotaşıyıcı sisteme yüklenen ilaç veya ilaç aday bileşikler bu birimlerin arasına kapsüle olur. İlk zamanda yüksek ve ani salımın nedeni (burst effect) ve daha sonrasındaki stabil salımının nedeni olarak bu katman yapısının ilk olarak kabuk yapısının bozulup sonra yavaş yavaş alt katmanların kendini salması neden olarak gösterilmektedir. Zein kabuk veya çekirdek yapısı, bu şekilde kabuk arayüzünde bulunan ilaç kısımlarının salım özelliklerini etkilemektedir. Zeinde hidrofobik amino asit kalıntılarının yüksek oranda olması nedeniyle, zein nanotaşıyıcılarını hazırlamak için antisolvent çöktürme yöntemi en sık tercih edilen yöntemdir (59). Zein parçacıkları genel olarak; kimyasal çapraz bağlama, antisolvent çöktürme, süperkritik antisolvent, antisolvent diyalizi, pH kontrollü zein sentezi, püskürtmeli kurutma ve elektro hidrodinamik atomizasyon hazırlanma yöntemleri ile hazırlanmaktadır.

2.6.1. Antisolvent Çöktürme (Sıvı-Sıvı Dispersiyon) Yöntemi

Sıvı-sıvı dispersiyonu veya faz ayırma tekniği, antisolvent çöktürme olarak bilinmektedir. Bu yöntem basitçe, Zein küresel nano yapısının, Zein etrafındaki sıvıların polaritesinin değiştirilmesiyle oluşturulmasıdır. Zein ve kapsüllenecek bileşik bir etanol sulu çözeltisinde çözüldükten sonra, manyetik karıştırma ile deiyonize su, etanol konsantrasyonunun hızla düşmesine neden olacak bir antisolvent olarak damla damla eklenir. Bu, zeinin aşırı doymuş hale gelmesine ve nanotaşıyıcıların oluşmasına neden olur. Kendi kendine birleşme özellikleriyle birleştiğinde, zein molekülleri parçacıklar halinde toplanır ve aktif bileşik sentez sırasında doğrudan zein nano yapılarının hidrofobik çekirdeğine girer. Zein nanotaşıyıcıları hazırlamak için etanol, metanol ve izopropanol kullanılabilir. Alkol türü dışında, alkol ve zeinin başlangıç konsantrasyonu, kayma hızı, alkolün suya oranı, pH, karıştırma modu ve eklenen diğer maddeler parçacık özelliklerini önemli derecede etkileyebilir (30).

Zein antisolvent çöktürme yönteminde mekanik şekilde mantık, damla damla yaklaşımla, yüzey aktif madde/stabilizatör içermeyen sulu bir faz ve bir çözücüde çözülmüş polimerden oluşan organik bir fazın yavaşça birleştirilerek zein nanotaşıyıcılarını oluşturmaktır. Antisolvent fazın solvent fazla bir araya

getirilmesiyle polaritede kayma oluşur ve polimerin hidrofilik grup etrafında koruyucu bir tabaka oluşturmaya yol açar. Bu şekilde polimerin çekirdeği hidrofobik olacak ve aktif bileşeni içerecektir(31). Sıvı-sıvı dispersiyon yönteminde, zein proteinin toz formunun çözünür olduğu birincil fazın, çözücü olmayan diğer bir faza dağıtılmasıyla nanotaşıyıcıların oluşumu indüklenir (Şekil 2). Temel ve basit adımlarla karakterizedir. Düşük maliyetlidir ve genellikle yüksek ilaç kapsülleme verimliliği gösterir, bu nedenle zein nanotaşıyıcıları oluşturmak için en yaygın yöntemdir (32).



Şekil 2. Antisolvent Çöktürme Yöntemi (30)

2.6.2. pH Kontrollü Sentez

Zeinin izoelektrik noktası 6,2 olduğu için, pH 6,2'yi geçerse negatif yüklenir, pH 6,2'nin altına düşerse pozitif olarak yüklenmektedir. İzoelektronik pH değeri olan 6,2 noktasında ise zein 0 yüklüdür. Bu nedenle zein, sulu ve fizyolojik sıvılarda bu özelliğinin getirdiği elektrostatik etkileşimler nedeniyle dengesizleşmeye ve toplanmaya eğilimlidir. Zeinin pH ortamından etkilenmesi özelliğinden faydalanılarak sentezleme işlemleri yapılmaktadır. Örnek bir sentezde, Zein ve ilaç pH: 12' de sürekli karıştırılarak, deiyonize su içerisinde çözdürülür. Son anda nanopartikül sentezini başlatmak için son pH:7' ye düşürülür. Benzer şekilde, nanopartikül yapılarını sentezlemek için Zein, sabit

manyetik karıştırma altında ve pH 12'de tutularak deiyonize su içinde çözündürülür (33).

2.6.3. Elektro Püskürtme Yöntemi

Bu yöntem, zein çözeltisinin yüklü damlacıklara ayrılmasını indüklemek için bir elektrik alanının kullanılmasına dayanan basit bir yöntemdir. Bu prensiple, elektrik voltajını, çözelti konsantrasyonunu ve akış hızını gibi özellikle ayarlanarak farklı özelliklere sahip monodispers nanopartiküller üretmek mümkündür (34).

2.6.4. Süperkritik Antisolvent Çökeltme Tekniği (SAS)

Süperkritik CO₂ polimerler için bir anti-solvent görevi görür ve sürekli olarak püskürtülen bir besleme ile sentezlenir (35). Sürecin ölçeklenebilirliğine rağmen, süperkritik antisolvent çökeltme tekniği çeşitli ilaçlarla uyumlu değildir ve özel ve pahalı bir ayar gerektirir. Bu nedenle, sıvı-sıvı antisolvent gibi geleneksel yöntemler, zein nanotaşıyıcıların hazırlanması için en çok uygulanan yöntem olmaya devam etmektedir.

2.7. Zein Nanotaşıyıcıları Üzerinde Yüzey Modifikasyonları

Zein tuğla benzeri birimleri katmanlaşma yoluyla birleşerek ilaçların kapsülasyonunu sağlarken, ayrıca γ -zeinin N-terminal bölgesi hücre zarı ile etkileşime geçebilir. Bu durum da Zeini, hücre zarını geçerek etki gösteren ilaçlar için yararlı bir taşıyıcı haline getirir. Zein ayrıca daha fazla modifikasyon bölgesi sağlayabilen serbest hidroksil (-OH) ve amino (NH₂) grupları içerir. Bu yapısal yönüyle Zein, yüzey modifikasyonu açısından ilaç dağıtımında önemli bir polimerdir (3,36). Zein nanotaşıyıcılar fizyolojik koşullarda stabil değildir ve topaklanmaya eğilimlidir ve bu durum ana dezavantajlarından biri olarak bilinmektedir. Bu durumun çözülebilmesi adına zein nanotaşıyıcılar üzerine kaplamalar olarak polisakkaritler, proteinler veya yüzey aktif maddeler kullanılmıştır. Özellikle polisakkaritler hem biyouyumlulukları hem de geniş kullanılabilirlikleri ve üstün stabiliteleri nedeniyle zein nanotaşıyıcılarında sıkça tercih edilen ve en çok çalışılan polimerler olmuştur. Bu kaplamaların avantajları arasında, daha yüksek kapsülleme kabiliyeti ve kaplanmayan zein nanotaşıyıcılara göre daha kontrollü salım kinetiği bulunur.

Zein stabilizasyonu sorununa ayrı bir çözüm olarak sodyum kazeinat gibi stabilize edici ajanlar, elektrostatik bir etki sağlayarak sterik bir itme ile daha

stabil Zein nanotaşıyıcıların üretilmesini sağlamaktadır. Stabilizatörler yüzey yüküne de etki sağlayarak yüzey modifikasyonuna etki edebilir. Kitosan ve sodyum kazeinat ile stabilize edilen zein nanotaşıyıcıların zeta potansiyeli pozitif (+) olmaktadır (37).

Zein, protein makromolekül olduğu için immünojenisite sorununu inhibe etmek amacıyla, polietilen glikol (PEG) ile kaplanmaktadır. PEG hidrofilik bir yapıda olup sulu ortamda çözünebilme kabiliyeti vardır. Ayrıca toksik bir malzeme değildir. Bununla birlikte, PEG kaplaması fizyolojik ortamda zein kolloidal stabilitesini artırabilir. Zein ile dispersiyon ortamına eklenen başka maddeler ile de oluşacak olan Zein nanotaşıyıcıların yüzey yükü değiştirilebilir. Boş Zein nanotaşıyıcıların zeta potansiyeli +30 mV olduğu bilinmektedir. Zein sentezi sırasında, sitrat tamponu, lesitin, sodyum kazeinat gibi maddelerin eklenmesiyle yüzey yükleri negatife dönüştürülebilmektedir. Kitosan eklenmesi ile de yüzey yükü negatif olan yüzey pozitifeye dönüşebilir (27).

Zein nanotaşıyıcıların elektriksel özellikleri, yapısında bulunan amino ve karboksil gruplarının protonlanması ve düşük pH ortamında bu katyonik grupların protonlanması nedeniyle yüksek pH ortamlarında, anyonik yüzey molekülleri ile elektriksel yükü belirlenir. Bu nedenle Zein nanotaşıyıcıların yüzey yükü pH'a bağlıdır. pH artmasıyla birlikte (bazik ortama doğru) pozitiften negatife doğru yüzey yükü değişmektedir (38). Zein nanotaşıyıcıları sentezinde asidik veya bazik işlemlere bağlı tutmak zein kaplı parçacıkların özelliklerini etkilemede büyük bir etkiye sahiptir. Çünkü Zein, alkil gruplarından ziyade karboksil gruplarını açığa çıkaran yüzeylerde daha yüksek bağlanma afinitesine sahiptir (24).

2.8. Zein Tabanlı Nanotaşıyıcı Sistemlerin Kanser Tedavisinde Uygulama Yöntemleri

Zein, lösin, prolin ve alanin gibi hidrofobik ve nötr aminoasitler ve hidrofilik glutamin kalıntılarından oluştuğu için amfifiliktir. Zeinin bu özelliği farklı kanser ilaçlarının yüklenebilmesini sağlar ve ilaç yükleme kapasitesini etkiler (22). Zein nanotaşıyıcılar bilinen özel yapısı ve avantajlarından ötürü, kanser ilacı dağıtımında önemli potansiyele sahiptir. Hem hidrofilik hem hidrofobik ilaçların kapsüllenmesine olanak sağlayan özel protein yapısı, birçok çeşitten ilacın kapsüle edilmesine olanak sağlar. Antikanser ilaç bağlamında Zein nanotaşıyıcılar gelişmiş hedefleme seçenekleri sunar. Zein,

amfifilik doğası nedeniyle, kimyasal yapısında bulunan serbest hidroksil ve amino grupları nedeniyle farklı pH koşulları altında farklı yüzey yükleri kazanabilir ve ilaçlarla hidrofobik bağlar kurabilmektedir. Zein, hidrofobik bileşikler etkin bir şekilde kapsüller ve ayrıca kimyasal ve termal stabilitesi, sentezlenen partikülleri bozulmaya karşı dirençli duruma getirmektedir (39).

2.8.1. Zein Hedefleme Mekanizmaları

İlaçların hedeflenmesi, aktif ve pasif olarak sınıflandırılan hedefleme yollarıyla gerçekleştirilir. Aktif hedeflemede kısaca antikorlar ve peptitler gibi kısımlar, hedef bölgede ifade edilen reseptör yapılarını algılamak ve hedeflemek için ilaç dağıtım sistemi ile konjuge edilir. Pasif hedeflemede, ilaç taşıyıcı sistem, kan dolaşımında dolaşır ve pH, sıcaklık, moleküler bölge ve damar yapısal bozukluğu gibi nedenlerden etkilenen kanser bölgelerinde bağlanma yoluyla hedef bölgede birikmesi gerçekleşir (40). Şu anda, nanoteknoloji aracılı ilaç dağıtım sistemlerinin çoğu kanser hastalığına ve tedavisine yöneliktir ve bu iki etki mekanizması üzerinden geliştirilmiştir (41).

Zein Çekirdek-Kabuk Yapısı ve İlaç Tutma Kapasitesi

Zein çekirdek-kabuk yapısının çekirdek bölgesi suda çözünürlüğü az olan ilaçların hapsedilmesi için uygundur. Kabuk kısmı ise genellikle kolloidal stabilite ve hidrofilik ilaçları yakalamak için uygundur. Bu şekilde zein, suda çözünürlüğü iyileştirmek için ideal bir polimerdir (42). Zein moleküler yapısında, Lösin ve Glutamin aminoasitlerini yüksek oranda içermesi nedeniyle, benzersiz bir yapıya sahiptir. Aynı zamanda yapısı dolayısıyla hücrelerin negatif yüklü yüzeyiyle kolayca etkileşime girebilir. Bu nedenlerle, antikanser kemoterapötik ajanların zein nanotaşıyıcıların içine kapsüllemesi üzerine yapılan çalışmalar artmaktadır.

Gelişmiş Geçirgenlik ve Tutulma Etkisi (EPR)

Kanserli bölgelerde hücreler çoğalırken kandaki plazma proteinleri enerji kaynağı olarak kullanılır. Tümör vasküler endotel duvarı sağlıklı damarlara göre daha fazla geçirgenliğe sahiptir ve bu kusuru nedeniyle bazı makromoleküllerin tümör interstisyel sıvı boşluğuna girişi artar. Bununla birlikte bu dokuda sıvı birikiminin dışarı rezeksiyonu gerçekleştirilemez ve bu durum, tümör dokusunda makromoleküllerin birikmesine yol açar. Bu etkinin ismi gelişmiş geçirgenlik ve tutulma etkisidir (EPR). Nanotaşıyıcı sistemler

aracılı ilaç dağıtımında, terapötik ajanlar pasif hedefleme yolu ile tümör bölgesinin bu fizyolojik özelliğinden faydalanılır. Bu mekanizma, pasif hedefleme durumudur. EPR etkisi ile pasif hedefleme yöntemi yaygın kullanılmaktadır. Kanser bölgesindeki kan damarlarının normal dokulara göre endotel açıklıklarının fazla olması sonucu bölgede sızdırma yapmaktadır ve bu durum da nanotaşıyıcı yapılarının bu mikro çevrede birikmesine yol açar (43). Boyutu 10-100 nm arasındaki nanotaşıyıcılar EPR etkisinden önemli ölçüde etkilenir ve bu parçacıklar boyutu nedeniyle böbreklerden temizlenemez. Bu durum sonucunda sistemik toksisite en aza inerken tümör çevresine iletilen terapötik yük artar. Zein nanotaşıyıcıları bu fenomene göre tümör bölgesinde pasif hedefleme yardımıyla birikerek bu bölgede salım gerçekleştirir (44).

Zein Nanotaşıyıcı Sistemlerinde Yüzey Modifikasyonları ile Aktif Hedefleme Yöntemleri

Zein nanotaşıyıcıların geliştirilmesinde yüzey modifikasyonları önemli rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda zein nano taşıyıcı sistemi sentezlenerek PEG ve folat ile işlevsel duruma getirilmektedir. Zein nanotaşıyıcılar bu şekilde folat reseptörü eksik olan hücrelerde β -reseptör folat ekspresyonu ifadesi arttırılabilir. Bu şekilde artan antikanser aktivitesi ile çalışmalarda, yüksek hücresel ilaç emilimi, apoptoz indüksiyonu ve hücre göçünün inhibisyonunu *in vitro* ve *in vivo* olarak göstermiştir. Bu şekilde folat reseptörü ile Zein yüzeyi modifiye edildiğinde daha etkili bir hücresel antikanser yanıt alınmıştır (45).

Zein nanotaşıyıcıların avantajları;

- Zein ile yapılan ilaç taşıma sistemleri, küçük boyut, yüzey alanı yüksek biyouyumluluk ve ilaç yükleme kapasitesi nedeniyle büyük avantajlara sahiptir.
- Zein nanotaşıyıcıları ile kaplanan ilaçlar daha stabil kalarak bozulmadan korunur. Kan dolaşım süresi arttırılır ve ilaç çözünürlüğü iyileştirilir.
- Çok yönlü ilaç taşıyıcılarından bir tanesi olan Zein yüzey modifikasyonuna uygundur ve (ilaç yükleme kapasitesi, dış yüzey yükü, ilaç salım özellikleri, boyutu ve yüzey alanı) mühendislik ilkeleriyle iyileştirilerek arttırılabilir.

- Nano-terapötik uygulamalarında yüklenen ilaç az miktarda salım yapar ve düşük dozlarda daha etkili sonuç vererek sağlıklı hücrelere en az zararı verir.
- Zein nanotaşıyıcı sistemler, yüksek kapasiteleri dolayısıyla birçok ilacın yüklenebilmesiyle, sinerjik olarak etki verebilmesini sağlar.
- Aktif tümör hedeflemesinde Zein nanotaşıyıcı sistemler üzerine yüzey modifikasyonu yoluyla DNA, RNA, aptamer, peptid gibi ligandlar yerleştirilerek kanser hücreleri üzerindeki reseptörler seçici olarak hedeflenir. Kanser hücrelerinde aşırı ifade edilen molekülleri hedef alan bu sistemle hedefli iletim yapılabilir.
- Zein nanotaşıyıcı sistemler ile tedavi sonucunda yüksek hücresel alım, apoptozun indüklenmesi ve tümör büyümesinin baskılanması gerçekleşir.
- Nano ölçekte olan taşıyıcı sistem olan Zein ilaçların hücresel alımının etkili bir şekilde olmasını kolaylaştırır ve 1 ve 10 mikrometre arasında değişen büyük parçacıklı ilaçlardan daha etkili bir hücresel alım sağlar.
- Nano boyutta olan Zein nanotaşıyıcı sistemleri, kanserli olan doku bölgesine nüfuz eder, ilacın hücreler tarafından kolayca alınmasını kolaylaştırır, etkili bir ilaç iletimi sağlar ve hedeflenen yerde etki sağlar. Nanoyapıların hücreler tarafından alımı, 1 ila 10 μm arasında değişen büyük parçacıklara göre çok daha yüksektir.
- Uygun şekilde tasarlanmış pH değişiklikleri ile Zeinin zıt yüzey yüküne sahip hidrofilik moleküller ile elektrostatik etkileşimleri teşvik edebilir ve bu da gelişmiş kapsülleme verimliliği sağlar.
- Prolin açısından zengin bir protein olan Zein, aktif molekülleri daha önemli oranda hidrofobik aminoasitlerle tutma ve koruma kapasitesini gösterir.

Bu gibi avantajlarına rağmen Zein nanotaşıyıcı sistemler bazı dezavantajlara da sahiptir. Zein nanotaşıyıcılar kolayca üretilebilir ve biyoyumludur ancak suda yeniden dağılmazlar. Sentezinden sonraki dondurarak kurutma işleminden sonra kümelenme eğilimi gösterirler. Zein bazlı kolloidal taşıyıcı sistemlerin kullanımı, zayıf kolloidal stabiliteleri nedeniyle kısıtlanmaktadır. Çalışmalarda bu nedenle Tween 80, Tween 20,

sodyum deoksilat ve lesitin gibi yüzey aktif maddelerin kullanımı ile stabilitenin artırılması sağlanmıştır.

Zein ortama göre değişebilen pH nedeniyle yüzey yükünün değişmesi sonucu ilaç salımı kontrol altına alınamayabilir. Bu gibi sınırlamaların üstesinden gelinmesi için araştırmacılar Zein nanotaşıyıcı sistemleri üzerinde biyopolimerik yapılar entegre ederek kapsülleme verimliliği ve stabilitesini arttırmışlardır. Sentezlenen bu çekirdek kabuk yapısı sonucu, Zein biyolojik maddenin yüklü olduğu çekirdek görevini üstlenirken polisakkarit kabuk yapısı yardımı ile çekirdek kabuk yapısı polisakkarit kabuk yapısı partiküller arasında itme kuvveti yaratarak partikülleri stabilize duruma getirir (46). Partiküller arasındaki elektrostatik ve sterik etkilerle kararlılığı arttırmak için çok katmanlı nanopartiküller hazırlama çalışmaları yapılmıştır.

3. TARTIŞMA VE SONUÇ

Nanoteknoloji, onkolojiye yönelik ilaç taşıma sistemlerinin kapısını açmıştır. Nanoteknoloji tabanlı ilaç dağıtım araçları araştırılmaya ve geliştirilmeye devam etmektedir. ClinicalTrials.com'dan alınan verilere göre, 150'den fazla klinik araştırma çalışması bu yönde devam etmektedir (ClinicalTrials, 2024). Nanopartiküllerin bilinen en önemli özelliği küçük boyutlu olmaları ve bu sayede bağışıklık sisteminde yakalanmadan ve böbrek filtreleme sistemini atlatabilmesidir. Aynı zamanda aktif veya pasif mekanizmalarla tümör çevresine hedefli ilaç dağıtımı gerçekleştirerek sağlıklı dokulara en az zararı vermekle karakterizedir. Bu yolla, kemoterapötik ilaçların etkinliğini arttırarak daha büyük faydalar sağlar. Nanopartiküllerle tedavi sonrasında daha az sistemik komplikasyonlar ve yan etkiler oluşur. Bununla birlikte tedavilerde gelişebilen çoklu ilaç mekanizmalarını atlatma yolunda başarılıdır.

İlaç taşıma sistemleri üzerinde in vitro çalışmalar büyük ölçüde nanopartikül-hücre etkileşimlerine odaklanmıştır. *In vivo* çalışmalar ise nanotaşıyıcıların hedef lezyon bölgesine nasıl aktarılacağına odaklanır. *In vivo* çalışmalarda önemli gelişmeler devam etmektedir ancak, nanotaşıyıcı sistemlerle yapılan ilaçların klinik açıdan benimsenmesi, kimyasal uygulanabilirlik, biyolojik dağılım, etkinlik, güvenlik, ölçeklenebilirlik parametreleri ve regülatör kuruluşlar gibi geçmesi gereken birçok zorlukla karşı karşıyadır. Klinik çalışmaların umut vadettiği bilinmektedir ve kemoterapötik

ilaçların nanotaşıyıcı sistemlerle birleştirildiğinde, sağlıklı hücrelere en az hasarı verdiği bulunmuştur. Bu önemli tespit sonrasında, bu ilaçlarla nanotaşıyıcı sistemlerin etkileşimleri hakkında araştırmaların ve hastalara göre kişiselleştirilmiş kanser tedavi planlarının önü açılmıştır. Ancak, nanotıp uygulamalarında ve klinik uygulamalarda nanopartiküllerin sergileyebileceği toksisite göz önünde bulundurulması gereken önemli bir konudur (47).

Günümüzde kemoterapi, kanser tedavisinde öncelikli olarak kullanılan yöntemlerden biri olmaya devam etmektedir. Yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ilaçlar güçlü bir etki göstermesinin yanında bazı yan etkilerle de kullanımı sınırlı olmaktadır. Klinik uygulamalarda, suda zayıf çözünürlük, sistemik toksisite, kısa yarı ömür ve hücresel ilaç direnci gibi konularında bu ilaçların da etkinliği zayıflamaktadır. Nanotaşıyıcı sistemleri hedef bölgelere taşımak için pasif etki mekanizması olan (EPR) etkisi, tümör mikro çevresi özel koşullarından yararlanır ve yaygın olarak kullanılan stratejidir (47). Bu konuda, bitkisel bir protein olan Zein, nanotaşıyıcılar yüksek derecede umut vadetmektedir.

Nanotaşıyıcı sistemlerde genel olarak potansiyel toksisite ve bunun sonucunda bağışıklık sistemleri tarafından tanınıp yok edilmesi gibi endişeler Zein için de geçerlidir. Ayrıca, Zein moleküler yapısından ötürü hidrofobik olduğu için klinikte kullanımında bağışıklık hücreleri tarafından kolayca temizlenebilme gibi bir sınırlamaya sahiptir. Buna karşın geliştirilen yöntemler mevcuttur. Bu yöntemlerden en sık tercih edileni yüzeyin biyoyumlu malzemeler (örneğin PEG'ilasyon) ve Zein kaplama gibi yöntemler geliştirilmiştir ancak, klinik olarak gidilmesi gereken uzun bir yol vardır (48).

Nanotaşıyıcı sistemler ne kadar yenilikçi teknoloji olup faydaları tartışılmaz ise, halen zayıf yönleri vardır. Ancak biyolojik sistemlerde toksik olmayan malzemelerin kullanımı ilaç endüstrisinde temel koşullar arasındadır (49). Zein, doğal bir polimer olarak yüksek modifikasyon özellikleriyle birlikte bu alanda rekabetçi adaylardan biridir. Bu özellikler sonucunda ilaç geliştirilmesi halinde FDA gibi onay kuruluşlarından geçebilme ihtimali yüksektir. Zein tabanlı nanotaşıyıcıların işlevselleştirilmesi hedefe yönelik olmasının geliştirilmesini kapsar.

ClinicalTrials.com'dan elde edilen bilgilere dayanarak şu anda Zein antikanser ilaç taşıyıcısı olarak kullanılan hiçbir ilaç bulunmamaktadır. Klinik tedaviler öncesinde, odak nokta, yalnızca temel fiziksel ve kimyasal

özelliklerin geliştirilmesi, salım profilinin iyileştirilmesidir. Bu çalışmalar sonucunda terapötik etkinliğin belirlendiği Zein tabanlı nanotaşıyıcıların geliştirilmesi üzerine *in vitro* çalışmalar hızla yürütülmektedir (6). Klinik araştırmalara geçmeden önce sağlam bir ön bilgiyle; örneğin birikim hızı, ilaç metabolizması, salım hızı ve farmakodinamik değerlendirmelerin sağlanması şarttır. Nanopartikül dispersiyonlarının nanoteknolojiye dayalı ürünlere dönüştürülme potansiyeli, *in vivo*, prelinik ve klinik araştırmaları zorunlu kılmaktadır (49).

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü TYL-2025-4015 nolu proje ve 2022-1-TR01-KA220-VET-000088373 kodlu Avrupa Birliği Projesi tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Kasaai MR. Zein and zein -based nano-materials for food and nutrition applications: A review. Vol. 79, Trends in Food Science and Technology. 2018.
2. Tapia-Hernández JA, Del-Toro-Sánchez CL, Cinco-Moroyoqui FJ, Juárez-Onofre JE, Ruiz-Cruz S, Carvajal-Millan E, et al. Prolamins from cereal by-products: Classification, extraction, characterization and its applications in micro- and nanofabrication. Vol. 90, Trends in Food Science and Technology. 2019.
3. Labib G. Overview on zein protein: a promising pharmaceutical excipient in drug delivery systems and tissue engineering. Vol. 15, Expert Opinion on Drug Delivery. 2018.
4. Weissmueller NT, Lu HD, Hurley A, Prud'Homme RK. Nanocarriers from GRAS Zein Proteins to Encapsulate Hydrophobic Actives. Biomacromolecules. 2016;17(11).
5. Qi F, Zhao L, Zhou A, Zhang B, Li A, Wang Z, et al. The advantages of using traditional Chinese medicine as an adjunctive therapy in the whole course of cancer treatment instead of only terminal stage of cancer. Vol. 9, BioScience Trends. 2015.
6. Luo X, Wu S, Xiao M, Gu H, Zhang H, Chen J, et al. Advances and Prospects of Prolamine Corn Protein Zein as Promising Multifunctional Drug Delivery System for Cancer Treatment. Vol. 18, International Journal of Nanomedicine. Dove Medical Press Ltd; 2023. p. 2589–621.
7. Leena Panigrahi L, Samal P, Ranjan Sahoo S, Sahoo B, Pradhan AK, Mahanta S, et al. Nanoparticle-mediated diagnosis, treatment, and prevention of breast cancer. Vol. 6, Nanoscale Advances. Royal Society of Chemistry; 2024. p. 3699–713.
8. Fedotcheva TA, Shimanovsky NL. Pharmacological Strategies for Overcoming Multidrug Resistance to Chemotherapy. Pharm Chem J. 2023;56(10).
9. Abolhassani H, Eskandari A, Saremi Poor A, Zarrabi A, Khodadadi B, Karimifard S, et al. Nanobiotechnological approaches for breast cancer Management: Drug delivery systems and 3D In-Vitro models. Vol. 508, Coordination Chemistry Reviews. 2024.

- 10.Huang W, Yao F, Tian S, Liu M, Liu G, Jiang Y. Recent Advances in Zein-Based Nanocarriers for Precise Cancer Therapy. Vol. 15, *Pharmaceutics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
- 11.Macedo DCS, Almeida FJF, Wanderley MSO, Ferraz MS, Santos NPS, López AMQ, et al. Usnic acid: from an ancient lichen derivative to promising biological and nanotechnology applications. Vol. 20, *Phytochemistry Reviews*. 2021.
- 12.Ribeiro-Costa RM, Alves AJ, Santos NP, Nascimento SC, Gonçalves ECP, Silva NH, et al. In vitro and in vivo properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. *J Microencapsul*. 2004;21(4).
- 13.Mirza Z, Karim S. Nanoparticles-based drug delivery and gene therapy for breast cancer: Recent advancements and future challenges. Vol. 69, *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press; 2021. p. 226–37.
- 14.Elumalai K, Srinivasan S, Shanmugam A. Review of the efficacy of nanoparticle-based drug delivery systems for cancer treatment. Vol. 5, *Biomedical Technology*. KeAi Communications Co.; 2024. p. 109–22.
- 15.Jin H, Pi J, Yang F, Jiang J, Wang X, Bai H, et al. Folate-Chitosan Nanoparticles Loaded with Ursolic Acid Confer Anti-Breast Cancer Activities in vitro and in vivo. *Sci Rep*. 2016;6.
- 16.Bayda S, Hadla M, Palazzolo S, Riello P, Corona G, Toffoli G, et al. Inorganic Nanoparticles for Cancer Therapy: A Transition from Lab to Clinic. *Curr Med Chem*. 2017;25(34).
- 17.Balaji AB, Pakalapati H, Khalid M, Walvekar R, Siddiqui H. Natural and synthetic biocompatible and biodegradable polymers. In: *Biodegradable and Biocompatible Polymer Composites: Processing, Properties and Applications*. 2017.
- 18.Bassas-Galia M, Follonier S, Pusnik M, Zinn M. Natural polymers: A source of inspiration. In: *Bioresorbable Polymers for Biomedical Applications: From Fundamentals to Translational Medicine*. 2017.
- 19.Huang L, Huang XH, Yang X, Hu JQ, Zhu YZ, Yan PY, et al. Novel nano-drug delivery system for natural products and their application. Vol. 201, *Pharmacological Research*. 2024.
- 20.Micaelo Â, Rodriguez E, Millan A, Gongora R, Fuentes M. Protein Interactions and Nanomaterials: A Key Role of the Protein Corona in Nanobiocompatibility. In: *Protein-Protein Interaction Assays*. 2018.

- 21.Nguyen MNU, Tran PHL, Tran TTD. A single-layer film coating for colon-targeted oral delivery. *Int J Pharm.* 2019;559.
- 22.Shukla R, Cheryan M. Zein: The industrial protein from corn. *Ind Crops Prod.* 2001;13(3).
- 23.Wiggers HA, Fin MT, Khalil NM, Mainardes RM. Polyethylene Glycol-Stabilized Zein Nanoparticles Containing Gallic Acid. *Food Technol Biotechnol.* 2022;60(2).
- 24.Tivano F, Chiono V. Zein as a renewable material for the preparation of green nanoparticles for drug delivery. *Frontiers in Biomaterials Science.* 2023;2.
- 25.Wang HJ, Lin ZX, Liu XM, Sheng SY, Wang JY. Heparin-loaded zein microsphere film and hemocompatibility. *Journal of Controlled Release.* 2005;105(1–2).
- 26.Corradini E, Curti PS, Meniqueti AB, Martins AF, Rubira AF, Muniz EC. Recent advances in food-packing, pharmaceutical and biomedical applications of zein and zein-based materials. Vol. 15, *International Journal of Molecular Sciences.* 2014.
- 27.Abdelsalam AM, Somaida A, Ayoub AM, Alsharif FM, Preis E, Wojcik M, et al. Surface-tailored zein nanoparticles: Strategies and applications. Vol. 13, *Pharmaceutics.* 2021.
- 28.Zhang X, Dong C, Hu Y, Gao M, Luan G. Zein as a structural protein in gluten-free systems: an overview. Vol. 10, *Food Science and Human Wellness.* 2021.
- 29.Argos P, Pedersen K, Marks MD, Larkins BA. A structural model for maize zein proteins. *J Biol Chem.* 1982;257(17).
- 30.Yan X, Li M, Xu X, Liu X, Liu F. Zein-based nano-delivery systems for encapsulation and protection of hydrophobic bioactives: A review. Vol. 9, *Frontiers in Nutrition.* 2022.
- 31.Vijayan JG. Zein-Based Composites: Synthesis, Characterization Properties, and Applications. In: *Foundation and Growth of Macromolecular Science: Advances in Research for Sustainable Development.* 2024.
- 32.Pascoli M, de Lima R, Fraceto LF. Zein nanoparticles and strategies to improve colloidal stability: A mini-review. Vol. 6, *Frontiers in Chemistry.* 2018.

- 33.Yildiz G, Andrade J, Engeseth NE, Feng H. Functionalizing soy protein nano-aggregates with pH-shifting and mano-thermo-sonication. *J Colloid Interface Sci.* 2017;505.
- 34.Castro Coelho S, Nogueiro Estevinho B, Rocha F. Encapsulation in food industry with emerging electrohydrodynamic techniques: Electrospinning and electrospraying – A review. Vol. 339, *Food Chemistry.* 2021.
- 35.Franco P, Marco I De. Supercritical antisolvent process for pharmaceutical applications: A review. *Processes.* 2020;8(8).
- 36.Zhang Y, Cui L, Che X, Zhang H, Shi N, Li C, et al. Zein-based films and their usage for controlled delivery: Origin, classes and current landscape. Vol. 206, *Journal of Controlled Release.* 2015.
- 37.Ahmed OAA, Hosny KM, Al-Sawahli MM, Fahmy UA. Optimization of caseinate-coated simvastatin-zein nanoparticles: Improved bioavailability and modified release characteristics. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9.
- 38.Cui B, Li J, Lai Z, Gao F, Zeng Z, Zhao X, et al. Emamectin benzoate-loaded zein nanoparticles produced by antisolvent precipitation method. *Polym Test.* 2021;94.
- 39.Preetam S, Duhita Mondal D, Mukerjee N, Naser SS, Tabish TA, Thorat N. Revolutionizing Cancer Treatment: The Promising Horizon of Zein Nanosystems. Vol. 10, *ACS Biomaterials Science and Engineering.* American Chemical Society; 2024. p. 1946–65.
- 40.Kumar S, Mohanan S, Vattoth AL, Bajaj G, Pandey T. Anatomy and Biomechanics of Lower Extremity Tendons: Imaging Implications. Vol. 44, *Seminars in Ultrasound, CT and MRI.* 2023.
- 41.Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres MDP, Acosta-Torres LS, et al. Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects. Vol. 16, *Journal of Nanobiotechnology.* 2018.
- 42.Deshmukh AS, Chauhan PN, Noolvi MN, Chaturvedi K, Ganguly K, Shukla SS, et al. Polymeric micelles: Basic research to clinical practice. Vol. 532, *International Journal of Pharmaceutics.* 2017.
- 43.Balyapan H, Ak G. Nanoparticle Targeting Strategies In Cancer Therapy. In 2023.

- 44.Kianfar E. Protein nanoparticles in drug delivery: animal protein, plant proteins and protein cages, albumin nanoparticles. Vol. 19, Journal of Nanobiotechnology. 2021.
- 45.Soe ZC, Ou W, Gautam M, Poudel K, Kim BK, Pham LM, et al. Development of folate-functionalized PEGylated zein nanoparticles for ligand-directed delivery of paclitaxel. *Pharmaceutics*. 2019;11(11).
- 46.Chen G, Fu Y, Niu F, Zhang H, Li X, Li X. Evaluation of the colloidal/chemical performance of core-shell nanoparticle formed by zein and gum Arabic. Vol. 560, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2019.
- 47.Mühlebach S. Regulatory challenges of nanomedicines and their follow-on versions: A generic or similar approach? Vol. 131, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018.
- 48.Yao K, Chen W, Song F, McClements DJ, Hu K. Tailoring zein nanoparticle functionality using biopolymer coatings: Impact on curcumin bioaccessibility and antioxidant capacity under simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocoll*. 2018;79.
- 49.Wu LP, Wang D, Li Z. Grand challenges in nanomedicine. Vol. 106, *Materials Science and Engineering C*. 2020.

BÖLÜM 4

MOLEKÜLER BİYOLOJİDE YENİ NESİL GENOMİK YAKLAŞIMLAR: KLİNİK VE ARAŞTIRMA PERSPEKTİFLERİ

Dr. Öğr. Üyesi Deniz AŞLAR ÖNER¹

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.17113875>

¹ Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Atatürk Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Afyonkarahisar, Türkiye. deniz.oner@afsu.edu.tr, orcid id: 0000-0002-9515-0073

1. GİRİŞ

Genomik teknolojilerdeki önemli ilerlemeler, moleküler biyolojinin araştırma alanlarını genişletmiş ve bu gelişmeler, klinik uygulamalara yönelik moleküler temelli yaklaşımların önünü açmıştır. Özellikle Yeni Nesil Dizileme (NGS), Tüm Ekzom Dizileme (WES) ve Tüm Genom Dizileme (WGS) gibi yüksek verimli dizileme yöntemleri, insan genomunu benzeri görülmemiş bir hız ve doğrulukla çözümleyerek genetik hastalıkların tanısında, kanserin moleküler alt tiplenmesinde ve farmakogenetik uygulamalarda yeni ufuklar açmıştır. Bu teknolojiler, klasik tek gen temelli yaklaşımlardan, çoklu gen ve omik tabanlı analizlere geçişi mümkün kılarak hastalıkların genetik temelini daha kapsamlı ve bütüncül bir perspektifle değerlendirme olanağı sağlamaktadır (Zalis vd., 2024).

Genomik profillemenin sunduğu çok katmanlı analiz kapasitesi (genom, transkriptom, epigenom, proteom) ve biyoinformatik araçlarla desteklenen veri yorumlama süreçleri, yalnızca tanı koyma sürecini hızlandırmakla kalmayıp aynı zamanda hastaya özgü tedavi stratejilerinin geliştirilmesine doğrudan katkı sağlamaktadır. Kanser biyolojisinden nadir genetik bozukluklara, prenatal tanıdan farmakogenetiğe kadar uzanan geniş bir spektrumda bu teknolojiler, klasik fenotip-temelli sınıflamaların ötesine geçerek moleküler temelli yeniden sınıflandırma ve hedeflenebilir biyobelirteçlerin keşfine olanak tanımaktadır (Ma vd., 2021).

Bu dönüşüm, “bench-to-bedside” felsefesine uygun olarak, temel bilimlerde üretilen genomik bilginin klinik karar destek sistemleriyle bütünleşmesini sağlayarak translasyonel araştırmalar ile kişiselleştirilmiş tıp arasındaki köprüyü güçlendirmiştir. Bu bağlamda, genomik profilleme teknolojileri yalnızca araştırma laboratuvarlarının bir aracı olmaktan çıkmış, modern tıbbın ayrılmaz bir bileşeni haline gelerek hastalıkların moleküler temelli yönetiminde paradigmatik bir değişimi temsil etmektedir.

Bu bölümde, NGS, WES, WGS, mutasyon tanı panelleri, genomik alt tip analizleri ve multi-omik entegrasyon stratejileri sistematik olarak ele alınacak; bu yöntemlerin hastalıkların tanı, prognoz ve hedefe yönelik tedavi süreçlerinde nasıl kullanılabileceği kapsamlı bir şekilde tartışılacaktır.

2. GENOMİK PROFİLLEME NGS, WES, WGS, MUTASYON TANI, GENOMİK ALT TİP ANALİZLERİ

2.1 Yeni Nesil Dizileme (Next-Generation Sequencing, NGS):

Teknoloji ve Klinik Kullanımı

Yeni Nesil Dizileme (NGS), milyonlarca DNA fragmanının paralel olarak dizilenmesine olanak tanıyan yüksek verimli bir dizileme teknolojisidir. Bu yöntem, geleneksel Sanger dizileme tekniklerine kıyasla çok daha kısa sürede, çok daha büyük miktarda genomik veriye erişim imkânı sunar. Aynı anda binlerce gen bölgesinin analiz edilebilmesi, NGS'yi hem araştırma hem de klinik tanı alanlarında vazgeçilmez bir araç haline getirmiştir (Metzker, 2010).

NGS, genetik varyantların tespiti, nadir hastalıkların tanılanması, tümör profillemeye, farmakogenetik analizler ve prenatal tanı gibi pek çok klinik uygulamada kullanılmakta; bu sayede kişiselleştirilmiş tıp yaklaşımlarına katkı sağlamaktadır. Teknolojinin sürekli gelişimiyle birlikte analiz süresi kısaltmakta, maliyetler azalmakta ve klinik doğruluk giderek artmaktadır. Bu yönleriyle NGS, moleküler biyolojinin klinik pratiğe entegrasyonunda temel bir yapı taşı olarak değerlendirilmektedir.

2.1.1. NGS Çalışma Prensibi

2.1.1.1 DNA/RNA İzolasyonu

NGS analizinin ilk adımı, klinik veya araştırma örneklerinden DNA veya RNA'nın saflaştırılmasıdır. Kan, tükürük, doku biyopsileri veya hücre kültürlerinden elde edilen nükleik asitler, kit temelli veya manuel yöntemlerle izole edilir. İzole edilen nükleik asitlerin kalitesi ve miktarı süreçlerin başarısı açısından kritik öneme sahiptir.

2.1.1.2. Kütüphane Hazırlama

İzole edilen DNA veya RNA, dizileme sürecine uygun hale getirilmek üzere kütüphane hazırlama aşamasına alınır. Bu aşamada öncelikle DNA, belirli boyutlara -genellikle 200-500 baz çifti (bp)- parçalanır. Daha sonra, fragmanların uçlarına adaptör dizileri eklenir ve DNA uçları uygun şekilde onarılır. Bu adaptörler, dizileme işlemi sırasında örneklerin ayırt edilmesini sağlayan indeks dizilerini de içerir. Son olarak, kütüphane PCR amplifikasyonu

ile çoğaltılarak dizileme için yeterli miktarda DNA elde edilir. Bu işlem, NGS analizinin doğruluğu ve tekrarlanabilirliği açısından kritik öneme sahiptir.

2.1.1.3. Sekanslama

Kütüphane hazırlandıktan sonra dizileme işlemi için Illumina gibi sekanslama platformlarına yüklenir. Bu aşamada DNA fragmanları, akış hücrelerinin yüzeyine bağlanır. Ardından köprü amplifikasyonu ile DNA fragmanlarının çok sayıda kopyası oluşturulur. Dizileme işlemi sırasında, floresan etiketli nükleotidler tek tek eklenir ve her bir ekleme sonrasında oluşan sinyal, yüksek çözünürlüklü kameralar aracılığıyla görüntülenir. Bu sinyaller, dizilim bilgisinin dijital verilere dönüştürülmesinis sağlar.

2.1.1.4. Biyoinformatik Analiz

Sekanslama sonrası ham veriler FASTQ formatında elde edilir ve şu adımlar izlenir:

- **Kalite kontrol:** Verilerin Phred kalite skorları değerlendirilir.
- **Hizalama:** Okumalar, referans genoma (ör. GRCh38) hizalanır (BWA, Bowtie gibi hizalama araçları kullanılır).
- **Varyant Çağırımı:** Tek nükleotid varyantları (SNV), küçük insersiyon/delesyonlar (indel) ve kopya sayısı değişimleri (CNV) GATK, VarScan gibi yazılımlarla tespit edilir.

2.1.1.5. Klinik Raporlama

Biyoinformatik analiz sonrası elde edilen varyantlar, ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) kriterlerine göre sınıflandırılır: patolojik (pathogenic), olası patolojik (likely pathogenic), belirsiz öneme sahip varyantlar (vus), olası benign ve benign. Son aşamada, klinik açıdan anlamlı varyantlar detaylı olarak raporlanır ve hasta yönetimi veya araştırma sonuçları için kullanılır (Goodwin et al., 2016).

2.1.2. NGS Platformları ve Teknolojileri

- **Illumina (Sequencing-by-Synthesis):** En yaygın kullanılan platform; kısa okuma (150-300 bp) ve yüksek doğruluk sağlar (Goodwin vd., 2016).

- **Ion Torrent (Semiconductor sequencing):** pH değişimini ölçerek dizileme yapar (Rothberg vd., 2011).
- **Oxford Nanopore (Nanopore sequencing):** Tek molekül DNA/RNA'yı gerçek zamanlı uzun okuma kapasitesiyle diziler (Jain vd., 2018).
- **PacBio (Single-Molecule Real-Time-SMRT):** Yüksek doğruluklu uzun okuma (HiFi reads) sağlar (Wenger vd., 2019)

2.1.3. NGS'nin Klinik Kullanım Alanları

2.1.3.1. Nadir Genetik Hastalıkların Tanısı

NGS, nadir genetik hastalıkların tanısında yüksek tanısal verimlilik sağlayan bir teknolojidir. Geleneksel yöntemlerle tanı konulamayan olgularda, NGS ile tüm genom veya ekzon seviyesinde geniş kapsamlı analiz yapılabilir. NGS kullanımı sayesinde, hastalığa neden olan tek nükleotid varyantlar (SNV), küçük insersiyon/delesyonlar ve kopya sayısı değişiklikleri (CNV) hızlı ve hassas şekilde saptanabilir. Klinik fenotip ile ilişkili genler aynı anda analiz edilerek tanı süresi kısılır. Özellikle pediatrik hasta gruplarında, erken tanı ve tedavi planlamasına doğrudan katkı sağlar (Bamshad vd., 2011).

2.1.3.2. Kanserde Somatik Profilleme

TCGA Pan-Cancer analizleri (NGS): 33 kanser tipinden 10.000'den fazla tümör, NGS tabanlı genomik, transkriptomik ve epigenomik profilleme ile incelenmiş ve moleküler alt tipler tanımlanmıştır (Huang vd., 2018).

NGS ile EGFR mutasyon profillemesi: NGS ile EGFR, ALK ve ROS1 gibi sürücü mutasyonların hızlı ve çoklu panel bazlı analizi mümkün hale gelmiştir (El Osta vd., 2019).

2.1.3.3. Prenatal ve Neonatal Genomik Tanı

NGS tabanlı non-invaziv prenatal test (NIPT), anne plazmasında dolaşan hücresiz fetal DNA'nın (cffDNA) dizilenmesiyle trisomi 21, 18 ve 13 gibi kromozomal anomalilerin yüksek doğrulukla saptanmasını sağlar.

Bianchi ve ark. (2014), anne plazmasındaki hücresiz fetal DNA'nın massively parallel sequencing (NGS tabanlı) yöntemiyle analizi sayesinde, trisomi 21 ve diğer anöploidilerde yüksek doğruluk oranı elde etmiştir.

2.1.3.4. Likit Biyopsi (ctDNA ve cfDNA Analizi)

NGS tabanlı likit biyopsi, tümör DNA'sının (ctDNA) periferik kandan izole edilerek sekanslanması yoluyla minimal invaziv moleküler profil çıkarmayı sağlar. Bu yöntem, özellikle biyopsi alınması zor olan veya metastatik hastalığı bulunan olgularda tümör heterojenitesini yansıtan geniş spektrumlu genetik bilgi sunar.

Porter ve ark. (2022), metastatik baş-boyun kanseri hastalarında Guardant360 (NGS tabanlı ctDNA paneli) kullanarak retrospektif bir analiz gerçekleştirmiştir. Çalışma sonucu, NGS tabanlı likit biyopsinin klinik uygulamada hedeflenebilir mutasyonların belirlenmesi ve kişiselleştirilmiş tedaviye yönlendirilmesinde önemli bir araç olduğunu vurgulamaktadır (Porter vd., 2020).

2.1.4. NGS'nin Avantajları

Yüksek verimlilik ve paralel analiz kapasitesi: NGS, milyonlarca DNA fragmanını eş zamanlı olarak dizileyebilir. Bu yüksek paralel kapasite, kısa sürede çok sayıda örneğin analiz edilmesine olanak tanır.

Klinik tanıda geniş gen paneli taraması: Tek bir NGS çalışması ile yüzlerce hatta binlerce gen hedeflenebilir. Bu özellik, özellikle heterojen genetik temele sahip hastalıkların (örn. nörogelişimsel bozukluklar, kanser) tanısında büyük kolaylık sağlar.

Somatik ve germline varyantların aynı anda analizi: NGS, hem kalıtsal (germline) varyantları hem de edinilmiş (somatik) mutasyonları aynı platformda analiz etme imkânı sunar. Özellikle kanser genomik analizlerinde tümör-normal çift örnek üzerinden eş zamanlı değerlendirme yapılabilir.

2.1.5. NGS'nin Sınırlılıkları

Biyoinformatik analiz gereksinimleri: NGS verileri, büyük hacimde ham veri (FASTQ) üretir ve bu verilerin işlenmesi için yüksek hesaplama gücü ve güçlü depolama altyapısı gerektirir. Biyoinformatik analiz ve veri yönetimi bu sürecin en kritik aşamalarından biridir.

Klinik anlamlandırma zorlukları: NGS analizlerinde sıkça belirsiz öneme sahip varyantlar (VUS) saptanır. Bu varyantların klinik anlamlandırılması ve hastalık ilişkilerinin belirlenmesi zaman alıcıdır ve multidisipliner ekiplerin yorumuna ihtiyaç duyar.

Düşük alel frekanslı varyantlarda yanlış negatif riski: Özellikle düşük tümör hücre içeriğine sahip örneklerde veya düşük mozaiklik düzeylerinde, düşük frekanslı varyantların saptanması güç olabilir ve yanlış negatif sonuç riski artar (Goodwin vd., 2016; Mardis 2017).

2.2. Tüm Ekzom Dizileme (Whole-Exome Sequencing, WES): Kodlayan Bölgelerin İncelenmesi

WES, genomun yalnızca protein kodlayan bölgelerini hedefleyen yüksek verimli dizileme yöntemidir. İnsan genomunun yaklaşık %1-2'si ekzonlardan oluşur; ancak patojenik varyantların %85-90'ı bu bölgelerde bulunur (Bamshad vd., 2011).

WES, NGS platformlarında (Illumina, Ion Torrent) ekzonları zenginleştiren hibrid yakalama yöntemlerini kullanır ve WGS'ye göre maliyet avantajı sağlayarak klinik tanıda yaygın olarak tercih edilir (Biesecker vd., 2014).

2.2.1. WES Çalışma Prensibi

Çalışma prensibi temelde DNA izolasyonu, kütüphane hazırlığı, ekzon zenginleştirme, dizileme, biyoinformatik analiz ve klinik yorumlama aşamalarını içerir.

İlk aşamada, klinik örneklerden (kan, doku, tükürük vb.) yüksek kaliteli DNA izole edilir (Head et al., 2014). İzole edilen DNA, mekanik (sonikasyon) veya enzimatik yöntemlerle küçük fragmanlara ayrılarak dizileme için hazırlanır ve adaptör ligasyonu ile dizileme kütüphanesi oluşturulur.

Daha sonra, ekzon zenginleştirme aşaması uygulanır. Bu aşamada, genomun yalnızca protein kodlayan bölgelerini hedefleyen problemler (örn. Agilent SureSelect, Illumina Nextera) kullanılarak ekzon dizileri hibridize edilir ve manyetik boncuklarla seçilerek zenginleştirilir.

Zenginleştirilmiş DNA, Illumina veya Ion Torrent gibi NGS platformlarında yüksek doğrulukla dizilenir ve ham dizileme verileri (FASTQ formatında) elde edilir. Bu veriler, biyoinformatik analiz sürecine alınır ve yorumlanır (Goodwin et al., 2016).

Son aşamada, elde edilen varyantlar ACMG standartlarına göre sınıflandırılır ve klinik açıdan anlamlı olanlar raporlanır. Böylece WES, protein kodlayan bölgelerdeki genetik değişimlerin hızlı ve maliyet etkin bir biçimde

belirlenmesini sağlayarak nadir hastalıkların tanısı ve moleküler temelli klinik karar desteği için güçlü bir araç sunar (van Dijk vd., 2014; Head vd., 2014).

2.2.2. WES'in Klinik Kullanım Alanları

2.2.2.1. Nadir Genetik Hastalıkların Tanısı

WES, nadir ve açıklanamayan genetik hastalıkların tanısında güçlü bir yöntemdir. Yang ve arkadaşlarının (2014), 2.000'den fazla hasta üzerinde yaptığı çalışmada klinik WES'in tanısal verimliliğini %25 olarak bildirmiştir. Çalışma, özellikle pediatrik hasta grubunda WES'in klasik testlerle tanı konulamayan vakalarda ek teşhis sağladığını göstermiştir (Yang vd., 2014). Buna paralel olarak, Deciphering Developmental Disorders (DDD) Study (2017), 4.293 çocukta yaptığı geniş çaplı analizde WES'in nörogelişimsel bozukluklarda yeni gen-varyant ilişkileri tanımladığını ve tanısal katkıyı anlamlı şekilde artırdığını raporlamıştır (Estévez-Arias vd., 2025).

2.2.2.2. Klinik Genetik Panellerin Alternatifi

Gold ve arkadaşları (2024) çalışmasında, yoğun bakımda yatan 365 yetişkin hastada WES uygulanmış ve %24.7 tanısal verimlilik raporlanmıştır. Ayrıca, hastaların %76.6'sında genetik tanıya dayalı olarak tedavi planlarında değişiklik yapılmıştır. Bu çalışma, WES'in sadece pediatrik değil yetişkin hastalarda da nadir ve kompleks genetik durumların tanısında güçlü bir araç olduğunu ve tedavi kararlarını doğrudan etkilediğini göstermektedir.

2.2.2.3. Kanser Genetiği

Son yıllarda WES, kanser genomik analizlerinde yalnızca araştırma alanında değil, klinik onkolojide de kullanılabilir hale gelmiştir. Klinik uygulamalara yönelik en önemli adımlar, formalinle fikse, parafine gömülü (FFPE) tümör dokularından hızlı ve güvenilir WES verisi elde edilmesi, analizlerin klinik açıdan yorumlanması ve tedavi karar süreçlerine entegrasyonudur. WES'in translasyonel kullanımı, hedefe yönelik tedavi ve klinik deneme katılımında hastalara doğrudan katkı sağlamaktadır

Örneğin, standart panel testlerinde sonuç alınamayan metastatik akciğer adenokarsinomu olan bir hastada WES ile KRAS A146V mutasyonu saptanmış, bu bulgu prelinik düzeyde CDK4 inhibitör duyarlılığıyla

ilişkilendirilmiş ve hasta ilgili klinik denemeye katılarak stabil hastalık yanıtı elde etmiştir (Van Allen vd., 2014).

2.2.2.4. Prenatal Tanı ile WES Uygulamaları

Yapısal anomalili fetüslerde yapılan prenatal WES çalışmaları, CMA/karyotip negatif vakalarda yüksek tanısal getiri sağlamaktadır: Mellis ve arkadaşlarının, meta-analiz sonuçlarına göre 4.350 fetüs incelenmiş ve CMA/karyotype negatif anomalilerde ES'in tanısal katkısı %31 olarak hesaplanmıştır (Mellis vd., 2022). Greenbaum ve arkadaşlarının çalışmalarında (2019), 45 ailelik kohortta prenatal anomalili fetüslerde genel tanı oranı %28,9, yalnızca anomalili vakalarda ise %31,7 olarak saptanmıştır. Özellikle beyin, renal ve kas-iskelet sistemi anomalili vakalarda tanı oranı %42,9-60 aralığında yüksek bulunmuştur.

2.2.3. WES Avantajları

Protein kodlayan bölgelerde yüksek derinlik ve hassasiyet: WES analizleri genellikle $\geq 100\times$ kapsama derinliğiyle gerçekleştirilir; bu sayede SNV ve küçük indeller yüksek güvenilirlikte tespit edilir. Bu durum, tanısal doğruluğu artırır ve küçük mutasyonların tanımlanmasını kolaylaştırır.

Klinik olarak anlamlı varyantları kapsama oranı yüksek: Bilinen hastalıkla ilişkili germline ve somatik varyantların %85-90'ı protein kodlayan bölgelerde yer almaktadır. Dolayısıyla WES, bu klinik olarak önemli mutasyonların büyük çoğunluğunu yakalayabilir

Maliyet ve işlem yükü açısından WGS'ye göre avantajlı: Sadece exom (%1-2 genom) tarandığı için WES hem daha düşük sıralama maliyetine sahiptir hem de veri boyutu küçük olduğu için bilgi işlem yükü düşüktür. Geniş örnek işleme kapasitesi, hızlı analiz ve daha az bellek kullanımı gibi avantajları vardır (Sun vd., 2021).

2.2.4. WES Sınırlılıkları

Regülatör bölgeler, intronlar ve kodlamayan DNA'yı kapsamaz: Kodlamayan bölgelerdeki varyantlar (promotor/enhancer/regülatör/eğer genetik hastalıkta rol oynuyorsa) WES ile tespit edilemez; bu tür varyantların önemli olduğu birçok monogenik hastalıkta eksiklik yaratır (Brlek vd., 2024).

CNV ve büyük yapısal değişikliklerin (SV) tespit gücü sınırlıdır: WES, yapısal varyantları yalnızca okuma derinliğine dayalı analizle tanıyabilir ve genellikle küçük CNV (<10 kb) ve yapısal kırılmaları güvenilir şekilde saptamakta zayıftır. WGS veya kromozomal mikrodarray yöntemleri bu alanlarda daha güvenilirlerdir (Evans vd., 2022).

Düşük mozaiklik düzeylerini saptama gücü düşüktür: Mozaiklik içeren örneklerde (örneğin somatik mosaik vakalar veya düşük allel fraksiyonlu mutasyonlar), WES sıklıkla yeterli hassasiyet gösteremeyebilir; bu durumlarda ultra-derin dizileme veya özel yöntemler gerekebilir (Bartha vd., 2019).

2.3. Tüm Genom Dizileme (Whole-Genome Sequencing, WGS): Kodlamayan Bölgeler Dahil Genomik İnceleme

WGS, genomun tamamını (kodlayan ekzon bölgeler + kodlamayan intronlar, regülatör bölgeler ve intergenik alanlar) kapsayan dizileme yöntemidir. İnsan genomunun yaklaşık %98'i kodlamayan DNA'dan oluştuğundan, WGS bu bölgelerdeki varyantları da ortaya çıkararak genomik analizde en kapsamlı yaklaşımı sunar.

WGS, hem kısa okuma (short-read Illumina) hem de uzun okuma (long-read Oxford Nanopore ve PacBio) teknolojileriyle uygulanabilir ve yapısal varyantlar, kopya sayısı değişiklikleri ve kompleks genom bölgelerinin analizinde üstündür (Bagger vd., 2024).

2.3.1. WGS'nin Çalışma Prensibi

2.3.1.1. Örnek Hazırlığı

WGS genellikle EDTA'lı tam kan, taze veya formalinle fiks edilmiş doku biyopsileri ya da cerrahi olarak elde edilen tümör örneklerinden izole edilen yüksek molekül ağırlıklı DNA ile başlatılır. CNV analizlerinde yüksek molekül ağırlıklı DNA tercih edilir. Yeni nesil amplifikasyonsuz protokoller, PCR kaynaklı yanlılığı azaltarak daha homojen kapsama (coverage) elde edilmesini sağlar.

2.3.1.2. Kütüphane Hazırlığı

İzole edilen DNA, kısa fragmanlara ayrılır ve adaptör dizileri eklenir. Barkod etiketleme sayesinde farklı hasta örnekleri tek bir akış hücresinde paralel olarak dizilenebilir.

2.3.1.3. Küme Oluşturma ve Dizileme

Fragmanlar akış hücresine yüklenir ve yüzeye bağlanarak polimeraz aracılığıyla çoğaltılır. Tek iplikçikli DNA kümeleri oluşturulduktan sonra, floresan işaretli terminatör nükleotidlerinin eklenmesine dayalı sequencing-by-synthesis yöntemi ile dizileme yapılır (özellikle Illumina platformlarında).

2.3.1.4. Veri Toplama ve Biyoinformatik İşleme

Sekanslama sonrası ham veriler FASTQ formatında elde edilir ve yüksek performanslı hesaplama (HPC) altyapısına aktarılır. Okumalar referans genom (ör. GRCh38) ile hizalanır ve hizalanmış verilerden BAM dosyaları oluşturulur. Varyant çağırımı ile SNV, küçük indel ve yapısal varyantları içeren VCF dosyaları elde edilir.

2.3.1.5. Varyant Filtreleme ve Klinik Raporlama

Ortalama bir WGS analizi yaklaşık 5 milyon varyant içerir. Bu varyantlar kalite metrikleri, popülasyon frekansı (örn. gnomAD), fonksiyonel etkiler ve klinik önem kriterlerine göre filtrelenir. Klinik olarak anlamlı varyantlar, ACMG kriterlerine göre sınıflandırılarak yorumlanır ve klinik rapor halinde iletilir (Bagger et al., 2024).

2.3.2. WGS'nin Klinik Kullanım Alanları

2.3.2.1. Regülatör ve Kodlamayan Bölgelerin İncelenmesi

PCAWG konsorsiyumu, 2.658 tümör ve eşleşen normal doku genomuyla yapılan bir analizde, kodlamayan regülatör bölgelerde yer alan kanser sürücü mutasyonlarını tanımlamıştır. TERT promotor mutasyonları dahil olmak üzere, nadir non-coding sürücüler kapsamlı şekilde raporlanmıştır. Bu veriler WGS kullanılarak elde edilmiştir (Rheinbay vd., 2020).

2.3.2.2. Yapısal Varyantlar ve Kopya Sayısı Değişiklikleri (CNV)

WGS, kanser genomlarında kompleks SV ve CNV yüksek doğrulukla analizi için altın standarttır.

PCAWG (Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes) konsorsiyumu tarafından yayımlanan önemli bir çalışmada (Nature, 2020), 2.658 tümör genomu incelenmiş ve özellikle chromothripsis gibi, tek bir olayla gerçekleşen büyük çaplı kromozomal yeniden düzenlemeler tanımlanmıştır.

Li ve ark. (2020), farklı yapısal varyant tiplerini (örneğin: delesyonlar, tandem duplikasyonlar, inversiyonlar, translokasyonlar ve chromothripsis) detaylı olarak sınıflandırmış ve bu varyantların biyolojik etkilerini ortaya koymuştur. Yapısal varyantların doğru şekilde saptanabilmesi için en az iki farklı SV çağırma algoritmasının (örneğin: Manta, DELLY, LUMPY) bir arada kullanılması önerilmiştir; bu şekilde %90 duyarlılık ve %97,5 özgüllük düzeyine ulaşılmıştır (Li vd., 2020).

2.3.2.3. Mitokondriyal Genom Analizi

WGS, mitokondriyal DNA (mtDNA) varyantlarının saptanması ve heteroplazmi düzeylerinin analizinde yüksek doğruluk sağlayan etkili bir yöntemdir. WGS, mtDNA için genellikle $\geq 2000\times$ kapsama derinliği sunarak düşük frekansta bulunan heteroplazmik varyantların bile güvenilir şekilde tespit edilmesini mümkün kılar.

Davis ve ark. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada, WGS kullanılarak otopsi kas dokusu örneğinde mtDNA delesyonu tespit edilmiş ve bu delesyonun heteroplazmi seviyesi %15,7 olarak raporlanmıştır. Bu bulgu, WGS'nin heteroplazmi analizlerinde klinik olarak kullanılabilirliğini desteklemektedir.

Hong ve ark. (2023), geniş ölçekli WGS analizlerinde, mtDNA heteroplazmik varyantlarının %40-45 oranında saptanabildiğini ve bu oranın yaşla birlikte arttığını ortaya koymuştur.

Gupta ve ark. (2023) ise 274.832 bireylik geniş bir WGS kohortu üzerinde yaptığı çalışmada, nükleer genetik varyantların mtDNA kopya sayısı (mtCN) ve heteroplazmi düzeylerini etkilediğini göstermiştir. Bu sonuçlar, mtDNA düzenlenmesinin hem popülasyon düzeyinde hem de klinik yorumlamada önemli bir parametre olduğunu ortaya koymaktadır.

2.3.2.4. Kanser Genetiği ve Somatik Profilleme

Tümör-normal çift örnek analizleri, somatik mutasyonların, epigenetik imzaların ve yapısal genomik değişikliklerin eş zamanlı olarak profillenmesini mümkün kılar. Bu yaklaşım, hedefe yönelik tedavi kararlarını destekleyen tümör-spesifik genetik değişimlerin belirlenmesinde kritik rol oynar (Priestley vd., 2019).

Pan-kanser WGS analizi, 38 farklı tümör tipinde genomik ve epigenetik düzenleyici mutasyonları tanımlamış ve kanserin moleküler heterojenitesine dair kapsamlı bir referans oluşturmuştur (Campbell vd., 2020).

2.3.2.5. Mikrobiyom ve Viral Entegrasyon

WGS, yalnızca insan genomunun değil, aynı zamanda mikrobiyom ve viral entegrasyon analizlerinin de yüksek doğrulukla incelenmesine olanak tanır. Bu kapsamda, Human Microbiome Project (HMP) projesi, 298 sağlıklı birey üzerinde hem konak genomik WGS hem de mikrobiyom profillemesini entegre ederek yürütülmüştür. Bu büyük ölçekli çalışma, bireylerin genetik yapısı ile vücut bölgelerine özgü mikrobiyom bileşimi arasındaki istatistiksel ilişkileri ortaya koymuş ve mikrobiyomun genetik kontrolüne dair ilk geniş ölçekli verileri sunmuştur (Parida vd., 2025).

WGS, ayrıca viral genom entegrasyonlarının incelenmesinde de güçlü bir araçtır. Akagi ve ark. (2014), HPV (Human Papillomavirus) entegrasyonlarını inceleyen öncü çalışmalarında WGS kullanarak HPV'nin konak genomundaki entegrasyon noktalarını ve bu entegrasyonların yol açtığı yapısal değişiklikleri ayrıntılı şekilde tanımlamıştır. Bu çalışma, HPV'nin kanser gelişiminde genomik instabilitiyi nasıl tetiklediğine dair önemli bilgiler sağlamıştır.

Daha yakın tarihli bir çalışmada, Sasa ve ark. (2025), HPV pozitif baş-boyun kanserlerinde WGS kullanarak intratumoral heterojeniteyi, HPV entegrasyon varyasyonlarını ve bu varyasyonların tümör genomunda yol açtığı instabilitiyi analiz etmiştir. Bulgular, viral entegrasyonların tümör biyolojisi üzerindeki etkilerini ortaya koyarak, HPV ilişkili tümörlerde moleküler heterojenitenin klinik önemini vurgulamaktadır.

2.3.3. WGS Avantajları

Tüm genomun eksiksiz analizi: WGS ile kodlanan ve kodlanmayan bölgeler dahil bütün genomu analiz edebilir, böylece yalnızca bilinen gen bölgeleriyle sınırlı kalmaz. Bu yaklaşım, tek nükleotid varyantlardan yapısal yeniden düzenlemelere kadar geniş bir spektrumu kapsar.

Kodlamayan regülatör bölgelerdeki varyantların tespiti: WGS, promotor, enhancer gibi regülatör bölgelerdeki patojenik varyantları yakalayarak, WES'in baki kaldığı klinik olarak anlamlı genomik değişiklikleri ortaya çıkarabilir.

Yapısal varyantlar, CNV ve kompleks yeniden düzenlemelerin saptanması: Delesyon, inversiyon, tandem duplication, translokasyon gibi kompleks yapısal değişiklikler WGS ile tespit edilirken, CNV'lerin de yüksek doğrulukla çağrılması mümkündür.

Tek testle germline ve somatik varyant analizi: Hem kalıtsal mutasyonlar hem de tümöre özgü somatik varyasyonlar WGS ile aynı anda analiz edilebilir, özellikle tümör-normal çift analizlerinde klinik karar sürecini destekler (Brlek vd., 2024).

2.2.4. WGS Sınırlılıkları

Yüksek maliyet: WGS, WES veya panel testlere göre daha pahalıdır; maliyet verileri düşse de klinik pratikte hâlâ önemli bir engeldir.

Büyük veri hacmi ve altyapı gereksinimi: Tek bir WGS ham veri seti genellikle 100-200 GB'ın üzerindedir. Bu da güçlü bilişim altyapısı, veri depolama ve analiz kapasitesi gerektirir.

Klinik anlamlandırma zorlukları (VUS): Özellikle belirsiz önemdeki varyantlar yüksek sayıda bulunur ve bunların doğru klinik anlamlandırılması uzman ekip ve multidisipliner değerlendirme gerektirir (Bagger vd., 2024).

2.4. Mutasyon Tanı: Klinik Panel Testleri

Klinik genetik paneller, belirli bir hastalık grubu ya da klinik fenotip ile ilişkili sınırlı sayıda geni hedef alan NGS tabanlı analizlerdir. Bu testler; hedefe odaklı dizileme, derin okuma (örneğin $>500\times$) ve sınırlı veri hacmi nedeniyle hem hızlı hem de maliyet-etkin sonuca olanak tanır (Satam vd., 2023).

2.4.1. Klinik Uygulama Alanları

2.4.1.1. Hastalık Spesifik Paneller

Bu paneller, belirli bir hastalıkla ilişkilendirilmiş tek bir veya birkaç geni analiz eder (örneğin: CFTR paneli-kistik fibrozis genleri). Yalnızca ilgili genleri hedeflediğinden, yüksek duyarlılık, düşük maliyet ve hızlı sonuç sağlar. Özellikle monogenik hastalık tanısında etkilidir (Xue vd., 2015).

2.4.1.2. Fenotip Tabanlı Paneller

Klinik fenotip açısından benzer belirtileri paylaşan farklı genetik hastalıkları kapsar (örneğin: nörogelişimsel gecikme paneli). Bu yaklaşımla, genetik heterojenite olguları daha yüksek tanı oranıyla yönetilebilir hale gelir (Bean vd., 2020).

2.4.1.3. Kanser Panelleri (Somatik ve Germline)

Somatik paneller (örneğin: Oncomine, FoundationOne CDx): tümör dokularındaki hedef genlerde mutasyon, CNV veya füzyon gibi değişiklikleri saptamak için kullanılır.

Germline paneller, BRCA1/2 gibi kanser yatkınlığıyla ilişkili genlerdeki kalıtsal varyantları inceler. Hem germline risk analizi hem de tümörde hedefli tedavi kararları için kullanılır (Chen vd., 2024).

2.4.1.4. Farmakogenetik Paneller

İlaç metabolizmasını etkileyen genlerdeki varyantları belirlemeye yönelik paneldir. Örneğin: CYP2D6, TPMT, DPYD gibi kritik farmakogenetik genlerdeki polimorfizmleri analiz eder. Bu paneller; ilaç doz optimizasyonu, yan etki risk azaltma ve tedavi etkinliği açısından klinik karar desteği sağlar (Anderson vd., 2020).

2.4.2. Çalışma Prensibi

2.4.2.1. DNA/RNA İzolasyonu

Klinik panel analizleri, periferik kan (germline), tümör biyopsisi (somatik) veya alternatif biyolojik örneklerden (örneğin tükürük veya nazofaringeal sürüntü) elde edilen DNA veya RNA ile başlar. Bu aşamada yüksek kaliteli nükleik asit izolasyonu, varyant analizi doğruluğu açısından

kritik önemdedir. Hedeflenen örnek türüne uygun izolasyon kitleleri ve protokoller kullanılarak, bozulmamış ve saf nükleik asitler elde edilir.

2.4.2.2. Panel Hedef Zenginleştirme

Hedef gen bölgelerinin zenginleştirilmesi için iki temel yöntem kullanılır:

PCR Bazlı Amplifikasyon: Belirli gen bölgelerinin PCR ile çoğaltılması yoluyla hedef genler seçici olarak zenginleştirilir.

Hibrid Yakalama: Biotinilize probalar aracılığıyla spesifik gen bölgeleri hedeflenir ve manyetik boncuklarla çekilerek saflaştırılır. Bu yöntem, özellikle geniş panel testlerinde daha homojen kapsama sağlar.

2.4.2.3. NGS Tabanlı Dizileme

Zenginleştirilmiş hedef bölgeler, kısa okuma (short-read) tabanlı NGS platformlarında (örn. Illumina, Ion Torrent) yüksek derinlikte dizilenir. Yüksek kapsama derinliği ($\geq 500\times$), özellikle düşük frekanslı somatik varyantların güvenilir bir şekilde saptanmasını sağlar (Miller et al., 2021).

2.4.2.4. Biyoinformatik Analiz

Dizileme sonrası veriler, yüksek performanslı biyoinformatik analiz süreçlerine tabi tutulur:

Okumaların Referans Genoma Hizalanması: FASTQ formatındaki ham diziler, insan referans genomuna hizalanarak BAM dosyaları oluşturulur.

Varyant Çağırımı: Tek nükleotid varyantları (SNV) ve küçük indeller (insertion/deletion) tespit edilir.

Varyant Sınıflandırması: Saptanan varyantlar ACMG/AMP kılavuz kriterlerine göre sınıflandırılır (Richards vd., 2015).

2.4.2.5. Klinik Raporlama

Biyoinformatik analiz sonrası elde edilen bulgular, klinik olarak yorumlanır ve raporlanır. Klinik rapor; Tanısal olarak anlamlı varyantları, FDA onaylı hedefe yönelik tedavi seçeneklerini, hastaya uygun klinik araştırma ve denemeleri içerir (Goodwin vd., 2016). Bu süreç, multidisipliner bir yaklaşım

gerektirir; klinik genetik uzmanları, moleküler patoloğlar ve ilgili klinisyenler tarafından varyantlar birlikte değerlendirilerek hasta bakımına entegre edilir.

2.4.3. Panel Testlerinin Avantajları

Maliyet etkinlik ve hız: Panel testleri, veri analiz süresini ve yorumlama yükünü büyük ölçüde azaltarak klinik karar destek sistemini hızlandırır.

Yüksek dizileme derinliği: Tanımlı gen kümesinde derin okuma yapılarak, nadir germline ya da somatik mozaiklikler daha güvenilir şekilde tespit edilebilir.

Klinik duyarlılık: Geniş panel uygulamalarında tanı duyarlılığı artarken, VUS sayısı da artabilmekte; bu durum panel seçiminde kritik bir karar parametresidir.

Standardizasyon: Elde edilen sonuçların ACMG sınıflandırma kriterlerine uygun şekilde yorumlanması zorunludur; bu, klinik anlamlandırmayı güvenilir kılar (Satam vd., 2023).

2.4.4. Panel Testlerinin Sınırlılıkları

Yeni gen-hastalık ilişkilerini kapsamaz: Klinik paneller, yalnızca panelde tanımlanmış genleri hedeflediğinden yeni tanımlanan gen-hastalık ilişkilerini veya nadir varyantları dışarıda bırakabilir.

Kodlamayan bölgelerdeki regülatör varyantları analiz etmez: Hedeflenen paneller, yalnızca ekzon bölgeleri ve yakın splice bölgelerini taradığından promotor, enhancer veya uzak regülatör bölgelerdeki varyantları saptayamaz.

Panelde olmayan nadir mutasyonlar gözden kaçabilir: Belirli fenotiplerde paneller, hastalık spektrumunun tamamını kapsamayabilir ve panel dışı genlerdeki varyantlar tespit edilemez (Xue vd., 2015).

2.5 Genomik Alt Tip Analizleri: Klinik Relevans

Genomik alt tip analizleri; hastalıkların, özellikle kanser ve karmaşık genetik bozuklukların moleküler düzeyde yeniden sınıflandırılmasını sağlar. Bu analizler histopatolojik tanının ötesinde, tedavi yanıtı ve prognostik bilgi edinmek için kullanılır.

Moleküler Sınıflandırma: TCGA analizleri (~10.000 tümörde, 33 tip) ile tümörler moleküler alt tiplerine ayrılmıştır. Hücre kökeni temelli bu sınıflandırma, prognostik açıdan daha isabetli bilgi sunmaktadır

Alt Tiplerin Klinik Anlamı: mRNA tabanlı metabolik ifade alt tipleri, tümör biyolojisi ve hayatta kalım gibi klinik sonuçlarla ilişkilendirilebilmiştir. Bu alt tipler farklı terapötik stratejiler açısından ayırım getirir

Multiplatform Entegrasyon: Gen ifade, genometik, metilasyon, proteomik gibi verilerin birleşimiyle geliştirilen moleküler alt tiplerin tanımlanması, hastalıkların moleküler profilini daha iyi anlamayı mümkün kılar ve hedefe yönelik tedavilerin planlanmasını destekler

Uluslararası Veri Konsorsiyumu: ICGC ve PCAWG projeleri, >38 kanser tipinde alt tip analizi yaparak, klinik uygulamalara aktarılabilir moleküler sınıflandırmalar oluşturmuştur (Hoadley vd., 2018; Arora vd., 2020).

2.5.1. Kanserde Genomik Alt Tip Analizleri

Kanserler, histolojik olarak benzer görünse de moleküler düzeyde farklı genomik alt tiplere ayrılabilir. Bu alt tipler, tedavi yanıtı, prognoz ve immün yanıt profili açısından farklılık gösterir ve kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin belirlenmesinde kritik rol oynar.

2.5.1.1 Meme Kanseri

The Cancer Genome Atlas (TCGA) analizine göre meme kanseri dört ana genomik alt tipe ayrılmıştır:

- Luminal A: ER+ (östrojen reseptörü pozitif), düşük proliferasyon oranı; iyi prognoz.
- Luminal B: ER+, yüksek proliferasyon; kemoterapi ihtiyacı artar.
- HER2-enriched: HER2 amplifikasyonu; trastuzumab ve diğer HER2 hedefli tedavilerden fayda görür.
- Basal-like / Triple-negative: ER-, PR- ve HER2- negatif; agresif seyirli, immünoterapiye aday (Cancer Genome Atlas Network, 2012).

2.5.1.2. Akciğer Kanseri

Akciğer adenokarsinomları, genomik alt tiplere ayrılarak tirozin kinaz inhibitörleri (TKI) gibi hedefe yönelik tedavilerle ilişkilendirilir:

- EGFR mutasyonları: Erlotinib, gefitinib gibi TKI'lere duyarlıdır.
- ALK ve ROS1 yeniden düzenlenmeleri: Crizotinib ve ikinci nesil ALK inhibitörleri etkilidir.
- KRAS mutasyonları: Genellikle TKI'ye yanıtızsız, yeni nesil KRAS-G12C inhibitörleri potansiyel tedavi sağlar (Lynch vd., 2004)

2.5.1.3 Kolorektal Kanser

Kolorektal kanserler, Consensus Molecular Subtypes (CMS) adı verilen dört alt tipe ayrılmıştır:

- CMS1 (MSI-Immune): Mikrosatellit instabilitesi yüksek, yoğun immün infiltrasyon; immünoterapiye yanıtı.
- CMS2 (Canonical): WNT/MYC aktivasyonu belirgin, klasik epitelyal özellikler.
- CMS3 (Metabolic): Metabolik yeniden programlama baskın.
- CMS4 (Mesenchymal): Stromal invazyon yüksek, kötü prognosis ile ilişkili (Guinney vd., 2015).

2.5.2. Pan-Kanser Multi-Omik Analizler

Pan-kanser analizler, farklı kanser türlerinden elde edilen genomik, transkriptomik, epigenomik ve proteomik verilerin entegre edilmesiyle tümör biyolojisinin bütüncül olarak anlaşılmasını sağlar.

2.5.2.1. Pan-Kanser Atlas

The Cancer Genome Atlas (TCGA), 33 farklı kanser tipinde 11.000'den fazla tümör örneğinin genom, transkriptom, epigenom ve proteom verilerini entegre ederek moleküler alt tipleri tanımlamıştır. Bu analizler sayesinde klasik histopatolojik sınıflamaların ötesine geçilerek fonksiyonel genomik alt tipler belirlenmiştir. (Hoadley vd., 2018).

2.5.2.2. Epigenetik İşaretler

Epigenetik işaretler (DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kromatin erişilebilirliği), tümör alt tiplerinin belirlenmesinde ve tedavi yanıtının öngörülmesinde kritik rol oynar. Glioblastomda MGMT promotor

metilasyonu, temozolomid (TMZ) tedavisine yanıtı belirleyen önemli bir biyobelirteçtir (Stupp vd., 2005).

2.5.2.3. İmmün Alt Tipler ve İmmünoterapi Yanıtı

Pan-kanser analizleri, tümör mutasyon yükü (TMB) ve neoantijen yükü gibi parametrelerin immün yanıtı ve immün kontrol noktası inhibitörlerine (ICI) yanıtı öngörmede kullanılabileceğini göstermiştir. TMB yüksek tümörler, özellikle PD-1/PD-L1 inhibitörleri gibi immünoterapilere daha iyi yanıt verir (Samstein vd., 2019).

2.5.3. Nörolojik ve Diğer Hastalıklarda Genomik Alt Tipler

2.5.3.1. Epilepsi-Genetik Alt Tipler ve Klinik İlişki

SCN1A (Dravet sendromu gibi) ve GABRG2 gibi genlerdeki varyantlar, epileptik ensefalopatilerde alt tip sınıflandırmasına yol açar; bu, belirli antiepileptik ilaç seçiminde (örneğin, sodyum kanal bloğu yapan ilaçlardan kaçınma) kritik rol oynar. İlgili klinik yaklaşım örneği: SCN1A mutasyonu taşıyan hastalarda, klobazam gibi GABAergic ajanlar tercih edilirken, sodyum kanal blokörleri (karbamazepin, fenitoin gibi) kaçınılmalıdır (Menezes vd., 2020).

2.5.3.2. Otoimmün Hastalıklar-HLA ve Epigenetik Temelli Alt Tipler

Romatoid artrit (RA) ve sistemik lupus eritematozus (SLE) gibi otoimmün hastalıklarda HLA DRB1 allelik varyantları, özellikle “shared epitope” haplotipleri, hastalık subgruplarının genetik bağlamda alt tiplerini oluşturur (Wysocki vd., 2020).

Ayrıca, epigenetik analizler, RA ve SLE’ye özgü alt grupları ayırt etmede kullanılabiliyor. IFI44L gen promotör metilasyonu gibi biyobelirteçler, lupusun tanısallık ve şiddet öngörücü bir alt tip belirlemede potansiyel taşıyor. Bu sınıflandırmalar, hastaya özgü tedavi seçimi (örn. biyolojik ajanlar, epigenetik ilaçlar) ve prognoz değerlendirmesi açısından kullanışlıdır (Mu vd., 2024).

2.5.4. Klinik Relevans ve Uygulama

HER2-amplifikasyonu taşıyan tümör alt tiplerinde hedefli tedaviler (ör. trastuzumab, trastuzumab deruxtecan) doğrudan etkilidir. Moleküler alt tip analizi ile bu hastalarda tedavi yanıtı daha doğru şekilde öngörülebilir.

Genomik alt tip sınıflaması, hastaları uygun klinik deneme gruplarına yönlendirerek yenilikçi tedavi seçeneklerinden faydalanmalarını sağlar (örneğin BRCA-mutant, HER2-low alt tipler) (Huang vd., 2020; Rediti vd., 2020).

2.6. Gelecek Klinik Uygulama Perspektifleri

Genomik profillemeye, klinik tanı ve tedavi yaklaşımlarını dönüştüren güçlü bir araç haline gelmiş olmakla birlikte, gelecekte bu teknolojilerin daha geniş ve etkin bir şekilde klinik pratiğe entegrasyonu öngörülmektedir. NGS, WES ve WGS gibi dizileme teknolojilerinin, maliyetlerin düşmesi ve analiz altyapılarının gelişmesiyle birlikte rutin sağlık hizmetlerine daha fazla entegre edilmesi beklenmektedir.

Özellikle NGS tabanlı tanı panellerinin, hedefli tedavi stratejileri ve farmakogenetik uygulamalarla daha yaygın olarak kullanılması; bireyselleştirilmiş tıp uygulamalarında standardizasyonun sağlanması açısından kritik rol oynayacaktır. WES ve WGS'nin ise özellikle nadir genetik hastalıkların tanısında, kodlamayan bölgelerdeki düzenleyici varyantların tespitinde ve tümör-normal çift analizlerinde rutin kullanım düzeyine ulaşması, tanısız verimliliği artıracaktır.

Genomik alt tip analizleri ve pan-kanser multi-omik entegrasyon, kanser biyolojisinin ötesinde nörolojik ve immünolojik hastalıklar gibi kompleks bozuklukların sınıflandırılmasında klinik olarak belirleyici hale gelecektir. Moleküler alt tiplerin tanımlanması, immünoterapiler, epigenetik tedaviler ve yeni nesil hedefe yönelik ajanların daha hassas şekilde seçilmesine olanak tanıyacaktır.

Sonuç olarak, genomik profillemeye ve buna entegre multi-omik yaklaşımlar, hastalıklara ilişkin moleküler bilgiyi doğrudan klinik karar destek sistemlerine taşıyarak bireyselleştirilmiş tıbbi “bench-to-bedside” anlayışıyla bir adım daha ileriye taşıyacaktır. Bu ilerlemeler, gelecekte hem tanısız doğruluk hem de tedavi etkinliği açısından klinik pratiğin dönüşümüne öncülük edecektir.

KAYNAKÇA

1. Akagi, K., Li, J., Broutian, T. R., Padilla-Nash, H., Xiao, W., Jiang, B., Rocco, J. W., Teknos, T. N., Kumar, B., Wangsa, D., He, D., Ried, T., Symer, D. E., & Gillison, M. L. (2014). Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. *Genome Research*, 24(2), 185–199. <https://doi.org/10.1101/gr.164806.113>
2. Anderson, H. D., Crooks, K. R., Kao, D. P., et al. (2020). The landscape of pharmacogenetic testing in a US managed care population. *Genetics in Medicine*, 22, 1247–1253. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-0788-3>
3. Arora, A., Olshen, A. B., Seshan, V. E., et al. (2020). Pan-cancer identification of clinically relevant genomic subtypes using outcome-weighted integrative clustering. *Genome Medicine*, 12, 110. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00804-8>
4. Bagger, F. O., Borgwardt, L., Jespersen, A. S., et al. (2024). Whole genome sequencing in clinical practice. *BMC Medical Genomics*, 17, 39. <https://doi.org/10.1186/s12920-024-01795-w>
5. Bamshad, M. J., Ng, S. B., Bigham, A. W., Tabor, H. K., Emond, M. J., Nickerson, D. A., & Shendure, J. (2011). Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nature Reviews Genetics*, 12(11), 745–755. <https://doi.org/10.1038/nrg3031>
6. Bartha, Á., & Györfy, B. (2019). Comprehensive outline of whole exome sequencing data analysis tools available in clinical oncology. *Cancers*, 11(11), 1725. <https://doi.org/10.3390/cancers11111725>
7. Bean, L. J. H., Funke, B., Carlston, C. M., Gannon, J. L., Kantarci, S., Krock, B. L., Zhang, S., & Bayrak-Toydemir, P. (2020). Diagnostic gene sequencing panels: From design to report—a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in Medicine*, 22(3), 453–461. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0666-z>
8. Bianchi, D. W., Parker, R. L., Wentworth, J., Madankumar, R., Saffer, C., Das, A. F., Craig, J. A., Chudova, D. I., Devers, P. L., Jones, K. W., Oliver, K., Rava, R. P., & Schnert, A. J. (2014). DNA sequencing versus

- standard prenatal aneuploidy screening. *New England Journal of Medicine*, 370(9), 799–808. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1311037>
9. Biesecker, L. G., & Green, R. C. (2014). Diagnostic clinical genome and exome sequencing. *New England Journal of Medicine*, 370(25), 2418–2425. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1312543>
 10. Brlek, P., Bulić, L., Bračić, M., Projić, P., Škaro, V., Shah, N., Shah, P., & Primorac, D. (2024). Implementing whole genome sequencing (WGS) in clinical practice: Advantages, challenges, and future perspectives. *Cells*, 13(6), 504. <https://doi.org/10.3390/cells13060504>
 11. Cheng, H. H., Shevach, J. W., Castro, E., Couch, F. J., Domchek, S. M., Eeles, R. A., Giri, V. N., Hall, M. J., King, M. C., Lin, D. W., Loeb, S., Morgan, T. M., Offit, K., Pritchard, C. C., Schaeffer, E. M., Szymaniak, B. M., Vassy, J. L., Katona, B. W., & Maxwell, K. N. (2024). BRCA1, BRCA2, and associated cancer risks and management for male patients: A review. *JAMA Oncology*, 10(9), 1272–1281. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2024.2185>
 12. Davis, R. L., Kumar, K. R., Puttick, C., Liang, C., Ahmad, K. E., Edema-Hildebrand, F., Park, J. S., Minoche, A. E., Gayevskiy, V., Mallawaarachchi, A. C., Christodoulou, J., Schofield, D., Dinger, M. E., Cowley, M. J., & Sue, C. M. (2022). Use of whole-genome sequencing for mitochondrial disease diagnosis. *Neurology*, 99(7), e730–e742. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000200745>
 13. El Osta, B., Behera, M., Kim, S., Berry, L. D., Sica, G., Pillai, R. N., Owonikoko, T. K., Kris, M. G., Johnson, B. E., Kwiatkowski, D. J., Sholl, L. M., Aisner, D. L., Bunn, P. A., Khuri, F. R., & Ramalingam, S. S. (2019). Characteristics and outcomes of patients with metastatic KRAS-mutant lung adenocarcinomas: The Lung Cancer Mutation Consortium experience. *Journal of Thoracic Oncology*, 14(5), 876–889. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.01.020>
 14. Estévez-Arias, B., Matalonga, L., Yubero, D., et al. (2025). Phenotype-driven genomics enhance diagnosis in children with unresolved neuromuscular diseases. *European Journal of Human Genetics*, 33, 239–247.
 15. Ewans, L. J., Minoche, A. E., Schofield, D., et al. (2022). Whole exome and genome sequencing in Mendelian disorders: A diagnostic and health

- economic analysis. *European Journal of Human Genetics*, 30, 1121–1131. <https://doi.org/10.1038/s41431-022-01162-2>
16. Goodwin, S., McPherson, J., & McCombie, W. (2016). Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17, 333–351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
 17. Greenbaum, L., Pode-Shakked, B., Eisenberg-Barzilai, S., Dicastro-Keidar, M., Bar-Ziv, A., Goldstein, N., Reznik-Wolf, H., Poran, H., Rigbi, A., Barel, O., Bertoli-Avella, A. M., Bauer, P., Regev, M., Raas-Rothschild, A., Pras, E., & Berkenstadt, M. (2019). Evaluation of diagnostic yield in fetal whole-exome sequencing: A report on 45 consecutive families. *Frontiers in Genetics*, 10, 425. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00425>
 18. Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., et al. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine*, 21, 1350–1356. <https://doi.org/10.1038/nm.3967>
 19. Gupta, R., Kanai, M., Durham, T. J., et al. (2023). Nuclear genetic control of mtDNA copy number and heteroplasmy in humans. *Nature*, 620, 839–848. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06426-5>
 20. Head, S. R., Komori, H. K., LaMere, S. A., Whisenant, T., Van Nieuwerburgh, F., Salomon, D. R., & Ordoukhanian, P. (2014). Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges. *Biotechniques*, 56(2), 61–68. <https://doi.org/10.2144/000114133>
 21. Hoadley, K. A., Yau, C., Hinoue, T., Wolf, D. M., Lazar, A. J., Drill, E., Shen, R., Taylor, A. M., Cherniack, A. D., Thorsson, V., Akbani, R., Bowlby, R., Wong, C. K., Wiznerowicz, M., Sanchez-Vega, F., Robertson, A. G., Schneider, B. G., Lawrence, M. S., Noushmehr, H., Malta, T. M., ... Laird, P. W. (2018). Cell-of-origin patterns dominate the molecular classification of 10,000 tumors from 33 types of cancer. *Cell*, 173(2), 291–304.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.022>
 22. Hong, Y. S., Battle, S. L., Shi, W., Puiu, D., Pillalamarri, V., Xie, J., Pankratz, N., Lake, N. J., Lek, M., Rotter, J. I., Rich, S. S., Kooperberg, C., Reiner, A. P., Auer, P. L., Heard-Costa, N., Liu, C., Lai, M., Murabito, J. M., Levy, D., Grove, M. L., ... Arking, D. E. (2023). Deleterious heteroplasmic mitochondrial mutations are associated with an increased risk of overall and cancer-specific mortality. *Nature*

- Communications, 14, 6113. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41785-7>
- 23.Huang, K. L., Mashl, R. J., Wu, Y., Ritter, D. I., Wang, J., Oh, C., Paczkowska, M., Reynolds, S., Wyczalkowski, M. A., Oak, N., Scott, A. D., Krassowski, M., Cherniack, A. D., Houlahan, K. E., Jayasinghe, R., Wang, L. B., Zhou, D. C., Liu, D., Cao, S., Kim, Y. W., ... Ding, L. (2018). Pathogenic germline variants in 10,389 adult cancers. *Cell*, 173(2), 355–370.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.039>
 - 24.Huang, X. Z., Jia, H., Xiao, Q., Li, R. Z., Wang, X. S., Yin, H. Y., & Zhou, X. (2020). Efficacy and prognostic factors for PARP inhibitors in patients with ovarian cancer. *Frontiers in Oncology*, 10, 958. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00958>
 - 25.ICGC/TCGA Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes Consortium. (2020). Pan-cancer analysis of whole genomes. *Nature*, 578, 82–93. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1969-6>
 - 26.Jain, M., Koren, S., Miga, K. H., Quick, J., Rand, A. C., Sasani, T. A., Tyson, J. R., Beggs, A. D., Dilthey, A. T., Fiddes, I. T., Malla, S., Marriott, H., Nieto, T., O'Grady, J., Olsen, H. E., Pedersen, B. S., Rhie, A., Richardson, H., Quinlan, A. R., ... Phillippy, A. M. (2018). Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. *Nature Biotechnology*, 36, 338–345. <https://doi.org/10.1038/nbt.4060>
 - 27.Li, Y., Roberts, N. D., Wala, J. A., Shapira, O., Schumacher, S. E., Kumar, K., Khurana, E., Waszak, S. M., Korbel, J. O., Haber, J. E., & Beroukhim, R. (2020). Patterns of somatic structural variation in human cancer genomes. *Nature*, 578, 112–121. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1913-9>
 - 28.Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., Harris, P. L., Haserlat, S. M., Supko, J. G., Haluska, F. G., Louis, D. N., Christiani, D. C., Settleman, J., & Haber, D. A. (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *New England Journal of Medicine*, 350(21), 2129–2139. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040938>
 - 29.Ma, M., Chen, Y., Chong, X., Jiang, F., Gao, J., Shen, L., & Zhang, C. (2021). Integrative analysis of genomic, epigenomic and transcriptomic

- data identified molecular subtypes of esophageal carcinoma. *Aging* (Albany NY), 13, 6999–7019. <https://doi.org/10.18632/aging.202556>
- 30.Mardis, E. R. (2017). DNA sequencing technologies: 2006–2016. *Nature Protocols*, 12(2), 213–218. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.182>
- 31.Mellis, R., Oprych, K., Scotchman, E., Hill, M., & Chitty, L. S. (2022). Diagnostic yield of exome sequencing for prenatal diagnosis of fetal structural anomalies: A systematic review and meta-analysis. *Prenatal Diagnosis*, 42(6), 662–685. <https://doi.org/10.1002/pd.6115>
- 32.Menezes, L. F. S., Sabiá Júnior, E. F., Tibery, D. V., Carneiro, L. D. A., & Schwartz, E. F. (2020). Epilepsy-related voltage-gated sodium channelopathies: A review. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 1276. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.0127>
- 33.Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies: The next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 31–46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>
- 34.Mu, S., Wang, W., Liu, Q., Ke, N., Li, H., Sun, F., Zhang, J., & Zhu, Z. (2024). Autoimmune disease: A view of epigenetics and therapeutic targeting. *Frontiers in Immunology*, 15, 1482728. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1482728>
- 35.Parida, P., Mukherjee, N., Singh, A., Lewis, S., Sharan, K., Mallya, S., Singh, A., Das, S. S., Rao, M., Higginson, D. S., & Sabarinathan, R. (2025). Precise identification of viral-host integration events in HPV-positive cervical cancers by targeted long-read sequencing. *Tumour Virus Research*, 20, 200325. <https://doi.org/10.1016/j.tvr.2025.200325>
- 36.Priestley, P., Baber, J., Lolkema, M. P., Steeghs, N., de Bruijn, E., Shale, C., Duyvesteyn, K., Haidari, S., van Hoeck, A., Onstenk, W., Roepman, P., Voda, R., Bloemendal, H., Cuppen, E., & de Leng, W. (2019). Pan-cancer whole-genome analyses of metastatic solid tumours. *Nature*, 575, 210–216. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1689->
- 37.Porter, A., Natsuhara, M., Daniels, G. A., Patel, S. P., Sacco, A. G., Bykowski, J., Banks, K. C., & Cohen, E. E. W. (2020). Next generation sequencing of cell-free circulating tumor DNA in blood samples of recurrent and metastatic head and neck cancer patients. *Translational Cancer Research*, 9(1), 203–209. <https://doi.org/10.21037/tcr.2019.12.70>

- 38.Rediti, M., Venet, D., Joaquin Garcia, A., et al. (2024). Identification of HER2-positive breast cancer molecular subtypes with potential clinical implications in the ALTTO clinical trial. *Nature Communications*, 15, 10402. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-54621-3>
- 39.Rheinbay, E., Nielsen, M. M., Abascal, F., et al. (2020). Analyses of non-coding somatic drivers in 2,658 cancer whole genomes. *Nature*, 578, 102–111. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1965-x>
- 40.Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, 17(5), 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- 41.Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., et al. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, 475(7356), 348–352. <https://doi.org/10.1038/nature10242>
- 42.Sasa, Y., Arai, Y., Yamamoto, N., Hongo, T., Mizutani, S., Imai, T., Saito, Y., & Nakajima, H. (2025). Intratumoral heterogeneity and HPV integration variability in HPV-positive head and neck squamous cell carcinoma: Whole genome sequencing analysis. *Cancer Genomics & Proteomics*, 22(1), 45–59. <https://doi.org/10.21873/cgp.20365>
- 43.Sawyer, S. L., Hartley, T., Dymant, D. A., Beaulieu, C. L., Schwartzentruber, J., Smith, A., Bedford, H. M., Bernard, G., Bernier, F. P., Brais, B., Bulman, D. E., Charron, F., ... Boycott, K. M. (2016). Utility of whole-exome sequencing for those near the end of the diagnostic odyssey: Time to address gaps in care. *Clinical Genetics*, 89(3), 275–284. <https://doi.org/10.1111/cge.12700>
- 44.Shaikh, T. H. (2017). Copy number variation disorders. *Current Genetic Medicine Reports*, 5, 183–190. <https://doi.org/10.1007/s40142-017-0127-y>
- 45.Sindelar, M., Wurst, K. E., Kaleta, E., Schwartz, S., Wells, G., & Hickey, K. (2021). Clinical utility of cell-free DNA in oncology: A review. *JAMA Oncology*, 7(8), 1162–1170. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2021.0413>

46. Skinner, B. M., & Johnson, E. E. P. (2017). Nuclear periphery chromatin: Readers, writers and beyond. *Essays in Biochemistry*, 61(6), 603–614. <https://doi.org/10.1042/EBC20170046>
47. Stark, Z., Tan, T. Y., Chong, B., et al. (2016). A prospective evaluation of whole-exome sequencing as a first-tier molecular test in infants with suspected monogenic disorders. *Genetics in Medicine*, 18, 1090–1096. <https://doi.org/10.1038/gim.2016.1>
48. Strom, S. P. (2016). Current practices and guidelines for clinical next-generation sequencing oncology testing. *Cancer Biology & Medicine*, 13(1), 3–11. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0010>
49. Sun, X., Wang, L., Zhang, Z., et al. (2020). Genomic analysis of primary and metastatic breast cancer reveals selective loss of epigenetic regulators. *Nature Communications*, 11, 2710. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16487-5>
50. Taber, K. A. J., & Dickinson, B. D. (2014). Clinical applications of next-generation sequencing in cancer: From panels, to exomes, to genomes. *Frontiers in Genetics*, 5, 93. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.0009>
51. Taylor, J. C., Martin, H. C., Lise, S., et al. (2015). Factors influencing success of clinical genome sequencing across a broad spectrum of disorders. *Nature Genetics*, 47, 717–726. <https://doi.org/10.1038/ng.3304>
52. Vail, P. J., Morris, B., van Heukelom, J., et al. (2020). Clinical experience with multigene panel testing in a cohort of 106 patients. *Genetics in Medicine*, 22(2), 338–346. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0652-5>
53. Van der Auwera, G. A., & O'Connor, B. D. (2020). *Genomics in the cloud: Using Docker, GATK, and WDL in Terra*. O'Reilly Media. ISBN: 9781491975190
54. Wenger, A. M., Peluso, P., Rowell, W. J., et al. (2019). Accurate circular consensus long-read sequencing improves variant detection and assembly of a human genome. *Nature Biotechnology*, 37, 1155–1162. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0217-9>
55. Wu, M., Zhang, Y., Liu, G., & Li, X. (2023). Advances in epigenetic cancer therapeutics: Mechanisms and clinical applications. *Frontiers in Oncology*, 13, 1121383. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1121383>

BÖLÜM 5
ENDOPLASMİK RETİKULUM STRESİNİN KANSER
ÜZERİNDEKİ ROLÜ
Gülizar AYDOĞDU¹

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.17114003>

¹ Ordu Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Giriş

Kanser ciddi bir küresel sağlık sorunudur ve görülme sıklığı ve mortalitesi dünya çapında hızla artmaktadır. Solid ve hematopoietik tümörler sıklıkla genomik kararsızlık, onkogen aktivasyonu, artan protein salgılama talepleri ve proteinlerin katlanmalarını engelleyen somatik mutasyonlar yaşarlar. Tümör hücreleri metastaz ile birlikte hipoksiye, oksidatif strese, büyüme sinyallerinin eksikliğine, yetersiz amino asit alımına, glikoz yoksunluğuna maruz kalırlar ve bu olumsuz mikroçevre endoplazmik retikulumdaki protein işlenmesinde zorluk oluşturabilir. Bu durum endoplazmik retikulum (ER)' da yanlış katlanmış proteinlerin birikmesini destekleyerek ER stresine neden olabilir. Kanser hücrelerinin hayatta kalabilmesi için ER içindeki dengeyi bozan çevresel koşullara direnmesi gerekir. Yanlış katlanmış proteinlerin ER'de birikmesiyle indüklenen hücresel stres, katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak adlandırılan ayrıntılı bir sinyal ağını aktive eder. UPR, ER lümeni içindeki protein katlanma koşullarını sürekli olarak izler ve gerektiğinde ER homeostazisini korumak için karşı önlemleri başlatır. Hafif veya orta düzeyde ER stresi altında, homeostatik UPR, hücre adaptasyonunu ve hayatta kalmasını destekleyen transkripsiyonel ve translasyonel değişiklikleri harekete geçirir. Bununla birlikte, eğer bu süreçler ER stresini çözmede başarısız olursa, bir terminal UPR programı baskın hale gelir ve aktif olarak hücre ölüm sinyalini verir. Yani bu adaptif yanıt sayesinde, hücre transmembran sinyal sensörleri aracılığıyla iyileşme veya ölüm kaderine karar verir. UPR aktivasyonu, tümör büyümesi ve metastazın yanı sıra kemoterapiye, hedefe yönelik tedavilere ve immünoterapiye yanıtın ana düzenleyicisidir. UPR'nin nasıl hedefleneceğini anlamak, gelecekteki yeni terapötikler için önemli bir potansiyele sahiptir (Limonta et al., 2019; Oakes, 2020).

Endoplazmik Retikulum Stresi

ER , ökaryotik hücrelerde hücre içi Ca^{2+} homeostazisinden, lipid biyosentezinden ve protein katlanmasından ve taşınmasından sorumlu olan organeldir. ER, salgı ve zar proteinleri doğal konformasyonlarına katlanır ve aktiviteleri ve yapıları açısından önemli olan translasyon sonrası modifikasyonlara uğrarlar. Proteinler katlanmamış polipeptit zincirleri olarak ER salgı yoluna girer ve organelin lümeni içinde katlanırlar. ER'de protein

katlanması, yeni oluşan katlanamamış proteinlerin toplanmasını önleyen ve onları verimli katlanma yollarına yönlendiren ER'de yerleşik şaperonlar tarafından gerçekleştirilir. Sitosol ile karşılaştırıldığında ER, olgunlaşan proteinlerde disülfid bağlarının oluşumunu kolaylaştıran ve proteinlerin yapısını daha da stabilize eden oksitleyici bir ortama sahiptir (Trombetta & Parodi, 2003; Almanza et al., 2019).

ER, protein homeostazisi için kalite kontrol organeli olarak işlev görür. Protein kalite kontrol sistemleri, ER ile ilişkili degradasyonu, protein şaperonlarını ve otofajiyi içerir. ER'deki protein katlanması, değişen Ca^{2+} seviyeleri, redoks durumu, besin durumu, protein sentezi oranındaki artışlar, patojenler veya inflamatuvar uyaranlar gibi ortamdaki değişikliklere son derece duyarlıdır. Bazı patolojik stres koşulları sonucu ER homeostazisinin bozulması ER lümeninde katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine yol açar. Protein homeostazisi bozulduğunda ER stresi ortaya çıkar. Bu stresle başa çıkmak için hücreler biyosentetik kapasiteyi artıran ve ER'nin biyosentetik yükünü azaltan sinyal iletim yolları etkinleştirilir. ER lümenini sitoplazma ve çekirdeğe bağlayan bu yollarla katlanmamış protein yanıtı (UPR) adı verilen bir sinyal iletim sistemi etkinleştirilir (Schröder & Kaufman, 2005; Harding et al., 2002; Chen et al., 2023).

İlk çalışmalarda, proteinler ER'de yanlış katlandığında ortaya çıkan iki önemli olay gösterilmiştir. Birincisi, yanlış katlanmış proteinler, şaperon proteinine (BIP; ayrıca GRP78 ve HSP5A olarak da bilinir) bağlanır ve onu ayırır. İkinci olarak, serbest Glikozla düzenlenmiş protein 78 (GRP78) seviyesindeki azalma, GRP78'in yanı sıra diğer protein şaperonlarını kodlayan genlerin transkripsiyonunu indüklemek için sinyal yollarını aktive eder. Bu yol UPR olarak bilinmektedir (Dorner et al., 1989).

UPR aktivasyonu, ER protein katlama kapasitesini ihtiyaca göre ayarlayan kapsamlı bir transkripsiyonel yanıtı tetikler. ER UPR sensörlerinin aktivasyonunu içerir. Bu aktivasyon tüm ökaryotlarda korunan mekanizmalar tarafından bir dizi transkripsiyon faktörünü aktive eder. Katlanmamış proteinlerin biriktiği hücreler protein katlama kapasitesinde homeostazi yeniden oluşturmaya çalışır eğer bunu başaramazsa hücreleri apoptoza yönlendiren mekanizmaları aktive eder (Bernaies et al., 2006; Hetz, 2012).

UPR, protein homeostazisinin yeniden kurulması için kullanılan adaptif bir yanıttır ve ER stresi tarafından tetiklenir. Spesifik ER proteinleri, şaperon

GRP78'den ayrıldıktan sonra UPR aktivasyonuna aracılık eder. UPR, ER stresini azaltabilir, ER adaptif bir yanıt üretebilir, ER homeostazisi yeniden sağlanırsa UPR'yi bloke edebilir veya apoptozu düzenleyebilir. Bazı tümör türleri, ER protein katlama mekanizmasının bozulmasıyla bağlantılıdır; bu durum, UPR'nin kanser hücrelerinde maligniteyi ve ilaç direncini korumak için nasıl önemli bir rol oynadığını vurgulamaktadır (Bonsignore et al., 2023; Hetz & Papa, 2018).

ER stresi kanser, diyabet, otoimmün durumlar, karaciğer bozuklukları, obezite ve nörodejeneratif bozukluklar dahil olmak üzere birçok hastalıkta gözlemlenir. ER stresine hücrel adaptasyon katlanmamış protein tepkisinin aktivasyonu ile sağlanır. Bu adaptasyon mekanizmaları katlanmamış protein yükünü karşılamada yetersiz kaldığında hücreler apoptoza uğrar (Chen et al., 2023; Özcan et al., 2004; Yuan et al., 2024).

Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR) Elemanları

ER'ye giren katlanmamış proteinlerin yükü ile protein katlanma kapasitesi arasındaki dengesizlik sonucu artan ER stres üç ana tepkiyi harekete geçirir; bunlardan birincisinde, ER'ye giren protein yükünde bir azalma vardır; bu, protein sentezinin ve ER'ye translokasyonun azaltılmasıyla elde edilen geçici bir adaptasyondur. İkincisinde, ER'nin katlanmamış proteinleri işleme kapasitesinde bir artış vardır; bu, ER protein katlama sürecinde etkili UPR hedef genlerinin transkripsiyonel aktivasyonunu gerektiren daha uzun vadeli bir adaptasyondur. Homeostazis bu iki mekanizma ile yeniden sağlanamazsa, organizmayı yanlış katlanmış proteinlerle birikmiş hücrelerden korumak için üçüncü bir mekanizma olan hücre ölümü tetiklenir. UPR'nin farklı kollarında üç farklı sınıf ER stres sinyal iletili molekül tanımlanmıştır. Bunlar inositol gerektiren protein-1 (IRE1), aktive edici transkripsiyon faktörü-6 (ATF6) ve protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinazıdır (PERK). Her üç durumda da, bir integral membran proteini, ER lümenindeki protein katlanma durumunu algılar ve bu bilgiyi ER membranı üzerinden sitozole iletir (Ron & Walter, 2007).

BiP olarak da bilinen GRP78, HSP70 ailesinin bir üyesidir. Tüm ökaryotların ER membranında lokalizedir. Protein katlanmasını düzenler. Aynı zamanda yanlış katlanmış proteinin (veya bunların alt birimlerinin) taşınmasını da önler. ER stresi durumunda GRP78'in ifadesi artar.

Homeostatik koşullar altında, bu UPR sensörleri, GRP78 ile etkileşimi yoluyla pasif halde tutulur. ER stresine yanıt olarak, biriken katlanmamış proteinler UPR sensörlerinden GRP78'i ayırır, bu da IRE1, PERK ve ATF6'nın aktivasyonunu ve GRP78'in indüksiyonunu teşvik eder (Bonsignore et al., 2023).

ER stresine maruz kalan omurgalı hücrelerinde geçici olarak farklı iki hücresel yanıt süreci gözlemlenir. İlk olarak ani bir reaksiyon olarak PERK'nin aktivasyonu, ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 2a (eIF2a)'nın fosforilasyonu yoluyla genel protein translasyonunu inhibe eder (Harding et al., 2000). Buna ek olarak, ER'de yer alan belirli proteinleri kodlayan mRNA'nın seçici bozunması, RIDD (düzenlenmiş IRE1'e bağlı bozulma) yoluyla başlatılır (Hollien et al., 2009; Kroemer et al., 2010). Son olarak, önleyici kalite kontrolü (Kang et al., 2006) ve eş-translasyonel bozunma, translasyona uğramış protein alt kümesinin ER'ye translokasyonunu engeller (Oyadomari et al., 2006). Genel olarak bu mekanizmalar, homeostazi yeniden kuran adaptif ve onarım mekanizmalarına izin vermek için proteinlerin ER'ye akışını azaltır (Hetz, 2012). İkinci yanıt sürecinde, en az üç farklı UPR aracılı transkripsiyon faktörünün düzenlenmesi yoluyla büyük bir gen ekspresyonu yanıtı tetiklenir. Her stres sensörü, belirli bir transkripsiyon faktörünün aktivasyonunu ve UPR hedef genlerinin bir alt kümesinin yukarı regülasyonunu teşvik eden mekanizmalar kullanır (Calfon et al., 2002; Wiseman et al., 2022).

PERK, mitokondri ile ilişkili ER membranlarında bulunan sitozolik serin/treonin kinaz alanıyla zenginleştirilmiş bir tip I transmembran proteinidir. Stres olmayan koşullar altında, GRP78 PERK'ü stabilize etmek ve aktivasyonunu önlemek için PERK'e bağlanır. ER stresi koşulları altında GRP78, katlanmamış proteinlere ve yanlış katlanmış proteinlere bağlanarak homodimerizasyon ve otofosforilasyon için PERK'nin salınmasına izin vererek aktivasyonuna yol açar. Aktive edilmiş PERK daha sonra eIF2a'yı fosforile eder. eIF2a'nın fosforilasyonu genel protein sentezini durdurarak ER'ye yeni protein akışını azaltır (Harding et al., 2000).

PERK'in aşağı akışında düzenlenen genler iki transkripsiyon faktörünü içerir: ATF4 ve CHOP. ATF4 mRNA ekspresyon seviyeleri, transkripsiyondaki artışla birlikte önemli ölçüde yükselir. İfadesi artan ATF4, antioksidan tepkiden ve amino asit biyosentezinden ve hücrenin hayatta kalmasını desteklemekten sorumlu olan ER stres yanıtı genlerini aktive etmek için çekirdeğe gider. Kalıcı

ER stresi ile ATF4 aynı zamanda apoptoz için gerekli olan C/EBP homolog proteininin (CHOP) transkripsiyonunu aktive eder. (B'chir et al., 2013). ER stresin erken zamanlarında PERK aktivasyonu, histon metilasyonu yoluyla CHOP transkripsiyonunu baskılayan miR-211 ekspresyonunu indükler ve apoptoz baskılanır (Chitnis et al., 2012). Kronik stres koşulları altında ise apoptoza yol açar. Bu nedenle PERK aktivasyonu, stresin ciddiyetine bağlı olarak hem adaptif hem de apoptotik yanıtları teşvik eder (Fu et al., 2021).

Hücredeki CHOP birikimi hücre ölümüyle ilişkili olsa da hem ATF4 hem de CHOP mRNA'ları ve proteinleri kısa yarı ömürlere sahiptir. Bu nedenle hücre ölümünü teşvik etmek amacıyla CHOP'un kararlı durum seviyelerini arttırmak için PERK'nin güçlü ve kronik aktivasyonu gereklidir. CHOP'un BCL-2 ekspresyonunu da baskıladığı bilinmektedir (McCullough et al., 2001). CHOP BAX'in mitokondriyel translokasyonunu desteklemektedir. CHOP'un apoptoz modülatörü ve hücre ölüm reseptörünü indüklediği bilinmektedir (Galehdar et al., 2010). CHOP olmayan hücrelerde artan ER stresi, ER'de daha az protein toplanmasına ve apoptoza neden olmaktadır. Yani CHOP protein sentezini artırarak proteinin yanlış katlanmasına ve oksidatif strese neden olmaktadır. Bu nedenle, ER stresinin indüklediği apoptoza dolaylı olarak CHOP aracılık etse de, tümör hücrelerinde hayatta kalmayı düzenlemek için CHOP'un aşağısında farklı yolların aktive edilmesi de mümkündür (M. Wang & Kaufman, 2014; Bonsignore et al., 2023)

IRE1 kinaz ve endonükleaz aktiviteleri sergileyen çok işlevli bir proteindir. Stresiz koşullar altında GRP78'e bağlanarak aktif olmayan monomerik konformasyonunu korur. ER stresine yanıt olarak GRP78'den ayrılır. GRP78 yanlış katlanmış proteinlere bağlanır. Bu durum IRE1 oligomerizasyonunu tetikler. IRE1 oligomerizasyonunu, protein kinaz aktivitesinin aktivasyonunu ve ardından otofosforilasyonu tetikler (Hetz ve ark. 2020). IRE1 etkinleştirildikten sonra, sinyali üç farklı mekanizma aracılığıyla yürütür. Ağırlıklı olarak fosforile edilmiş IRE1, nükleik asit endonükleaz aktivitesini aktive eder. Aktive edilmiş IRE1 endonükleazı X-box protein 1 (XBP1) transkriptinden 26 bazı uzaklaştırır. Bu çerçeve kayması, yüksek derecede aktif bir transkripsiyon faktörünün (sXBP1) sentezine izin verir. sXBP1'ı tamamen işlevsel bir transkripsiyon faktörü haline getiren yeni bir karboksil alanı dahil edilmiştir (Calfon et al., 2002). Aktif bir transkripsiyon faktörü olarak işlev gören sXBP1, endoplazmik retikulum stres yanıt elemanı

(ERSE) ile ilişkili genlerin destekleyicilerine bağlanarak, katlanmadan sorumlu genlerinin ve ERAD genlerinin ekspresyonunu indükler. Bu, protein katlanmasını ve yanlış katlanmış proteinlerin bozunmasını hızlandırır. XBP1 spesifik olmayan nükleik asit endonükleaz aktivitesi de sergiler. Düzenlenmiş IRE1'e bağımlı bozunma (RIDD) sürecinin modülasyonu yoluyla ER membranıyla ilişkili mRNA'ları hızla parçalayarak protein sentezini azaltır. Bu sürece RIDD adı verilir. Bu yanıt, protein salgılanmasını azaltarak stresi de azaltır. Yoğun salgılama fonksiyonuna sahip dokularda RIDD'nin önemi bilinmektedir (Coelho & Domingos, 2014; Yuan et al., 2024).

ATF6, sitozolik cAMP'ye duyarlı element bağlama proteini (CREB)/ATF temel lösin fermuarı (bZIP) alanını içeren bir tip II transmembran proteinidir. Stressiz koşullar altında ATF6, GRP78 ile etkileşim yoluyla ER'de tutulur. Yanlış katlanmış proteinin birikmesi üzerine GRP78, luminal alandan ayrışır ve ATF6 monomerlerinin sayısının artmasına yol açar. Daha sonra bu monomerler Golgi aygıtına geçer ve burada hidrolize uğrarlar ve bölge 1 proteaz (S1P) ve bölge 2 proteaz (S2P) tarafından kolaylaştırılan işlemlere tabi tutulurlar (Ye et al., 2000). Aktive edilmiş ATF6 çekirdeğe geçer, ERSE ile ilişkili genlere bağlanır ve bunların transkripsiyonel aktivasyonunu başlatır. ATF6'nın aşağı yöndeki hedef genleri, protein katlanmasını, translokasyonunu ve sentezini kolaylaştıran genleri kapsar. Ek olarak ATF6, ERAD ile ilgili genleri aktive ederek XBP1 ile dimerler oluşturma yeteneğine sahiptir. Bu yol, protein katlanmasının, translokasyonunun desteklenmesine ve ER içindeki protein birikiminin azaltılmasına katkıda bulunur (Yuan et al., 2024).

Kanser Hücrelerinde ER Stres Yanıtı

Kanser hücreleri sürekli olarak bölünmesinden dolayı kısıtlı besin, oksijen kaynakları ve azalan vaskülarizasyonla tehdit halindedir. Kanserler genellikle stresli bir mikro ortamda ortaya çıktığı ve ilerlediği için, kanserli hücreler katlanamamış protein yanıtı (UPR) aktivasyonunu bir hayatta kalma stratejisi olarak kullanabilir. Bu nedenle, ER'de yerleşik proteinler, kanserde değişmiş ekspresyon modelleri sergiler. ER stresi ve UPR aktivasyonu çeşitli insan kanserlerinde belgelenmiştir. ER stresinin tümörler üzerinde ikili bir etkisi vardır. İlk olarak, tümör büyümesini artıran uyarlanabilir bir etkiyi içerir. İkinci olarak aynı zamanda apoptozu indükleyen sitotoksik etkilere de sahiptir (Yadav et al., 2014). Aynı zamanda, UPR yolları aynı zamanda kanser

gelişimindeki fonksiyonlarını modüle etmek için onkogenler veya tümör baskılayıcı genlerle de etkileşime girebilir. Onkogenlerin hiperaktivasyonu veya tümör baskılayıcı genlerdeki fonksiyon kaybı mutasyonları sıklıkla protein sentezinde artışa yol açar, bu da ER'de protein katlama yükünün artmasına neden olur. Sonuç olarak UPR, protein katlama kapasitesini artırmak için etkinleştirilir. Kanser hücreleri, UPR'nin aktivasyonu yoluyla kendilerini çevreleyen mikro ortama uyum sağlar ve makrofajlar, sitokinleri, büyüme faktörlerini ve anjiyojenik faktörleri salgılayarak kanser hücresi gelişimi ve istilası için daha uygun mikro ortamlar yaratır. Bu durum makrofajlar ve kanser hücreleri arasında etkileşimin kanıtıdır. Hızla çoğalan kanser hücrelerinin sıklıkla ER'de protein katlanmasını bozan ve UPRyi aktive eden bir ortamları vardır. Bir çalışmada ER stresinin, yüksek yağlı diyetle indüklenen inflamatuvar ortam koşulları altında hepatoselüler karsinomlara yol açan pre-onkogenik hücreler ürettiği gösterilmiştir; bu da ER stresinin onkogenik bir rolünü gösterir.

Hüresel plastisite, tümörlere heterojenite ve terapötik direnç kazandıran iyi bilinen dinamik bir kanser hücre özelliğidir. Metastaz ve ilaç duyarlılığını geliştirmesinden dolayı kanser terapisine büyük zorluk teşkil eden bir özelliktir. Yapılan çalışmalar kanser hücresi plastisitesinin düzenlenmesinde ER stresinin rol oynadığını göstermektedir. ER stresi tümör hücresinin hedefe yönelik tedaviye duyarlılığı gibi tümör hücrelerinin çeşitli malign özelliklerini etkiler. Tümörün ilerlemesi ve kemorezistansında rol oynayan ER stresi ile kanser hücresi plastisitesi arasındaki ilişki ile ilgili araştırmalar sürmektedir (H. Wang & Mi, 2023).

UPR'nin Aktivasyonuna Katkıda Bulunabilecek Tümör Mikro Ortamı

Pozitron emüsyon tomografisi (PET) ile görüntülenen baş ve boyun kanseri, yumuşak doku sarkomu, meme kanseri ve glioblastoma da dahil olmak üzere çeşitli katı tümörlerinin hepsi bir dereceye kadar hipoksiye sahiptir. Her ne kadar tümörler damar yapısının büyümesini teşvik etmek için anjiyojenik faktörler salgılasa da, bu genellikle tümöre optimal oksijen ve besin sağlamak veya atıklardan kurtulmak için yeterli değildir (Sivridis et al., 2003). Bu nedenle hipoksiye ek olarak gelişmekte olan tümördeki hücrelerde düşük glikoz, pH ve amino asit kaynakları da bulunabilir. Hücre döngüsü ve apoptotik

kontrol noktalarının üstesinden gelen kanser hücresinin hayatta kalmasının önündeki en büyük engel, sınırlı besin ve oksijen tedarikidir. Bu olumsuz koşulların hücre kültürü deneylerinde N-bağlı glikosilasyonu veya yan zincir etkileşimlerini inhibe ettiği, dolayısıyla protein katlanmasını değiştirip katlanmamış protein yanıtı (UPR) adı verilen büyük ölçüde hücre koruyucu bir sinyal yolunu aktive ettiği bilinmektedir. Hipoksi aynı zamanda transkripsiyon faktörü 4'ün (ATF4)'ün aktive edilmesi gibi bazı UPR bileşenlerinin stabilitesini de artırır. Hem ATF4 hem de X-box bağlayıcı protein 1 (XBP1), hücrenin hayatta kalmasını desteklemek için aşağı yöndeki hedeflerinin ifadesini artırır. Bununla birlikte, ökaryotik transkripsiyon başlatma faktörü 2a (eIF2a) fosforilasyonu, tedaviye dirençli kanser hücrelerinin hayatta kalmasının desteklenmesinde önemlidir. UPR aktivasyonunun bloke edilmesi, hipoksik koşullar altında kanser hücresi ölümünü önemli ölçüde artırır. Çoğunlukla hipoksi ile aynı zamana denk gelen glikoz yoksunluğu da ER'de protein katlanmasını bozar. Glikoz metabolizması, tümör hücrelerine biyosentez için enerji sağlar ve glikosilasyon için verici olarak işlev görür. Glikoz eksikliği, azalan enerji tedariki ve uygunsuz protein glikosilasyonunun neden olduğu protein yanlış katlanması nedeniyle yetersiz sarkoplazmik/endoplazmik retikulum kalsiyum ATPaz (SERCA) aktivitesinin aracılık ettiği bozulmuş ER-Ca²⁺ homeostazisine yol açar. Diğer bazı çevresel faktörler dolaylı olarak ER stresini ve UPR aktivasyonunu tetikler. Amino asit yoksunluğu, eIF2a'yı fosforile etmek için genel kontrol bastırılmayan 2 (GCN2; eIF2K4 olarak da bilinir)'yi aktive eder. Tümör mikro ortamında mevcut olan büyüme faktörleri, ER stresinden bağımsız olarak kanserde UPR aktivasyonuna da katkıda bulunabilir (M. Wang & Kaufman, 2014).

UPR'nin Kanser Üzerine Etkisi

UPR aktivasyonu, protein sentezinde geçici zayıflamayı, ER yoluyla protein trafiği için artan kapasiteyi, protein katlanmasının artışı, ER ile ilişkili bozunmayı (ERAD) içerir. Bu adaptif mekanizmalar protein katlama kusurunu çözemezse, UPR'nin uzun süreli ve aşırı aktivasyonu, hücre ölümüne yol açabilir. UPR'nin bileşenlerinin tanımlandığı çalışmalar ve çeşitli klinik çalışmalar ışığında kanser hücresi ölümü, uyku hali ve agresif büyüme arasındaki dengenin düzenlenmesinde UPR'nin önemli bir rol oynadığı ortaya konmuştur. Özellikle, UPR bileşenlerinin, katı tümörlerin kemoterapötiklere

duyarlılığının değiştirilmesinde benzersiz bir role sahip olduğu gösterilmiştir (Ma & Hendershot, 2004). Bütün bunlar göz önüne alındığında UPR aktivasyonunun, kanser hücrelerinde hem hayatta kalma oranının artmasına hem de apoptozun indüklenmesine katkıda bulunduğu görülmektedir (M. Wang & Kaufman, 2014).

Kanser hücreleri, ER şaperonu olan GRP78/BiP'nin ekspresyonunu indükleyerek tümör mikro çevresindeki kronik strese uyum sağlar. GRP78, tümör çoğalmasını, hayatta kalmayı, metastazı ve çok çeşitli terapilere direnci destekler. Dolayısıyla GRP78 ekspresyonu, tümör davranışı ve tedavi yanıtı için bir biyobelirteç görevi görebilir. GRP78 ekspresyonunu baskılayan tedavi stratejileri, tümörlerin yok edilmesine yönelik yeni bir yaklaşım oluşturabilir (Lee, 2007).

Hücre yüzeyi GRP78, agresif, metastatik ve kemoterapiye dirençli kanserlerde aşırı eksprese edilmektedir. GRP78, ER lümeninde, yeni sentezlenen proteinlerin katlanmasını ve salgılanmasını kolaylaştıran ve katlanmamış protein yolunda bir ER stres sensörü şaperon protein olarak işlev göstermektedir. GRP78 proliferatif, hayatta kalma yanlısı ve pro-apoptotik yollar dahil olmak üzere çeşitli aşağı yönde hücre sinyal yollarını tetiklerler. Şu ana kadar keşfedilen GRP78'in pro-apoptotik ligandları arasında doğal proteinler, monoklonal antikolar ve sentetik peptitler yer alır (Ge & Kao, 2019).

Tümör oluşumunda PERK-eIF2a yolu, ER stresi üzerine hayatta kalmayı veya apoptozu indüklediğinden, bu sebepten malign dönüşümü kolaylaştırmanın yanı sıra bastırabilir. Bir çalışmada, PERK'in silinmesinin, meme tümörü gelişimini geciktirdiği ve akciğer metastazlarını azalttığı, fakat uzun süreli PERK inaktivasyonunun, artan genomik instabilite nedeniyle spontan meme tümörü oluşumuna duyarlılığını arttırdığı gösterilmiştir. (Bobrovnikova-Marjon et al., 2010).

Bazı çalışmalar ATF6a'nın hedef genlerin düzenlenmesi yoluyla hepatokarsinogenezi desteklediğini ileri sürmektedir. ATF6'da, ATF6'nın ve onun aşağı yöndeki genlerinin mRNA ekspresyonunu arttıran yanlış anlamalı bir polimorfizm, hepatoselüler karsinom duyarlılığı ile ilişkilendirilmiştir (Arai et al., 2006). Daha da önemlisi, ATF6a'nın aşağı yöndeki transkripsiyonel hedefi olan GRP78'in, hücreler için bir malignite belirteci olarak görev yaptığı bilinmektedir. ER stresinin indüklenmesi üzerine ATF6a, ER stresini

iyileştirmek için katlanmamış proteine ve yanlış katlanmış proteine bağlanan GRP78 ekspresyonunu hızlı bir şekilde indükler (Lee, 2007; Lebeaupin et al., 2020).

Kanser Gelişimi ve İlerlemesinde UPR ile Uyarılan Otofaji

UPR'nin hücre metabolizması ile entegrasyonu, kanser biyolojisi alanı için özel bir öneme sahiptir. Çünkü, tümör hücreleri, muhtemelen zayıf vasküler besleme ve hızlı hücre çoğalmasından ve tümörlerden kaynaklanan ER stresi, UPR aktivasyonu ve besin eksikliği sergiler. Normal çevreye kıyasla besin açısından zengin bir ortamda daha yüksek oranlarda ortaya çıkar ve daha maligndir. Besin eksikliği ve yetersiz ER protein katlama ortamıyla karşı karşıya kalan hücreler, yanlış katlanmış proteinleri çıkarmak, ER homeostazisini yeniden sağlamak için hücresel bileşenlerin otofagozomlar içinde kapsüllendiği ve lizozomal hidrolazlar tarafından parçalandığı, strese uyum sağlayan bir kendi kendine yeme süreci olan otofajiyi etkinleştirir. UPR, hem otofajiye, hem apoptoza, hem de hücrenin hayatta kalmaya yol açabilir. UPR'nin otofajiyi etkinleştirdiği mekanizmalar hala net olarak ortaya koyulamamıştır. Yapılan çalışmalar, otofaji indüksiyonu için eIF2a fosforilasyonunun gerekliliğini göstermiştir. Örneğin, poliglutamin 72 (polyQ72) agregatlarının ekspresyonuna yanıt olarak PERK-eIF2a yolunun aktivasyonu, otofagozom oluşumunu ve hayatta kalmayı tetikleyebilir. Otofajiyi başlatmak için eIF2a fosforilasyonunun ve aşağısındaki olayların gerekli olup olmadığı araştırılmaktadır. Son çalışmalar, ATF4 ve CHOP'un geniş bir otofaji genleri setini indüklemek için hem bağımsız olarak hem de birlikte çalıştığını göstermektedir. Bir çalışma, ER stresi durumunda otofaji ve hücrenin hayatta kalması için IRE1 α -JNK yolunun da gerekli olduğunu öne sürmektedir. XBP1 eksikliği olan farelerle yapılan çalışmada hücreler azalan ERAD'yi telafi etmek için otofajiyi aktive etmektedir. Ayrıca başka bir çalışmada ATF6a'nın interferon- γ (IFN γ) kaynaklı otofaji için de gerekli olduğu gösterilmiştir. UPR ile otofaji arasındaki ilişkinin kanser gelişimine ve metabolizmasına katkıda bulunup bulunmadığı henüz tam olarak ortaya çıkarılamamıştır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, onkogenik ER stresinin PERK-eIF2a-ATF4 sinyal yolunun aktivasyonunu indüklediği, sitoprotektif otofajinin indüksiyonu yoluyla hücre sağ kalımını arttırdığı görülmüştür. Başka bir çalışma PERK, ATF4 ve CHOP'un hipoksi sırasında otofaji yoluyla insan

tümör hücrelerini koruduğunu göstermiştir. Bu süreçler arasındaki karmaşık etkileşimi aydınlatmak ve bunların kanser gelişimi ve ilerlemesinin tüm aşamalarındaki otofajinin gerekliliklerini ortaya çıkarmak için araştırmalar sürmektedir (Suh et al., 2012; M. Wang & Kaufman, 2014).

Kronik ER Stresinin Apoptotik Etkisi

Kronik ER Stresi durumunda ER protein katlama homeostazisini yeniden sağlamada başarısız olursa, UPR sinyali kalıcı olmaya devam eder ve sonunda apoptozu teşvik eden "terminal UPR" adı verilen alternatif sinyal programlarına dönüşür. Çok sayıda kanıt, iki UPR kinaz olan PERK ve IRE1a'nın, ER stresinin çözülmemesi durumunda hücre ölümüne katkıda bulunan farklı bir dizi pro-apoptotik mekanizmayı devreye soktuğunu desteklemektedir. Örneğin, eIF2a fosforilasyonuna bağlı olarak protein translasyonunda geçici bir duraklama, salgı yükünü azaltarak faydalı olabilirken, sürekli PERK sinyallesinden translasyonda uzun süreli inhibisyon hayatta kalma ile bağdaşmaz. Ayrıca PERK hiperaktivasyonu, hücre ölümünü hızlandırmak için anti-apoptotik BCL-2'yi kodlayan genin ekspresyonunu da inhibe eden CHOP/GADD153 transkripsiyon faktörünü de aktive eder. Kronik ER stresi nedeniyle aşırı aktif hale gelen fosforile edilmiş CHOP, çeşitli pro- ve anti-apoptotik genlerin ekspresyonunu düzenler. Anti-apoptotik proteinleri aşağı regüle eder ve pro-apoptotik protein Bim'i yukarı regüle ederek pro-apoptotik proteinlerden BCL2 ile ilişkili X proteini (BAX) ve BCL2 antagonist katili (BAK)'nin ekspresyonunda artışa yol açar. ER stresi CHOP ifadesinde önemli bir artışa neden olur. Stresiz koşullar altında, mitokondriyal ve ER membranlarında bulunan BAX ve BAK, anti-apoptotik protein Bcl-2'ye bağlanarak inaktif bir durumda kalır. Eş zamanlı olarak BİM, hücre iskeleti proteinlerine bağlanarak inhibe edilir. IRE1a ise ER lokalize mRNA'ların yüzlercesinin büyük endonükleolitik bozunmasına neden olur ve bu da ER yükünü azaltır. Ancak tedavi edilemeyecek kadar yüksek seviyelerde ER stresi artışının IRE1a aktivasyonu ile bir dizi pro-inflamatuar ve -apoptotik proteinlerin yukarı regülasyonunu indüklediği gösterilmiştir. Örneğin, hiperaktive edildiğinde, IRE1a RNazı pro-apoptotik hedefleri baskılayan seçilmiş mikroRNA'ların seviyelerini de azaltı (Hetz & Papa, 2018; Yuan et al., 2024; Zhang et al., 2022).

Kanser Tedavisi için ER Stresinin Düzenlenmesi

Kanser tedavisi için ER stresinin uyandırılması ER stresi ve UPR yollarının kanserdeki önemli rolü nedeniyle, tümör hücrelerinin öldürülmesine yönelik yeni bir terapötik stratejiyi temsil eder. Tümör hücrelerinde UPR'yi inhibe etmenin seçici avantajı, bu hücrelerin stresli mikro ortamlarda hayatta kalabilmek için sıklıkla UPR yollarına "bağımlı" olmasıdır. Bu tür tedaviler, hücre ölümüne yol açan ciddi ER stresini tetikleyebilir. Ayrıca, tümör mikroçevresindeki ER stresi kanseri destekleyen stromal hücrelerin fonksiyonunu etkiler ve tümör büyümesini baskılar. UPR yolu aktivasyonunun hücreler üzerinde hem hayatta kalma yanlısı hem de anti-hayatta kalma etkileri olduğundan, UPR bileşenlerini hedef alan tedavileri tasarlarken ve sonuçları yorumlarken çok dikkatli olunması gerekir. Proteazom inhibitörü bortezomib, ER stresinin indükleyicisi olarak işlev gören, kanser tedavisi için FDA onaylı ilk ilaçtır. Bazı aday bileşikler, PERK, IRE1a, HSP90, GRP94 ve GRP78 gibi protein katlama veya UPR yollarının spesifik bileşenlerini inhibe edecek, böylece kanser hücrelerinde ER stresini ve hücre ölümünü artıracak şekilde tasarlanmıştır. GRP78 ekspresyonu, tümör evresi ve ilaç direnci arasındaki anlamlı korelasyon, çeşitli kanser türlerinde çok sayıda anti-GRP78 tedavisinin test edilmesine yol açmıştır. Alternatif olarak PERK-ATF4-CHOP yolunu aktive eden terapötik ajanlar, yapısal UPR aktivasyonuna sahip hücrelerde apoptotik UPR'yi arttırmak için kullanılabilir. UPR'nin inhibisyonu veya PERK yolunun aktivasyonu, kanser hücrelerini ve kanser stromal hücrelerini diğer tedavilere karşı duyarlı hale getirebilir ve bu da kombinasyon tedavileri için bir avantaj sunar. Bu nedenle, ER stresini ve UPR yollarını hedef alan ilaçları içeren bu tür tedaviler, en umut verici antikanser yaklaşımlarından birini temsil etmektedir (M. Wang & Kaufman, 2014; Yuan et al., 2024).

ER stresi, kanser hücrelerinde immünojenik hücre ölümünü tetikleyerek antitümör bağışıklığı güçlendirebilir. Wang ve ark. (2025), ER'ye hedeflenen nanopartiküllerin melanomda immünojenik hücre ölümünü artırarak dendritik hücre aktivasyonunu sağladığını belirtmiştir. Bu çalışma, ER stresinin immünoterapiyle kombinasyonunun potansiyelini vurgulamaktadır (Wang et al., 2025).

Kanser tedavisinde direnç mekanizmalarını aşmak için yeni kombinasyon terapileri geliştirilmektedir. Yin ve ark. (2025), apolipoprotein B100'ün lipid birikimi ve ER stresi yoluyla over kanserinde otofajiyi bloke

ettiğini ve yeni bir flavonoid olan LFG-500'ün bu yolu hedeflediğini belirtmiştir (Yin et al., 2025).

KAYNAKLAR

- Almanza, A., Carlesso, A., Chintia, C., Creedican, S., Doultisinos, D., Leuzzi, B., Luís, A., McCarthy, N., Montibeller, L., More, S., Papaioannou, A., Püschel, F., Sassano, M. L., Skoko, J., Agostinis, P., De Bellerocche, J., Eriksson, L. A., Fulda, S., Gorman, A. M., Samali, A. (2019). Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications. *The FEBS Journal*, 286(2), 241–278. <https://doi.org/10.1111/febs.14608>
- Arai, M., Kondoh, N., Imazeki, N., Hada, A., Hatsuse, K., Kimura, F., Matsubara, O., Mori, K., Wakatsuki, T., & Yamamoto, M. (2006). Transformation-associated gene regulation by ATF6 α during hepatocarcinogenesis. *FEBS Letters*, 580(1), 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.11.072>
- B'chir, W., Maurin, A.-C., Carraro, V., Averous, J., Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Stepien, G., Fafournoux, P., & Bruhat, A. (2013). The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Research*, 41(16), 7683–7699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt563>
- Bernales, S., Papa, F. R., & Walter, P. (2006). Intracellular Signaling by the Unfolded Protein Response. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22(1), 487–508. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.122303.120200>
- Bobrovnikova-Marjon, E., Grigoriadou, C., Pytel, D., Zhang, F., Ye, J., Koumenis, C., Cavener, D., & Diehl, J. A. (2010). PERK promotes cancer cell proliferation and tumor growth by limiting oxidative DNA damage. *Oncogene*, 29(27), 3881–3895. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.153>
- Bonsignore, G., Martinotti, S., & Ranzato, E. (2023). Endoplasmic Reticulum Stress and Cancer: Could Unfolded Protein Response Be a Druggable Target for Cancer Therapy? *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1566. <https://doi.org/10.3390/ijms24021566>
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G., & Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum

- load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*, 415(6867), 92–96. <https://doi.org/10.1038/415092a>
- Chen, X., Shi, C., He, M., Xiong, S., & Xia, X. (2023). Endoplasmic reticulum stress: Molecular mechanism and therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 352. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01570-w>
- Chitnis, N. S., Pytel, D., Bobrovnikova-Marjon, E., Pant, D., Zheng, H., Maas, N. L., Frederick, B., Kushner, J. A., Chodosh, L. A., Koumenis, C., Fuchs, S. Y., & Diehl, J. A. (2012). miR-211 Is a Prosurvival MicroRNA that Regulates chop Expression in a PERK-Dependent Manner. *Molecular Cell*, 48(3), 353–364. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.025>
- Coelho, D. S., & Domingos, P. M. (2014). Physiological roles of regulated Ire1 dependent decay. *Frontiers in Genetics*, 5. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00076>
- Dorner, A. J., Wasley, L. C., & Kaufman, R. J. (1989). Increased synthesis of secreted proteins induces expression of glucose-regulated proteins in butyrate-treated Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Chemistry*, 264(34), 20602–20607. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)47105-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)47105-6)
- Fu, X., Cui, J., Meng, X., Jiang, P., Zheng, Q., Zhao, W., & Chen, X. (2021). Endoplasmic reticulum stress, cell death and tumor: Association between endoplasmic reticulum stress and the apoptosis pathway in tumors (Review). *Oncology Reports*, 45(3), 801–808. <https://doi.org/10.3892/or.2021.7933>
- Galehdar, Z., Swan, P., Fuerth, B., Callaghan, S. M., Park, D. S., & Cregan, S. P. (2010). Neuronal Apoptosis Induced by Endoplasmic Reticulum Stress Is Regulated by ATF4–CHOP-Mediated Induction of the Bcl-2 Homology 3-Only Member PUMA. *The Journal of Neuroscience*, 30(50), 16938–16948. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1598-10.2010>
- Ge & Kao. (2019). Cell Surface GRP78 as a Death Receptor and an Anticancer Drug Target. *Cancers*, 11(11), 1787. <https://doi.org/10.3390/cancers11111787>

- Harding, H. P., Calton, M., Urano, F., Novoa, I., & Ron, D. (2002). Transcriptional and Translational Control in the Mammalian Unfolded Protein Response. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 18(1), 575–599. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.18.011402.160624>
- Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., & Ron, D. (2000). Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells. *Molecular Cell*, 6(5), 1099–1108. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00108-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00108-8)
- Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: Controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(2), 89–102. <https://doi.org/10.1038/nrm3270>
- Hetz, C., & Papa, F. R. (2018). The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Molecular Cell*, 69(2), 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.017>
- Hollien, J., Lin, J. H., Li, H., Stevens, N., Walter, P., & Weissman, J. S. (2009). Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, 186(3), 323–331. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903014>
- Kang, S.-W., Rane, N. S., Kim, S. J., Garrison, J. L., Taunton, J., & Hegde, R. S. (2006). Substrate-Specific Translocational Attenuation during ER Stress Defines a Pre-Emptive Quality Control Pathway. *Cell*, 127(5), 999–1013. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.032>
- Kroemer, G., Mariño, G., & Levine, B. (2010). Autophagy and the Integrated Stress Response. *Molecular Cell*, 40(2), 280–293. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.023>
- Lebeaupin, C., Yong, J., & Kaufman, R. J. (2020). The Impact of the ER Unfolded Protein Response on Cancer Initiation and Progression: Therapeutic Implications. In M. L. Mendillo, D. Pincus, & R. Scherz-Shouval (Eds.), *HSF1 and Molecular Chaperones in Biology and Cancer* (Vol. 1243, pp. 113–131). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-40204-4_8
- Lee, A. S. (2007). GRP78 Induction in Cancer: Therapeutic and Prognostic Implications. *Cancer Research*, 67(8), 3496–3499. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0325>

- Limonta, P., Moretti, R., Marzagalli, M., Fontana, F., Raimondi, M., & Montagnani Marelli, M. (2019). Role of Endoplasmic Reticulum Stress in the Anticancer Activity of Natural Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 961. <https://doi.org/10.3390/ijms20040961>
- Ma, Y., & Hendershot, L. M. (2004). The role of the unfolded protein response in tumour development: Friend or foe? *Nature Reviews Cancer*, 4(12), 966–977. <https://doi.org/10.1038/nrc1505>
- McCullough, K. D., Martindale, J. L., Klotz, L.-O., Aw, T.-Y., & Holbrook, N. J. (2001). Gadd153 Sensitizes Cells to Endoplasmic Reticulum Stress by Down-Regulating Bcl2 and Perturbing the Cellular Redox State. *Molecular and Cellular Biology*, 21(4), 1249–1259. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.4.1249-1259.2001>
- Oakes, S. A. (2020). Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Cancer Cells. *The American Journal of Pathology*, 190(5), 934–946. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.01.010>
- Oyadomari, S., Yun, C., Fisher, E. A., Kreglinger, N., Kreibich, G., Oyadomari, M., Harding, H. P., Goodman, A. G., Harant, H., Garrison, J. L., Taunton, J., Katze, M. G., & Ron, D. (2006). Cotranslocational Degradation Protects the Stressed Endoplasmic Reticulum from Protein Overload. *Cell*, 126(4), 727–739. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.051>
- Özcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.-H., Iwakoshi, N. N., Özdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L. H., & Hotamisligil, G. S. (2004). Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes. *Science*, 306(5695), 457–461. <https://doi.org/10.1126/science.1103160>
- Ron, D., & Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(7), 519–529. <https://doi.org/10.1038/nrm2199>
- Schröder, M., & Kaufman, R. J. (2005). THE MAMMALIAN UNFOLDED PROTEIN RESPONSE. *Annual Review of Biochemistry*, 74(1), 739–789. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134>
- Sivridis, E., Giatromanolaki, A., & Koukourakis, M. I. (2003). The vascular network of tumours—What is it not for? *The Journal of Pathology*, 201(2), 173–180. <https://doi.org/10.1002/path.1355>

- Suh, D. H., Kim, M., Kim, H. S., Chung, H. H., & Song, Y. S. (2012). Unfolded protein response to autophagy as a promising druggable target for anticancer therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1271(1), 20–32. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06739.x>
- Trombetta, E. S., & Parodi, A. J. (2003). Quality Control and Protein Folding in the Secretory Pathway. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19(1), 649–676. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.110701.153949>
- Wang, H., & Mi, K. (2023). Emerging roles of endoplasmic reticulum stress in the cellular plasticity of cancer cells. *Frontiers in Oncology*, 13, 1110881. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1110881>
- Wang, M., & Kaufman, R. J. (2014). The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nature Reviews Cancer*, 14(9), 581–597. <https://doi.org/10.1038/nrc3800>
- Wang, M., & Kaufman, R. J. (2016). Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature*, 529(7586), 326–335. <https://doi.org/10.1038/nature17041>
- Wang, F. L., Lai, W. J., Xie, D. D., Zhou, M., Wang, J., Xu, R. F., Zhang, R., & Li, G. B. (2025). Nanoparticle-mediated celastrol ER targeting delivery amplify immunogenic cell death in melanoma. *Journal of Advanced Research*, 71, 585–601. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2024.06.011>
- Wiseman, R. L., Mesgarzadeh, J. S., & Hendershot, L. M. (2022). Reshaping endoplasmic reticulum quality control through the unfolded protein response. *Molecular Cell*, 82(8), 1477–1491. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.03.025>
- Yadav, R. K., Chae, S.-W., Kim, H.-R., & Chae, H. J. (2014). Endoplasmic Reticulum Stress and Cancer. *Journal of Cancer Prevention*, 19(2), 75–88. <https://doi.org/10.15430/JCP.2014.19.2.75>
- Ye, J., Rawson, R. B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U. P., Prywes, R., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2000). ER Stress Induces Cleavage of Membrane-Bound ATF6 by the Same Proteases that Process SREBPs. *Molecular Cell*, 6(6), 1355–1364. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00133-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00133-7)

- Yin, Z. Y., He, S. M., Zhang, X. Y., Yu, X. C., Sheng, K. X., Fu, T., Jiang, Y. X., Xu, L., Hu, B. X., Zhang, J. B., Li, Y. Y., Wang, Q., Zhang, B. B., Qi, Y. M., Adu-Amankwaah, J., Zhou, X. Y., Qi, Q., Zhang, B., & Li, C. L. (2025). Apolipoprotein B100 acts as a tumor suppressor in ovarian cancer via lipid/ER stress axis-induced blockade of autophagy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 46(5), 1445-1461. <https://doi.org/10.1038/s41401-024-01470-x>
- Yuan, S., She, D., Jiang, S., Deng, N., Peng, J., & Ma, L. (2024). Endoplasmic reticulum stress and therapeutic strategies in metabolic, neurodegenerative diseases and cancer. *Molecular Medicine*, 30(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s10020-024-00808-9>
- Zhang, J., Guo, J., Yang, N., Huang, Y., Hu, T., & Rao, C. (2022). Endoplasmic reticulum stress-mediated cell death in liver injury. *Cell Death & Disease*, 13(12), 1051. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05444-x>

BÖLÜM 6

İKLİM DEĞİŞİKLİĞİ VE EPİGENETİK BİYOBELİRTEÇLER

Dr. Öğr. Üyesi Esra GÖKÇE GÜNDÜZER^{1,*}
Biyolog Sema Nur AĞARAN²

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.17114028>

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

²Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye, semaagaran@gmail.com

*Sorumlu Yazar

GİRİŞ

İklim değişikliği, yalnızca küresel ekosistemleri değil, bireyin moleküler biyolojik sistemlerini de etkileyen çok boyutlu bir çevresel krizdir. Aşırı sıcaklık artışları, hava kirliliği, sel, kuraklık ve UV ışınımı gibi çevresel stresörler; hücresel düzeyde oksidatif stres, DNA hasarı ve bağışıklık disfonksiyonuna neden olabilir (Feil ve Fraga, 2012; Bind vd., 2014; Herceg vd., 2021). Ancak bu etkiler çoğu zaman DNA dizisinde doğrudan bir mutasyon yaratmaz. Bunun yerine gen ekspresyonunu düzenleyen epigenetik mekanizmalar aracılığıyla hücre fonksiyonlarını değiştirir (Feil ve Fraga, 2012).

Bu nedenle, çevresel stresin etkisini saptamak için klasik genetik yaklaşımlar yetersiz kalırken, epigenetik biyobelirteçler güçlü bir çözüm sunar. Epigenetik biyobelirteçler, çevresel maruziyetlerin birey üzerindeki etkisini objektif olarak gösterebilen moleküler parametrelerdir (Jirtle ve Skinner, 2007). Bunlar arasında en yaygın olanları DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, küçük düzenleyici RNA'lar (özellikle mikroRNA'lar) ve epigenetik yaş saatleridir. Bu biyobelirteçlerin kullanımı; çevresel risk faktörlerinin tespiti, erken tanı, hastalık öngörüsü ve hatta müdahale penceresinin belirlenmesi gibi birçok klinik ve halk sağlığı uygulamasında değerli bilgiler sunmaktadır (Horvath ve Raj, 2018).

Bu kitap bölümünde, iklim değişikliğinin oluşturduğu çevresel streslerin hücresel ve moleküler düzeyde epigenetik modifikasyonlar yoluyla nasıl kodlandığı incelenecektir. DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve non-kodlayıcı RNA'lar gibi başlıca epigenetik biyobelirteçlerin, çevresel maruziyetlerin moleküler imzalarını taşıyan hassas ve dinamik göstergeler olarak işlevleri ayrıntılı şekilde analiz edilecektir. Ayrıca, bu biyobelirteçlerin çevresel etkilerin izlenmesi, risk değerlendirmesi ve klinik uygulamalarda prognostik ile tanısal araçlar olarak kullanım potansiyelleri moleküler mekanizmalar ve güncel çalışmalar ışığında tartışılacaktır. Böylece, iklim değişikliği kaynaklı moleküler adaptasyon süreçlerinin anlaşılmasında epigenetik biyobelirteçlerin kritik önemi ortaya konacaktır. Ayrıca, bu biyobelirteçlerin transgenerasyonel etkileri (yani çevresel bir faktörün epigenetik mekanizmalar yoluyla yalnızca maruz kalan bireyi değil, sonraki nesilleri de etkileyebilmesi), mikrobiyota ile ilişkisi ve halk sağlığı

politikalarına entegrasyon potansiyeli de güncel çalışmalar ışığında tartışılacaktır.

1. İKLİM DEĞİŞİKLİĞİ VE ÇEVRESEL EPİGENETİK

1.1 Sıcaklık Stresi ve Epigenetik Değişimler

Aşırı sıcaklık, özellikle 35 °C üzerindeki uzun süreli maruziyet, epigenetik sistemleri hedef alan bir stresör olarak tanımlanmıştır (Ailshire ve Choi, 2025). Horvath ve arkadaşlarının geliştirdiği epigenetik saat modelleri ile yapılan çok sayıda çalışmada, sıcaklık maruziyeti ile biyolojik yaşlanma arasında güçlü bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Özellikle ELOVL2, FHL2, PDE4C, ASPA, KLF14 gibi yaşla metilasyonu artan genlerin promotör bölgelerinde, sıcaklık stresine maruz kalan bireylerde metilasyon hızlanması gözlenmiştir (Horvath ve Raj, 2018).

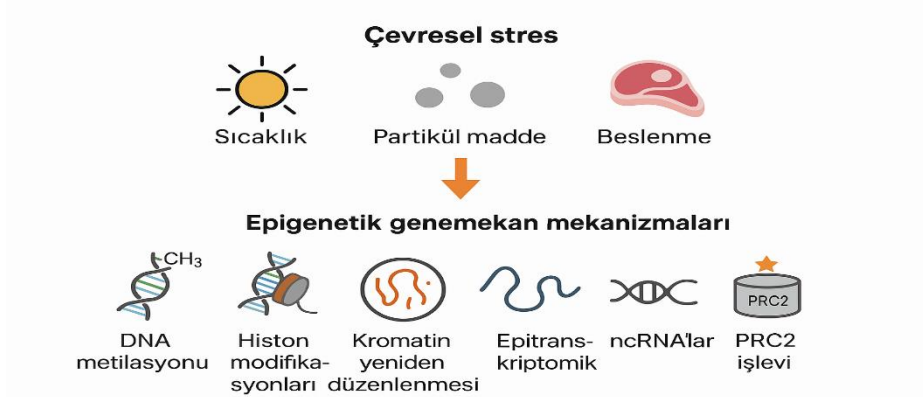
1.2. Partikül Madde (PM_{2.5}) ve Histon Modifikasyonları

PM_{2.5} gibi küçük çaplı partikül maddeler, histon asetiltransferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzimleri üzerinden histon modifikasyonlarını etkiler (Baccarelli ve Ghosh, 2012). PM_{2.5} partiküllerine maruz bırakılan insan monosit hücrelerinde H3K27ac (histon H3 lizinin 27 asetilasyonu) düzeylerinin anlamlı şekilde arttığı gözlemlenmiştir. Bu epigenetik değişikliğin, IL6, TNF- α ve IL1 β gibi proinflamatuvar sitokinleri kodlayan genlerin transkripsiyonel olarak aktive edilmesiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu bulgular, çevresel hava kirleticilerinin histon modifikasyonları yoluyla inflamatuvar yanıtları epigenetik düzlemde düzenleyebileceğini ve H3K27ac'nin çevresel inflamasyon biyobelirteci olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır (Liu vd., 2015).

1.3. Beslenme Yetersizliği ve DNA Metilasyonu

Özellikle prenatal dönemde maruz kalınan çevresel faktörler, bireyin epigenomunda kalıcı ve transkripsiyonel açıdan anlamlı izler bırakabilmektedir. Batı Afrika'da kıtlık döneminde dünyaya gelen bireyler üzerinde yapılan bir çalışmada, IGF2, MEG3 ve LEP genlerinin promotör bölgelerinde DNA metilasyon düzeylerinin anlamlı şekilde değiştiği gösterilmiştir. Bu epigenetik değişimlerin, yaşam boyu süren metabolik

bozukluklar ve immün sistemle ilişkili hastalıklar açısından risk oluşturabileceği belirtilmiştir (Dominguez-Salas vd., 2014).



Şekil 1: Sıcaklık, partikül madde ve beslenme gibi çevresel stres faktörlerinin; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, kromatin yeniden düzenlenmesi, ncRNA'lar ve PRC2 gibi mekanizmalar üzerinden epigenetik yanıt oluşturmaları. [Kaynak: Thaiss vd. (2014), Rooks ve Garrett (2016), Singh vd. (2017), Gensollen vd. (2016)'dan sentezlenerek uyarlanmıştır.]

2. ALERJİK VE SOLUNUM HASTALIKLARINDA EPIGENETİK BİYOBELİRTEÇLER

Alerjik hastalıklar (ör. astım, atopik dermatit, alerjik rinit), bağışıklık sisteminin çevresel antijenlere karşı aşırı reaksiyon göstermesiyle karakterizedir. Bu reaksiyonlarda epigenetik düzenlemeler, özellikle immün hücrelerin gen ekspresyon paternlerinde kritik rol oynar. Çevresel faktörler (partikül madde, sıcaklık, beslenme, enfeksiyon) bu düzenlemeleri değiştirerek hastalık patogenezini şekillendirir (Cardenas vd., 2019).

2.1. DNA Metilasyonu ve Alerjiye Özgü Gen Regülasyonu

Astım gibi alerjik hastalıklarda FOXP3 geninin promotor bölgesinde artmış metilasyon saptanmıştır. Bu epigenetik değişiklik, Treg hücrelerinin fonksiyonunu baskılayarak immün toleransın bozulmasına yol açar. FOXP3 hipermetilasyonu, özellikle çocukluk çağı astımı ile ilişkilendirilmiştir (Cardenas vd., 2019). Alerjik astımı olan bireylerde IL4, IL5 ve IL13 gibi Th2 sitokinlerini kodlayan genler genellikle hipometilasyon gösterir. Bu epigenetik

durum, gen ekspresyonunu artırarak eozinofilik inflamasyon ve bronşiyal hiperreaktiviteye katkıda bulunur. (Brand vd., 2012; Barton vd., 2018).

2.2. MikroRNA'lar ve Post-transkripsiyonel Kontrol

MiRNA'lar bağışıklık regülasyonunun ince ayarını sağlayan anahtar molekülüdür. miR-21, miR-155 ve miR-146a gibi mikroRNA'lar alerjik enflamasyonda düzenleyici roller oynar. miR-21'in aşırı ekspresyonu, PTEN baskılanmasına neden olarak PI3K/AKT yolunu aktive eder ve bu durum kronik inflamasyonu destekler (Rebane ve Akdis, 2014). Aynı zamanda miR-146a eksikliği, NF-κB aktivitesini artırarak IL-6 ve IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinlerin artmasına neden olur. Bu biyobelirteçler hastalık alt tiplerinin ayırıcı tanısında kullanılabilir.

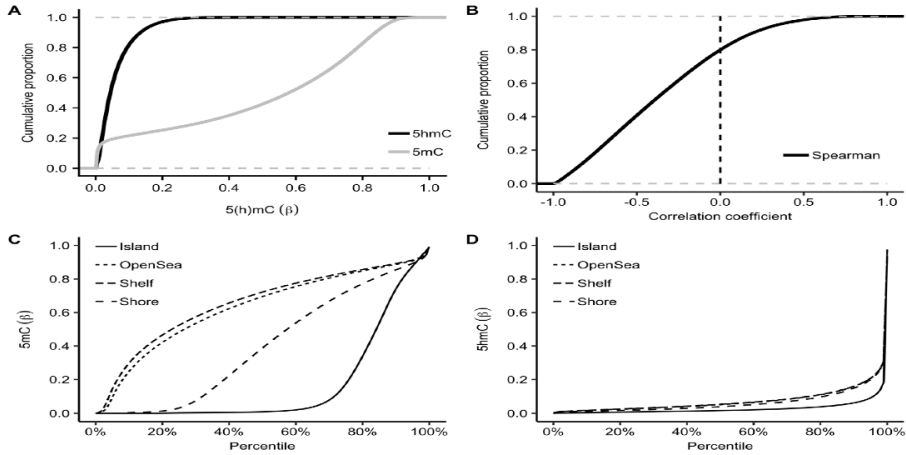
2.3. Histon Modifikasyonları ve Gen Aktivasyonu

Epitel ve bağışıklık hücrelerinde yapılan epigenetik analizler, alerjiye özgü gen bölgelerinde -özellikle *IL4* ve *IL33* gibi sitokin genlerinde- histon asetilasyon düzeylerinin anlamlı şekilde arttığını göstermektedir. Bu artış, özellikle H3K27ac ve H3K9ac gibi aktif kromatin işaretlerinde gözlenmekte olup, söz konusu gen bölgelerinde kromatin yapısının gevşemesine ve gen ekspresyonunun artmasına yol açmaktadır (Liu vd., 2015). Histon asetiltransferaz (HAT) aktivitesindeki artış ve histon deasetilaz (HDAC) enzimlerinin baskılanması, bu asetilasyon desenlerinin epigenetik düzeyde sürdürülmesine katkıda bulunur. Bu epigenetik modifikasyonlar, özellikle astım ve alerjik inflamasyon gibi hastalıklarda immün yanıtı şekillendiren genlerin kontrolsüz ekspresyonu ile ilişkilidir (Rebane ve Akdis, 2014).

2.4. Epigenetik Saatler ile Hastalık Korelasyonu

GrimAge ve PhenoAge gibi DNA metilasyonuna dayalı epigenetik saatler, yalnızca biyolojik yaş tahminiyle sınırlı kalmayıp aynı zamanda kronik enflamatuvar hastalıkların da potansiyel biyobelirteçleri olarak değerlendirilmektedir. Sıcaklık artışı gibi çevresel stres faktörlerine uzun süre maruz kalan yaşlı bireylerde, özellikle GrimAge-EAA (epigenetik yaş hızlanması) değerlerinin artış gösterdiği ve bu artışın astım atak sıklığı ile CRP ve IL-6 gibi inflamatuvar belirteçlerle pozitif korelasyon gösterdiği

bildirilmiştir. Bu bulgular, epigenetik saatlerin hem yaşlanmanın hem de çevresel koşullara bağlı hastalık şiddetinin izlenmesinde işlevsel biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini desteklemektedir (Yazdi vd., 2023).



Şekil 2: Alerji ile ilişkili epigenetik biyobelirteçlerin sınıflandırılması: [Kaynak: Uyarlanmıştır Michels vd., (2019, Şekil 1)'den].

3. EPİGENETİK YAŞLANMA VE İKLİM FAKTÖRLERİ

Epigenetik yaşlanma, kronolojik yaş ile bireyin biyolojik yaşını birbirinden ayırmayı sağlayan önemli bir göstergedir. DNA metilasyonuna dayalı epigenetik saatler, çevresel faktörlerin yaşlanma süreci üzerindeki etkilerini ölçebilen hassas biyobelirteçler sunar.

3.1. Epigenetik Saatlerin Moleküler Temeli

Epigenetik saat modelleri, yaşlanmayla korelasyon gösteren CpG metilasyon bölgeleri üzerinden biyolojik yaş tahmini yapmaktadır. Örneğin, Horvath epigenetik saati 353 CpG bölgesine; Hannum saati ise 71 CpG bölgesine dayanmaktadır. Yaşla birlikte metilasyon düzeyleri belirgin şekilde değişen bu bölgeler, genellikle yaşlanma ve hücre fonksiyonlarının düzenlenmesiyle ilişkili genlerde yer almaktadır. Bu bağlamda, ELOVL2, FHL2, PDE4C, ASPA ve KLF14 gibi genlerin promotör bölgelerinde tespit edilen metilasyon artışları, hücre yaşlanma ve replikatif senesansa yaklaşımı yansıtan moleküler belirteçler olarak değerlendirilmektedir. Söz konusu

metilasyon değişiklikleri, hücrelerin proliferatif kapasitesinin azaldığı ve DNA hasar yanıtlarının arttığı bir durumu işaret etmektedir (Horvath ve Raj, 2018).

Tablo 1: Epigenetik Saatlerde Sık Kullanılan CpG Bölgeleri ve İlgili Genler (Horvath ve Raj, 2018)

GEN	İLGİLİ CPG BÖLGESİ	YAŞ KORELASYONU	SAAT MODELİ
ELOVL2	chr6:11044877	Pozitif	Horvath, Hannum
FHL2	chr2:106054384	Pozitif	PhenoAge
KLF14	chr7:130956316	Negatif	GrimAge
PDE4C	chr19:1050870	Pozitif	Hannum
ASPA	chr17:63373645	Pozitif	Horvath

3.2. Sıcaklık ve Partikül Maruziyetine Bağlı Epigenetik Yaşlanma

Çevresel stresörler (ör. yüksek sıcaklık, PM_{2.5}) epigenetik yaşlanmayı hızlandırır. Van Dang ve arkadaşları (2025), ABD yaşlı kohortlarında sıcaklık artışı ve PM_{2.5} yoğunluğunun, GrimAge ve PhenoAge epigenetik saatlerinde 0.74–0.93 yıl arası yaş artışı ile korele olduğunu göstermiştir. Bu değişiklikler özellikle PAI-1, IL-6 ve GDF15 gibi yaşlanmayla ilişkili genlerin promotor bölgelerinde metilasyon artışı ile paraleldir (Van Dang vd., 2025).

3.3. Epigenetik Yaşlanma Akselerasyonu (EAA) ve Hastalık Riski

Epigenetik yaşlanma akselerasyonu (EAA), biyolojik yaştan kronolojik yaşı geçmesi durumudur ve çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Yazdi ve arkadaşları (2023), yüksek EAA değerlerine sahip bireylerde artmış astım atak sıklığı, düşük akciğer fonksiyonu (FEV₁/FVC) ve yüksek inflamatuvar belirteç düzeyleri (CRP, IL-6) bildirmiştir. Bu veriler, EAA değerlerinin sadece yaş tahmini değil, aynı zamanda hastalık prognozunu öngörmede de etkili olduğunu göstermektedir (Yazdi vd., 2023).

4. TRANSGENERASYONEL ETKİLER

Transgenerasyonel epigenetik etki, çevresel maruziyetlerin yalnızca bireyin kendisini değil, sonraki nesilleri de etkileyen kalıcı epigenetik değişikliklere yol açabileceğini öne süren bir kavramdır. DNA dizisini

değiştirmeden aktarılan bu epigenetik işaretler, özellikle gametler üzerinden taşınarak F2, hatta F3 nesilde de fenotipik değişikliklere neden olabilmektedir (Skinner vd., 2020).

4.1. Transgenerasyonel Epigenetik Kalıtımın Temeli

Epigenetik işaretlerin kalıtsal olarak aktarılması genellikle DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, non-kodlayan RNA'lar (örneğin piRNA ve miRNA) yoluyla gerçekleşmektedir. DNA yeniden programlama (reprogramming) süreci sırasında silinmesi beklenen bazı metilasyon işaretleri, özellikle IGF2, H19, MEG3 gibi gen bölgelerinde silinmeden aktarılabilir. Bu mekanizmalar, embriyonik gelişim sürecinde hücre kaderinin yönlendirilmesinde kritik rol oynamaktadır (Reik ve Walter, 2001).

4.2. Model Organizmalarla Elde Edilen Bulgular

Fare, sıçan ve zebrafish modellerinde yapılan çalışmalarda, çevresel toksinler (ör. vinclozolin), stres, ısı maruziyeti ve malnütrisyon (yetersiz veya dengesiz beslenme durumu), germ hattındaki DNMT aktivitesini etkileyerek transgenerasyonel metilasyon değişiklikleri yarattığı gösterilmiştir. Örneğin, Le Luyer ve arkadaşları (2017), ısı stresine maruz kalan zebrafish bireylerinde *sox2* ve *pou5f1* genlerinde H3K27me3 histon modifikasyonunda değişiklikler saptamış ve bu işaretlerin F2 nesline dek aktarıldığını ortaya koymuştur.

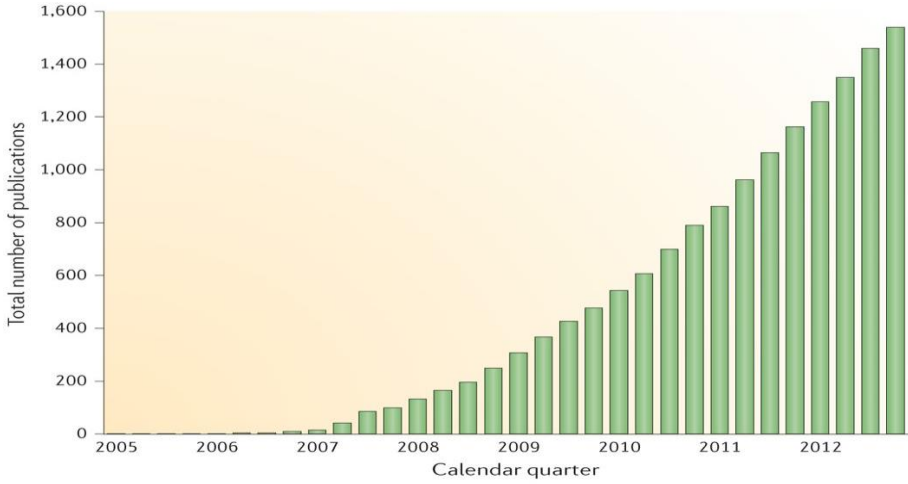
Tablo 2: Model organizmalarda transgenerasyonel biyobelirteç örnekleri (Skinner vd., 2020; Le Luyer vd., 2017)

MODEL ORGANİZMA	GEN	EPİGENETİK DEĞİŞİM	MARUZİYET	AKTARILAN NESİL
FARE	IGF2	Hipometilasyon	Açlık	F2
ZEBRAFİŞH	<i>sox2</i>	H3K27me3 artışı	Sıcaklık	F2
SİÇAN	H19	Metilasyon kaybı	Pestisit	F3

4.3. İnsan Popülasyonlarında Kanıtlar

Hollanda Kıtlığı (1944–1945) örneği, insanlarda transgenerasyonel epigenetik değişimlerin kanıtlandığı az sayıdaki örnekten biridir. Heijmans ve arkadaşları (2008), açlığa maruz kalan annelerin çocuklarında IGF2 promotor bölgesinde kalıcı hipometilasyon olduğunu ortaya koymuştur. Bu değişiklik,

metabolik hastalık riskinin artışı ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, prenatal dönemlerde hava kirliliğine maruz kalmak, bağışıklık sistemine ait IL-4, IL-10 ve IFN γ gibi genlerin promotör bölgelerinde metilasyon değişikliklerine yol açabilmektedir (Khan vd., 2022; Broséus vd., 2024). Bu değişiklikler doğumsal gelişim anormalliklerine ve immün sistem programlanmasına katkıda bulunabilir.



Nature Reviews | Genetics

Şekil 3: Transgenerasyonel epigenetik kalıtım modeli (germline yoluyla aktarım) [Kaynak: Uyarlanmıştır Manolio (2013, Figure 1)'den].

5. HISTON MODİFİKASYONLARI

5.1. Histon Modifikasyonlarının Gen İfadesine Etkisi

Histon proteinleri, DNA'nın nükleozom adı verilen yapılar etrafında sarılmasını sağlayan temel yapısal bileşenlerdir. Bu histonlara uygulanan post-translasyonel modifikasyonlar (örneğin asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon) kromatin yapısını dinamik bir şekilde değiştirerek gen ekspresyonunu doğrudan etkiler. Açık kromatin konformasyonu genellikle H3K27ac, H3K4me3, H3K9ac gibi modifikasyonlarla ilişkiliyken; baskılayıcı yapılar H3K9me2, H3K27me3 gibi metilasyonlarla karakterizedir. Bu modifikasyonların konumu ve yoğunluğu, hücrenin çevresel sinyallere karşı nasıl bir genetik yanıt geliştireceğini belirler. Histon modifikasyonlarının dinamik doğası, çevresel faktörlere karşı kısa süreli fakat etkili adaptasyon mekanizmaları geliştirilmesini sağlar (Kouzarides, 2007).

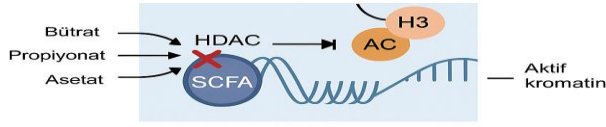
5.2. Çevresel Maruziyetle Histon Profillerinde Değişim

Çevresel maruziyetler, özellikle hava kirliliği ve sıcaklık stresi gibi faktörler, histon modifikasyon profillerini önemli ölçüde değiştirebilmektedir. Liu ve arkadaşları (2015), insan monosit hücrelerinde PM_{2.5} maruziyeti sonrası H3K27ac işaretinin belirgin şekilde arttığını ve bunun TNF- α , IL6, IL1 β gibi proinflamatuvar genlerin ekspresyonunu yükselttiğini göstermiştir. Bu değişiklikler, partikül maruziyetinin hücresel inflamatuvar yanıtları nasıl tetiklediğini anlamada önemli ipuçları sunmaktadır. Benzer şekilde Chen ve arkadaşları (2024), ısı stresine maruz bırakılan bronş epitel hücrelerinde IL-33 promotör bölgesinde H3K9ac artışının meydana geldiğini, bu artışın histon asetiltransferaz P300'ün aktivasyonu ile ilişkili olduğunu ve sonuçta epitel bariyer işlevinin bozulduğunu ortaya koymuştur. Histon modifikasyonları, bu yönüyle hem inflamasyon hem de bariyer bütünlüğünün epigenetik düzenleyicisi olarak işlev görmektedir (Chen vd., 2024; Liu vd., 2015).

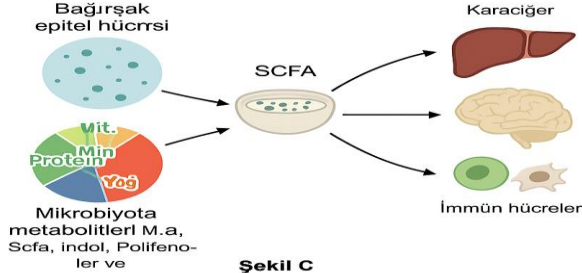
6. MİKROBİYOTA–EPIGENETİK İLİŞKİSİ VE İKLİM DEĞİŞİKLİĞİ

6.1. Mikrobiyota ve Epigenetik Arasındaki İki Yönlü Etkileşim

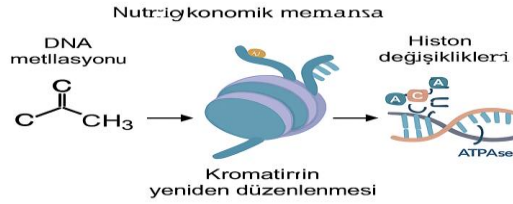
İnsan mikrobiyotası, konak genomunun ekspresyonunu hem doğrudan hem de dolaylı yollarla etkileyen epigenetik düzenleyiciler üretir. Özellikle kısa zincirli yağ asitleri (SCFA'lar), bağırsak bakterileri tarafından üretilen ve DNA metiltransferaz (DNMT) ya da histon deasetilaz (HDAC) gibi enzimlerin aktivitesini modüle eden moleküllerdir. Örneğin bütirat, HDAC inhibitörü olarak görev yaparak H3K9ac ve H3K27ac seviyelerini artırır, bu da gen ekspresyonunu aktive eder ve inflamasyonu baskılar (Krautkramer vd., 2016; Donohoe vd., 2012). Bunun yanı sıra, mikrobiyota kaynaklı asetat ve propiyonat gibi diğer SCFA'lar da genetik üstü modifikasyonlara katkı sağlar. Bu moleküllerin etkisi sadece gastrointestinal sistemle sınırlı kalmaz; sistemik dolaşıma karışarak karaciğer, beyin ve bağışıklık hücrelerinde de epigenetik programlamayı etkiler (Arpaia vd., 2013).



Şekil B



Şekil C



Şekil D

Şekil 4: Mikrobiyotadan türeyen kısa zincirli yağ asitlerinin (bütirat, propiyonat, asetat) HDAC'ı inhibe ederek histon asetilasyonunu artırması; bu etkilerin sistemik dağılımı yoluyla çeşitli organ ve hücrelerde epigenetik düzenlemeler oluşturması [Kaynak: Fellows ve Varga-Weisz (2020), Bordonı ve Gabbianelli (2019), Louis ve Flint (2017a), Arpaia vd. (2013)'ten sentezlenerek hazırlanmıştır].

6.2. İklim Değişikliğinin Mikrobiyota Kompozisyonuna Etkisi

İklim değişikliği; sıcaklık artışları, ekstrem hava olayları ve beslenme alışkanlıklarındaki değişim gibi yollarla mikrobiyota kompozisyonunu dönüştürmekte ve bu değişimler konak epigenomuna etki etmektedir. Yüksek sıcaklıklar ve çevresel stresörler, bağırsak bariyer fonksiyonunu bozarak disbiyozise (yararlı ve zararlı mikroorganizmalar arasındaki denge bozulması) neden olur. Bu durum, inflamatuvar sitokinlerin salınımını artırır ve immün regülasyonla ilişkili genlerde (örneğin FOXP3, IL6, TLR4) DNA metilasyon değişikliklerine yol açar (Rooks ve Garrett, 2016; Thaiss vd., 2016). Ayrıca, hayvansal protein tüketiminin azalması ve sebze bazlı diyetin artması gibi iklim temelli beslenme değişiklikleri, mikrobiyota metabolit dengesini etkileyerek HDAC ve DNMT aktivitesini değiştirebilir (Singh vd., 2017). Sonuç olarak bu epigenetik etkiye; sistemik inflamasyon, metabolik sendrom ve hatta nörolojik

bozukluklara kadar uzanan geniş bir yelpazede epigenetik modifikasyonlara neden olabilir.

6.3. Mikrobiyota Temelli Epigenetik Biyobelirteçler

Son yıllarda, mikrobiyotaya bağlı epigenetik değişiklikler tanısal ve prognostik biyobelirteç olarak önem kazanmıştır. Örneğin dışkı DNA metilasyon analizlerinde SEPT9, VIM, SFRP2 gibi genlerin hipermetilasyon profilleri kolorektal kanser için anlamlı bulunmuştur (Brenner vd., 2014; Ahlquist, 2010). Aynı zamanda SCFA düzeyleri ve mikrobiyota kompozisyonuna dayalı sistemik inflamasyon düzeyleri, kardiyometabolik hastalıklar için potansiyel epigenetik biyobelirteç olarak değerlendirilmektedir (Bultman, 2018; Louis ve Flint, 2017b). Bu göstergeler, kişisel risk değerlendirmesi, erken tanı ve yaşam tarzı düzenlemeleri açısından güçlü bir klinik araç sunmaktadır.

7. MikroRNA'LAR (miRNA) VE POST-TRANSKRİPSİYONEL REGÜLASYON

7.1. MiRNA'ların İmmün Sistem Üzerindeki Rolü

MiRNA'lar, gen ekspresyonunu transkripsiyon sonrası düzeyde düzenleyen küçük kodlamayan RNA molekülleridir ve özellikle immün sistem hücrelerinde önemli fonksiyonlara sahiptir. Ortalama 22 nükleotit uzunluğundaki bu moleküller, hedef mRNA'nın 3'UTR bölgesine bağlanarak translasyonu baskılar veya mRNA'yı yıkıma gönderir. Alerjik hastalıklar başta olmak üzere pek çok bağışıklıkla ilişkili hastalıkta miR-155, miR-21, miR-146a gibi miRNA'lar işlevsel olarak öne çıkmaktadır. Örneğin miR-21, PTEN baskılaması üzerinden PI3K/AKT yolunu aktive ederek hücre çoğalması ve fibrozisi artırırken, miR-146a eksikliği NF- κ B aktivasyonunu kontrolsüzleştirir ve IL-6 üretimini artırır (Rebane ve Akdis, 2014). Bu bağlamda, miRNA'lar çevresel stresin immün sistem üzerine etkisinin birer biyobelirteci haline gelmiştir.

7.2. Çevresel Maruziyetlerin miRNA Profili Üzerindeki Etkileri

Son yıllarda çevresel stres faktörlerinin epigenetik düzeydeki etkileri, özellikle miRNA ekspresyon profilleri üzerinden incelenerek biyomedikal araştırmalarda öncelikli bir odak haline gelmiştir. Yazdi ve arkadaşları (2023), sıcaklık artışı ile miR-155 ekspresyonunun pozitif yönde değiştiğini ve bu artışın Th2 hücre çoğalmasını ve IL-13 üretimini artırarak alerjik inflamasyonu şiddetlendirdiğini göstermiştir. Benzer şekilde, hava kirliliği maruziyeti ile miR-21 ekspresyonu artarken, PTEN ekspresyonunun azalmasına ve inflamatuvar sürecin devam etmesine neden olmuştur (Bollati vd., 2010). Özellikle yaşlı bireylerde bu tür epigenetik değişikliklerin, kardiyopulmoner hastalık riskini artırabileceği düşünülmektedir. Bu bağlamda, miRNA düzeyleri, hem tanı hem de risk sınıflandırması için umut verici epigenetik biyobelirteçler arasında değerlendirilmektedir.

8. DNA METİLASYONU VE GENOMİK İSTİKRAR

8.1 CpG Adalarında Metilasyon ve Gen Regülasyonu

DNA metilasyonu, özellikle gen promotörlerindeki CpG adası bölgelerinde yoğunlaşır ve transkripsiyonel sessizleşme yoluyla gen ekspresyonunun epigenetik olarak baskılanmasına katkıda bulunur. Bu düzenleme, kromatin yapısının heterokromatin formuna geçmesine neden olarak genetik materyale erişimi sınırlar. Özellikle immün yanıtla ilişkili gen bölgelerinde meydana gelen metilasyon değişiklikleri, alerjik ve otoimmün hastalıkların patogeneğinde belirleyici rol oynayabilir. Örneğin, FOXP3 promotör bölgesindeki hipermetilasyon, regülatör T hücrelerinin fonksiyonunu zayıflatarak immün toleransı azaltırken; Th2 yönelimli genlerden IL4, IL5 ve IL13'ün promotör bölgelerindeki hipometilasyon, bu genlerin ekspresyonunu artırarak eozinofilik inflamasyon ve bronşiyal hiperreaktiviteyi tetikleyebilir (Brunst vd., 2012; Brand vd., 2012; Barton vd., 2018).

8.2. Çevresel Etkiler ve Metilasyon Profili Bozukluğu

Çevresel toksinlere uzun süreli maruziyet, DNA metilasyon desenlerinde global ve bölgesel düzeyde bozulmalara neden olabilir. He ve arkadaşları (2023), çocuklarda PM_{2.5} maruziyeti ile LINE-1 metilasyonunun azaldığını ve

bunun genomik istikrarsızlıkla ilişkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca prenatal malnütrisyon durumlarında IGF2, H19, MEG3 gibi gelişimle ilişkili genlerde kalıcı metilasyon değişiklikleri saptanmış, bu epigenetik izlerin ilerleyen yaşlarda obezite, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olduğu belirlenmiştir (Dominguez-Salas vd., 2014). Bu bulgular, metilasyon profillerinin çevresel etkilerle bozulmasının sadece akut değil, aynı zamanda uzun vadeli sağlık sonuçları doğurabileceğini göstermektedir.

9. UYGULAMALAR, POLİTİKALAR VE GELECEK PERSPEKTİFLER

9.1. Çevresel İzleme ve Erken Uyarı Sistemlerinde Epigenetik Kullanımı

Gelişen çevresel stres faktörlerine karşı toplum sağlığını koruyabilmek için çevresel izleme sistemlerine entegre edilen epigenetik biyobelirteçler, erken uyarı mekanizmalarının temelini oluşturmaktadır. DNA metilasyon profilleri, özellikle hava kirliliğine maruziyetin izlenmesinde etkili olup LINE-1, ALU ve p16INK4a gibi metilasyon düzeyi değişen diziler, partikül madde (PM2.5) seviyeleri ile korelasyon göstermektedir (Bind vd., 2014; Madrigano vd., 2011). Aynı zamanda miR-21, miR-146a ve let-7d gibi çevreye duyarlı miRNA'lar, ısı dalgaları ve pestisit maruziyeti gibi stres faktörlerinin biyolojik etkilerini saptamada kullanılmaktadır (Motta vd., 2013; Hou vd., 2011). Bu biyobelirteçler, bireylerin yaşadıkları çevreye ilişkin moleküler “maruz kalım geçmişi”ni kayıt altına alarak risk haritalarının oluşturulmasına katkı sağlamaktadır.

9.2. Halk Sağlığı Politikalarında Epigenetik Verilerin Rolü

Toplum düzeyinde sürdürülebilir sağlık politikalarının geliştirilmesinde epigenetik biyobelirteçler, özellikle yaşlanma hızı, enflamasyon ve oksidatif stres düzeylerinin değerlendirilmesinde temel biyogöstergeler haline gelmiştir. Epigenetik saatler (Horvath DNAmAge, Hannum Age, GrimAge) çevresel toksinler, UV ışınımı ve beslenme gibi faktörlerin yaşlanma üzerindeki etkisini ölçme kapasitesine sahiptir (Levine vd., 2018; Lu vd., 2019). Bu sayede, iklim değişikliğiyle bağlantılı olarak gelişen hastalık riskleri önceden öngörülebilir hale gelmektedir. Politika yapımcılar, bu verilerle yaş gruplarına özel müdahale

stratejileri, gıda takviyesi planları veya kentsel çevre düzenlemeleri geliştirebilmektedir (Herceg vd., 2021). Özellikle yaşlı bireyler ve çocuklar gibi savunmasız grupların hedeflenmesinde, epigenetik değerlendirme desteklenen epidemiyolojik modeller kritik rol oynamaktadır.

9.3. Kişiselleştirilmiş Tıpta Uygulama Potansiyeli

Epigenetik biyobelirteçlerin kişisel sağlık planlamasına entegrasyonu, hastalık öncesi dönemde moleküler risklerin tanımlanmasına olanak tanır. Özellikle çevresel faktörlere hassas gen bölgelerinde meydana gelen metilasyon değişimleri, bireysel sağlık takibinde kullanılabilir. Örneğin, AHRN, F2RL3, GFII genlerindeki hipometilasyon, sigara dumanı maruziyetiyle ilişkilendirilmiş ve akciğer kanseri riskinin öngörülmesinde kullanılmıştır (Zhang vd., 2016; Joeanes vd., 2016). Bu veriler, klinik karar destek sistemlerinde birey bazında değerlendirilerek diyet, yaşam tarzı, hava kalitesi duyarlılığı gibi çevresel maruziyetlere karşı kişiselleştirilmiş önlemler geliştirilmesini sağlar. Ayrıca çevresel miRNA profili değişimleri, bireyin akut stres yanıtlarını ve inflamasyon durumunu da yansıtarak tedavi izleminde rol oynar (Ward-Caviness vd., 2018).

Epigenetik biyobelirteçlerin kişisel sağlık planlamasına entegrasyonu, hastalık öncesi dönemde moleküler risklerin tanımlanmasına olanak tanır. Özellikle çevresel faktörlere duyarlı gen bölgelerinde meydana gelen metilasyon değişimleri, bireysel sağlık takibinde kullanılabilir. Örneğin, AHRN, F2RL3 ve GFII genlerindeki hipometilasyon, sigara dumanı maruziyetiyle ilişkilendirilmiş ve akciğer kanseri riskinin öngörülmesinde kullanılmıştır (Zhang vd., 2016; Joeanes vd., 2016). Bu veriler, klinik karar destek sistemlerinde birey bazında değerlendirilerek, diyet, yaşam tarzı ve hava kalitesi duyarlılığı gibi çevresel maruziyetlere karşı kişiselleştirilmiş önlemler geliştirilmesini sağlar. Ayrıca, çevresel miRNA profili değişimleri, hastanın tedaviye verdiği yanıtların izlenmesinde ve müdahale stratejilerinin güncellenmesinde tamamlayıcı rol oynar (Ward-Caviness vd., 2018).

9.4. Gelecekteki Araştırma Alanları ve Teknolojik Gelişmeler

Epigenomik veri üretim teknolojilerindeki gelişmeler (örneğin bisülfat dizileme, CHIP-seq, ATAC-seq) sayesinde çevresel maruziyetlerin gen ekspresyonuna etkileri daha hassas ve yüksek çözünürlüklü şekilde

incelenebilmektedir. Özellikle tek hücreli epigenomik teknolojiler, çevresel streslere verilen yanıtların hücresel heterojenliğini ortaya koymaktadır (Clark vd., 2017). Yapay zekâ algoritmaları, bu büyük veriyi anlamlandırmak için kullanılmakta; bireysel çevresel risk skorları ve epigenetik yaşlanma tahmininde büyük ilerleme sağlanmaktadır (Galkin vd., 2021; Bell vd., 2019). Gelecekte, çevresel epigenetik biyobelirteçlerin transgenerasyonel izlem, uzunlamasına analiz, maruz kalım hafızası çıkarımı gibi alanlarda daha fazla kullanılması öngörülmektedir.

10. SONUÇ VE ÖNERİLER

İklim değişikliği ile birlikte artan çevresel stres faktörleri -özellikle sıcaklık artışı, hava kirliliği, beslenme değişiklikleri ve toksin maruziyeti- moleküler düzeyde canlıların hem adaptif hem de patolojik yanıtlarını şekillendirmektedir. Bu süreçte DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, miRNA profili değişimleri ve epigenetik saat ölçümleri gibi epigenetik biyobelirteçler, çevresel maruziyetin biyolojik etkilerini değerlendirmek için oldukça hassas ve noninvaziv göstergeler olarak öne çıkmaktadır (Cardenas vd., 2019; Horvath ve Raj, 2018).

Epigenetik biyobelirteçlerin bu özgül duyarlılığı, çevresel faktörlere bağlı hastalık risklerinin erken belirlenmesini, bireysel düzeyde sağlık önlemlerinin geliştirilmesini ve kişiselleştirilmiş halk sağlığı yaklaşımlarının uygulanmasını mümkün kılmaktadır. Özellikle bağırsak mikrobiyotasının bileşimi ve işlevi üzerine iklim temelli çevresel etkilerin epigenetik düzlemde yansımaları hem konak bağışıklığı hem de metabolik denge açısından kritik önemdedir. Mikrobiyota kaynaklı kısa zincirli yağ asitleri (örneğin bütirat) gibi moleküller, DNA metiltransferazları (DNMT) ve histon deasetilazlar (HDAC) gibi enzimlerin regülasyonu üzerinden konak epigenomunu doğrudan etkileyerek çevresel etki–epigenetik yanıt eksenini güçlendirmektedir (Thaiss vd., 2016; Rooks ve Garrett, 2016).

Ayrıca epigenetik saatlerin (GrimAge, PhenoAge) yalnızca yaşlanmanın değil, inflamasyon, kardiyovasküler risk ve solunum yolu hastalıkları gibi kronik durumların da biyobelirteçleri olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Epigenetik yaş hızlanması (EAA) değerlerinin, sıcaklık artışı ve hava kirliliği gibi çevresel değişkenlerle doğrudan ilişkili olması, bu biyobelirteçleri hem

epidemiyojik izlem hem de bireysel risk değerlendirme açısından oldukça değerli kılmalıdır (Yazdi vd., 2023; Levine vd., 2018).

Gelecekte, epigenetik verilerin halk sağlığı politikalarına entegrasyonu, çevresel risklerin toplum bazlı yönetimi açısından stratejik bir önem taşımaktadır. Özellikle çevresel izleme ve erken uyarı sistemlerine epigenetik göstergelerin entegre edilmesi, maruziyete bağlı sağlık etkilerinin bölgesel olarak haritalanmasını sağlayabilir. Epigenetik profillemenin kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarına dahil edilmesi ise, önleyici hekimlikten tedaviye kadar geniş bir yelpazede karar destek sistemlerini güçlendirecektir (Lu vd., 2019; Galkin vd., 2021).

Bununla birlikte, gelecek çalışmaların daha geniş örneklemli, çok dokulu (kan, solunum epiteli, plasenta vb.), çok merkezli ve uzunlamasına tasarımlarla yürütülmesi önerilmektedir. Bu sayede çevresel epigenom haritaları çıkarılarak yerel ve küresel düzeyde etkili halk sağlığı stratejileri geliştirilebilir. Ayrıca epigenetik miras kavramı çerçevesinde transgenerasyonel etkilerin daha iyi anlaşılabilmesi için gametlerde ve erken embriyonik dokularda çevresel izlerin izlenmesi önem arz etmektedir (Skinner vd., 2020).

Bu bütünsel bakış açısıyla, iklim değişikliğinin moleküler etkilerini değerlendirmede epigenetik biyobelirteçler; bilimsel araştırmaların, klinik uygulamaların ve halk sağlığı politikalarının kesişim noktasında stratejik bir araç olarak öne çıkmaktadır.

KAYNAKÇA

- Ahlquist, D. A. (2010). Molecular detection of colorectal neoplasia. *Gastroenterology*, 138(6), 2127–2139.
- Ailshire, J. A., Choi, E. (2025). Ambient heat and accelerated epigenetic aging. *Science Advances*, 11(9), eadr0616.
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veeken, J., deRoos, P., Rudensky, A. Y. (2013). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, 504(7480), 451–455.
- Baccarelli, A., Ghosh, S. (2012). Environmental exposures, epigenetics and cardiovascular disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 15(4), 323–329.
- Bell, C. G., Lowe, R., Adams, P. D., Baccarelli, A. A., Beck, S., Bell, J. T., Rakyan, V. K. (2019). DNA methylation aging clocks: Challenges and recommendations. *Genome Biology*, 20, 61.
- Bind, M. A., Zanobetti, A., Gasparrini, A., Peters, A., Coull, B., Baccarelli, A. A., Schwartz, J. (2014). Effects of temperature and relative humidity on DNA methylation. *Environmental Health Perspectives*, 122(9), 947–954.
- Barton, A., Lee, Y. H., Kim, S., Choi, H., Kim, H., & Lee, J. Y. (2018). Hypomethylation of IL-4 and IL-13 promoter regions in children with asthma. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 14, 27.
- Bollati, V., Baccarelli, A., Hou, L., Bonzini, M., Fustinoni, S., Cavallo, D., Bertazzi, P. A. (2010). Exposure to air pollution and blood miRNA changes in highly exposed subjects. *PLoS One*, 5(9), e13120.
- Bordoni, L., Gabbianelli, R. (2019). Primers on nutrigenetics and nutrigenomics: Tools for understanding gene-diet interactions. *Nutrients*, 11(2), 282.
- Brand, S., Kesper, D. A., Teich, R., Kilic-Niebergall, E., Pinkenburg, O., Lohmeyer, J., Renz, H. (2012). DNA methylation of TH2 cytokine genes affects sensitization and progress of experimental asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130(6), 1365–1373.e6.
- Brenner, H., Kloor, M., Pox, C. P. (2014). Colorectal cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 11(11), 659–670.

- Broséus, L., Galliano, G., Fougère, J., Demailly, Y., & Guillemin, F. (2024). Prenatal exposure to PM2.5 and placental DNA methylation: An epigenome-wide association study. *The Lancet Planetary Health*, 8(5), e224–e234.
- Brunst, K. J., Ryan, P., Briggs, F., & Carlsten, C. (2012). Ambient air pollution impairs regulatory T-cell function in childhood asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(3), 857–865.e1.
- Bultman, S. J. (2018). Interplay between diet, epigenetics, and cancer. *Seminars in Oncology*, 43(1), 97–106.
- Cardenas, A., Sordillo, J. E., Rifas-Shiman, S. L., Baccarelli, A. A., DeMeo, D. L., Litonjua, A. A., & Breton, C. V. (2019). The nasal methylome as a biomarker of asthma and airway inflammation in children. *Nature Communications*, 10, 3095.
- Chen, Y., Wang, X., Zhang, L., Xu, H., Wang, Y., Wang, J. (2024). Heat-induced histone acetylation in airway epithelium leads to pro-inflammatory gene activation. *Frontiers in Immunology*, 15, 1127.
- Clark, S. J., Argelaguet, R., Kapourani, C. A., Stubbs, T. M., Lee, H. J., Alda-Catalinas, C., Stegle, O. (2017). scNMT-seq enables joint profiling of chromatin accessibility DNA methylation and transcription in single cells. *Nature Reviews Genetics*, 18(7), 385–403.
- Donohoe, D. R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O'Connell, T. M., Bunger, M. K., Bultman, S. J. (2012). The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell*, 153(7), 1477–1491.
- Dominguez-Salas, P., Moore, S. E., Baker, M. S., Bergen, A. W., Cox, S. E., Dyer, R. A., Waterland, R. A. (2014). Maternal nutrition at conception modulates DNA methylation of human metastable epialleles. *Nature Communications*, 5, 374.
- European Environment Agency. (2022). Climate change and health: The latest scientific findings (Technical Report 19/2022).
- Feil, R., Fraga, M. F. (2012). Epigenetics and the environment: Emerging patterns and implications. *Nature Reviews Genetics*, 13(2), 97–109.
- Fellows, R., Varga-Weisz, P. (2020). How short-chain fatty acids affect histone modifications. *Frontiers in Genetics*, 11, 608.

- Galkin, F., Zhang, B., Dmitriev, S. E., Gladyshev, V. N. (2021). Reversibility of epigenetic aging. *Nature Communications*, 12, 4204.
- Gensollen, T., Iyer, S. S., Kasper, D. L., Blumberg, R. S. (2016). How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science*, 352(6285), 539–544.
- He, Y., Wang, T., Zhang, L., Guo, H., Xu, M., Jin, Y. (2023). Exposure to ambient particulate matter alters DNA methylation profiles and increases genomic instability in children. *Environmental Science & Technology*, 57(3), 2156–2164.
- Heijmans, B. T., Tobi, E. W., Stein, A. D., Putter, H., Blauw, G. J., Susser, E. S., Lumey, L. H. (2008). Persistent epigenetic differences associated with prenatal famine exposure. *PNAS*, 105(44), 17046–17049.
- Herceg, Z., Ghantous, A., Wild, C. P., Sklias, A. (2021). Roadmap for investigating epigenetic markers of environmental health. *Nature Reviews Genetics*, 22(9), 563–584.
- Horvath, S., Raj, K. (2018). DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nature Reviews Genetics*, 19(6), 371–384.
- Hou, L., Zhang, X., Wang, D., Baccarelli, A. (2011). Environmental chemical exposures and human epigenetics. *Epigenetics*, 6(9), 1021–1028.
- Joehanes, R., Just, A. C., Marioni, R. E., Pilling, L. C., Reynolds, L. M., Mandaviya, P. R., Baccarelli, A. A. (2016). Epigenetic signatures of cigarette smoking. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 9(5), 513–522.
- Jirtle, R. L., Skinner, M. K. (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature Reviews Genetics*, 8(4), 253–262.
- Khan, A. R., Wu, D., Yan, Y., & Chen, J. (2022). Prenatal air pollution exposure and DNA methylation in children. *Clinical Epigenetics*, 14(1), 45.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693–705.
- Krautkramer, K. A., Fan, J., Bäckhed, F. (2016). Gut microbial metabolites and host epigenetics. *Molecular Cell*, 64(5), 982–992.

- Le Luyer, J., Laporte, M., Beacham, T. D., Kaukinen, K. H., Withler, R. E., Leong, J. S., Bernatchez, L. (2017). Epigenetic variation and environmental adaptation in zebrafish. *BMC Genomics*, 18, 859.
- Levine, M. E., Lu, A. T., Quach, A., Chen, B. H., Assimes, T. L., Bandinelli, S., Horvath, S. (2018). An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging*, 10(4), 573–591.
- Liu, C., Mariani, C. J., Lou, W., He, H., Wang, X., Tian, Y., Baccarelli, A. A. (2015). Exposure to particulate air pollution and histone modifications in humans. *Environmental Health Perspectives*, 123(6), 594–601.
- Louis, P., Flint, H. J. (2017a). Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(10), 577–589.
- Louis, P., Flint, H. J. (2017b). Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*, 19(1), 29–41.
- Lu, A. T., Quach, A., Wilson, J. G., Reiner, A. P., Aviv, A., Hou, L., Horvath, S. (2019). DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and healthspan. *Aging*, 11(2), 303–327.
- Manolio, T. A. (2013). Bringing genome-wide association findings into clinical use. *Nature Reviews Genetics*, 14(8), 549–558.
- Madrigano, J., Baccarelli, A., Mittleman, M. A., Wright, R. O., Sparrow, D., Vokonas, P. S., Schwartz, J. (2011). Prolonged exposure to particulate pollution, genes associated with glutathione pathways, and DNA methylation in a cohort of older men. *Environmental Health Perspectives*, 119(4), 553–558.
- Michels, K. B., Binder, A. M., Dedeurwaerder, S. (2019). DNA methylation-based measures of biological age: Advances and challenges. *Epigenomes*, 3(3), 16.
- Motta, V., Angelici, L., Nordio, F., Bollati, V., & Baccarelli, A. A. (2013). Integrative analysis of miRNA and inflammatory gene expression after acute particulate matter exposure. *Toxicological Sciences*, 132(2), 307–316.
- Rebane, A., Akdis, C. A. (2014). MicroRNAs in allergy and asthma. *Current Allergy and Asthma Reports*, 14(5), 424.
- Reik, W., Walter, J. (2001). Genomic imprinting: Parental influence on the genome. *Nature Reviews Genetics*, 2(1), 21–32.

- Rooks, M. G., Garrett, W. S. (2016). Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nature Reviews Immunology*, 16(6), 341–352.
- Singh, R. K., Chang, H. W., Yan, D., Lee, K. M., Ucmak, D., Wong, K., Liao, W. (2017). Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal of Translational Medicine*, 15, 73.
- Skinner, M. K., Nilsson, E. E., Anway, M. D. (2020). Epigenetic transgenerational inheritance. *Nature Reviews Genetics*, 21(10), 625–640.
- Thaiss, C. A., Levy, M., Korem, T., Dohnalová, L., Shapiro, H., Jaitin, D. A., Elinav, E. (2016). Microbiota diurnal rhythmicity programs host transcriptome oscillations. *Science*, 352(6285), 1116–1120.
- Thaiss, C. A., Zeevi, D., Levy, M., Zilberman-Schapira, G., Suez, J., Tengeler, A. C., Elinav, E. (2014). Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis. *Cell*, 159(3), 514–529.
- Van Dang, J., Nguyen, A. H., Park, K., Kim, S. H., Baccarelli, A. A. (2025). Exposure to PM_{2.5} and heat stress accelerates epigenetic ageing in elderly populations. *Environmental Epigenetics*, 11(2), 24–35.
- Ward-Caviness, C. K., Pu, W., Martin, E. M., Heiss, G., London, S. J. (2018). Long-term exposure to air pollution is associated with biological aging. *Environmental Health Perspectives*, 126(4), 047013.
- Yazdi, P., Schwarz, L., Ghosh, S., Baccarelli, A. A. (2023). Ambient temperature and epigenetic ageing in older adults: A prospective cohort study. *Nature Aging*, 3(2), 184–194.
- Zhang, Y., Qian, H., Zhao, C., Chen, C., Fan, J., Wang, Y., Jin, Y. (2016). Epigenetic modifications of microRNA-200 family mediate pulmonary fibrosis induced by PM_{2.5} in rat lungs. *Scientific Reports*, 6, 22179.

BÖLÜM 7

DIYABET, OBEZİTE VE KOMPLİKASYONLARINDA KÖK HÜCRELERİN KULLANIMI VE MOLEKÜLER MEKANİZMALARI

Dr. Öğr. Üyesi Esra GÖKÇE GÜNDÜZER^{1,*}
Hussein Abbas LAZİM MALİKİ²

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.17114040>

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

² Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye, husswina@gmail.com

*Sorumlu Yazar

GİRİŞ

Kök hücreler, farklılaşarak çeşitli özelleşmiş hücre tiplerine dönüşme kapasitesine sahip, farklılaşmamış hücrelerdir. Gelişim, büyüme ve doku onarım süreçlerinde temel işlevler üstlenen bu hücreler, embriyonik evrelerden itibaren organizmanın farklı gelişim aşamalarında çeşitli dokularda tanınlanmaktadır (Zipori, 2009). Hasar gören dokuların yenilenmesinde rol alan kök hücrelerin temel özellikleri; kendini yenileme (proliferasyon), klonalite (tek bir hücreden türeme) ve çok yönlü farklılaşma potansiyelidir (Khan ve Pastides, 2013).

Farklılaşma potansiyellerine göre kök hücreler; totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olarak sınıflandırılmaktadır. Totipotent kök hücreler, tüm embriyonik ve ekstraembriyonik hücre tiplerine dönüşebilirken; pluripotent kök hücreler yalnızca embriyonik hatlara farklılaşabilir. Embriyonik kök hücreler ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPSC'ler) bu gruba dahildir. Multipotent kök hücreler, ait oldukları germ yaprağındaki çeşitli hücre alt tiplerine farklılaşabilmektedir. Örneğin mezenkimal kök hücreler (MSC), osteosit, kondrosit ve adiposit gibi hücre tiplerine dönüşebilir (Manganelli vd., 2011). Unipotent kök hücreler ise yalnızca tek bir hücre tipine farklılaşma yeteneğine sahiptir; epidermal kök hücrelerin yalnızca keratinosit oluşturması buna örnek olarak verilebilir (Khan ve Pastides, 2013).

Farklı hücre tiplerine dönüşebilme yetenekleri nedeniyle kök hücreler, özellikle metabolik hastalıkların tedavisine yönelik rejeneratif tıpta güçlü birer biyolojik araç olarak değerlendirilmektedir. Özellikle aşırı kilolu bireyler ya da diyabet hastaları için kök hücre temelli tedavi yaklaşımlarının umut vadettiği bildirilmektedir. Mimeault ve arkadaşları vücutta doğal olarak bulunan erişkin kök hücrelerin çeşitli şekillerde hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğini belirtmiştir (Mimeault vd., 2008).

Prowse ve arkadaşları, kök hücrelerden tamamen farklılaşmış, fonksiyonel hücre gruplarının elde edilmesinin, özellikle Tip 1 diyabet gibi metabolik hastalıkların tedavisinde büyük önem taşıdığını vurgulamıştır. Özellikle kültür koşulları ve sinyal yolları hakkında bilgi sahibi olmanın, kök hücrelerin pankreatik beta hücrelerine yönlendirilmesinde etkili olduğu belirtilmektedir (Prowse vd., 2011). Benzer şekilde, Fox ve arkadaşları, pluripotent kök hücrelerin defalarca kullanılabilecek bir hücre kaynağı

olduğunu ve bu özelliğin diyabet gibi hastalıkların tedavisinde önemli bir avantaj sağladığını ifade etmiştir (Fox vd., 2014).

Miklosz ve arkadaşları ise yağ dokusundan türetilmiş mezenkimal kök hücrelerin (ADMSC), obezite ve ilişkili metabolik bozuklukların tedavisinde kullanılabileceğini, bu hücrelerin salgıladığı sitokin ve büyüme faktörlerinin metabolik dengenin yeniden sağlanmasına katkı sağlayabileceğini bildirmiştir. Bununla birlikte, bu tür uygulamaların rutin klinik kullanımına geçilmeden önce güvenlik ve etkinlik açısından daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu vurgulanmaktadır (Miklosz vd., 2022).

Pagnotti ve arkadaşları egzersizin kök hücre biyolojisi üzerindeki etkilerine odaklanarak, osteojenik ve adipojenik farklılaşma arasındaki dengeyi nasıl şekillendirdiğini incelemiştir. Kök hücre farklılaşmasının bozulması durumunda kemik iliğinde yağ birikiminin artabileceği ve bunun diyabet ile obezite durumlarında kemik sağlığını olumsuz etkileyebileceği belirtilmektedir (Pagnotti vd., 2019).

Cingolani ve arkadaşları, diyabetik veya obez bireylerde gelişen enterik nöropatilerin moleküler patogeneze odaklanmakta; kök hücre temelli tedavi yaklaşımlarının enterik sinir sisteminde nöronal kaybı önleyebileceğini ileri sürmektedir. Bu stratejiler, metabolik hastalıklarla ilişkili gastrointestinal komplikasyonların tedavisinde potansiyel faydalar sunmaktadır (Cingolani vd., 2024).

Son yıllarda, kök hücrelerin özellikle diyabet ve obezite gibi kronik metabolik hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek biyolojik araçlar olduğu yönünde artan kanıtlar bulunmaktadır. Bu bölümde, kök hücrelerin bu hastalıklardaki kullanım potansiyeli ve altta yatan moleküler mekanizmalar detaylı şekilde ele alınacaktır.

1. DİYABET VE KÖK HÜCRE TEMELLİ YAKLAŞIMLAR

1.1. Tip 1 Diyabet ve Kök Hücre Temelli Yaklaşımlar

1.1.1. Tip 1 Diyabetin Patofizyolojisi, Mevcut Tedavi Yaklaşımları ve Klinik Engeller

Tip 1 diyabet (T1D), T hücreleri aracılığıyla pankreatik β hücrelerinin otoimmün yıkımı sonucu gelişen kronik bir hastalıktır. Bu karmaşık süreçte genetik yatkınlık ve çevresel tetikleyiciler birlikte rol oynar (Wang vd., 2017).

Yıllık yaklaşık 80.000 yeni genç hasta ile T1D, diyabet vakalarının %5-10'unu oluşturmaktadır. Batı ülkelerinde son 20-30 yılda T1D sıklığında belirgin bir artış bildirilmiştir (Garyu vd., 2016). Klinik başlangıç genellikle çocukluk veya ergenlik dönemini işaret etse de erişkin yaşlarda da ortaya çıkabilmektedir (Katsarou vd., 2017).

Tip 1 diyabet (T1D) günümüzde başta insülin tedavisi ve immünoterapilerle kontrol altına alınmaktadır. Ancak bu yaklaşımlar, olası yan etkiler ve yüksek maliyetler gibi çeşitli dezavantajlar taşımaktadır. Bu nedenle araştırmacılar, indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPSC'ler) ile insan embriyonik kök hücrelerinden (hESC'ler) türetilen hücreleri kullanarak alternatif kök hücre temelli tedavi stratejilerine yönelmiştir. Bununla birlikte, bu yöntemler de klinik uygulamaya geçişte teratom riski (kontrolsüz hücre çoğalması sonucu farklı doku tiplerini içerebilen tümör benzeri yapıların oluşumu), immün yanıtlar ve hücre reddi gibi önemli engellerle karşılaşmaktadır (Espes vd., 2017).

1.1.2. Tip 1 Diyabette Mezenkimal Kök Hücreler ve Terapötik Potansiyeli

Tüm kök hücre temelli yaklaşımlar arasında mezenkimal kök hücreler (MSC'ler), Tip 1 diyabet (T1D) tedavisinde öne çıkan bir terapötik potansiyele sahiptir (Tablo 1). MSC'ler, C-peptid üretimini artırarak glisemik kontrolü iyileştirebilir, mikrovasküler hasarları onarabilir ve bağışıklık sistemini modüle ederek insülin sentezini destekleyebilir (Jayasinghe vd., 2022; Xv vd., 2017). Bununla birlikte, MSC transplantasyonu sonrasında pankreatik β hücre kaybı, özellikle iskemi ve immün yanıt gibi faktörler nedeniyle terapötik etkinliği sınırlayabilmektedir (Shilleh ve Russ, 2023).

MSC'lerin terapötik etkileri; insülin üreten hücrelere dönüşüm, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, pankreatik β hücrelerinin onarılması ve sitokin aracılı sinyal yolları üzerinden immün yanıtın modülasyonu gibi çeşitli mekanizmalarla gerçekleşmektedir (Boháčová ve Holáň, 2018). Özellikle damar dokusu kaynaklı MSC'lerin, hasarlı pankreas dokusuna göç ederek inflamatuvar hücre aktivitesini azalttığı ve doku yenilenmesini desteklediği gösterilmiştir (Haque vd., 2019).

Wharton jeli kaynaklı mezenkimal kök hücreler (WJ-MSC'ler), kemik iliği kaynaklı MSC'lere kıyasla daha yüksek proliferasyon kapasitesine sahiptir

ve daha büyük adacık benzeri hücre kümeleri oluşturarak pankreatik transkripsiyon faktörleri (örneğin PDX-1) açısından daha güçlü gen ekspresyonu sergilemektedir. Bu farklılaşmış hücreler, glukoz düzeylerindeki değişimlere yanıt olarak insülin salgılayabilmekte ve C-peptid üretimini artırabilmektedir (Wu, L. vd., 2009)

1.1.3. Tip 1 Diyabette Kök Hücre Türevleri: Eksozomlar ve Alternatif Kaynaklar

Menstrüal kan kaynaklı MSC'lerin (MenSC) eksozomları ile pankreatik β -hücrelerin yenilenmesi sağlanabilmekte, bu da PDX-1 yolu aracılığıyla insülin üretiminde artışa neden olmaktadır. Öte yandan, iPSC'lerden türetilen pankreatik endoderm hücreleri (PEC-01) de in vivo ortamda β -hücre fenotipine dönüşebilmekte ve yemekle tetiklenen C-peptid salınımı gösterebilmektedir (Mahdipour vd., 2019).

Anne sütünden elde edilen MSC'ler (Br-MSCLer), pankreatik belirteçlerin ekspresyonunu artırarak adacık fonksiyonunu güçlendirmiştir (Khamis vd., 2021). Benzer şekilde, miR-213/132 yüklü ekstraselüler veziküllerin (EV) NGN3 ekspresyonunu stabilize ederek iPSC'den türetilen β -hücre oluşumunu teşvik ettiği bildirilmiştir (Bai vd., 2021).

TGF- β ile modifiye edilmiş MSC'lerin insülin üretimini artırdığı ve bağışıklık sistemini düzenlediği gösterilmiştir (Daneshmandi vd., 2017). Ayrıca MSC'lerin, miR-25 taşıyan eksozomlar aracılığıyla T hücrelerinde CXCR3 ekspresyonunu azaltarak otoimmün yanıtları baskıladığı ortaya konmuştur (Zhou vd., 2025).

Fare saç foliküllerinden türetilen moMSCORS hücrelerinin intravenöz uygulanması sonucunda, daha düşük glukoz seviyeleri, azalmış immün hücre infiltrasyonu ve korunmuş insülin ekspresyonu elde edilmiştir. Bu terapötik etkiler; Th17 ve IFN- γ^+ CD8 $^+$ hücrelerinin baskılanması ile birlikte, immün toleransı destekleyen düzenleyici T hücrelerinin (Treg) artışı ile ilişkilendirilmiştir (Mićanović vd., 2024).

1.1.4. Tip 1 Diyabet Tedavisinde Kök Hücre Uygulamalarının Sınırlayıcı Faktörleri ve Yenilikçi Yaklaşımlar

Kök hücre temelli tedaviler T1D'nin tedavisinde önemli bir umut vaat verici bir yaklaşım sunmaktadır; ancak klinik uygulamaya geçişte bir dizi bilimsel ve teknik engel söz konusudur. Nakil yöntemlerinin geliştirilmesi, hücre hayatta kalım oranlarının artırılması, immün yanıtın kontrol altına alınması ve uzun vadeli terapötik etkinliğin sağlanması gibi alanlarda daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Gelecekte MSC'lerin daha etkili kullanımı, farklılaşma kapasitelerinin artırılması ve yeni hücre kaynaklarının tanımlanması ile mümkün olacaktır.

Tablo 1: Tip 1 Diyabet Tedavisinde Kullanılan Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklarının Karşılaştırması

MSC Kaynağı	Terapötik Etki Alanı	Moleküler Hedef/Etki Mekanizması	Kaynak
WJ-MSC	β -hücre koruma ve insülin üretimi	PDX-1, C-peptid artışı	Wu vd., 2009
MenSC	Eksozom aracılığıyla β -hücre yenilenmesi	PDX-1 sinyali	Mahdipour vd., 2019
Br-MSC	Pankreatik belirteçlerin ekspresyonu ve fonksiyon	PDX1, Ngn3, PCNA, IR	Khamis vd., 2021
moMSCORS	Glisemik kontrol ve immün regülasyon	Th17, CD8+, Treg yanıtları	Mićanović vd., 2024
Modifiye MSC (TGF- β)	İnsülin üretimi ve immün supresyon	TGF- β sinyali	Daneshmandi vd., 2017
MSC-Exo (miR-25)	T hücre migrasyonunun engellenmesi	CXCR3 ekspresyonu azalması	Zhou vd., 2025

1.2. Tip 2 Diyabet ve Kök Hücre Tabanlı Tedavi Yaklaşımları

1.2.1. Tip 2 Diyabetin Patofizyolojisi, Mevcut Tedavi Yaklaşımları ve Klinik Engeller

Tip 2 diyabet (T2D), azalmış insülin üretimi ile insülin direncinin birlikte görülmesi sonucu ortaya çıkan kronik bir metabolik bozukluktur. Bu durum, hücrelerin glukozu etkin şekilde kullanamamasına yol açar ve kan şekeri düzeylerinin sürekli olarak yüksek seyretmesine neden olur. Zamanla nöropati, nefropati ve kardiyovasküler hastalıklar gibi ciddi komplikasyonlar gelişebilir (Cohen ve Marles, 2008).

Mevcut tedavi yaklaşımlarının çoğu yalnızca kan glukozunun kontrolüne odaklanmakta, altta yatan hastalığı hedef almamaktadır. Bu

durum, özellikle kök hücre tedavisi gibi rejeneratif tıp yöntemlerini giderek daha cazip hale getirmektedir

1.2.2. Tip 2 Diyabette Mezenkimal Kök Hücreler ve Terapötik Potansiyeli

Kök hücrelerin, Tip 2 diyabetle ilişkili sistemik inflamasyonu azaltma, pankreatik β -hücre aktivitesini yeniden sağlama ve insülin duyarlılığını artırma potansiyeli, çok sayıda çalışmayla ortaya konmuştur (Tablo 2) (Zang, L. vd., 2017). Özellikle, melatonin aracılığıyla canlılığı artan ADMSC'ler, β -hücre tükenmesi, karaciğer disfonksiyonu, insülin direnci ve sistemik inflamasyonun azaltılmasında önemli katkılar sağlamaktadır (Li. B. vd., 2021; Xu ve Zuo, 2021).

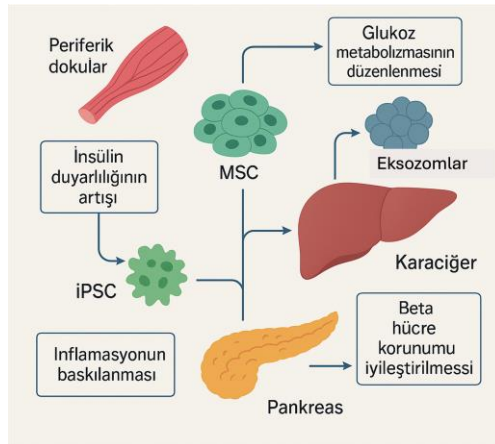
İnsan göbek kordonundan türetilen mezenkimal kök hücreler (UCMSC'ler), Akt fosforilasyonu yoluyla etki göstererek hiperglisemi ve insülin direncini azaltmakta; böylece obeziteye bağlı yağlı karaciğer hastalığında glikolipid metabolizmasını iyileştirmektedir (Wang, Z. vd., 2022). Ayrıca, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde bmal1 geninin aşırı ekspresyonu, Tip 2 diyabette osteoblast ve osteoklast aktivitesi arasındaki dengeyi yeniden kurarak NF- κ B sinyal yolunun baskılanması yoluyla kemik mineralizasyonunu artırabilir (Li. X. vd., 2018). Bu bulgular, kök hücre temelli tedavilerin metabolik düzeydeki terapötik önemini vurgulamaktadır. Özellikle, insülin üreten hücrelere farklılaştırılabilen iPSC'ler, β -hücre replasman tedavisi açısından umut vadetmektedir (Dadheech ve James Shapiro, 2019). Bununla birlikte, CRISPR/Cas9 gibi gen düzenleme teknolojileri, β -hücre fonksiyon bozukluklarını düzeltme kapasitesiyle diyabet tedavisinde yenilikçi terapötik yaklaşımlar sunmaktadır (Gao vd., 2022).

İnsan kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücreler (UC-MS C'ler), periferik dokularda insülin direncini azaltarak T2D hastalarında hiperglisemiye önemli düzeyde düşürmektedir (Zang, L. vd., 2017). Yapılan çalışmalarda, MSC infüzyonunun T2D sıçan modellerinde insülin direncini azalttığı ve MSC kaynaklı M2 makrofajların, proinflamatuvar M1 makrofajlarının etkisini dengelediği gösterilmiştir. M1 makrofajları, UC-MS C'lerde IL-6 ekspresyonunu artırarak IL4R düzeylerini düzenlemekte; bu da STAT6'nın fosforilasyonunu teşvik ederek makrofajların M2 fenotipine yönelmesini

sağlamaktadır (Xie, Z. vd., 2016). Bu makrofaj polarizasyonu, MSC'lerin obeziteye bağlı insülin direnci tedavisindeki terapötik potansiyelini ortaya koymaktadır.

UC-MSK'lerin, karaciğerde glukoz metabolizmasını düzenleyici etkileri de raporlanmıştır. UC-MSK uygulaması, T2D fare modellerinde açlık kan şekeri düzeylerini azaltmakta, insülin duyarlılığını, karaciğer fonksiyonlarını ve lipid profillerini iyileştirmektedir. Bu etkiler; glikolitik ve lipolitik enzimlerin (GCK, PFK, PK, PPAR- α) ekspresyonundaki artış ile birlikte, glukoneogenez ve yağ asidi biyosentezine katılan enzimlerin (G-6-P, PEPCK, SREBP-1c) düzeylerindeki azalma ile desteklenmektedir (He, Q. vd., 2020).

Wang ve arkadaşları, T2DM tedavisinde liraglutid ile insan göbek kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (hUC-MSK) kombinasyonunun terapötik etkilerini incelemiştir. Liraglutid; insülin salınımını artıran, glukagon sekresyonunu baskılayan ve β -hücrelerinin hayatta kalmasını destekleyen bir GLP-1 reseptör agonisti olup, glisemik kontrolü iyileştiren etkili bir antidiyabetik ajan olarak tanımlanmaktadır. Bu kombinasyonun, β -hücrelerinde pro-apoptotik ASK1/JNK/BAX sinyal yolunun aktivasyonunu inhibe ettiği ve anti-apoptotik Bcl-2 protein ekspresyonunu artırdığı raporlanmıştır. Ayrıca, açlık plazma glukozu (FPG), HbA1c, glukagon düzeyleri ve vücut ağırlığında anlamlı azalmalar gözlemlenmiş; bununla birlikte adacık mikrodolaşımının iyileştirilmesi, insülin hedeflemeli yönelimin azaltılması, otofajin düzeylerinin düşürülmesi ve makrofaj kaynaklı rejeneratif süreçlerin baskılanması gibi ek faydalar da bildirilmiştir (Wang, W. vd., 2020).



Şekil 1: Tip 2 Diyabet Tedavisinde Kök Hücre Müdahale Noktaları. Şematik görselde periferik dokular, karaciğer ve pankreas üzerine MSC, iPSC ve eksozomların etkileri

gösterilmektedir. Beta hücre korunumu, insülin duyarlılığının artışı, glukoz metabolizmasının düzenlenmesi, inflamasyonun baskılanması ve lipid metabolizmasının iyileştirilmesi gibi başlıca etkiler vurgulanmaktadır.

1.2.3. Tip 2 Diyabette Kök Hücre Türevleri: Eksozomlar, Moleküler Modifikasyonlar ve İmmün Düzenleyici Etkiler

hUC-MSK'lerden türetilen eksozomların (hUCMSCs-ex) tip 2 diyabet tedavisinde umut verici sonuçlar verdiği bildirilmiştir. Bu eksozomlar, insülin duyarlılığını artırmakta, glukoz emilimini ve metabolizmasını iyileştirmekte ve pankreatik beta hücre yıkımını azaltarak hiperglisemiye düşürmektedir (Sun vd., 2018). Ek olarak, MSC kaynaklı eksozomlar (MSC-Exos), tümörojenik risk taşınamaları ve terapötik RNA'lar içermeleri nedeniyle hücre temelli tedavilere alternatif olarak değerlendirilmektedir. Büyüme faktörleri, onarıcı proteinler ve terapötik kodlamayan RNA'lar bakımından zengin olan MSC-Exos, iltihabı azaltmakta, vaskülarizasyonu teşvik etmekte ve anti-apoptotik etki göstererek doku onarımına katkı sağlamaktadır. Bu özellikleri sayesinde MSC-Exos, diyabet ve ilişkili metabolik hastalıkların tedavisinde umut vadeden ve etkili bir biyolojik araç olarak değerlendirilmektedir (Xiong vd., 2021).

Melatonin ile önceden tedavi edilen hUC-MSK'ler, STZ ve HFD ile indüklenmiş diyabetik farelerde serum insülin seviyesini artırmakta, PI3K/Akt yolu üzerinden *p53*'e bağlı *Bcl2* seviyesini yükseltmekte, *Bax* ve *Casp3* aktivasyonunu azaltmakta ve insülin sinyalini etkilemektedir (Aierken vd., 2022).

MSC'lerin diyabet tedavisinde yalnızca hücresel düzeyde değil, aynı zamanda immün yanıtın modülasyonu açısından da etkili olduğu gösterilmiştir. Gerçekten de, yapılan çalışmalar anti-inflamatuar sitokin IL-10'un düzeyini artırırken, IL-6, IL-1 β ve TNF- α gibi pro-inflamatuar sitokinlerin azalmasını sağlamaktadır. Ayrıca, pluripotent kök hücrelerin anti-inflamatuar M2 makrofajlar ile pro-inflamatuar M1 makrofajlar arasındaki dengeyi düzenleyerek ek bir terapötik avantaj sunduğu bildirilmiştir (Yu, S. vd., 2019). Bu bağlamda, hayvan modelleri, insan kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (hUC-MSK'ler) diyabet tedavisindeki rolünü daha iyi anlamamıza olanak sağlamış hem glisemik kontrol hem de immün regülasyon açısından umut verici sonuçlar ortaya koymuştur.

1.2.4. Tip 2 Diyabette Kombinasyon Tedavileri ve Yeni Nesil Nanovesiküller

Düşük doz Decitabine ile kombine edilen UC-MSc infüzyonları, T2D modelinde pankreas adacıkları içindeki (intraislet) M2 makrofajlarının artışıını sağlamış ve adacık fonksiyonunun yeniden kazanılmasına katkıda bulunmuştur. Bu kombinasyon, PI3K/AKT sinyal yolunun aktivasyonu aracılığıyla M1'den M2'ye makrofaj polarizasyonunu güçlendirmiştir (Xue, J. vd., 2020). Öte yandan, yeni bir çalışmada kemik iliği kök hücrelerinden türetilen ve kurkumin analogu H8 içeren nanovesiküller (H8-BMSCs-NVs), PI3K/AKT/AMPK yolunu aktive ederek HepG2 hücre modellerinde lipid birikimini azaltmış ve diyabetik farelerde glukoz-lipid metabolizmasını iyileştirmiştir (Zhang vd., 2024). Bu gelişmeler, kök hücreler ve türevlerinin insülin direnci, beta hücre fonksiyon kaybı ve sistemik inflamasyon gibi diyabetin temel patofizyolojik bileşenleri üzerinde terapötik etki gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

Tablo 2: Tip 2 Diyabette Kök Hücre Tabanlı Tedavi Stratejileri ve Moleküler Mekanizmalar

Tedavi Yaklaşımı	Hücre Kaynağı	Moleküler Etki Mekanizması	Terapötik Sonuçlar	Kaynak
MSC/ADMSC Parakrin Etkiler	Yağ dokusu, kemik iliği	TGF- β , Akt fosforilasyonu, anti-inflamatuar sinyal yolları	Beta hücre korunumu, sistemik iltihap↓	Li. B vd., 2021; Xu ve Zuo, 2021
iPSC ve CRISPR/Cas9 Uygulamaları	Yeniden programlanmış hücreler	Beta hücre fonksiyon gen düzeltmesi	İnsülin üretiminin artırılması, genetik onarım	Dadheech ve Shapiro, 2019; Gao vd., 2022
UC-MSc ile Makrofaj Polarizasyonu	Göbek kordonu	STAT6 aktivasyonu, IL-4R/IL-6 regülasyonu	M2 makrofaj artışı, insülin duyarlılığında↑	Zang vd., 2017; Xie vd., 2016
hUCMSC ve Eksozom Uygulamaları	Göbek kordonu MSC'leri	GCK, PFK, PK, PPAR α artışı; G-6-P, PEPCK azalması	Glukoz/lipid metabolizmasının düzenlenmesi	He. Q vd., 2020
H8-BMSC Nanovesikül Tedavisi	Kemik iliği	PI3K/AKT/AMPK aktivasyonu	Hepatik lipid/glukoz birikiminin↓	Zhang vd., 2024

1.3. İnsülin Direnci ve Kök Hücre Tabanlı Tedavi Yaklaşımları

1.3.1. İnsülin Direncinin Patofizyolojisi, Mevcut Tedavi Yaklaşımları ve Klinik Önemi

İnsülin direnci (IR), karaciğer, iskelet kası ve yağ dokusu gibi hedef organlarda insülinin fizyolojik etkilerinin yetersiz kalmasıyla karakterize edilen yaygın bir metabolik bozukluktur. Bu durum, karaciğerde glukoz üretiminin baskılanamaması ve periferik dokularda glukoz alımının azalması ile sonuçlanır. İnsülin direncini dengelemek amacıyla pankreastan sürekli olarak fazla insülin salgılanması talebi, zamanla β -hücre fonksiyonunun bozulmasına ve tip 2 diyabetin gelişimine yol açar (Reaven, 1997). IR; obezite, hipertansiyon, dislipidemi, kardiyovasküler hastalıklar ve T2D gibi çok sayıda patolojik durumla ilişkilidir (Hotamisligil, 2000; Lebovitz, 2001). Metabolik sonuçların ötesinde, IR, insülin sinyalizasyonundaki bozulmanın nöroinflamasyonu ve oksidatif stresi artırdığı Alzheimer hastalığı da dahil olmak üzere nörolojik hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir. İnsülin sinyal yolundaki bozulmalar; genetik mutasyonlar, fetal programlama bozuklukları, visseral yağ birikimi, inflamasyon, oksidatif stres ve çeşitli sinyal iletim yollarının (ör. NF- κ B, Nrf2, kaspazlar) düzensizliği ile ilişkilidir (Lebovitz, 2001, Akhtar ve Sah, 2020). Bu mekanizmalar yalnızca glukoz metabolizmasını değil, aynı zamanda nörodejeneratif süreçleri de etkileyerek insülin direncinin sistemik sonuçlarını derinleştirmektedir. İnsülin direncinin çok yönlü etkileri göz önüne alındığında, bu durumun olumsuz sonuçlarını en aza indirmek amacıyla çeşitli tedavi stratejileri geliştirilmiştir. Bu bağlamda, kök hücre temelli tedaviler, insülin duyarlılığını artırma ve metabolik homeostazi yeniden sağlama potansiyeliyle dikkat çekmektedir.

1.3.2. İnsülin Direncinde Mezenkimal Kök Hücreler ve Terapötik Potansiyeli

Kordon kanı kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden (UC-MSC) elde edilen koşullandırılmış ortam (UC-MSC-CM), çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri ve aktif proteinler içermektedir. Bu biyolojik bileşenler arasında insülin direncini azaltma potansiyeli taşıyan TIMP-2, SPARC, MCP-1, VEGF, GDF-15 ve anjiyopoyetin-1 gibi önemli düzenleyiciler yer almaktadır (Tablo

3). UC-MSC-CM'nin, sitoplazmik GLUT4 seviyelerini etkilemeden hücre membranındaki GLUT4 ekspresyonunu artırarak glukoz emilimini attırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, protein kinaz B (Akt) ve insülin reseptör substrat-1 (IRS-1) aracılığıyla insülin sinyal yolunu onardığı bildirilmiştir. Bu metabolik düzenlemelere ek olarak, UC-MSC-CM'nin mitokondriyal aktiviteyi artırdığı da saptanmıştır. Özellikle, PPAR- γ koaktivatör 1-alfa (PGC-1 α), mitokondriyal DNA kopya sayısı ve mitokondriyal transkripsiyon faktörü A (TFAM) ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir. Yağ asidi oksidasyonu ve mitokondriyal zar potansiyeli artarken, reaktif oksijen türleri (ROS) düzeylerinde azalma görülmüştür. Ancak adenosin trifosfat (ATP) düzeylerinde anlamlı bir artış kaydedilmemiştir. Tüm bu bulgular, UC-MSC-CM'nin hem GLUT4 ekspresyonunu hem de mitokondriyal fonksiyonu artırarak insülin direncinin iyileştirilmesine katkı sağladığını göstermektedir (Kim, K. S. vd., 2020).

Nrg4 aşırı ekspresyonu ile modifiye edilen AD-MSC'lerin, glukoz intoleransı ve insülin direncini azaltma açısından standart AD-MSC'lere kıyasla daha yüksek terapötik etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu etkinin, iskelet kası ve yağ dokusunda GLUT4 ekspresyonunun artışıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, TNF- α ve IL-6 gibi pro-inflamatuar belirteçlerin düzeylerindeki azalma, Nrg4'ün anti-inflamatuar ve metabolik düzenleyici etkilerini desteklemektedir (Wang vd., 2019).

AD-MSC transplantasyonunun, hiperglisemi, insülin direnci ve karaciğer disfonksiyonu üzerinde olumlu etkiler gösterdiği bildirilmiştir. TGF- β 1/SMAD sinyal yolları üzerine yapılan analizler, AD-MSC'lerin fibrotik karaciğer dokularında TGF- β 1 ve p-SMAD3 ekspresyonunu azalttığını ortaya koymuştur (Liao vd., 2017). Ayrıca, mezenkimal kök hücre infüzyonunun Tip 2 diyabetik sıçanlarda periferik insülin duyarlılığını artırdığı ve hiperglisemiyi azalttığı gösterilmiştir. Bu etki, iskelet kasındaki MG53 düzeyinin düşürülmesiyle IRS-1 ubiquitinasyonunun azalması ve dolayısıyla insülin sinyalizasyonunun iyileştirilmesi ile ilişkilendirilmiştir (Si vd., 2012; Deng vd., 2018).

Benzer şekilde, AD-MSC transplantasyonu; yüksek yağlı diyet ve streptozotosin (STZ; pankreatik β -hücreleri seçici olarak tahrip eden bir diabetojenik ajan) ile indüklenen T2D modelinde, GLUT4 ve INSR gen ekspresyonunu artırarak hiperglisemi ve insülin direncini azaltmıştır. Ayrıca, IRS-1 fosforilasyonundaki artış, insülin sinyal yolunun genel olarak

güçlendiğini göstermektedir. Proinflamatuvar genlerin baskılanması ve makrofaj müdahalesinin azaltılması da bu terapötik etkinin önemli bileşenleri arasında yer almaktadır (Hu vd., 2015; Wang, M. vd., 2018).

Tüm bu bulgular, AD-MSC temelli yaklaşımların insülin direncinin moleküler mekanizmalarını hedef alarak hem glukoz metabolizmasını hem de karaciğer ve kas dokularındaki sinyal yollarını düzenleyebileceğini göstermektedir. İnsülin direncine yönelik kök hücre tabanlı stratejiler ve ilgili mekanizmalar Tablo 3’te özetlenmiştir.

1.3.3. İnsülin Direncinde Kök Hücre Türevleri: Eksozomlar ve Biyomalzemelerle Kombinasyonlar

Wharton jeli kaynaklı insan kordonu mezenkimal kök hücrelerinden (hWJ-MSC) türetilen eksozomların, karaciğer lipid metabolizmasını düzenleyici etkiler gösterdiği belirlenmiştir. Bu eksozomların, SIRT1 aracılı metabolik yolları aktive ederek yağ asidi oksidasyonunu artırdığı, subkutan yağ dokusunun (SAT) kahverengileşmesini ve kahverengi yağ dokusunda (BAT) termojenezi desteklediği saptanmıştır. Eksozom tedavisi, SAT ve BAT dokularında SIRT1 ekspresyonunu artırarak insülin direncine ve karaciğer steatozuna karşı koruyucu etki oluşturmuştur (Kim vd., 2024).

Benzer şekilde, insan kordonu mezenkimal kök hücrelerinden elde edilen eksozomlar (hUCMSC-ex), periferik insülin direncini tersine çevirerek ve β -hücre fonksiyonunu koruyarak Tip 2 diyabetin tedavisinde etkili bulunmuştur. Diyabetik sıçan modellerinde, GLUT4 ekspresyonunun artışı sayesinde kas hücrelerinde glukoz alımı artmış, glukoz metabolizması desteklenmiş ve β -hücre ölümü engellenmiştir (Sun vd., 2018).

Ancak, tüm kök hücre kaynaklı ekstraselüler veziküller (EV) benzer faydalar sağlamamaktadır. Gestasyonel diyabetik sıçanlardan elde edilen yağ dokusu kök hücrelerinden türetilmiş küçük ekstraselüler veziküllerin (sEV), normal sıçan hepatositlerinde hücre canlılığını ve insülin duyarlılığını azalttığı gösterilmiştir. Bu olumsuz etki, TGF- β /Smad2 sinyal yolunun aktivasyonu ve Thbs1 proteinlerinin aşırı ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir (Li, H. vd., 2024).

Öte yandan, fare kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinden (BMSC) elde edilen eksozomların, obeziteye bağlı insülin direncini azaltmada etkili olduğu bildirilmiştir. Bu düşük immünojenik eksozomlar, baskılanmış

PI3K/AKT sinyal yolunu yeniden aktive ederek, GLUT4 protein düzeylerini artırmış ve glukoz alımını desteklemiştir (Shi vd., 2023).

Tablo 3: İnsülin Direncinde Kök Hücre Tabanlı Yaklaşımlar ve Mekanizmalar

Kök Hücre Türü / Yaklaşımı	Hedeflenen Etki	Temel Mekanizma	Sistem/ Hedef Bölge	Kaynak
UC-MSC-CM (Kordon kanı MSC ortamı)	Glukoz emilimini artırma, insülin duyarlılığı sağlama	GLUT4 membran translokasyonu, PKB ve IRS-1 yolu, mitokondriyal aktivite↑	Kas hücresi (C2C12), mitokondri	Kim vd., 2020
Nrg4-ADSC	Glukoz intoleransı ve insülin direncini azaltma	GLUT4 ekspresyonu ↑, TNF-α / IL-6 ↓	Kas ve yağ dokusu	Wang vd., 2019
hWJMSC-Exo	Karaciğer lipid metabolizmasını iyileştirme, IR azaltma	SIRT1 aktivasyonu, yağ asidi oksidasyonu, termogenez artışı	Karaciğer, SAT, BAT	Kim vd., 2024
ADSC transplantasyonu	Karaciğer fonksiyonu ve insülin duyarlılığını artırma	TGF-β1/p-SMAD3 ↓	Karaciğer	Liao vd., 2017
hucMSC-ex (Eksozomlar)	İnsülin salınımını ve glukoz metabolizmasını iyileştirme	GLUT4 ekspresyonu ↑, beta hücre korunumu	Kas dokusu, pankreas	Sun vd., 2018
GDM-sEV (GDM kökenli küçük veziküller)	İnsülin sinyalini baskılama (olumsuz etki)	TGF-β/Smad2 aktivasyonu, Thbs1 ↑	Hepatositler	Li, H vd., 2024
MSC infüzyonu	Periferik IR'yi azaltma	MG53 ↓, IRS-1 ubiquitinlenmesi engellenmesi	İskelet kası	Deng vd., 2018; Si vd., 2012
AD-MSC transplantasyonu	Glukoz homeostazı ve inflamasyonun iyileştirilmesi	GLUT4, INSR, IRS-1 ↑; TNF-α, IL-6 ↓	Kas, karaciğer, yağ dokusu	Hu vd., 2015; Wang, M. vd., 2018
BMSC-Exos	GLUT4 artırarak glukoz emilimini artırma	PI3K/AKT sinyali ↑, GLUT4 ↑	Kas, karaciğer	Shi vd., 2023
BM-MSC+ Pioglitazon/ Exendin-4	Beta hücre koruması, insülin duyarlılığı ↑	Anti-inflamatuar etki, sinerjik farmakolojik aktivite	Pankreas, yağ dokusu	Mohamed vd., 2023
Yaşlı BM-MSC-Exo	IR'nin yaşa bağlı düzenlenmesi	miR-29b-3p → SIRT1 baskılanması	Hepatosit, miyosit, adiposit	Su vd., 2019

1.3.4. İnsülin Direncinde Yeni Yaklaşımlar: Kombinasyon Tedavileri ve Yaşlanma İlişkisi

Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin, pioglitazon veya exendin-4 gibi ilaçlarla kombinasyonu; pankreas hasarı, β -hücre disfonksiyonu ve yağ dokusu inflamasyonunu azaltmada sinerjik bir etki göstermiştir. Bu kombinasyon, HFD/STZ ile indüklenen Tip 2 diyabet modellerinde tek başına uygulanan tedavilere kıyasla daha belirgin anti-inflamatuar ve insülin duyarlılığını artırıcı etkiler sunmuştur (Mohamed vd., 2023).

Yaşlanma ile ilişkili olarak, yaşlı bireylerden elde edilen kemik iliği mezenkimal kök hücrelerine (BM-MSC) ait eksozomların insülin yanıtı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu eksozomların hepatosit, miyosit ve adipositlerde insülin sinyal yanıtlarını modüle ettiği belirlenmiştir. Özellikle yaşlı BM-MSC kaynaklı mikroRNA-29b-3p'nin SIRT1'i hedef alarak insülin duyarlılığını azalttığı gösterilmiştir. Bu bulgu, yaşa bağlı insülin direnci gelişiminde potansiyel bir moleküler yolak olarak değerlendirilmiştir. Ancak miR-29b-3p inhibisyonunun pankreas fonksiyonu üzerinde anlamlı bir etki oluşturmaması, bu mikroRNA'nın etkisinin daha çok periferik insülin yanıtlarıyla sınırlı olduğunu düşündürmektedir (Su vd., 2019).

Bu bulgular, mezenkimal kök hücre kaynaklı tedavi yaklaşımlarının; glukoz alımını artırma, mitokondriyal fonksiyonu iyileştirme ve inflammatuar yanıtı çeşitli biyolojik yollarla baskılama kapasitesi sayesinde insülin direncinin azaltılmasına önemli katkılar sunduğunu ortaya koymaktadır. İlgili sinyal yollarının düzenlenmesi, özellikle Tip 2 diyabet (T2D) başta olmak üzere metabolik hastalıkların patofizyolojik yönetiminde bu hücrel tedavi stratejilerinin terapötik değerini pekiştirmektedir.

Sonuç olarak, insülin direncine yönelik kök hücre temelli tedaviler; insülin sinyal yolunun yeniden düzenlenmesi, inflamasyonun baskılanması, glukoz taşıyıcılarının aktivasyonu ve mitokondriyal fonksiyonların artırılması yoluyla metabolik homeostazın sağlanmasına katkı sunmaktadır. Bu alanda yürütülecek ileri düzeyde prelinik ve klinik çalışmalar, hücrel tedavilerin diyabet ve obezite yönetiminde rutin klinik uygulamalara entegrasyonunu kolaylaştıracaktır.

2. OBEZİTE VE KÖK HÜCRE TABANLI TEDAVİ YAKLAŞIMLARI

2.1. Obezite ve Kök Hücre Tabanlı Tedavi Yaklaşımları

2.1.1. Obezitenin Patofizyolojisi, Mevcut Tedavi Yaklaşımları ve Klinik Önemi

Fazla vücut ağırlığı, obezite olarak tanımlanan kompleks bir klinik durumu ifade eder. Obezite, yalnızca estetik bir sorun olmanın ötesinde; kalp hastalıkları, diyabet, hipertansiyon, hiperlipidemi, karaciğer hastalıkları, uyku apnesi ve bazı kanser türleri gibi çok sayıda kronik hastalık için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (Singh, 2023). Obezite ile metabolik disfonksiyon arasındaki karmaşık ilişki, yenilikçi tedavi stratejilerine duyulan ihtiyacı açıkça ortaya koymaktadır.

Bu bağlamda, mitokondriyal aktivitenin baskılanmasıyla ilişkili mitofaji eksikliği ve hücre içi mitokondri hareketinin bozulması, obezite tedavisinde karşılaşılan temel biyolojik engeller arasında yer almaktadır. Ancak, pirroloquinolin kinon (PQQ; antioksidan özelliklere sahip bir kofaktör) uygulamasıyla kardiyolipin içeriğinde sağlanan değişikliklerin mitokondriyal fonksiyonları restore ettiği ve hipokampusta yer alan dentate gyrus hücrelerinin (nörogenez ve metabolik düzenlemede görevli nöral progenitör hücreler) kullanımıyla obeziteye yönelik potansiyel bir tedavi stratejisi sunulduğu bildirilmiştir (Shakti vd., 2021).

Öte yandan, azot bağımlı bir mekanizma üzerinden etkili olduğu gösterilen bir başka yaklaşımda, indüklenmiş pluripotent kökenli endotelial hücreler (iPSC-EC) ile yapılan hücre transplantasyonunun, Pravastatin (kolesterol düşürücü bir ilaç) ile birlikte uygulandığında obezite kaynaklı endotel disfonksiyonunu tersine çevirebildiği ve endotel fonksiyonunu artırabildiği rapor edilmiştir (Gu vd., 2015).

2.1.2. Obezitede Mezenkimal Kök Hücreler (MSC) ve Terapötik Potansiyeli

AD-MSC tedavisinin obezite üzerindeki terapötik etkisi, vücut ağırlığı, hormonal denge, karaciğer fonksiyonu, lipid profili, inflamatuvar durum, vücut kompozisyonu ve glukoz metabolizması gibi çok yönlü fizyolojik parametrelere bağlıdır (Saleh, F. vd., 2018). Obez bireylerden elde edilen yağ

kök hücrelerinde Lin28/Let7 yolunun düzenlenmesi, MSC transplantasyonunun obezite tedavisinde potansiyel bir moleküler hedef sunduğunu göstermektedir (Pérez vd., 2013).

MSC'lerin, makrofaj polarizasyonunu etkileyerek inflamatuvar yanıtları modüle ettiği bildirilmiştir. Özellikle AD-MSK'ler, pro-inflamatuvar M1 makrofajlarını anti-inflamatuvar M2 fenotipine dönüştürerek yağ dokusundaki inflamasyonu azaltmakta ve obezite ile ilişkili insülin direncini iyileştirmektedir (Whitfield-Gabrieli ve Nieto-Castanon, 2012). Öte yandan, göbek kordonu kaynaklı MSC'ler, dalaktaki Treg hücrelerinde IL-10 üretimini artırarak insülin direncini azaltmakta ve metabolik homeostazi desteklemektedir (Xue, J. vd., 2022).

MSC'ler, yalnızca metabolik ve inflamatuvar süreçleri değil, aynı zamanda obezite ile ilişkili merkezi sinir sistemi devrelerini de etkileyebilmektedir. Özellikle hipotalamik kök hücrelerdeki POMC-erjik (pro-opiomelanokortin ekspresyonu yapan) ve GABA-erjik (gama-aminobütirik asit üreten) nöronal soyların gelişimi, NF- κ B sinyal yolunun baskılanması aracılığıyla nörojenezi ve hücre hayatta kalımını desteklemekte; böylece glukoz intoleransı ve obezite üzerinde düzenleyici bir etki oluşturmaktadır (Tablo 4) (Li, J. vd., 2014).

POMC-erjik nöronlar, hipotalamusta yer alan ve pro-opiomelanokortin (POMC) genini ifade eden nöronlardır. Enerji dengesi, iştah kontrolü ve glukoz metabolizmasında kritik rol oynarlar (Toda vd., 2017). GABA-erjik nöronlar, GABA (gama-aminobütirik asit) üreten inhibitör nöronlardır. Beyin aktivitesini dengeleyerek aşırı uyarılmayı önlerler; stres, iştah ve nöroinflamasyon gibi süreçlerde etkilidirler (Xu ve Wong 2018).

Diyetle indüklenen obezite (DIO) modellerinde, MSC tedavisinin karaciğer oksidatif stresini azalttığı, oksidatif hasarı hafiflettiği ve çeşitli inflamatuvar parametreleri düşürdüğü gösterilmiştir (Nyamandi vd., 2014). Hayvan modellerinde AD-MSK tedavisinin hiperglisemi, hiperlipidemi, non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), ateroskleroz ve insülin direnci gibi obeziteyle ilişkili patolojilerde olumlu etkiler sağladığı bildirilmiştir. Ayrıca, HDL düzeylerinde ve insülin salınımında artış gözlenmiş; düzensizleşmiş metabolik yollar dengeye gelmiştir (Welsh ve Gallicchio, 2022).

MSC'ler, hepatosteatoz, karaciğer fibrozisi ve glukoz intoleransı gibi metabolik bozuklukların tedavisinde potansiyel bir hücresel terapi olarak öne

çıkılmaktadır. Bu terapötik etkiler, adiponektin-leptin oranının düzenlenmesi ve PPARs (Peroksizom proliferatör-aktive edilmiş reseptörler) ekspresyonunun modülasyonu yoluyla gerçekleşmektedir. Özellikle MSC'lerden türetilen kahverengi yağ hücreleri (M-BA; MSC-derived Brown Adipocytes), vücut ağırlığını azaltıcı ve hiperlipidemiye karşı düzeltici etkileriyle dikkat çekmektedir (Lee vd., 2017).

2.1.3. Obezitede Kök Hücre Türevleri: Eksozomlar ve Biyomalzemelerle Kombinasyonlar

İnsan amniyotik mezenkimal kök hücrelerinden elde edilen koşullandırılmış kültür ortamı (hAMSCs-CM), obezite tedavisinde umut verici bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir. Yüksek yağlı diyet (HFD) kaynaklı obeziteyi, yağ dokusu ve karaciğerdeki lipid birikimini azaltarak ve adipogenez sürecini baskılayarak kontrol altına almıştır. Bu etkiler, PPAR γ ve C/EBP α aracılı yağ sentezinin inhibisyonu, GLUT4 üzerinden glukoz metabolizmasının desteklenmesi, UCP1/PPAR α /PGC1 α yoluyla enerji harcamasının artırılması ve STAT3-ARG1 eksenini üzerinden M2 makrofaj polarizasyonunun teşvik edilmesi ile gerçekleşmektedir (Tan vd., 2021).

MSC tedavisi, obeziteyle ilişkili komplikasyonlar arasında yer alan non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), kardiyovasküler hastalıklar (CVD) ve renal disfonksiyon gibi durumlarda olumlu terapötik etkiler göstermektedir. Bu etkiler, TNF- α ve IL-6 gibi pro-enflamatuar sitokinlerin düzeylerinde gözlenen azalma ile desteklenmektedir (Saleh, F.A. vd., 2021).

2.1.4. Obezite ve Diyabetin Ortak Tedavisinde Kök Hücreler: Klinik Gelecek Perspektifleri

Diyabet ve obezite, önemli metabolik bozukluklara yol açan ve küresel düzeyde halk sağlığını tehdit eden kronik hastalıklardır. Bu hastalıkların tedavisinde, özellikle iPSC'ler ve MSC'ler gibi hücresel terapiler; doku onarımı, insülin üretiminin desteklenmesi ve inflamasyonun azaltılması gibi mekanizmalar üzerinden yüksek terapötik potansiyel sunmaktadır (Zeinhom vd., 2024).

Pankreas β -hücre fonksiyonlarının düzenlenmesi, insülin duyarlılığının artırılması ve enerji metabolizmasının iyileştirilmesi gibi etkiler, kök hücre

uygulamalarıyla elde edilebilmektedir. Bu nedenle, kök hücre temelli tedaviler, gelecekte diyabet ve obezitenin klinik yönetiminde önemli bir yer edinme potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte, bu tedavilerin güvenliği, etkinliği ve uzun vadeli sonuçları, daha fazla klinik çalışma ile desteklenmelidir. Ayrıca, moleküler düzeydeki mekanizmaların tam olarak anlaşılması ve bireyselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesi, bu alanın ilerlemesi açısından kritik önemdedir (Ogieuhi vd., 2025).

Tablo 4: Obezitede Kök Hücre Tabanlı Uygulamalar ve Etki Mekanizmaları

Kök Hücre Türü / Yaklaşım	Hedeflenen Etki	Temel Mekanizma / Bulgular	Kaynak
Dentate hücrelerle tedavi	Mitokondriyal aktivitenin restorasyonu	PQQ ile kardiyolipin içeriği modülasyonu	Shakti vd., 2021
iPSC-EC + Pravastatin	Endotel fonksiyonunun artırılması	Azot bağımlılığı mekanizması	Gu vd., 2015
MSC transplantasyonu	Metabolik kurtarma	Lin28/Let7 yolunun düzenlenmesi	Pérez vd., 2013
MSC + NF-κB baskılanması	Hipotalamik nöroenez ve glukoz toleransı	POMC/GABA soy gelişimi	Li, J. vd., 2014
MSC	Karaciğer oksidatif stresinin azaltılması	Diyetle indüklenen oksidatif hasarın baskılanması	Nyamandi vd., 2014
MSC	Sitokin düzeylerinin düşürülmesi	TNF-α, IL-6 azalması	Saleh, F.A. vd., 2021
Göbek kordonu MSC	İnsülin direnci ve inflamasyonun azaltılması	IL-10 üretimi; metabolik homeostaz	Xue, J. vd., 2022
ADMSC	İnflamasyon ve glukoz metabolizmasının iyileştirilmesi	Vücut ağırlığı, lipid profili, karaciğer sağlığı üzerinde etki	Saleh, F. vd., 2018
ADMSC	Makrofaj polarizasyonu, insülin duyarlılığı	M1 → M2 geçişi; inflamasyon azalması	Whitfield-Gabrieli ve Nieto-Castanon, 2012
ADMSC	Metabolik parametrelerin düzeltilmesi	İnsülin direnci, hiperglisemi, NAFLD, HDL artışı	Welsh ve Gallicchio, 2022
MSC-türevli M-BA	Vücut ağırlığı ve lipid dengesinin sağlanması	Adiponektin-leptin oranı, PPARs modülasyonu	Lee vd., 2017
hAMSCs-CM	Yağ hücresi oluşumu ve lipid birikiminin baskılanması	PPARγ/C/EBPα baskılanması, UCP1-STAT3-ARG1 aktivasyonu	Tan vd., 2021

3. DİYABETİN KOMPLİKASYONLARI VE KÖK HÜCRE TABANLI TEDAVİLER

3.1. Diyabetik Nöropati ve Kök Hücre Tabanlı Tedavi Yaklaşımları

3.1.1. Diyabetik Nöropati: Patofizyolojisi, Mevcut Tedavi Yaklaşımları ve Klinik Önemi

Diyabetik hastalıklara eşlik eden makrovasküler komplikasyonlar (örneğin kardiyovasküler hastalıklar) ile mikrovasküler komplikasyonlar (örneğin retinopati, nefropati ve nöropati) klinik literatürde sıklıkla ele alınan başlıca patolojik süreçler arasında yer almaktadır (Callaghan, 2014). Bu komplikasyonlar arasında diyabetik nöropati, yüksek prevalansı ve hastaların yaşam kalitesini ciddi şekilde etkilemesi nedeniyle özellikle dikkat çekmektedir. Bu durum, düşme riskini artırmakta ve kronik ağrı gelişimine yol açmaktadır (Pop-Busui, R. vd., 2017).

Diyabetik nöropati (DN), diyabete bağlı olarak periferik sinir sisteminde gelişen ve ilerleyici sinir hasarıyla seyreden bir komplikasyondur. Hastalığın klinik önemi, hem yüksek prevalansı hem de fonksiyonel kayıplara yol açma potansiyeli ile ilişkilidir. DN'nin gelişimi; diyabet süresi, glikolize hemoglobin düzeyleri (HbA1c), vücut kitle indeksi (BMI) ve sigara kullanımı gibi risk faktörleriyle yakından bağlantılıdır (Teskaye vd., 2005). Bu klinik tablo, değerlendirme sürecinde çok boyutlu bir yaklaşım gerektirir; çünkü nöropatik bulgular hem anatomik dağılım hem de semptom yapısı açısından heterojen özellikler göstermektedir.

Nöropati alt tiplerinin tanımlanmasında şu parametreler temel alınır:

- **Yayılım karakteri:** proksimal/distal, simetrik/asimetrik, fokal/multifokal/difüz
- **Semptom profili:** ağrılı veya ağrısız; duyuşal, motor ya da otonom
- **Klinik seyir:** akut, subakut veya kronik
- **Patofizyolojik arka plan:** metabolik, vasküler veya inflamatuvar mekanizmalar

Bu değişkenler, diyabetik nöropatinin “tipik” ve “atipik” klinik formları arasındaki ayırıcı rol oynar (Smith vd., 2012). Bu nedenle, erken tanı ve doğru sınıflandırma hem semptom yönetimi hem de hastanın yaşam kalitesinin korunması açısından kritik önemdedir.

DN'nin en sık görülen formu distal simetrik polinöropatidir (DSP) olup, bu formda ellerde ve ayaklarda uyuşma, karıncalanma, yanma hissi, elektrik çarpması tarzında ağrı, uzuv zayıflığı, denge ve koordinasyon kaybı gibi semptomlar gözlenir. Atipik formlar ise daha değişken klinik özellikler sergileyebilir. Örneğin, diyabetik radikülopleksus nöropatisi (DRPN) sıklıkla tek taraflı proksimal ağrı ile başlar, ardından kas zayıflığı ve atrofi gelişir. Ayrıca, otonom sinir tutulumu, bağırsak ve mesane fonksiyon bozuklukları gibi semptomlara neden olabilir (Pop-Busui, R. vd., 2017).

Diyabetik nöropatinin tedavisi önemli zorluklar içermektedir. DSP'nin başlangıcını veya progresyonunu durdurmak için önerilen en etkili yöntem glisemik kontroldür. Ancak glisemik kontrolün yeterli olmaması nedeniyle birçok hastada hastalık ilerlemeye devam etmektedir. Mevcut tedaviler çoğunlukla semptom yönetimine odaklanmakta; bu da yaralı sinirlerin iyileştirilmesine yönelik yeni terapötik yaklaşımlara olan ihtiyacı artırmaktadır. Bu bağlamda, kök hücre temelli tedaviler, sinir rejenerasyonunu destekleyerek DN tedavisinde umut verici bir strateji olarak değerlendirilmektedir. (Pop-Busui, R. vd., 2022).

3.1.2. Nöropatide Mezenkimal Kök Hücreler ve Terapötik Potansiyeli

MSC temelli tedavilerin, diyabetik nöropati modeli üzerinde sinir rejenerasyonunu desteklediği çeşitli deneysel verilerle gösterilmiştir. Özellikle motor sinir iletim hızı (MNCV), duyu sinir iletim hızı (SNCV), bileşik kas aksiyon potansiyeli (CMAP), intraepidermal sinir lifi yoğunluğu (IENFD), miyelin kalınlığı ve aksonal morfoloji gibi parametrelerde iyileşmeler gözlemlenmiştir. Farklı MSC kaynakları farklı terapötik etkiler göstermektedir (Tablo 5). Örneğin, kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler (BM-MSC), güçlü biyokimyasal yanıtlar üretirken, diş pulpası kaynaklı kök hücreler (DPSC), birçok parametrede en yüksek etkiyi göstermiştir. DPSC'lerin diyabetik periferik nöropati (DPN) tedavisinde en yüksek terapötik potansiyele sahip hücre tipi olduğu öne sürülmektedir (Alizadeh vd., 2025).

BM-MSC'lerin, GSK-3 β / β -katenin sinyal yolunu aktive ederek sinir rejenerasyonunu desteklediği; aynı zamanda oksidatif stres ve inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (He, D. vd., 2020). Ayrıca, MSC transplantasyonunun

spinal nöroinflamasyonu baskıladığı, astrosit ve mikrogliya aktivitesini azalttığı ve oksidatif stres belirteçlerini düşürdüğü bildirilmiştir (Evangelista vd., 2018).

İnsan süt dişi kaynaklı kök hücreler (SHED), nöropatik ağrıyı azaltarak periferik sinir fonksiyonlarını iyileştirmiş ve kılcal damar/miyofibril oranını artırmıştır. RT-PCR ve Western blot analizleri, bu hücrelerin anjiyojenik ve nörotrofik belirteçlerin ekspresyonunu artırdığını doğrulamaktadır (Xie vd., 2019).

Diş pulpası kökenli kök hücreler (DPSC), hem intravenöz hem de intramüsküler uygulamalarda terapötik potansiyel göstermiştir. Özellikle tekrarlanan intramüsküler uygulamaların daha uzun vadeli faydalar sağladığı belirtilmiştir. TNF- α ve CRP düzeylerindeki düşüşler, bu etkinin biyokimyasal kanıtı olarak sunulmuştur (Datta vd., 2017).

Plasenta kaynaklı mezenkimal kök hücreler (PMSC), Wnt/ β -katenin sinyal yolunu aktive ederek sinir rejenerasyonunu desteklemiştir. PGP9.5 ve S100 β ekspresyonundaki artış, bu hücrelerin sinir iyileşmesine katkısını göstermektedir. Ayrıca, Wnt inhibitörü LGK974'nin terapötik etkinliği azaltması, bu yolun nörorejeneratif süreçlerdeki önemini ortaya koymaktadır (Pan vd., 2022).

3.1.3. Nöropatide Kök Hücre Türevleri: Eksozomlar ve Alternatif Kaynaklar

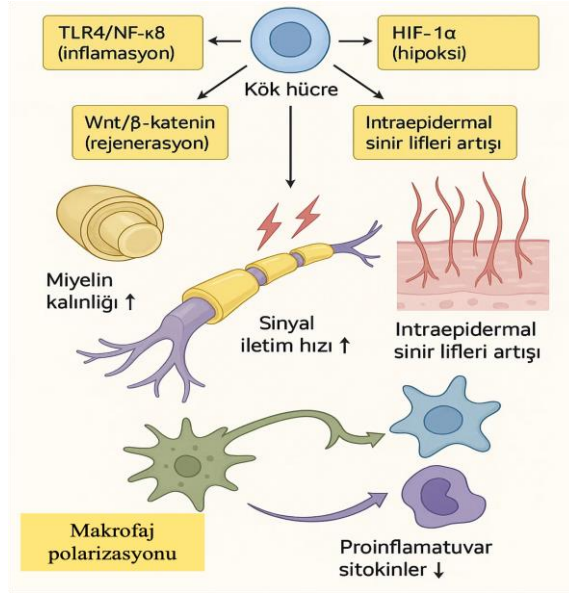
MSC'lerden elde edilen eksozomların da önemli terapötik etkileri olduğu gösterilmiştir. Proinflamatuvar gen ekspresyonunu azaltarak nörovasküler disfonksiyonu düzeltten MSC-eksozomları, termal ve mekanik duyarlılığı artırmış, sinir iletim hızını yükseltmiştir. Ayrıca, intraepidermal sinir lifi yoğunluğunu ve siyatik sinir akson çaplarını artırmış, makrofaj polarizasyonunu M1'den M2'ye kaydırmış ve TLR4/NF- κ B yolaklarını hedefleyen miRNA'lar aracılığıyla anti-inflamatuvar etki göstermiştir (Fan vd., 2021).

MSC-türevli eksozomların polipirrol nanoparçacıkları (PpyNPs) ile kombinasyonu, diyabetik periferik nöropati (DPN) modelinde motor sinir iletim hızı (MNCV) ve bileşik kas aksiyon potansiyeli (CMAP) değerlerini artırmış; kas rejenerasyonunu desteklemiş ve oksidatif stresle ilişkili hasarı azaltmıştır. Ayrıca, gen ekspresyon düzeylerinde terapötik açıdan olumlu değişiklikler gözlenmiştir (Singh vd., 2021).

Deferoksamin (DFX) ile ön koşullandırılan AD-MSK'lerde, HIF-1 α düzeylerinde artış saptanmış; bu artış, nörotrofik faktörlerin (NGF, GDNF, NT-3), pro-anjiyojenik proteinlerin (VEGF α , angiopoietin-1) ve anti-inflamatuar sitokinlerin (IL-4, IL-5) ekspresyonunu artırmıştır. Bu yaklaşım, aynı zamanda MSK sekresyonunun antioksidan kapasitesini güçlendirmiştir (Oses vd., 2017).

AD-MSK-türevli ekstraselüler veziküller, DNMT1 baskılanması yoluyla NRF2/HIF-1 α /ACTA1 sinyal yolunu aktive eden miR-130a-3p'yi taşıyarak, Schwann hücrelerinde apoptozu engellemiş ve bu mekanizma, DPN tedavisi için yeni moleküler perspektifler sunmuştur (Chen, J., Li, G. vd., 2023).

İnsan bademciklerinden elde edilen MSK-türevli nörorejeneratif promotor hücreler (NRPC'ler), duyuşal fonksiyonları artırmış, TRPV1 ekspresyonunu düzenlemiş ve intraepidermal sinir lifi (IENF) sayısını artırmıştır. Bu fonksiyonel iyileşme, Von Frey testi ile deneysel olarak doğrulanmıştır (Yum vd., 2024).



Şekil 2: Diyabetik Nöropatide Kök Hücre Temelli Terapötik Mekanizmalar (Şekilde, Miyelin kalınlığı artışı, sinir iletim hızında iyileşme, intraepidermal sinir liflerinin artışı ve makrofaj polarizasyonu gibi süreçler gösterilmektedir. Yolaklar: TLR4/NF-κB (inflamasyon), Wnt/β-katenin (rejenerasyon), HIF-1 α (hipoksi), miR-130a (apoptoz önleme); İyileşme göstergeleri: Miyelin kalınlığı ↑, sinyal iletim hızı ↑, proinflamatuar sitokinler ↓)

Tablo 5: Kök Hücre Bazlı Tedavilerin Diyabetik Nöropatide Etki Mekanizmaları

Kök Hücre Kaynağı	Ana Mekanizma	Etki Yolları / Faktörler	Kaynak
BMSC	Nörotrofik destek	GSK-3 β / β -katenin aktivasyonu	He, D. vd. (2020)
DPSC (Diş pulpası)	Nöroregenerasyon	IENFD $\uparrow$, Miyelin kalınlığı $\uparrow$	Alizadeh vd. (2025)
SHED	Vaskülogenez ve nöroproteksiyon	CD31, vWF, NGF, NT-3 ekspresyonu $\uparrow$	Xie, J. vd. (2019)
PMSC	Wnt sinyali ile rejenerasyon	β -katenin, DVL1 $\uparrow$, Bax $\downarrow$	Pan vd. (2022)
MSC-eksozomları	İnflamasyon baskılanması	TLR4/NF- κ B, miRNA, M1 $\rightarrow$ M2 makrofaj dönüşümü	Fan vd. (2021)
AD-MSC + DFX	Hipoksi yanıtı / Anjiyogenez	HIF-1 α , VEGF, NGF, IL-4/5	Oses vd. (2017)
ADSC-eksozom (miR-130a)	Schwann hücre koruması	NRF2/HIF1 α /ACTA1 eksen	Chen, J., Li, G. vd. (2023)
TMSC-NRPC	Duyusal yanıt ve IENFD $\uparrow$	TRPV1, von Frey test performansı	Yum vd. (2024)

3.1.4. Diyabetik Nöropatide Yeni Yaklaşımlar: Kombinasyon Tedavileri

Diyabetik nöropati (DN) tedavisinde, diş pulpası kökenli kök hücrelerin (DPSC) tekrarlayan intramüsküler (IM) enjeksiyonlarla uygulanması, uzun vadede daha etkili bir terapötik seçenek olabileceğini düşündürmektedir. Tüm tedavi gruplarında, tümör nekroz faktörü (TNF- α) ve C-reaktif protein (CRP) düzeylerinde, kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir (Datta vd., 2017).

Kök hücre tabanlı tedaviler, nöroproteksiyon (sinir hücrelerini hasara karşı koruma ve fonksiyonlarını sürdürme), inflamasyon düzenlemesi, anjiyogenez ve sinir rejenerasyonu gibi çoklu mekanizmalar aracılığıyla diyabetik periferik nöropati (DPN) tedavisinde önemli bir potansiyele sahiptir. Bu terapötik etkilerin daha iyi anlaşılması ve tedavi protokollerinin optimize edilmesi için ileri düzey araştırmalara gereksinim duyulmaktadır (Akter vd., 2023).

3.2. Diyabetik Ayak ve Kök Hücre Tabanlı Tedavi Yaklaşımları

3.2.1. Diyabetik Ayak: Patofizyolojisi, Mevcut Tedavi Yaklaşımları ve Klinik Engeller

Diyabetik ayak hastalığı, kronik hipergliseminin periferik sinirlerde ve vasküler yapılarda yarattığı hasar sonucu gelişen, özellikle alt ekstremiteleri etkileyen ciddi bir diyabetik komplikasyondur. Sürekli yüksek kan şekeri seviyeleri sinir hasarına ve duysal kayba yol açarak yaralanmaların fark edilmemesine neden olur; bu da enfeksiyon ve ülser riskini arttırır. Tedavi edilmezse, amputasyonla sonuçlanabilecek ülserasyonlar gelişebilir (Wang, X. vd., 2022).

Yara bakımı üzerine yapılan araştırmalar ilerleme kaydetmiş olsa da, kök hücre tedavisi, rejeneratif özellikleri ve belirli doku gelişimini artırma kapasitesi nedeniyle potansiyel bir çözüm olarak değerlendirilmektedir. Bununla birlikte, diyabetik ayak ülserlerinin tedavisi, hâlâ çok modlu bir terapi stratejisi gerektirmektedir (Xu vd., 2023).

3.2.2. Diyabetik Ayakta Mezenkimal Kök Hücreler (MSC) ve Terapötik Potansiyeli

MSC'ler, parakrin sinyal yolları aracılığıyla VEGF, NGF, Akt ve bFGF gibi büyüme faktörlerinin salınımını artırarak epitel rejenerasyonunu desteklemekte, inflamasyonu baskılamakta ve kollajen birikimini artırarak yara iyileşmesini hızlandırmaktadır (Yu, X. vd., 2023; Cao vd., 2017). Kullanılan hücre tipi, kök hücre tedavisinin mekanizmasını belirleyici bir faktördür. Örneğin, MSC bazlı tedavi, diyabetik ayak ülserlerinin iyileşmesinde kan damarlarının oluşumunu teşvik ederek nöroiskemiye ve inflamasyonu azaltmakta, aynı zamanda kollajen birikimini artırarak doku onarımını desteklemektedir (Yu, Q. vd., 2022).

Epidermal kök hücreler hücre göçünü ve erken yara kapanma süreçlerini aktive eden Jag1 ifadesini artırmakta ve miR-21-5p gibi mikroRNA salınımı ile anjiyogenezin artmasında etkili olmaktadır. Böylece diyabetik yaraların iyileşmesinde anlamlı bir potansiyel sunmaktadır (Yang vd., 2016).

AD-MSC'ler, klinik ortamda diyabetik ayak tedavisinde immün yanıtı düzenleme, fibrozis uyarımı ve yeni damar oluşumu yoluyla katkı

sağlamaktadır (Liu vd., 2022). Diyabetik hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, AD-MSC'lerin endotelial hücreleri aktive ederek VEGF başta olmak üzere çeşitli anjiyojenik mediyatörlerle yara iyileşmesini hızlandırdığını göstermektedir (Tablo 6) (Tseng vd., 2024).

Tablo 6: Diyabetik Ayakta Kullanılan Kök Hücre Türleri ve Terapötik Etkileri

Kök Hücre Türü	Terapötik Etki	Ana Mekanizma	Kaynak
MSC	Anjiyogenez, Epitelizasyon	Parakrin salınım (VEGF, bFGF)	Yang vd., 2016
ADMSC	Fibroblast aktivasyonu, damar oluşumu	miR-204-3p / HIPK2, miR-16-5p	Liu vd., 2022
HUMSC	Kan akışını artırma, ülser onarımını teşvik etme, amputasyon oranlarını düşürme	SIRT1 ve Nrf2, miR-142	Qin vd., 2016
iPSC-türevli	Kas ve damar hücresi rejenerasyonu	miRNA, GF salınımı	Gorecka vd., 2020

3.2.3. Diyabetik Ayakta Kök Hücre Türevleri: Eksozomlar ve Biyomalzemelerle Kombinasyonlar

Kök hücrelerin yüksek proliferatif kapasite ve pluripotent yapıları, klinik uygulamalarda tümörjenik riskleri beraberinde getirebilirken; biyolojik olarak daha stabil olan eksozomlar, immünojenik ve genetik değişim riski taşımamaları sayesinde daha güvenli bir hücresiz terapötik alternatif sunmaktadır (Huang vd., 2021).

MSC'lerden türetilen eksozomlar, miRNA-21-5p, miR-204-3p gibi moleküller aracılığıyla AKT/MAPK ve VEGFR sinyal yollarını aktive ederek anjiyogenezi teşvik etmektedir. Eksozomlar, kök hücrelerin tümörjenik potansiyelini taşımadan benzer rejeneratif etkiler sunduğu için klinikte güvenli bir alternatif oluşturmaktadır (Huang, C. vd., 2021; Huang, H. vd., 2023).

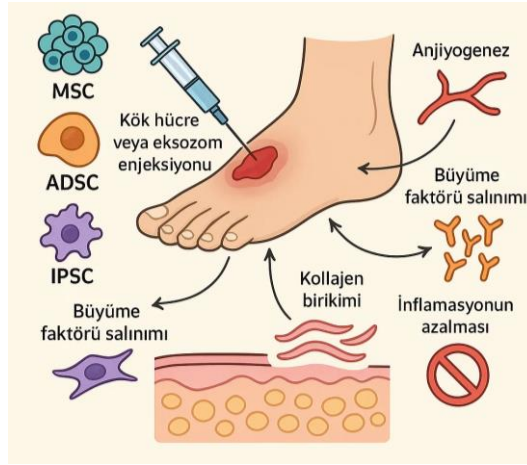
NFIC tarafından aktive edilen, AD-MSC türevi eksozomlar, yüksek glukoz ortamında miR-204-3p/HIPK2 sinyal yolunu hedef alarak, insan göbek bağı venöz endotelial hücrelerinde (HUVEC'lerde) anjiyojenik yanıt artırmakta ve böylece NFIC'in yara iyileşmesindeki destekleyici rolünü ortaya koymaktadır (Huang, H. vd., 2023).

Diyabetik ayak dokularında MSC'lerin hayatta kalımını artırmak amacıyla, oksijen salan mikropartiküllerle desteklenen hidrojel teknolojileri

geliştirilmiştir. Bu yenilikçi yaklaşım, MSC hayatta kalımını artırarak inflamatuvar sitokin düzeylerini azaltmakta, anjiyogenezisi indükleyerek yara iyileşmesini hızlandırmaktadır (Chen, L. vd., 2023).

Cerrahi olmayan rejeneratif yaklaşımlar arasında, kordon kanı kaynaklı kök hücreler ile hyaluronik asit bazlı jelin kombinasyonu, diyabetik ayak ülserlerinin tedavisinde umut vadeden sonuçlar ortaya koymuştur. Bu jel, hem Tip 1 hem de Tip 2 diyabetin hayvan modellerinde epitel rejenerasyonunu, kolajen depozisyonunu ve anjiyogenezi artırarak yara iyileşmesini destekleyen biyouyumlu bir mikroçevre sağlamaktadır (Chen, J., Liu, Y. vd., 2023).

Buna ek olarak, IRF1 ekzozomları ile yüklenmiş yağ dokusu kaynaklı kök hücre şeritlerinin, miR-16-5p/SP5 sinyal yolunu aktive etmek suretiyle fibroblast proliferasyonunu ve migrasyonunu tetiklediği; böylece diyabetik yara iyileşmesini anlamlı şekilde hızlandırdığı bildirilmiştir (Wu, M. vd., 2023). Diyabetik ayakta kök hücre temelli etki noktaları Şekil 3’de gösterilmiştir.



Şekil 3: Diyabetik Ayakta Kök Hücre Temelli Etki Noktaları. Şematik görselde yara bölgesine kök hücre veya ekzozom enjeksiyonu gösterilmekte; anjiyogenez, fibroblast aktivasyonu, büyüme faktörü salınımı, kollajen birikimi ve inflamasyonun azalması gibi etkiler vurgulanmaktadır. Farklı kök hücre tiplerinin (MSC, ADSC, iPSC) moleküler etkileri temsil edilmektedir.

3.2.4. Diyabetik Ayakta Yeni Yaklaşımlar: Genetik Düzenleme ve Kombinasyon Tedavileri

Diyabetik ayak hastalığı, vasküler bozulma ve hücresel hasarın birlikte ilerlediği kompleks bir komplikasyon olup, rejeneratif tıp yaklaşımları bu

patolojiyi hedef alarak hem dolaşım sistemini hem de doku onarım süreçlerini desteklemektedir. Özellikle göbek kordonu kaynaklı kök hücre enjeksiyonlarının anjiyoplasti ile kombine edilmesi, kan akışını artırmakta, ülser onarımını hızlandırmakta ve amputasyon oranlarını azaltarak hasta yaşam kalitesini belirgin şekilde iyileştirmektedir (Qin vd., 2016).

Bu kombine yaklaşımlara ek olarak, indüklenmiş pluripotent kök hücrelerden (iPSC) türetilen düz kas hücreleri, M2 makrofaj aktivasyonunu artırarak inflamasyonu baskılamakta; aynı zamanda hücre proliferasyonu, cilt yapısının restorasyonu, büyüme faktörü üretimi ve anjiyogenez gibi süreçlerde etkili olmaktadır (Gorecka vd., 2020). Bu veriler, rejeneratif tıbbın diyabetik komplikasyonların tedavisinde güçlü bir terapötik potansiyel sunduğunu göstermektedir.

Genetik düzenleme teknolojileri de diyabetik ayak tedavisinde yeni bir boyut kazandırmaktadır. Özellikle CRISPR/Cas9 aracılığıyla mezenkimal kök hücrelerde (MSC) MALAT1 gen ekspresyonunun düzenlenmesi, miR-142 yolunun kontrolü üzerinden SIRT1 ve Nrf2 gibi moleküler hedefleri aktive ederek doku onarımını desteklemektedir (Shi vd., 2024).

Bu gelişmeler ışığında, kök hücre bazlı tedavi yaklaşımları hem hücresel rejenerasyonu destekleyerek hem de vasküler yenilenmeyi teşvik ederek diyabetik ayak hastalığı gibi ilerleyici komplikasyonlara karşı gelecek vadeden, çok yönlü bir klinik çözüm sunmaktadır (Qin vd., 2016; Gorecka vd., 2020).

4. SONUÇ

Diyabet ve obezite, metabolik ve vasküler sistemleri çok yönlü biçimde etkileyen kronik hastalıklardır. Bu hastalıkların neden olduğu hücresel hasarın onarımı ve işlevsel restorasyonu açısından kök hücre temelli tedavi yaklaşımları, giderek daha fazla ilgi görmektedir. Özellikle mezenkimal kök hücreler (MSC'ler) ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPSC'ler), insülin üretiminin artırılması, inflamasyonun azaltılması, doku rejenerasyonunun hızlandırılması ve anjiyogenez gibi süreçlerde umut vadeden sonuçlar ortaya koymuştur.

Diyabetik bireylerde sık görülen alt ekstremitte yaraları, MSC'lerin epitelizasyonu ve parakrin sinyalizasyon yoluyla büyüme faktörleri salgılaması sayesinde daha hızlı iyileşmektedir. Bu bağlamda, eksozomlar, tümör riski

taşımayan güvenli bir alternatif olarak öne çıkmakta; biyomateryal destekli uygulamalar ise hücrelerin canlılığını ve terapötik etkinliğini artırmaktadır.

Diyabetik nöropati gibi komplikasyonlarda, kök hücreler sinir rejenerasyonunu kolaylaştırmakta, miyelin kalınlığını artırmakta ve nöronal inflamasyonu azaltarak sinir fonksiyonlarını iyileştirmektedir. Diş pulpası, kemik iliği ve plasenta gibi farklı kaynaklardan elde edilen kök hücreler ve bunlara ait eksozomlar, nöron güvenliğini sağlama ve yeni damar oluşumunu destekleme açısından translayonel potansiyele sahiptir.

Obezite ile ilişkili süreçlerde, kök hücrelerin metabolik dengeyi yeniden kurma, insülin duyarlılığını artırma ve inflamatuvar yanıtları modüle etme gibi mekanizmalar üzerinden etkili olabileceği gösterilmiştir. Bu süreçler, kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak tanımaktadır.

Genel olarak, kök hücre temelli tedaviler; hücresel ve moleküler düzeyde yenilenme, inflamasyon kontrolü ve fonksiyonel restorasyon açısından diyabet, obezite ve ilişkili komplikasyonların yönetiminde güçlü bir terapötik potansiyel sunmaktadır. Bununla birlikte, mevcut literatürde bu yaklaşımların uzun vadeli güvenlik, etkinlik ve translayonel uygulanabilirliklerine ilişkin veriler hala sınırlıdır. Bu durum, söz konusu stratejilerin klinik geçerliliğinin daha kapsamlı biçimde değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Gelecekteki çalışmalar, diyabet ve obezite gibi metabolik hastalıkları yöneten moleküler belirteçlerin daha hassas biçimde tanımlanmasını ve bu doğrultuda kişiselleştirilmiş kök hücre stratejilerinin geliştirilmesini gerektirmektedir.

KAYNAKÇA

- Aierken, A., Li, B., Liu, P., Cheng, X., Kou, Z., Tan, N., Zhang, M., Yu, S., Shen, Q., Du, X., Enkhbaatar, B. B., Zhang, J., Zhang, R., Wu, X., Wang, R., He, X., Li, N., Peng, S., Jia, W., ... Hua, J. (2022). Melatonin treatment improves human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy in a mouse model of type II diabetes mellitus via the PI3K/AKT signaling pathway. *Stem Cell Research and Therapy*, 13(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02832-0>
- Akhtar, A., Sah, S. P. (2020). Insulin signaling pathway and related molecules: Role in neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 135 (February), 104707. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104707>
- Akter, S., Choubey, M., Mohib, M. M., Arbee, S., Sagor, M. A. T., & Mohiuddin, M. S. (2023). Stem cell therapy in diabetic polyneuropathy: recent advancements and future directions. *Brain Sciences*, 13(2), 255.
- Alizadeh, S. D., Hassan Zadeh Tabatabaei, M. S., Rezaei Zadeh Rukerd, M., Tabrizi, R., Masoomi, R., Banihashemian, S. Z., Pourmasjedi, S. S., Ghodsi, Z., Pour-Rashidi, A., Harrop, J., Rahimi-Movaghar, V. (2025). The safety and efficacy of stem cell therapy for diabetic peripheral neuropathy in animal studies: A systematic review and meta-analysis. *Neuroscience*, 566(December 2024), 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2024.12.035>
- Bai, C., Ren, Q., Liu, H., Li, X., Guan, W., Gao, Y. (2021). miR-212/132-Enriched Extracellular Vesicles Promote Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells Into Pancreatic Beta Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9 (May), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.673231>
- Boháčová, P., Holář, V. (2018). Mesenchymal stem cells and type 1 diabetes treatment. *Vnitřní Lekarství*, 64(7–8), 725–728. <https://doi.org/10.36290/VNL.2018.099>
- Cao, Y., Gang, X., Sun, C., Wang, G. (2017). Mesenchymal Stem Cells Improve Healing of Diabetic Foot Ulcer. *Journal of Diabetes Research*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9328347> treatments. *The Lancet Neurology*, 11(6), 521-534.

- Callaghan, B. C., Cheng, H. T., Stables, C. L., Smith, A. L., & Feldman, E. L. (2014). Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. *The Lancet Neurology*, 11(6), 521-534.
- Chen, J., Li, G., Liu, X., Chen, K., Wang, Y., Qin, J., Yang, F. (2023). Delivery of miR-130a-3p Through Adipose-Derived Stem Cell-Secreted EVs Protects Against Diabetic Peripheral Neuropathy via DNMT1/NRF2/HIF1 α /ACTA1 Axis. *Molecular Neurobiology*, 60(7), 3678–3694. <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03297-9>
- Chen, J., Liu, Y., Zhang, J., Yang, Y., Liang, H., Li, T., Yan, L., Zhou, L., Shan, L., Wang, H. (2023). External Application of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells in Hyaluronic Acid Gel Repairs Foot Wounds of Types I and II Diabetic Rats Through Paracrine Action Mode. *Stem Cells Translational Medicine*, 12(10), 689–706. <https://doi.org/10.1093/stcltm/szad050>
- Chen, L., Zheng, B., Xu, Y., Sun, C., Wu, W., Xie, X., Zhu, Y., Cai, W., Lin, S., Luo, Y., Shi, C. (2023). Nano hydrogel-based oxygen-releasing stem cell transplantation system for treating diabetic foot. *Journal of Nanobiotechnology*, 21(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12951-023-01925-z>
- Cingolani, F., Balasubramaniam, A., & Srinivasan, S. (2024). Molecular mechanisms of enteric neuropathies in high-fat diet feeding and diabetes. *Neurogastroenterology & Motility*, e14897.
- Cohen, N., Marles, L. (2008). Type 2 diabetes. *Australian Doctor*, 20/JUNE, 29–36.
- Dadheech, N., James Shapiro, A. M. (2019). Human Induced Pluripotent Stem Cells in the Curative Treatment of Diabetes and Potential Impediments Ahead. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1144(December 2018), 25–35. https://doi.org/10.1007/5584_2018_305
- Daneshmandi, S., Karimi, M. H., Pourfathollah, A. A. (2017). TGF- β engineered mesenchymal stem cells (TGF- β /MSCs) for treatment of Type 1 diabetes (T1D) mice model. *International Immunopharmacology*, 44, 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.01.01>
- Datta, I., Bhadri, N., Shahani, P., Majumdar, D., Sowmithra, S., Razdan, R., Bhonde, R. (2017). Functional recovery upon human dental pulp stem

- cell transplantation in a diabetic neuropathy rat model. *Cytotherapy*, 19(10), 1208–1224. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.07.00>
- Deng, Z., Xu, H., Zhang, J., Yang, C., Jin, L., Liu, J., Song, H., Chen, G., Han, W., Si, Y. (2018). Infusion of adipose-derived mesenchymal stem cells inhibits skeletal muscle Mitsugumin 53 elevation and thereby alleviates insulin resistance in type 2 diabetic rats. *Molecular Medicine Reports*, 17(6), 8466–8474. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.890>
- Espes, D., Lau, J., Carlsson, P. O. (2017). Towards the clinical translation of stem cell therapy for type 1 diabetes. *European Journal of Endocrinology*, 177(4), R159–R168. <https://doi.org/10.1530/EJE-17-0080>
- Evangelista, A. F., Vannier-Santos, M. A., de Assis Silva, G. S., Silva, D. N., Juiz, P. J. L., Nonaka, C. K. V., dos Santos, R. R., Soares, M. B. P., Villarreal, C. F. (2018). Bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cells reverse the sensorial diabetic neuropathy via modulation of spinal neuroinflammatory cascades. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1224-3>.
- Fan, B., Li, C., Szalad, A., Wang, L., Pan, W., Zhang, R., ... & Liu, X. S. (2020). Mesenchymal stromal cell-derived exosomes ameliorate peripheral neuropathy in a mouse model of diabetes. *Diabetologia*, 63(2), 431–443. <https://doi.org/10.1007/s00125-019-05043-0>.
- Fox, I. J., Daley, G. Q., Goldman, S. A., Huard, J., Kamp, T. J., & Trucco, M. (2014). Use of differentiated pluripotent stem cells in replacement therapy for treating disease. *Science*, 345(6199), 1247391. doi: 10.1126/science.1247391. PMID: 25146295; PMCID: PMC4329726.
- Gao, S., Zhang, Y., Liang, K., Bi, R., & Du, Y. (2022). Mesenchymal stem cells (MSCs): a novel therapy for type 2 diabetes. *Stem Cells International*, 2022(1), 8637493. <https://doi.org/10.1155/2022/8637493>
- Garyu, J. W., Meffre, E., Cotsapas, C., Herold, K. C. (2016). Progress and challenges for treating Type 1 diabetes. *Journal of Autoimmunity*, 71, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2016.04.004>
- Gorecka, J., Gao, X., Fereydooni, A., Dash, B. C., Luo, J., Lee, S. R., Taniguchi, R., Hsia, H. C., Qyang, Y., Dardik, A. (2020). Induced pluripotent stem cell-derived smooth muscle cells increase angiogenesis

- and accelerate diabetic wound healing. *Regenerative Medicine*, 15(2), 1277–1293. <https://doi.org/10.2217/rme-2019-008>
- Gu, M., Mordwinkin, N. M., Kooreman, N. G., Lee, J., Wu, H., Hu, S., Churko, J. M., Diecke, S., Burrridge, P. W., He, C., Barron, F. E., Ong, S. G., Gold, J. D., Wu, J. C. (2015). Pravastatin reverses obesity-induced dysfunction of induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells via a nitric oxide-dependent mechanism. *European Heart Journal*, 36(13), 806–816. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu411>
- Haque, M., Das, J. K., Xiong, X., & Song, J. (2019). Targeting stem cell-derived tissue-associated regulatory T cells for type 1 diabetes immunotherapy. *Current diabetes reports*, 19(10), 89.
- He, D., Xu, Y., Xiong, X., Yin, C., Lei, S., Cheng, X. (2020). The bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) alleviate diabetic peripheral neuropathy induced by STZ via activating GSK-3 β / β -catenin signaling pathway. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 79(June), 103432. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103432>
- He, Q., Wang, L., Zhao, R., Yan, F., Sha, S., Cui, C., ... & Chen, L. (2020). Retracted article: Mesenchymal stem cell-derived exosomes exert ameliorative effects in type 2 diabetes by improving hepatic glucose and lipid metabolism via enhancing autophagy. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1), 223.
- Hotamisligil, G. S. (2000). Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte. *International Journal of Obesity*, 24, S23–S27. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801497>
- Hu, J., Fu, Z., Chen, Y., Tang, N., Wang, L., Wang, F., Sun, R., Yan, S. (2015). Effects of autologous adipose-derived stem cell infusion on type 2 diabetic rats. *Endocrine Journal*, 62(4), 339–352. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ14-0584>
- Huang, C., Luo, W., Wang, Q., Ye, Y., Fan, J., Lin, L., Shi, C., Wei, W., Chen, H., Wu, Y., Tang, Y. (2021). Human mesenchymal stem cells promote ischemic repairment and angiogenesis of diabetic foot through exosome miRNA-21-5p. *Stem Cell Research*, 52, 102235. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2021.102235>
- Huang, H., Zhu, W., Huang, Z., Zhao, D., Cao, L., Gao, X. (2023). Adipose-derived stem cell exosome NFIC improves diabetic foot ulcers by

- regulating miR-204-3p/HIPK2. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 18(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13018-023-04165-x>
- Jayasinghe, M., Prathiraja, O., Perera, P. B., Jena, R., Silva, M. S., Weerawarna, P. S. H., Singhal, M., Kayani, A. M. A., Karnakoti, S., Jain, S. (2022). The Role of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Type 1 Diabetes. *Cureus*, 14(7), 1–13. <https://doi.org/10.7759/cureus.27337>
- Katsarou, A., Gudbjörnsdottir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B. J., Jacobsen, L. M., Schatz, D. A., Lernmark, A. (2017). Type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 1–18. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.16>
- Khamis, T., Abdelalim, A. F., Saeed, A. A., Edress, N. M., Nafea, A., Ebian, H. F., Algendy, R., Hendawy, D. M., Arisha, A. H., Abdallah, S. H. (2021). Breast milk MSCs upregulated β -cells PDX1, Ngn3, and PCNA expression via remodeling ER stress /inflammatory /apoptotic signaling pathways in type 1 diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, 905(April), 174188. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.17418>
- Khan, W. S., & Pastides, P. S. (2013). What are stem cells? Tissue Engineering and the Musculoskeletal System: A Limitless Cure? Nova Biomedical, p 5–16, January 1, 2013, UK.
- Kim, B., Ronaldo, R., Kweon, B. N., Yoon, S., Park, Y., Baek, J. H., Lee, J. M., Hyun, C. K. (2024). Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Attenuate Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in Diet-Induced Obese Mice by Activating the FGF21-Adiponectin Axis. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(19). <https://doi.org/10.3390/ijms251910447>
- Kim, K. S., Choi, Y. K., Kim, M. J., Hwang, J. W., Min, K., Jung, S. Y., Kim, S. K., Choi, Y. S., Cho, Y. W. (2020). Umbilical cord-mesenchymal stem cell-conditioned medium improves insulin resistance in c2c12 cell. *Diabetes and Metabolism Journal*, 44(44), 260–269. <https://doi.org/10.4093/dmj.2019.0191>
- Lebovitz, H. E. (2001). Insulin resistance: definition and consequences. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 109(Suppl 2), S135–S148. <https://doi.org/10.1055/s-2001-18576>
- Lee, C. W., Hsiao, W. T., Lee, O. K. S. (2017). Mesenchymal stromal cell-based therapies reduce obesity and metabolic syndromes induced by a

- high-fat diet. *Translational Research*, 182(145), 61-74.e8. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.11.003>
- Li, B., Cheng, X., Aierken, A., Du, J., He, W., Zhang, M., Tan, N., Kou, Z., Peng, S., Jia, W., Tang, H., Hua, J. (2021). Melatonin Promotes the Therapeutic Effect of Mesenchymal Stem Cells on Type 2 Diabetes Mellitus by Regulating TGF- β Pathway. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(October). <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.722365>
- Li, H., Yang, H., Liu, J., Yang, H., Gao, X., Yang, X., Liu, Z., Qian, Q. (2024). Adipose stem cells-derived small extracellular vesicles transport Thrombospondin 1 cargo to promote insulin resistance in gestational diabetes mellitus. *Diabetology and Metabolic Syndrome*, 16(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13098-024-01276-1>
- Li, J., Tang, Y., Purkayastha, S., Yan, J., Cai, D. (2014). Control of obesity and glucose intolerance via building neural stem cells in the hypothalamus. *Molecular Metabolism*, 3(3), 313–324. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.01.012>
- Li, X., Liu, N., Gu, B., Hu, W., Li, Y., Guo, B., Zhang, D. (2018). BMAL1 regulates balance of osteogenic–osteoclastic function of bone marrow mesenchymal stem cells in type 2 diabetes mellitus through the NF- κ B pathway. *Molecular Biology Reports*, 45(6), 1691–1704. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4312-7>
- Liao, N., Zheng, Y., Xie, H., Zhao, B., Zeng, Y., Liu, X., Liu, J. (2017). Adipose tissue-derived stem cells ameliorate hyperglycemia, insulin resistance and liver fibrosis in the type 2 diabetic rats. *Stem Cell Research and Therapy*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0743-7>
- Liu, R., Dong, R., Chang, M., Liang, X., Wang, H. C. (2022). Adipose-Derived Stem Cells for the Treatment of Diabetic Wound: From Basic Study to Clinical Application. *Frontiers in Endocrinology*, 13(July), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.882469>
- Mahdipour, E., Salmasi, Z., Sabeti, N. (2019). Potential of stem cell-derived exosomes to regenerate β islets through Pdx-1 dependent mechanism in a rat model of type 1 diabetes. *Journal of Cellular Physiology*, 234(11), 20310–20321. <https://doi.org/10.1002/jcp.28631>

- Manganelli, G., Fico, A., & Filosa, S. (2011). Embryonic Stem Cells: from Blastocyst to in vitro Differentiation, Methodological Advances in the Culture, Manipulation and Utilization of Embryonic Stem Cells for Basic and Practical Applications, p3-24, Prof. Craig Atwood (Ed.), ISBN: 978-953-307-197-8, InTech.
- Mikłosz, A., Nikitiuk, B. E., & Chabowski, A. (2022). Using adipose-derived mesenchymal stem cells to fight the metabolic complications of obesity: Where do we stand? *Obesity Reviews*, 23(5), e13413.
- Mićanović, D., Stanisavljević, S., Li, H., Koprivica, I., Jonić, N., Stojanović, I., Savković, V., Saksida, T. (2024). Mesenchymal Stem Cells from Mouse Hair Follicles Inhibit the Development of Type 1 Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(11), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms25115974>
- Mimeault, M., & Batra, S. K. (2008). Recent progress on tissue-resident adult stem cell biology and their therapeutic implications. *Stem cell reviews*, 4(1), 27–49. <https://doi.org/10.1007/s12015-008-9008-2>
- Mohamed, M. M., Rashed, L. A., El-Boghdady, N. A., Said, M. M. (2023). Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Pioglitazone or Exendin-4 Synergistically Improve Insulin Resistance via Multiple Modulatory Mechanisms in High-Fat Diet/Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. *Reports of Biochemistry and Molecular Biology*, 12(1), 42–58.
- Nyamandi, V. Z., Johnsen, V. L., Hughey, C. C., Hittel, D. S., Khan, A., Newell, C., Shearer, J. (2014). Enhanced stem cell engraftment and modulation of hepatic reactive oxygen species production in diet-induced obesity. *Obesity*, 22(3), 721–729. <https://doi.org/10.1002/oby.20580>
- Oses, C., Olivares, B., Ezquer, M., Acosta, C., Bosch, P., Donoso, M., Léniz, P., Ezquer, F. (2017). Preconditioning of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with deferoxamine increases the production of pro-angiogenic, neuroprotective and anti-inflammatory factors: Potential application in the treatment of diabetic neuropathy. *PLoS ONE*, 12(5), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178011>
- Ogieuhi, I. J., Agbo, C. E., Ajekiigbe, V. O., Anthony, C. S., Onyehalu, J. C., Nwankwo, C. K., ... & Bakare, I. S. (2025). Stem cell-derived pancreatic

- beta cells: a step closer to functional diabetes treatment? *BMC Endocrine Disorders*, 25(1), 1-20.
- Pan, S., Hada, S. S., Liu, Y., Hu, C., Zhou, M., Zheng, S., Xu, M., Shi, C., Yin, S., Xie, X. (2022). Human Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Diabetic Neuropathy via Wnt Signaling Pathway. *Stem Cells International*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/6897056>
- Pagnotti, G. M., Styner, M., Uzer, G., Patel, V. S., Wright, L. E., Ness, K. K., ... & Rubin, C. T. (2019). Combating osteoporosis and obesity with exercise: leveraging cell mechanosensitivity. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(6), 339-355.
- Pérez, L. M., Bernal, A., San Martín, N., Lorenzo, M., Fernández-Veledo, S., Gálvez, B. G. (2013). Metabolic rescue of obese adipose-derived stem cells by lin28/let7 pathway. *Diabetes*, 62(7), 2368–2379. <https://doi.org/10.2337/db12-1220>
- Prowse, A. B., Chong, F., Gray, P. P., & Munro, T. P. (2011). Stem cell integrins: implications for ex-vivo culture and cellular therapies. *Stem cell research*, 6(1), 1-12.
- Pop-Busui, R., Boulton, A. J. M., Feldman, E. L., Bril, V., Freeman, R., Malik, R. A., Sosenko, J. M., Ziegler, D. (2017). Diabetic neuropathy: A position statement by the American diabetes association. *Diabetes Care*, 40(1), 136–154. <https://doi.org/10.2337/dc16-2042>
- Pop-Busui, R., Ang, L., Boulton, A. J., Feldman, E. L., Marcus, R. L., Mizokami-Stout, K., ... & Ziegler, D. (2022). Diagnosis and treatment of painful diabetic peripheral neuropathy.
- Qin, H. L., Zhu, X. H., Zhang, B., Zhou, L., Wang, W. Y. (2016). Clinical Evaluation of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Transplantation After Angioplasty for Diabetic Foot*. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 124(8), 497–503. <https://doi.org/10.1055/s-0042-103684>
- Reaven, G. M. (1997). Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. 1988. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 13(1), 1595–1607. <https://doi.org/10.2337/diabetes.37.12.1595>
- Saleh, F., Itani, L., Calugi, S., Grave, R. D., El Ghoch, M. (2018). Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Obesity: A Systematic Review of Longitudinal Studies on Preclinical Evidence.

- Current Stem Cell Research Therapy*, 13(6), 466–475.
<https://doi.org/10.2174/1574888x13666180515160008>
- Saleh, F. A., Jaber, H., Eid, A. (2021). Effect of Adipose derived mesenchymal stem cells on multiple Organ Injuries in diet-induced obese mice. *Tissue Barriers*, 9(4). <https://doi.org/10.1080/21688370.2021.1952150>
- Shakti, Sagar., Md., Imam, Faizan., Nisha, Chaudhary., Atish, Gheware., Khushboo, Sharma., Iqbal, Azmi., Vijay, Pal, Singh., Gaurav, Kharya., Ulaganathan, Mabalirajan., Anurag, Agrawal., Tanveer, Ahmad., Soumya, Sinha, R. (2021). Obesity impairs therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells by inhibiting cardioplipindependent mitophagy and intercellular mitochondrial transfer in mouse models of allergic airway inflammation. *Pharmacognosy Magazine*, 75(17), 399–405.
- Shi, H., Hao, X., Sun, Y., Zhang, H., Zhao, Y., Wang, B., Lu, J., Hou, W., Yan, Y., Yu, X., Xue, L., Luo, X., Wang, H. (2023). Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes reduce insulin resistance and obesity in mice via the PI3K/AKT signaling pathway. *FEBS Open Bio*, 13(6), 1015–1026. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13615>
- Shi, R., Chen, C., Zhao, S., Yuan, H., Zhao, J., Zhao, H. (2024). Stem cell therapy with CRISPR/Cas9-mediated MALAT1 delivery modulates miR-142 and rescues wound healing in rats with age-associated diabetic foot ulcers. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 118(November 2023), 105283. <https://doi.org/10.1016/j.archger.2023.105283>
- Shilleh, A. H., Russ, H. A. (2023). Cell Replacement Therapy for Type 1 Diabetes Patients: Potential Mechanisms Leading to Stem-Cell-Derived Pancreatic β -Cell Loss upon Transplant. *Cells*, 12(5), 1–19. <https://doi.org/10.3390/cells1205069>
- Si, Y., Zhao, Y., Hao, J., Liu, J., Guo, Y., Mu, Y., Shen, J., Cheng, Y., Fu, X., Han, W. (2012). Infusion of mesenchymal stem cells ameliorates hyperglycemia in type 2 diabetic rats: Identification of a novel role in improving insulin sensitivity. *Diabetes*, 61(6), 1616–1625. <https://doi.org/10.2337/db11-1141>
- Singh, A., Raghav, A., Shiekh, P. A., Kumar, A. (2021). Transplantation of engineered exosomes derived from bone marrow mesenchymal stromal cells ameliorate diabetic peripheral neuropathy under electrical

- stimulation. *Bioactive Materials*, 6(8), 2231–2249. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.01.008>
- Singh, Y. (2023). Consequences of obesity and Cardiovascular risk. *International Journal of Social Sciences*, 12(1), 25–32. <https://doi.org/10.46852/2249-6637.01.2023.5>
- Smith, A. G., & Singleton, J. R. (2012). Diabetic neuropathy. Continuum: lifelong learning in neurology, 18(1), 60–84.
- Su, T., Xiao, Y., Xiao, Y., Guo, Q., Li, C., Huang, Y., Deng, Q., Wen, J., Zhou, F., Luo, X. H. (2019). Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomal MiR-29b-3p Regulates Aging-Associated Insulin Resistance. *ACS Nano*, 13(2), 2450–2462. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b09375>
- Sun, Y., Shi, H., Yin, S., Ji, C., Zhang, X., Zhang, B., Wu, P., Shi, Y., Mao, F., Yan, Y., Xu, W., Qian, H. (2018). Human mesenchymal stem cell derived exosomes alleviate type 2 diabetes mellitus by reversing peripheral insulin resistance and relieving β -cell destruction. *ACS Nano*, 12(8), 7613–7628. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b07643>
- Tan, H. L., Guan, X. H., Hu, M., Wu, J., Li, R. Z., Wang, L. F., Huang, H. Da, Yu, Z. P., Wang, X. Y., Xiao, Y. F., Deng, K. Y., Xin, H. B. (2021). Human amniotic mesenchymal stem cells-conditioned medium protects mice from high-fat diet-induced obesity. *Stem Cell Research and Therapy*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02437-z>
- Tesfaye, S., Chaturvedi, N., Eaton, S. E. M., Ward, J. D., Manes, C., Ionescu-Tirgoviste, C., Witte, D. R., Fuller, J. H. (2005). Vascular Risk Factors and Diabetic Neuropathy. *New England Journal of Medicine*, 352(4), 341–350. <https://doi.org/10.1056/nejmoa032782>
- Tseng, S.-L., Kang, L., Li, Z.-J., Wang, L.-Q., Li, Z.-M., Li, T.-H., Xiang, J.-Y., Huang, J.-Z., Yu, N.-Z., Long, X. (2024). Adipose-derived stem cells in diabetic foot care: Bridging clinical trials and practical application. *World Journal of Diabetes*, 15(6), 1162–1177. <https://doi.org/10.4239/wjd.v15.i6.1162>
- Toda, C., Santoro, A., Kim, J. D., & Diano, S. (2017). POMC neurons: from birth to death. *Annual Review of Physiology*, 79(1), 209–236.
- Wang, M., Song, L., Strange, C., Dong, X., Wang, H. (2018). Therapeutic Effects of Adipose Stem Cells from Diabetic Mice for the Treatment of

- Type 2 Diabetes. *Molecular Therapy*, 26(8), 1921–1930. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.06.013>
- Wang, W., Wu, R. D., Chen, P., Xu, X. J., Shi, X. Z., Huang, L. H., Shao, Z. L., Guo, W. (2020). Liraglutide combined with human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation inhibits beta-cell apoptosis via mediating the ASK1/JNK/BAX pathway in rats with type 2 diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 36(2), 1–10. <https://doi.org/10.1002/dmrr.3212>
- Wang, W., Zhang, Y., Yang, C., Wang, Y., Shen, J., Shi, M., Wang, B. (2019). Feature Article: Transplantation of neuregulin 4-overexpressing adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorates insulin resistance by attenuating hepatic steatosis. *Experimental Biology and Medicine*, 244(7), 565–578. <https://doi.org/10.1177/1535370219839643>
- Wang, Z., Li, H., Fang, J., Wang, X., Dai, S., Cao, W., Guo, Y., Li, Z., Zhu, H. (2022). Comparative Analysis of the Therapeutic Effects of Amniotic Membrane and Umbilical Cord Derived Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Stem Cell Reviews and Reports*, 18(3), 1193–1206. <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10320-w>
- Wang, Z., Xie, Z., Lu, Q., Chang, C., Zhou, Z. (2017). Beyond Genetics: What Causes Type 1 Diabetes. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 52(2), 273–286. <https://doi.org/10.1007/s12016-016-8592-1>
- Wang, X., Yuan, C. X., Xu, B., & Yu, Z. (2022). Diabetic foot ulcers: Classification, risk factors and management. *World journal of diabetes*, 13(12), 1049.
- Welsh, M., Gallicchio, V. S. (2022). Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells In The Treatment Of Obesity. *Journal of Stem Cell Research*, 3(1), 1. [https://doi.org/10.52793/jscr.2022.3\(1\)-29](https://doi.org/10.52793/jscr.2022.3(1)-29)
- Whitfield-Gabrieli, S., Nieto-Castanon, A. (2012). Page 1 of 50 1. *Brain Connectivity*, 2.3(859), 125–141.
- Wu, L. F., Wang, N. N., Liu, Y. S., Wei, X. (2009). Differentiation of wharton's jelly primitive stromal cells into insulin-producing cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering - Part A*, 15(10), 2865–2873. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0579>

- Wu, M., Tu, J., Huang, J., Wen, H., Zeng, Y., Lu, Y. (2023). Exosomal IRF1-loaded rat adipose-derived stem cell sheet contributes to wound healing in the diabetic foot ulcers. *Molecular Medicine*, 29(1). <https://doi.org/10.1186/s10020-023-00617-6>
- Xie, J., Rao, N., Zhai, Y., Li, J., Zhao, Y., Ge, L., Wang, Y. (2019). Therapeutic effects of stem cells from human exfoliated deciduous teeth on diabetic peripheral neuropathy. *Diabetology and Metabolic Syndrome*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13098-019-0433-y>
- Xie, Z., Hao, H., Tong, C., Cheng, Y., Liu, J., Pang, Y., Si, Y., Guo, Y., Zang, L., Mu, Y., Han, W. (2016). Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells elicit macrophages into an anti-inflammatory phenotype to alleviate insulin resistance in type 2 diabetic rats. *Stem Cells*, 34(3), 627–639. <https://doi.org/10.1002/stem.2238>
- Xiong, J., Hu, H., Guo, R., Wang, H., Jiang, H. (2021). Mesenchymal Stem Cell Exosomes as a New Strategy for the Treatment of Diabetes Complications. *Frontiers in Endocrinology*, 12(April), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.646233>
- Xu, M. Y., & Wong, A. H. (2018). GABAergic inhibitory neurons as therapeutic targets for cognitive impairment in schizophrenia. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(5), 733-753.
- Xu, J., Zuo, C. (2021). The Fate Status of Stem Cells in Diabetes and its Role in the Occurrence of Diabetic Complications. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8(November), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.745035>
- Xu, Z. H., Ma, M. H., Li, Y. Q., Li, L. L., & Liu, G. H. (2023). Progress and expectation of stem cell therapy for diabetic wound healing. *World Journal of Clinical Cases*, 11(3), 506.
- Xue, J., Cheng, Y., Hao, H., Gao, J., Yin, Y., Yu, S., Zou, J., Liu, J., Zhang, Q., Mu, Y. (2020). Low-Dose Decitabine Assists Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells in Protecting β Cells via the Modulation of the Macrophage Phenotype in Type 2 Diabetic Mice. *Stem Cells International*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/4689798>
- Xue, J., Gao, J., Gu, Y., Wang, A., Yu, S., Li, B., Yin, Y., Wang, J., Su, W., Zhang, H., Ren, W., Gu, W., Lv, Z., Mu, Y., Cheng, Y. (2022). Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells alleviate insulin

- resistance in diet-induced obese mice via an interaction with splenocytes. *Stem Cell Research and Therapy*, 13(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02791-6>
- Xv, J., Ming, Q., Wang, X., Zhang, W., Li, Z., Wang, S., Li, Y., Li, L. (2017). Mesenchymal stem cells moderate immune response of type 1 diabetes. *Cell and Tissue Research*, 368(2), 239–248. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2499-2>
- Yang, R. H., Qi, S. H., Shu, B., Ruan, S. Bin, Lin, Z. P., Lin, Y., Shen, R., Zhang, F. G., Chen, X. D., Xie, J. L. (2016). Epidermal stem cells (ESCs) accelerate diabetic wound healing via the Notch signalling pathway. *Bioscience Reports*, 36(4), 1–7. <https://doi.org/10.1042/BSR20160034>
- Yu, Q., Qiao, G. H., Wang, M., Yu, L., Sun, Y., Shi, H., Ma, T. L. (2022). Stem Cell-Based Therapy for Diabetic Foot Ulcers. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10(February), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.812262>
- Yu, S., Cheng, Y., Zhang, L., Yin, Y., Xue, J., Li, B., Gong, Z., Gao, J., Mu, Y. (2019). Treatment with adipose tissue-derived mesenchymal stem cells exerts anti-diabetic effects, improves long-term complications, and attenuates inflammation in type 2 diabetic rats. *Stem Cell Research and Therapy*, 10(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1474-8>
- Yu, X., Liu, P., Li, Z., Zhang, Z. (2023). Function and mechanism of mesenchymal stem cells in the healing of diabetic foot wounds. *Frontiers in Endocrinology*, 14(March), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1099310>
- Yum, Y., Park, S., Nam, Y. H., Yoon, J., Song, H., Kim, H. J., Lim, J., Jung, S. C. (2024). Therapeutic Effect of Schwann Cell-Like Cells Differentiated from Human Tonsil-Derived Mesenchymal Stem Cells on Diabetic Neuropathy in db/db Mice. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 21(5), 761–776. <https://doi.org/10.1007/s13770-024-00638-0>
- Zang, L., Hao, H., Liu, J., Li, Y., Han, W., & Mu, Y. (2017). Mesenchymal stem cell therapy in type 2 diabetes mellitus. *Diabetology and Metabolic Syndrome*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13098-017-0233-1>

- Zeinhom, A., Fadallah, S. A., & Mahmoud, M. (2024). Human mesenchymal stem/stromal cell based-therapy in diabetes mellitus: experimental and clinical perspectives. *Stem Cell Research & Therapy*, 15(1), 384.
- Zhang, M., Yuan, Q., Wang, P., Zhang, F., Wu, D., Bai, H., Liu, J., Liu, H., Yuan, X. (2024). Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Nanovesicles Containing H8 Improve Hepatic Glucose and Lipid Metabolism and Exert Ameliorative Effects in Type 2 Diabetes. *International Journal of Nanomedicine*, 19(July), 6643–6658. <https://doi.org/10.2147/IJN.S455021>
- Zhou, B., Zhou, N., Jiang, J., Zhang, X., Zhao, X., Duan, Y., Zhang, Y. (2025). Exosomal miR-25 from Mesenchymal stem cells inhibits T cells migration and Alleviates Type 1 diabetes mellitus by Targeting CXCR3 models. *Gene*, 936(July 2024). <https://doi.org/10.1016/j.gene.2024.149098>
- Zipori, D. (2009). Biology of Stem Cells and the Molecular Basis of the Stem State. In *Biology of Stem Cells and the Molecular Basis of the Stem State*. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-130-1>

BÖLÜM 8

HÜCRE DIŞINA AÇILAN KAPI: EKSOZOMLARIN BİLEŞENLERİ, BİYOGENEZİ VE İŞLEVSEL ROLÜ

İlker BÜYÜK^{1*}, Aybüke OKAY², E. Sümer ARAS³

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.17114072>

¹ Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

² Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

³ Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

*Sorumlu Yazar: Prof. Dr. İlker BÜYÜK; buyuki@ankara.edu.tr

1. Giriş

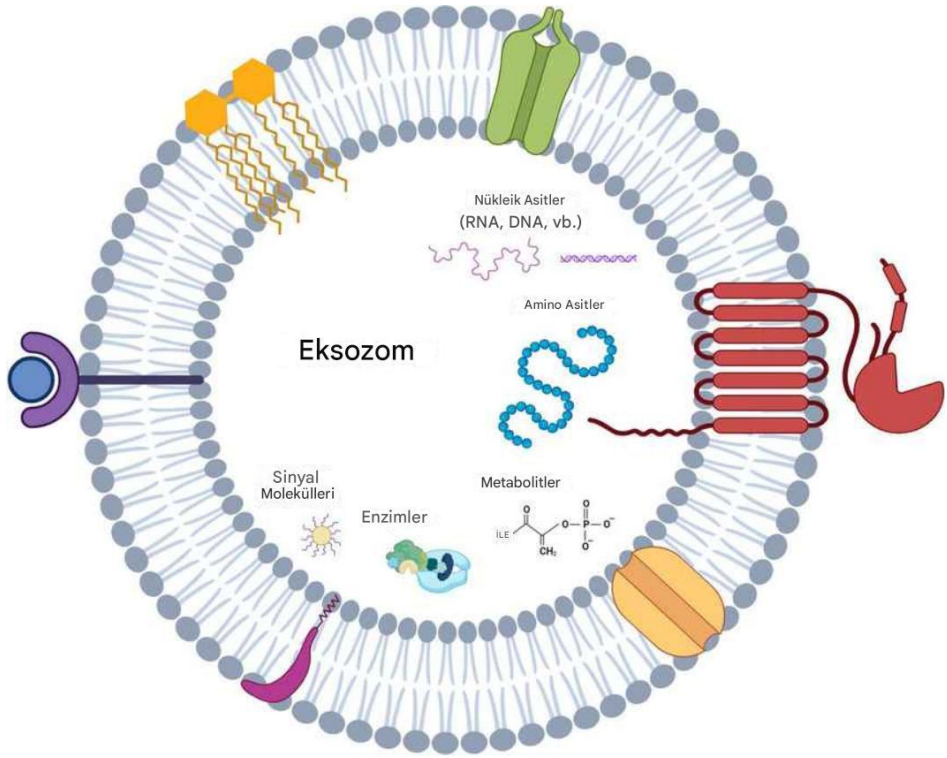
Trams ve arkadaşları 1981 yılında, vezikülle ilişkili ATPaz ve nükleotidaz üzerinde yaptıkları çalışmada eksozomları “fizyolojik bir işleve hizmet edebilecek” veziküller olarak tanımlamışlardır [1]. Bu çalışmalarıyla, vezikül salgılanmasını belirli bir hücre tipine özgü bir süreç yerine ‘hücre sel işlev’ olarak ele alan ilk araştırmacılar olmuşlardır. Ayrıca memeli hücrelerinin çapı yaklaşık 40 nm olan küçük veziküller ve çapı 500 nm’den büyük olan büyük veziküller olmak üzere iki farklı boyutta vezikül salgıladığını da rapor etmişlerdir [1]. Boyut farkı, diferansiyel santrifüjleme yöntemiyle iki farklı vezikül sınıfının ayrılmasını mümkün kılmıştır. Daha büyük veziküller nispeten düşük santrifüj kuvvetlerinde (örneğin, $10.000 \times g$ ’de 30 dakika), daha küçük veziküller ise daha yüksek santrifüj kuvvetlerinde (örneğin, $70.000-100.000 \times g$ ’de 90-120 dakika) çökelmektedir [2]. Araştırmacıların bu iki vezikül sınıfını basit bir teknikle ayırabilmesi, bunların ayrı yapılar olarak incelenmesine olanak sağlamış ve sonuç olarak daha büyük veziküller için "mikrovezikül", daha küçük olanlar için ise "eksozom" terimlerinin kullanılmasına yol açmıştır. Günümüzde hücre dışı veziküller (EV’ler) boyut ve kökene dayalı olarak (a) eksozomlar (boyut aralığı 30-200 nm), (b) mikroveziküller/ektozomlar (100-1000 nm) ve (c) apoptotik cisimler (50-5000 nm) olmak üzere üç grupta sınıflandırılmaktadırlar [3] (Tablo 1).

Tablo 1 Hücre kaynaklı çoklu veziküler cisimlerin (MVB’ler) sınıflandırılması

MVB’ler	Boyut (nm)	Yoğunluk (g/ml)	Orjin	Bileşim
Eksozomlar	30–200 nm	1.07–1.18	Çeşitli hücre tiplerinde endozomal yollar	RNA, proteinler, hücre sel atıklar
Mikroveziküller	100–1000 nm	Belirtilmemiş	Çeşitli hücre tiplerinden plazma zarları	RNA, proteinler, hücre sel atıklar
Apoptotik cisimler	50–5000 nm	1.24–1.28	Tüm hücre tiplerinin plazma zarı	RNA, proteinler, hücre sel atıklar

1.1. Eksozomların İşlevi ve Biyolojik Önemi

Zamanla eksozomların hücre kaynaklı proteinler, nükleik asitler, lipidler ve glikokonjugatların özgün bir alt kümesi açısından zengin olduğu, buna karşın daha büyük mikroveziküllerin bileşimi açısından hücreye daha çok benzediği anlaşılmıştır [4, 5]. Eksozomlar, nano ölçekli membranöz yapılar olarak genomik DNA, RNA, diğer kodlamayan RNA'lar ve proteinleri içeren kimyasal kargoları iletir (Şekil 1). Bu sayede komşu hücreler ve uzak organlarla etkili iletişim kurarlar. Bu benzersiz mesajlaşma yetenekleri, eksozomları terapötik platformlar olarak giderek daha cazip hale getirmiştir [6]. Birçok çalışma, eksozomların hücrelere sızdığını, kimyasal habercileri ilettiğini ve hücrelerdeki çeşitli fiziksel ve patolojik durumlar için konsolidasyon sürecine dahil olduğunu destekleyen hipotezleri ortaya koymaktadır [7]. Eksozomların nano ölçekli boyutları, onları hedeflenen dokulara, hücrelere ve organlara yük taşıyabilen ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesi için ideal bir aday haline getirmektedir. Eksozomlar, MVB'lerin plazma membranı ile birleşmesi ve hücre dışı mikro çevreye salınmasıyla üretilir [8]. Eksozomlar B hücreleri, dendritik hücreler, T hücreleri, mastositler ve trombositler gibi farklı hücre tiplerinde yaygındır ve ayrıca serum, idrar, anne sütü, beyin-omurilik sıvısı ve tükürük gibi çeşitli biyolojik sıvılarda da bulunurlar. Birçok çalışma, biyolojik sıvılardaki eksozomların çeşitli hastalıkların tahmininde biyobelirteç olarak kullanılabileceğini bildirmiştir. Her bir eksozomun moleküler bileşenleri, çeşitli hastalıkların indüklenmesi ve aynı zamanda iyileşmesi için önem ihtiva etmektedir [9].



Şekil 1 Eksozomun grafiksel gösterimi. Eksozomlar, lipid çift tabakasıyla çevrili hücre dışı veziküllerdir ve nükleik asitler, proteinler ve hücreler arası haberci görevi gören metabolitler gibi bir dizi molekül içerirler [10].

Son yıllarda hücre dışı veziküllerin (EV'ler) olağanüstü özellikleri nedeniyle bu alanda yapılan çalışmalar büyük bir artış göstermiştir. Farklı fizyolojik mekanizmalarda yer alabilen bu veziküller, potansiyel terapötikler olarak dikkat çekmektedir. Bu bağlamda bitkilerdeki hücre dışı veziküllerin varlığı giderek daha fazla önem kazanmıştır. Bitkilerde EV'lerin varlığının memeli hücre kaynaklı eksozomlara kıyasla avantajlarına dair çok sayıda çalışma yayınlanmıştır [11, 12]. Gıdalarda pEV'lerin (veya endozomal türevli veziküllerin) varlığı, FAO/INFOODS veri tabanlarına dahil edilmiş ve 'Gıda EV'leri' olarak adlandırılmıştır. Ancak gıda EV'leri hakkındaki bilgiler yalnızca süt, nişastalı kökler ve yumrular, kabuklu yemişler ve tohumlar ile meyveler gibi dört FAO grubuyla sınırlıdır [13]. Önceki çalışmalar, bitkilerden elde edilen hücre dışı veziküllerin enflamasyon [14-20] tümörler [21-26] ve bulaşıcı durumlar [27-30] dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara [31-35] terapötik

özellikler gösterdiğini öne sürmüştür. Örneğin, *Citrus limon* L. (EXO-CLs) eksozom benzeri nanoveziküller, çeşitli hastalıklara karşı potansiyel kullanım sunan anti-oksidan kapasite ve terapötik aktivite göstermektedir [36, 37]. Bunun gibi pek çok çalışma literatüre kazandırılarak bitki kaynaklı nanoveziküllerin farklı yapıdaki moleküllerin taşınmasındaki potansiyel rolü hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir [38-43]. Yenilebilir meyvelerden önemli sayıda nanopartikül saflaştırılabilir. Meyve kaynaklı nanoveziküller, kemoterapötik ilaçlar, DNA ekspresyon vektörleri, siRNA ve antikolar gibi çeşitli terapötik moleküllerin hem *in vitro* hem de *in vivo* iletiminde potansiyel taşımaktadır. Bu nanoveziküller, spesifik biyolojik etkilere ulaşmak için modifiye edilebilir bu da onların artan çeşitlilikte terapötik ajanlar sağlamak için ideal adaylar olduğunu göstermektedir [13]. Bu durum takviyeden dermokozmetiğe ve ilaç tedavisine kadar çeşitli terapötik uygulamalarda bitki türevli nanoveziküllerin kullanımını büyük bir avantaj haline getirir. Bu bağlamda bitki türevli nanoveziküller, daha fazla düzenlenerek belirli bir insan vücut bölgesine daha etkili bir şekilde yönlendirilebilir. Bitki kaynaklı nanoveziküllerin bir diğer önemli avantajı, insan hücresi kaynaklı eksozomlar için gerekli olan büyük ölçekli hücre fabrikalarına gerek duymadan, doğrudan ve sürekli olarak taze meyve ve sebzelerden elde edilebilmeleridir. Bu durum, üretim maliyetlerini önemli ölçüde düşürebilir. Bu nedenle, bitki türevli nanoveziküllerin karakterizasyonu ve insan sağlığını iyileştirme amaçlı kullanımı üzerine mevcut literatürde giderek artan sayıda çalışma bulunmaktadır [37].

1.2. Eksozom Teriminin İlk Dönemleri: Kavramsal Netleşme Süreci ve Ortaya Çıkan Hipotezler

Küçük salgılanan veziküllerin tanımları, ilk kez 1960'ların sonunda Bonucci [56] ve Anderson [57] tarafından, kondrositlerin (kıkırdak matriksini üreten hücreler) yaklaşık 100 nm büyüklüğünde küçük veziküller salgıladığını gözlemlenmeleriyle ortaya çıkmıştır. Bu ilk çalışmalar, söz konusu veziküllerin hidroksiapatit kristal oluşumunu başlattığını ve doğrudan plazma membranından tomurcuklandığını göstermiştir [57]. Aynı dönemde Wolf [58], trombositlerin de “trombosit tozu” olarak adlandırılan küçük hücre dışı veziküller (EV'ler) salgıladığını ve bu veziküllerin önemli pıhtılaşma aktivitelerine sahip olduğunu rapor etmiştir. Zamanla, bu dönüm noktası

niteliğindeki bulgular doğrulanmış ve genişletilmiştir. 1980'lerde eksozomlar üzerine yeni araştırma alanları açılmıştır. Bu dönemde Trams ve arkadaşlarının ektoenzim çalışmaları ile seminal sıvıda prostat ve epididim kaynaklı eksozomların varlığı tespit edilmiştir [1]. 1980'lerin başında yapılan diğer araştırmalar, eksozom biyogenezinin, plazma membranındaki proteinlerin kalite kontrolünde bir mekanizma olarak işlediğini ortaya koymuştur. Bu işlev, olgunlaşan retikülositlerin plazma zarından transferrin reseptörlerini (TfR) elimine etme süreciyle gösterilmiştir. Bu süreç, TfR'nin plazma zarından seçici olarak endositoza alınmasını, endozom zarlarından lümene doğru tomurcuklanmasını ve MVB'lerin plazma zarıyla birleşmesini içermektedir [59, 60]. Ayrıca, döllenme sonrası zigot yüzeyinden doğrudan tomurcuklanan Juno proteini örneğinde olduğu gibi, eksozom aracılı protein kalite kontrolü de doğrudan plazma zarından tomurcuklanarak da gerçekleşebilir [61].

Bu araştırmalar, eksozom biyolojisi ile ilgili dört temel ilkenin ortaya çıkmasını sağlamış ve bu ilkeler daha sonraki birçok çalışma ile doğrulanmıştır:

1. Eksozomlar, hem plazma zarından [57, 61] hem de endozom zarından [59, 62] tomurcuklanarak üretilir.
2. Eksozomlar, sinyalleri ve makromolekülleri hedef hücrelere aktarabilir [63, 64].
3. Eksozom biyogenezi bir protein kalite kontrol mekanizmasıdır [59, 62].
4. Eksozom biyolojisi insan sağlığı ve hastalığında kritik roller oynar [65, 66].

2. Eksozomların Elde Edilme Yöntemleri

Eksozomların ve diğer EV'lerin klinik ortamdaki potansiyel faydaları ve kullanımları daha önce açıklanmış olsa da eksozomların klinik uygulamalara entegrasyonunda en büyük engellerden biri izolasyon yöntemlerinin standardizasyon eksikliğidir. Eksozomlar başlangıçta ultrasantrifüjasyon temelli yöntemlerle izole edilmiştir ve bu yöntem hâlâ altın standart olarak kabul edilse de ultrasantrifüjasyonun zorluklarını aşmak amacıyla alternatif yöntemler geliştirilmiştir [67, 68]. Bu alternatif yöntemler; boyuta göre ayırma, immünoafiniteyle yakalama ve çöktürme gibi tekniklere dayansa da eksozomları tam olarak ayıramaz. Genellikle EV'ler ile hücre dışı boşluktaki diğer maddelerin karışık bir bileşimini elde etmeye neden olurlar [11, 69].

Bunun nedeni, eksozomların alındığı biyolojik sıvıların çok karmaşık olması, eksozomların diğer hücre dışı veziküllerle benzer fiziksel ve kimyasal özellikler taşıması ve ayrıca eksozomların kendi içinde de çok çeşitli yapıda olmasıdır [70, 71]. Bu sebeple hücre dışı matristeki farklı EV türlerini ayırt edebilen, hızlı, verimli, tekrarlanabilir ve klinik olarak uygun bir şekilde izolasyon yapabilen tekniklerin geliştirilmesi hala büyük bir zorluk teşkil etmektedir [72]. Ayrıca belirli bir izolatın eksozomal içeriğini daha da zenginleştirmek amacıyla birden fazla izolasyon yönteminin ardışık olarak kullanılması da söz konusu olmuştur. Ancak bu durum maliyetin ve işlem süresinin artışına neden olmaktadır ve klinik açıdan uygulanabilir gözükmemektedir [73]. Tablo 2'de eksozom izolasyonunda kullanılan bazı yöntemlere ilişkin önemli bilgiler yer almaktadır.

Tablo 2 Eksozomal izolasyon tekniklerinin geri kazanım, saflık, gereken örnek hacmi ve izolasyon için gereken zamana göre karşılaştırılması.

İzolasyon tekniği	Geri Kazanım	Saflık	Örnek Hacmi	Gerekli Süre
Ultra santrifüjleme	5–25%	Düşük	100 ml'ler	8 sa
Yoğunluk Gradyanı	UC'den daha yüksek	UC'ye benzer	1 mL'ye kadar	20 sa
Precipitation Kiti	N/A	Düşük	>100 µL	Bir gecelik
ExoChip	N/A	N/A	<400 µL	<2 sa
Immunoprecipitation	>99% bead geri kazanımı	UC'den daha yüksek	1 mL'ye kadar	Bir gecelik
ExoSearch Chip	42–97%	UC'den daha yüksek	20 µL	40 dk
Acoustic Nanofilter	>80%	Yüksek	50 µL	<30 dk

İzole edilen EV'lerin miktarı genellikle protein konsantrasyonu ölçülerek tahmin edilmektedir. Ancak bu yöntem, izolasyon sırasında oluşabilecek kontaminasyonlar nedeniyle gerçek miktardan daha yüksek sonuçlar verebilir. Ayrıca, farklı EV alt tiplerinin birbirinden farklı protein içeriklerine sahip olması, bu yöntemin doğruluğunu azaltan bir diğer etkidir [69]. Bu nedenle, EV'lerin kullanımı arttıkça ve daha fazla ilgi çekmeye

başladıkça daha sofistike yöntemlerle incelenmişlerdir. Günümüzde, izole edilen veziküller üzerinde genellikle fiziksel analizler ve kimyasal/biyokimyasal/bileşimsel analizler olmak üzere iki tür analiz yapılmaktadır. Parçacık boyutu ve/veya konsantrasyonu hakkında bilgi veren fiziksel analizler, nanoparçacık izleme analizi (NTA), dinamik ışık saçılımı (DLS), elektron mikroskopu ve ayarlanabilir dirençli darbe algılama (tRPS) gibi farklı yöntemlerle yapılır. Kimyasal/biyokimyasal/bileşimsel analizler ise tipik olarak boyama, immünoablottama veya proteomik analizlerle gerçekleştirilir ve izole edilen veziküllerin içeriği hakkında bilgi sağlar. Bu alandaki en büyük zorluk, farklı EV türlerini ayırt edebilen, kolayca standartlaştırılabilen ve tekrarlanabilir metodolojilerin geliştirilmesidir. Bunu zorlaştıran en önemli faktör ise, aynı hücre hattından eksozomları izole etmek için farklı yöntemler kullanıldığında eksozomların proteomik profillerinin değişmesidir [11]. Bu bölüm, eksozom analizi için kullanılan mevcut yöntemlere genel bir bakış sunmaktadır.

2.1. Fiziksel Analiz

2.1.1. Nanopartikül İzleme Analizi (NTA)

Nanopartikül izleme analizi (NTA), hem partikül boyutunu hem de konsantrasyonunu belirlemeye olanak tanır. Partiküllerin boyutu, difüzyon katsayısının, oda içindeki partiküllerin Brown hareketine dayandığı Stokes-Einstein denklemi kullanılarak tahmin edilir. Lazer ışığı, oda içindeki partiküllerle (Brown hareketi altında) etkileşime girdikçe saçılır ve saçılan ışık, üzerine bir kamera yerleştirilmiş mikroskop tarafından toplanır [74]. Mikroskopun üzerindeki kamera, partiküllerin hareketini bir videoya kaydeder ve ardından NTA yazılımı, videodaki partiküllerin hareketini kullanarak boyut ve konsantrasyon tahminleri yapar. NTA, partiküllerin boyutunu belirleyebilir [75]. Ancak, NTA ile ilgili zorluk, yaklaşık 0,5 mL'lik örnek hacimleri ve veri toplama ile analiz parametrelerinin optimizasyonunu gerektirmesidir [76, 77]

2.1.2. Dinamik Işık Saçılımı (DLS)

NTA gibi dinamik ışık saçılması (DLS) da partikül boyutunu ve konsantrasyonunu tahmin etmek için partiküllerin Brown hareketinden kaynaklanan 'saçılan ışığı' kullanır. Ancak DLS saçılan ışığın yoğunluğundaki dalgalanmaları kullanarak partikülün boyutunu tahmin eder, oysa NTA,

partikülün difüzyon katsayısını belirlemek için saçılan ışığı kullanır [78]. NTA'nın aksine, DLS çok daha küçük bir örnek hacmi (70 μ L) gerektirir ve optimizasyon için daha az parametreye ihtiyaç duyar, bu da kullanımını kolaylaştırır [77]. DLS'nin NTA'ya göre avantajları olsa da, en büyük dezavantajı heterojen karışımların analizidir. Özellikle, saçılan ışığın yoğunluğu partikül çapının altıncı kuvvetiyle orantılıdır, bu da daha küçük partiküllerden kaynaklanan saçılan ışığın tespit edilmesini zorlaştırır. Bu nedenle, süspansiyonda farklı boyutlarda partiküller bulunduğunda, genellikle daha büyük partiküllere yönelik çarpık veriler elde edilir. Bu durum, heterojen partikül popülasyonlarının farklılaştırılması için NTA'nın daha uygun olmasını sağlar [77].

2.1.3. Elektron Mikroskobu

Eksozom boyutunun belirlenmesinde kullanılan her teknik, kendine özgü ölçüm önyargılarına ve tahmin yöntemlerine sahiptir [79-81]. Örneğin, hidrodinamik boyutu ölçen yöntemler (nanoparçacık izleme analizi veya dirençli puls algılama gibi), eksozom membranından uzanan proteinler, glikanlar ve eksozom yüzeyine gevşek bağlı molekülleri de ölçüme dahil eder. Buna karşılık, transmisyon elektron mikroskobu (TEM) yalnızca membran çapını ölçer ve bu uzantılara duyarlıdır. Ancak TEM ölçümleri, numunenin sabitlenmesi, kurutulması, gömülmesi ve görüntülenmesi sırasında meydana gelen büzülme, şişme veya düzleşme gibi faktörlerden etkilenebilir. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ve kriyo-elektron mikroskobu (Cryo-EM) gibi yöntemler bu etkilerin bazılarını azaltabilir; ancak bu teknolojiler düşük verimlidir, erişimi zordur ve sınırlı bilgi sağlayabilir. Öte yandan, geleneksel ışık mikroskobu, eksozomların ışığın dalga boyundan 5 ila 10 kat daha küçük olması nedeniyle bu yapıları tespit edemez. Geleneksel floresan mikroskopi ile, eksozomların çift tabaka yapısı, proteinleri, nükleik asitleri veya karbonhidratları, özgü floresan problemlerle etiketlenmesi durumunda tespit edilebilir [82]. Süper çözünürlüklü mikroskopi, eksozomların boyutunu ve alt eksozomal kargo dağılımını belirleme imkânı sunar [83]. Tek parçacıklı interferometrik yansıma (SPIR) görüntüleme, 30 ila 200 nm boyutundaki bireysel eksozomları görselleştirebilir. Bu yöntem, geleneksel floresan mikroskobisi ile birleştğinde, lipidler, proteinler, nükleik asitler ve karbonhidratlar gibi maddelerin varlığını ve miktarını tespit edebilir [84].

Ayrıca, akış sitometrisi gibi yöntemler de eksozomların incelenmesinde kullanılmaktadır. Ancak eksozomlar ışığın dalga boyutundan çok daha küçük oldukları ve büyük oranda sudan oluştukları için akış teknikleriyle tespit edilip edilemeyecekleri hala belirsizdir [85]. Bu sorunu aşmak için floresan tetikleme yöntemleri kullanılabilir. Ancak, bu yöntemler her eksozom için yaklaşık 50 veya daha fazla florofor gerektirmesi nedeniyle sınırlı kalır [86]. Eksozom ölçümlerindeki doğruluğun sağlanması zorlu bir hedef olmaya devam etse de tarafsız kriyo-elektron mikroskobu çalışmaları, insan biyoakışkanlarında dolaşan eksozomlar ve diğer ekstraselüler veziküller (EV'ler) hakkında önemli bilgiler sunmuştur. Bu yapıların büyük çoğunluğu basit, küresel bir morfoloji sergilemekte olup, yaklaşık yarısı 30 ila 200 nm çapındaki eksozomlar iken, geri kalanı daha büyük mikroveziküllerdir [80]. Bunun yanında, çoklu membranlı yapılar, tübüler morfolojiye sahip veziküller ve daha sıra dışı şekillere sahip nadir membranöz yapılar da gözlenmiştir. Bu yapıların biyolojik süreçlerle oluşması mümkün olsa da fiziksel kuvvetlerin neden olduğu parçalanma ve yeniden şekillenme süreçlerinin, biyoakışkanlar veya doku kültürü süpernatantlarında tespit edilen EV'lerin bir kısmını oluşturduğu düşünülmektedir. Eksozom preparatlarında ayrıca lipoprotein partikülleri, ekzomerler (tek fosfolipid kabukla kaplı yoğun protein yapıları), RNA-protein kompleksleri ve protein agregatları gibi kirletici unsurlar da bulunabilir [87, 88].

Eksozomal veziküllerin morfolojisini değerlendirmek için kullanılan iki yaygın elektron mikroskobu türü, transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ve taramalı elektron mikroskobudur (SEM). Hem SEM hem de TEM, mikron altı boyutlardaki parçacıkların yüksek çözünürlüklü görüntülerini elde etmek için bir elektron demeti kullanır. İkisi arasındaki fark hangi elektronların tespit edildiğidir. Basitçe, SEM'de saçılan elektronlar tespit edilirken, TEM'de numunenin içinden geçen elektronlar tespit edilir [89]. Daha spesifik olarak, SEM'de elektronlar numunedeki parçacıklarla etkileşime girdiğinde saçılır. Saçılan elektronlar daha sonra yakalanarak algılanır ve bu, parçacıkların görüntüsünü oluşturur. TEM'de ise numuneden geçmeyen elektronlar, floresan ekran kullanılarak tespit edilir. Numunedeki partiküller, floresan ekran üzerinde karanlık alanlar veya gölgeler oluşturarak bir görüntü meydana getirir [89]. Eksozomlar söz konusu olduğunda hem TEM hem de SEM, partiküllerin benzer boyut dağılımını gösterse de biraz farklı morfolojiler sergiler. Yani, her

iki teknikte de eksozomal veziküllerin tipik olarak merkezlerinde bir çukur bulunur. Bu durum ise TEM ve SEM için gereken numune hazırlık sürecindeki kurutma işlemiyle ilgilidir [90].

2.1.4. İmmünodeteksiyon Yöntemleri

İmmün tespit yöntemleri, poliklonal veya monoklonal bir antikorun numunedeki antijenini tanımasına dayanan analiz yöntemleridir. Bu tür yöntemler biyomedikal araştırma laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaktadır ve genellikle marker proteinlerin varlığını veya yokluğunu gözlemleyerek ilgilenilen hedef proteinleri tespit eder ve izole edilmiş EV'lerin saflığını belirlemek için kullanılır.

2.1.5. Akış Sitometrisi

Akış sitometrisi, eksozomların görsel olarak incelenmesine olanak tanıdığı için genellikle fiziksel bir analiz yöntemi olarak değerlendirilir. Ancak, bu yöntemin çalışabilmesi için eksozomların protein bileşimi hakkında önceden bilgi gerekmesi, onu aynı zamanda bir bileşimsel analiz yöntemi hâline getirir. Gelişen teknoloji sayesinde artık 100–200 nanometre gibi küçük parçacıkları tespit edebilen cihazlar üretilmiştir. Ancak hâlâ çoğu cihazın tespit sınırı 300–500 nanometre civarındadır ki bu da, eksozomların (genellikle 30–200 nm boyutundadır) çok daha küçük olması nedeniyle sınırlayıcı bir durumdur [91]. Eksozomların yoğun olduğu örneklerde ya da izolasyon sırasında eksozomların birbirine yapışması (agregasyon) durumunda, tek tek partiküllerin ölçülmesi zorlaşır. Agregasyon, birden fazla eksozomun bir arada algılanmasına neden olur ve bu da analizde hatalara yol açar [92]. Bu sorunu aşmak için, eksozomların yüzeyi özel boncuklara sabitlenir (bu işleme “immobilizasyon” denir). Bu işlem immün yakalama ya da kovalent bağlama gibi yöntemlerle yapılabilir. Ardından, bu sabitlenmiş eksozomlar, yüzeylerindeki belirli proteinleri tanıyabilen ve floresanla işaretlenmiş antikorlarla işleme alınır. Boncuklara bağlanmış ve floresanla işaretlenmiş eksozomlar, önce bir epifloresan mikroskobu (EPI) ile görüntülenebilir. Sonrasında numune, akış sitometrisinin lazerinden geçirilir ve eğer antikorlar hedef proteinlere bağlandıysa floresan sinyal alınır [92]. Bu yöntem sayesinde, hem çok sayıda eksozom hızlı bir şekilde analiz edilebilir, hem de üzerlerinde bulunan antijenlere göre miktar ve tür belirlenmesi yapılabilir.

2.1.6. Western Blotlama

İmmünoiblotlama veya Western blotlamanın temel prensibi, bir antijenin (hedef proteinler) ve antijeni spesifik olarak tanıyan bir antikorun afinite bağlanmasını içermektedir. Akış sitometrisinin aksine, Western blotlama bozulmamış veziküllerin gözlemlenmesine izin vermez. Bunun yerine, veziküller parçalanır ve proteinler numune hazırlama sırasında denatüre edilip indirgenir. Denatürasyon işleminin ardından, proteinler SDS-PAGE yöntemiyle ayrılır ve bir nitroselüloz veya poliviniliden florür (PVDF) membranına aktarılır. Membran üzerinde kalan açık gözenekler, protein (yağsız süt) ve/veya deterjan ile doldurulur ve ardından hedef antijene karşı bir antikora maruz bırakılır. Antikor, ideal olarak membran yüzeyindeki antijeni spesifik olarak tanır. Membran, daha sonra bu antijeni tanımak için kullanılan birincil antikorun türlerine karşı ikinci bir antikora maruz bırakılır. İkincil antikor, floresan etiketi veya horseradish peroksidaz/alkalin fosfataz grubu sayesinde tespit edilir. Western blotlama metodolojisi, kullanım kolaylığı, geniş erişilebilirliği ve eksozomal yüzey proteinleri ile iç proteinleri tespit etme kabiliyeti nedeniyle eksozomların analizi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Ancak bu yöntemin en büyük zorluğu, kullanılan antikorun kalitesine bağlı olarak özgüllük ve tekrarlanabilirlik sınırlamalarıdır. Ayrıca çoğul olmayan analizler, minimum bilgi elde edebilmek için büyük miktarda eksozomal protein kullanılmasını gerektirir. Eksozomların toplanması ve izolasyonu genellikle düşük verimle zaman alıcı bir süreç olduğundan daha fazla analiz yöntemi kullanmak son derece faydalı olacaktır [93]

3. Eksozom Yapısı ve Eksozom Analitiği

Eksozomlar, hücrelerle aynı topolojiye sahip, yaklaşık 30 ila 200 nm çapında, tek zarla çevrili (çift katmanlı lipid bilayer içeren) membran vezikülleridir. Ancak eksozomların boyutları, tek bir hücre hattından salgılananlar arasında bile önemli ölçüde farklılık gösterebilir. Eksozomlar, yoğunluk gradyan santrifüjasyonu gibi izolasyon tekniklerinde genellikle 1.1–1.2 g/mL aralığındaki yoğunluk fraksiyonlarında tespit edilir. Bu yoğunluk değeri, eksozomların ayırt edici fiziksel özelliklerinden biri olarak kabul edilir [94]. Ancak vezikül yoğunluğu protein:lipid oranından etkilenir ve bu oran veziküller arasında önemli ölçüde farklılık gösterebilir. Tek bir eksozomal kargo protein ekspresyonunun, eksozom yoğunluğunu artırabileceği ayrıca

eksozomun boyut ve şeklinde belirgin değişikliklere yol açabileceği tespit edilmiştir [95]. Eksozom yoğunluğu, osteojenik eksozomların hidroksiapatit kristalizasyonu sonucu yoğunluklarının artması gibi eksozomal metabolik yolların etkisiyle de değişebilir; [82, 95]. Bu durumlar birlikte değerlendirildiğinde, eksozomların boyutu, şekli ve yoğunluğunun, spesifik protein, lipid, enzim ve mineral içerikleri tarafından belirlendiği ve bu özelliklerin oldukça değişken olduğu anlaşılmaktadır. Dolayısıyla, bu özellikler eksozomların kesin tanımlayıcı kriterleri değildir. Ayrıca eksozomların özellikleri, saflaştırılma yöntemlerine doğrudan bağlıdır. Eksozomlar ve mikroveziküller genellikle diferansiyel santrifüjleme yöntemiyle ayrıştırılır. Mikroveziküller, $1.000-2.000 \times g$ 'de 30 dakika santrifüjleme ile çökeltilir. Eksozomlar ise süpernatantın $10.000 \times g$ 'de santrifüjlenmesinden sonra, 90-120 dakika boyunca $70.000-100.000 \times g$ 'de santrifüjlenmesiyle elde edilir. Ancak bu işlemler sonucunda elde edilen eksozom peleti yalnızca eksozomları içermez. Eğer başlangıç materyali plazma gibi bir biyoakışkan ise pelet ayrıca şilomikronlar ve lipoprotein partikülleri içerebilir. $100,000 \times g$ ile elde edilen pelet ayrıca ekzomerler, büyük protein agregatları, ribonükleoprotein kompleksleri (örneğin Ago2-miRNA'lar) ve mekanik hasar sonucu oluşan küçük mikrozomlar içerebilir. Santrifüjleme işlemlerinin fiziki ve santrifüj tüplerinin geometrisi de fraksiyonlar arasında karışmalara neden olabilir; bazı eksozomlar mikrovezikül fraksiyonuna karışabilirken, bazı mikroveziküller eksozom fraksiyonunda yer alabilir. Bu nedenlerle, bazı araştırmalar yoğunluk gradyanlı santrifüjleme ile daha yüksek saflıkta eksozomlar elde etmeyi önerirken, diğerleri belirli eksozomal yüzey antijenlerine özgü antikorlarla immünoafinite saflaştırması yöntemini tercih etmektedir. Ancak bu yöntemler de önyargılar içerebilir; örneğin, yoğunluğu yüksek eksozomlar ilk yöntemde dışlanabilirken, hedef antijen taşımayan eksozomlar ikinci yöntemde göz ardı edilebilir. Bu durumlar, her bir eksozom saflaştırma yönteminin güçlü ve zayıf yönlerinin, deney sonuçları üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bu nedenle literatür incelenirken bu değişkenler göz önünde bulundurulmalı ve tartışmalar, güvenilirliği daha yüksek olan eksozomal proteinler, glikanlar ve lipitlerle sınırlı tutulmalıdır. Eksozomla ilişkili RNA ve DNA'ya geçildikçe bu güvenilirlik düzeyinin azaldığı unutulmamalıdır.

4. Eksozom Bileşenleri

4.1. Eksozom Proteinleri

Integral Eksozomal Membran Proteinleri

Eksozomlar; transmembran, lipide bağlı, periferik membran proteinleri ile lümen içi çözünür proteinleri içerir. Escola ve ark., tetraspanin ailesinden CD81, CD82, CD37 ve CD63'ün eksozomlarda yüksek oranda bulunduğunu, buna karşın plazma ve lizozomal membran proteinlerinin daha düşük düzeyde olduğunu göstermiştir [96]. Tetraspaninler, katalitik aktivite taşımaz ancak diğer membran proteinlerinin taşınması, işlevi ve stabilitesi üzerinde düzenleyici rol oynar. MHC sınıf II, IGSF8, ICAM-1, SDC1-4 ve integrinler gibi birçok protein, tetraspaninlerle birlikte bulunur. Bu proteinler, özellikle premetastatik niş oluşumu ve organotropik metastazda kritik rol oynar [97-100]. Eksozomlar ayrıca, HIV ve hepatit C gibi zarflı virüslerin zarf proteinlerini taşıyabilir. Endojen retrovirüs kökenli ENV proteinleri de eksozomlarda bulunabilir ve plasentasyonda görev alan syncytin-1/2 gibi bazıları fizyolojik fonksiyonlar kazanmıştır. ERV ENV ekspresyonu genellikle baskılanır ancak embriyonik gelişim, inflamasyon, viral enfeksiyon ve kanserde aktive olabilir. Bu proteinlerin, eksozomal füzyon ve tropizmi etkileyebileceği düşünülmektedir [101]. İnsan endojen retrovirüslerinin (HERV'ler) hiçbirisi tamamen işlevsel olmasa da insanlar yaklaşık 30.000 ERV kodlar. Bunların arasında sinyal dizisi, olgunlaşma bölgesi ve fuzojenik peptid motifine sahip retroviral ENV proteinlerini kodlayan en az 19 tanesi bulunur. Bu ENV proteinlerinden bazıları, plasentasyona aracılık eden, membran fuzojenik aktiviteye sahip olan ve eksozomlardaki hücrelerden salgılanan syncytin-1 ve syncytin-2 gibi fizyolojik rolleri yerine getirmek üzere evrimleşmiştir [102, 103]. ERV ENV gen ifadesi birçok dokuda baskılanır ancak genellikle gelişimin erken dönemlerinde, indüklenmiş pluripotent kök hücrelerde, viral enfeksiyonlar sırasında, enflamatuar bozukluklarda ve kanserde aktive olur. ERV ENV ifadesinin, eksozom tropizmini ve eksozom-hücre füzyonunu etkileyebileceği olasılığı artmaktadır [104, 105]. Eksozomlar ayrıca epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) [106], mast/kök hücre büyüme faktörü reseptörü (c-Kit) [107], vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü tip-2 [108], insülin benzeri büyüme faktörü I reseptörü [109], T hücre reseptörü [110], sitokin reseptörleri [111], G proteinine bağlı reseptörler (GPCR'ler) [112], Notch reseptörleri (örneğin, jagged-1, Dll4 vb. [113] gibi

birçok reseptör içerir. Bu ve diğer eksozomal sinyal molekülleri, eksozomların yüzeyinde sinyal iletiminde görev alabilen zar proteinleri taşıdığını ve bu sayede normalde bu özelliklere sahip olmayan hücrelere işlevsel reseptörler ve sinyal iletim yolları kazandırabileceğini göstermektedir.

Lipit Bağlantılı Dış Zar Proteinleri

Eksozomların yüzeyinde, lipitlere bağlı birçok protein bulunur. Bu proteinler arasında, glikozilfosfatidilinositol (GPI) adı verilen bir yapı aracılığıyla zarla bağlantı kuran bazı özel proteinler vardır. Örneğin: hücre dışında ATP ve ADP gibi molekülleri parçalayan enzimler CD39 ve CD73 [114], sperm reseptörü Juno [61], bağışıklık sisteminde savunmayı baskılayan CD55 ve CD59 proteinleri [115], Glikan-1 adlı bir protein [116] ve hem normal formda (PrP^C) hem de bozulmuş yapıda (PrP^{SC}) bulunabilen prion proteinleri bu gruba dahildir. Ayrıca, gelişimsel süreçlerde ve kanserde önemli rolleri olan Hedgehog adlı proteinler [117] de eksozom yüzeyinde bulunur. Bu proteinler, kolesterol yapıları sayesinde zarın dış kısmına tutunur.

Periferal Yüzey Proteinleri

Eksozomlar ayrıca periferal olarak ilişkili yüzey proteinleri de taşır ve bunların çoğu sinyalizasyonda da rol oynar. Ayrıca eksozomların büyüme faktörü β [118], tümör nekroz faktörü (TNF) [119], TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand [120] taşıdığı bulunmuştur, apoptoz sinyali (FAS) ligandı [121], sitokinler [122] ve çok çeşitli diğer yüzey sinyal molekülleri, eksozomların karmaşık otokrin ve parakrin sinyalleri iletebilen çok yönlü sinyal platformları olduğu görüşünü daha da güçlendirmektedir. Eksozom yüzeyi ayrıca fibronektin, tenascin C, ECM1 ve benzerleri gibi hücre dışı matris (ECM) proteinleri bakımından da zengindir ve bunlar da sinyalizasyon ve yapışmada önemli rollere sahiptir [123, 124]. Periferal olarak ilişkili bazı eksozomal proteinler, proteinin C1C2 alanları aracılığıyla eksozomların dış yaprakçığındaki fosfatidilserine (PS) bağlanan Mfge8/laktadherin gibi doğrudan eksozom lipidlerine bağlanır [125]

Lipitle Eşleşmiş İç Membran Proteinleri

Eksozom iç zarı, lipide bağlı proteinler bakımından zengindir. Bunlar arasında prenillenmiş küçük GTPazlar (Rabs, Ras, Rho, vb.), miristoillenmiş sinyal kinazları (örn. Src) ve palmitoillenmiş membran proteinleri bulunur

[126, 127]. Bu protein sınıfı içinde, viral olarak kodlanmış, asillenmiş Gag proteinleri, enfekte hücreler tarafından salınan eksozomların bileşiminde baskın hale gelebilir [82, 95]. HIV veya HTLV-1 gibi eksojen retrovirüslerle enfekte olan hücrelerde meydana gelenlere ek olarak, memeli hücreleri, HERV-K retroelement ailesinden 90'dan fazlası dahil olmak üzere endojen retroviral elementlerden asillenmiş Gag proteinlerini eksprese eder [128]. Ayrıca bazı Gag proteinleri fizyolojik işlevleri yerine getirmek üzere evrimleşmiştir. Bunlardan biri, öğrenme ve hafızada kritik roller oynayan Gag benzeri bir protein olan aktiviteyle düzenlenen hücre iskeleti (ARC) proteinidir. ARC ifadesi öğrenme ile aktive olur ve ARC proteinleri eksozomlar halinde hücreden salgılanır, komşu hücreler tarafından alınır ve kendi mesajcı RNA'larının (mRNA) hücreler arası trafiğine aracılık eder [129, 130].

İç Periferik Membran Proteinleri: Bir İskele Ağı

Eksozomların iç zarı, eksozomal membran proteinlerinin sitoplazmik uçlarını birbirine, diğer çapraz bağlayıcı proteinlere, ortak proteinlere ve lipitlere bağlayan proteinler açısından zengindir. Bu iskele faktörleri arasında ezrin-radixin-moesin (ERM) proteinleri yer alır ve bunlar, plazma membran proteinlerini hücre iskeleti proteinlerine ve diğer iskele proteinlerine bağlayarak sinyalle indüklenen fosforilasyona yanıt verir. Eksozomların ERM proteinleri ve EBP50, CD44, CD43, IGSF8, PTGFRN gibi ERM ligandları bakımından zengin olması beklenendir. Syntenin, eksozomal iskele faktörlerinden biridir ve çoklu protein bağlayıcı motifleri aracılığıyla eksozomal proteinleri kümelediği bilinmektedir [131, 132].

Protein Heterojenliği

Eksozomlar, hücreyle aynı yapısal topolojiye sahip küçük ve salgılanan veziküller olmalarının yanı sıra, belirgin bir şekilde heterojen bir yapıya sahiptir. Bu heterojenlik, eksozomların taşıma kapasitelerinin sınırlı olmasından kaynaklanır; çünkü yaklaşık 30 ila 200 nanometre çapındaki bu küçük veziküller, yalnızca sınırlı sayıda protein ve diğer taşıyıcı molekülleri içerebilir [2]. Sonuç olarak, hücreler hem hücre zarı (plazma membranı) hem de içindeki endozom zarlarından eksozom üretir. Bu da demektir ki oluşan her bir eksozomun içeriği, çevresindeki maddelerin yoğunluğuna bağlı olarak farklılık gösterebilir [133]. Eksozom heterojenliğinin bir başka mekanik itici gücü de diferansiyel gen ifadesidir. Örneğin, antijen sunan hücreler tarafından

salgılanan eksozomlar, yüksek düzeyde MHC sınıf II proteinleri ve ko-stimulatör proteinler içerirken, diğer hücre tiplerinden salınan eksozomlar bu proteinlerden yoksundur. Ayrıca çevresel faktörler (diyet, sirkadiyen ritimler, hormonlar, fiziksel aktivite, enfeksiyonlar, hücre döngüsündeki aşamalar) gibi değişiklikler, eksozom heterojenliğini yönlendirme potansiyeline sahiptir [94, 96]. Sitoplazma ve membranlar içindeki protein konsantrasyonu, difüzyon, protein komplekslerinin ayrışması ve diğer fiziko-kimyasal süreçlerin bir sonucu olarak stokastik bir şekilde değişir, bu da endozom ve plazma membranları boyunca protein konsantrasyonu farklılıklarının güçlenmesine yol açar. Eksozomlar arasındaki farklılıklar, sterik dışlama adı verilen fiziksel bir durumu yansıtabilir. Örneğin, çok büyük eksozomal kargolar (ERV Gag proteinleri, ARC, heparan sülfat proteoglikanlar gibi) yeni oluşan eksozomda fazla yer kapladıkları için başka proteinlerin eklenmesini engelleyebilir [134]. Eksozom biyogenezi sırasında sitoplazma ve membran parçalarının toplu şekilde kullanılması, her eksozomun içerik açısından diğerlerinden farklı olmasını neredeyse kesinleştirir. Ayrıca gen transkripsiyonundaki rastgele dalgalanmalar hücreler arasında önemli farklılıklara yol açarak eksozomların kargo yapısını etkileyebilir. Tüm bu faktörler bir araya geldiğinde, eksozomlardaki çeşitliliğin çözülmesi gereken bir sorun olmadığı; bunun endozom ve plazma membranları boyunca işleyen biyogenez mekanizmasının doğal ve kaçınılmaz bir sonucu olduğu anlaşılmaktadır [135].

4.2. Eksozomal Enzimler

Eksozomlar, hücre tarafından salgılanan, zarla çevrili ve metabolik olarak aktif yapılar olarak işlev görür. İçerdikleri RNA düzenleme enzimleri, lipazlar, proteazlar, glikoziltransferazlar, glikozidazlar ve diğer metabolik enzimler sayesinde, eksozom içeriğini değiştirme yetenekleri de bulunur [136]. Bu durum, eksozomların hücresel formlarından kimyasal olarak farklı makromoleküller üretmek için bir rezervuar işlevi görebileceğini gösterir. Kanser hücrelerinden kaynaklanan eksozomlar, mutant Ras proteinlerini, reseptörleri ve hyaluronan sentaz-3'ü eksozomal olarak paketlemeleri ve RNA interferans işleme faaliyetleri sayesinde daha geniş bir enzimatik repertuara sahiptir [126]. Eksozomların enerji metabolizmasının kilit enzimlerini içerdikleri de bildirilmiş olmakla birlikte son zamanlarda bunların veziküllerden ziyade ekzomerlerde zenginleştirilmiş olabileceği belirtilmiştir [126].

Eksozom glikokonjugatları ve lipidleri

Eksozomların en dış yüzeyi, yüzey proteinlerine ve bazı dış yaprak lipidlerine bağlı bir glikan örtüsünden oluşur. Bu örtü, lektin kaydırma ve benzeri yöntemlerle incelenmiştir. Araştırmalar, eksozomların α -2,6-sialik asit ve heparan sülfat gibi bileşenlerle zenginleştiğini göstermiştir. Ancak genel olarak, eksozom yüzeyindeki karbonhidrat yapılarının oldukça çeşitli ve heterojen olduğu tespit edilmiştir [137, 138]. Kanseri hücrelerinden kaynaklanan eksozomlar biraz farklıdır çünkü üzerlerindeki glikan yapıları, çeşitli glikozidaz ve glikozil transferaz enzimlerinin seviyelerine bağlı olarak değişiklik gösterir. Örneğin, bazı kanser türlerinde hyaluronan sentaz 3 enziminin yüksek düzeyde üretilmesi, kanserin büyümesini destekleyen ve eksozom oluşumunu etkileyen uzun hyaluronik asit polimerlerinin sentezlenmesine yol açar [139].

4.3. Eksozomal RNA'lar

Eksozomlar RNA içerir ve bu hücre dışı RNA'lar (exRNA'lar), işlevsel olarak diğer hücrelere ve dokulara aktarılabilir. Bu durum ilk olarak Ratajczak ve arkadaşları tarafından ortaya konmuştur. Kök hücrelerden gelen eksozomların içinde bulunan Oct-4 mRNA'sı gibi RNA'ların, diğer hücrelere taşınarak bu hücrelerde Oct-4 geninin ifadesinin artmasına neden olduğu bildirilmiştir [140].

Eksozomal RNA'lar ve eksozom aracılığıyla RNA transferi, Valadi ve arkadaşları tarafından mast hücreleri arasında mRNA transferi olarak tanımlanmıştır [141]. Skog ve arkadaşları ise glioblastoma hücrelerinden kaynaklanan RNA'ların eksozomlar yoluyla hücreler arasında taşındığını göstermiştir [142]. Ayrıca Pegtel ve arkadaşları eksozom aracılı miRNA transferinin işlevsel bir rolü olduğunu ortaya koyarak bu bulguları doğrulamış ve genişletmiştir (Skog et al. 2008). Bu dört çalışma birlikte değerlendirildiğinde, hücrelerde üretilen RNA'ların hücre dışı bir ortamda (aselüler ara maddede) serbest kalabileceği, daha sonra başka hücreler tarafından alınarak işlev görebileceği ortaya konmuş ve moleküler biyolojideki temel anlayışı genişletmiştir.

Eksozomlar tek başına büyük miktarlarda RNA molekülü taşıyor gibi görünse de içerdikleri RNA'lar, hücresel RNA'ların büyük ölçüde çarpık bir alt popülasyonunu temsil etmektedir. Eksozomal RNA araştırmaları, bu

organellerin özellikle küçük nükleer RNA'lar (snRNA'lar), miRNA'lar, transfer RNA'lar (tRNA'lar), Y RNA'lar, tonoz RNA'lar, tekrarlayan element RNA'lar ve 3' mRNA parçaları gibi küçük kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar) bakımından zengin olduğunu göstermektedir [143]. Genel olarak, eksozomal RNA'lar, hücredeki RNA profiline kıyasla belirli RNA türlerinde daha fazla bulunurken, mikroveziküllerdeki RNA profili hücredekinin daha çok aynıdır. Eksozomal RNA'larda, miRNA'ların 3'-uçlarında nükleotid eklenmeleri ve 5'-uçlarında oligopirimidin dizileri gibi özel değişiklikler görülür. Bu değişiklikler, henüz tam olarak anlaşılamamış eksozomal ayırma ve RNA kalite kontrol mekanizmalarıyla bağlantılı olabilir. Ayrıca eksozomal RNA analizinde DNA kontaminasyonu ve RNA'nın çıkarılması, çoğaltılması, adaptör eklenmesi, saflaştırılması ve dizilenmesi aşamalarında kullanılan tüm tekniklerin neden olduğu yanlışlıklara karşı özellikle dikkatli olunması gerektiği unutulmamalıdır [144].

4.4. Eksozomal DNA'lar

Eksozomlar, tek sarmallı DNA, çift sarmallı DNA, genomik DNA, mitokondriyal DNA ve hatta ters transkripsiyonla üretilmiş tamamlayıcı DNA'lar gibi çeşitli DNA türlerini içerebilir. Diğer eksozomal kargoların aksine, spesifik DNA'ların eksozomlara seçici olarak ayrılıp ayrılmadığı henüz kesinleşmemiştir [145, 146]. Bazı raporlar, eksozomlarla ilişkili DNA'nın dizilenmesinin, eksozomların bulunduğu hücrenin tam genom dizisini ortaya çıkarabileceğini göstermektedir. Eksozomal DNA'nın ne kadarının organel içinde bulunduğu ve ne kadarının yüzeye bağlı olduğu da netleşmemiştir. Eksozomal DNA'nın fizyolojik rolleri arasında, eksozom bazlı DNA salgısının DNA kalite kontrolüne katkıda bulunması belki de enflamasyonun düzenlenmesi ve kanser, viral enfeksiyon veya kemoterapötik direncin belirtici olabileceği öne sürülmektedir [147].

5. Eksozom Biyogenezi

Eksozomların Oluştugu Hücresel Yapılar

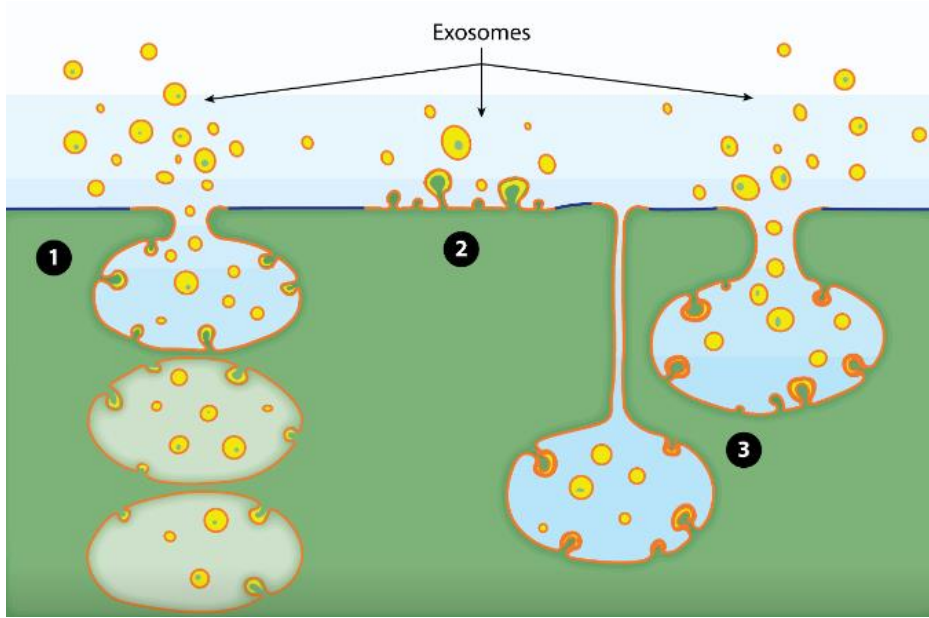
Eksozomlar, endozomal yol üzerinden vezikül tomurcuklanmasıyla oluşabilir ve ardından çok veziküllü cisimcikler (MVB'ler) aracılığıyla plazma membranı ile füzyona girerek dış ortama salınabilir (Şekil 2). Bu biyogenez modeli, ilk olarak olgunlaşmakta olan retikülositlerde transferrin reseptörlerinin (TfR) veziküler yolla uzaklaştırılması üzerine yapılan

çalışmalarla ortaya konmuş [59] ve sonraki araştırmalarda farklı biyolojik sistemlerde de desteklenmiştir [148]. Elektron mikroskobu bulguları bu modele güçlü destek sağlarken, Rab27 veya Ral içermeyen hücrelerde MVB birikimi ve eksozom salınımının azalması gibi genetik gözlemler de bu mekanizmanın işlevselliğini doğrulamaktadır [127, 149]. Ayrıca, MVB-plazma membranı füzyonunu tespit edebilmek amacıyla genetik olarak kodlanmış ve pH duyarlılığına sahip CD63-pHluorin füzyon proteinleri geliştirilmiştir [150]. Bu deneysel yaklaşım, Verweij ve arkadaşları tarafından sinaptozomal ilişkili protein-23 (SNAP23) ile syntaxin-4'ün MVB-plazma membranı füzyonundaki rollerini ve SNAP23'ün G protein bağlı reseptör (GPCR) sinyaliyle fosforilasyon yoluyla düzenlenmesini göstermek amacıyla kullanılmıştır [151]. Bununla birlikte, eksozom biyogenezinin yalnızca endozomal tomurcuklanma ile sınırlı olduğu fikri, tüm eksozomların bu yolla oluştuğu anlamına gelmemelidir. Güncel veriler, eksozom benzeri veziküllerin plazma membranından da tomurcuklanarak oluşabileceğini ortaya koymaktadır [150, 152, 153]. Dolayısıyla, yalnızca endozomal kaynaklı biyogenez modelinin iki temel varsayımı—(a) endozomlardan tomurcuklanan her vezikülün eksozom olduğu ve (b) tüm eksozom benzeri veziküllerin endozomal kaynaklı olduğu—bilimsel bir hipotezden çok döngüsel bir argüman niteliği taşımaktadır.

Plazma membranından eksozom tomurcuklanmasına ilişkin çok sayıda kanıt mevcuttur (Şekil 2). Atomik kuvvet mikroskobu analizleri, kök hücrelerin plazma membranı üzerinden tomurcuklanan 50–100 nm çapında eksozomların üretimini doğrudan göstermektedir [153]. Bu gözlemler, daha önceki elektron mikroskobu bulgularıyla da örtüşmektedir [154]. İnsan lökositlerinde, plazma membranından eksozom tomurcuklanmasına ait ara yapıların gözlemlendiği bildirilmiştir [82, 95]. Bu bulgular, eksozom biyogenezinin yalnızca endozomal kökenli olmadığına işaret etmektedir. Ayrıca, eksozomal protein ve lipid belirteçlerinin, bu hücrelerin plazma membranlarının belirli bölgelerinde yoğunlaştığını gösteren veriler, plazma membranı kaynaklı tomurcuklanmanın varlığını desteklemektedir [95, 154].

Plazma membranından eksozomal tomurcuklanma, glioblastoma eksozomları [155], Juno proteini [61], GPCR'ler [112] ve ARRDC1 proteini [152] gibi birçok örnekte gösterilmiştir. Bu süreç, yalnızca memeli hücrelerinde değil, *Caenorhabditis elegans* gibi farklı organizmalarda da gözlemlenmiştir [156]. Yakın zamanda yapılan araştırmalar, bazı hücrelerde plazma

membranına bağlı ancak hücre içinde yer alan özel bölmelerin bulunduğunu ortaya koymuştur. Bu yapılar, “hücre içi plazma membranı bölmeleri” (IPMC – Intracellular Plasma Membrane-Connected Compartments) olarak adlandırılmaktadır [157-159]. IPMC’ler, hücre dışı ortamla bağlantı kurarak bir süreklilik oluşturur. Bu bağlantı sayesinde, küçük moleküller bu bölmelerden geçebilir. Aynı zamanda bu yapılar, eksozom benzeri veziküllerin biriktiği alanlar olarak işlev görür ve bu veziküllerin kontrollü (pulsatil) şekilde salınmasını sağlar [159]. Ayrıca, IPMC’lerin retrovirüslerin hücre zarından tomurcuklandığı bölgelerle örtüştüğü gözlemlenmiştir. Bu durum, eksozom oluşumu (biyogenezi) ile bazı viral süreçler arasında yapısal ve işlevsel benzerlikler olduğunu düşündürmektedir [160, 161]. Bu bulgular birlikte ele alındığında, eksozom biyogenezinin yalnızca endozomal kaynaklı olduğu yönündeki hipoteze karşı güçlü bir karşıtlık oluşturmaktadır. Aksine, eksozomların hem endozomal hem de plazma membran kaynaklı mekanizmalarla üretildiği anlaşılmaktadır. Yakın tarihli bir çalışmada, CD63 ve CD9 proteinlerinin tomurcuklanma bölgeleri incelenerek, belirli hücre tiplerinde eksozom kargosunun esasen plazma membranı üzerinden yönlendirildiği ve eksozom kompozisyonunun biyogenez yolundan ziyade hücre içi protein taşıma yolları tarafından şekillendirildiği gösterilmiştir [133]. Bu kadar çok araştırmacının yalnızca endozomal biyogeneze dayanan görüşü benimsemiş olmasının nedeni sorgulanmalıdır. Bu eğilim, özellikle sağlam hücrelerin elektron mikroskobu ile incelenmesinde açıkça görülmektedir. Elektron mikroskobu, multiveziküler cisimcik (MVB) yapılarının net biçimde görüntülenebilmesi nedeniyle, çoğu zaman endozomal kökenli eksozom biyogenezini daha belirgin şekilde göstermektedir. Ancak bu durum, plazma membranı kaynaklı tomurcuklanma olaylarının gözden kaçmasına neden olabilmektedir. Zira, örnek hazırlığı sırasında plazma membranı üzerinde oluşan tomurcuklanma yapılarını tespit etmek daha zordur ve bu da gözlemsel bir yanıllığa yol açmaktadır. Bu gözlemsel önyargının giderilmesi için, hücredeki tüm endozomal ve plazma membranı bölgelerindeki tomurcuklanma ara yapılarına ilişkin nicel analizlerin yapılması gerekir. Bu da ancak üç boyutlu elektron mikroskobik tomografi ile mümkün olacaktır. Ayrıca, bazı araştırmacılar plazma membranı tomurcuklanmasını, doğrudan plazma membranından köken alan ve mikron boyutunda olan mikroveziküllerle karıştırmakta ve bu da mantıksal yanılgılara yol açabilmektedir [5].



Şekil 2 Eksozom oluşumunun üç yolu. 1. Multivesiküler cisimler, plazma membran füzyonu üzerine eksozomları serbest bırakır. 2. Plazma membranından tomurcuklanma yoluyla serbest bırakılan eksozomlar. 3. Hücre içi plazma membranına bağlı kompartmanlarda tomurcuklanma yoluyla gecikmeli salınım [162]

Eksozom Oluşumunun Fiziko-Kimyasal Yönleri

Eksozom biyogenezi temel olarak küçük, yaklaşık 30 ila 200 nm çapında veziküllerin plazma ve endozom membranlarından dışa doğru tomurcuklanması sürecidir (dışa doğru = sitoplazmadan uzaklaşan). Tüm membran vezikülasyon süreçlerinde olduğu gibi, lipidler, özellikle koni ve ters koni şekilleri oluşturanlar eksozom biyogenezinde kritik rol oynar. Bu bağlamda, eksozomların dış yaprakçıklarında PE ve PS bakımından zengin olmaları dikkat çeker [82, 95]. Dış yaprakçık PE'nin eksozom biyogenezindeki rolü, PE flippazdan yoksun mutantlarda eksozom tomurcuklanmasındaki artışla ilişkilendirilmiştir. PS de flippaz aracılı asimetriye tabidir ve dış yaprakçık PS, canlı hücrelerde plazma membranı eksozom tomurcuklanma bölgeleriyle örtüşen mikro alanlarda bulunur [149]. Bu gözlemler, PE ve PS'nin plazma membranındaki asimetriyi, hücre yüzeyinde eksozom biyogenezini baskılayan bir faktör olarak etkileyebileceği olasılığını gündeme getiriyor. Eksozom biyogenezini teşvik edebilecek diğer fosfolipidler arasında PLD2 tarafından üretilen ve bazı eksozomal kargoların tomurcuklanmasında rol oynayan koni

şekli lipid PA ve eksozomal fosfolipaz A2 enzimleri tarafından üretilen lizofosfolipidler yer alır. Ayrıca, seramid bolluğunun eksozom biyogenezindeki artışla pozitif korelasyon gösterdiği, seramidin üretimini engelleyen bir enzimin (nötr sfingomiyelinaz 2, nSMaz2) inhibisyonunun ise eksozom biyogenezini bozabildiği gözlemlenmiştir [163]. Bu verilerin en basit yorumu, seramidin membran vezikülasyonu için gerekli eğriliği sağladığı ve eksozom tomurcuklanmasını artırdığıdır. Ancak, seramidin artışının eksozom biyogenezi dışında otofaji, apoptoz, metabolizma ve sinyalizasyon gibi birçok süreç üzerinde dolaylı etkileri olabilir. Ayrıca seramid, birden fazla lipid metabolik yolunun kesişim noktasında yer alır; bu da seramidin artışının, eksozom biyogenezini etkileyebilecek diğer lipidlerin (örneğin, sfingomiyelin, diaçilgliserol gibi) bolluğunu etkileyebileceğini gösterir. Lipidlerin eksozom biyogenezi üzerindeki bir diğer etkisi de lipid raftları (detergent-resistant membranes) ile ilgilidir. Bu oluşumlar, özellikle GPI bağlantılı proteinlerin kümelenmesini, dağılımını ve işlevini yönlendirebilir [164]. Ancak, lipid raftları ile ilgili biyolojik membranlarda Protein taşınımı (protein trafficking) ve işlevinin düzenleyicileri olduğuna dair güçlü ve sağlam temelli karşı argümanlar da bulunmaktadır. Lipid raftlarının eksozom biyogenezine katkısı konusunda kesin bir kanıt bulunmamaktadır ancak deterjana dirençli membranlarla ilişkili bazı proteinlerin eksozomlardaki hücrelerden tomurcuklanmadığı ve bazı GPI bağlantılı proteinlerin de eksozomlardaki hücrelerden tomurcuklanmadığı gözlemlenmiştir [165].

6. Eksozomların Canlılardaki Biyolojik İşlevleri

Eksozom Biyogenezinin Hücre Otonom Roller

Eksozom biyogenezi, hücrelerin plazma membranından proteinleri hızlı ve seçici bir şekilde elimine etmesini sağlayan bir protein kalite kontrol mekanizmasıdır. Bunun en bilinen örneği, sperm reseptörü Juno'nun memeli zigotlarının plazma zarından döllenmeye bağlı olarak tomurcuklanmasıdır [61]. Eksozom aracılı protein kalite kontrolünün bir başka örneği de TfR'nin retikülosit plazma membranından gelişimsel olarak zamanlanmış eliminasyonunu içerir [59, 62]. Hücre ölümü aracı MLKL'nin eksozom aracılı salgılanması [166] korumasız ve kimyasal olarak modifiye edilmiş RNA'ların dışarı atılması [166] ve nörodejeneratif amiloidojenik proteinlerin ve toplanmış sinyal moleküllerinin veziküler salgılanması [167] gibi diğer benzer örnekler

literatürde bolca bulunmaktadır. Protein kalite kontrolüne ek olarak, hücreler ön-arka hücre polaritesini sağlamak için eksozom protein ayırma yolunu kullanır. Bu hücre polaritesi modu, ister insan lökositleri ister protozoan sosyal amipler olsun, en hızlı göç eden hücreler tarafından kullanılır ve hücreler tarafından polarize edici uyaranlara maruz kaldıktan sonra dakikalar içinde kurulur (günler ila haftalar içinde gelişen epitel hücre polaritesinin aksine). Spesifik olarak, eksozom biyogenez yolu, üropod olarak da bilinen amoeboid hücrelerin arka kutbunda eksozomal proteinleri ve lipidleri zenginleştiren polarize bir protein ayırma yolu oluşturur [154, 168]. Eksozom kargolarının polarize sıralanmasında rol oynayan moleküler mekanizmalar henüz aydınlatılamamış olsa da, bunların varlığı lökositlerin ve diğer amoeboid hücrelerin hızlı, yönlü hücre göçü için gerekli morfolojik ve işlevsel polariteyi hızla oluşturmaya olanak tanır [168]

Eksozom Aracılı Sinyalleşme ve Moleküler Transfer

Eksozom araştırmalarındaki son gelişmelerin büyük bir kısmı, eksozomların hücreler arası vezikül trafiği yoluyla sinyal ve moleküllerin iletilmesindeki rollerine odaklanmaktadır. Eksozomlar, çok yönlü sinyal partikülleri olarak, hücre yüzeyindeki ilgili reseptörlere bağlanıp kümelenerek çok çeşitli, kombinatoryal sinyaller oluşturma kapasitesine sahiptir. Bu tür faaliyetler, büyüme faktörleri, sitokinler, Wnt ve Notch yollarında yer alan proteinler için gözlemlenmiştir. Ayrıca eksozomların hedef hücrelerle füzyonu, işlevsel reseptörleri hedef hücrelere ve bazı durumlarda aktive olmuş reseptörleri ve efektörleri iletme kapasitesine sahiptir. Ancak eksozom aracılı sinyalizasyon ve hücreler arası trafik gözlemlerinin in vivo fizyolojik süreçler için gerçekten önemli olup olmadığı sorgulanabilir. Birçok sistemde bu soru henüz yanıtlanmamış olsa da, immünosupresyon sırasında eksozom aracılı PD-L1 sinyalinin açık kanıtı, hamilelik ve viral enfeksiyonlar sırasında eksozom aracılı miRNA yeniden programlaması ve kanserde EGFRvIII'in eksozom aracılı transferi gibi örneklerde bu sorunun cevabı verilmiştir. Bu nedenle, eksozomların belirli bir biyolojik süreç için önemli olup olmadığını değerlendirirken şüpheli olmak gerekse de, bu şüphelik, eksozomların sürekli olarak evrimleşmesi ve çok hücreli yaşamın bir parçası olarak sürekli oluşumu ve alımının olasılığı göz önünde bulundurularak yumuşatılmalıdır. Son olarak, eksozomlar (a) çok çeşitli normal fizyolojik süreçlerde (örneğin gelişim, doku

homeostazi, yaşlanma, metabolik düzenleme, egzersiz, stres, sirkadiyen ritimler, hamilelikte moleküler transfer, emzirme, yemek yeme, parazitik etkileşimler, kanser, enflamasyon, metabolik bozukluklar, otoimmünite, nörodejenerasyon, kronik pulmoner obstrüktif hastalık, bağımlılıklar) ve (b) geniş bir bulaşıcı hastalıklar yelpazesinde (örneğin virüsler, protozoanlar, mantarlar, solucanlar, eklem bacaklılar) enfeksiyon kaynaklı durumlarla ilişkilidir [169, 170].

6. Uygulamalar ve Kullanım Alanları

Eksozom araştırmalarında ortak bir ilgi alanı, hastalıklar için biyobelirteç taşıyıcıları olarak kullanım potansiyellerini incelemektir. Örneğin, hem plazma hem de beyin-omurilik sıvısındaki (BOS) eksozomların, Parkinson hastalığıyla ilişkili bir protein olan alfa sinüklein içerdiği bulunmuştur [171-173]. Yakın zamanda yapılan bir inceleme, glioblastoma belirteçleri olarak eksozomları incelemiştir [174]. İdrardan izole edilen eksozomlar, akut böbrek hasarını yansıtmaya yeteneğini göstermiştir [175]. Ayrıca eksozomlarda pankreas kanseri ve akciğer kanseri için belirteçler de bulunmuştur [116, 176]. Eksozomlar biyobelirteç taşıyıcıları olarak idealdir çünkü bu veziküller kan ve idrar gibi vücut sıvılarında bulunur. Bu durum, hastaların tedaviye yanıtını teşhis etmek ve izlemek için minimal veya invazif olmayan "sıvı biyopsi" yöntemlerini mümkün kılar. Eksozomların hastanın yanıtını izleme yeteneği, klinik ortamda başka bir potansiyel uygulamasıdır [177]. Eğer hastalık belirteci doğrudan hastalık durumu ile ilişkiliyse ve tedavi işe yarıyorsa, tedavi sırasında biyobelirteç varlığında bir değişiklik gözlemlenmelidir. Ayrıca bazı araştırmacılar eksozomların aşı geliştirme ve diğer immünolojik amaçlar için kullanılabileceğini öne sürmüştür [178, 179]. Eksozomlar doğal olarak antijen sunan veziküller olarak işlev gördüğünden, bu özelliklerinden faydalanmak mümkün olabilir. Eksozomlar uzun bir dolaşım yarı ömrüne sahiptir, insan vücudu tarafından iyi tolere edilir ve sadece hücresel membranlara nüfuz etmekle kalmaz, aynı zamanda belirli hücre tiplerini hedefleyebilir. Bu özellikler, onları immünolojik uygulamalar için daha uygun hale getirir [180]. Eksozomların bu doğal avantajları, ilaç dağıtım sistemleri geliştirilmesi için de ideal olmalarını sağlar [181]. RNA ve proteinlerin eksozomlara eklenmesi ve bu eksozomların vücudun belirli bir bölgesine hedeflenmesi için yöntemler geliştirilmekte olup, eksozomların hem protein hem de genetik materyal taşıma

yeteneği onları çekici bir ilaç dağıtım sistemi haline getiren bir diğer avantajdır [180]. Son olarak, mezenkimal kök hücre eksozomlarının, doku hasarını azaltmaya yardımcı olmak için terapötik bir varlık olarak hareket edebileceği gösterilmiştir [182-186]. Eksozomların klinik ortamda çok çeşitli potansiyel uygulamaları olsa da, FDA ve diğer düzenleyici kurumların eksozomları biyobelirteçler, aşılar, ilaç dağıtım sistemleri ve terapötik araçlar olarak kullanmak için belirlediği düzenleyici gerekliliklere uygun standartlaştırılmış izolasyon ve analiz yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır [72].

Sonuç olarak eksozomlar, yalnızca hücreler arası iletişimin doğal araçları olmakla kalmayıp, aynı zamanda modern tıbbın en umut verici biyolojik araçlarından biri olarak öne çıkmaktadır. İçerdikleri zengin moleküler yük sayesinde tanıdan tedaviye kadar uzanan geniş bir yelpazede kullanılabilecek potansiyele sahiptirler. Nanoölçekte taşıdıkları bilgiyle hastalıkların erken teşhisi, ilaçların hedefe yönelik iletimi ve bireyselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarında çığır açabilecek bu küçük veziküller, geleceğin biyoteknolojik ve klinik uygulamalarına yön verecek güçlü adaylar arasında yer almaktadır. Tüm bu yönleriyle, eksozomların moleküler yolculuğu, yalnızca temel bilim için değil aynı zamanda translasyonel tıp için de büyük bir devinimi temsil etmektedir.

REFERANSLAR

1. Trams, E.G., et al., *Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1981. 645(1): p. 63-70.
2. Gould, S.J. and G. Raposo, *As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles*. Journal of extracellular vesicles, 2013. 2(1): p. 20389.
3. Li, Z., et al., *Emerging role of exosomes in the joint diseases*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2018. 47(5): p. 2008-2017.
4. Théry, C., L. Zitvogel, and S. Amigorena, *Exosomes: composition, biogenesis and function*. Nature reviews immunology, 2002. 2(8): p. 569-579.
5. Scott, R.E., *Plasma membrane vesiculation: a new technique for isolation of plasma membranes*. Science, 1976. 194(4266): p. 743-745.
6. Yuan, D., et al., *Macrophage exosomes as natural nanocarriers for protein delivery to inflamed brain*. Biomaterials, 2017. 142: p. 1-12.
7. Zhou, Y., et al., *Exosomes transfer among different species cells and mediating miRNAs delivery*. Journal of Cellular Biochemistry, 2017. 118(12): p. 4267-4274.
8. Braccioli, L., C. Van Velthoven, and C.J. Heijnen, *Exosomes: a new weapon to treat the central nervous system*. Molecular neurobiology, 2014. 49: p. 113-119.
9. Suntres, Z.E., et al., *Therapeutic uses of exosomes*. exosomes and microvesicles, 2013. 1: p. 5.
10. Truby, L.K., et al., *Towards allograft longevity: leveraging omics technologies to improve heart transplant outcomes*. Current heart failure reports, 2023. 20(6): p. 493-503.
11. Yáñez-Mó, M., et al., *Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions*. Journal of extracellular vesicles, 2015. 4(1): p. 27066.
12. Fais, S., et al., *Evidence-based clinical use of nanoscale extracellular vesicles in nanomedicine*. 2016.

13. Karamanidou, T. and A. Tsouknidas, *Plant-derived extracellular vesicles as therapeutic nanocarriers*. International journal of molecular sciences, 2021. 23(1): p. 191.
14. Berger, E., et al., *Use of nanovesicles from orange juice to reverse diet-induced gut modifications in diet-induced obese mice*. Molecular Therapy Methods & Clinical Development, 2020. 18: p. 880-892.
15. Chen, X., et al., *Identification of anti-inflammatory vesicle-like nanoparticles in honey*. Journal of extracellular vesicles, 2021. 10(4): p. e12069.
16. Chen, Y.-S., et al., *Exosomes in clinical trial and their production in compliance with good manufacturing practice*. Tzu Chi Medical Journal, 2020. 32(2): p. 113-120.
17. Sarwa, K.K., P.J. Das, and B. Mazumder, *A nanovesicle topical formulation of Bhut Jolokia (hottest capsicum): a potential anti-arthritic medicine*. Expert opinion on drug delivery, 2014. 11(5): p. 661-676.
18. Sriwastva, M.K., et al., *Exosome-like nanoparticles from Mulberry bark prevent DSS-induced colitis via the AhR/COPS8 pathway*. EMBO reports, 2022. 23(3): p. e53365.
19. Zhang, M., et al., *Edible ginger-derived nanoparticles: A novel therapeutic approach for the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer*. Biomaterials, 2016. 101: p. 321-340.
20. Ju, S., et al., *Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis*. Molecular Therapy, 2013. 21(7): p. 1345-1357.
21. Chin, A.R., et al., *Cross-kingdom inhibition of breast cancer growth by plant miR159*. Cell research, 2016. 26(2): p. 217-228.
22. Kim, D.K. and W.J. Rhee, *Antioxidative effects of carrot-derived nanovesicles in cardiomyoblast and neuroblastoma cells*. Pharmaceutics, 2021. 13(8): p. 1203.
23. Kim, K., et al., *Anti-metastatic effects of plant sap-derived extracellular vesicles in a 3D microfluidic cancer metastasis model*. Journal of Functional Biomaterials, 2020. 11(3): p. 49.

24. Raimondo, S., et al., *Citrus limon-derived nanovesicles inhibit cancer cell proliferation and suppress CML xenograft growth by inducing TRAIL-mediated cell death*. *Oncotarget*, 2015. 6(23): p. 19514.
25. Yang, M., et al., *An efficient method to isolate lemon derived extracellular vesicles for gastric cancer therapy*. *Journal of nanobiotechnology*, 2020. 18: p. 1-12.
26. Stanly, C., et al., *Grapefruit-derived micro and nanovesicles show distinct metabolome profiles and anticancer activities in the A375 human melanoma cell line*. *Cells*, 2020. 9(12): p. 2722.
27. Pinna, R., et al., *Antimicrobial Effect of Thymus capitatus and Citrus limon var. pompia as Raw Extracts and Nanovesicles*. *Pharmaceutics*, 2019. 11(5): p. 234.
28. Regente, M., et al., *Plant extracellular vesicles are incorporated by a fungal pathogen and inhibit its growth*. *Journal of experimental botany*, 2017. 68(20): p. 5485-5495.
29. Schuh, C.M., et al., *Exosome-like vesicles in Apis mellifera bee pollen, honey and royal jelly contribute to their antibacterial and pro-regenerative activity*. *Journal of Experimental Biology*, 2019. 222(20): p. jeb208702.
30. Sundaram, K., et al., *Plant-derived exosomal nanoparticles inhibit pathogenicity of Porphyromonas gingivalis*. *Iscience*, 2019. 21: p. 308-327.
31. Alfieri, M., A. Leone, and A. Ambrosone, *Plant-derived nano and microvesicles for human health and therapeutic potential in nanomedicine*. *Pharmaceutics*, 2021. 13(4): p. 498.
32. Dad, H.A., et al., *Plant exosome-like nanovesicles: emerging therapeutics and drug delivery nanoplatforms*. *Molecular Therapy*, 2021. 29(1): p. 13-31.
33. Deng, Z., et al., *Broccoli-derived nanoparticle inhibits mouse colitis by activating dendritic cell AMP-activated protein kinase*. *Molecular Therapy*, 2017. 25(7): p. 1641-1654.
34. Iravani, S. and R.S. Varma, *Plant-derived edible nanoparticles and miRNAs: emerging frontier for therapeutics and targeted drug-delivery*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2019. 7(9): p. 8055-8069.

35. Zhang, M., et al., *Plant derived edible nanoparticles as a new therapeutic approach against diseases*. Tissue barriers, 2016. 4(2): p. e1134415.
36. Baldini, N., et al., *Exosome-like nanovesicles isolated from Citrus limon L. exert anti-oxidative effect*. Current pharmaceutical biotechnology, 2018. 19(11): p. 877-885.
37. Logozzi, M., et al., *Nanovesicles from organic agriculture-derived fruits and vegetables: Characterization and functional antioxidant content*. International journal of molecular sciences, 2021. 22(15): p. 8170.
38. Garaeva, L., et al., *Delivery of functional exogenous proteins by plant-derived vesicles to human cells in vitro*. Scientific reports, 2021. 11(1): p. 6489.
39. Rutter, B.D. and R.W. Innes, *Extracellular vesicles isolated from the leaf apoplast carry stress-response proteins*. Plant physiology, 2017. 173(1): p. 728-741.
40. Sarvarian, P., et al., *Application of emerging plant-derived nanoparticles as a novel approach for nano-drug delivery systems*. Immunological investigations, 2022. 51(4): p. 1039-1059.
41. Stanly, C., et al., *Crosstalk between the immune system and plant-derived nanovesicles: a study of allergen transporting*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021. 9: p. 760730.
42. Stanly, C., et al., *Membrane transporters in citrus clementina fruit juice-derived nanovesicles*. International journal of molecular sciences, 2019. 20(24): p. 6205.
43. Yu, L., et al., *Plant-derived nanovesicles: a novel form of nanomedicine*. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 2020. 8: p. 584391.
44. Logozzi, M., et al., *Extracellular acidity and increased exosome release as key phenotypes of malignant tumors*. Cancer and Metastasis Reviews, 2019. 38: p. 93-101.
45. Rodríguez Zorrilla, S., et al., *A pilot clinical study on the prognostic relevance of plasmatic exosomes levels in oral squamous cell carcinoma patients*. Cancers, 2019. 11(3): p. 429.
46. Osti, D., et al., *Clinical significance of extracellular vesicles in plasma from glioblastoma patients*. Clinical Cancer Research, 2019. 25(1): p. 266-276.

47. Logozzi, M., et al., *Plasmatic exosome number and size distinguish prostate cancer patients from healthy individuals: A prospective clinical study*. *Frontiers in Oncology*, 2021. 11: p. 727317.
48. Logozzi, M., et al., *Immunocapture-based ELISA to characterize and quantify exosomes in both cell culture supernatants and body fluids*. *Methods in enzymology*, 2020. 645: p. 155-180.
49. Foglio, E., et al., *Exosomal clusterin, identified in the pericardial fluid, improves myocardial performance following MI through epicardial activation, enhanced arteriogenesis and reduced apoptosis*. *International journal of cardiology*, 2015. 197: p. 333-347.
50. Canitano, A., et al., *Exosomes released in vitro from Epstein–Barr virus (EBV)-infected cells contain EBV-encoded latent phase mRNAs*. *Cancer letters*, 2013. 337(2): p. 193-199.
51. Logozzi, M., et al., *Human primary macrophages scavenge AuNPs and eliminate it through exosomes. A natural shuttling for nanomaterials*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2019. 137: p. 23-36.
52. Lugini, L., et al., *Exosomes from human colorectal cancer induce a tumor-like behavior in colonic mesenchymal stromal cells*. *Oncotarget*, 2016. 7(31): p. 50086.
53. Cossetti, C., et al., *Soma-to-germline transmission of RNA in mice xenografted with human tumour cells: possible transport by exosomes*. *PloS one*, 2014. 9(7): p. e101629.
54. Properzi, F., et al., *Detection of exosomal prions in blood by immunochemistry techniques*. *Journal of General Virology*, 2015. 96(Pt_7): p. 1969-1974.
55. Yang, C., M. Zhang, and D. Merlin, *Advances in plant-derived edible nanoparticle-based lipid nano-drug delivery systems as therapeutic nanomedicines*. *Journal of Materials Chemistry B*, 2018. 6(9): p. 1312-1321.
56. Bonucci, E., *Fine structure of early cartilage calcification*. *Journal of ultrastructure research*, 1967. 20(1-2): p. 33-50.
57. Anderson, H.C., *Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage*. *The Journal of cell biology*, 1969. 41(1): p. 59-72.

58. Wolf, P., *The nature and significance of platelet products in human plasma*. British journal of haematology, 1967. 13(3): p. 269-288.
59. Pan, B.-T. and R.M. Johnstone, *Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor*. Cell, 1983. 33(3): p. 967-978.
60. Harding, C., J. Heuser, and P. Stahl, *Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes*. The Journal of cell biology, 1983. 97(2): p. 329-339.
61. Bianchi, E., et al., *Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization*. Nature, 2014. 508(7497): p. 483-487.
62. Harding, C., J. Heuser, and P. Stahl, *Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding*. European journal of cell biology, 1984. 35(2): p. 256-263.
63. Frenette, G. and R. Sullivan, *Prostasome-like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface*. Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research, 2001. 59(1): p. 115-121.
64. Arienti, G., et al., *Prostasome to sperm transfer of CD13/aminopeptidase N (EC 3.4. 11.2)*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1997. 1336(3): p. 533-538.
65. Bakhshian Nik, A., J.D. Hutcheson, and E. Aikawa, *Extracellular vesicles as mediators of cardiovascular calcification*. Frontiers in cardiovascular medicine, 2017. 4: p. 78.
66. Melki, I., et al., *Platelet microvesicles in health and disease*. platelets, 2017. 28(3): p. 214-221.
67. Zarovni, N., et al., *Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches*. Methods, 2015. 87: p. 46-58.
68. Zhang, M., et al., *Methods and technologies for exosome isolation and characterization*. Small Methods, 2018. 2(9): p. 1800021.
69. Zaborowski, M.P., et al., *Extracellular vesicles: composition, biological relevance, and methods of study*. Bioscience, 2015. 65(8): p. 783-797.

70. Laulagnier, K., et al., *Characterization of exosome subpopulations from RBL-2H3 cells using fluorescent lipids*. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 2005. 35(2): p. 116-121.
71. Smith, Z.J., et al., *Single exosome study reveals subpopulations distributed among cell lines with variability related to membrane content*. Journal of extracellular vesicles, 2015. 4(1): p. 28533.
72. Raposo, G. and W. Stoorvogel, *Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends*. Journal of Cell Biology, 2013. 200(4): p. 373-383.
73. Li, P., et al., *Progress in exosome isolation techniques*. Theranostics, 2017. 7(3): p. 789.
74. Dragovic, R.A., et al., *Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2011. 7(6): p. 780-788.
75. Soo, C.Y., et al., *Nanoparticle tracking analysis monitors microvesicle and exosome secretion from immune cells*. Immunology, 2012. 136(2): p. 192-197.
76. Palmieri, V., et al., *Dynamic light scattering for the characterization and counting of extracellular vesicles: a powerful noninvasive tool*. Journal of nanoparticle research, 2014. 16: p. 1-8.
77. Filipe, V., A. Hawe, and W. Jiskoot, *Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates*. Pharmaceutical research, 2010. 27: p. 796-810.
78. Frisken, B.J., *Revisiting the method of cumulants for the analysis of dynamic light-scattering data*. Applied optics, 2001. 40(24): p. 4087-4091.
79. Chernyshev, V.S., et al., *Size and shape characterization of hydrated and desiccated exosomes*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2015. 407: p. 3285-3301.
80. Arraud, N., et al., *Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2014. 12(5): p. 614-627.

81. Sharma, S., et al., *Nanofilaments on glioblastoma exosomes revealed by peak force microscopy*. Journal of the Royal Society Interface, 2014. 11(92): p. 20131150.
82. Booth, A.M., et al., *Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane*. The Journal of cell biology, 2006. 172(6): p. 923-935.
83. Golfetto, O., et al., *A platform to enhance quantitative single molecule localization microscopy*. Journal of the American Chemical Society, 2018. 140(40): p. 12785-12797.
84. Daaboul, G.G., et al., *Digital detection of exosomes by interferometric imaging*. Scientific reports, 2016. 6(1): p. 37246.
85. Morales-Kastresana, A., et al., *Labeling extracellular vesicles for nanoscale flow cytometry*. Scientific reports, 2017. 7(1): p. 1878.
86. Nolan, J.P. and E. Duggan, *Analysis of individual extracellular vesicles by flow cytometry*. Flow cytometry protocols, 2018: p. 79-92.
87. Sódar, B.W., et al., *Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection*. Scientific reports, 2016. 6(1): p. 24316.
88. Zhang, H., et al., *Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation*. Nature cell biology, 2018. 20(3): p. 332-343.
89. Doyle, L.M. and M.Z. Wang, *Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis*. Cells, 2019. 8(7): p. 727.
90. Wu, Y., W. Deng, and D.J. Klink II, *Exosomes: improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers*. Analyst, 2015. 140(19): p. 6631-6642.
91. Ko, J., E. Carpenter, and D. Issadore, *Detection and isolation of circulating exosomes and microvesicles for cancer monitoring and diagnostics using micro-/nano-based devices*. Analyst, 2016. 141(2): p. 450-460.
92. Szatanek, R., et al., *The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization*. International journal of molecular sciences, 2017. 18(6): p. 1153.

93. Ni, D., P. Xu, and S. Gallagher, *Immunoblotting and immunodetection*. Current Protocols in Cell Biology, 2017. 74(1): p. 6.2. 1-6.2. 37.
94. Raposo, G., et al., *B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles*. The Journal of experimental medicine, 1996. 183(3): p. 1161-1172.
95. Fang, Y., et al., *Higher-order oligomerization targets plasma membrane proteins and HIV gag to exosomes*. PLoS biology, 2007. 5(6): p. e158.
96. Escola, J.-M., et al., *Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes*. Journal of Biological Chemistry, 1998. 273(32): p. 20121-20127.
97. Liang, Y., et al., *Complex N-linked glycans serve as a determinant for exosome/microvesicle cargo recruitment*. Journal of Biological Chemistry, 2014. 289(47): p. 32526-32537.
98. Segura, E., et al., *ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming*. Blood, 2005. 106(1): p. 216-223.
99. Baietti, M.F., et al., *Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes*. Nature cell biology, 2012. 14(7): p. 677-685.
100. Rieu, S., et al., *Exosomes released during reticulocyte maturation bind to fibronectin via integrin $\alpha 4 \beta 1$* . European journal of biochemistry, 2000. 267(2): p. 583-590.
101. Dewannieux, M. and T. Heidmann, *Endogenous retroviruses: acquisition, amplification and taming of genome invaders*. Current opinion in virology, 2013. 3(6): p. 646-656.
102. Heidmann, O., et al., *HEMO, an ancestral endogenous retroviral envelope protein shed in the blood of pregnant women and expressed in pluripotent stem cells and tumors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2017. 114(32): p. E6642-E6651.
103. Vargas, A., et al., *Syncytin proteins incorporated in placenta exosomes are important for cell uptake and show variation in abundance in serum exosomes from patients with preeclampsia*. The FASEB Journal, 2014. 28(8): p. 3703-3719.
104. Kassiotis, G. and J.P. Stoye, *Making a virtue of necessity: the pleiotropic role of human endogenous retroviruses in cancer*. Philosophical

- Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2017. 372(1732): p. 20160277.
105. Grow, E.J., et al., *Intrinsic retroviral reactivation in human preimplantation embryos and pluripotent cells*. Nature, 2015. 522(7555): p. 221-225.
106. Al-Nedawi, K., et al., *Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells*. Nature cell biology, 2008. 10(5): p. 619-624.
107. Atay, S., et al., *Oncogenic KIT-containing exosomes increase gastrointestinal stromal tumor cell invasion*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014. 111(2): p. 711-716.
108. Jarad, M., et al., *Release of endothelial cell associated VEGFR2 during TGF- β modulated angiogenesis in vitro*. BMC cell biology, 2017. 18: p. 1-10.
109. DeRita, R.M., et al., *c-Src, insulin-like growth factor I receptor, G-protein-coupled receptor kinases and focal adhesion kinase are enriched into prostate cancer cell exosomes*. Journal of cellular biochemistry, 2017. 118(1): p. 66-73.
110. Blanchard, N., et al., *TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/ ζ complex*. The Journal of Immunology, 2002. 168(7): p. 3235-3241.
111. Li, M., et al., *Horizontal transfer of exosomal CXCR4 promotes murine hepatocarcinoma cell migration, invasion and lymphangiogenesis*. Gene, 2018. 676: p. 101-109.
112. Nager, A.R., et al., *An actin network dispatches ciliary GPCRs into extracellular vesicles to modulate signaling*. Cell, 2017. 168(1): p. 252-263. e14.
113. Gonzalez-King, H., et al., *Hypoxia inducible factor-1 α potentiates jagged 1-mediated angiogenesis by mesenchymal stem cell-derived exosomes*. Stem cells, 2017. 35(7): p. 1747-1759.
114. Clayton, A., et al., *Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production*. The Journal of Immunology, 2011. 187(2): p. 676-683.
115. Rabesandratana, H., et al., *Decay-accelerating factor (CD55) and membrane inhibitor of reactive lysis (CD59) are released within*

- exosomes during In vitro maturation of reticulocytes*. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 1998. 91(7): p. 2573-2580.
116. Melo, S.A., et al., *Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer*. Nature, 2015. 523(7559): p. 177-182.
 117. Qi, J., et al., *Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth through hedgehog signaling pathway*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2017. 42(6): p. 2242-2254.
 118. Borges, F.T., et al., *TGF- β 1-containing exosomes from injured epithelial cells activate fibroblasts to initiate tissue regenerative responses and fibrosis*. Journal of the American Society of Nephrology, 2013. 24(3): p. 385-392.
 119. Sampey, G.C., et al., *Exosomes from HIV-1-infected cells stimulate production of pro-inflammatory cytokines through trans-activating response (TAR) RNA*. Journal of Biological Chemistry, 2016. 291(3): p. 1251-1266.
 120. Munich, S., et al., *Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands*. Oncoimmunology, 2012. 1(7): p. 1074-1083.
 121. Kim, S.H., et al., *MHC class II+ exosomes in plasma suppress inflammation in an antigen-specific and Fas ligand/Fas-dependent manner*. The Journal of Immunology, 2007. 179(4): p. 2235-2241.
 122. McGough, I.J. and J.-P. Vincent, *Exosomes in developmental signalling*. Development, 2016. 143(14): p. 2482-2493.
 123. Zheng, J., et al., *Extracellular matrix proteins and carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules characterize pancreatic duct fluid exosomes in patients with pancreatic cancer*. Hpb, 2018. 20(7): p. 597-604.
 124. Santasusagna, S., et al., *Proteomic analysis of liquid biopsy from tumor-draining vein indicates that high expression of exosomal ECM1 is associated with relapse in stage I-III colon cancer*. Translational Oncology, 2018. 11(3): p. 715-721.
 125. Oshima, K., et al., *Secretion of a peripheral membrane protein, MFG-E8, as a complex with membrane vesicles: A possible role in membrane secretion*. European Journal of Biochemistry, 2002. 269(4): p. 1209-1218.

126. Beckler, M.D., et al., *Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS*. Molecular & cellular proteomics, 2013. 12(2): p. 343-355.
127. Ostrowski, M., et al., *Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway*. Nature cell biology, 2010. 12(1): p. 19-30.
128. Subramanian, R.P., et al., *Identification, characterization, and comparative genomic distribution of the HERV-K (HML-2) group of human endogenous retroviruses*. Retrovirology, 2011. 8: p. 1-22.
129. Ashley, J., et al., *Retrovirus-like Gag protein Arc1 binds RNA and traffics across synaptic boutons*. Cell, 2018. 172(1): p. 262-274. e11.
130. Pastuzyn, E.D., et al., *The neuronal gene arc encodes a repurposed retrotransposon gag protein that mediates intercellular RNA transfer*. Cell, 2018. 172(1): p. 275-288. e18.
131. Bretscher, A., et al., *ERM-Merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function*. Annual review of cell and developmental biology, 2000. 16(1): p. 113-143.
132. Pisitkun, T., R.-F. Shen, and M.A. Knepper, *Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004. 101(36): p. 13368-13373.
133. Fordjour, F.K., G.G. Daaboul, and S.J. Gould, *A shared pathway of exosome biogenesis operates at plasma and endosome membranes*. BioRxiv, 2019: p. 545228.
134. Raj, A. and A. Van Oudenaarden, *Nature, nurture, or chance: stochastic gene expression and its consequences*. Cell, 2008. 135(2): p. 216-226.
135. Battich, N., T. Stoeger, and L. Pelkmans, *Control of transcript variability in single mammalian cells*. Cell, 2015. 163(7): p. 1596-1610.
136. Wubbolts, R., et al., *Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes: potential implications for their function and multivesicular body formation*. Journal of Biological Chemistry, 2003. 278(13): p. 10963-10972.
137. Batista, B.S., et al., *Identification of a conserved glycan signature for microvesicles*. Journal of proteome research, 2011. 10(10): p. 4624-4633.
138. Shimoda, A., et al., *Glycan profiling analysis using evanescent-field fluorescence-assisted lectin array: Importance of sugar recognition for*

- cellular uptake of exosomes from mesenchymal stem cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017. 491(3): p. 701-707.
139. Rilla, K., et al., *Hyaluronan production enhances shedding of plasma membrane-derived microvesicles*. Experimental cell research, 2013. 319(13): p. 2006-2018.
 140. Ratajczak, J., et al., *Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery*. Leukemia, 2006. 20(5): p. 847-856.
 141. Valadi, H., et al., *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. Nature cell biology, 2007. 9(6): p. 654-659.
 142. Skog, J., et al., *Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers*. Nature cell biology, 2008. 10(12): p. 1470-1476.
 143. Wei, Z., et al., *Coding and noncoding landscape of extracellular RNA released by human glioma stem cells*. Nature communications, 2017. 8(1): p. 1145.
 144. Giraldez, M.D., et al., *Comprehensive multi-center assessment of small RNA-seq methods for quantitative miRNA profiling*. Nature biotechnology, 2018. 36(8): p. 746-757.
 145. Balaj, L., et al., *Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences*. Nature communications, 2011. 2(1): p. 180.
 146. Kahlert, C., et al., *Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer*. Journal of Biological Chemistry, 2014. 289(7): p. 3869-3875.
 147. Thakur, B.K., et al., *Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection*. Cell research, 2014. 24(6): p. 766-769.
 148. Colombo, M., G. Raposo, and C. Théry, *Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles*. Annual review of cell and developmental biology, 2014. 30(1): p. 255-289.
 149. Hyenne, V., et al., *RAL-1 controls multivesicular body biogenesis and exosome secretion*. Journal of Cell Biology, 2015. 211(1): p. 27-37.

150. Sung, B.H., et al., *Directional cell movement through tissues is controlled by exosome secretion*. Nature communications, 2015. 6(1): p. 7164.
151. Verweij, F.J., et al., *Quantifying exosome secretion from single cells reveals a modulatory role for GPCR signaling*. Journal of Cell Biology, 2018. 217(3): p. 1129-1142.
152. Nabhan, J.F., et al., *Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. 109(11): p. 4146-4151.
153. Casado, S., M.d.V.T. Lobo, and C.L. Paíno, *Dynamics of plasma membrane surface related to the release of extracellular vesicles by mesenchymal stem cells in culture*. Scientific reports, 2017. 7(1): p. 6767.
154. Shen, B., et al., *Protein targeting to exosomes/microvesicles by plasma membrane anchors*. Journal of Biological Chemistry, 2011. 286(16): p. 14383-14395.
155. Shao, H., et al., *Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy*. Nature medicine, 2012. 18(12): p. 1835-1840.
156. Wehman, A.M., et al., *The P4-ATPase TAT-5 inhibits the budding of extracellular vesicles in C. elegans embryos*. Current Biology, 2011. 21(23): p. 1951-1959.
157. Welsch, S., et al., *HIV-1 buds predominantly at the plasma membrane of primary human macrophages*. PLoS pathogens, 2007. 3(3): p. e36.
158. Deneka, M., et al., *In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53*. The Journal of cell biology, 2007. 177(2): p. 329-341.
159. Nkwe, D.O., et al., *The intracellular plasma membrane-connected compartment in the assembly of HIV-1 in human macrophages*. BMC biology, 2016. 14: p. 1-19.
160. Edgar, J.R., et al., *Tetherin is an exosomal tether*. Elife, 2016. 5: p. e17180.
161. Neil, S.J., T. Zang, and P.D. Bieniasz, *Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu*. Nature, 2008. 451(7177): p. 425-430.
162. Chen, L., et al., *Role of exosomes in pharyngocutaneous fistula after total laryngectomy*. International Journal of Nanomedicine, 2022. 17: p. 4119.

163. Egea-Jimenez, A.L. and P. Zimmermann, *Phospholipase D and phosphatidic acid in the biogenesis and cargo loading of extracellular vesicles: Thematic Review Series: Exosomes and Microvesicles: Lipids as Key Components of their Biogenesis and Functions*. Journal of Lipid Research, 2018. 59(9): p. 1554-1560.
164. Sevcsik, E., et al., *GPI-anchored proteins do not reside in ordered domains in the live cell plasma membrane*. Biophysical Journal, 2015. 108(2): p. 32a-33a.
165. Lingwood, D. and K. Simons, *Lipid rafts as a membrane-organizing principle*. science, 2010. 327(5961): p. 46-50.
166. Nabet, B.Y., et al., *Exosome RNA unshielding couples stromal activation to pattern recognition receptor signaling in cancer*. Cell, 2017. 170(2): p. 352-366. e13.
167. Verweij, F.J., et al., *Exosomal sorting of the viral oncoprotein LMP1 is restrained by TRAF2 association at signalling endosomes*. Journal of extracellular vesicles, 2015. 4(1): p. 26334.
168. Shen, B., et al., *Biogenesis of the posterior pole is mediated by the exosome/microvesicle protein-sorting pathway*. Journal of Biological Chemistry, 2011. 286(51): p. 44162-44176.
169. Quek, C. and A.F. Hill, *The role of extracellular vesicles in neurodegenerative diseases*. Biochemical and biophysical research communications, 2017. 483(4): p. 1178-1186.
170. Theodoraki, M.-N., et al., *Clinical significance of PD-L1+ exosomes in plasma of head and neck cancer patients*. Clinical cancer research, 2018. 24(4): p. 896-905.
171. Alvarez-Llamas, G., et al., *Recent advances in atherosclerosis-based proteomics: new biomarkers and a future perspective*. Expert Review of Proteomics, 2008. 5(5): p. 679-691.
172. Al-Nedawi, K., B. Meehan, and J. Rak, *Microvesicles: messengers and mediators of tumor progression*. Cell cycle, 2009. 8(13): p. 2014-2018.
173. Simpson, R.J., et al., *Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential*. Expert review of proteomics, 2009. 6(3): p. 267-283.
174. Giusti, I., M. Di Francesco, and V. Dolo, *Extracellular vesicles in glioblastoma: role in biological processes and in therapeutic applications*. Current cancer drug targets, 2017. 17(3): p. 221-235.

175. Zhou, H., et al., *Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury*. Kidney international, 2006. 70(10): p. 1847-1857.
176. Sandfeld-Paulsen, B., et al., *Exosomal proteins as prognostic biomarkers in non-small cell lung cancer*. Molecular oncology, 2016. 10(10): p. 1595-1602.
177. Sonoda, H., et al., *Decreased abundance of urinary exosomal aquaporin-1 in renal ischemia-reperfusion injury*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2009. 297(4): p. F1006-F1016.
178. Bobrie, A., et al., *Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses*. Traffic, 2011. 12(12): p. 1659-1668.
179. Chaput, N. and C. Théry. *Exosomes: immune properties and potential clinical implementations*. in *Seminars in immunopathology*. 2011. Springer.
180. Lai, R.C., et al., *Exosomes for drug delivery—a novel application for the mesenchymal stem cell*. Biotechnology advances, 2013. 31(5): p. 543-551.
181. Alvarez-Erviti, L., et al., *Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes*. Nature biotechnology, 2011. 29(4): p. 341-345.
182. Gatti, S., et al., *Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2011. 26(5): p. 1474-1483.
183. Reis, L.A., et al., *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells repaired but did not prevent gentamicin-induced acute kidney injury through paracrine effects in rats*. 2012.
184. Bruno, S., et al., *Microvesicles derived from mesenchymal stem cells enhance survival in a lethal model of acute kidney injury*. PloS one, 2012. 7(3): p. e33115.
185. Akao, Y., et al., *Microvesicle-mediated RNA molecule delivery system using monocytes/macrophages*. Molecular therapy, 2011. 19(2): p. 395-399.

186. Bruno, S., et al., *Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury*. Journal of the American Society of Nephrology, 2009. 20(5): p. 1053-1067.

BÖLÜM 9

PRENATAL VE POSTNATAL DÖNEMDE GENETİK TANI: KROMOZOMAL BOZUKLUKLARDAN MOLEKÜLER TESTLERE

Prof. Dr. İlker BÜYÜK^{1*}, Prof. Dr. Mehmet Ali ERGÜN²,
Aybüke OKAY¹, Prof. Dr. E. Sümer ARAS¹
DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.17114185>

¹ Biyoloji Bölümü, Fen Fakültesi, Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye

² Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara, Türkiye

* Sorumlu Yazar: Prof. Dr. İlker BÜYÜK; buyuki@ankara.edu.tr

1. Kromozomal Anomaliler: Yapısal ve Sayısal Bozuklukların Tanı Sürecinde Klinik ve Genetik Yansımaları

Kromozomal anomaliler, kromozomların yapısında ya da sayısında meydana gelen değişikliklerdir. İnsanlarda genellikle 23 çift kromozom bulunur; bunların 22 çifti otozomal kromozomlardan oluşur ve 1'den 22'ye kadar numaralandırılır. Son çift ise cinsiyet kromozomlarıdır ve bireyin biyolojik cinsiyetini belirler. Doğumda, XY cinsiyet kromozomlarına sahip bireyler erkek, XX kromozomlarına sahip bireyler ise dişi olarak adlandırılır. Her birey, kromozomlarının yarısını annesinden, diğer yarısını ise babasından alır; böylece toplamda 23 çift kromozomdan oluşan bir genom oluşur. Kromozomların sayısında ya da yapısında meydana gelen herhangi bir değişiklik, kromozomal anomali olarak tanımlanır ve bu durum çeşitli tıbbi bozukluklara yol açabilir [1].

Kromozomal anomaliler, sayısal veya yapısal olmak üzere iki ana kategoriye ayrılır. Sayısal anomaliler, kromozom sayısındaki değişiklikleri ifade eder ve bu durumlar genel olarak anöploidi olarak adlandırılır. En yaygın anöploidi türleri arasında, bir kromozom çiftinin yalnızca tek bir kopyasının bulunduğu monozomi ve bir kromozomun normalde iki yerine üç kopya ile bulunduğu trizomi yer alır [2, 3]. Çoğu anöploidi olgusunda, monozomiden çok trizomi görülür. Down sendromu, kromozomal anöploidilerin en iyi bilinen örneğidir ve trizomi 21 olarak adlandırılan, 21. kromozomun fazladan bir kopyasına sahip olunmasından kaynaklanır. Trizomi her kromozomda meydana gelebilse de bu durum oldukça nadirdir. Down sendromu dışında en yaygın kromozomal anöploidiler arasında trizomi 13 (Patau sendromu), trizomi 18 (Edwards sendromu), Turner sendromu (45,X), Klinefelter sendromu (47,XXY), 47,XYY ve 47,XXX yer alır [4, 5]. Cinsiyet kromozomu anöploidileri (SCA'lar), Klinefelter sendromu (47,XXY), Trizomi X (47,XXX) ve 47,XYY sendromu gibi durumları kapsar ve en yaygın süpernümerer (fazladan) kromozomal bozukluklardır. Yaklaşık her 500 canlı doğumda bir görülürler. Bu anöploidilerde klinik fenotip oldukça değişken olup, genellikle hafif dismorfik özellikler veya nörogelişimsel etkilenim gözlemlenir. Ancak, tarihsel olarak bu olguların yalnızca %10–25'i yaşam boyu tanı alabilmiştir. SCA vakalarının büyük çoğunluğu, doğum sonrası dönemde nörogelişimsel problemler, tıbbi sorunlar veya infertiliteye yönelik klinik değerlendirmeler

sırasında teşhis edilmektedir [6]. Bununla birlikte, 1970’li yıllarda yürütülen prospektif yenidoğan çalışmalarında SCA’lı bireylerde nörogelişimsel özelliklerin erken dönemde ortaya çıkma riski tutarlı biçimde gösterildiğinden, evrensel yenidoğan taramasının erken müdahalelerin başlatılmasına ve uzun vadeli sonuçların iyileştirilmesine olanak sağlayıp sağlamayacağı konusunda artan bir tartışma bulunmaktadır [7, 8].

Yapısal kromozomal anomaliler ise delesyon, duplikasyon, inversiyon ve translokasyon olmak üzere dört ana gruba ayrılır [1, 9]. Delesyonlar, bir kromozomun belirli bir parçasının silinmesi veya kaybı sonucunda meydana gelir; bu durum, ilgili kromozomu daha az işlevsel hale getirebilir. Örneğin, kromozom 5’in kısa kolundaki bir bölgenin silinmesi, Cri-du-chat sendromuna yol açar. Bu sendromun yaygın belirtileri arasında bebeklerde mikrosefali (küçük kafa yapısı) ve karakteristik yüksek perdeli ağlama yer alır. Duplikasyon, kromozomun belirli bir bölümünün kopyalanmasıyla ortaya çıkar ve bu durum fazladan genetik materyalin oluşmasına neden olur. Örneğin, kromozom 17’nin bir kısmının kopyalanması sonucu ortaya çıkan Charcot-Marie-Tooth hastalığı tip 1, kas güçsüzlüğüne yol açan genetik bir hastalıktır. İnversiyon, bir kromozomda iki farklı bölgenin kırılması ve bu parçanın 180 derece dönerek yeniden aynı bölgeye yerleşmesiyle oluşur. İnversiyonlar genellikle klinik olarak belirgin bir hastalığa neden olmasa da, en sık kromozom 2 üzerinde gözlemlenir. Translokasyonlar, bir kromozom parçasının koparak farklı bir kromozoma bağlanmasıyla meydana gelir. Bunun en yaygın örneği, iki akrosentrik kromozomun (sentromeri uçlara yakın, kolları eşit olmayan kromozomlar) kısa kollarını kaybetmesi ve uzun kollarının birleşmesiyle oluşan Robertsonian translokasyondur. Robertsonian translokasyonlar, bazı trizomi formlarının potansiyel nedenleri arasında yer alır [10-12].

1.1. Prenatal Tarama ve Tanının Tarihsel Gelişimi ve Uygulama Prensipleri

Prenatal tarama ve tanı yaklaşımları, 20. yüzyılın başlarında gelişmeye başlamış ve zaman içerisinde teknolojik ilerlemelerle birlikte karmaşık bir yapı kazanarak bugünkü haline ulaşmıştır. Fetal anomalilerin tanısına yönelik ilk girişim 1917 yılında James T. Case tarafından X-ışını ile anensefali tespitiyle gerçekleştirilmiştir [13]. Yaklaşık otuz yıl öncesine dek prenatal taramanın

temel amacı, Down sendromu (Trizomi 21) ve daha az sıklıkla Trizomi 18 ve Trizomi 13 gibi kromozomal anöploidilerin saptanmasıydı [14]. Bu dönemde hemoglobinopatiler ve kistik fibrozis gibi monogenik hastalıklar da prenatal taramanın kapsama alanına girmiştir.

Amniyosentez ilk olarak 1930'larda tanıtılmış ve 1950'lerde Rh uyumsuzluğunun tanı ve tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır [15]. Kromozomal anomalilerin tanısı için genetik amniyosentez uygulaması ise 1971 yılında yayınlanan raporlarla bilimsel literatüre girmiştir [16]. Bu yöntem zamanla Pompe hastalığı, kistik fibrozis ve mukopolisakkaridozlar gibi kalıtsal hastalıkların tanısında da kullanılmıştır [17]. 1956 yılında Tjio, insan kromozom sayısının 46 olduğunu belirlemiş; sonrasında Lejeune ve Turpin, Down sendromunun 21. kromozomun fazladan bir kopyası ile ilişkili olduğunu göstermiştir [18]. 1960'lı yıllarda amniyotik sıvıdaki hücrelerin kültüre edilebilir olduğunun gözlemlenmesi, kromozomal anomalilerin prenatal tanısını mümkün hale getirmiştir [19].

Down sendromu riskinin anne yaşıyla artması, 35 yaş ve üzerindeki gebelerin "ileri anne yaşı" kategorisinde değerlendirilmesine ve bu bireylere invaziv testlerin önerilmesine yol açmıştır [20, 21]. Bu yaş sınırı, 35 yaşındaki kadınlarda Down sendromu prevalansının, amniyosenteze bağlı düşük riskine yakın olması temelinde belirlenmiştir [22]. Ayrıca, 1960-1970 yılları arasında doğum yapan kadınların sadece %5'inin 35 yaş üzerinde olması, bu yaş grubunun makul bir hedef kitle olarak kabul edilmesine neden olmuştur [15]. Ancak, Down sendromlu bebeklerin yalnızca üçte birinin bu yaş grubundan doğduğu dikkate alındığında, sadece anne yaşına dayanan bu stratejinin yetersiz kaldığı ortaya konmuştur [23, 24]. Down sendromu için risk, 30 yaşında 1:900 iken, 40 yaşında 1:90'a çıkmaktadır. Ancak her iki yaş grubunda da %98,5'ten fazla kadın Down sendromlu olmayan fetüs taşır [25, 26]. Bu nedenle, American College of Obstetricians and Gynecologists, yaşa bakılmaksızın tüm gebelere invaziv testlerin sunulmasını tavsiye etmektedir [24].

Zamanla, serum taraması gibi biyokimyasal yaklaşımlar anne yaşına dayanan değerlendirmelerin yerini almaya başlamıştır. Maternal serum alfa-fetoprotein (MSAFP), nöral tüp defektlerinin taramasında ilk kullanılan belirteçlerden olmuştur [25, 26]. Daha sonra, Down sendromlu gebeliklerde MSAFP ve estriol düzeylerinin düşük, hCG ve inhibin düzeylerinin ise yüksek

olduğu bulunarak bu parametreler ikinci trimester testlerine dahil edilmiştir [22, 24, 27-29]. "Üçlü", "dörtlü" ve "penta" testlerle sırasıyla yaklaşık %69, %80 ve daha yüksek tespit oranları bildirilmiştir. Birinci trimester taraması, ense kalınlığı ve burun kemiği değerlendirmesiyle Down sendromunun erken dönemde saptanmasını mümkün kılmış; serum analitleriyle birleştirilerek tarama etkinliği artmıştır [30]. Buna rağmen, ikinci trimester taramaları yaklaşık %80, birinci trimester kombine tarama ise %90-95 tespit oranları sunmakta; ancak her iki yaklaşımda da %5'e varan yanlış pozitiflik görülmektedir [31, 32]. Down sendromu ve Trizomi 18'li fetüslerde sıklıkla sonografik olarak "yumuşak belirteçler" (soft markers) tespit edilmektedir. Bu belirteçler, kromozomal olarak normal fetüslerde de bulunabilse de, anöploidilerde daha sık rastlanmaktadır. Yumuşak belirteçler, genetik ultrason kavramı altında risk değerlendirmesinde tamamlayıcı unsur olarak kullanılmaktadır [33, 34]. Yaygın yumuşak belirteçler arasında intrakardiyak ekojenik odak, koroid pleksus kisti, tek umbilikal arter, kısa femur/humerus, ekojenik bağırsak ve idrar yolu dilatasyonu yer almaktadır [35]. Ancak burun kemiği hipoplazisi ve ense kalınlığı artışı gibi belirteçler, riski belirgin şekilde artırdığından "yumuşak" değil, majör belirteçler olarak sınıflandırılmaktadır [36]. Yumuşak belirteçlerin varlığı genellikle hastalarda endişeye yol açmakta ve invaziv tanı testlerinin önerilmesine neden olmaktadır.

Son yıllarda NIPT (non-invaziv prenatal tarama) yöntemlerinin yaygınlaşmasıyla birlikte, rehberler yumuşak belirteçlerin çoğunun normal varyant olarak kabul edilmesini ve tek başına bu bulgulara dayanarak ek test önerilmemesini tavsiye etmektedir [37]. Buna rağmen, uygulamada hekimin bu bulguları hasta ile paylaşıp paylaşmayacağı konusunda fikir ayrılıkları sürmektedir [38]. Bazı uzmanlar, bu bulguların bildiriminin hasta üzerindeki anksiyete ve depresyon düzeyini artırdığını ve anne-bebek etkileşimi üzerinde olumsuz etkiler yaratabildiğini belirtmektedir [39, 40]. Dolayısıyla, bu alanda standardizasyon ihtiyacı sürmektedir [41].

2. Genetik Tarama ve Testlerin Önemi: Yöntemler, Uygulamalar ve Klinik Sonuçlar

2.1. Gebelikte Genetik Tarama ve Tek Gen Hastalıklarının Tanısı: Yöntemler ve Klinik Önemi

Gebeliğin erken dönemlerinde, tüm kadınlara bazı genetik hastalıklar ve doğumsal kusurlar açısından artmış fetal riski belirleyebilen çeşitli kan belirteçlerinin taranması önerilmektedir. Gebeliğin 15 ila 21. haftaları arasında alınan maternal serum örneğinde alfa-fetoprotein (AFP), estriol ve insan koryonik gonadotropini (hCG) düzeylerine bakılarak tarama yapılır. Bazı tarama protokollerine dördüncü bir belirteç olan inhibin-A da dahil edilir. AFP, annenin kanında kolaylıkla tespit edilebilen ve fetal anomalilerde ilişkilendirilen ilk protein belirteci olmuştur [42, 43]. Fetüs, gelişimin erken dönemlerinde yüksek miktarda AFP sentezler; ancak bu düzeyler anne serumunda normalde çok daha düşüktür. Anne serumundaki yüksek AFP düzeyleri, açık nöral tüp defektleriyle ilişkilidir. Nöral tüp, embriyonik gelişim sırasında beyin ve omuriliğin oluşumunu sağlar. Bu tüpün doğru şekilde kapanmaması, spina bifida ve anensefali gibi doğumsal kusurlara yol açabilir. Açık nöral tüp defektleri her yıl yaklaşık 2.500 bebeği etkiler. Spina bifidada, bel bölgesindeki omurga kemikleri kaynaşamaz ve omurgayı çevreleyen yapıların açıkta kalmasına neden olur. Bu durum, kısmi felç ile mesane ve bağırsak kontrol sorunları gibi çeşitli nörolojik komplikasyonlara yol açabilir. Anensefali ise beyin ve kafatasının ciddi şekilde gelişmediği, genellikle bebeklerin ölü doğmasına ya da doğumdan kısa bir süre sonra kaybedilmesine neden olan ağır bir doğum kusurudur. Daha sonra yapılan araştırmalar, düşük AFP düzeylerinin Down sendromu (trizomi 21) ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Her 800 bebekten biri, 21. kromozomun fazladan bir kopyası nedeniyle Down sendromu ile doğmaktadır. Maternal serum AFP düzeyleri; estriol, hCG ve inhibin-A gibi diğer belirteçlerle birlikte, maternal yaş ile birleştirilerek hassas bir tarama testi oluşturur. Düşük AFP ve estriol düzeyleri ile birlikte yüksek hCG düzeyleri, Down sendromu riskinin arttığını gösterir. Her üç belirtecinde düşük olması ise Edward sendromu (trizomi 18) riskinin artışıyla ilişkilidir. Tarama testine inhibin-A'nın eklenmesi, Down sendromu risk tahmininin doğruluğunu daha da artırmaktadır [42, 43]. Bebeğin nöral tüp defekti, Down sendromu ve trizomi 18 riski; ölçülen belirteç düzeylerinin yanı

sıra annenin yaşı, kilosu, çoğul gebelik durumu, ırkı ve insülin tedavisi gerektiren diyabeti gibi ek faktörler de göz önünde bulundurularak hesaplanır. Ancak bu testler yalnızca tarama amaçlıdır; anormal bir sonuç yalnızca riskin arttığını gösterir ve tek başına bir doğum kusuru ya da genetik hastalık tanısı koymaz. Kesin tanı koymak için ileri tanısal testler yapılması gerekir. Kadınların yaklaşık %5-7'sinde, çoğunlukla gebelik yaşının yanlış hesaplanması gibi nedenlerle yanlış pozitif sonuç elde edilebilir [44].

Tek gen hastalıkları, basit kalıtım desenleri (otozomal resesif veya dominant) ve nispeten sade genetik etiyolojileri nedeniyle en iyi anlaşılan genetik bozukluklar arasında yer almaktadır [45]. Bu hastalıkların çoğu nadir görülse de, toplamda milyonlarca insanı etkilemektedir. En yaygın tek gen hastalıkları arasında kistik fibrozis, hemokromatozis, Tay-Sachs hastalığı ve orak hücreli anemi bulunmaktadır.

Bu hastalıkların temelinde çoğunlukla tek bir gen yer almakla birlikte, aynı hastalığa neden olabilecek birden fazla mutasyon bulunabilir. Bu mutasyonlar, hastalığın şiddeti ve fenotipinde farklılıklar yaratabilir. Hatta aynı mutasyonun bile bireyler arasında farklı fenotipik sonuçlara yol açabileceği gösterilmiştir. Bu farklılıklar; bireyin çevresel faktörleri ve hastalık fenotipini ya da seyrini etkileyebilecek diğer genetik varyasyonlarla ilişkilendirilmektedir. Örneğin, aynı *CFTR* (kistik fibrozis transmembran iletkenlik düzenleyici) gen mutasyonuna sahip çocuklarda, diğer genetik etmenlerin kistik fibrozis fenotipini değiştirdiği gösterilmiştir [46]. Buna ek olarak, bazı durumlarda —örneğin galaktozemi gibi hastalıklarda— farklı genlerdeki mutasyonlar benzer klinik fenotiplere neden olabilmektedir. Günümüzde pek çok tek gen hastalığı için genetik testler mevcut olmakla birlikte, özellikle aile öyküsü olmayan olgularda ayırıcı tanı sürecinde klinik değerlendirme kritik öneme sahiptir. Bazı genetik hastalıklarda erken tanı —özellikle yenidoğan taramaları yoluyla— mümkün olduğunda, hastalar semptomlar başlamadan önce tedavi edilebilir veya uygun diyet değişiklikleriyle semptomların gelişmesi önlenir. Ancak genetik etiyolojinin daha iyi anlaşılması ve tanı olanaklarının gelişmesine rağmen, bu hastalıkların büyük bir kısmı için hastalığın başlamasını önleyici ya da ilerleyişini durdurucu etkili bir tedavi hâlâ bulunmamaktadır [42, 43, 47].

2.2. Yenidoğan Taraması: Genetik Hastalıkların Erken Tespiti ve Yönetimi

Son on yılda genetik tanı teknolojilerindeki hızlı gelişmeler, yenidoğan ve bebeklerin en son teknolojilerle değerlendirilmesine olanak sağlamıştır (Tablo 1). Günümüzde, implantasyon öncesinde embriyodan alınan tek bir hücre üzerinde genetik test yapılabilmekte ve maternal plazmadan fetal DNA elde edilerek önemli genomik dengesizlikler değerlendirilebilmektedir. Genetiğin insan hastalıklarındaki rolüne ve bireylerin karmaşık hastalıklara yatkınlığı ile ilaçlar, toksinler ve enfeksiyöz ajanlar gibi çevresel tetikleyicilere karşı doğuştan gelen yanıtlarına ilişkin farkındalığın artmasıyla birlikte, klinisyenlerin bireyselleştirilmiş tıbbi uygulamaları ve pediatrik bakımda en uygun tanı ve tedavi yaklaşımlarını benimsemeleri büyük önem taşımaktadır [48].

Tablo 1 Yenidoğanlarda görülen çeşitli genetik bozuklukların klinik özellikleri ve bu bozuklukların tanısı için önerilen test yöntemleri

Bozukluk	Klinik ipuçları	Önerilen test
Down sendromu	Dismorfik özellikler, AVSD (<i>Atrioventriküler Septal Defekt</i>), hipotoni	Karyotip
Turner sendromu	Kistik higroma, boyun derisi yapışıklığı, CoA (<i>Aort Koarktasyonu</i>), HLHS (<i>Hipoplastik Sol Kalp Sendromu, nadir</i>), böbrek anomalileri	Karyotip
Trizomi 18	Dismorfik özellikler, büyüme geriliği, çok kapaklı kalp hastalığı, sıkı yumruklar	Karyotip
Trizomi 13	Büyüme geriliği, dudak/damak yarığı, mikroftalmi, kafa derisi kusurları, holoprosensefali, postaksiyal polidaktili	Karyotip

Cri-du-chat sendromu (5p minus)	Kedi gibi ağlama, yuvarlak yüz, mikrosefali, CVM (<i>Kardiyovasküler Malformasyonlar</i>)	Karyotip / Kromozomal mikroarray analizi
Cat-eye sendromu	TAPVR (<i>Total Anormal Pulmoner Venöz Dönüş</i>), TOF (<i>Tetraloji of Fallot</i>), anüs atrezisi, iris kolobomu, safra yolu atrezisi, bağırsak malrotasyonu, preauriküler	Karyotip / Kromozomal mikroarray analizi

Genetik testlerin en başarılı uygulama alanı, kuşkusuz tedavi edilebilir durumların erken tespiti amaçlayan yenidoğan taramasıdır. Her yıl milyonlarca semptom öncesi yenidoğan, sadece 3 mm’lik kuru bir kan örneği ile kritik genetik, endokrin, metabolik ve hemoglobin bozuklukları açısından test edilmektedir. Elektrosprey tandem kütle spektrometresi yöntemlerinin kullanımıyla, rutin kan taramaları 1990’lı yıllarda devlet destekli yenidoğan tarama programlarına dahil edilmiştir. Plazma amino asitleri, idrar organik asitleri, asilkarnitin profili ve amonyak düzeyleri gibi analizler, yenidoğan taramalarında tespit edilen metabolik bozuklukların doğrulanmasında önemli tanısal araçlar olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, konjenital adrenal hiperplazi, konjenital hipotiroidizm, kistik fibrozis, ağır kombine immün yetmezlik ve T-hücreli lenfopenisi gibi bozuklukların doğumda taranması, bu hastalıkların etkin şekilde yönetilmesi açısından kritik öneme sahiptir. Amerika Birleşik Devletleri’ndeki çoğu eyalette, American College of Medical Genetics’in (ACMG) oluşturduğu bir yenidoğan tarama uzman grubu tarafından belirlenen öneriler doğrultusunda, ebeveynler için vazgeçme hakkı saklı kalmak kaydıyla en az 29 birincil durum ve 25 önerilen ikincil hedef hastalık için zorunlu yenidoğan taraması yapılmaktadır [49].

3. Yenidoğan Teşhis Yöntemleri

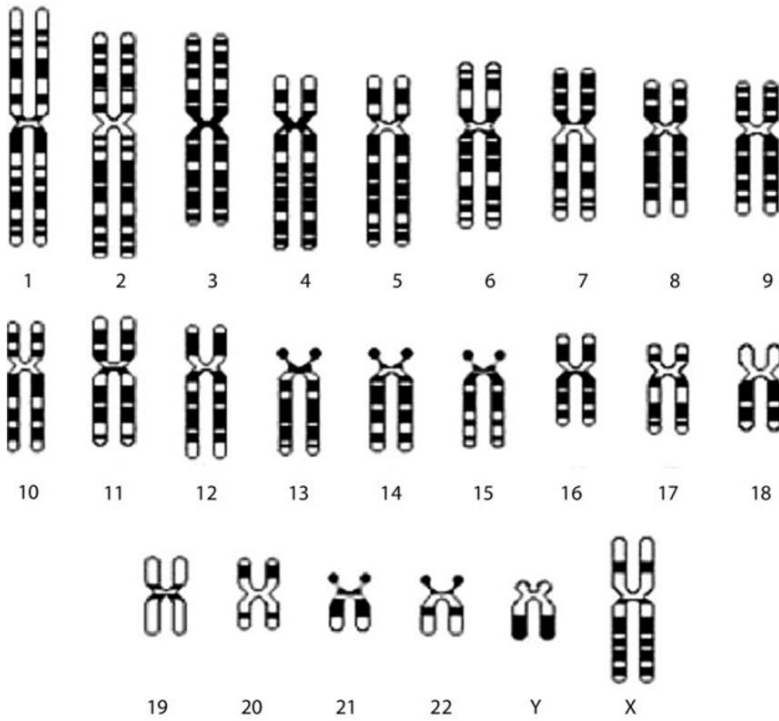
Genetik testler genellikle doğum öncesinde veya doğumdan hemen sonraki erken dönemde çeşitli durumların değerlendirilmesinde gereklilik arz eder. Özellikle gelişimsel gerilik, zihinsel yetersizlik, dismorfik özellikler, çoklu doğumsal anomaliler, kalp kusurları, boy kısalığı ve belirsiz genital yapı gibi erken büyüme ve gelişme sorunlarında, sağlık profesyonelleri tanıya

ulaşmak amacıyla genetik testlere başvurabilir. Bu testler, ölü doğum, yenidoğan ölümü ya da doğurganlık sorunlarının nedenlerini araştırmak isteyen çiftler ve aileler için de önemli bilgiler sağlayabilir. Ayrıca ileri yaşta (>35 yaş) gebe kalan kadınlarda kromozom anomalilerin dışlanması açısından da genetik testler değerlidir. Çoğu durumda bu testler, ailede bilinen bir kromozom anomalisi ya da monogenik (tek genle ilişkili) Mendel tipi bir hastalık öyküsü bulunması nedeniyle istenir [50, 51].

3.1. Sitogenetik Analiz Yöntemleri

Sitogenetik, kromozomal anomalilerin tespitine odaklanan klinik genetiğin bir alt uzmanlık alanıdır. Kromozomal bozukluklar, çeşitli ve tanınabilir anormal fenotiplere katkıda bulunabilir. Genetik laboratuvarlarda bu anomalilerin değerlendirilmesinde en sık başvuru testlerinden biri, karyotipleme olarak da bilinen kromozom analizidir. Bu test, sayısal anomalileri (kromozom kazancı veya kaybı) ve yapısal anomalileri—örneğin, DNA'nın kısmi delesyonları ve/veya duplikasyonları, dengeli karşılıklı translokasyonlar, Robertsonian translokasyonlar, perisentrik inversiyonlar, dengeli ya da dengesiz insersiyonlar, izokromozomlar, marker kromozomlar ve halka kromozomlar—tespit etmek amacıyla uygulanır. Bu tür testlerde kullanılan örnekler arasında periferik kan, deri fibroblastları, amniyotik sıvı, koryonik villus biyopsisi ve kordosentez yer alır. Numuneler, hücre bölünmesini teşvik eden özel koşullar altında kültüre edilerek hücrelerin mitotik metafaz evresinde durdurulması sağlanır. Bu evrede DNA, en yoğun ve kompakt yapısına ulaşır ve kromozom adı verilen ayırt edilebilir birimler hâline gelir (Şekil 1). Gamet hücreleri dışında, insan vücudundaki her hücre 44 otozom (22 çift) ve 2 cinsiyet kromozomu (XX veya XY) olmak üzere toplam 46 kromozom içerir. Analiz sırasında kromozomları mikroskop altında görünür hâle getirmek için çeşitli boyama teknikleri kullanılır. En yaygın kullanılan yöntem, Giemsa boyası ile işlenmiş kromozomlara uygulanan ve G-bantlama olarak bilinen tekniktir. G-bantlı kromozomlarda koyu bantlar gen açısından düşük, açık bantlar ise gen açısından zengin bölgeleri temsil eder. Her kromozomun kendine özgü bant deseni, yaklaşık 5–10 megabaz çifti çözünürlüğe sahip olup, eksik veya fazla parçaların saptanmasında referans niteliğindedir. Kromozom analizi genellikle 20 metafaz hücresinin incelenmesiyle gerçekleştirilir. Mozaiklik şüphesinde (örneğin Turner

sendromunda), analiz edilen hücre sayısı 30 ila 50'ye çıkarılır. Mozaiklik, anormal hücre bölünmeleri sonucu birden fazla hücre dizisinin—örneğin biri normal, diğerleri ekstra veya eksik kromozomlu—oluşmasıyla karakterizedir ve bu tür incelemelere mozaiklik çalışması adı verilir [50]. Kromozom analizinin bazı sınırlamaları bulunmaktadır. 550 bantlık çözünürlük seviyesinde, yalnızca yaklaşık 5–10 Mb'lık genomik dengesizlikler saptanabilir. Ortalama olarak, bu büyüklükteki delesyon ya da duplikasyonların tespit edilme duyarlılığı yaklaşık %70 olarak kabul edilmektedir. Özellikle bantlama deseninde değişiklik göstermeyen büyük yapısal bozukluklar gözden kaçabilir. Ayrıca bu testin uygulanabilmesi için genellikle taze doku örneği ve canlı hücre kültürü gereklidir. Bu durum, örneğin deri biyopsisinden fibroblast kültürü alınması gerektiğinde analiz süresinin 3–6 haftaya kadar uzamasına neden olabilir. Nadir durumlarda yeterli sayıda metafaz hücresi elde edilememesi, testin suboptimal sonuçlar vermesine yol açabilir. Ayrıca, submikroskopik delesyonlar ve duplikasyonlar, ince yapısal anomalilerin mozaikliği ile birlikte bu yöntemle tespit edilemeyebilir. Moleküler genetik mutasyonlara veya çevresel faktörlere bağlı anormallikler de bu teknikle saptanamaz. Tüm bu sınırlamalara karşın, kromozom analizinin en büyük avantajı, tek bir testle tüm genomun hem sayısal hem de yapısal anomaliler açısından değerlendirilmesine olanak sağlamasıdır [50].



Şekil 1 İnsan haploid karyotipinin diyagramatik gösterimi; X ve Y kromozomları cinsiyet kromozomları olarak yer almaktadır. Standart G-bantlama desenine özgü açık ve koyu bantlar gösterilmiştir; bu bantlar sırasıyla ökromatin (gen açısından zengin ve transkripsiyonel olarak aktif bölgeler) ve heterokromatin (gen açısından fakir ve genellikle inaktif bölgeler) bölgelerini temsil etmektedir [52].

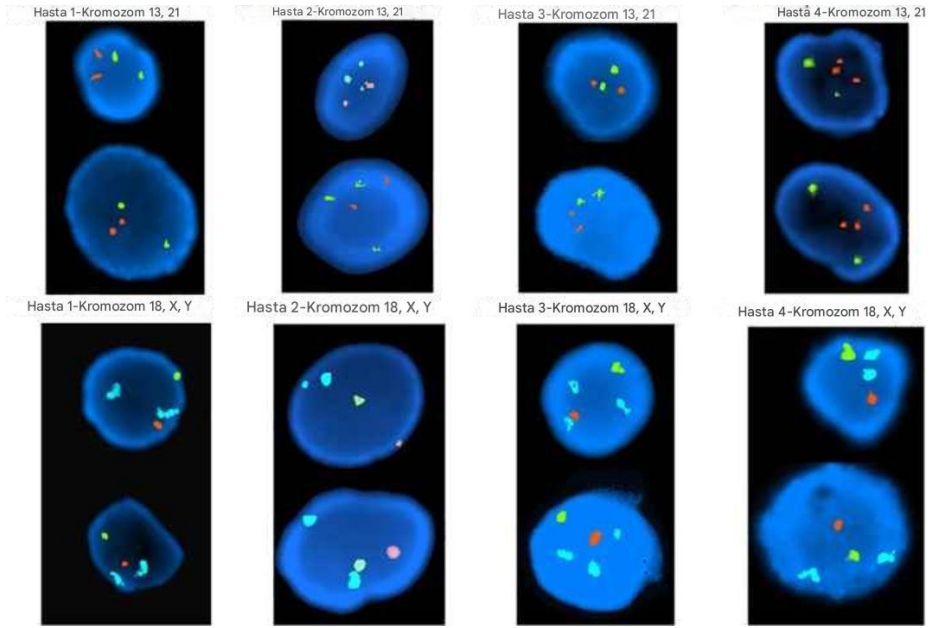
3.2. Moleküler Sitogenetik Analiz Yöntemleri

Floresan in situ hibridizasyon (FISH)

Yaygın olarak FISH testi olarak bilinen floresan in situ hibridizasyon, sitogenetik alanında modern teknolojinin kullanımına öncülük eden bir yöntemdir. FISH, floresanla işaretlenmiş problemlerin, hedef DNA veya RNA dizilerine spesifik olarak bağlanmasını (hibridizasyon) esas alır. Bu problemler, tamamlayıcı tek sarmallı nükleotid dizilerine bağlandıktan sonra hücreler veya dokular bir dizi yıkama işlemine tabi tutulur ve ardından preparatlar floresan mikroskop ile analiz edilir [53]. FISH uygulamalarında kullanılan problemler, farklı uyarılma ve emisyon özelliklerine sahip floresan moleküllerle etiketlenebilir. Bu sayede, kontrol problemleri de dâhil olmak üzere birden fazla problemin eşzamanlı olarak analiz edilmesi mümkün hâle gelir. Örneğin,

DiGeorge sendromu ile ilişkili 22q11.2 delesyonunun tespitinde iki FISH probu aynı anda kullanılır: Biri, genellikle silinmiş olan bölgeye hibridize olan ve turuncu floresan sinyal yayan lokusa özgü prob, diğeri ise kromozom 22q kolunun distal ucundaki belirli bir bölgeye bağlanan ve yeşil floresan yayan kontrol probudur (Şekil 2). Normal bir bireyde iki turuncu ve iki yeşil sinyal gözlenirken, delesyonun mevcut olduğu bireylerde bir turuncu ve iki yeşil sinyal tespit edilir; bu da 22q11.2 bölgesinin bir kopyasının eksik olduğunu gösterir.

Günümüzde FISH problemleri ve uygulamaları iki ana kategoriye ayrılmaktadır: Sentromerik problemler, özellikle halka kromozomlar veya marker kromozomların kökenini belirlemek amacıyla kullanılır. Lokusa özgü problemler ise belirli genetik hastalıklarla ilişkili olduğu bilinen özgül genomik bölgeleri hedef alır [50, 54, 55].



Şekil 2 Floresan in situ hibridizasyon (FISH), üst panelde sunulan 13 (yeşil) ve 21 (kırmızı) kromozomlarının sayısını tespit etmek için dört farklı erkek hastanın amniyotik sıvı örneğinden kültürlenmemiş interfaz hücreleri üzerinde kullanılmıştır. Alt panelde bulunan 18 (aqua), X kromozomu (yeşil) ve Y kromozomu (turuncu) sayısını tespit etmek için ek interfaz hücreleri incelenmiştir. Bu testte kullanılan tüm FISH problemleri sentromere özgü problemlerdir. Hasta 1 test edilen normal kromozom sayısına sahiptir, Hasta 2 trizomi 13 için pozitif, Hasta 3 trizomi 18 için pozitif ve Hasta 4 trizomi 21 için pozitif [50].

FISH çalışmalarının, kromozom analizine kıyasla en önemli avantajlarından biri; doku miktarının yetersiz olduğu durumlarda bile taze veya arşivlenmiş örneklerden, bölünmeyen (interfaz) hücreler üzerinde uygulanabilmesidir. Çoğu durumda, numunenin alınmasından itibaren 24–48 saat içinde sonuç elde edilebilir. FISH yöntemi, yalnızca hedeflenen bölgeler için geçerli olmak üzere, kromozom analizine kıyasla daha yüksek çözünürlük sağlar. FISH yönteminin sınırlamaları ise şu şekildedir; FISH ile elde edilen bilgiler oldukça spesifiktir ve yalnızca kullanılan prob(lar)ın hibridize olduğu genomik bölgelerle sınırlıdır. Prob tasarımına bağlı olarak, tek gen nokta mutasyonları, küçük insersiyon/delesyonlar, intragenik tandem duplikasyonlar ve 30 kb'den küçük boyuttaki kazanç veya kayıplar bu yöntemle tespit edilemeyebilir [50].

Kromozomal microarray (CMA)

Sitogenetik alanı, kromozomal mikro dizi analizi (CMA) ve tüm genom analizi için tek nükleotid polimorfizm (SNP) dizisi gibi yeni moleküler teknolojilerin ortaya çıkmasıyla yeniden canlanmıştır [56]. Bu teknolojiler, genetikçilerin laboratuvar tıbbını uygulama biçimini değiştirmiştir [57]. Sitogenetik dengesizlikler; doğum kusurları, gelişimsel gecikme, zihinsel engellilik, otizm spektrum bozuklukları, çoklu konjenital anomaliler, kalp kusurları ve anöploidi ile açıklanamayan diğer bozuklukların sık görülen nedenlerindendir [58, 59]. Birçok kromozomal anomalinin kromozomların sonunda meydana geldiği (telomer analizi ile) anlaşıldıktan sonra, kromozomal anomalilerin önemli bir bölümünü oluşturduğu fark edilmiştir. Bu anlayış ve bilgi birikimi, mikrodelsyonlar veya mikroduplikasyonlar olarak bilinen kopya sayısı varyantlarını (CNV'ler) tespit etmede, alternatif yöntemlere kıyasla üstün olan sitogenomik dizi metodolojilerinin uygulanmasıyla gelişmiştir. Tüm genom mikroarray analizi, idiyopatik gelişimsel gecikme ve/veya çoklu konjenital anomalilerden etkilenen pediatrik hastalara tanı koymaya çalışan klinisyenler tarafından hızla benimsenmiştir [60]. CMA analizi, tanısal verimi %3-5'ten %15-20'ye çıkararak, daha önce “nedeni bilinmiyor” olarak tanımlanan birçok genetik bozukluğa açıklama getirmiştir. Önceki yöntemlerden önemli bir fark, CMA için DNA'nın kullanılması ve canlı hücre kültürü gerekliliğinin ortadan kalkmasıdır. Böylece kültüre edilemeyen örnekler de dahil olmak üzere neredeyse her dokudan DNA analiz

edilebilmektedir. Mikro dizi analizleri genel olarak hedefli veya tüm genom dizisi şeklinde tasarlanabilir. Mikroarray testleri, tüm genom boyunca dağıtılmış ve sayıları binden iki milyona kadar değişen çoklu problemler kullanarak, tüm genomun yüksek çözünürlükte analiz edilmesini sağlar. Birden fazla ardışık problemden gelen sinyaller CNV'leri belirlemek için kullanılır. Günümüzde laboratuvarların çoğu oligonükleotid veya SNP tabanlı diziler kullanmaktadır.

Oligonükleotid tabanlı diziler, yaklaşık 60 baz çifti uzunluğunda problemlerden oluşur ve genomdaki kopya sayısı varyasyonlarını tespit etmek için tasarlanmıştır. Bu diziler, prob seçiminde esnekliğe izin vererek laboratuvarlara dizi içeriği ve prob yoğunluğunu özelleştirme olanağı sunar. Tüm genom oligonükleotid dizilerinde problemler genom boyunca dağıtılır. Haploinsufficient veya triplosensitive genler, tekrarlayan mikrodelsiyon/mikroduplikasyon sendromlarını, subtelomerik ve klinik önemi olan diğer bölgeleri içeren alanlar ise yüksek yoğunluklu prob kapsamına sahip olacak şekilde tasarlanmıştır [59, 61].

SNP tabanlı platformlar, daha kısa oligonükleotid problemler (yaklaşık 20–50 bp) ve tüm genom boyunca yüksek polimorfik SNP'lere hibridize olacak SNP tespit problemlerinin kombinasyonunu kullanır. SNP tespit problemleri, genomik materyalin kazanım veya kayıplarını belirlemede rol oynar. Ayrıca, allelik dengesizlikleri, olası akrabalık izleri veya uniparental disomi (UPD) gibi durumların tespitinde kritik öneme sahiptir. Heterodizomi tespiti, proband ve her iki ebeveyni içeren üçlü çalışmayı gerektirir [62]. UPD, belirli bir kromozomun iki kopyasının aynı ebeveynden gelmesi durumudur ve büyüme ile gelişmeyi etkileyen ciddi klinik durumlara yol açabilir; özellikle 6, 7, 11, 14 ve 15. kromozomlarda görülür [63].

Şu anda, ACMG ile diğer profesyonel tıp kuruluşları, gelişimsel gecikme, zihinsel engellilik ve otizm spektrum bozukluğu olan bireylerde klinik olarak anlamlı kromozomal materyal kazanım veya kayıplarını araştırmak için ilk test olarak kromozomal mikro dizi analizini önermektedir. Ayrıca, Amerikan Obstetrisyenler ve Jinekologlar Koleji (ACOG), şüpheli konjenital anomali vakalarında invaziv test uygulanan gebelerde, geleneksel karyotip analizi yerine ilk aşama tanı testi olarak kromozomal mikroarray'i tavsiye etmektedir [64, 65]. Genel olarak, özellikle doğum öncesi dönemde,

pozitif sonuçlar ailelere eğitimli genetikçiler veya genetik danışmanlar tarafından titizlikle açıklanmalı ve danışmanlık verilmelidir [66].

Sınırlamaları ise; genomik mikroarrayler yalnızca kromozomal dengesizlikleri tespit edebilir. Parasentrik veya perisentrik inversiyonlar, dengeli insersiyonlar, dengeli translokasyonlar ve Robertsonian translokasyonlar gibi dengeli yeniden düzenlemeler bu yöntemle tespit edilemez. Ayrıca, düşük seviyeli mozaiklik (%10-20'den az), tek gen nokta mutasyonları (%1'den az), epigenetik modifikasyonlar ve çevresel faktörlerin klinik fenotipe etkisi mikroarray ile tespit edilemez. Test nispeten pahalıdır ancak sonuçlar zamanında ve etkili sunulduğu için, genel tanı veriminin karyotip analizi veya FISH'e kıyasla (%3-5) %10-20'ye yükselmesi nedeniyle maliyet-fayda dengesi pozitifdir [50].

3.3. Moleküler Genetik Analiz Yöntemleri

İnsan genomu yavaş ancak sürekli bir şekilde değişim göstermekte ve bu değişiklikler türlerin evrimi için büyük önem taşımaktadır. İnsan genomunda bulunan varyasyonlar ağırlıklı olarak iki ana sınıfa ayrılır: Kopya Sayısı Varyasyonları (Copy Number Variations - CNV'ler) ve Tek Nükleotid Polimorfizmleri (Single Nucleotide Polymorphisms - SNP'ler). İnsan genomu yaklaşık 3 milyar baz çiftinden oluşmaktadır. 1000 Genom Projesi Konsorsiyumu gibi girişimler, 26 farklı popülasyondan 2.504 bireyin tüm genom ve ekzom dizilemesini gerçekleştirmiş ve geniş bir genetik varyasyon yelpazesi ortaya koymuştur. Bu çalışmada toplam 84,7 milyon SNP, 3,6 milyon kısa insersiyon/delesyon (indel) ve 60.000 yapısal varyant olmak üzere 88 milyondan fazla varyant tespit edilmiştir [67]. Buna rağmen, iki farklı insan genomu DNA baz çifti düzeyinde karşılaştırıldığında, yaklaşık %99,9 oranında aynıdır. Kalan %0,1'lik kısımda ise her bireyi benzersiz kılan genetik varyantlar yer almaktadır [68]. Bu varyantların çok küçük bir kısmı, insan genetik hastalıklarında önemli rol oynayan değişiklikleri içermektedir. Moleküler genetik tanı testleri, tek baz çifti değişiklikleri, küçük delesyonlar, duplikasyonlar veya insersiyonlar, büyük intragenik yeniden düzenlemeler, intronik değişiklikler ve üçlü tekrarların kopya sayısındaki değişiklikler gibi küçük varyantları tespit etmeye odaklanır. Üçlü tekrarların genişlemesi, trinükleotid tekrar bozukluklarının temel biyolojik mekanizmasını oluşturur. Bir varyant hastalıkla ilişkilendirildiğinde, bu varyantlar patojenik varyantlar

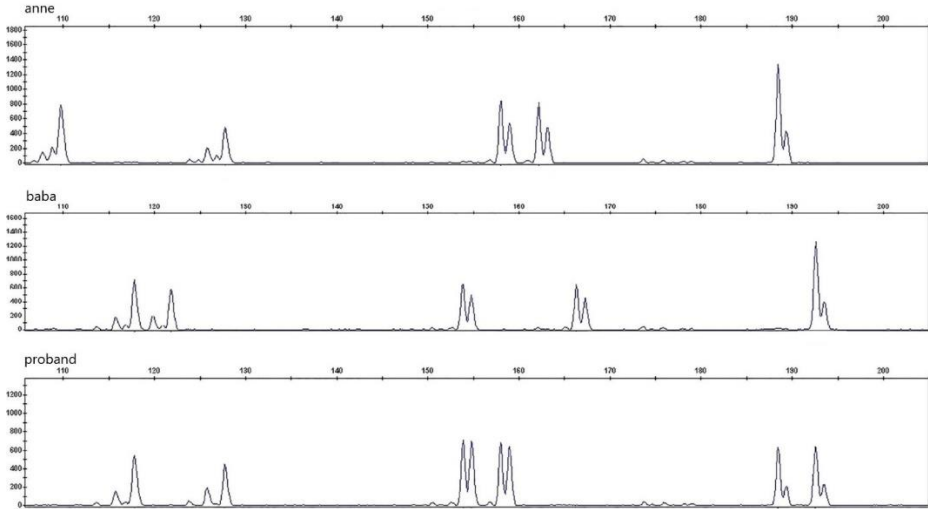
veya hastalığa neden olan mutasyonlar olarak adlandırılır. Moleküler genetik laboratuvarları, insan genomundaki kalıtsal ve de novo değişiklikleri incelemek ve patojenik varyantları belirlemek amacıyla çeşitli teknikler ve protokoller kullanmaktadır [50].

PCR (DNA) fragman boyutu analizi

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) amplifikasyonu, delesyon çalışmalarından gen dizilemeye kadar birçok moleküler analiz için ilk ve temel adımdır. PCR'nin temel amacı, ileri analizler için insan DNA'sında belirli bir segmentin çok sayıda kopyasını oluşturmaktır. Laboratuvarlar, ilgilenilen bölgeyi çevreleyen ve primer adı verilen, yaklaşık 19-27 baz çifti uzunluğunda, kısa ve tamamlayıcı dizilerden (ileri ve geri primer) oluşan son derece spesifik ve benzersiz çiftler tasarlar. PCR reaksiyonu primerler, DNA şablonu, DNA nükleotidleri (yapı taşları), tampon çözeltiler ve DNA polimeraz enzimi içerir. PCR ile çoğaltılan DNA parçaları, özel jel boyalarıyla işaretlenip, DNA parçalarını boyutlarına göre ayıran jel elektroforezi yöntemiyle görselleştirilebilir. Yanında DNA merdiveni (standart) bulunan örnekler, parça boyutlarının çok yakın bir tahminini sağlar.

Uniparental disomi (UPD) [63] şüphesi olduğunda veya zigosite çalışmalarının gerektiği durumlarda, PCR parça büyüklüğü analizi yöntemi kullanılır. Bu yöntemde, testin geri dönüş süresini, özgüllüğünü, sonuçların doğruluğunu ve yorumlanmasını iyileştirmek amacıyla birkaç modifikasyon yapılır; ancak temel prensip aynıdır. Her primer çiftindeki ileri primerler, floresan moleküllerle (floroforlarla) etiketlenir (Şekil 3). Jel elektroforezin yerini kapiler elektroforez alır. Örneğin, kromozom 14'ün maternal UPD'si (Temple sendromu) veya paternal UPD'si (Kagami-Ogata sendromu) şüphesi durumunda, testin amacı kromozom 14'ün iki kopyasının aynı ebeveynden gelip gelmediğinin belirlenmesidir (Şekil 3). Kısa tandem tekrar belirteçleri (örneğin CA tekrarları) içeren diziler, floresan etiketli ileri primerlerle PCR ile çoğaltılır. Aynı anda iki ila dörtten fazla lokusun test edilmesine olanak sağlamak için farklı floresanlar kullanılabilir. PCR ile çoğaltılan hedef diziler kromozom 14 boyunca dağılmıştır. Kapiler elektroforez yapılır ve sinyaller dahili merdiven kontrolü kullanılarak analiz edilir; böylece her bir parçanın boyutu belirlenir. Probandın sonuçları ebeveynlerin sonuçları ile karşılaştırılarak, hangi ebeveyne ait olduğu tespit edilir. Teşhis için en az iki

tam bilgilendirici lokusun elde edilmesi önerilir. Bu yöntemin de diğer yöntemlerde olduğu gibi sınırlamaları vardır; negatif sonuçlar, bu yöntemle tespit edilemeyen diğer genomik hastalıklara neden olan varyantların varlığını dışlamaz [50, 69, 70].



Şekil 3 Şüpheli bir UPD14 vakasında kısa tandem tekrar (STR) belirteçleri için multipleks kantitatif floresan-polimeraz zincir reaksiyonu (QF-PCR). Görüntü, proband ve ebeveynlerinden alınan DNA örneklerinde (D14S1007, D14S611 ve D14S581) test edilen 14. kromozomdan dokuz polimorfik belirteçten üçü için sonuçları temsil etmektedir. X eksen, dahili şerit standardı kullanılarak belirlenen baz çifti cinsinden PCR ürünlerinin uzunluğunu, y eksen ise keyfi birimler cinsinden floresan yoğunluğunu göstermektedir. Probanddaki kromozom 14'ün biparental kökeni, kalıtsal alleller ve STR belirteçlerinin kromozom konumu analiz edilerek çıkarılabilir. Sunulan üç belirteç için de proband bir kopyayı anneden, bir kopyayı da babadan almıştır [50].

Restriksiyon parçası uzunluk polimorfizmi (RFLP) analizi

Bu tür testler, DNA'yı restriksiyon bölgeleri olarak adlandırılan kısa ve spesifik dizilerde kesme yeteneğine sahip restriksiyon enzimlerinin kullanımına dayanır. Testler, genomik DNA'nın tamamı veya belirli bir bölümü üzerinde uygulanabilir. Klinik laboratuvarlar, maliyet ve zaman açısından verimli testler tasarlamak ve bireyin ailesinde görülen bir hastalıkla ilişkili genlerde varyant taşıyıp taşımadığını belirlemek amacıyla restriksiyon enzimlerinin bu özelliklerinden yararlanır. RFLP analizi, *HFE* geni olarak bilinen insan homeostatik demir düzenleyici geninde, kalıtsal hemokromatoz

ile ilişkili olduğu bilinen p.C282Y ve p.H63D amino asit değişikliklerini incelemek için kullanılır. Bu test, HFE geninin DNA segmentlerini aynı anda ve yüksek özgüllükle çoğaltmak için multipleks PCR amplifikasyonu (Adım 1) ve ardından restriksiyon endonükleaz sindirimi (Adım 2) olmak üzere iki aşamalı bir süreçtir. PCR ürünleri restriksiyon endonükleaz sindirimine tabi tutulduktan sonra, oluşan fragmanlar jel elektroforezi ile analiz edilir. Hastalıkla ilişkili sindirilememiş parçalar daha büyük boyuttadır ve sindirilmiş ürünlere göre jelde daha yavaş hareket eder. Bu yöntemin en büyük dezavantajlarından biri, dayanıklılığının sınırlı olması ve çok sayıda örneğin kısa sürede analiz edilememesidir [71, 72].

Çoklu ligasyon bağımlı prob amplifikasyonu

Multiplex ligasyon bağımlı prob amplifikasyonu (MLPA), genomik DNA veya RNA'daki anormal kopya sayılarını tespit edebilen, (kısmi) intragenik gen delesyonları veya duplikasyonlarının neden olduğu genetik hastalıkların laboratuvarlarda tespit oranını önemli ölçüde artıran multipleks PCR tabanlı bir yöntemdir [73]. Spinal kasiler atrofi (SMA), DiGeorge sendromu, Duchenne kasiler distrofi gibi çeşitli genetik durumları hedefleyen 300'den fazla prob seti ticari olarak mevcuttur.

SMA, ilerleyici iskelet kası güçsüzlüğü, genel güçsüzlük, atrofi ve felçle sonuçlanan otozomal resesif, nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalık, başlangıç yaşına ve klinik seyrine göre Tip I (ağır), Tip II (orta) ve Tip III (hafif) olmak üzere üç klinik kategoriye ayrılır. Etkilenen hastaların yaklaşık %95'inde *SMN1* geninin 7. ekzonunda homozigot delesyon bulunmaktadır. Komşu *SMN2* geni, *SMN1* geni ile çok yüksek sekans homolojisi paylaşır ve *SMN2* kopya sayısının SMA'nın klinik fenotipini modüle ettiği gösterilmiştir [73]. MLPA testi birkaç adımdan oluşur. İlk adım, spesifik problemlerin genomik DNA'ya hibridizasyonudur. SMA MLPA kiti, *SMN1*'e özgü ekzon 7 probu (274 nt) ve *SMN2*'ye özgü ekzon 7 probu (281 nt) içerir; bu problemler, bağlanma bölgelerindeki ekzon 7'deki kritik tek nükleotid farkı sayesinde *SMN1*'i *SMN2*'den ayırır. İkinci adım, bitişik problemlerin ligasyonu ve ardından PCR amplifikasyonudur (Adım 3). Bu testin benzersiz özelliği, bağlanan problemlerin PCR reaksiyonu için şablon olarak kullanılması ve üssel olarak çoğaltmasıdır. Bu da PCR ürünlerinin, hedef dizilerin sayısının doğrudan bir ölçüsü olduğu anlamına gelir. PCR ürünleri kapiler elektroforez ile ayrılır ve elde edilen pik

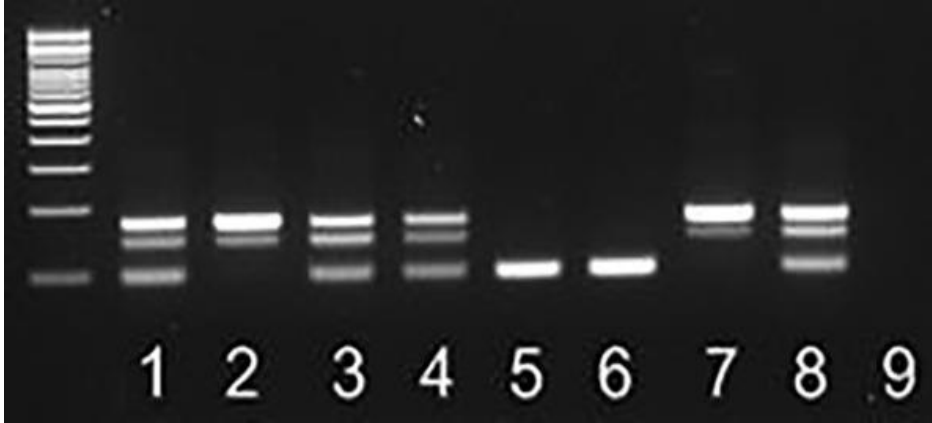
paterni referans numunelerinki ile karşılaştırılarak veriler analiz edilir [74, 75]. Sınırlamaları ise testin SMA hastalarının yaklaşık %95'inde *SMN1* geninin 7. ekzonunun homozigot delesyonunu doğru şekilde tespit etse de, geri kalan hastalarda nokta mutasyonu nedeniyle *SMN1* geninin tek kopyası inaktif olabilir. MLPA testi bu vakaları tespit edemez. Ayrıca, normal polimorfik varyasyonlar prob bağlanmasını etkileyebilir ve yanlış pozitif sonuçlara yol açabilir [50].

Metilasyon PCR

CpG adalarındaki DNA metilasyon paternleri, hücrelerin baskılanmış (imprinted) genlerin ekspresyonunu düzenlediği temel mekanizmalardan biridir. CpG adaları, tüm genom ortalamasına göre yüksek G + C içeriğine ve yoğun CpG dinükleotid sıklığına sahip uzun düzenleyici DNA bölgeleridir. Baskılanmış genler, hangi ebeveyne ait allelin ifade edileceğini epigenetik olarak belirleyen genlerdir [73]. Prader-Willi sendromu (PWS) ve Angelman sendromu (AS), 15q11-q13 bölgesindeki baskılanmış genlerin ekspresyon kaybı sonucu ortaya çıkan, klinik olarak ayırt edilebilir iki nörogelişimsel bozukluktur [73]. PWS'de baba kaynaklı allelde; AS'de ise aynı kromozom segmentindeki anne kaynaklı allelde işlev kaybı meydana gelir. Bu nedenle, klinik kuşku durumunda tanıyı doğrulamak için genetik test yapılması şiddetle önerilir [76].

PWS ve AS'nin farklı moleküler mekanizmalarla gelişmesi nedeniyle, tanı amacıyla çeşitli sitogenetik ve moleküler testler uygulanabilir. SNRPN lokusuna yönelik metilasyona özgü PCR, ilk basamak tanısal testler arasında yer alır; PWS olgularının %99'undan fazlasını, AS olgularının ise yaklaşık %80'ini saptar. Bu test, SNRPN lokusundaki sitozin kalıntılarının anne allelinde %96'dan fazlasının metillenmiş, baba allelinde ise metillenmemiş olmasına dayanır. Sodyum bisülfid işlemi: Probandın DNA'sındaki metillenmemiş sitozinler urasile dönüştürülür. Spesifik PCR: Anne ve baba allellerine özgü primerlerle amplifikasyon yapılır; anne alleleline ait 174 bp'lik, baba alleleline ait 100 bp'lik ürünler elde edilir (Şekil 4). Normal kontrollerde her iki bant da amplifiye olur. PWS olgularında yalnızca maternal bant, AS olgularında ise yalnızca paternal bant amplifiye olur [76]. Sınırlamaları ise şu şekildedir; metilasyona özgü PCR, AS olgularının yaklaşık %10'unu oluşturan *UBE3A* nokta mutasyonlarını ya da nadir intragenik ekzonik delesyonları tespit

edemez. Yöntem tanıyı doğrulasa da altta yatan hastalık mekanizması (delesyon, uniparental disomi, imprinting merkezi kusuru) hakkında ek bilgi sağlamaz [50].

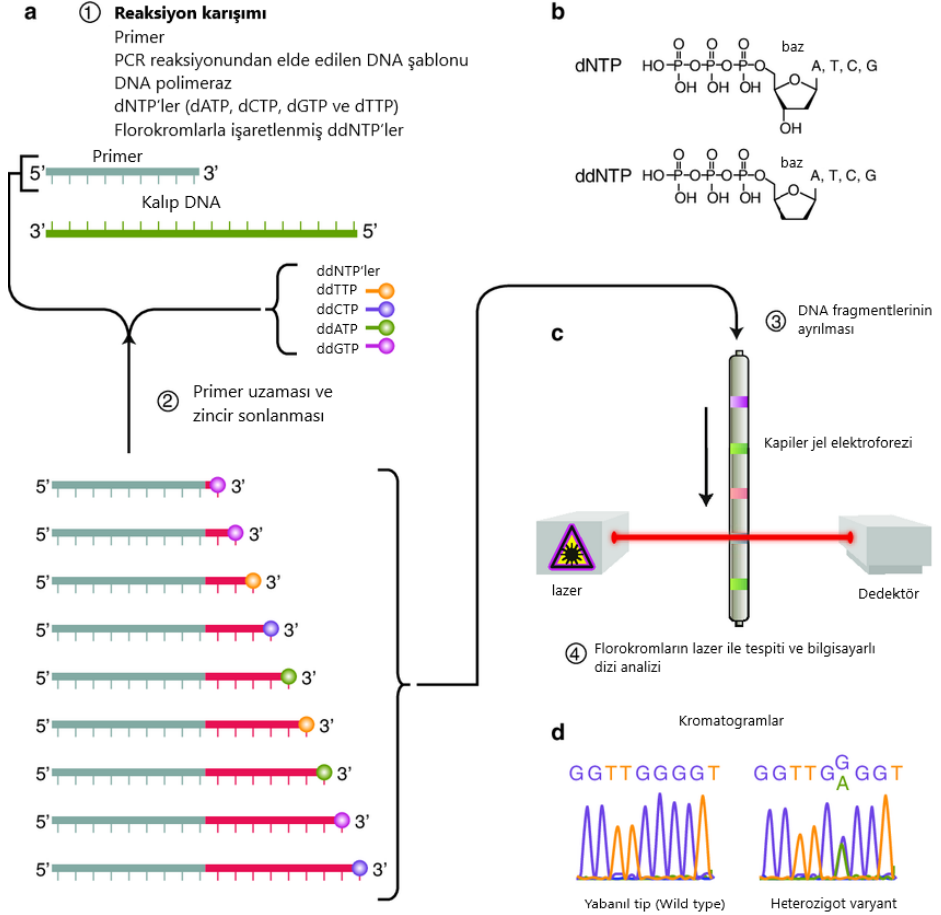


Şekil 4 SNRPN lokusunun metilasyona özgü PCR (MS-PCR) analizinin agaroz jel elektroforezi. Soldan sağa doğru: 500 bp işaretli DNA merdiveni, en küçük bant boyutu 100 bp'ye eşittir; 1, 3 ve 4: normal hasta örnekleri; 2: PWS için pozitif hasta DNA'sı; 5: AS için pozitif hasta DNA'sı; 6: AS için pozitif kontrol; 7: PWS için pozitif kontrol; 8: normal örnek için kontroller; 9: negatif PCR kontrolü. AS, Angelman sendromu; PWS, Prader-Willi sendromu [50].

Sanger dizileme ile tek gen analizi

Genel olarak Sanger dizilemesi olarak bilinen *Sanger dideoksi terminatör DNA dizileme yöntemi*, hastalığa neden olan varyant genlerin tüm kodlayıcı dizilerini analiz etmek amacıyla kullanılan bir laboratuvar tekniğidir. Bu yöntem, tek baz değişiklikleri, birkaç baz çifti içeren delesyonlar/duplikasyonlar gibi küçük dizi değişikliklerini tespit etmede altın standart olarak kabul edilir. Örneğin, bu yöntem kistik fibrozis ile ilişkili olan *CFTR* geninin 27 kodlayıcı ekzonundaki varyantları tespit etmek için yaygın olarak kullanılır. Ekzonlar, genin, sitoplazmada bulunan ribozomlar tarafından proteine çevrilecek bölgeleridir. Patojenik varyantlar; protein fonksiyonunu, ekspresyon düzeyini (dozaj), proteinin hücre içi taşınmasını (örneğin membran proteinleri için) ve diğer birçok biyolojik süreci etkileyebilir. Her bir ekzonun DNA dizisini analiz etmenin ilk adımı PCR amplifikasyonudur. Bunu, çift yönlü (bidirectional) dizileme analizi izler. Bu aşamada, PCR ürünleri kapiler elektroforez aracılığıyla bir dizileme analizöründe işlenir. Dizileme, floresan etiketli ddNTP'ler kullanılarak gerçekleştirilir. Dizileme reaksiyonu şu

bileşenleri içerir: PCR ile çoğaltılmış DNA şablonu, etiketsiz ileri veya geri primer, uygun tampon, dört dNTP (normal nükleotid), dört floresan etiketli ddNTP (dideoksinükleotid) ve DNA polimeraz enzimi. Polimeraz enzimi, her biri farklı renk taşıyan floresan boyalarla işaretlenmiş ddNTP'leri dahil ederek farklı uzunlukta DNA fragmanları oluşturur. Tüm bu sonlandırılmış fragmanlar (bir ddNTP ile bitenler), 3' uçlarında floresan boya içerir. Ortaya çıkan dizileme ürünleri bir yazılım aracılığıyla analiz edilir; bu yazılım, baz dizisini doğrudan görselleştirir ve her bir nükleotidin DNA dizisindeki konumunu "heceleyerek" gösterir [77] (Şekil 5). Sonuçta elde edilen nükleotid dizisi, insan referans genomuyla karşılaştırılarak herhangi bir baz değişikliği ya da varyantın varlığı saptanabilir. Genetik topluluklar, özellikle bebeklik veya çocukluk çağında ortaya çıkan ciddi hastalıklarla ilişkili varyantları içeren genetik varyant veri tabanları oluşturmaktadır. Örneğin, bugüne kadar *CFTR* geninde tanımlanmış 1.700'den fazla varyant bulunmaktadır. Bunların bazıları yaygınken, bazıları nadir görülür ve yalnızca birkaç bireyde tanımlanmıştır [78]. Sanger dizilemesinin sınırlamaları ise, özellikle küçük mutasyonların tespiti için uygundur; ancak, büyük genomik yeniden düzenlemeler, gen düzeyinde delesyonlar/duplikasyonlar gibi kopya sayısı varyasyonlarının (CNV) tespiti için yeterli değildir. Diğer sınırlamalar arasında: Düşük verim, yüksek maliyet, birden fazla genin analiz edilmesi gerektiğinde yöntemin zahmetli ve zaman alıcı olması sayılabilir. Ayrıca, gen dizilemesinden elde edilen negatif sonuçlar, dokuya özgü mutasyonları veya somatik mozaiklik olasılığını dışlamaz. Daha teknik bir sınırlama olarak, Sanger dizileme yöntemi yaklaşık %10–15'lik bir tespit eşiğine sahiptir. Bu da, bir mutasyonun DNA moleküllerinin %10–15'inden daha azında bulunması durumunda algılanamayacağı anlamına gelir [79].



Şekil 5 Floresanla işaretlenmiş ddNTP'ler ile Sanger dizileme.

- (a) Sanger dizilemesi için gerekli reaktifler.
 (b) dNTP ile ddNTP arasındaki yapısal farkın gösterimi.
 (c) Uzunlaşmış fragmanların kapiler jel elektroforezi ve eklenmiş floresanla işaretli bazın lazer ile tespiti.
 (d) Çıktıya kromatogram biçiminde bir örnek; aynı dizilim, biri yabani tip olan bir bireyden, diğeri ise heterozigot G'den A'ya geçiş (substitüsyon) taşıyan bir bireyden gösterilmektedir [80].

Yeni nesil dizileme (NGS)

Dizileme teknolojileri, bir seferde birden fazla genin analiz edilmesine duyulan ihtiyaç nedeniyle son yıllarda hızla gelişmiş ve yaygınlaşmıştır. Günümüzde dizileme platformları, masif paralel dizileme (Massively Parallel Sequencing) veya NGS (Next Generation Sequencing) adı verilen yöntemlerle,

tek bir hücrenin tüm genomunu dizileyebilmektedir [79]. NGS teknolojilerinin birçok uygulaması klinik laboratuvarlara taşınmış, bazıları ise hâlen doğrulama aşamasındadır. NGS ile hâlihazırda üç ana analiz seviyesi gerçekleştirilebilmektedir: hastalık odaklı gen panelleri, tüm ekzom dizileme (WES) ve tüm genom dizileme (WGS). Bir NGS analizinin temel aşamaları DNA ekstraksiyonu, kütüphane hazırlama, hedef zenginleştirme, sekanslama ve veri analizinden oluşur. DNA; formalinle fikse edilmiş parafine gömülü dokular da dâhil olmak üzere, çeşitli örnek türlerinden izole edilebilir. Kütüphane hazırlama aşamasında; genomik DNA parçalara ayrılır ve bu parçaların uçlarına adaptörler eklenerek dizileme işlemine hazır hâle getirilir. Hedef zenginleştirme yalnızca hedefli ekzom dizileme ve gen panelleri için uygulanır ve bu işlem, hedef bölgelerin tamamlayıcı dizilere hibridizasyonu ya da PCR amplifikasyonu ile sağlanır [81]. Dizileme sırasında DNA parçaları sabitlenir ve ardından, yeterli sinyal yoğunluğu elde edilebilmesi için klonal olarak çoğaltılır. Sekanslama, sentez yoluyla dizileme (sequencing-by-synthesis) yöntemiyle gerçekleştirilir; bu yöntem, Sanger dizilemesine benzer prensiplere dayanır. Dizileme işlemi DNA'nın her iki ucunda da yapıldığında bu "eşleştirilmiş uç okumaları" (paired-end reads) olarak adlandırılır [82]. Elde edilen ham veriler, çok katmanlı biyoinformatik analizlerden geçirilir. Varyant yorumlama süreci, gen paneli gibi hedefli analizlerde daha basitken, analiz kapsamı genişledikçe (örneğin ekzom veya genom dizilemesi gibi) yeni ya da nadir varyantların bulunma ihtimali arttığından daha karmaşık hâle gelir. Farklı laboratuvarlar, varyantların saptanması ve yorumlanmasını kolaylaştırmak ve standartlaştırmak amacıyla çeşitli rehberler yayımlamıştır [83].

Hastalık hedefli gen panelleri, yalnızca hastalıkla ilişkili olduğu bilinen genleri inceler. Bu paneller, daha yüksek sekanslama derinliği ($>500\times$), özelleştirilebilir içerik, SNP'ler ile ekleme/silme varyantlarını saptayabilme, daha uygun maliyet, yüksek analitik hassasiyet ve özgüllük gibi avantajlara sahiptir. Yüksek derinlik, özellikle heterozigot varyantların ve mozaik durumların daha güvenilir biçimde tespitine olanak tanır. Ayrıca, veri hacmi daha yönetilebilir düzeydedir; bu da özellikle tüm genom dizilemenin oluşturduğu veri yüküyle karşılaştırıldığında önemli bir avantajdır [84, 85].

Tüm ekzom dizileme (WES), genomun protein kodlayan bölgelerini analiz eder. Ekzom, genomun yalnızca %1-2'sini oluştursa da, bilinen hastalık

yapıcı mutasyonların yaklaşık %85'i bu bölgelerde yer almaktadır. Son çalışmalar, WES'in tanı konulamamış nadir hastalıkların yaklaşık %20-25'inde tanısal katkı sağladığını göstermektedir. Sekanslama derinliği genellikle $50\times$ - $100\times$ üzerindedir ve SNP, insersiyon/delesyon ile yapısal varyantları tespit edebilir. WES'in tanısal verimi %20-30 arasında değişmekte olup, tanı konulamamış vakaların yaklaşık dörtte birinde hastalığa neden olan varyantları ortaya çıkarabilmektedir [83, 86].

Tüm genom dizileme (WGS), nükleer ve mitokondriyal DNA da dâhil olmak üzere, kodlayan ve kodlamayan tüm genom bölgelerini kapsar. Kodlamayan bölgelerin dahil edilmesiyle SNP'lerin yanı sıra, gen ekspresyonunu düzenleyen promotör, enhancer ve silencer gibi bölgeler; splicing ile ilişkili intronik alanlar ve kodlamayan düzenleyici RNA'lar hakkında bilgi edinilebilir. Bu yöntem genellikle $30\times$ ve üzeri derinlikte gerçekleştirilir. Ancak veri analizinin karmaşıklığı ve yüksek maliyetleri nedeniyle, WGS mevcut seçenekler arasında en pahalı olanıdır ve çoğu durumda sağlık sigortaları tarafından karşılanmamaktadır. Ayrıca, tespit edilen varyantların patojenitesini belirlemek genellikle oldukça zordur [87, 88].

NGS, günümüz tıbbi genetik laboratuvarlarında kullanılan en ileri teknolojilerden biri olsa da, hâlâ tam kapsamlı bir yöntem değildir. Sınırlamaları; genomdaki uzun tekrarlayan diziler gibi bazı bölgeler hâlen dizileme veya analiz açısından zorluk teşkil etmektedir. Bunun yanı sıra, mevcut bilgi eksiklikleri ya da işlevsel testlerin bulunmaması gibi nedenlerle nadir veya yeni varyantların klinik yorumlanması güç olabilir ve bu varyantlar "belirsiz klinik öneme sahip" olarak raporlanmak zorunda kalabilir. Yapısal gen değişiklikleri ve kopya sayısı varyantları gibi bulgular, çoğu zaman ek testlerle doğrulama gerektirir. Bu ise hem maliyetleri artırmakta hem de hastalar ve aileler için ilave psikolojik yük oluşturmaktadır. Genetik verilerin klinik pratiğe entegrasyonu da hâlen bazı zorluklar içermektedir. Bu ve burada yer verilmeyen diğer sınırlılıkların aşılması, NGS'nin gelecekte tüm klinik olarak anlamlı genetik varyantları saptamak için tek başına yeterli bir yöntem olabilmesi açısından kritik önem taşımaktadır [86, 89].

4. Gelişmiş Tarama ve Genetik Analiz Yöntemleri: Real Time PCR ve Dijital PCR Uygulamaları

Trizomi 18 (T18) ve Trizomi 21 (T21) taşıyan bireylerde, başka sağlık sorunlarının ortaya çıkma riski artmıştır. Bu bireylerde yarık dudak ve damak gibi konjenital anomalilerin yanı sıra Down sendromu ve Frajil X sendromu gibi çeşitli genetik sendromlar da görülebilir [90]. Moleküler belirteçler, 1. ve 2. bölümlerde açıklandığı üzere, bir organizmada belirli bir hastalık ya da fizyolojik durumun göstergesi olarak hizmet eden özgül genetik veya biyokimyasal değişikliklerdir. Moleküler belirteçlerin anlaşılmasındaki ilerlemeler, doğum öncesi tarama uygulamalarında kullanılabilecek yeni biyobelirteçlerin tanımlanmasını sağlamıştır (Tablo 3) [91]. Trizomi 18 ve 21 için potansiyel biyobelirteçlere yönelik çalışmaların ele alındığı bir incelemede, kullanıcı dostu cihazlar ve platformlar da dahil olmak üzere çeşitli teknolojik yenilikler değerlendirilmiştir. Bu bağlamda, hücresiz DNA (cfDNA), invazif olmayan yapısı ve geleneksel yöntemlere kıyasla daha yüksek doğruluğu nedeniyle dikkat çekmektedir. cfDNA testleri, anneden alınan kan örneğinde dolaşan fetal DNA'nın analizine dayanır ve belirli genetik anormalliklerin tespitini mümkün kılar [92]. Bu test, gebeliğin 10. haftası gibi erken bir dönemde uygulanabilmekte ve anne-baba adaylarına zamanında bilgi sağlayarak tanı sürecine katkıda bulunmaktadır [93]. Günümüzde cfDNA testleri için üç temel yöntem kullanılmaktadır: kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR), sekanslama tabanlı testler ve mikroyarray tabanlı analizler. Her yöntemin kendine özgü avantajları ve sınırlamaları bulunmakla birlikte, genel olarak cfDNA testlerinin T18 ve T21'in tespitinde umut verici sonuçlar verdiği bildirilmiştir [94]. Prenatal tarama kapsamında araştırılan diğer yeni biyobelirteçlerden biri de anne kanında bulunan fetal DNA'dır. Fetal DNA, gebelik süresince annenin dolaşım sisteminde saptanabilir. Bu DNA'nın analizi sayesinde gelişmekte olan fetüste mevcut olabilecek genetik anomalilerin belirlenmesi mümkün hâle gelir. Bu yaklaşım, T18 ve T21'in doğum öncesi taramasında doğruluğu ve güvenilirliği artırma potansiyeli taşımaktadır [95].

Tablo 3 T18 tanısında sıklıkla kullanılan biyokimyasal belirteçler;

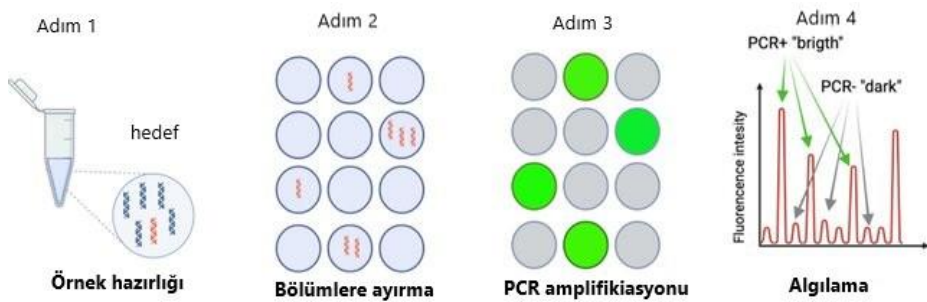
Ketojenik asit seviyeleri	Yağ parçalanmasının asidik yan ürünleri olan keton seviyelerindeki artış, T18'den etkilenen bireylerin kanında tespit edilebilir. Bununla birlikte, bu belirtecin T18'e özgü olmadığını ve diyabetik ketoasidoz gibi diğer durumlarda da mevcut olabilir [96].
Yüksek immünoreaktif tripsinojen	T18 hastalarının kanında sindirim sürecinde rol oynayan bir enzim olan immünoreaktif tripsinojen seviyelerinde artış gözlenmiştir [97].
Yüksek alfa-fetoprotein seviyeleri	Alfa-fetoprotein (AFP) karaciğer tarafından üretilen ve kan dolaşımına salınan bir proteindir. Özellikle gebeliğin erken dönemlerinde yüksek AFP seviyeleri, T18 riskinin arttığını gösterebilir [98].
Yüksek insan koryonik gonadotropin seviyeleri	İnsan koryonik gonadotropini (hCG) gebelik sırasında üretilen bir hormondur. Özellikle gebeliğin erken dönemlerinde yüksek hCG seviyeleri, T21 riskinin arttığını gösterebilir [99].
Konjuge olmayan estriol	Düşük konjuge olmayan estriol seviyeleri T21 gebelikleri ile ilişkilendirilmiştir. Estriol, hem fetüs hem de plasenta tarafından üretilen bir östrojen formudur.
İnhibin A	T21'den etkilenen gebeliklerde plasenta tarafından üretilen bir hormon olan inhibin A seviyelerinde artış gözlenmiştir.
Gebelikle ilişkili plazma proteini A	Plasenta tarafından üretilen bir proteindir. T21 gebeliklerinde, gebelikle ilişkili plazma protein A seviyeleri normal gebeliklerdekine kıyasla daha düşük olabilir.

Dijital PCR (dPCR), hedef nükleik asitlerin mutlak miktar tayini için kullanılabilen, geleneksel kantitatif polimeraz zincir reaksiyonunun (qPCR) yeni nesil bir versiyonudur (Şekil 6). Bu yöntemde numune, her biri sıfır, bir veya daha fazla (örneğin iki, üç, dört vb.) kopya hedef nükleik asit içerebilecek şekilde çok sayıda küçük biyoreaktöre bölünür. Her damlacık, mikro biyoreaktörler arasında çapraz kontaminasyonu önleyen kapsüllü bir alanda yer alır.

Numuneyi bölümlere ayırmak için mikro hücre formatları, mikroakışkan odacıklar ve damlacıklar gibi çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Mikro hücreler veya çip tabanlı sistemler, sınırlı sayıda mikro biyoreaktör içermeleri, hacim farklılıklarına bağlı değişkenlik ve genellikle çapraz kontaminasyon riski

nedeniyle bazı sınırlamalara sahiptir. Buna karşılık mikroakışkan sistemler, bu türden milyonlarca mikro biyoreaktörü uygun maliyetli bir şekilde üretme potansiyeli taşır [100]. Damlacık tabanlı dijital PCR (ddPCR), qPCR'ye kıyasla çeşitli avantajlar sunar: ddPCR'nin daha küçük reaksiyon hacmi, hedef nükleik asidin etkin konsantrasyonunu artırırken, hedef dışı nükleik asitlerden kaynaklanan kontaminasyonu azaltır. Son nokta analizi ve ikili sinyal ölçümü, tespit elemanları açısından daha düşük gereksinimlerle çalışılmasına olanak tanır. Kalibrasyon eğrisi gerektirmez. Sonuçlar, amplifikasyon verimliliği ve PCR inhibitörlerinden daha az etkilenir.

Bu nedenlerle, ddPCR düşük tespit limitine, yüksek hassasiyet, doğruluk ve tekrarlanabilirliğe sahiptir [101]. İnvaziv olmayan testlerde ddPCR; hastalıkların erken teşhisi, nadir mutasyonların tespiti gibi karmaşık örnek arka planlarında nadir hedeflerin doğru kantifikasyonu açısından son derece uygundur. Kullanılan mikro reaksiyon odacıklarının yapısına göre dijital PCR yöntemleri, çip tabanlı dijital PCR (cddPCR) ve damlacık/emülsiyon tabanlı dijital PCR (ddPCR) olarak sınıflandırılır. ddPCR sisteminde reaksiyon bölmeleri, yağ fazında dağılmış mikro- ya da nanolitre düzeyinde damlacıklar şeklinde, damlacık mikroakışkan teknolojisi ile oluşturulur. Teorik olarak sınırsız sayıda bölme oluşturulabilmesi ve bölme boyutlarının ayarlanabilir olması sayesinde, ddPCR yöntemi tespit açısından daha esnek ve yüksek hassasiyetlidir [102].



Şekil 6 ddPCR'nin şematik gösterimi [103].

Bu şekil, dijital PCR'de damlacık prensibini ve hedef diziyi içeren tek bir örneğin nasıl bölümlendiğini göstermektedir. PCR amplifikasyonu sonucunda, bir tespit sistemi tarafından saptanabilen ve yorumlanabilen

binlerce kopya elde edilir. Tipik bir ddPCR iş akışında, tek bir numune; hedef ve hedef dışı dizileri (DNA veya RNA), gerçek zamanlı PCR primerlerini, floresan etiketli problemleri ve standart PCR ana karışımlarını içerir. Birinci aşamada, yağ içinde su emülsiyonları oluşturularak numune binlerce nanolitrelik damlacığa bölünür. Bu damlacıkların bir kısmı hiç şablon molekülü içermezken, bazıları bir veya daha fazla hedef nükleik asit içerir. Damlacık üretimi çeşitli yöntemlerle gerçekleştirilebilir. Standart yöntemler arasında T-kavşağı ve akış odaklı geometri bulunur; bu şekilde yalnızca akış odaklı geometriye yer verilmiştir. Ayrıntılı açıklama için ilgili metne başvurulabilir. İkinci aşamada, hedef dizinin çoğaltılması için geleneksel son nokta PCR gerçekleştirilir. Üçüncü aşamada, hedef diziyi içeren damlacıklar yüksek floresan yoğunluğu gösterir ve “pozitif damlacıklar” olarak adlandırılır. Hedef içermeyen damlacıklar ise düşük floresan yoğunluğu sergiler ve “negatif damlacıklar” olarak sınıflandırılır. Zamana karşı floresan yoğunluğu grafik üzerinde çizilir. Damlacıklara düşen hedef moleküllerin sayısı, rastgele meydana gelen DNA veya RNA kapsüllenmesinin Poisson dağılımına uygun olduğu varsayımıyla hesaplanır. Floresan yoğunluğu çeşitli yöntemlerle analiz edilebilir; en yaygın olanları floresan mikroskopu ve damlacık okuyuculardır. Dördüncü aşamada, elde edilen veriler özel yazılımlar yardımıyla grafik hâlinde görselleştirilir. Yazılım tarafından otomatik olarak belirlenen bir eşik değeriyle pozitif ve negatif damlacıklar ayrılır; bu eşik gerekirse manuel olarak da ayarlanabilir.

Yapılan bir çalışmada, gebe kadınlarda hücresiz fetal DNA fraksiyonu da dahil olmak üzere plazmada dolaşan hücresiz DNA analiz edilmiştir. Çalışmanın amacı, ddPCR yöntemini birçok laboratuvarı yaygın olarak kullanılan klasik DNA kantifikasyon tekniği olan qPCR ile eş zamanlı olarak karşılaştırmak ve ddPCR'nin, invaziv olmayan doğum öncesi tanı (NIPT) uygulamalarında metodolojik bir alternatif olarak kullanılabilirliğini değerlendirmektir. Elde edilen sonuçlar, ddPCR'nin daha yüksek hassasiyet sunduğunu ortaya koymuştur [104].

Başka bir çalışmada ise 22q11 delesyon sendromunun (22q11DS) halk sağlığı üzerindeki önemli etkisi nedeniyle, yenidoğan tarama panellerine dahil edilmesi gerektiği önerilmiştir. 22q11DS'yi tespit etmek için yaygın olarak kullanılan yöntem olan floresan in situ hibridizasyon (FISH), özel ekipman gerektirir ve bu nedenle çoğu laboratuvarın rutin tarama programlarında

uygulanması zordur. Bu bağlamda, 22q11DS için hızlı, uygun maliyetli ve hâlihazırda yenidoğan taraması yapan laboratuvarlarda kolaylıkla uygulanabilecek yeni bir genetik tarama yöntemi geliştirilmiştir. Çalışma sonucunda, ister tam kandan ister kuru kan lekesi kartlarından elde edilsin, ddPCR'nin nükleik asit konsantrasyonlarının mutlak ölçümünü sağlayabildiği ve klinik teşhis açısından son derece önemli olan doğru DNA kopya sayısı (CN) tahminleri sunabildiği tespit edilmiştir [105].

Spinal musküler atrofi (SMA), 3.3. bölümde de açıklandığı üzere, motor nöron dejenerasyonu nedeniyle ilerleyici kas atrofisi ve solunum yetmezliği ile karakterize nöromusküler bir hastalıktır [106]. Gerçek zamanlı kantitatif PCR (qPCR), *SMN1* genindeki delesyonları tespit edebilmekle birlikte, bu yöntem kalibrasyon eğrilerine ve normalizasyon işlemlerine ihtiyaç duyar. Yapılan bir çalışmada, damlacık dijital PCR (ddPCR) yönteminin diğer tekniklere kıyasla SMA'nın yenidoğan taramasında ve taşıyıcılık durumunun belirlenmesinde daha hassas ve spesifik olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, şiddetli kombine immün yetmezlikler için paralel bir ddPCR ile T hücresi eksizyon halkaları (TREC) testinin entegre edilmesi önerilmiştir [107, 108].

5. Sonuç

Prenatal ve postnatal dönemlerde uygulanan genetik testler, bireyin sağlık durumuna ilişkin erken ve hedefe yönelik bilgi sağlayarak tanı, prognoz ve tedavi planlamasında önemli bir yer edinmiştir. Kromozomal düzeyden tek gen hastalıklarına kadar uzanan geniş bir spektrumda tanı koymaya olanak tanıyan bu testler, hem teknik kapasite hem de klinik fayda açısından son yıllarda dikkate değer bir evrim geçirmiştir. Bu gelişmeler, sağlık hizmeti sunumunun genetik boyutunu daha öncelikli ve entegre bir konuma taşımıştır. Genetik testlerin yalnızca biyolojik bir veri sunmanın ötesinde; etik ilkeler, hukuki düzenlemeler ve bireylerin psikososyal ihtiyaçlarıyla da doğrudan ilişkili olduğu unutulmamalıdır. Bu nedenle prenatal ve postnatal genetik tanı süreçlerinin multidisipliner bir yaklaşımla ele alınması zorunludur. Bu yaklaşımın merkezinde yer alan genetik danışman, hem hasta hem de ailesi açısından bilgiye dayalı karar verme süreçlerini destekleyerek, etik ilkelere uygun bir yönlendirme sağlamaktadır. Sonuç olarak, genetik testlerin sunduğu olanaklar yalnızca günümüz klinik pratiğinde değil, aynı zamanda bireyselleştirilmiş sağlık hizmetlerinin geleceğini şekillendirmede de temel bir

rol oynamaktadır. Genom temelli tıbbın gelişimiyle birlikte, genetik bilgilerin doğru yorumlanması ve bütüncül bir yaklaşımla klinik karar süreçlerine entegre edilmesi, hem prenatal hem de postnatal dönemde daha etkili ve etik sağlık hizmetlerinin sunulmasına olanak sağlayacaktır [109-112].

Teşekkür YÖK Araştırma Üniversiteleri Destek Programı kapsamında desteklenen FBA-2023-2731 kodlu proje çerçevesinde sağlanan bilimsel etkileşim ve iş birliği ortamı, bu derlemenin hazırlanmasına katkı sağlamıştır. Yazarlar, sağlanan destek için Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkür eder.

REFERANSLAR

1. Jain, A.K., et al., *Chromosomal aberrations, in Mutagenicity: Assays and Applications*. 2018, Elsevier. p. 69-92.
2. Torres, E.M., B.R. Williams, and A. Amon, *Aneuploidy: cells losing their balance*. Genetics, 2008. **179**(2): p. 737-746.
3. Siegel, J.J. and A. Amon, *New insights into the troubles of aneuploidy*. Annual review of cell and developmental biology, 2012. **28**: p. 189-214.
4. Wang, W., et al., *Risk stratification of chromosomal abnormalities in chronic myelogenous leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy*. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 2016. **127**(22): p. 2742-2750.
5. Dubé, I.D., R.F. Carter, and P.H. Pinkerton, *Chromosome abnormalities in chronic myeloid leukaemia*. Tumor Biology, 1990. **11**(Suppl. 1): p. 3-24.
6. Bojesen, A., S. Juul, and C.H. Gravholt, *Prenatal and postnatal prevalence of Klinefelter syndrome: a national registry study*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2003. **88**(2): p. 622-626.
7. Tennes, K., et al., *The early childhood development of 17 boys with sex chromosome anomalies: a prospective study*. Pediatrics, 1977. **59**(4): p. 574-583.
8. Howell, S., et al., *Discordant Prenatal Cell-Free DNA Screening vs. Diagnostic Results of Sex Chromosome Aneuploidies: Implications for Newborn Screening and Genetic Counseling*. International Journal of Neonatal Screening, 2024. **10**(3).
9. Shakoori, A.R., S. Aftab, and K. Al-Ghanim, *Structural changes in chromosomes*. Chromosome Structure and Aberrations, 2017: p. 245-274.
10. Scambler, P.J., *The 22q11 deletion syndromes*. Human molecular genetics, 2000. **9**(16): p. 2421-2426.
11. Alabbad, F.A., et al., *Cri-Du-Chat Syndrome Associated With Meningomyelocele: A Case Report*. Cureus, 2023. **15**(9).
12. Yoon, M., *Retention of topographic addresses by reciprocally translocated tectal re-implants in adult goldfish*. The Journal of Physiology, 1980. **308**(1): p. 197-215.

13. Case, J.T., *Anencephaly successfully diagnosed before birth*. Surg Gynecol Obstet, 1917. **24**: p. 312.
14. Turnbull, A., P. Gregory, and K. Laurence, *Fetal Abnormalities: Antenatal Diagnosis of Fetal Abnormality with Special Reference to Amniocentesis*. 1973, SAGE Publications.
15. Resta, R.G., *Historical aspects of genetic counseling: why was maternal age 35 chosen as the cut-off for offering amniocentesis?* Medicina nei secoli, 2002. **14**(3): p. 793-811.
16. Ferguson-Smith, M., et al., *Chromosome analysis before birth and its value in genetic counselling*. Br Med J, 1971. **4**(5779): p. 69-74.
17. Nadler, H.L. and A.B. Gerbie, *Role of amniocentesis in the intrauterine detection of genetic disorders*. New England Journal of Medicine, 1970. **282**(11): p. 596-599.
18. Tjio, J.H., *The chromosome number of man*. American journal of obstetrics and gynecology, 1978. **130**(6): p. 723-724.
19. Jacobson, C.B. and R.H. Barter, *Intrauterine diagnosis and management of genetic defects*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 1967. **99**(6): p. 796-807.
20. Nadler, H.L. and A. Gerbie, *Present status of amniocentesis in intrauterine diagnosis of genetic defects*. Obstetrics & Gynecology, 1971. **38**(5): p. 789-799.
21. Penrose, L., *Mongolian idiocy (mongolism) and maternal age*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1954. **57**(5): p. 494-502.
22. Dashe, J.S., *Aneuploidy screening in pregnancy*. Obstetrics & Gynecology, 2016. **128**(1): p. 181-194.
23. Oyelese, Y. and A. Vintzileos, *Interpretation and communication of medical evidence: room for improvement*. Obstetrics & Gynecology, 2012. **120**(3): p. 650-654.
24. Oyelese, Y., D. Schioppo, and B. O'Brien, *Prenatal screening and diagnosis: time for a paradigm shift*. American Journal of Perinatology, 2024.
25. Seller, M., *Alpha-fetoprotein in anencephaly*. The Lancet, 1972. **300**(7779): p. 716-717.
26. Leek, A., et al., *Raised α -fetoprotein in maternal serum with anencephalic pregnancy*. The Lancet, 1973. **302**(7825): p. 385.

- 27.Haddow, J.E., et al., *Prenatal screening for Down's syndrome with use of maternal serum markers*. New England journal of medicine, 1992. **327**(9): p. 588-593.
- 28.HEYL, P.S., W. MILLER, and J.A. CANICK, *Maternal serum screening for aneuploid pregnancy by alpha-fetoprotein, hCG, and unconjugated estriol*. Obstetrics & Gynecology, 1990. **76**(6): p. 1025-1031.
- 29.Sheldon, T.A. and J. Simpson, *Appraisal of a new scheme for prenatal screening for Down's syndrome*. British Medical Journal, 1991. **302**(6785): p. 1133-1136.
- 30.Nicolaides, K.H., et al., *Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy*. British medical journal, 1992. **304**(6831): p. 867-869.
- 31.Malone, F.D., et al., *First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome*. New England Journal of Medicine, 2005. **353**(19): p. 2001-2011.
- 32.Wald, N. and A. Hackshaw, *Combining ultrasound and biochemistry in first-trimester screening for Down's syndrome*. Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis, 1997. **17**(9): p. 821-829.
- 33.Yeo, L. and A.M. Vintzileos. *The use of genetic sonography to reduce the need for amniocentesis in women at high-risk for Down syndrome*. in *Seminars in perinatology*. 2003. Elsevier.
- 34.Bromley, B., et al., *The genetic sonogram: a method of risk assessment for Down syndrome in the second trimester*. Journal of Ultrasound in Medicine, 2002. **21**(10): p. 1087-1096.
- 35.Hobbins, J.C., et al., *An 8-center study to evaluate the utility of midterm genetic sonograms among high-risk pregnancies*. Journal of ultrasound in medicine, 2003. **22**(1): p. 33-38.
- 36.Bethune, M., *Time to reconsider our approach to echogenic intracardiac focus and choroid plexus cysts*. Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology, 2008. **48**(2): p. 137-141.
- 37.Vena, F., et al., *Hyperechogenic fetal bowel: Current evidence-based prenatal diagnosis and management*. Journal of Clinical Ultrasound, 2023. **51**(7): p. 1172-1178.

- 38.Doubilet, P.M., et al., *Choroid plexus cyst and echogenic intracardiac focus in women at low risk for chromosomal anomalies: the obligation to inform the mother*. Journal of ultrasound in medicine, 2004. **23**(7): p. 883-885.
- 39.Hayat Roshanai, A., C. Ingvaldstad, and P. Lindgren, *Fetal ultrasound examination and assessment of genetic soft markers in Sweden: are ethical principles respected?* Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica, 2015. **94**(2): p. 141-147.
- 40.Viaux-Savelon, S., et al., *Prenatal ultrasound screening: false positive soft markers may alter maternal representations and mother-infant interaction*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e30935.
- 41.Nevay, D.L., et al., *Impact of increased risk for fetal aneuploidy on maternal mood: a prospective longitudinal study*. Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica, 2016. **95**(10): p. 1120-1128.
- 42.Alliance, G. and D.o.C.D.o. Health, *Newborn Screening*, in *Understanding Genetics: A District of Columbia Guide for Patients and Health Professionals*. 2010, Genetic Alliance.
- 43.Alliance, G., N.Y.-M.-A.C.f. Genetic, and N.S. Services, *Understanding genetics: a New York, mid-Atlantic guide for patients and health professionals*. 2009.
- 44.Khandekar, S., A. Dive, and P. Munde, *Chromosomal abnormalities-a review*. Central India J Dent Sci, 2013. **4**(1): p. 35-40.
- 45.McFadden, D.E. and J. Friedman, *Chromosome abnormalities in human beings*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 1997. **396**(1-2): p. 129-140.
- 46.Ocak, Z., U. Üyetürk, and M.M. Dinçer, *Clinical and prognostic importance of chromosomal abnormalities, Y chromosome microdeletions, and CFTR gene mutations in individuals with azoospermia or severe oligospermia*. Turkish journal of medical sciences, 2014. **44**(2): p. 347-351.
- 47.Doyle, D.L. and M.J. Khoury, *Genetics and genomics in public health*. Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics and Genomics, 2019: p. 355-367.
- 48.Brady, P., et al., *Clinical implementation of NIPT—technical and biological challenges*. Clinical Genetics, 2016. **89**(5): p. 523-530.

49. Watson, M.S., et al., *American College of Medical Genetics Newborn Screening Expert Group. Newborn screening: Toward a uniform screening panel and system-Executive summary.*(vol 117, pg S296, 2006). *Pediatrics*, 2006. **118**(2): p. 851-851.
50. Berisha, S.Z., et al., *Cytogenetic and molecular diagnostic testing associated with prenatal and postnatal birth defects.* *Birth defects research*, 2020. **112**(4): p. 293-306.
51. Forabosco, A., A. Percesepe, and S. Santucci, *Incidence of non-age-dependent chromosomal abnormalities: a population-based study on 88965 amniocenteses.* *European Journal of Human Genetics*, 2009. **17**(7): p. 897-903.
52. Kassem, H.S., F. Girolami, and D. Sanoudou, *Molecular genetics made simple.* *Global Cardiology Science and Practice*, 2012. **2012**(1): p. 6.
53. Moter, A. and U.B. Göbel, *Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms.* *Journal of microbiological methods*, 2000. **41**(2): p. 85-112.
54. Ratan, Z.A., et al., *Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) technique for the detection of genetic aberration in medical science.* *Cureus*, 2017. **9**(6).
55. Nath, J. and K.L. Johnson, *A review of fluorescence in situ hybridization (FISH): current status and future prospects.* *Biotechnic & Histochemistry*, 2000. **75**(2): p. 54-78.
56. Iafrate, A.J., et al., *Detection of large-scale variation in the human genome.* *Nature genetics*, 2004. **36**(9): p. 949-951.
57. Redon, R., et al., *Global variation in copy number in the human genome.* *nature*, 2006. **444**(7118): p. 444-454.
58. Girirajan, S., C.D. Campbell, and E.E. Eichler, *Human copy number variation and complex genetic disease.* *Annual review of genetics*, 2011. **45**(1): p. 203-226.
59. Miller, D.T., et al., *Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies.* *The American Journal of Human Genetics*, 2010. **86**(5): p. 749-764.

- 60.Kaminsky, E.B., et al., *An evidence-based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities*. Genetics in medicine, 2011. **13**(9): p. 777-784.
- 61.Weise, A., et al., *Microdeletion and microduplication syndromes*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2012. **60**(5): p. 346-358.
- 62.Tucker, T., et al., *Uniparental disomy: can SNP array data be used for diagnosis?* Genetics in medicine, 2012. **14**(8): p. 753-756.
- 63.Shaffer, L.G., et al., *American college of medical genetics statement on diagnostic testing for uniparental disomy*. Genetics in Medicine, 2001. **3**(3): p. 206-211.
- 64.Levy, B. and R. Wapner, *Prenatal diagnosis by chromosomal microarray analysis*. Fertility and sterility, 2018. **109**(2): p. 201-212.
- 65.Dugoff, L., et al., *The use of chromosomal microarray for prenatal diagnosis*. American journal of obstetrics and gynecology, 2016. **215**(4): p. B2-B9.
- 66.Richardson, A. and K.E. Ormond. *Ethical considerations in prenatal testing: Genomic testing and medical uncertainty*. in *Seminars in fetal and neonatal medicine*. 2018. Elsevier.
- 67.c, G.P.C.C.a.A.A.a.g.c.b.A.G.R.g.u.e., et al., *A global reference for human genetic variation*. Nature, 2015. **526**(7571): p. 68-74.
- 68.Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome*. science, 2001. **291**(5507): p. 1304-1351.
- 69.Ralph, A., et al., *Maternal uniparental isodisomy for chromosome 14 detected prenatally*. Prenatal diagnosis, 1999. **19**(7): p. 681-684.
- 70.Passemar, S., et al., *Abstracts from the 50th European Society of Human Genetics Conference: Posters*. European Journal of Human Genetics, 2019. **26**(S1): p. 113-819.
- 71.Williams, R.C., *Restriction fragment length polymorphism (RFLP)*. American Journal of Physical Anthropology, 1989. **32**(S10): p. 159-184.
- 72.Pammer, L., et al., *Comorbidities are a major driver for disease penetrance in p. H63D homozygotes and p. C282Y/p. H63D compound heterozygotes*. Zeitschrift für Gastroenterologie, 2024. **62**(05): p. P57.

73. Stuppia, L., et al., *Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases*. International journal of molecular sciences, 2012. **13**(3): p. 3245-3276.
74. Yeo, C.J., E.F. Tizzano, and B.T. Darras, *Challenges and opportunities in spinal muscular atrophy therapeutics*. The Lancet Neurology, 2024. **23**(2): p. 205-218.
75. Costa-Roger, M., et al., *Complex SMN hybrids detected in a cohort of 31 patients with Spinal Muscular Atrophy*. Neurology: Genetics, 2024. **10**(4): p. e200175.
76. Kotzot, D., *Prenatal testing for uniparental disomy: indications and clinical relevance*. Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, 2008. **31**(1): p. 100-105.
77. Crossley, B.M., et al., *Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2020. **32**(6): p. 767-775.
78. Straniero, L., et al., *Whole-gene CFTR sequencing combined with digital RT-PCR improves genetic diagnosis of cystic fibrosis*. Journal of human genetics, 2016. **61**(12): p. 977-984.
79. Chin, E.L., C. da Silva, and M. Hegde, *Assessment of clinical analytical sensitivity and specificity of next-generation sequencing for detection of simple and complex mutations*. BMC genetics, 2013. **14**: p. 1-13.
80. Waters, A. and M. Lemaire, *Genetic Diagnosis of Renal Diseases: Basic Concepts and Testing*, in *Pediatric Kidney Disease*. 2017, Springer. p. 107-149.
81. Satam, H., et al., *Next-generation sequencing technology: current trends and advancements*. Biology, 2023. **12**(7): p. 997.
82. Yohe, S. and B. Thyagarajan, *Review of clinical next-generation sequencing*. Archives of pathology & laboratory medicine, 2017. **141**(11): p. 1544-1557.
83. Richards, S., et al., *Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*. Genetics in medicine, 2015. **17**(5): p. 405-423.

- 84.Lionel, A.C., et al., *Improved diagnostic yield compared with targeted gene sequencing panels suggests a role for whole-genome sequencing as a first-tier genetic test*. Genetics in Medicine, 2018. **20**(4): p. 435-443.
- 85.Zhang, J., et al., *A new SNP genotyping technology Target SNP-seq and its application in genetic analysis of cucumber varieties*. Scientific reports, 2020. **10**(1): p. 5623.
- 86.Lazaridis, K.N., et al. *Outcome of whole exome sequencing for diagnostic odyssey cases of an individualized medicine clinic: the Mayo Clinic experience*. in *Mayo Clinic Proceedings*. 2016. Elsevier.
- 87.Balloux, F., et al., *From theory to practice: translating whole-genome sequencing (WGS) into the clinic*. Trends in microbiology, 2018. **26**(12): p. 1035-1048.
- 88.Ceballos, F.C., S. Hazelhurst, and M. Ramsay, *Assessing runs of Homozygosity: a comparison of SNP Array and whole genome sequence low coverage data*. BMC genomics, 2018. **19**: p. 1-12.
- 89.Clark, M.M., et al., *Diagnosis of genetic diseases in seriously ill children by rapid whole-genome sequencing and automated phenotyping and interpretation*. Science translational medicine, 2019. **11**(489): p. eaat6177.
- 90.Verma, R.P., *Evaluation and risk assessment of congenital anomalies in neonates*. Children, 2021. **8**(10): p. 862.
- 91.Pös, O., J. Budiš, and T. Szemes, *Recent trends in prenatal genetic screening and testing*. F1000Research, 2019. **8**.
- 92.Song, P., et al., *Limitations and opportunities of technologies for the analysis of cell-free DNA in cancer diagnostics*. Nature biomedical engineering, 2022. **6**(3): p. 232-245.
- 93.Balaguer, N., et al., *Non-invasive cell-free DNA-based approach for the diagnosis of clinical miscarriage: A retrospective study*. BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology, 2024. **131**(2): p. 213-221.
- 94.Pérez-Barrios, C., et al., *Comparison of methods for circulating cell-free DNA isolation using blood from cancer patients: impact on biomarker testing*. Translational lung cancer research, 2016. **5**(6): p. 665.

95. Shi, J., et al., *Novel perspectives in fetal biomarker implementation for the noninvasive prenatal testing*. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 2019. **56**(6): p. 374-392.
96. McTaggart, J.S., et al., *Type 1 diabetes mellitus presenting with diabetic ketoacidosis in a child with Patau syndrome (trisomy 13) and persistent fetal haemoglobin*. BMJ Case Reports CP, 2021. **14**(6): p. e243077.
97. Alghamdi, S.A., *Gestational and Newborn Screening Markers of Cystic Fibrosis*. 2011: University of Glasgow (United Kingdom).
98. Yoshizato, T., et al., *Diagnosis of fetal abnormalities during the first trimester*. The Kurume Medical Journal, 2019. **66**(2): p. 85-92.
99. Atallah, A., et al., *Combined first trimester screening for trisomy 21: Assessment of excess risk in case of free β -human chorionic gonadotrophin between 5 and 10 multiples of the median*. International Journal of Gynecology & Obstetrics, 2023. **162**(2): p. 676-683.
100. Quan, P.-L., M. Sauzade, and E. Brouzes, *dPCR: a technology review*. Sensors, 2018. **18**(4): p. 1271.
101. Hindson, C.M., et al., *Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR*. Nature methods, 2013. **10**(10): p. 1003-1005.
102. Hindson, B.J., et al., *High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number*. Analytical chemistry, 2011. **83**(22): p. 8604-8610.
103. Baltrušis, P. and J. Höglund, *Digital PCR: modern solution to parasite diagnostics and population trait genetics*. Parasites & Vectors, 2023. **16**(1): p. 143.
104. Sawakwongpra, K., et al., *Droplet-based digital PCR for non-invasive prenatal genetic diagnosis of α and β -thalassemia*. Biomedical Reports, 2021. **15**(4): p. 1-11.
105. Pretto, D., et al., *Screening newborn blood spots for 22q11. 2 deletion syndrome using multiplex droplet digital PCR*. Clinical chemistry, 2015. **61**(1): p. 182-190.
106. Verhaart, I.E., et al., *Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy—a literature review*. Orphanet journal of rare diseases, 2017. **12**: p. 1-15.

107. Vidal-Folch, N., et al., *Multiplex droplet digital PCR method applicable to newborn screening, carrier status, and assessment of spinal muscular atrophy*. Clinical chemistry, 2018. **64**(12): p. 1753-1761.
108. Calucho, M., et al., *Correlation between SMA type and SMN2 copy number revisited: an analysis of 625 unrelated Spanish patients and a compilation of 2834 reported cases*. Neuromuscular Disorders, 2018. **28**(3): p. 208-215.
109. Directors, A.B.o., *Clinical utility of genetic and genomic services: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics*. Genetics in Medicine, 2015. **17**(6): p. 505-507.
110. Biesecker, L.G. and R.C. Green, *Diagnostic clinical genome and exome sequencing*. New England Journal of Medicine, 2014. **370**(25): p. 2418-2425.
111. Cheng, L., *Patients' and Health Professionals' Decision-making about Preimplantation Genetic Testing*. 2022, University of New South Wales (Australia).
112. Botkin, J.R., et al., *Points to consider: ethical, legal, and psychosocial implications of genetic testing in children and adolescents*. The American Journal of Human Genetics, 2015. **97**(1): p. 6-21.

BÖLÜM 10

***Salmonella* Typhimurium’da AI-2 SENTEZİNDE CsrA’nın DÜZENLEYİCİ ROLÜ**

Doç. Dr. Nefise AKÇELİK¹, Nasrine BEKHEDDA¹,
Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK²

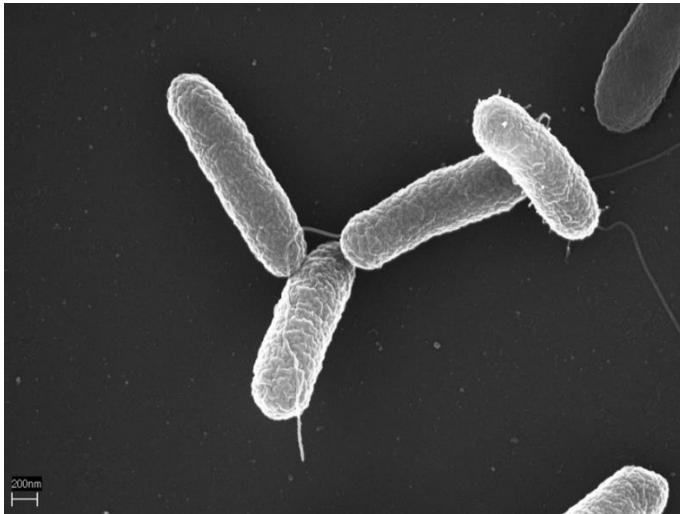
DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.17114257>

¹ Ankara University, Biotechnology Institute, Keçiören, Ankara 06135, Türkiye

² Ankara University, Faculty of Science, Department of Biology, Tandoğan, Ankara 06100, Türkiye

GİRİŞ

Salmonella cinsi, Gram negatif, spor oluşturmeyen, çubuk şekilli bakterilerdir (Şekil 0.1.). Bu mikroorganizmaların çapları yaklaşık 0,7-1,5 µm ve uzunluğu 2-5 µm arasında değişmektedir. Fakültatif anaerob organizmalardır ve ağırlıklı olarak peritrik hareketlilik gösterirler (24). Kauffmann-White sınıflandırma şemasına göre *Enterobacteriaceae* familyasına ait olan *Salmonella* cinsi; *S. enterica* ve *S. bongori* olmak üzere iki geniş türe sahiplik yapmaktadır. *S. enterica*; *S. enterica* subsp. *enterica* (I), *S. enterica* subsp. *salam* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV) ve *S. enterica* subsp. *indica* (VI) olmak üzere altı alt türe ayrılır. *S. bongori* ise, II, IIIa, IIIb, IV ve VI olarak adlandırılan alt türlere ayrılmaktadır. Bu alt türler, esas olarak soğukkanlı omurgalılarda bulunurken, klinik örneklerden nadiren izole edilirler. Bu nedenle insanlarda ve evcil hayvanlarda hastalığa neden olan *Salmonella* organizmalarının hemen hemen hepsi *S. enterica* subsp. *enterica* (I)'ya aittir. *S. enterica* suşları, O (lipopolisakkarit) ve H (flagellar) antijenlerine göre 2557 serovar içerir ve klinik olarak en önemli olan serovarlar Typhi, Paratyphi, Enteritidis ve Typhimurium olarak bilinmektedir (11).



Şekil 0.1. *Salmonella* Typhimurium elektron mikroskop görüntüsü (Volker Brinkmann, Max Planck Enfeksiyon Biyolojisi Enstitüsü, Berlin, Almanya) (25)

S. enterica, kontamine sulardan, hayvansal ürünlerden, enfekte veya taşıyıcı biri ile yakın temastan bulaşmaktadır. Bu mikroorganizmalar dört ana sendroma neden olabilirler: enterik ateş (tifo), gastroenterit, bakteriyemi ve kronik asemptomatik taşıyıcılık. Enterik ateşe insan patojenleri *S. enterica* serovar Typhi ve *S. enterica* serovar Paratyphi A/B neden olurken, ishalleri hastalıklara esas olarak klinik ortamlarda en yaygın izole edilen non-tifoidal *Salmonella* (NTS) olarak bilinen *S. enterica* serovar Enteritidis ve *S. enterica* serovar Typhimurium neden olmaktadır. Bu serovarlar inek, köpek ve domuz gibi hayvanları da enfekte edebilirler (26).

S. enterica, tifoid olmayan *Salmonella* (NTS) nedeniyle 3 milyon ölüm dahil 200 milyon ila 1,3 milyar bağırsak hastalığı vakasına neden olduğu için büyük klinik öneme sahiptir (24). Tifoid olmayan *Salmonella* (NTS), 5 yaşın altındaki çocuklar arasında yüksek morbidite ve ölümün başlıca nedenidir. Kenya'da yapılan bir çalışmada, çocuklardan toplanan örneklerden elde edilen NTS serotiplerinin % 59'unun *S. Typhimurium* ve % 28,3'ünün *S. Enteritidis* içerdiği bildirilmiştir (27). 2001'den 2009'a kadar Kanada'da, taze meyve ve sebze tüketimine bağlı bakteriyel enfeksiyon salgınlarının % 50'sinin *Salmonella*'dan kaynaklandığı bilinmektedir (28). Her yıl farklı *Salmonella* serovarlarıyla bağlantılı birçok salgın rapor edilmektedir.

1. *SALMONELLA* CİNSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Salmonella Typhimurium ile kontamine yiyecek veya su alınmasıyla bakteriyel enfeksiyon başlar. *S. Typhimurium*, hücre içi pH'sını hücre dışı ortamından daha yüksek değerlerde tutmak için asit tolerans tepkisini aktive ederek midenin asidik pH'sında hayatta kalır. Bu patojen, bağırsak mukus tabakasını geçtikten sonra bağırsak epitel hücrelerine yapışır. Yapışmadan sonra istila süreci, konakçı hücrelerin sitoskelet yapısını yeniden düzenler ve yapışık bakterilerin kapsüllenerek hücrelerin konakçı hücrelerin içerisinde hayatta kalıp çoğalabildiği *Salmonella* içeren vakuoller (SCV'ler) adı verilen büyük veziküller oluşur. Eşzamanlı olarak, fagositlerin submukozal boşluktan bağırsak lümenine toplanması ve göçü başlar. Daha sonra SCV'ler bazolateral membrana transsitosiz yaparak bakterileri submukozaya bırakır. Bakteriler daha sonra fagositler tarafından fagosite edilerek tekrar SCV'ler haline dönüşürler. Son olarak, bu enfekte fagositler, bakterilerin kan dolaşımı yoluyla diğer

dokulara sistemik yayılmasını kolaylaştırarak invazif hastalığın ilerlemesine sebebiyet verir (11).

S. Typhimurium, yukarıda bahsedilen enfeksiyon basamakları esnasında konakçı savunma mekanizmaları ile etkileşim kurmak için kullanılan birçok virülans faktörüne ve farklı stratejilere sahiptir. En önemli virülans faktörlerini kodlayan genlerin çoğu, yüksek oranda korunmuş *Salmonella* Patojenite Adaları'nda (SPI) bulunurken, diğerleri virülans plazmitinde veya kromozomol DNA'da yer alır (29, 30).

Şimdiye kadar toplam beş SPI'nın (SPI-1 ila SPI-5), *S. Typhimurium* virülansına direkt olarak dahil olduğu tespit edilmiştir. En önemlileri ve iyi çalışılanları, SPI-1 ve SPI-2'dir. Her iki SPI, konakçı biyokimyasını ve hücre fizyolojisini doğrudan etkilemek için bakteriyel ve konakçı membranlar aracılığıyla konakçı hücrelere veya hücre dışı ortama 'efektörler' olarak bilinen bakteri proteinlerini enjekte edebilen Tip III Salgılama Sistemi (T3SS) adı verilen moleküler bir aparatı kodlar. SPI-1, aktin hücre iskeleti yeniden düzenlemelerine aracılık ederek bakterilerin fagosite edilmesine aracılık eder ve çoğunlukla epitel hücrelerin istilasını tetikleyen birkaç efektör proteini kodlar (31). SPI-2 patojenite adası, hücre içi parazitizm için ve *Salmonella*'nın, SCV'ler olarak konakçı hücrelerin (epitel hücreleri ve makrofajlar) içerisinde hayatta kalabilmesi ve çoğalabilmesi için esastır (32). SPI-3, sistemik yayılma sırasında hem ilk bağlanma hem de uzun süreli kalıcılığın yanı sıra bakteriyel hayatta kalma ile ilişkilidir. SPI-4, bağırsak epiteli ile ilk etkileşim sırasında rol oynar. SPI-5, enfeksiyon sırasında çeşitli patojenik süreçlerin gerçekleştirilmesinde rol oynar (29).

Virülans plazmidi, sadece *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis* ve *S. Dublin* gibi klinik olarak önemli serovarlarda bulunabilir. Serovara bağlı olarak boyutu 50 ila 95 kb arasında değişen serovar spesifik bir plazmittir. *S. Typhimurium*'da ise, yaklaşık 95 kb'dir ve pSLT olarak adlandırılmıştır. Bu plazmit, hastalığın hücre içi evresinde konağın proinflatuar yanıtında rol oynayan efektör proteinleri kodlar (33).

Flagella, *S. Typhimurium*'un sadece motilite ve kemotaksis için değil aynı zamanda patogenezdaki diğer birçok süreç için gerekli olan yüzey uzantılarıdır (34).

En önemli adezinler, Tip I fimbriya ve kıvrımlı fimbriyadır. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların sonucunda, fimbriyaların çeşitli patojenik

süreçlerde yer aldığı bildirilmiştir. Bunların arasında, spesifik epitel hücrelerine yapışma, bağırsak sıvı birikimi, farelerde bağırsakta kalıcılık ve klinik olarak tedavi edilmesi zor biyofilmlerin oluşumu yer almaktadır (35-37).

1.1. BAKTERİYEL BİYOFİMLER

Biyofilm, bir yüzeye geri dönüşümsüz olarak bağlanan ve ürettikleri hücre dışı polimerik maddelerden oluşan bir matrikse gömülü hücreler tarafından karakterize edilen sesil bir mikrobiyal topluluktur. Biyofilm hücreleri, üreme hızları ve gen transkripsiyonu açısından planktonik formlarından farklıdırlar. Biyofilmler; canlı dokular, takılmış tıbbi cihazlar, endüstriyel ve doğal su sistemleri gibi farklı yüzeylerde oluşabilmektedir (1-5). Biyofilmler, tek bir mikrobiyal tür veya birden fazla mikrobiyal tür içerebilir. Dünyadaki bakteri hücrelerinin yaklaşık % 40-80'inin biyofilm oluşturabileceği bilinmektedir (38).

Biyofilm oluşumu, UV ışığına maruz kalma, metal toksisitesi, dehidrasyon ve tuzluluk, fagositoz, antibiyotikler ve antimikrobiyal ajanlar gibi çok çeşitli çevresel strese koruma sağlamaktadır (2, 4). Artan antimikrobiyal direnç, birçok faktörden kaynaklanabilir. Antimikrobiyal ajanların biyofilm yapısına geç penetrasyonu, yüksek konsantrasyonda hücre dışı antibiyotik parçalayıcı enzimleri içeren biyofilm matriksi, persister (inatçı) hücrelerin oluşumuna yol açan alt popülasyonların metabolik heterojenliği, antibiyotik duyarlılığını etkileyen genleri kodlayan çoklu gen ağlarının farklı ifadesi ve yatay gen transferi yoluyla direnç genlerinin kazanılması farklı mikrobiyal türlerde yüksek direncin ana mekanizmaları olarak gösterilmiştir (39).

Hücre dışı polimerik maddeler (EPS) matriksi; polisakaritler, proteinler, hücre dışı DNA (eDNA), lipidler ve su moleküllerinden oluşmaktadır. EPS matriksinin kimyasal ve fiziksel özellikleri bakteri türüne ve çevre şartlarına göre değişiklik gösterebilmektedir (40). Polisakaritler, EPS matriksinin büyük bir kısmını oluşturmaktadır ve esas olarak biyofilmlerin mekanik stabilitesinin desteklenmesinde rol oynarlar (41). Proteinler, biyofilm oluşumunda ve dağılımında farklı rollere sahiptirler. Hücrelerin yüzeylere tutunmasına katkıda bulunarak, ekzopolisakkarit ve nükleik asit bileşenleri ile etkileşim yoluyla biyofilm matriksini stabilize ederler. Ayrıca üç boyutlu biyofilm yapılarının gelişmesinde rol alarak biyofilm oluşumunda ve polisakaritlerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin enzimatik degradasyonu yoluyla biyofilm dağılımında rol

oyunlar (42). eDNA, bakteri yapışmasına ve biyofilmin yapısal stabilitesine katkıda bulunmanın yanı sıra, yatay gen transferi yoluyla biyofilm hücrelerinin antibiyotiklere ve konak immün efektörlerine karşı direnç kazanmasını kolaylaştırır (43). Lipitler, bakteriyel yapışma ve biyofilmin yapısal stabilitesi için oldukça önemlidir. Matriksin en yüksek oranda bulunan bileşeni olan su molekülleri ise EPS'nin bakterilere besin dağılımını sağlaması için katkıda bulunur (40). Biyofilm hücrelerini öldürmek için antimikrobiyal moleküllerin biyofilm matriksinden geçmesi gerekir. Bununla birlikte, EPS matriksi, bu moleküllerin biyofilm içine taşınmalarını ve dolayısıyla biyofilm hücreleri ile temaslarını engelleyen bir difüzyon bariyeri olarak görev yapar (8). Ek olarak, EPS matriksi, biyofilm hücreleri tarafından sentezlenen ve salgılanan antibiyotikleri parçalayabilen enzimleri içererek biyofilmin antimikrobiyal ajanlara karşı direncine katkıda bulunmaktadır (44).

Biyofilm direncine neden olan bir diğer mekanizma ise, persister hücrelerin oluşumudur. Biyofilm yapısının farklı katmanları arasındaki besin ve oksijen mevcudiyeti farklıdır. Biyofilm yapısının daha derin katmanlarda daha az besin ve oksijen bulunması nedeniyle orada yaşayan bakterilerin, biyofilm yüzeyine yakın bulunan bakterilerden düşük metabolik aktiviteye ve düşük üreme hızına sahip olduğu bilinmektedir. Persister hücreler olarak adlandırılan ve metabolik olarak aktif olmayan bu tür hücreler, antibiyotik tedavilerini tolere ederek biyofilm enfeksiyonlarının direncine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Persister hücrelerin antibiyotiklere karşı yüksek toleransı, klinikte kullanılan antibiyotiklerin hedeflerinin çoğunu temsil eden transkripsiyon, translasyon, genom replikasyonu ve hücre bölünmesi gibi hücresel süreçlerin düşük seviyelerde gerçekleştirilmesi ile açıklanabilmektedir (44).

Ek olarak, biyofilm yapısı, yüksek hücre yoğunluğu ve hücre yakınlığı, artan genetik çeşitlilik ve EPS matriksi içine eDNA salgılanması nedeniyle yatay gen transferi yoluyla direnç genlerinin alımını destekleyebilmektedir (45). Sonuç olarak, yukarıda bahsedilen mekanizmalar, antimikrobiyallere ve antibiyotiklere karşı biyofilm direncini çok faktörlü bir şekilde artırmada rol oynamaktadır.

Biyofilmlerin tıp ve halk sağlığı üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğu giderek daha açık hale gelmektedir. Kronik enfeksiyonların yaklaşık % 80'ine sebep olarak hastaneye yatış oranlarında, sağlık bakım maliyetlerinde,

morbidite ve mortalitede artışa yol açtığı bilinmektedir (8). Bu yapı, kateterler, protez kalp kapakçıkları ve kontakt lensler gibi birçok tıbbi implant üzerinde oluşabilir (46) ve antimikrobiyal maddelere karşı artan dirençleri nedeniyle enfeksiyonlar genellikle implantın çıkarılmasıyla tedavi edilebilir. Bu nedenle tedavi maliyeti ve hasta için travmayı artırır (47). Ek olarak, mikrobiyal biyofilmler, kistik fibroz gibi birçok enfeksiyöz hastalıkta rol oynarlar (48). *Legionella pneumophila* (49), *Staphylococcus aureus* (50), *Listeria monocytogenes* (51), *Escherichia coli* (52), *Salmonella Typhimurium* (53), *Vibrio cholerae* (54) ve *Helicobacter pylori* (55) dahil olmak üzere çeşitli bakteriyel patojenlerin biyofilmlerle ilgili enfeksiyonlara yol açtığı gösterilmiştir.

Gıda endüstrisinde, biyofilmler yüzeylerde oluşabildikleri gibi gıda kaynaklı salgınların yaklaşık % 60'ına sebebiyet verdiklerinden gıda güvenliği açısından da önemli bir risk oluşturmaktadır (56). Bunun yanı sıra, gıda bozulmalarına neden olarak ciddi ekonomik sonuçlara yol açmaktadır (10). Tarım yapılan alanlarda da biyofilm ilişkili hastalıklar gözlenmekte ve kayıplara neden olmaktadır. Örneğin arabidopsis ve *Ocimum basilicum* (tatlı fesleğen) köklerinde bulunan *Pseudomonas aeruginosa* biyofilminin bitki ölümüne neden olabileceği belirlenmiştir (57).

Denizcilik sektöründe de biyofilm oluşumu ciddi sonuçlara yol açabilmektedir. Deniz biyolojik kirliliği (marine biofouling), gemi gövdeleri ve petrol veya gaz tesisatları dahil olmak üzere deniz suyuna maruz kalan doğal veya insan yapımı nesneler üzerinde istenmeyen organizma birikimi meydana gelebilir (58). Biyolojik kirlilik, denizcilik endüstrisinde ve açık denizde giden sivil gemiler için büyük bir zorluk oluşturur. Genel olarak, gemi gövdelerinde biyofilmlerin birikmesi, gemicilik endüstrisi için hızın düşürülmesi, temizlik süresinin uzaması ve daha fazla yakıt tüketimi gibi zorluklara neden olabilir (59). Ek olarak, gemi gövdelerinin biyolojik olarak kirlenmesi, istilacı deniz türlerinin yeni habitatlara yayılması için önemli bir vektör olarak kabul edilmiştir (60). Bu nedenle biyofilm oluşumu hem gemi kullanım maliyetini hem de deniz ortamının ekolojik dengesini etkileyebilmektedir.

1.1.1. BAKTERİYEL BİYOFİMLERİN OLUŞUM AŞAMALARI

Biyofilmlerin oluşumu, daha önce de belirtildiği gibi beş basamakta incelenebilen çok aşamalı bir süreçtir. Biyofilm yapısının oluşumunun ilk

aşaması bakterilerin yüzeye geri dönüşümlü olarak tutunmasıdır. Ardından geri dönüşümsüz bağlanma ve mikro kolonilerin oluşumu ile biyofilm oluşumu ilerler. Dördüncü olarak, olgun biyofilm yapısı oluşur. Son aşama olan beşinci aşamada ise, olgun biyofilm farklı koşullar altında dağılmaya başlar (Şekil 0.2.) (61). Bu basamaklardan aşağıda ayrıntılı olarak bahsedilmiştir.

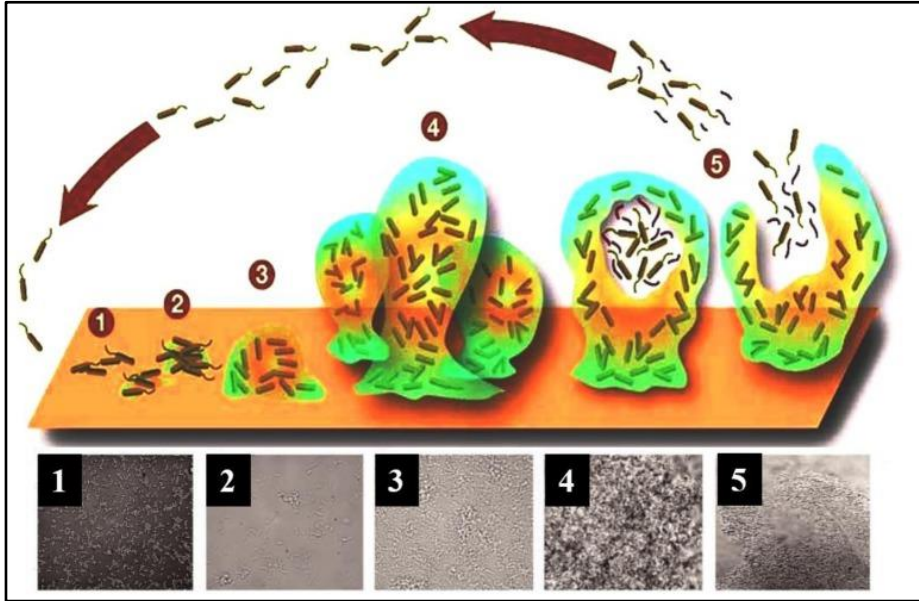
İlk basamak olan geri dönüşümlü tutunma, planktonik hücreler ve yüzey arasındaki etkileşimle başlar. Hücreler bir yüzeye ulaştığında, hücreler ve yüzey arasındaki etkileşim, aralarında oluşturulan itici veya çekici kuvvetlerin net toplamına bağlıdır. Çekici kuvvetler itici kuvvetlerden daha büyükse, bakteri yüzeye yapışacaktır (62). Yüzey pürüzlülüğü, hidrofobisitesi ve yüzey yükü dahil olmak üzere yüzeyin fizikokimyasal özellikleri bakteri tutunmasını etkileyebilmektedir (5).

İkinci basamak olan geri dönüşümsüz tutunma, dipol-dipol ve hidrofobik etkileşimleri gibi kısa mesafeli etkileşimlerin ve bakteriyel yapısal adezyonların katılımıyla gerçekleştirilebilir (63). Bakterilerin yüzeyi, hücre yüzeyinden hücre dışı ortama uzatılan farklı yapışkanlara sahiptir. Şimdiye kadar, flagella, pili/fimbriya ve fimbriyal olmayan yapılar dahil olmak üzere bakterilerin yapışkan uçlarının, biyofilm oluşturan hücrelerin bir yüzeye bağlanmasında rol oynadığı tespit edilmiştir (64). Flagella, hücre-yüzey etkileşimlerini engelleyebilecek itici kuvvetlerin üstesinden gelerek hücrelerin yüzeylere yapışmasını başlatabilir (65). Fimbriya ise bakterilerin birbirlerine bağlanmasında ve erken hücre yüzeyi bağlanmasında rol alabilmektedir (66). Geri dönüşümsüz tutunma, biyofilmlerin yüzeye yapışmasına aracılık etmek için biyofilm oluşturan hücreler tarafından sentezlenen EPS üretimi ile ilerler (67). Ayrıca ikincil haberci c-di-GMP molekülleri, EPS ve hücre yüzey yapılarının üretimini regüle ederek bakterilerin planktonik yaşam formundan sessil yaşam formuna geçişi için en önemli sinyallardan biri olarak kabul edilmektedir (68).

Üçüncü ve dördüncü basamak olan mikrokoloniler oluşumu ve biyofilmlerin olgunlaşmasında, bakteriler, EPS matriksi içerisinde çoğalmaya devam eder ve mikrokolonilerin oluşumuna ve biyofilmlerin olgunlaşmasına yol açar (61). Mikrokoloni oluşumunu ve EPS birikimini takiben, dolaşım sistemleri görevi gören, besinleri hücre topluluklarına taşıyan ve atıkları uzaklaştıran su dolu kanalların oluşur (2). Mikrokolonilerin yapısal analizi genellikle piramit/mantar şeklinde çok hücreli bir yapı göstermektedir (2).

Biyofilm olgunlaşmasının süreci esnasında, bakteriyel yüzey yapılarının üretimi inhibe edildiğinden mikrokoloniler içerisinde hareketlilik kısıtlanır. Sesil hücrelerin gen ekspresyon paterni planktonik formlarından önemli ölçüde farklılık göstermektedir (69).

Beşinci basamak olan biyofilm dağılımı (dispersiyon), biyofilm gelişiminin son sürecini temsil etmektedir. Dispersiyon esnasında, biyofilm yapısında bulunan bakteriler planktonik yaşam moduna dönerek yapısında boşluklar bulunan aşınmış bir biyofilm yapısını geride bırakırlar (70). Dağılma, çevresel sinyaller, sinyal iletim yolları ve efektörler tarafından düzenlenen kompleks bir süreçtir. Dispersiyon (dağılma), dış kuvvetlerden kaynaklanan pasif bir süreç olabileceği gibi yeni bölgelere yayılmak amacıyla genetik olarak programlanmış aktif bir süreç de olabilmektedir (13). İndüksiyon türüne göre iki tip dispersiyon vardır: i) Doğal olarak indüklenmiş dispersiyon ve ii) Çevresel olarak indüklenmiş dispersiyon. Doğal olarak indüklenmiş dispersiyon, biyofilm yapısında bulunan bakteriler tarafından sentezlenen sinyal moleküllerine bağlı olarak veya biyofilm içindeki besin gradyanları sonucu meydana gelirken, çevresel olarak indüklenmiş dispersiyon, ortamda mevcut olan sinyal moleküllerine veya çevreleyen ortamın değişen koşullarına yanıt olarak meydana gelmektedir (70). Aktif dağılım sırasında, flagella sentezi ve EPS degradasyonu gibi hücre hareketliliğinden sorumlu olan genler up regüle edilirken, EPS matriksinin üretimi, tutunma ve fimbriya sentezi ile ilgili genler down regüle edilir. Ayrıca, hücre içi c-di-GMP seviyelerinin azalması biyofilm gelişimini engelleyeceği ve biyofilm dağılımını artıracığı için c-di-GMP sinyal yolları engellenir (71).



Şekil 0.2. *P. aeruginosa* biyofilm oluşum aşamalarını (72). (1) Geri dönüşümlü tutunma, (2) Geri dönüşümsüz tutunma, (3) Mikrokolonilerin oluşumu, (4) Biyofilm olgunlaşması, (5) Biyofilm dağılımı (dispersiyon)

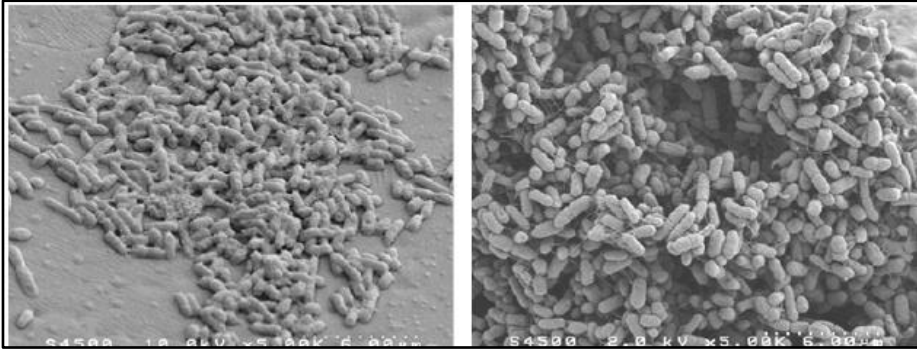
1.2. *SALMONELLA* BİYOFİLMLERİ

Farklı *Salmonella* türlerinin arasındaki farklılıklara rağmen biyofilm oluşturma yeteneğinde ortak noktalar bulunmaktadır ve bu durum, biyofilm oluşumunun *Salmonella* serovarları arasında (özellikle birden fazla konakçıyı kolonize edebilen serovarlarda) oldukça korunmuş bir özellik olduğu ve evrimsel bir avantaj olarak hizmet ettiğine işaret eder. Biyofilm oluşturma yeteneği; sınırlı besin mevcudiyeti, ısı, asidik pH, düşük sıcaklıklar ve antimikrobiyallere maruz kaldıklarında hayatta kalmalarını desteklediğinden, enfeksiyon döngüsü sırasında *Salmonella* virülansında, uzun süreli kalıcılıkta ve bulaşmasında önemli bir faktördür (Şekil 0.3.) (53).

Salmonella biyofilmlerine birçok biyotik (bitki yüzeyleri, epitel hücreleri ve safra taşları) ve abiyotik (plastik, cam, çimento, kauçuk ve paslanmaz çelik) yüzeylerde rastlanmaktadır (73). Laboratuvar koşullarında, *S. Typhimurium* biyofilmli, koloni görünümünden dolayı rdar (kırmızı, kuru ve pürüzlü) morfoloji olarak adlandırılan Kongo kırmızısı agar plakaları üzerinde belirgin desenli, agregatif koloniler olarak ortaya çıkar. Bu biyofilm formu, *S. Typhimurium*'da iki ana hücre dışı matriks bileşeni olan selüloz ve kıvrımlı

fimbriyaların ifadesi ile karakterize edilmektedir (74). Rdar morfortipi, 28 °C'nin altında tuzsuz besiyeri (düşük ozmolarite) içeren agar plakalarında veya 37 °C'de demir içermeyen besiyerinde görünmektedir (73).

Diğer biyofilm oluşturan bakterilerde olduğu gibi, *Salmonella* biyofilm hücreleri, proteinler, polisakkaritler ve eDNA'dan oluşan bir EPS matriksi içerisinde bulunur. *Salmonella* biyofilm EPS'lerinin tam bileşimi hem serovar hem de çevresel koşullara bağlı olarak değişmektedir. Ancak temel olarak farklı tip yapışkan fimbriyalar olan tip 1 fimbriya, plazmid kodlu fimbriya (Pef), kıvrımlı fimbriya (Csg), uzun polar fimbriya (Lpf), geniş yüzey proteini BapA ve flagella gibi proteinli bileşiklerden oluşur. Selüloz, kolanik asit ve O-antijen kapsülü gibi ekzopolisakkaritler ve lipitleri de içerdiği bilinmektedir (75). Ek olarak, *S. Typhimurium* tarafından oluşturulan biyofilmlerde eDNA tespit edilmiştir. Fakat, çoğu bakteri türünün aksine, eDNA'nın varlığı, *S. Typhimurium*'de biyofilm oluşumunu olumsuz yönde etkilemektedir (76).



Şekil 0.3. Taramalı elektron mikroskobu ile çekilen *Salmonella* biyofilmlerinin görüntüleri (77)

Salmonella hücrelerinin planktonik formlarından biyofilm yapısına geçişi, sıcaklık dalgalanmaları, besin mevcudiyetindeki değişiklikler ve zararlı maddelere maruz kalma gibi çeşitli çevresel tetikleyicilerden etkilenebilmektedir. Bu nedenle, biyofilm genlerinin ekspresyonu, çok sayıda global düzenleyici, iki bileşenli yanıt sistemi ve diğer düzenleyici proteinler ve küçük RNA'lar tarafından düzenlenmektedir. Bu tezin konusu olan Csr sistemi ve QS sinyalizasyonuna vurgu yapılarak *Salmonella* biyofilminin en önemli düzenleyicilerine aşağıda değinilmiştir (78).

CsgD, *Salmonella*'daki ana biyofilm düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir (79). CsgD, *csgBAC* curli (kıvrımlı fimbriya) biyosentez operonu içerisinde yer alan *csgB* promotoruna doğrudan bağlanarak ve ikincil haberci (3'-5')-siklik-diguanozin monofosfatın (c-di-GMP) modülasyonu yoluyla selüloz biyosentezini düzenleyen diguanilat siklaz AdrA'nın ifadesini indükleyerek iki ana EPS bileşenini olan kıvrımlı fimbriya ve selülozun üretimini indüklemektedir (78). CsgD ifadesi, besin seviyeleri, sıcaklık, oksijen gerilimi, ozmolarite ve membran bütünlüğü dahil olmak üzere çok sayıda çevresel sinyale yanıt olarak meydana gelir. CsgD'nin ifadesi; transkripsiyonel, post-transkripsiyonel, translasyonel ve post-translasyonel seviyelerde kontrol edilmektedir. Biyofilm düzenleyici ağında birkaç sigma faktörü de yer almaktadır. *in vitro* transkripsiyon deneylerinde, *csgBA* promotorun ekspresyonu için CsgD'nin RpoD ($\sigma 70$) ve RpoS (σS) sigma faktörleri ile yüklü RNA polimeraz ile etkileşime girdiği gösterilmiştir. Buna karşılık, CsgD, *adrA* transkripsiyonunu yalnızca sigma faktörü RpoS ile yüklü RNA polimeraz ile etkileşime girerek aktive eder. Rdar morfoloji ayrıca küçük kodlamayan RNA'lar (sRNA) tarafından da düzenlenmektedir. ArcZ sRNA, *rpoS* translasyonunu pozitif olarak düzenler, hareketliliği inhibe eder ve dolaylı olarak *csgD* ekspresyonunun stimülasyonunu indükler. RpoS'ye bağlı sRNA SdsR, *csgD* ekspresyonunun transkripsiyonel regülasyonu yoluyla rdar morfoloji oluşumunun pozitif bir düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır. Ancak RprA sRNA, *csgD* mRNA ile doğrudan etkileşim yoluyla rdar morfolojisini negatif olarak etkiler (78).

Çeşitli bakterilerde biyofilm ve planktonik yaşam modu arasındaki geçiş, sinyal molekülü (3-5)-siklik-diguanosin monofosfat (c-di-GMP) tarafından düzenlenir. c-di-GMP, katalitik olarak aktif GGDEF bölgelerini içeren diguanilat siklazlar (DGC'ler) tarafından sentezlenir ve EAL veya HD-GYP bölgelerini barındıran fosfodiesterazlar (PDE) tarafından degrade edilir. Bu ikincil habercinin yüksek hücre içi seviyeleri, biyofilm ile ilişkili fenotipleri teşvik ederken, düşük c-di-GMP konsantrasyonları dispersiyon ve hareketliliğe yol açmaktadır (80). *S. Typhimurium*'da c-di-GMP'nin aşırı ekspresyonu, yüksek *csgD* ekspresyonu, rdar biyofilm oluşumu ve yüksek selüloz üretiminin yanı sıra motilite ve virülans özelliklerinin inhibisyonu ile sonuçlanmıştır. *S. Typhimurium*'daki GGDEF ve/veya EAL bölgelerini barındıran bazı proteinler,

rdar morfortipinin ve/veya selüloz ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynarlar (81).

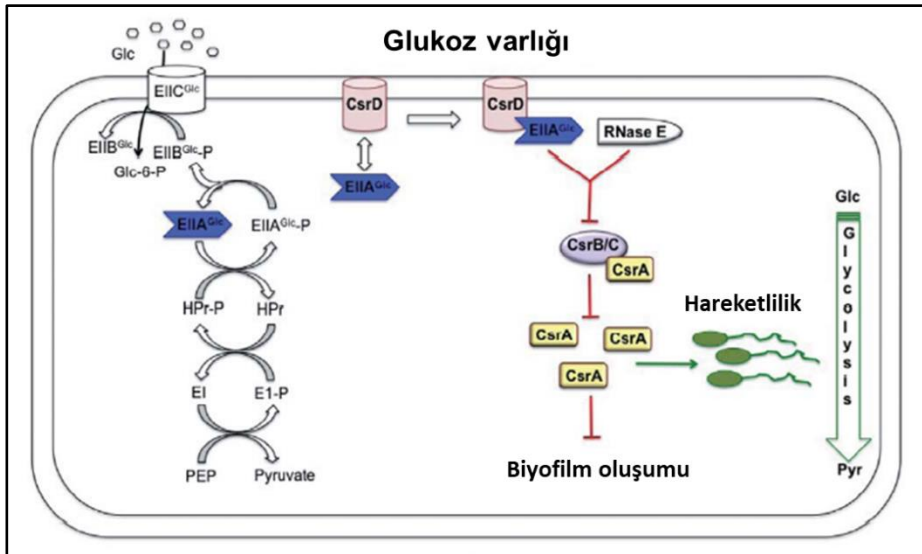
1.2.1.SALMONELLA BİYOFİLMİNİN Csr SİSTEMİ TARAFINDAN DÜZENLENMESİ

Karbon depolama düzenleyicisi CsrA, hedef mRNA'ları destabilize veya stabilize ederek gen ekspresyonunu baskılayan veya aktive eden homodimerik bir RNA bağlayıcı proteindir. CsrB ve CsrC adlı küçük RNA'lar ise, çok sayıda CsrA bağlanma bölgesi içerir ve bu proteine bağlanarak etkilerini antagonize ederler. Enzimatik aktivitesinden yoksun dejenere GGDEF-EAL bölgelerini içeren CsrD proteini ise, CsrB ve CsrC sRNA'ların RNaz E aracılığıyla parçalanmasını sağlar (82). CsrD proteini, CsrA tarafından negatif olarak düzenlenir, bu da, CsrA ifadesi için bir düzenleyici döngü oluşturmaktadır. BarA/SirA iki bileşenli sistem, *Salmonella* virülansı, hareketliliği ve biyofilm oluşumunda yer alan önemli bir global düzenleyici sistemdir. SirA, sensör kinaz BarA veya hücrel asetil fosfat tarafından fosforile edilen bir yanıt düzenleyicidir. SirA, *csrB* ve *csrC* sRNA'larını transkripsiyonel olarak aktive ettiği için Csr sistemi, BarA /SirA tarafından da kontrol edilmektedir (83). *Salmonella* Typhimurium'da CsrA, SPI-1'de bulunan virülans genleri, biyofilm oluşumu, motilite genlerini, B12 vitamini sentezini ve kullanımı ile ilişkili genleri ve konak bağırsağında bulunan bazı besinlerin metabolizması için gerekli olan genleri düzenler (84).

Gerçekleştirilen bir çalışmada, *csrA* geni bakımından mutant *E. coli* suşlarında biyofilm oluşumunun arttığı, söz konusu genin aşırı ekspresyonunun ise, hem *E. coli* hem de *S. Typhimurium* suşlarında biyofilm oluşumunu inhibe ettiği belirlenmiştir. Ayrıca *csrA* ifadesinin indüksiyonu, 24 saatlik biyofilm yapılarında dağılmaya neden olmuştur. Bununla birlikte, *E. coli* olgun biyofilmlerine glukoz eklenmesinin, CsrA'nın biyofilm dağılımı üzerindeki düzenleyici etkisinin yok olmasına sebebiyet verdiği belirlenmiştir (14). CsrA'nın GGDEF/EAL bölgesini içeren proteinlerini kodlayan sekiz genin ekspresyonunu hem doğrudan hem de dolaylı mekanizmalarla kontrol ettiği bilinmektedir. Biyofilm oluşumunu kontrol etmek için Csr, flagellar ve c-di-GMP sistemi arasındaki ilişkiyi araştıran diğer çalışmalar, CsrA'nın flagella regülununun bir aktivatörü olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak, CsrA'nın sinyal yolağında birden fazla süreçte rol alarak *S. Typhimurium*'da hareket

(motilite) yollarını aktive ettiği ve biyofilm oluşumunda rol alan faktörlerinin üretimini engellediği belirlenmiştir (15). Ek olarak, Solano vd. (2002), LB sıvı besiyerinde sıkı bir pelikül oluşumu için BarA'nın gerekli olduğunu belirlemiştir (85). Ancak beklenmeyen bir şekilde *csrA* geni bakımından mutant *S. Typhimurium*'un biyofilm üretiminde bir artış gözlenmemiştir. Bu nedenle karmaşık düzenleyici ağda ek bileşenlerin yer alabileceği öne sürülmüştür (86).

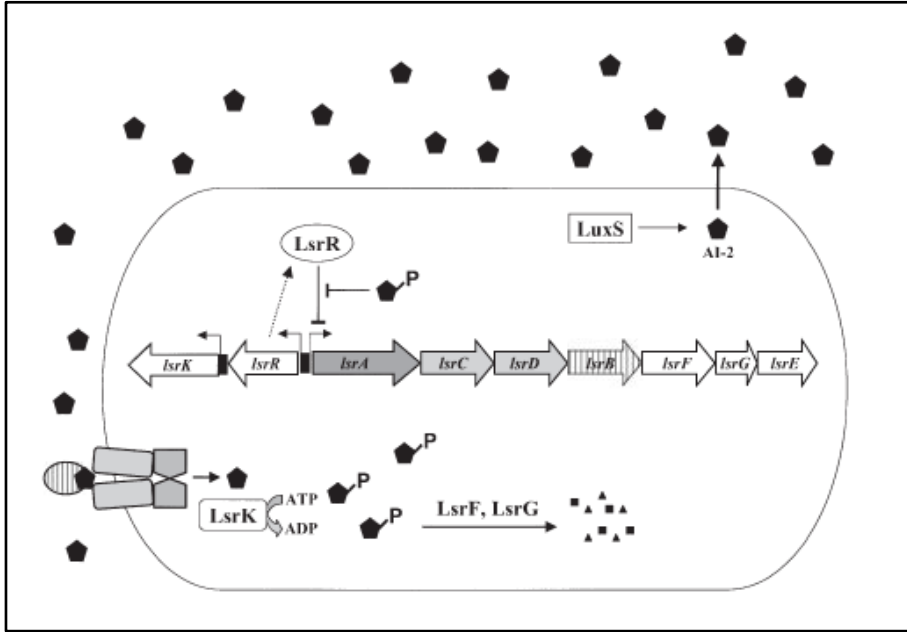
Leng vd. (2015) tarafından glukoz konsantrasyonunun CsrB/C sRNA'ların oluşumu ve degradasyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Glukoz varlığının (Şekil 0.4.), membran taşıyıcılarına bağlanan ve alternatif karbon kaynaklarının alımını önleyen $EIIA^{Glc}$ 'nin defosforilasyonuna yol açtığı gözlenmiştir. Defosforile olan $EIIA^{Glc}$ daha sonra CsrD'nin EAL bölgesine bağlanır ve RNaz E aracılığıyla CsrB/C'yi degrade ederek serbest CsrA seviyesini artırır. CsrA seviyesindeki artış hücrelerin hareketliliğinin artmasına neden olur. Ancak, glukoz yokluğunda (Şekil 0.5.), $EIIA^{Glc}$ fosforile kalır ve cAMP üretimi artar. CAMP, CRP'ye bağlanır ve alternatif karbon kaynaklarının kullanımı için gerekli enzimlerin ekspresyonunu destekler. cAMP-CRP kompleksi, SirA regülatörü yoluyla CsrA'nın sekestrasyonuna ve biyofilm ile ilişkili fenotiplerin ekspresyonuna yol açan CsrB/C'nin bozulmasını inhibe eder (16, 87).



Şekil 0.4. Glukoz varlığında CsrA regülasyonu (87)

İkinci olarak, birçok araştırma grubu tarafından polistiren üzerinde *Salmonella* biyofilm oluşumunun *luxS* geninin mutasyonundan etkilendiği bildirmiştir. Mikrodizin analizinde, *luxS* delesyonunun, birçok hareketlilik geninin ve biyofilm ile ilgili genlerin down regülasyonuna yol açtığı belirlenmiştir. Bu genlerin bazılarının ekspresyon seviyelerinin doğal tip *S. Typhimurium*'un hücresiz süpernatantının eklenmesiyle kısmen kompanse edildiği gözlenmiştir. Bu da AI-2'nın, bu genlerin düzenlenmesinde rol oynayabildiğini göstermektedir (22).

Salmonella Typhimurium'da AI-2, *luxS* geni tarafından kodlanan LuxS sentaz tarafından üretilip eksponansiyel üreme fazında salınır ve durağan fazın başlangıcında ATP bağlayıcı kaset (ABC) olan Lsr taşıyıcı aracılığıyla bakterilere aktarılır. *Lsr* operonu, *lsrACDBFGE* olmak üzere yedi gen içerir. *lsrACDB*, AI-2 taşıyıcısının bileşenlerini kodlar. *lsrR*, farklı promotordan transkribe edilen *lsr* transkripsiyonunun bir baskılayıcısıdır. *lsrK* geni, Lsr taşıyıcısı yoluyla içe aktarıldıktan sonra AI-2'yi fosforile eden bir sitoplazmik kinazı kodlar. Fosfo-AI-2, LsrR baskılayıcıyı serbest bırakarak *lsr* transkripsiyonunu indükler. *lsrF* ve *lsrG*, sitoplazmik fosfo-AI-2'nin işlenmesinde yer alan enzimleri kodlar (Şekil 0.6.) (21). *luxS*/AI-2 sistemi, *Salmonella Typhimurium*'da hareketlilik, biyofilm oluşumu, virülans, translasyon, transkripsiyon ve diğer temel hücresel işlevlerle ilgili genlerin ifadesini etkilemektedir (22). *luxS* ifadesinden bağımsız olarak, ekstraselüler AI-2 seviyesi, *E. coli*'de ortamdaki glukoz bolluğundan etkilenir (23). Benzer şekilde, *S. Typhimurium*'da glukoz varlığında, hücre dışı AI-2 seviyesi artmış ve glukoz yokluğunda azalmıştır. Dahası, glukoz varlığı, *S. Typhimurium*'da biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir (22). *E. coli*'de bulunan cAMP, *lsr* transkripsiyonunu aktive ederek hücre dışı AI-2 seviyesinin azalmasına neden olur. Glukoz yokluğunda cAMP seviyesinin yüksek olduğu belirlenmiştir (89).



Şekil 0.6. AI-2'nin sentezi ve Lsr proteinleri tarafından taşınması ve modifikasyonunu. AI-2 (beşgen olarak gösterilmiştir) LuxS tarafından sentezlenir ve hücre dışı ortama salınır. Lsr taşıyıcısının bazal ekspresyonu, AI-2'nin sitoplazmaya girmesine ve ardından LsrK tarafından fosforile edilmesine neden olur. Fosfo-AI-2, LsrR proteinini inaktive ederek lsr operonunun transkripsiyonunu indükler. AI-2'nin hücre içine daha fazla alınmasıyla Lsr taşıyıcısının üretimi gerçekleşmiş olur. AI-2 molekülleri LsrF ve LsrG proteinleri tarafından işlenmektedir (21)

Gram negatif ve/veya Gram pozitif bakteriler arasında "evrensel dil" olarak kullanılan AI-2 (18) de biyofilm dağılımında rol alabilmektedir. AI-2'nin, *Helicobacter pylori* (19) ve *Vibrio vulnificus* (20) bakterilerinde biyofilm yapısının dispersiyonunu teşvik ettiği bilinmektedir.

1.3. BİYOFİLM YAPILARININ KONTROLÜ

Biyofilmler iki yol izlenerek kontrol edilebilir: i) Geri dönüşümsüz bağlanmanın oluşmasını engelleyerek biyofilm oluşumunun engellenmesi ve ii) Olgun biyofilmlerin eradikasyonu (12).

Bakterilerin biyofilm oluşturan yüzeylere ilk tutunmasını engellemek ve böylece biyofilm geliştirme şansını azaltmak, yüzeyin kimyasal ve fiziksel özelliklerini değiştirerek sağlanabilir. Biyofilm oluşumunu önlemek amacıyla biyomedikal cihazların yüzeyini değiştirmek için yaygın olarak kullanılan kimyasal yöntemler arasında antibiyotikler, biyositler ve iyon kaplamaları

bulunmaktadır (90). Minosiklin ve rifampin antibiyotikleriyle kaplı cihazların klinik ortamlarında *Staphylococcus aureus* biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlarının insidansını azalttığı gösterilmiştir (91). Biyofilm oluşumunda önemli olan iyonların görevlerine müdahale eden şelatörler de biyofilm inhibitörleri olarak kabul edilmektedir (92). Gümüş iyon kaplı implantların konak dokularda gümüş birikimine sebep olmadan *S. aureus* biyofilm oluşumunu engellediği bildirilmiştir (93, 94). Ayrıca, çeşitli destekliyi bileşikler ve antimikrobiyal ajanları kullanılarak yük ve hidrofobiklik gibi yüzey fiziksel özelliklerinin modifikasyonunun, biyofilm önlemede etkili olduğu kanıtlanmıştır (95). Hidrofilik özellikleri nedeniyle yüzeylere bakteri yapışmasını azaltan çeşitli hidrojel kaplamalar özellikle tıbbi cihazlarda biyofilm oluşumunu önlemek için kullanılmak üzere tasarlanmıştır (96).

Mevcut biyofilmlerin eradikasyonu için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Nekrotik dokuyu veya dental biyofilmleri çıkarmak için cerrahi alan enfeksiyonlarının debridmanını ve yüksek hızlı sprey kullanımı dahil olmak üzere çeşitli mekanik eradikasyon yaklaşımları uygulanmaktadır (12). Bakterileri öldürmek ve ilişkili biyofilm yapıları ortadan kaldırmak amacıyla elektriksel olarak iletken bir hedef yüzeye bir akım uygulanmasını içeren elektrokimyasal yöntemler, yakın zamanda yoğun bir şekilde araştırılmaktadır (97). Bununla birlikte, biyofilmler planktonik bakterilere göre antimikrobiallere 10-1000 kat daha dirençli olduğundan, biyofilme ilişkili enfeksiyonların geleneksel antibiyotiklerin kullanımı ile yok edilmesi oldukça zordur. Enfekte tıbbi cihazlar çıkarılamadığında, antibiyotik kilit tedavisi gibi agresif antimikrobiyal stratejiler uygulanmaktadır (98). Bu durum göz önüne alındığında, biyofilm eradikasyonu hem daha yüksek antimikrobiyal konsantrasyonlar hem de daha yüksek maliyetler gerektirir. Bu nedenle biyofilm hücrelerini koruyucu EPS'lerinden ayırmaya yönelik yaklaşımların araştırılması büyük önem taşımaktadır.

Biyofilm gelişiminin son aşaması olan dağılım sırasında, biyofilme bulunan bakteriler planktonik durumlarına dönerek biyofilm hücrelerine kıyasla daha savunmasız hale gelir. Bu nedenle biyofilm dağıtıcı ajanlarına dayalı etkin biyofilm eradikasyon stratejileri oluşturmak amacıyla son yıllarda yoğun bir şekilde dispersiyon ajanları ve mekanizmaları araştırılmaktadır (13).

1.3.1. BİYOFİLM KONTROL STRATEJİSİ OLARAK BİYOFİLM DİSPERSYONU

Daha önce belirtildiği gibi, biyofilm hücrelerinin dağılmasına ve savunmasız planktonik durumlarına geri dönmesine neden olmak, antibiyotik uygulamasının başarısını arttırabilir ve mevcut biyofilmlerin etkili bir şekilde eradikasyonu ile sonuçlanabilir. Gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda, EPS matriksi, QS sistemi ve persister (inatçı) hücreler gibi biyofilmin en önemli kısımları ve süreçleri hedeflenerek biyofilm yapılarının dağıtılabileceği gösterilmiştir (99).

EPS matriksi biyofilm hücrelerini; UV ışığı, dehidrasyon, toksinler ve yüksek antibiyotik konsantrasyonları dahil olmak üzere birçok strese koruduğu için bu hücrelerin "kalkanı" olarak kabul edilmektedir. EPS matriksi, biyofilm yapılarının konakçıda daha kalıcı olmasına ve tedaviye daha dirençli olmasına neden olmaktadır (2). Bu nedenle biyofilm hücrelerinin "kalkanından" ayrılması biyofilm stabilitesinin bozulmasına ve hücrelerin salınmasına neden olur. EPS genellikle polisakkaritler, proteinler, lipidler ve eDNA'dan oluşur (100). EPS yapısı, üretiminin engellenmesi ve/veya hücre dışı enzimler kullanarak EPS bileşenlerinin parçalanması yoluyla hedeflenebilmektedir (12). Biyofilm tutunması ve stabilitesi için önemli olan EPS proteinleri, Tripsin (101), Proteinaz K (102) ve LapG Proteinaz (103) gibi proteazlar tarafından hedeflenebilir. Ayrıca biyofilm yapısının korunmasında ve çeşitli streslere karşı direnç için hayati öneme sahip olan EPS ekzopolisakkaritleri (40) Dispersin B gibi glikozit hidrolazlar kullanılarak parçalanabilir (104). Son olarak, DNase I gibi deoksiribonükleazların kullanılması, biyofilm yapısının stabilize edilmesine ve yatay gen transferi yoluyla biyofilm hücrelerinin genetik çeşitliliğini artırmasına katkıda bulunan eDNA'nın degradasyonuna yol açmaktadır (105). Bununla birlikte, EPS'nin biyokimyasal bileşiminin farklı mikrobiyal türler arasında önemli ölçüde değişebileceğini ve hedefleme stratejilerinin her bir türe ayrı ayrı uyarlanması gerektiğini göz önünde bulundurmak gerekir (100).

Daha önce bahsedildiği üzere QS, otoindüktör olarak adlandırılan küçük sinyal moleküllerinin üretimi, tespiti ve bunlara yanıt verilmesi yoluyla meydana gelen, popülasyon yoğunluğuna bağlı gen ekspresyonunun düzenlenmesi mekanizmasıdır. Virülans, motilite ve biyofilm oluşumu gibi birçok bakteriyel süreç QS sistemi tarafından düzenlendiğinden, QS sisteminin

hedeflenmesi ve hücreden hücreye iletişimin kesilmesi biyofilm dağılmasına ve virülansın azalmasına neden olabilmektedir (17). QS sistemi, otoindüktörlerin üretimini engelleyerek, yapısını değiştirerek veya parçalayarak hedeflenebilir (106). QS sinyal moleküllerini parçalayabilen enzimler, üç tip AHL laktonaz, asetil homoserin lakton (AHL) asilaz ve oksidoredüktazdır. Ek olarak, çeşitli araştırmalar sonucunda uçucu yağlar ve bitki özleri gibi birçok QS inhibitörü (QSI) tanımlanmıştır (107). Bu moleküllerin bir örneği, *Pseudomonas aeruginosa*'da hem QS'ye bağlı virülans faktörlerinin üretimini hem de biyofilm oluşumunu engellediği kanıtlanmış olan sinnamik asittir (108). Başka bir örnek ise, *Chromobacterium violaceum* 12472 ve *S. aureus* suşlarındaki hem AI moleküllerin hem de AHL'lerin aktivitesine karşı geniş spektrumlu bir anti-QS aktivitesi sergileyen hidrolize edilebilir tanenler bakımından zengin Hint şifalı bitki özleridir (109). Ek olarak, sarımsağın da QS sisteminde bloke edici özelliklere sahip olduğu araştırmacılar tarafından kanıtlanmıştır (110).

Uyuyan (dormant) hücreler veya persister olarak da adlandırılan hücreler, herhangi bir antibiyotik direnç geni taşımadıkları halde antibiyotiklerden etkilenmeyen hücrelerdir. Bu direncin sebebi, persistent hücrelerin metabolik olarak inaktif olmaları ve antibiyotiklerin protein sentezi, hücre duvar sentezi gibihücrel aktiviteleri hedeflemesidir. Bu tip hücreler, biyofilm aktif dağılım indüksiyonunu ve antibiyotik tedavilerini engelledikleri için önemli bir zorluğu temsil etmektedir (111). Son zamanlarda, antibiyofilm peptitlerinin, metabolik aktivitelerinden bağımsız olarak biyofilm içerisindeki persistent hücreleri etkili bir şekilde hedeflediği gösterilmiştir. Bu antibiyofilm peptitlerinin önemli bir örneği, düşük konsantrasyonlarda *P. aeruginosa* biyofilm miktarını azaltan insan peptiti olan LL-37'dir (112).

Ayrıca, biyofilm aktif dağılma tepkisinin başlatılması, dağılma molekülleri ile gerçekleştirilebilir. Bu moleküller dağılma sinyallerine, anti-matriks moleküllerine, sekestrasyon moleküllerine ve metabolik interferans moleküllerine ayrılmakta ve biyofilmden planktonik hücreleri çevreye aktif olarak salmak için dağılma tepkisini tetikleyebilmektedir (99). İkincil haberci nükleotid c-di-GMP gibi birçok dağılma sinyalinin bakteriyel biyofilm dağılımına yol açtığı gösterilmiştir. Bu molekülü parçalayan enzimler olan fosfodiesterazlar tarafından modüle edilen düşük c-di-GMP seviyeleri, bakteriyel biyofilmlerin dağılmasına neden olur. Bu nedenle, c-di-GMP

sentezinin diguanil siklazlar tarafından bloke edilmesi veya fosfodiesterazlar tarafından degradasyonunun teşvik edilmesi, umut verici bir dağılma indüksiyon yaklaşımı olarak kabul edilmektedir (113). Diğer bir dağılma sinyali, birçok bakteri türünde biyofilm hücrelerinin salınımını tetikleyen Nitrik Oksit (NO) ve donörleridir (114). Cis-2-dekenoik asit (CDA) ise bir dispersiyon sinyalidir (115). EPS'yi hedefleyen anti-matriks molekülleri; biyosürfaktanları, ramnolipidleri ve fenolde çözünen modüller (PSM'ler) içermektedir (99). EDTA gibi sekestrasyon molekülleri ise, biyofilm gelişimi için gerekli bileşenleri (iyonlar, besinler, metabolitler vb.) bağlayan ve biyofilm yapısının stabilitesini bozarak dağılmaya yol açan moleküllerdir (116). Son olarak, L-arginin, D-arginin ve L-metionin gibi ekzojen amino asitler gibi metabolik interferans moleküllerinin, çeşitli bakteri türlerinde dispersiyon tepkilerini tetiklediği bulunmuştur (99).

Bununla birlikte, dağılmış hücrelerin antibiyotiklere karşı daha duyarlı olmasına rağmen, daha hareketli ve virulent olabilecekleri gösterilmiştir. Bu nedenle diğer alanlara kolonize olma riski veya dağılma sürecinden sonra sepsisemi riski artmaktadır. Dağılan hücrelerin ve kalan biyofilmlerin etkin bir şekilde ortadan kaldırılması için biyofilm dispersiyon stratejilerinin antibiyotiklerle birleştirilmesi gerekmektedir (117).

1.3.2. *SALMONELLA* BİYOFİLM DİSPERSİYONUNDA KULLANILAN STRATEJİLER

Bu bölüm, *S. enterica*'nın oluşturduğu biyofilmleri üzerinde test edilen bazı dispersiyon yaklaşımları hakkında bilgileri özetlemektedir.

Çeşitli araştırma grupları tarafından gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda, bakterilerde nitrik oksit aracılı sinyalleşmenin biyofilmin dağılmasına neden olabileceği belirlenmiştir. Nitrik oksit donörleri, farklı optimal dağılım koşulları altında *S. Typhimurium* biyofilmlerinin dağılmasını indüklemiştir (118, 119). Bu ajanlar, *S. Typhimurium* biyofilmlerinin etkin bir şekilde dağılması için hidrojellerle birlikte kullanılabileceği gibi (120) dezenfektanlarla birlikte de kullanılarak etkinliği artırılabilir (121). Biyofilm dispersiyonu, bir alarmon olan (p)ppGpp'nin bloke edilmesiyle de indüklenebilir. De La Fuente-Nunez vd. (2014), (p)ppGpp sinyalini bloke edebilen ve sonuçta *S. Typhimurium*'un da içinde bulunduğu birçok Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriyel patojenlerin biyofilm dağılımına yol açan

yeni bir anti-biyofilm peptid tanımlamışlardır (122). Çeşitli araştırmacılar, dispersiyon verimliliğini artırmak için birden fazla dispersiyon indükleyici ajanın birlikte kullanımı sonucunda gerçekleşen dispersiyon oranını araştırmıştır. Örneğin; doymamış yağ asidi cis-2-dekenoik asit (CDA), *S. enterica* dahil olmak üzere gıda kaynaklı pek çok bakterinin oluşturduğu olgun biyofilm yapısının dağılmasında etkilidir. CDA'nın, dezenfektanlar ve antibiyotiklerle birlikte kullanılarak dispersiyon etkinliğindeki değişiminin araştırıldığı bir çalışma sonucu, 310 nM CDA'nın dezenfektanlar (Persidin ve Epimax S) veya antibiyotikler (siprofloksasin, vankomisin ve ampicilin) ile birlikte kullanımının biyofilm biyokütlesini yaklaşık % 80 oranında azalttığı gösterilmiştir (123). Grubumuz tarafından yapılan bir araştırmada, P22 fajı, EDTA ve nisin üçlü kombinasyonunun *S. Typhimurium* olgun biyofilm dağılımı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. 10^7 PFU mL⁻¹ P22 fajı, 20 mM EDTA ve 150 µg mL⁻¹ nisin kombinasyonunun, olgun biyofilm yapısını % 70 oranında azalttığı belirlenmiştir (124). Ek olarak, antibakteriyel aktiviteye sahip diğer suşların ekzopolisakkarit yapıları da biyofilm dağılımını indüklemek için kullanılmıştır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada ise, yeni izole edilmiş *Lactobacillus casei* NA-2 suşunun ekzopolisakkarit yapısı, *S. Typhimurium* biyofilmini % $40,8 \pm 3,3$ oranında azaltmada başarılı olmuştur (125).

DNaz'ların çeşitli bakteri türlerinde biyofilm dispersiyonuna neden olduğu kanıtlanmış olmasına rağmen Wang et al. (2014) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, DNaz I'in, *S. Typhimurium* ve *S. Typhi*'nin polistiren ve cam yüzeylerde oluşturduğu olgun biyofilmler üzerinde, DNaz I'in eklenmediği biyofilmlere kıyasla, önemli bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (76).

KAYNAKLAR

1. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-22. doi: 10.1126/science.284.5418.1318. PubMed PMID: 10334980.
2. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(2):95-108. doi: 10.1038/nrmicro821. PubMed PMID: 15040259.
3. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54:49-79. Epub 2000/10/06. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.49. PubMed PMID: 11018124.
4. Davey ME, O'Toole G A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64(4):847-67. doi: 10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000. PubMed PMID: 11104821; PubMed Central PMCID: PMC99016.
5. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(9):881-90. doi: 10.3201/eid0809.020063. PubMed PMID: 12194761; PubMed Central PMCID: PMC2732559.
6. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 2001;9(1):34-9. Epub 2001/02/13. doi: 10.1016/s0966-842x(00)01913-2. PubMed PMID: 11166241.
7. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(2):167-93. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002. PubMed PMID: 11932229; PubMed Central PMCID: PMC118068.
8. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(2):114-22. doi: 10.1038/nrd1008. PubMed PMID: 12563302.
9. Joseph B, Otta SK, Karunasagar I, Karunasagar I. Biofilm formation by salmonella spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *Int J Food Microbiol*. 2001;64(3):367-72. Epub 2001/04/11. doi: 10.1016/s0168-1605(00)00466-9. PubMed PMID: 11294359.
10. Galie S, Garcia-Gutierrez C, Miguelez EM, Villar CJ, Lombo F. Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Front Microbiol*. 2018;9:898. Epub 20180507. doi:

- 10.3389/fmicb.2018.00898. PubMed PMID: 29867809; PubMed Central PMCID: PMC5949339.
11. Fabrega A, Vila J. Salmonella enterica serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. Clin Microbiol Rev. 2013;26(2):308-41. doi: 10.1128/CMR.00066-12. PubMed PMID: 23554419; PubMed Central PMCID: PMC3623383.
12. Fleming D, Rumbaugh KP. Approaches to Dispersing Medical Biofilms. Microorganisms. 2017;5(2). Epub 20170401. doi: 10.3390/microorganisms5020015. PubMed PMID: 28368320; PubMed Central PMCID: PMC5488086.
13. Wille J, Coenye T. Biofilm dispersion: The key to biofilm eradication or opening Pandora's box? Biofilm. 2020;2:100027. Epub 20200601. doi: 10.1016/j.biofilm.2020.100027. PubMed PMID: 33447812; PubMed Central PMCID: PMC7798462.
14. Jackson DW, Suzuki K, Oakford L, Simecka JW, Hart ME, Romeo T. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of Escherichia coli. J Bacteriol. 2002;184(1):290-301. doi: 10.1128/JB.184.1.290-301.2002. PubMed PMID: 11741870; PubMed Central PMCID: PMC134780.
15. Jonas K, Edwards AN, Ahmad I, Romeo T, Romling U, Melefors O. Complex regulatory network encompassing the Csr, c-di-GMP and motility systems of Salmonella Typhimurium. Environ Microbiol. 2010;12(2):524-40. Epub 2009/11/19. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02097.x. PubMed PMID: 19919539; PubMed Central PMCID: PMC2888478.
16. Leng Y, Vakulskas CA, Zere TR, Pickering BS, Watnick PI, Babitzke P, et al. Regulation of CsrB/C sRNA decay by EIIA(Glc) of the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. Mol Microbiol. 2016;99(4):627-39. Epub 2015/10/29. doi: 10.1111/mmi.13259. PubMed PMID: 26507976; PubMed Central PMCID: PMC4888959.
17. Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. Annu Rev Cell Dev Biol. 2005;21:319-46. doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001. PubMed PMID: 16212498.

18. Pereira CS, Thompson JA, Xavier KB. AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2013;37(2):156-81. Epub 20120716. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00345.x. PubMed PMID: 22712853.
19. Anderson JK, Huang JY, Wreden C, Sweeney EG, Goers J, Remington SJ, et al. Chemorepulsion from the Quorum Signal Autoinducer-2 Promotes *Helicobacter pylori* Biofilm Dispersal. *mBio.* 2015;6(4):e00379. Epub 2015/07/15. doi: 10.1128/mBio.00379-15. PubMed PMID: 26152582; PubMed Central PMCID: PMC4488943.
20. Kim SM, Park JH, Lee HS, Kim WB, Ryu JM, Han HJ, et al. LuxR homologue SmcR is essential for *Vibrio vulnificus* pathogenesis and biofilm detachment, and its expression is induced by host cells. *Infect Immun.* 2013;81(10):3721-30. Epub 20130729. doi: 10.1128/IAI.00561-13. PubMed PMID: 23897607; PubMed Central PMCID: PMC3811769.
21. Taga ME, Miller ST, Bassler BL. Lsr-mediated transport and processing of AI-2 in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol.* 2003;50(4):1411-27. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03781.x. PubMed PMID: 14622426.
22. Jesudhasan PR, Cepeda ML, Widmer K, Dowd SE, Soni KA, Hume ME, et al. Transcriptome analysis of genes controlled by luxS/autoinducer-2 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Foodborne Pathog Dis.* 2010;7(4):399-410. doi: 10.1089/fpd.2009.0372. PubMed PMID: 19909098; PubMed Central PMCID: PMC3132110.
23. Hardie KR, Cooksley C, Green AD, Winzer K. Autoinducer 2 activity in *Escherichia coli* culture supernatants can be actively reduced despite maintenance of an active synthase, LuxS. *Microbiology (Reading).* 2003;149(Pt 3):715-28. doi: 10.1099/mic.0.25853-0. PubMed PMID: 12634340.
24. Coburn B, Grassl GA, Finlay BB. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol Cell Biol.* 2007;85(2):112-8. Epub 20061205. doi: 10.1038/sj.icb.7100007. PubMed PMID: 17146467.
25. A Novel Data-Mining Approach Systematically Links Genes to Traits. *PLoS Biol.* 2005;3(5): e166. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030166>.
26. Ohl ME, Miller SI. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annu Rev Med.* 2001;52:259-74. doi: 10.1146/annurev.med.52.1.259. PubMed PMID: 11160778.

27. Kariuki S, Revathi G, Kariuki N, Kiiru J, Mwituria J, Hart CA. Characterisation of community acquired non-typhoidal *Salmonella* from bacteraemia and diarrhoeal infections in children admitted to hospital in Nairobi, Kenya. *BMC Microbiol.* 2006;6:101. Epub 20061215. doi: 10.1186/1471-2180-6-101. PubMed PMID: 17173674; PubMed Central PMCID: PMC1764016.
28. Kozak GK, MacDonald D, Landry L, Farber JM. Foodborne outbreaks in Canada linked to produce: 2001 through 2009. *J Food Prot.* 2013;76(1):173-83. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-126. PubMed PMID: 23317873.
29. Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect.* 2000;2(2):145-56. doi: 10.1016/s1286-4579(00)00273-2. PubMed PMID: 10742687.
30. Olsen JE, Brown DJ, Thomsen LE, Platt DJ, Chadfield MS. Differences in the carriage and the ability to utilize the serotype associated virulence plasmid in strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium investigated by use of a self-transferable virulence plasmid, pOG669. *Microb Pathog.* 2004;36(6):337-47. doi: 10.1016/j.micpath.2004.02.005. PubMed PMID: 15120160.
31. Lou L, Zhang P, Piao R, Wang Y. *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and Its Complex Regulatory Network. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:270. Epub 20190731. doi: 10.3389/fcimb.2019.00270. PubMed PMID: 31428589; PubMed Central PMCID: PMC6689963.
32. Kuhle V, Hensel M. Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(22):2812-26. doi: 10.1007/s00018-004-4248-z. PubMed PMID: 15558211.
33. Barth S, Bauerfeind R. [Virulence plasmids of *Salmonella enterica*--incidence and properties]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2005;118(1-2):8-23. PubMed PMID: 15690632.
34. Stecher B, Hapfelmeier S, Muller C, Kremer M, Stallmach T, Hardt WD. Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infect Immun.* 2004;72(7):4138-50. doi:

- 10.1128/IAI.72.7.4138-4150.2004. PubMed PMID: 15213159; PubMed Central PMCID: PMC427403.
35. Baumler AJ, Tsolis RM, Heffron F. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun*. 1996;64(5):1862-5. doi: 10.1128/iai.64.5.1862-1865.1996. PubMed PMID: 8613405; PubMed Central PMCID: PMC174006.
36. Rehman T, Yin L, Latif MB, Chen J, Wang K, Geng Y, et al. Adhesive mechanism of different *Salmonella* fimbrial adhesins. *Microb Pathog*. 2019;137:103748. Epub 20190912. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103748. PubMed PMID: 31521802.
37. Boddicker JD, Ledebor NA, Jagnow J, Jones BD, Clegg S. Differential binding to and biofilm formation on, HEp-2 cells by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is dependent upon allelic variation in the fimH gene of the fim gene cluster. *Mol Microbiol*. 2002;45(5):1255-65. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03121.x. PubMed PMID: 12207694.
38. Flemming HC, Wuertz S. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(4):247-60. doi: 10.1038/s41579-019-0158-9. PubMed PMID: 30760902.
39. Mah TF. Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiol*. 2012;7(9):1061-72. doi: 10.2217/fmb.12.76. PubMed PMID: 22953707.
40. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8(9):623-33. doi: 10.1038/nrmicro2415. PubMed PMID: WOS:000280855500009.
41. Limoli DH, Jones CJ, Wozniak DJ. Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiol Spectr*. 2015;3(3). doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014. PubMed PMID: 26185074; PubMed Central PMCID: PMC4657554.
42. Fong JNC, Yildiz FH. Biofilm Matrix Proteins. *Microbiol Spectr*. 2015;3(2). doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0004-2014. PubMed PMID: 26104709; PubMed Central PMCID: PMC4480581.
43. Okshevsky M, Meyer RL. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Crit Rev Microbiol*. 2015;41(3):341-52. Epub 20131204. doi: 10.3109/1040841X.2013.841639. PubMed PMID: 24303798.

44. Taylor PK, Yeung AT, Hancock RE. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: towards the development of novel anti-biofilm therapies. *J Biotechnol.* 2014;191:121-30. Epub 20140918. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.09.003. PubMed PMID: 25240440.
45. Sharma D, Misba L, Khan AU. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019;8:76. Epub 20190516. doi: 10.1186/s13756-019-0533-3. PubMed PMID: 31131107; PubMed Central PMCID: PMC6524306.
46. Wu H, Moser C, Wang HZ, Hoiby N, Song ZJ. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int J Oral Sci.* 2015;7(1):1-7. Epub 20150323. doi: 10.1038/ijos.2014.65. PubMed PMID: 25504208; PubMed Central PMCID: PMC4817533.
47. Carmen JC, Roeder BL, Nelson JL, Ogilvie RL, Robison RA, Schaalje GB, et al. Treatment of biofilm infections on implants with low-frequency ultrasound and antibiotics. *Am J Infect Control.* 2005;33(2):78-82. doi: 10.1016/j.ajic.2004.08.002. PubMed PMID: 15761406; PubMed Central PMCID: PMC1361257.
48. Hoiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol.* 2010;5(11):1663-74. doi: 10.2217/fmb.10.125. PubMed PMID: 21133688.
49. Abu Khweek A, Fernandez Davila NS, Caution K, Akhter A, Abdulrahman BA, Tazi M, et al. Biofilm-derived *Legionella pneumophila* evades the innate immune response in macrophages. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013;3:18. Epub 20130527. doi: 10.3389/fcimb.2013.00018. PubMed PMID: 23750338; PubMed Central PMCID: PMC3664316.
50. Otto M. Staphylococcal Biofilms. *Microbiol Spectr.* 2018;6(4). doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0023-2018. PubMed PMID: 30117414; PubMed Central PMCID: PMC6282163.
51. Bai X, Liu D, Xu L, Tenguria S, Drolia R, Gallina NLF, et al. Biofilm-isolated *Listeria monocytogenes* exhibits reduced systemic dissemination at the early (12-24 h) stage of infection in a mouse model. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2021;7(1):18. Epub 20210208. doi: 10.1038/s41522-021-00189-5. PubMed PMID: 33558519; PubMed Central PMCID: PMC7870835.

52. Lagha R, Ben Abdallah F, Al-Sarhan BO, Al-Sodany Y. Antibacterial and Biofilm Inhibitory Activity of Medicinal Plant Essential Oils Against *Escherichia coli* Isolated from UTI Patients. *Molecules*. 2019;24(6). Epub 20190323. doi: 10.3390/molecules24061161. PubMed PMID: 30909573; PubMed Central PMCID: PMC6471185.
53. Harrell JE, Hahn MM, D'Souza SJ, Vasicek EM, Sandala JL, Gunn JS, et al. *Salmonella* Biofilm Formation, Chronic Infection, and Immunity Within the Intestine and Hepatobiliary Tract. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:624622. Epub 20210202. doi: 10.3389/fcimb.2020.624622. PubMed PMID: 33604308; PubMed Central PMCID: PMC7885405.
54. Silva AJ, Benitez JA. *Vibrio cholerae* Biofilms and Cholera Pathogenesis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(2):e0004330. Epub 20160204. doi: 10.1371/journal.pntd.0004330. PubMed PMID: 26845681; PubMed Central PMCID: PMC4741415.
55. Hathroubi S, Servetas SL, Windham I, Merrell DS, Ottemann KM. *Helicobacter pylori* Biofilm Formation and Its Potential Role in Pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2018;82(2). Epub 20180509. doi: 10.1128/MMBR.00001-18. PubMed PMID: 29743338; PubMed Central PMCID: PMC5968456.
56. Han Q, Song X, Zhang Z, Fu J, Wang X, Malakar PK, et al. Removal of Foodborne Pathogen Biofilms by Acidic Electrolyzed Water. *Front Microbiol*. 2017;8:988. Epub 20170607. doi: 10.3389/fmicb.2017.00988. PubMed PMID: 28638370; PubMed Central PMCID: PMC5461821.
57. Walker TS, Bais HP, Deziel E, Schweizer HP, Rahme LG, Fall R, et al. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant Physiol*. 2004;134(1):320-31. Epub 20031230. doi: 10.1104/pp.103.027888. PubMed PMID: 14701912; PubMed Central PMCID: PMC316311.
58. Dobretsov S, Abed RM, Teplitski M. Mini-review: Inhibition of biofouling by marine microorganisms. *Biofouling*. 2013;29(4):423-41. doi: 10.1080/08927014.2013.776042. PubMed PMID: 23574279.
59. Demirel YK, Uzun D, Zhang Y, Fang HC, Day AH, Turan O. Effect of barnacle fouling on ship resistance and powering. *Biofouling*.

- 2017;33(10):819-34. Epub 20171005. doi: 10.1080/08927014.2017.1373279. PubMed PMID: 28980835.
60. Castro MC, Fileman TW, Hall-Spencer JM. Invasive species in the Northeastern and Southwestern Atlantic Ocean: A review. *Mar Pollut Bull.* 2017;116(1-2):41-7. Epub 20170124. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.12.048. PubMed PMID: 28126398.
61. Tolker-Nielsen T. Biofilm Development. *Microbiol Spectr.* 2015;3(2):MB-0001-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0001-2014. PubMed PMID: 26104692.
62. Carniello V, Peterson BW, van der Mei HC, Busscher HJ. Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surface-programmed biofilm growth. *Adv Colloid Interface Sci.* 2018;261:1-14. Epub 20181024. doi: 10.1016/j.cis.2018.10.005. PubMed PMID: 30376953.
63. Bos R, van der Mei HC, Busscher HJ. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions--its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol Rev.* 1999;23(2):179-230. doi: 10.1111/j.1574-6976.1999.tb00396.x. PubMed PMID: 10234844.
64. Berne C, Ducret A, Hardy GG, Brun YV. Adhesins Involved in Attachment to Abiotic Surfaces by Gram-Negative Bacteria. *Microbiol Spectr.* 2015;3(4). doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0018-2015. PubMed PMID: 26350310; PubMed Central PMCID: PMC4566860.
65. Wood TK. Precedence for the structural role of flagella in biofilms. *mBio.* 2013;4(2):e00225-13. Epub 20130423. doi: 10.1128/mBio.00225-13. PubMed PMID: 23611910; PubMed Central PMCID: PMC3631614.
66. Maldarelli GA, Piepenbrink KH, Scott AJ, Freiberg JA, Song Y, Achermann Y, et al. Type IV pili promote early biofilm formation by *Clostridium difficile*. *Pathog Dis.* 2016;74(6). Epub 20160630. doi: 10.1093/femspd/ftw061. PubMed PMID: 27369898; PubMed Central PMCID: PMC5985507.
67. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(9):563-75. doi: 10.1038/nrmicro.2016.94. PubMed PMID: 27510863.

68. Jonas K, Melefors O, Romling U. Regulation of c-di-GMP metabolism in biofilms. *Future Microbiol.* 2009;4(3):341-58. doi: 10.2217/Fmb.09.7. PubMed PMID: WOS:000265342700011.
69. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Developmental regulation of microbial biofilms. *Curr Opin Biotechnol.* 2002;13(3):228-33. doi: 10.1016/s0958-1669(02)00318-x. PubMed PMID: 12180097.
70. Rumbaugh KP, Sauer K. Biofilm dispersion. *Nat Rev Microbiol.* 2020;18(10):571-86. Epub 20200612. doi: 10.1038/s41579-020-0385-0. PubMed PMID: 32533131; PubMed Central PMCID: PMC8564779.
71. Kaplan JB. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res.* 2010;89(3):205-18. Epub 20100205. doi: 10.1177/0022034509359403. PubMed PMID: 20139339; PubMed Central PMCID: PMC3318030.
72. Verderosa AD, Totsika M, Fairfull-Smith KE. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. *Front Chem.* 2019;7:824. Epub 20191128. doi: 10.3389/fchem.2019.00824. PubMed PMID: 31850313; PubMed Central PMCID: PMC6893625.
73. Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. Salmonella biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International.* 2012;45(2):502-31. doi: 10.1016/j.foodres.2011.01.038. PubMed PMID: WOS:000302032200005.
74. Zogaj X, Nimtz M, Rohde M, Bokranz W, Romling U. The multicellular morphotypes of Salmonella typhimurium and Escherichia coli produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol.* 2001;39(6):1452-63. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02337.x. PubMed PMID: 11260463.
75. Maruzani R, Sutton G, Nocerino P, Marvasi M. Exopolymeric substances (EPS) from Salmonella enterica: polymers, proteins and their interactions with plants and abiotic surfaces. *J Microbiol.* 2019;57(1):1-8. Epub 20180906. doi: 10.1007/s12275-019-8353-y. PubMed PMID: 30552630.
76. Wang H, Huang Y, Wu SY, Li YY, Ye Y, Zheng YJ, et al. Extracellular DNA Inhibits Salmonella enterica Serovar Typhimurium and S. enterica Serovar Typhi Biofilm Development on Abiotic Surfaces. *Curr*

- Microbiol. 2014;68(2):262-8. doi: 10.1007/s00284-013-0468-5. PubMed PMID: WOS:000329994500020.
77. Dubois-Brissonnet F. Adaptation of Salmonella to Antimicrobials. Food-Processing Environments 2012.
 78. Simm R, Ahmad I, Rhen M, Le Guyon S, Romling U. Regulation of biofilm formation in Salmonella enterica serovar Typhimurium. Future Microbiol. 2014;9(11):1261-82. doi: 10.2217/fmb.14.88. PubMed PMID: 25437188.
 79. Gerstel U, Romling U. The csgD promoter, a control unit for biofilm formation in Salmonella typhimurium. Res Microbiol. 2003;154(10):659-67. doi: 10.1016/j.resmic.2003.08.005. PubMed PMID: 14643403.
 80. Jonas K, Melefors O, Romling U. Regulation of c-di-GMP metabolism in biofilms. Future Microbiol. 2009;4(3):341-58. Epub 2009/03/31. doi: 10.2217/fmb.09.7. PubMed PMID: 19327118.
 81. Ahmad I, Cimdins A, Beske T, Romling U. Detailed analysis of c-di-GMP mediated regulation of csgD expression in Salmonella typhimurium. BMC Microbiol. 2017;17(1):27. Epub 20170202. doi: 10.1186/s12866-017-0934-5. PubMed PMID: 28148244; PubMed Central PMCID: PMC5289004.
 82. Babitzke P, Romeo T. CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. Curr Opin Microbiol. 2007;10(2):156-63. Epub 20070323. doi: 10.1016/j.mib.2007.03.007. PubMed PMID: 17383221.
 83. Martinez LC, Yakhnin H, Camacho MI, Georgellis D, Babitzke P, Puente JL, et al. Integration of a complex regulatory cascade involving the SirA/BarA and Csr global regulatory systems that controls expression of the Salmonella SPI-1 and SPI-2 virulence regulons through HilD. Mol Microbiol. 2011;80(6):1637-56. Epub 2011/04/27. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07674.x. PubMed PMID: 21518393; PubMed Central PMCID: PMC3116662.
 84. Lawhon SD, Frye JG, Suyemoto M, Porwollik S, McClelland M, Altier C. Global regulation by CsrA in Salmonella typhimurium. Mol Microbiol. 2003;48(6):1633-45. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03535.x. PubMed PMID: 12791144.

85. Solano C, Garcia B, Valle J, Berasain C, Ghigo JM, Gamazo C, et al. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol Microbiol.* 2002;43(3):793-808. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02802.x. PubMed PMID: 11929533.
86. Teplitski M, Al-Agely A, Ahmer BMM. Contribution of the SirA regulon to biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology (Reading).* 2006;152(Pt 11):3411-24. doi: 10.1099/mic.0.29118-0. PubMed PMID: 17074910.
87. Perez-Morales D, Bustamante VH. The global regulatory system Csr senses glucose through the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Mol Microbiol.* 2016;99(4):623-6. Epub 20151222. doi: 10.1111/mmi.13285. PubMed PMID: 26593223.
88. Federle MJ, Bassler BL. Interspecies communication in bacteria. *J Clin Invest.* 2003;112(9):1291-9. doi: 10.1172/JCI20195. PubMed PMID: 14597753; PubMed Central PMCID: PMC228483.
89. Xavier KB, Bassler BL. Regulation of uptake and processing of the quorum-sensing autoinducer AI-2 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2005;187(1):238-48. doi: 10.1128/JB.187.1.238-248.2005. PubMed PMID: 15601708; PubMed Central PMCID: PMC538819.
90. Dror N, Mandel M, Hazan Z, Lavie G. Advances in microbial biofilm prevention on indwelling medical devices with emphasis on usage of acoustic energy. *Sensors (Basel).* 2009;9(4):2538-54. Epub 20090414. doi: 10.3390/s90402538. PubMed PMID: 22574031; PubMed Central PMCID: PMC3348827.
91. Ramos ER, Reitzel R, Jiang Y, Hachem RY, Chaftari AM, Chemaly RF, et al. Clinical effectiveness and risk of emerging resistance associated with prolonged use of antibiotic-impregnated catheters: more than 0.5 million catheter days and 7 years of clinical experience. *Crit Care Med.* 2011;39(2):245-51. doi: 10.1097/CCM.0b013e3181feb83e. PubMed PMID: 21057308.
92. Zhu Y, Jin F, Yang S, Li J, Hu D, Liao L. Pre-treatment with EDTA-gallium prevents the formation of biofilms on surfaces. *Exp Ther Med.* 2013;5(4):1001-4. Epub 20130205. doi: 10.3892/etm.2013.946. PubMed PMID: 23596464; PubMed Central PMCID: PMC3627445.

93. Chernousova S, Eppler M. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2013;52(6):1636-53. Epub 20121217. doi: 10.1002/anie.201205923. PubMed PMID: 23255416.
94. Secinti KD, Ozalp H, Attar A, Sargon MF. Nanoparticle silver ion coatings inhibit biofilm formation on titanium implants. *J Clin Neurosci*. 2011;18(3):391-5. Epub 20110120. doi: 10.1016/j.jocn.2010.06.022. PubMed PMID: 21256031.
95. Jansen B, Kohnen W. Prevention of biofilm formation by polymer modification. *J Ind Microbiol*. 1995;15(4):391-6. doi: 10.1007/BF01569996. PubMed PMID: 8605077.
96. John T, Rajpurkar A, Smith G, Fairfax M, Triest J. Antibiotic pretreatment of hydrogel ureteral stent. *J Endourol*. 2007;21(10):1211-6. doi: 10.1089/end.2007.9904. PubMed PMID: 17949328.
97. Freebairn D, Linton D, Harkin-Jones E, Jones DS, Gilmore BF, Gorman SP. Electrical methods of controlling bacterial adhesion and biofilm on device surfaces. *Expert Rev Med Devices*. 2013;10(1):85-103. doi: 10.1586/erd.12.70. PubMed PMID: 23278226.
98. Justo JA, Bookstaver PB. Antibiotic lock therapy: review of technique and logistical challenges. *Infect Drug Resist*. 2014;7:343-63. Epub 20141212. doi: 10.2147/IDR.S51388. PubMed PMID: 25548523; PubMed Central PMCID: PMC4271721.
99. Jiang Y, Geng M, Bai L. Targeting Biofilms Therapy: Current Research Strategies and Development Hurdles. *Microorganisms*. 2020;8(8). Epub 20200811. doi: 10.3390/microorganisms8081222. PubMed PMID: 32796745; PubMed Central PMCID: PMC7465149.
100. Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol*. 2007;189(22):7945-7. Epub 20070803. doi: 10.1128/JB.00858-07. PubMed PMID: 17675377; PubMed Central PMCID: PMC2168682.
101. Chaignon P, Sadovskaya I, Ragunah C, Ramasubbu N, Kaplan JB, Jabbouri S. Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Appl Microbiol Biot*. 2007;75(1):125-32. doi: 10.1007/s00253-006-0790-y. PubMed PMID: WOS:000246094200015.

102. Nguyen UT, Burrows LL. DNase I and proteinase K impair *Listeria monocytogenes* biofilm formation and induce dispersal of pre-existing biofilms. *Int J Food Microbiol.* 2014;187:26-32. Epub 20140704. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.025. PubMed PMID: 25043896.
103. Christensen DG, Marsden AE, Hodge-Hanson K, Essock-Burns T, Visick KL. LapG mediates biofilm dispersal in *Vibrio fischeri* by controlling maintenance of the VCBS-containing adhesin LapV. *Mol Microbiol.* 2020;114(5):742-61. Epub 20200803. doi: 10.1111/mmi.14573. PubMed PMID: 32654271; PubMed Central PMCID: PMC7704791.
104. Baker P, Hill PJ, Snarr BD, Alnabelseya N, Pestrak MJ, Lee MJ, et al. Exopolysaccharide biosynthetic glycoside hydrolases can be utilized to disrupt and prevent *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Sci Adv.* 2016;2(5). doi: ARTN e1501632
10.1126/sciadv.1501632. PubMed PMID: WOS:000380073000013.
105. Okshevsky M, Meyer RL. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Crit Rev Microbiol.* 2015;41(3):341-52. doi: 10.3109/1040841x.2013.841639. PubMed PMID: WOS:000359360900005.
106. Kalia VC. Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnol Adv.* 2013;31(2):224-45. Epub 20121109. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.10.004. PubMed PMID: 23142623.
107. Mukherji R, Prabhune A. Novel glycolipids synthesized using plant essential oils and their application in quorum sensing inhibition and as antibiofilm agents. *ScientificWorldJournal.* 2014;2014:890709. Epub 20140114. doi: 10.1155/2014/890709. PubMed PMID: 24558341; PubMed Central PMCID: PMC3914375.
108. Rajkumari J, Borkotoky S, Murali A, Suchiang K, Mohanty SK, Busi S. Cinnamic acid attenuates quorum sensing associated virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Biotechnol Lett.* 2018;40(7):1087-100. Epub 20180421. doi: 10.1007/s10529-018-2557-9. PubMed PMID: 29680931.
109. Shukla V, Bhatena Z. Broad Spectrum Anti-Quorum Sensing Activity of Tannin-Rich Crude Extracts of Indian Medicinal Plants. *Scientifica (Cairo).* 2016;2016:5823013. Epub 20160414. doi:

- 10.1155/2016/5823013. PubMed PMID: 27190686; PubMed Central PMCID: PMC4848445.
110. Persson T, Hansen TH, Rasmussen TB, Skinderso ME, Givskov M, Nielsen J. Rational design and synthesis of new quorum-sensing inhibitors derived from acylated homoserine lactones and natural products from garlic. *Org Biomol Chem*. 2005;3(2):253-62. Epub 20041201. doi: 10.1039/b415761c. PubMed PMID: 15632967.
111. Wood TK, Knabel SJ, Kwan BW. Bacterial persister cell formation and dormancy. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(23):7116-21. Epub 20130913. doi: 10.1128/AEM.02636-13. PubMed PMID: 24038684; PubMed Central PMCID: PMC3837759.
112. Overhage J, Campisano A, Bains M, Torfs EC, Rehm BH, Hancock RE. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infect Immun*. 2008;76(9):4176-82. Epub 20080630. doi: 10.1128/IAI.00318-08. PubMed PMID: 18591225; PubMed Central PMCID: PMC2519444.
113. McDougald D, Rice SA, Barraud N, Steinberg PD, Kjelleberg S. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol*. 2011;10(1):39-50. Epub 20111128. doi: 10.1038/nrmicro2695. PubMed PMID: 22120588.
114. Barraud N, Kelso MJ, Rice SA, Kjelleberg S. Nitric oxide: a key mediator of biofilm dispersal with applications in infectious diseases. *Curr Pharm Des*. 2015;21(1):31-42. doi: 10.2174/1381612820666140905112822. PubMed PMID: 25189865.
115. Davies DG, Marques CN. A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J Bacteriol*. 2009;191(5):1393-403. Epub 20081212. doi: 10.1128/JB.01214-08. PubMed PMID: 19074399; PubMed Central PMCID: PMC2648214.
116. Estrela C, Costa ESR, Urban RC, Goncalves PJ, Silva JA, Estrela CRA, et al. Demetallization of *Enterococcus faecalis* biofilm: a preliminary study. *J Appl Oral Sci*. 2018;26:e20170374. Epub 20180208. doi: 10.1590/1678-7757-2017-0374. PubMed PMID: 29451651; PubMed Central PMCID: PMC5815357.
117. Fleming D, Rumbaugh K. The Consequences of Biofilm Dispersal on the Host. *Sci Rep-Uk*. 2018;8. doi: ARTN 10738

- 10.1038/s41598-018-29121-2. PubMed PMID: WOS:000438679100043.
118. Marvasi M, Chen C, Carrazana M, Durie IA, Teplitski M. Systematic analysis of the ability of Nitric Oxide donors to dislodge biofilms formed by *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7. *AMB Express*. 2014;4:42. Epub 20140605. doi: 10.1186/s13568-014-0042-y. PubMed PMID: 24995149; PubMed Central PMCID: PMC4070026.
119. Marvasi M, Durie IA, Henriquez T, Satkute A, Matuszewska M, Prado RC. Dispersal of human and plant pathogens biofilms via nitric oxide donors at 4 degrees C. *AMB Express*. 2016;6(1):49. Epub 20160726. doi: 10.1186/s13568-016-0220-1. PubMed PMID: 27457245; PubMed Central PMCID: PMC4960098.
120. Marvasi M, Durie IA, McLamore ES, Vanegas DC, Chaturvedi P. *Salmonella enterica* biofilm-mediated dispersal by nitric oxide donors in association with cellulose nanocrystal hydrogels. *AMB Express*. 2015;5:28. Epub 20150523. doi: 10.1186/s13568-015-0114-7. PubMed PMID: 26020015; PubMed Central PMCID: PMC4441645.
121. Islam M, Durie I, Ramadan R, Purchase D, Marvasi M. Exploitation of nitric oxide donors to control bacterial adhesion on ready-to-eat vegetables and dispersal of pathogenic biofilm from polypropylene. *J Sci Food Agric*. 2020;100(7):3078-86. Epub 20200302. doi: 10.1002/jsfa.10340. PubMed PMID: 32077490.
122. de la Fuente-Nunez C, Reffuveille F, Haney EF, Straus SK, Hancock RE. Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response. *PLoS Pathog*. 2014;10(5):e1004152. Epub 20140522. doi: 10.1371/journal.ppat.1004152. PubMed PMID: 24852171; PubMed Central PMCID: PMC4031209.
123. Sepehr S, Rahmani-Badi A, Babaie-Naiej H, Soudi MR. Unsaturated fatty acid, cis-2-decenoic acid, in combination with disinfectants or antibiotics removes pre-established biofilms formed by food-related bacteria. *PLoS One*. 2014;9(7):e101677. Epub 20140707. doi: 10.1371/journal.pone.0101677. PubMed PMID: 25000301; PubMed Central PMCID: PMC4084997.
124. Yuksel FN, Buzrul S, Akcelik M, Akcelik N. Inhibition and eradication of *Salmonella Typhimurium* biofilm using P22 bacteriophage, EDTA and

nisin. Biofouling. 2018;34(9):1046-54. Epub 20190108. doi: 10.1080/08927014.2018.1538412. PubMed PMID: 30621457.

125. Xu X, Peng Q, Zhang Y, Tian D, Zhang P, Huang Y, et al. Antibacterial potential of a novel *Lactobacillus casei* strain isolated from Chinese northeast sauerkraut and the antibiofilm activity of its exopolysaccharides. Food Funct. 2020;11(5):4697-706. Epub 20200514. doi: 10.1039/d0fo00905a. PubMed PMID: 32406901.

BÖLÜM 11

RNA İNTERFERANS TABANLI NANOTEKNOLOJİK TAŞIYICI SİSTEMLERİN KANSER TEDAVİSİNDEKİ ROLÜ

Fatma Zeynep BOZKURT¹,

Prof. Dr. Pelin MUTLU^{1,*}

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.17114289>

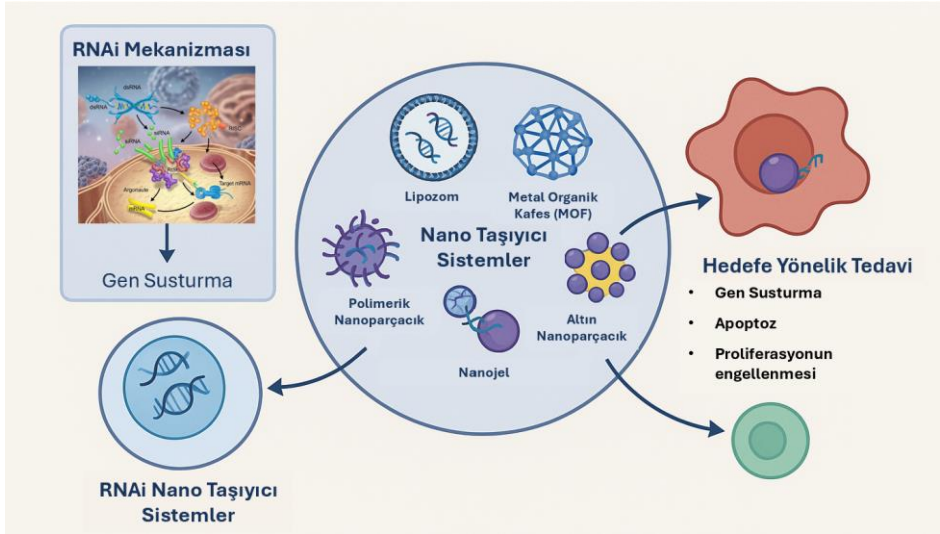
¹ Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı, 06135, Ankara, Türkiye

*Sorumlu Yazar: Prof. Dr. Pelin Mutlu; pmutlu@ankara.edu.tr

Giriş

Kanser dünya genelinde önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmekte olup; kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel tedavi yöntemleri ciddi yan etkileri ile tedavi başarısını sınırlamaktadır. Geleneksel tedavi yöntemlerinin bu dezavantajları daha etkili ve hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Gen susturma mekanizması olan RNA interferans (RNAi) son yıllarda kanser tedavisinde umut vadeden bir yaklaşım olarak öne çıkmıştır. RNAi mekanizması, kanser hücrelerinin proliferasyonu, hayatta kalması ve tümörogenezinde rol oynayan spesifik genlerin susturulmasına yönelik güçlü bir terapötik yaklaşım sunmaktadır. Ancak, küçük müdahaleci RNA'lar (siRNA) ve mikroRNA'lar (miRNA) gibi RNAi temelli moleküllerin *in vivo* stabilitesinin düşük olması ve hedef hücrelere etkin şekilde iletilememesi gibi biyolojik engeller bu teknolojilerin klinik uygulamalarını önemli ölçüde sınırlamaktadır. Söz konusu zorlukların aşılmasında nanoteknoloji temelli taşıyıcı sistemler umut vadeden çözümler sunmaktadır. Nano ilaç taşıyıcı sistemler RNAi moleküllerini enzimatik bozunmalardan koruyarak kanda dolaşım sürelerini uzatmakta ve tümör bölgelerine hedefli bir şekilde ulaşmalarını sağlayarak RNAi tabanlı tedavilerin etkinliğini artırmaktadır (Şekil 1).

Bu kitap bölümü, kanser tedavisinde RNAi temelli nano ilaç taşıyıcı sistemlerin temel prensiplerini, uygulama alanlarını, karşılaşılan zorlukları ve geleceğe yönelik perspektiflerini ele almaktadır. Bu çerçevede, RNAi mekanizmasının işleyişi, farklı nano taşıyıcı sistemlerin yapısal ve fonksiyonel özellikleri ile kanser tedavisindeki rollerine odaklanılmıştır. Ayrıca ilaç direncinin aşılması, kombine tedavi yaklaşımları ve hedefe yönelik tedaviler gibi uygulama alanları tartışılmıştır.



Şekil 1: RNA İnterferans İçeren Nano İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Terapötik Etkinliği

1. RNA İnterferans (RNAi)

1.1. RNAi Mekanizması

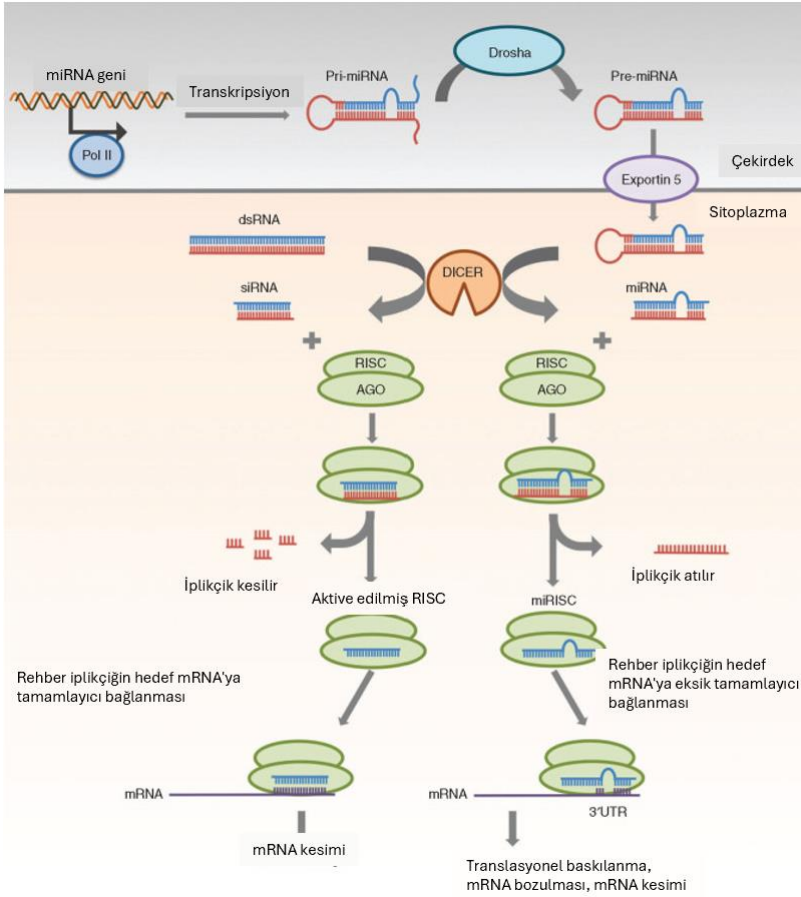
RNAi, belirli genlerin ifadesini küçük RNA molekülleri aracılığıyla hedefli bir şekilde baskılayan ve hücrede doğal olarak işleyen bir gen susturma mekanizmasıdır. Bu mekanizma mayalardan memelilere kadar birçok ökaryotik canlıda bulunmaktadır. Genetik ifadenin düzenlenmesinde ve genomun transpozonlar ile virüslere karşı korunmasında önemli bir rol oynamaktadır [1]. Bununla birlikte, RNAi belirli genlerin ifadesini spesifik olarak susturarak hastalıkların tedavisinde potansiyel bir etkinlik sunmaktadır.

RNAi'nin keşfi, moleküler biyoloji alanında çığır açan bir gelişme olmuştur. Bu mekanizma ilk olarak 1998 yılında Andrew Z. Fire ve Craig C. Mello tarafından *Caenorhabditis elegans* üzerinde yapılan çalışmalarla tanımlanmıştır [2]. Fire ve Mello'nun çalışmaları, çift sarmallı RNA'nın (dsRNA), gen ifadesini tek sarmallı RNA'ya kıyasla çok daha etkili biçimde baskıladığını deneysel olarak ortaya koymuştur. Bu çığır açıcı bulgu, bilinen gen susturma mekanizmalarından belirgin şekilde ayrılarak, RNA'nın yalnızca bir mesaj taşıyıcısı değil, aynı zamanda gen ifadesini doğrudan düzenleyebilen güçlü bir biyolojik kontrol unsuru olduğunu da gözler önüne sermiştir. Bu çığır açan keşifleri nedeniyle Andrew Z. Fire ve Craig C. Mello, 2006 yılında Fizyoloji veya Tıp alanında Nobel Ödülü'ne layık görülmüşlerdir [2]. Nobel Komitesi, RNAi'nin gen ifadesinin kontrolünde temel bir mekanizma olduğunu ve gelecekteki tıbbi araştırmalar için büyük potansiyel taşıdığını vurgulamıştır.

Bu keşif genetik araştırmalarda yeni bir dönemi başlatmış ve gen susturma teknolojilerinin geliştirilmesine zemin hazırlamıştır.

RNAi mekanizmasında görev alan başlıca RNA molekülleri, küçük interferans RNA'lar (siRNA), mikroRNA'lar (miRNA) ve kısa saç tokası benzeri, RNA (shRNA) molekülleri olarak sınıflandırılır. Bu RNA molekülleri, genetik ifadenin düzenlenmesinde, genom bütünlüğünün korunmasında ve özellikle kanser gibi hastalıklarda potansiyel tedavi hedefleri olarak önemli görevler üstlenmektedirler [2].

siRNA, miRNA ve shRNA gibi gen susturma kapasitesine sahip küçük RNA moleküllerinin işlev gösterebilmeleri, RNA-indüklenmiş susturma kompleksi (RISC) ile etkileşime geçerek bu kompleksin bir parçası haline gelmelerine bağlıdır [5]. RISC, merkezinde bir Argonaute (AGO) proteinini içeren çok bileşenli bir protein komplekstir. RISC'e katılan çift sarmallı RNA, ATP'ye bağımlı bir süreçle ayrıştırılarak tek sarmallı aktif forma dönüştürülür. Bu ayrışma sırasında, genellikle hedef mRNA'ya tamamlayıcı olan antisense (kılavuz) zincir kompleks içinde tutulurken, sense zincir hücre tarafından parçalanır. Kılavuz zincir, hedef mRNA'yı baz eşleşmesi yoluyla tanıyarak RISC'i spesifik bağlanma bölgesine yönlendirir ve hedefe özgü gen susturma etkisi başlatılır. Eğer kılavuz zincir hedef mRNA'ya tam olarak tamamlayıcı ise—siRNA'larda olduğu gibi—AGO proteini mRNA'yı keserek doğrudan parçalar. Öte yandan, endojen miRNA'lar gibi kılavuz RNA'ların hedef mRNA ile yalnızca kısmi baz eşleşmesi göstermesi durumunda, RISC kompleksi mRNA'nın ribozomlar tarafından translasyonunu engelleyerek translasyonel represyona neden olur. Ayrıca, deadenilasyon ve ardından gelen dekapping süreçleri aracılığıyla mRNA'nın kademeli degradasyonu başlatılabilir. Bu mekanizma, hücresel gen ifadesinin post-transkripsiyonel düzeyde hassas ve dinamik bir şekilde düzenlenmesini sağlamaktadır (Şekil 2).



Şekil 2: siRNA ve miRNA aracılı gen susturma mekanizmaları [3]

1.1.1. Küçük Müdahaleci RNA (siRNA)

siRNA molekülleri, genellikle 19–23 nükleotit uzunluğunda dsRNA parçalarıdır. Bu moleküller dışarıdan sentetik olarak hücreye aktarılabilirdiği gibi hücre içinde bulunan uzun dsRNA'ların Dicer enzimi tarafından özgül olarak parçalanması sonucu da doğal olarak üretilebilirler [4]. Dicer, RNaz III ailesine ait bir endonükleaz olup dsRNA'yı, her biri yaklaşık 21–23 nükleotit uzunluğunda olacak şekilde kısa RNA fragmanlarına ayırıştırır ve bu sayede RNAi mekanizmasının aktif bileşenlerini oluşturur. Bu işlem sonucunda her bir RNA zincirinin 3' ucunda genellikle iki nükleotitlik tek sarmallı çıkıntılar (overhang) ve 5' ucunda monofosfat grubu bulunan çift sarmallı kısa RNA molekülleri oluşur. Bu karakteristik yapılar siRNA'nın tanınması ve RNAi mekanizmasında etkin şekilde işlev görebilmesi için kritik öneme sahiptir. Bu

yapısal uygunluk sayesinde, oluşan olgun siRNA'lar RNA-indüklenmiş susturma kompleksi (RISC) ile kolaylıkla bütünleşir. RISC kompleksi içerisinde yer alan kılavuz RNA zinciri hedef mRNA'nın tamamlayıcı dizisine özgün olarak bağlanarak gen susturma sürecini başlatır. Bu tamamlama yüksek derecede spesifiktir ve hedef mRNA'nın doğrudan parçalanmasına yol açar. mRNA'nın parçalanması, protein sentezinin durdurulmasına ve dolayısıyla gen ifadesinin susturulmasına neden olur (Şekil 2). Bu mekanizma özellikle viral enfeksiyonlara karşı hücresel savunmada ve transpozonların kontrolünde önemli bir rol oynar.

1.1.2. MikroRNA (miRNA)

miRNA molekülleri, yaklaşık 18-24 nükleotit uzunluğunda, protein kodlamayan tek sarmallı endojen RNA molekülleridir. miRNA'ların biyogenezi, siRNA'lardan farklı bir yol izler. İlk olarak RNA polimeraz II tarafından pri-miRNA (primer miRNA) olarak çekirdekte sentezlenirler. Pri-miRNA'lar çekirdek içinde RNaz III ailesine ait Drosha enzimi ve yardımcı protein DGCR8'in oluşturduğu işleme kompleksi tarafından kesildikten sonra yaklaşık 70 nükleotit uzunluğunda saç tokası benzeri bir yapısı olan pre-miRNA moleküllerine dönüştürülür [5]. Pre-miRNA'lar daha sonra Exportin-5 proteini aracılığıyla çekirdekten sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmada, Dicer enzimi pre-miRNA'yı olgun ve tek sarmallı miRNA'ya işler. Olgun miRNA'lar ise RISC kompleksine dahil olurlar. siRNA'ların aksine miRNA'lar hedef mRNA'lara genellikle kısmi tamamlama yoluyla bağlanırlar. Bu kısmi tamamlanma hedef mRNA'nın translasyonunun inhibe edilmesine veya mRNA'nın daha yavaş bir şekilde degradasyonuna yol açar (Şekil 2). miRNA'lar, hücresel gelişim, farklılaşma, apoptoz ve metabolizma gibi birçok biyolojik süreçte gen ifadesinin düzenlenmesinde kritik rol oynarlar [6].

1.1.3. Kısa Saç Tokası Benzeri RNA (shRNA)

shRNA molekülleri, hücre içinde siRNA'ya dönüşebilen, saç tokası şeklinde çift sarmallı RNA molekülleridir. shRNA'lar, lentivirüs veya adenovirüs vektörleri gibi bir ekspresyon vektörüne klonlanarak hücrelere verilir. shRNA'lar hücre içine girdikten sonra çekirdekte RNA polimeraz III tarafından transkribe edilir ve pre-miRNA'lara benzer şekilde işlenirler. Dicer enzimi tarafından kesilip olgun siRNA'lara dönüştürülerek RISC kompleksine dahil olurlar. shRNA'ların en önemli avantajı, hücre genomuna kalıcı olarak entegre edilebilmeleri sayesinde uzun süreli gen susturmayı mümkün kılmalarıdır. Bu özellikleri, onları hem gen fonksiyonlarını incelemeye yönelik araştırmalarda hem de potansiyel gen tedavisi yaklaşımlarında değerli bir araç haline getirmektedir.

1.1.4. RNAi'nin Biyolojik Roller ve Uygulama Alanları

RNAi, ökaryotik hücrelerde post-transkripsiyonel gen susturma mekanizması olarak görev yapan ve evrimsel olarak korunmuş bir süreçtir. Bu mekanizma, dsRNA moleküllerinin, özgül mRNA hedeflerine bağlanarak onların translasyonunu baskılaması ya da hedef mRNA'nın degradasyonunu tetiklemesiyle işlev görür. RNAi'nin doğal biyolojik rolleri arasında viral enfeksiyonlara karşı hücresel savunma, transpozon aktivitesinin genom bütünlüğü lehine sınırlandırılması, embriyonik gelişim boyunca hücresel farklılaşma ve doku morfogenez gibi süreçlerin düzenlenmesi yer almaktadır. Bunu yanı sıra RNAi yolu aracılığıyla gen ifadesinin dokuya özgü, zamana bağlı ve çevresel uyarılara yanıt verecek biçimde düzenlenmesi mümkündür. Bu yönüyle RNAi, hücrenin hem genetik kararlılığını koruyan hem de dinamik genetik tepkiler üretebilen bir düzenleyici katmanı olarak işlev görmektedir.

RNAi'nin keşfi, fonksiyonel genomik çalışmalarında devrim niteliğinde bir ilerleme sağlamıştır. Belirli genlerin susturulması yoluyla fenotipik sonuçların incelenmesi, genetik devrelerin işleyişini çözümlemede güçlü bir araç sunmuştur. Bu nedenle RNAi, gen fonksiyonunun analizi ve hedef gen tanımlamasında yaygın olarak kullanılmaktadır.

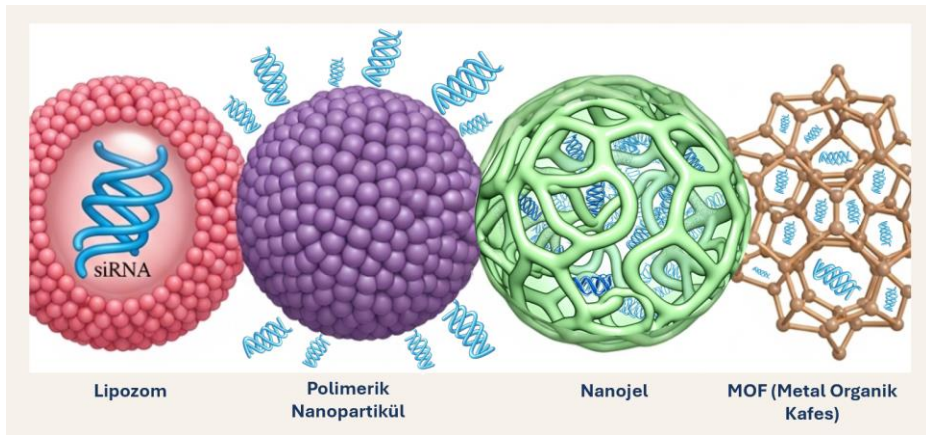
Biyomedikal uygulamalar açısından bakıldığında, RNAi temelli yaklaşımlar; kanser, viral enfeksiyonlar, nörodejeneratif hastalıklar ve kalıtsal genetik bozukluklar gibi çok sayıda kompleks hastalığın tedavisinde terapötik potansiyele sahiptir. Hastalıkla ilişkili gen ifadesinin seçici biçimde baskılanması amacıyla siRNA ve miRNA türevleri, mimetikleri ya da inhibitörleri terapötik ajan olarak kullanılmaktadır. Bu küçük RNA molekülleri, hücre içi sinyal yollarına doğrudan müdahale edebilme ve hastalığa özgü moleküler mekanizmaları hedefli olarak düzenleyebilme yetenekleri sayesinde güçlü bir klinik potansiyel taşımaktadır.

Tüm bu avantajlarının yanında, RNAi temelli tedavilerin klinik uygulamaya entegrasyonu birtakım biyolojik ve teknik zorlukları da beraberinde getirmektedir. siRNA'ların serumda stabil olmaması, hücre içine etkin şekilde alınamaması, immünojenik etkiler oluşturmaması ve hedef dışı gen susturma gibi istenmeyen etkiler bu yaklaşımların önündeki başlıca engellerdir. Bu sorunları aşmak amacıyla, ilaç taşıma sistemlerinde nanoteknoloji tabanlı çözümler geliştirilmektedir. Lipid nanopartiküller, polimerik nanotaşıyıcılar, dendrimer yapılar ve metal-organik kafesler (MOF'lar) gibi yenilikçi platformlar; hedefleme, kontrollü salım, stabilite ve biyolojik bariyerleri aşma konularında avantaj sağlayarak RNAi'nin klinik başarısını artırmaya yönelik umut verici stratejiler olarak öne çıkmaktadır.

2. Nano Taşıyıcı Sistemler

RNAi moleküllerinin *in vivo* uygulamalarında karşılaşılan en büyük zorluklardan biri bu moleküllerin serumda stabilitesini sağlamak ve hedeflenen hücrelere etkili bir şekilde ulaştırmaktır. Bu kapsamda, nanoteknoloji alanındaki gelişmeler söz konusu zorlukların üstesinden gelmek için umut vadeden çözümler sunmaktadır. Nano taşıyıcı sistemler ilaçlar, peptitler veya genler gibi aktif bileşikler taşımak üzere geliştirilen, 1 ila 100 nanometre boyut aralığındaki partiküler sistemler olarak tanımlanmaktadır [7]. Bu sistemler biyoyararlanımı artırma, *in vivo* stabiliteyi iyileştirme ve hedeflenen hücrelerde terapötik etkinliği yükseltme gibi önemli avantajlar sunmaktadır [8]. Bunun yanı sıra ilaçları hidrolitik ve enzimatik bozulmadan koruyarak etkinliklerini sürdürmelerine yardımcı olmaktadır.

Kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan başlıca nano taşıyıcı sistemler arasında lipozomlar, polimerik nanopartiküller, nanojeller ve inorganik nanopartiküller yer almakta olup her sistemin kendine özgü avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır (Şekil 3).



Şekil 3. RNAi yüklü nano taşıyıcı sistemlerden örnekler

2.1. Lipozomlar

Lipozomlar, ilk geliştirilen nano-ilâç taşıma sistemlerinden biri olup, genellikle 50 ila 200 nanometre büyüklüğündedirler. Yapısal olarak iç kısımları hidrofilik, dış kısımları ise hidrofobik özellik göstermektedir. Bu durum onları hücre zarına benzer yapılar olarak kılmaktadır. Biyoyumlu yapıda olmaları hem hidrofilik hem de lipofilik ilaçları taşıyabilme yetenekleri, formülasyon stabilitesinin artırılmasına ve sistemik toksisitenin azaltılmasına olanak tanınmaları, bu taşıyıcı sistemlerin öne çıkan farmasötik avantajları arasında yer almaktadır [9]. Lipozomlar, immünilipozomlar ve nanolipozomlar gibi farklı

fonksiyonelleştirilmiş formlarda da mevcuttur. Nükleik asitlerin lipozomal zar içerisinde kompleks oluşturmasıyla oluşan lipopleksler, nükleik asitleri hidroliz, enzimatik bozulma ve bağışıklık sisteminden koruyarak RNAi moleküllerinin etkinliğini artırma potansiyeli taşımaktadır [8].

2.2. Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller kitosan, aljinat, jelatin, albümin gibi doğal kaynaklı olabilecekleri gibi poliakrilat, polilaktid gibi sentetik polimerlerden elde edilen nano ilaç taşıyıcı sistemler de mevcuttur. Bu nanopartiküller ilaçların yanı sıra protein, peptit ve genlerin hedeflenen dokuya taşınmasında etkin bir şekilde kullanılmaktadırlar [10]. Biyouyumlu ve toksik olmayan yapıları sayesinde ilaç, nükleik asit, protein veya peptit stabilitesini artırma potansiyeline sahiptirler. Polimerik nanopartiküller, sterilizasyon kolaylığı, yüksek yükleme kapasitesi, kontrollü salım özellikleri gibi pek çok avantaj sunmaktadırlar. Bu taşıyıcı sistemler, hem pasif hedefleme (artırılmış geçirgenlik ve tutulma etkisi – EPR) hem de aktif hedefleme (yüzey ligandları aracılığıyla spesifik hücre yüzey reseptörlerine bağlanma) stratejilerine uygun olarak tasarlanabilmektedir. Bu özellikleri sayesinde, sistemik dolaşımda daha uzun süre stabil kalabilme, tümör dokusuna daha etkin şekilde taşınabilme ve sağlıklı dokulara olan dağılımı azaltarak tedaviye bağlı sistemik toksisiteyi önemli ölçüde düşürebilme potansiyeline sahiptirler [10].

2.3. Nanojeller

Amfifilik veya hidrofilik polimerlerin fiziksel ya da kimyasal çapraz bağlanmasıyla oluşan nanometre ölçeğindeki üç boyutlu ağ yapıları polimerik hidrojel nanopartikülleri olarak tanımlanmaktadır. Nanojeller olarak adlandırılan bu taşıyıcı sistemler uygun çözücülerle etkileşime girdiklerinde hacimsel olarak şişerek çevresel koşullara yanıt verebilen bir yapı sergilemektedirler. Biyouyumlu olmaları, ilaç salımını artırmaları, farklı özellikte etkin maddelerin kolayca yüklenebilmesi, spesifik ilaç salımı ve çevresel faktörlere duyarlılık gibi avantajları nanojelleri nano ilaç taşıyıcı sistemler arasında ön plana çıkarmaktadır.

Son yıllarda, nanojeller siRNA taşıyıcı sistemleri olarak dikkat çekici bir ilgi görmektedir. Hidrofilik, yüksek su tutma kapasitesine sahip ve çapraz bağlı polimer ağlarından oluşan bu yapılar, siRNA'yı hem fiziksel hem de kimyasal yollarla kapsülleyerek koruyabilmektedir. Nanojellerin çevresel uyaranlara (pH, sıcaklık, redoks gibi) duyarlı olarak tasarlanabilmesi, siRNA'nın hedef hücre içinde kontrollü salımını mümkün kılmakta ve gen susturma verimliliğini artırmaktadır. Özellikle kanser tedavisine yönelik yapılan çalışmalarda, nanojellerin siRNA'yı sistemik dolaşımda stabilize ettiği, hücre içi alımını

artırdığı ve hedef mRNA üzerinde başarılı susturma etkisi gösterdiği rapor edilmiştir. Ayrıca, biyoyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir olmaları sayesinde, nanojellerin toksisite profili düşük olup uzun süreli tedavilerde avantaj sağlamaktadır. Bu özellikler, nanojelleri siRNA'ya dayalı gen tedavisi yaklaşımlarında umut verici taşıyıcı sistemler haline getirmektedir [11].

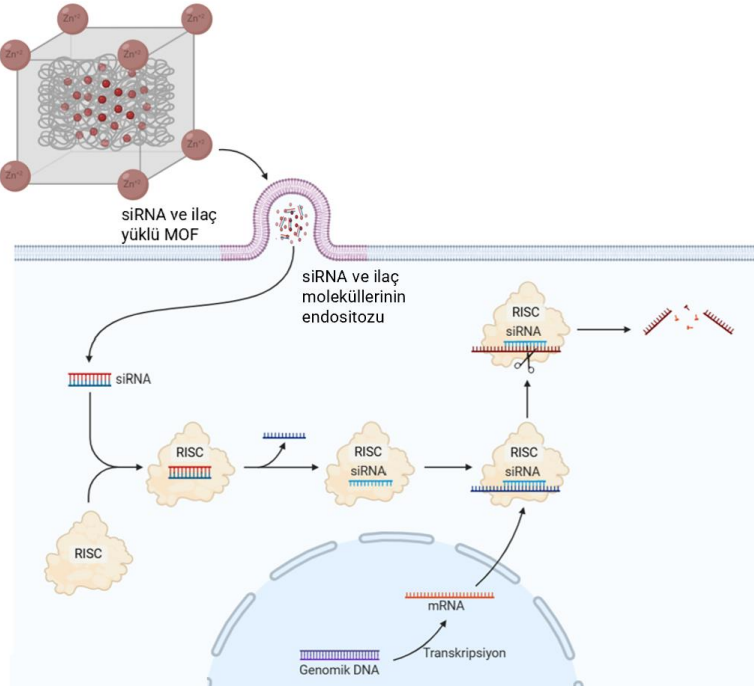
2.4. İnorganik Nanopartiküller

İnorganik nanopartiküller; mezo-gözenekli silika yapılar, karbon nanotüpler, kuantum noktaları ve metal iyonu içeren nanoyapılar gibi geniş bir malzeme grubunu kapsamaktadır. Bu yapılar sahip oldukları gelişmiş gözenek mimarisi, yüksek yüzey alanı, yüzey modifikasyonuna uygunluk ve özgün optoelektronik özellikler sayesinde ilaç taşıma sistemlerinde çok yönlü uygulamalara uygun bir yapı sergilemektedir. siRNA gibi RNAi temelli moleküllerin taşınmasında bu nanomalzemeler önemli avantajlara sahiptir. Yüzeylerinin katyonik polimerlerle kaplanması hem siRNA bağlanma verimliliğini artırmakta hem de hücre alımı kolaylaştırmaktadır. Altın nanopartiküller, siRNA moleküllerine kovalent veya elektrostatik bağlar ile bağlanabilmektedir. Aynı zamanda RGD peptidi gibi hedefleyici ligandlarla yüzey fonksiyonelleştirmesi yoluyla tümör hücrelerine özgü taşıma kapasitesi kazanabilmektedir [12].

Bu yapılar arasında dikkat çeken bir diğer sınıf ise metal-organik kafeslerdir (MOF). MOF'lar metal iyonları veya metal kümeleri ile organik ligandların koordinatif bağlarla oluşturduğu kristal yapıda, yüksek gözenekliliğe sahip hibrit nanomalzemelerdir. Bu sistemler RNAi taşıyıcısı olarak çeşitli avantajlar sunmaktadır. MOF'ların metal düğümleri ile siRNA'nın fosfat omurgası arasında gelişen elektrostatik çekim ve çoklu koordinasyon bağları yüksek siRNA yükleme verimi ve yapısal stabilite sağlamaktadır [13,14]. Gözenekli yapılar siRNA'yı çevresel bozunmalara karşı koruyarak biyoyararlanımını artırırken kontrollü salım ve hedefe yönlendirme açısından da işlevsel avantajlar sunmaktadır[15].

Son dönemde yapılan çalışmalar MOF tabanlı siRNA taşıyıcı sistemlerin özellikle kanser tedavisinde umut verici sonuçlar verdiğini göstermektedir (Şekil 4). Biyomimetik hücre zarı kaplamalı MOF yapıları homolog hedefleme yeteneği sayesinde siRNA'yı etkili biçimde kapsülleyip hedef hücreye spesifik olarak yönlendirebilmektedir. Eş zamanlı olarak immün sistemi yanıltarak dolaşım süresini uzatmaktadır [16]. MOF'lar siRNA ile birlikte kemoterapötikler veya fotodinamik terapi ajanları gibi çoklu bileşenleri taşıyabilme kapasitesine de sahiptir. Bu sinerjistik yaklaşım özellikle çok bileşenli tedavi stratejilerinde dikkat çekmektedir [15]. Örneğin zeolitik imidazolat kafesi-8 (ZIF-8) gibi belirli MOF türleri hem miRNA taşıyıcısı

olarak hem de kemodinerik tedavi adjuvanı olarak çift işlevli rol üstlenebilmektedir [17]. Her ne kadar bu inorganik ve hibrit nano taşıyıcı sistemler RNAi temelli tedavi yaklaşımlarının etkinliğini artırmak için güçlü birer araç olarak öne çıksa da immünojenite, sitotoksisite, biyobozunurluk ve uzun vadeli biyogüvenlik gibi parametreler hâlâ araştırma konusudur. Klinik uygulamaların güvenli ve etkili biçimde hayata geçirilebilmesi için bu sistemlerin biyolojik davranışlarına dair kapsamlı *in vivo* çalışmalar gerekmektedir [18].



Şekil 4: siRNA ve ilaç yüklü MOF-5 nanoparçacıkların hücre içine alımı ve etkinliği

3. Nano Taşıyıcı Sistemlere RNAi Yükleme Yöntemleri

3.1. Elektrostatik Etkileşimler

siRNA'yı nano taşıyıcı sistemlere yükleme yöntemlerinden biri elektrostatik etkileşimlerdir. Negatif yüklü siRNA molekülleri, nano taşıyıcı sistemin yüzeyinde bulunan pozitif yükler ile elektrostatik etkileşime girebilmektedir. Örneğin, yapılan çalışmalarda trombosit membran kaplı MOF nanopartiküller ile siRNA moleküllerinin elektrostatik etkileşimlerle bir araya getirildiği gösterilmiştir [19]. Benzer şekilde zeolitik imidazolat kafeslerinin (ZIF) hedeflenen gen susturulması için kullanımı aynı yöntem ile gerçekleştirilmiştir [20].

3.2. Yüzey Fonksiyonelleştirme

Nano taşıyıcı sistemlerin yüzeylerinin fonksiyonelleştirilmesi siRNA yüklemesini artırmak için kullanılan bir diğer etkili stratejidir. Manganez dioksit-MOF'ların folik asit (FA) modifikasyonunun reseptör aracılı endositoz yoluyla siRNA'nın hücre içi alımını arttırdığı bildirilmiştir [21]. Bu yöntem yalnızca yüklemeye yardımcı olmakla kalmamış aynı zamanda FA reseptörünü ifade eden kanser hücrelerine iletim sisteminin özgüllüğünü de artırmıştır.

3.3. Biyobozunur ve pH'a Duyarlı Sistemler

siRNA'nın terapötik uygulamalardaki etkinliğini artırmak amacıyla geliştirilen iletim sistemlerinde, biyobozunur ve pH'a duyarlı materyallerin kullanımı giderek artan bir ilgi görmektedir. Bu sistemler, hem biyolojik olarak güvenli olmaları hem de hedeflenen salım profilleri sunabilmeleri nedeniyle gen tedavisinde önemli avantajlar sağlamaktadır. MOF'lar, geniş yüzey alanları, ayarlanabilir poroziteleri ve fonksiyonelleştirilebilir yapıları sayesinde siRNA taşıyıcıları olarak dikkat çekmektedir. Ancak, geleneksel MOF'ların biyolojik ortamlarda sınırlı kararlılığı ve biyouyumluluğu, bu materyallerin doğrudan kullanımını kısıtlamaktadır. Bu nedenle, MOF'ların biyobozunur polimerler veya doğada çözünebilen moleküllerle modifiye edilmesi, siRNA'nın kontrollü ve hedefe yönelik salımını mümkün kılmak adına önemli bir strateji olarak ortaya çıkmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, özellikle tümör mikroçevresinin karakteristik olarak düşük pH değerinden faydalanılarak pH'a duyarlı MOF sistemleri geliştirilmiştir. Bu sistemler, fizyolojik pH'da stabil kalırken, tümör bölgesindeki asidik ortamda bozunarak yükledikleri siRNA'yı kontrollü şekilde serbest bırakmaktadır. Bu mekanizma, siRNA'nın sistemik dolaşım sırasında degradasyona uğramasını engellerken, terapötik molekülün tümör dokusuna spesifik olarak iletilmesini sağlamaktadır [22].

3.4. Biyokonjugasyon Teknikleri

siRNA'nın çeşitli biyojenik moleküllerle kovalent olarak birleştirilmesini içeren biyokonjugasyon teknikleri, terapötik siRNA'nın taşıma ve hedefleme kapasitesini artırmak için geliştirilen önemli stratejilerden biridir. Biyokonjugasyon, siRNA molekülüne kimyasal olarak ligand, peptit, antikor, polimer veya lipid gibi taşıyıcı ve hedefleyici unsurların eklenmesiyle gerçekleştirilmektedir.

Literatürde, N-asetilgalaktozamin (GalNAc) gibi ligandların siRNA'ya konjugasyonu ile, karaciğer hücrelerine yüksek özgüllükte iletim sağlanabildiği gösterilmiştir. GalNAc-siRNA konjugatları,

hepatosit yüzeyindeki asialoglikoprotein reseptörleri aracılığıyla hücre içine alınmakta ve bu sayede sistemik uygulamalarda bile hedef dokuya seçici birikim sağlayabilmektedir [23]. Buna ek olarak, hücre içi hedeflemeyi iyileştirmek amacıyla hücre-penetre edici peptitler (CPP'ler), polietilen glikol (PEG) gibi stabilite artırıcı polimerler veya antikör bazlı hedefleyici ajanlar da siRNA'ya konjuge edilmektedir [24,25].

Biyokonjugasyonun bir diğer önemli avantajı ise siRNA'nın farmakokinetik ve farmakodinamik profillerini iyileştirmesidir. Konjugasyon sayesinde siRNA, nükleazlara karşı daha dirençli hale gelirken, dolaşım süresi uzamakta ve istenmeyen organlarda birikimi minimize edilmektedir. Ayrıca, konjugatlar aracılığıyla siRNA'nın immün sistemi aktive etme potansiyeli azaltılabilmekte, bu da klinik uygulamalarda daha güvenli bir profil sunmaktadır [26].

Genel olarak, biyokonjugasyon teknikleri, siRNA'nın sistemik stabilitesini, hücresel alım verimliliğini ve hedefe özgüllüğünü optimize etmek adına önemli bir biyoteknolojik araçtır. Bu stratejiler, özellikle spesifik hücre tiplerinin hedeflenmesini gerektiren kanser, viral enfeksiyonlar ve genetik hastalıklar gibi klinik durumlarda siRNA tedavisinin etkinliğini artırmada büyük potansiyel taşımaktadır.

3. Kanser Tedavisinde RNAi Tabanlı Nano Taşıma Sistemlerinin Mevcut Durumu ve Geliştirilmeye Açık Yönleri

RNAi tabanlı tedaviler kanser tedavisinde gen susturma potansiyeli nedeniyle büyük umut vaat etmektedir. Ancak siRNA ve miRNA temelli tedavi yaklaşımlarının klinik uygulamalara başarılı bir şekilde entegre edilebilmesi bazı biyolojik engeller nedeniyle sınırlanmaktadır. Bu engeller arasında, RNA moleküllerinin fizyolojik koşullarda kararsız yapısı, hedef hücrelere yeterli düzeyde ulaştırılamamaları ve immün sistem tarafından tanınıp hızla uzaklaştırılmaları yer almaktadır. Bu noktada nanoteknolojik çözümler, bu biyolojik bariyerleri aşmak ve RNAi temelli tedavilerin terapötik etkinliğini artırmak amacıyla yenilikçi taşıma sistemleri ve hedefleme stratejileri geliştirilmesine imkân sağlamaktadır [27].

RNAi kullanılarak tasarlanan nano ilaç taşıyıcı sistemlere bakıldığında kanser tedavisindeki uygulama alanları oldukça geniştir. Bu alanlar hedefe yönelik gen susturma, ilaç direncinin geri çevrilmesi, kombine tedavi stratejileri, hassasiyet ve seçicilik, biyobelirteç ve tanı gibi çeşitli yaklaşımları içermektedir. İlk olarak RNAi, kanser hücrelerinin büyümesi, çoğalması ve hayatta kalması için kritik olan spesifik genlerin ifadesini susturarak kanser tedavisinde kullanılabilir. Bu durum onkogenlerin susturulmasını veya tümör

baskılayıcı genlerin ifadesinin artırılmasını hedefleyebilir [28]. İkinci olarak kanser tedavisindeki en büyük zorluklardan biri olan ilaç direnci, RNAi aracılığıyla geri çevrilebilir. RNAi, kemorezistansa neden olan genleri susturarak kanser hücrelerini kemoterapiye karşı daha duyarlı hale getirebilir. Aynı zamanda nanomateryaller, siRNA'nın kemorezistan kanser hücrelerine aktarımını kolaylaştırarak siRNA taşınmasında önemli bir rol oynamaktadır [29]. Üçüncü olarak, nanopartiküller, siRNA ya da miRNA ile kemoterapötik ajanları birleştirerek sinerjistik tedavi yaklaşımları sunabilmektedir. Bu kombinasyonlar tedavi sonuçlarını iyileştirebilir ve ilaç direncini azaltabilir. Dördüncü olarak, nanoteknoloji destekli siRNA taşıma sistemleri, gelişmiş seçicilik, iyileştirilmiş stabilite ve kontrollü salım profilleri sağlayarak siRNA'nın sadece hedeflenen kanser hücrelerine ulaşmasını sağlayabilmektedir. Böylece sağlıklı dokulara verilen zararın en aza indirilmesi sağlanabilmektedir [30]. Son olarak, miRNA'lar, farklı kanser türleri ve evrelerinin teşhis ve tedavisinde yeni biyobelirteçler olarak işlev görebilirler. Nanoteknoloji bu biyobelirteçlerin erken teşhis ve izlenmesinde de kullanılabilir [31,32].

RNAi tabanlı nano ilaç taşıyıcı sistemlerin kanser tedavisindeki potansiyeline rağmen, klinik uygulamaya geçişte çeşitli zorluklar bulunmaktadır. siRNA'nın hedeflenen kanser hücrelerine spesifik ve etkin bir şekilde ulaşması hala önemli bir engeldir. Sistemik dolaşımda degradasyon, immün yanıt ve tümör mikroçevresindeki bariyerler, siRNA'nın hedefe ulaşmasını zorlaştırmaktadır [33]. Nanotaşıyıcıların ve siRNA'nın kendisinin potansiyel toksik etkileri sağlıklı dokulara zarar verme riski taşımaktadır. İmmün sistemin aktivasyonu ve istenmeyen hedef dışı etkiler ilaç güvenlik profili açısından dikkatle değerlendirilmelidir. Klinik kullanım için yeterli saflıkta ve miktarda siRNA ve nanotaşıyıcı üretimi, maliyet ve ölçeklenebilirlik açısından zorluklar içermektedir. Üretim süreçlerinin standartlaştırılması ve maliyet etkinliğinin sağlanması gerekmektedir. Kanser hücrelerinin tedaviye karşı direnç geliştirmesi RNAi tabanlı tedaviler için de bir sorundur. Bu nedenle, RNAi'nin diğer kemoterapötik ajanlar veya tedavi yöntemleri ile sinerjistik kombinasyonları üzerinde daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir [34]. Biyoyararlanım ve stabilite açısından incelendiğinde siRNA molekülleri vücut içinde hızla parçalanabilen ve düşük biyoyararlanıma sahip moleküllerdir. Nanotaşıyıcılar bu stabiliteyi artırsa da uzun süreli ve etkili bir terapötik yanıt için daha stabil formülasyonlara ihtiyaç vardır [35]. Bu zorlukların aşılması RNAi tabanlı nano ilaç taşıyıcı sistemlerin kanser tedavisinde tam potansiyeline ulaşması için kritik öneme sahiptir.

RNAi temelli tedaviler için geliştirilen nanoteknoloji odaklı taşıyıcı sistemler hem hücresel düzeyde hassas hedefleme hem de kontrollü salım

yetenekleriyle, kanser tedavisinde yeni nesil terapötik stratejilerin geliştirilmesine zemin hazırlamaktadır. Son yıllarda çok işlevli nanopartikül tasarımları ve biyomimetik yüzey modifikasyonları gibi ileri düzey teknolojilerin entegrasyonu, siRNA bazlı tedavilerin hedef özgüllüğünü, biyoyararlanımını ve güvenlik profilini önemli ölçüde iyileştirmiştir [11]. Bu gelişmeler, bireyselleştirilmiş tedavi stratejilerinin uygulanabilirliğini artırarak, genetik ve moleküler düzeyde hasta özelinde optimize edilmiş kanser tedavilerine yönelik yeni ufuklar açmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] O. BENDER, E. ÇELEBİ, A. ATALAY, RNA Interference and Current Clinical Applications: Review, *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences* 36 (2016) 53–60. <https://doi.org/10.5336/medsci.2015-49055>.
- [2] A. Fire, S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, C.C. Mello, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature* 391 (1998) 806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>.
- [3] J.K.W. Lam, M.Y.T. Chow, Y. Zhang, S.W.S. Leung, siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing., *Mol Ther Nucleic Acids* 4 (2015) e252. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.23>.
- [4] J. Kurreck, Antisense technologies, *Eur J Biochem* 270 (2003) 1628–1644. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03555.x>.
- [5] A.M. Gewirtz, On future's doorstep: RNA interference and the pharmacopeia of tomorrow, *Journal of Clinical Investigation* 117 (2007) 3612–3614. <https://doi.org/10.1172/JCI34274>.
- [6] M.Z. Michael, S.M. O' Connor, N.G. van Holst Pellekaan, G.P. Young, R.J. James, Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia., *Mol Cancer Res* 1 (2003) 882–91.
- [7] Y. DAĞLIOĞLU, A. YÜKSEL, Kanser Tedavisi İçin MikroRNA'ların Çok İşlevli Nano-taşıyıcılar İle Dağıtımı, *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 32 (2023) 52–60. <https://doi.org/10.17827/aktid.1181394>.
- [8] N.K. Dastgerdi, N.K. Dastgerdi, H. Bayraktutan, G. Costabile, F. Atyabi, R. Dinarvand, G. Longobardi, C. Alexander, C. Conte, Enhancing siRNA cancer therapy: Multifaceted strategies with lipid and polymer-based carrier systems, *Int J Pharm* 663 (2024) 124545. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124545>.
- [9] K. Norling, M. Sjöberg, M. Bally, V.P. Zhdanov, N. Parveen, F. Höök, Dissimilar Deformation of Fluid- and Gel-Phase Liposomes upon Multivalent Interaction with Cell Membrane Mimics Revealed Using Dual-Wavelength Surface Plasmon Resonance, *Langmuir* 38 (2022) 2550–2560. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c03096>.
- [10] M. Sanati, C.G. Figueroa-Espada, E.L. Han, M.J. Mitchell, S.A. Yavari, Bioengineered Nanomaterials for siRNA Therapy of Chemoresistant Cancers, *ACS Nano* 18 (2024) 34425–34463. <https://doi.org/10.1021/acsnano.4c11259>.
- [11] V. Udappusamy, S. Nithya Thangam, N.K. Ramasamy, S. Ganeshan, D.K. Rajan, M. Moovendhan, Nanoparticle-mediated delivery of siRNA: Targeting gene silencing in cancer therapy, *J Drug Deliv Sci Technol* 109 (2025) 106973. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2025.106973>.
- [12] T.R. Sathe, A. Agrawal, S. Nie, Mesoporous Silica Beads Embedded with

- Semiconductor Quantum Dots and Iron Oxide Nanocrystals: Dual-Function Microcarriers for Optical Encoding and Magnetic Separation, *Anal Chem* 78 (2006) 5627–5632. <https://doi.org/10.1021/ac0610309>.
- [13] F. Demir Duman, A. Monaco, R. Foulkes, C.R. Becer, R.S. Forgan, Glycopolymer-Functionalized MOF-808 Nanoparticles as a Cancer-Targeted Dual Drug Delivery System for Carboplatin and Floxuridine, *ACS Appl Nano Mater* 5 (2022) 13862–13873. <https://doi.org/10.1021/acsanm.2c01632>.
- [14] S. Wuttke, S. Braig, T. Preiß, A. Zimpel, J. Sicklinger, C. Bellomo, J.O. Rädler, A.M. Vollmar, T. Bein, MOF nanoparticles coated by lipid bilayers and their uptake by cancer cells, *Chemical Communications* 51 (2015) 15752–15755. <https://doi.org/10.1039/C5CC06767G>.
- [15] X. Chen, R. Tong, Z. Shi, B. Yang, H. Liu, S. Ding, X. Wang, Q. Lei, J. Wu, W. Fang, MOF Nanoparticles with Encapsulated Autophagy Inhibitor in Controlled Drug Delivery System for Antitumor, *ACS Appl Mater Interfaces* 10 (2018) 2328–2337. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b16522>.
- [16] X. Chen, R. Tong, Z. Shi, B. Yang, H. Liu, S. Ding, X. Wang, Q. Lei, J. Wu, W. Fang, MOF Nanoparticles with Encapsulated Autophagy Inhibitor in Controlled Drug Delivery System for Antitumor, *ACS Appl Mater Interfaces* 10 (2018) 2328–2337. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b16522>.
- [17] M. Liu, C. Sun, J. Jiang, L. Wan, C. Hu, C. Wen, G. Huang, Q. Ruan, S. Wu, D. Qiao, P. Zheng, Q. Pan, W. Zhu, Aptamer-Functionalized ZIF-8 Nanomedicine for Targeted Delivery of Gefitinib and siRNA to Treat Tyrosine-Kinase-Inhibitor-Resistant Nonsmall-Cell Lung Cancer, *ACS Appl Nano Mater* 6 (2023) 21587–21602. <https://doi.org/10.1021/acsanm.3c03564>.
- [18] J. Hu, P.M. Arvejjeh, S. Bone, E. Hett, F.M. Marincola, K.-H. Roh, Nanocarriers for cutting-edge cancer immunotherapies, *J Transl Med* 23 (2025) 447. <https://doi.org/10.1186/s12967-025-06435-0>.
- [19] J. Zhuang, H. Gong, J. Zhou, Q. Zhang, W. Gao, R.H. Fang, L. Zhang, Targeted gene silencing in vivo by platelet membrane-coated metal-organic framework nanoparticles, *Sci Adv* 6 (2020). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz6108>.
- [20] R. Tagore, K. Alagarasu, P. Patil, S. Pyreddy, S.A. Polash, M. Kakade, R. Shukla, D. Parashar, Targeted in vitro gene silencing of E2 and nsP1 genes of chikungunya virus by biocompatible zeolitic imidazolate framework, *Front Bioeng Biotechnol* 10 (2022). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1003448>.
- [21] S. Huang, W. Zhu, F. Zhang, G. Chen, X. Kou, X. Yang, G. Ouyang, J. Shen, Silencing of Pyruvate Kinase M2 via a Metal–Organic Framework Based Theranostic Gene Nanomedicine for Triple-Negative Breast Cancer Therapy, *ACS Appl Mater Interfaces* 13 (2021) 56972–56987.

- <https://doi.org/10.1021/acsami.1c18053>.
- [22] Z.-J. Zhang, Y.-K. Hou, M.-W. Chen, X.-Z. Yu, S.-Y. Chen, Y.-R. Yue, X.-T. Guo, J.-X.X. Chen, Q. Zhou, A pH-Responsive Metal–Organic Framework for the Co-delivery of HIF-2 α siRNA and Curcumin for Enhanced Therapy of Osteoarthritis, (2022). <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2214178/v1>.
 - [23] K.G. Rajeev, J.K. Nair, M. Jayaraman, K. Charisse, N. Taneja, J. O’Shea, J.L.S. Willoughby, K. Yucius, T. Nguyen, S. Shulga-Morskaya, S. Milstein, A. Liebow, W. Querbes, A. Borodovsky, K. Fitzgerald, M.A. Maier, M. Manoharan, Hepatocyte-Specific Delivery of siRNAs Conjugated to Novel Non-nucleosidic Trivalent N -Acetylgalactosamine Elicits Robust Gene Silencing in Vivo, *ChemBioChem* 16 (2015) 903–908. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500023>.
 - [24] S.H. Kim, J.H. Jeong, S.H. Lee, S.W. Kim, T.G. Park, PEG conjugated VEGF siRNA for anti-angiogenic gene therapy, *Journal of Controlled Release* 116 (2006) 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.05.023>.
 - [25] W. Tai, Current Aspects of siRNA Bioconjugate for In Vitro and In Vivo Delivery, *Molecules* 24 (2019) 2211. <https://doi.org/10.3390/molecules24122211>.
 - [26] I. V. Chernikov, V. V. Vlassov, E.L. Chernolovskaya, Current Development of siRNA Bioconjugates: From Research to the Clinic, *Front Pharmacol* 10 (2019). <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00444>.
 - [27] D.M. Dykxhoorn, C.D. Novina, P.A. Sharp, Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression, *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 (2003) 457–467. <https://doi.org/10.1038/nrm1129>.
 - [28] E. Bernstein, A.A. Caudy, S.M. Hammond, G.J. Hannon, Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference, *Nature* 409 (2001) 363–366. <https://doi.org/10.1038/35053110>.
 - [29] T. Wang, S. Shigdar, H. Al Shamaileh, M.P. Gantier, W. Yin, D. Xiang, L. Wang, S.-F. Zhou, Y. Hou, P. Wang, W. Zhang, C. Pu, W. Duan, Challenges and opportunities for siRNA-based cancer treatment, *Cancer Lett* 387 (2017) 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.03.045>.
 - [30] Z. Tian, G. Liang, K. Cui, Y. Liang, Q. Wang, S. Lv, X. Cheng, L. Zhang, Insight Into the Prospects for RNAi Therapy of Cancer, *Front Pharmacol* 12 (2021). <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.644718>.
 - [31] Y. Xin, M. Huang, W.W. Guo, Q. Huang, L. zhen Zhang, G. Jiang, Nano-based delivery of RNAi in cancer therapy, *Mol Cancer* 16 (2017) 134. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0683-y>.
 - [32] M. Magalhães, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, A. Figueiras, A.C. Santos, F.

- Veiga, RNAi-based therapeutics for lung cancer: biomarkers, microRNAs, and nanocarriers, *Expert Opin Drug Deliv* 15 (2018) 965–982. <https://doi.org/10.1080/17425247.2018.1517744>.
- [33] D. Li, C. Gao, M. Kuang, M. Xu, B. Wang, Y. Luo, L. Teng, J. Xie, Nanoparticles as Drug Delivery Systems of RNAi in Cancer Therapy, *Molecules* 26 (2021) 2380. <https://doi.org/10.3390/molecules26082380>.
- [34] M.A. Malik, M.Y. Wani, A.A. Hashmi, Combination therapy: Current status and future perspectives, in: *Combination Therapy Against Multidrug Resistance*, Elsevier, 2020: pp. 1–38. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820576-1.00001-1>.
- [35] A. Paul, A. Muralidharan, A. Biswas, B.V. Kamath, A. Joseph, A.T. Alex, siRNA therapeutics and its challenges: Recent advances in effective delivery for cancer therapy, *OpenNano* 7 (2022) 100063. <https://doi.org/10.1016/j.onano.2022.100063>.

BÖLÜM 12

ALZHEİMER HASTALIĞINDA DEĞİŞEN miRNA PROFİLLERİ

Arş. Gör. Recep ÇELİK¹

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.17117532>

¹ Gazi Üniversitesi fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, recepcelik@gazi.edu.tr

GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH), yaşlılıkla birlikte ortaya çıkan ve ilerleyici nitelikte seyreden en yaygın nörodejeneratif hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, günümüzde dünya çapında 55 milyondan fazla kişi demans ile yaşamakta olup, bu vakaların büyük çoğunluğu Alzheimer hastalığına atfedilmektedir (World Health Organization, 2021). AH, başlangıçta hafıza kaybı ve öğrenme güçlüğü gibi bilişsel belirtilerle kendini gösterirken, zamanla davranışsal bozukluklar ve motor fonksiyon kaybı gibi daha ağır semptomlara yol açar. Patolojik olarak hastalık, beyinde beta-amiloid (A β) plaklarının birikimi, tau proteininin hiperfosforilasyonu sonucu oluşan nörofibriller yumaklar, sinaptik kayıp ve nöronal ölüm ile karakterizedir (Serrano-Pozo et al., 2011).

Genetik, çevresel ve yaşam tarzı faktörlerinin etkileşimiyle ortaya çıkan Alzheimer hastalığında, son yıllarda epigenetik düzenleyicilerin önemi giderek artmaktadır. Bu bağlamda mikroRNA'lar (miRNA'lar), post-transkripsiyonel gen düzenleyici moleküller olarak, Alzheimer patofizyolojisinde rol oynayan birçok biyolojik süreç üzerinde etkili oldukları için araştırmaların odağına yerleşmiştir. miRNA'lar, hedef mRNA'ları baskılayarak veya translasyonunu engelleyerek protein sentezini düzenler. Nöronal gelişim, sinaptik plastisite, inflamasyon, oksidatif stres ve apoptoz gibi süreçlerde rol alan birçok miRNA'nın Alzheimer hastalığında disfonksiyonel hale geldiği gösterilmiştir (Bartel, 2004; Siedlecki-Wullich et al., 2019).

Bu kitap bölümü, Alzheimer hastalığında değişen miRNA profillerini kapsamlı şekilde ele alarak, bu moleküllerin tanı biyobelirteci olarak potansiyelini, patogeneze katkılarını ve terapötik hedef olarak değerlendirilme durumlarını incelemeyi amaçlamaktadır. Böylece hem mevcut literatür sentezlenecek hem de gelecekteki araştırmalara yön gösterebilecek bir çerçeve sunulacaktır.

ALZHEIMER HASTALIĞINDA miRNA PROFİLLERİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLER

Alzheimer hastalığında değişen miRNA profilleri, hastalığın farklı evrelerinde ve çeşitli biyolojik sıvılarda (kan, plazma, BOS) gözlemlenmiştir. Bu değişiklikler, hastalığın moleküler düzeyde daha iyi anlaşılmasına olanak

sağlamakta ve tanı, prognoz ile tedavi süreçlerinde kullanılabilecek biyobelirteçlerin tanımlanmasında kritik rol oynamaktadır.

Örneğin, Siedlecki-Wullich ve arkadaşlarının (2019) çalışmasında Alzheimer hastalarının plazmasında sinaptik işleve bağlı miR-92a-3p, miR-181c-5p ve miR-210-3p düzeylerinin anlamlı ölçüde arttığı gösterilmiştir. Bu miRNA'ların, hafif kognitif bozukluk evresinde de yüksek olması, Alzheimer hastalığının erken tanısı açısından önem taşımaktadır. Benzer şekilde, Wang ve arkadaşları (2019) miRNA ve mRNA ekspresyonlarını entegre analiz ettikleri çalışmada, Alzheimer hastalarının kanında birçok miRNA'nın (miR-107, miR-29a) sinaptik işlev, hücre döngüsü ve apoptotik yollarla ilişkili genleri hedefleyerek hastalığın patogenezeine katkı sağladığını belirtmiştir.

Müller ve ark. (2015) tarafından yürütülen başka bir çalışmada, Alzheimer hastalarının BOS'unda 100'den fazla miRNA'nın farklı şekilde ifade edildiği, özellikle miR-146a, miR-100 ve miR-1274a gibi miRNA'ların belirgin şekilde regüle olduğu bildirilmiştir. Bu değişikliklerin, nöroinflamasyon ve immün yanıt süreçleriyle ilişkilendirildiği görülmektedir.

Tewari ve arkadaşları (2024) ise Alzheimer hastalarının plazma ve BOS örneklerinde benzer miRNA profilleri olduğunu, örneğin miR-29c ve miR-132 gibi miRNA'ların her iki sıvıda da düşük seviyede bulunduğunu belirtmişlerdir. Bu durum, sistemik dolaşımda ölçülebilen miRNA'ların merkezi sinir sistemi patolojileri hakkında bilgi verebileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak, Alzheimer hastalığında değişen miRNA profilleri, hastalığın tanı ve seyir takibi açısından umut verici biyobelirteçler sunmakta; aynı zamanda hastalığın moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasında önemli ipuçları vermektedir.

miRNA	Tespit Edildiği Doku/Biyolojik Sıvı	Alzheimer ile İlişkili Rolü	Referans
miR-132	Plazma, BOS	Sinaptik plastisite, nöronal sağkalım	Tewari et al., 2024
miR-29c	Plazma, BOS	APP ekspresyonunun baskılanması	Tewari et al., 2024
miR-125b	Beyin dokusu	Tau fosforilasyonu, nöronal dejenerasyon	Leidinger et al., 2024
miR-146a	BOS	Nöroenflamasyonun düzenlenmesi	Müller et al., 2015
miR-92a-3p	Plazma	Sinaptik işlevin bozulması	Siedlecki-Wullich et al., 2019
miR-107	Kan	BACE1 ekspresyonunun artmasıyla A β birikimi	Wang et al., 2019
miR-181c-5p	Plazma	Sinaptik disfonksiyon	Siedlecki-Wullich et al., 2019
miR-210-3p	Plazma	Mitokondriyal disfonksiyon ve hücrel stres yanıtı	Siedlecki-Wullich et al., 2019

Bu miRNA'ların düzeylerindeki değişiklikler, hastalığın erken tanısı, evrelemesi ve patofizyolojisinin anlaşılması açısından önemli bilgiler sunmaktadır. Ayrıca, bu moleküller Alzheimer hastalığına yönelik biyobelirteç geliştirme çalışmalarında güçlü adaylar olarak değerlendirilmektedir.

TANI VE BİYOBELİRTEÇ OLARAK miRNA'LAR

MikroRNA'ların stabil yapıları, doku ve hücre dışı sıvılarda tespit edilebilir olmaları, onları Alzheimer hastalığında güçlü aday biyobelirteçler haline getirmektedir. Özellikle plazma, serum ve BOS örneklerinde yapılan analizlerde, bazı miRNA'ların hastalığın erken evrelerinde bile anlamlı düzeyde değiştiği saptanmıştır. Bu durum, miRNA'ların non-invaziv tanı yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlayabileceğini göstermektedir.

Leidinger ve arkadaşlarının (2024) yaptığı kapsamlı çalışmada, Alzheimer hastalarının plazmasında tespit edilen miR-34a, miR-125b ve miR-195 gibi miRNA'ların düzeylerinin hastalığın ilerlemesiyle birlikte değiştiği rapor edilmiştir. Bu miRNA'lar, amiloid beta metabolizması ve tau protein modifikasyonları gibi hastalığın temel patolojik süreçleriyle ilişkilidir.

Tewari ve arkadaşları (2024), hem plazma hem de BOS örneklerinde ortaklaşa düşüş gösteren miR-29c ve miR-132 gibi miRNA'ların, merkezi sinir sistemi patolojilerinin periferik olarak da tespit edilebileceğini göstermesi açısından önemli bir bulgu sunduğunu vurgulamıştır. Bu özellik, non-invaziv tanı araçlarının geliştirilmesinde önemli avantajlar sağlamaktadır.

Siedlecki-Wullich ve ark. (2019) ise MKB (hafif kognitif bozukluk) evresinde dahi yüksek düzeyde bulunan miR-92a-3p, miR-181c-5p ve miR-210-3p gibi miRNA'ların erken tanı biyobelirteçleri olabileceğini ileri sürmektedir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, miRNA'lar Alzheimer hastalığının tanı sürecinde kullanılabilecek, hassasiyeti ve özgüllüğü yüksek biyomoleküller olarak öne çıkmaktadır. Bu bağlamda, gelecekte geliştirilecek klinik testlerde miRNA panellerinin kullanılması olası görünmektedir.

PATOGENEZDE miRNA'LARIN ROLÜ

Alzheimer hastalığının patogenezi çok faktörlü bir yapıya sahiptir ve bu süreçte mikroRNA'lar (miRNA'lar) önemli düzenleyici moleküller olarak rol oynamaktadır. miRNA'lar, nöronal hücre yaşam döngüsünü, sinaptik plastisiteyi, inflamatuvar yanıtları ve apoptotik mekanizmaları etkileyerek hastalığın ilerlemesine katkı sağlar.

Örneğin, miR-132'nin sinaptik plastisiteyi destekleyen genleri regüle ettiği, ancak Alzheimer hastalarında bu miRNA'nın ekspresyonunun ciddi biçimde azaldığı gösterilmiştir. Bu düşüş, sinaptik bozulmaya ve kognitif işlevlerin zayıflamasına yol açabilmektedir (Tewari et al., 2024).

Buna karşılık, miR-125b gibi bazı miRNA'lar, tau proteinlerinin hiperfosforilasyonunu tetikleyen sinyalleri artırarak nörofibriler yumak oluşumunu destekler. Bu durum nöronal dejenerasyonu hızlandırabilmektedir (Leidinger et al., 2024).

Ayrıca miR-146a, nöroenflamasyonun düzenlenmesinde görev alan bir miRNA'dır. Glial hücrelerde aşırı inflamatuvar yanıtlara karşı dengeleyici bir

mekanizma oluştursa da, Alzheimer hastalarında bu miRNA'nın ekspresyonundaki değişiklikler nöroenflamatuvar süreçlerin bozulmasına neden olabilmektedir (Müller et al., 2015).

miR-107'nin ise Alzheimer hastalarında düşük seviyelerde bulunduğu ve BACE1 geninin ekspresyonunu artırarak A β plak oluşumunu kolaylaştırdığı bilinmektedir (Wang et al., 2019).

Sonuç olarak, Alzheimer patogenezinde görev alan miRNA'lar, çeşitli moleküler mekanizmaları etkileyerek hastalığın ortaya çıkışını ve ilerlemesini modüle etmektedir. Bu miRNA'ların hedeflenmesi, gelecekte hastalık sürecine müdahalede yeni olanaklar sağlayabilme konusunda yeni umut ışıkları açmaktadır.

TERAPÖTİK POTANSİYELLERİ

MikroRNA'ların Alzheimer hastalığındaki merkezi rolü, onları yalnızca tanı ve patogeneizde değil, aynı zamanda potansiyel terapötik hedefler olarak da önemli hale getirmiştir. miRNA temelli tedavi stratejileri iki ana yaklaşımı içermektedir: hastalıkta baskılanmış faydalı miRNA'ların dışarıdan takviye edilmesi (miRNA mimetikleri) ve patolojik süreçlerde artmış zararlı miRNA'ların baskılanması (antagomiR'ler veya inhibitörler).

miR-132, Alzheimer hastalığında sinaptik plastisiteyi destekleyici etkisiyle bilinir ve ekspresyonunun azalması bilişsel gerilemeyle ilişkilendirilmiştir. Deneysel çalışmalarda, miR-132'nin sentetik formlarının kullanımıyla sinaptik bütünlüğün korunduğu ve kognitif performansın iyileştiği gösterilmiştir (Tewari et al., 2024).

Benzer şekilde, artmış miR-125b ekspresyonunun tau protein hiperfosforilasyonunu desteklediği, bu nedenle antagomiR'ler aracılığıyla bu miRNA'nın inhibisyonunun nöronal dejenerasyonu azalttığı gözlemlenmiştir (Leidinger et al., 2024).

Gelişmekte olan teknolojiler arasında, miRNA'ların hedef dokuya spesifik olarak ulaştırılmasını sağlayan lipid nanopartiküller, viral vektör sistemleri ve CRISPR tabanlı taşıyıcı mekanizmalar bulunmaktadır. Bu stratejiler, sistemik uygulamalarda karşılaşılan biyoyararlanım ve güvenlik problemlerini aşmak açısından umut vericidir.

Ancak bu alandaki ilerlemeler halen prekllinik aşamadadır ve insanlar üzerinde yapılacak faz I/II klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca,

bireyler arası genetik varyasyonlar ve miRNA profillerindeki bireysel farklılıklar göz önünde bulundurularak kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi gerektiği açıktır.

Sonuç olarak, miRNA'lara dayalı terapiler, Alzheimer hastalığının tedavisinde gelecekte devrim yaratabilecek stratejiler arasında yer almakta; özellikle kombine biyobelirteç ve hedefleyici ajan olarak kullanılmalarıyla translasyonel tıp alanında önemli bir potansiyel taşımaktadır.

SONUÇ VE GELECEK PERSPEKTİFLER

Alzheimer hastalığında mikroRNA'ların (miRNA'lar) rolü, hastalığın tanı, patogeneze ve tedavi stratejilerinin yeniden şekillendirilmesinde kritik öneme sahiptir. Son on yıl içinde yapılan araştırmalar, miRNA'ların hastalığın biyolojik süreçlerine doğrudan etki ettiğini ortaya koymuş; hem tanı biyobelirteci hem de terapötik hedef olarak kullanılabilecek potansiyellerini gözler önüne sermiştir.

Çeşitli biyolojik sıvılarda ve beyin dokularında tespit edilen miRNA'lar, hastalığın erken evrelerinde bile anlamlı değişiklikler gösterebilmekte; bu durum onların non-invaziv tanı yöntemlerinde kullanımına olanak sağlamaktadır. Ayrıca, sinaptik işlev, nöroenflamasyon ve A β metabolizması gibi süreçleri etkileyen miRNA'lar, patolojik sürecin merkezinde yer almakta ve hedeflenebilir moleküller olarak ön plana çıkmaktadır.

Terapötik açıdan değerlendirildiğinde, miRNA mimetikleri ve antagomiR'ler aracılığıyla yapılan müdahalelerin, hayvan modellerinde olumlu sonuçlar verdiği görülmektedir. Ancak bu stratejilerin insanlar üzerindeki güvenilirliği ve etkinliği henüz yeterince doğrulanmamıştır. Bu nedenle, daha fazla klinik çalışma ve uzun süreli gözleme dayalı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Gelecekte, miRNA profillemesi ile bireysel hastalık alt tiplerinin belirlenmesi ve buna göre kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesi mümkün olabilir. Ayrıca, yapay zeka ve biyoinformatik araçlar kullanılarak miRNA-mRNA etkileşimlerinin detaylı şekilde modellenmesi, hastalığın moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasına önemli katkılar sunacaktır.

Sonuç olarak, miRNA'lar Alzheimer hastalığının anlaşılması ve yönetimi açısından çok boyutlu bir potansiyel sunmaktadır. Bu moleküllerin

klirik pratiğe entegrasyonu, sadece erken tanı ve tedavi değil, aynı zamanda hastalığın önlenmesi açısından da umut verici bir gelecek vadetmektedir.

KAYNAKÇA

- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281–297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- Leidinger, P., Backes, C., Deutscher, S., Schmitt, K., Mueller, S. C., Frese, K., ... & Keller, A. (2024). Plasma miRNAs across the Alzheimer's disease continuum: A discovery and validation study. *Alzheimer's & Dementia*. <https://doi.org/10.1002/alz.14230>
- Müller, M., Kuiperij, H. B., Claassen, J. A. H. R., Küsters, B., & Verbeek, M. M. (2015). MicroRNA profiling in cerebrospinal fluid reveals potential biomarkers to detect Alzheimer's disease. *PLOS ONE*, 10(5), e0126423. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126423>
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., & Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), a006189. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006189>
- Siedlecki-Wullich, D., Català-Solsona, J., Mena-Mollà, S., Ribera-Fortuny, C., Rodríguez-Gallego, C., Muñoz, F. J., & Pérez-González, M. (2019). Altered microRNAs related to synaptic function as potential plasma biomarkers for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, 11(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s13195-019-0501-4>
- Tewari, M., Mehta, D., Khattar, E., & Malhotra, R. (2024). Validation that miRNAs altered in Alzheimer's disease in human plasma are stable over time and correlate with CSF biomarkers. *Scientific Reports*, 14, 4215. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52681-5>
- Wang, X., Liu, P., Zhu, H., Xu, Y., Ma, C., Dai, X., Huang, L., Liu, Y., Wang, D., Liu, D., Fan, M., & Zhang, X. (2019). Integrated analysis of miRNA and mRNA expression in the blood of Alzheimer's disease. *Molecular Medicine Reports*, 20(1), 663–672. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10553>
- World Health Organization. (2021). Dementia. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>

BÖLÜM 13

BÖCEKLERLE YAPILMIŞ MOLEKÜLER ÇALIŞMALARA KISA BİR GİRİŞ

Doç. Dr. Damla AMUTKAN MUTLU¹

Doç. Dr. Neslihan BAL²

¹ Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye.
damlamutkan@gazi.edu.tr, Orcid ID: 0000-0002-4780-8520

² Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye.
neslihan.bal@gazi.edu.tr, Orcid ID: 0000-0002-8122-7914

GİRİŞ

Böcekler, hayvanlar aleminin en büyük ve en çeşitli grubunu oluşturur. Günümüzde yaklaşık bir milyon tür tanımlanmıştır ve toplam hayvan çeşitliliğinin %70'inden fazlasını oluştururlar. Tanımlanmamış türler de dahil edildiğinde, bu sayının 5 ila 10 milyon arasında değiştiği ve çok daha yüksek olduğu da tahmin edilmektedir (Stork, 2018). Bu çeşitlilik, böceklerin ekosistemlerde zengin ve karmaşık bir rol yelpazesine sahip olmasına yol açmıştır. Böcekler, tozlaşma, ayrışma, biyolojik kontrol ve besin zincirinin çeşitli aşamalarında rol alarak ekolojik işlevlerin sürekliliğine katkıda bulunurlar.

Ancak böceklerin insan yaşamı üzerinde doğrudan ve dolaylı etkileri de vardır. Tarımsal zararlılar, orman zararlıları ve insan sağlığına tehdit oluşturan vektör konumundaki türler, böceklerin olumsuz etkilerine örnek olarak verilebilir. Bal arıları, ipekböcekleri ve biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılan türler ise olumlu katkılarını ortaya koymaktadır. Bu nedenle, böceklerin incelenmesi yalnızca biyolojik çeşitliliği anlamak için değil, aynı zamanda tarım, çevre ve sağlık alanlarında uygulanabilir bilgi üretmek için de kritik öneme sahiptir.

Uzun yıllar boyunca klasik entomoloji çalışmaları morfolojik özelliklere dayanıyordu. Morfoloji, tür tanımlama, sınıflandırma ve evrimsel ilişkilerin temelini oluşturuyordu. Ancak, kriptik tür kompleksleri, eşeysel dimorfizm, farklı yaşam evreleri arasındaki morfolojik benzerlikler ve yakın evrim, bu yöntemin sınırlarını ortaya koydu (Hebert ve ark., 2003). Moleküler biyoloji tekniklerinin böcek araştırmalarında devrim yarattığı nokta tam da bu noktalardır.

DNA ve RNA analizleri, protein temelli yaklaşımlar ve omik teknolojileri sayesinde böceklerin genetik yapısı, filogenetik ilişkileri, popülasyon dinamikleri ve simbiyotik etkileşimleri çok daha net bir şekilde anlaşılmaya başlanmıştır. Bu gelişmeler, hem temel bilimsel araştırmalarda hem de uygulamalı alanlarda (örneğin zararlı kontrolü, biyoteknoloji ve koruma biyolojisi) yeni ufuklar açmıştır.

1. BÖCEK ARAŞTIRMALARINDA MOLEKÜLER BİYOLOJİNİN YERİ

Moleküler biyoloji tekniklerinin entomolojiye uygulanması, hem temel bilimlerde hem de uygulamalı alanlarda önemli kazanımlar sağlamaktadır. Geleneksel yöntemlerle morfolojik tanımlama, özellikle larva aşamasında veya belirgin cinsiyet farklılıkları olan türlerde genellikle yetersiz kalmaktadır. DNA tabanlı tanımlama yöntemleri bu eksiklikleri gidererek daha güvenilir tür tanımlamalarına olanak tanımıştır (Hajibabaei ve ark., 2007).

Böcek araştırmalarında moleküler biyolojinin önem kazandığı başlıca alanlardan biri zararlı türlerinin izlenmesi ve kontrolüdür. Moleküler belirteçler, özellikle tarımsal zararlıların, hızla yayılan istilacı türlerin ve insan sağlığını tehdit eden vektör türlerinin izlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu, erken teşhis ve daha etkili yönetim stratejilerinin planlanmasını mümkün kılmaktadır.

Moleküler biyoloji, pestisitlere karşı gelişen direnç mekanizmalarının çözülmesini de mümkün kılmıştır. Böcek metabolik yollarındaki veya hedef proteinlerdeki mutasyonlar, böcek ilaçlarının etkinliğini azaltabilir. Bu tür moleküler bulgular, yeni yönetim stratejilerinin geliştirilmesine doğrudan katkıda bulunur (Ffrench-Constant, 2013). Moleküler biyolojinin bir diğer önemli katkısı da koruma biyolojisinde görülmektedir. Nesli tükenmekte olan veya endemik böcek türlerinin genetik çeşitliliğinin anlaşılması, koruma stratejilerinin planlanmasına yardımcı olur. Bu, türlerin uzun vadeli hayatta kalma şansını artırır.

2. DNA BARKODLAMA VE FİLOGENETİK ÇALIŞMALAR

DNA barkodlama, son yıllarda biyoçeşitlilik çalışmalarında devrim yaratmıştır. Bu yöntem, genellikle hızlı ve güvenilir tür tanımlaması sağlamak için mitokondriyal DNA'daki sitokrom oksidaz I (COI) gen bölgesini kullanır (Hebert ve ark., 2003). Böceklerde DNA barkodlama, özellikle gizli türleri ayırt etmek ve biyoçeşitlilik envanterleri hazırlamak için etkili bir araçtır.

Daha gelişmiş bir yaklaşım olan metabarkodlama, çevresel örneklerden (örneğin toprak, su veya böcek dışkısı) elde edilen DNA dizilerinin toplu analizine olanak tanır. Bu yöntem, ekosistemlerdeki böcek çeşitliliğinin hızlı ve kapsamlı bir şekilde tanımlanmasını sağlar. Tarımsal zararlıların erken tespiti ve istilacı türlerin izlenmesi için giderek daha fazla kullanılmaktadır (Taberlet ve ark., 2012).

Filogenetik çalışmalar, moleküler biyolojinin entomolojiye en önemli katkılarından biridir. Daha önce birkaç gen bölgesine dayanan filogenetik analizler, tüm genom verilerinin kullanılmasıyla çok daha güvenilir hale gelmiştir. Bu şekilde böcekler arasındaki evrimsel ilişkiler, türleşme süreçleri ve adaptif yayılmalar daha ayrıntılı olarak açıklanabilir.

3. BÖCEKLERDE GENETİK ÇEŞİTLİLİK VE POPÜLASYON GENETİĞİ

Böcek popülasyonlarının genetik yapısını anlamak, hem ekolojik hem de uygulamalı bakış açılarından büyük önem taşımaktadır. Popülasyon genetiği çalışmaları, türler içindeki gen akışını, izolasyon derecesini, genetik sürüklenmeyi ve adaptasyon süreçlerini anlamaya katkıda bulunur.

Geçmişte mikrosatellitler, AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi) ve ISSR (Basit Dizi Tekrarları Arası) gibi moleküler belirteçler yaygın olarak kullanılıyordu. Günümüzde ise tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler), çok daha yüksek çözünürlüklü veriler sağladıkları için önem kazanmaktadır. Bu yöntemler, örneğin sivrisineklerde (Culicidae) böcek ilacı direnciyle ilişkili genleri belirleyerek direnç yönetimi stratejilerinin geliştirilmesini mümkün kılmıştır (Ranson ve ark., 2011).

Böceklerin iklim değişikliğine verdiği tepkiler de moleküler düzeyde incelenmektedir. Popülasyonlardaki genetik çeşitlilik düzeyi, çevresel stres faktörlerine karşı dayanıklılıklarını belirleyen en önemli faktörlerden biridir. Bu nedenle, moleküler ekoloji, iklim değişikliğinin böcekler üzerindeki etkilerini anlamada kritik bir araç haline gelmiştir.

4. BÖCEK-MİKROORGANİZMA ETKİLEŞİMLERİNİN MOLEKÜLER İNCELENMESİ

Böcekler ve mikroorganizmalar arasındaki ilişkiler, ekolojik ve evrimsel açıdan kritik öneme sahiptir. Zorunlu simbiyontlar böceklerin beslenme ihtiyaçlarını karşılarken, fakültatif simbiyontlar ekolojik uyum yeteneklerini artırır (Steinhaus, 1940).

Örneğin, yaprak bitlerinde (Aphididae) Buchnera bakterisi, temel amino asitlerin sentezinde kritik bir rol oynar (Douglas, 2015). Öte yandan *Wolbachia* bakterisi, konak böceklerin üreme biyolojisini değiştirerek popülasyon dinamikleri üzerinde önemli etkiler yaratır. *Wolbachia*'nın konak sivrisinek popülasyonlarına transferi, belirli patojenlerin bulaşmasını önlemek için biyolojik bir kontrol yöntemi olarak da kullanılır (Zabalou ve ark., 2004).

Son yıllarda, metagenomik ve metatranskriptomik analizler böcek mikrobiyotası hakkında çok daha ayrıntılı bilgiler sağlamıştır. Bu çalışmalar hem simbiyotik ilişkilerin evrimsel boyutlarının anlaşılmasına hem de yeni biyolojik kontrol yöntemlerinin geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır (Liu ve ark., 2019).

5. PEST KONTROL VE BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARI

Moleküler biyoloji, zararlı kontrolü için devrim niteliğinde yöntemlerin geliştirilmesini mümkün kılmaktadır. Bunların başında RNAi (RNA interferanz) teknolojisi gelmektedir. RNAi, hedef genlerin susturulmasını sağlayarak böcek gelişimini veya üremesini engellemektedir (Attathom, 2002).

CRISPR/Cas9 teknolojisi ise böceklerde genetik düzenleme olanağı sunmaktadır. Gen sürücü sistemleri özellikle zararlı popülasyonlarını baskılamak için kullanılmaktadır (Hammond ve ark., 2016). Ancak, bu tür genetik müdahalelerin çevresel etkileri, biyogüvenlik riskleri ve etik boyutları dikkatlice değerlendirilmelidir.

Ayrıca, steril böcek tekniği (SIT) ve baskın öldürücü (RIDL) genetik sistem taşıyan böceklerin salınması gibi yöntemler, doğal popülasyonların genetik yapısını manipüle ederek zararlıları kontrol etmek için kullanılmaktadır (Dilani ve ark., 2022).

6. OMİK TEKNOLOJİLER

Omik teknolojileri, böceklerin biyolojik özelliklerinin sistematik olarak anlaşılmasında önemli bir rol oynar.

- *Genomik*: Böcek türlerinin genetik haritalarının oluşturulmasını sağlar (Raman ve ark., 2015; Li ve ark., 2019).
- *Transkriptomik*: Gen ifadesinin farklı çevre koşullarında nasıl değiştiğini ortaya koyar (Dunaevsky ve Elpidina, 2024).
- *Proteomik*: Protein yapısını ve işlevini inceleyerek böcek fizyolojisine yeni bakış açıları sağlar (Raman ve ark., 2015).
- *Metabolomik*: Böcek-bitki ve böcek-mikroorganizma etkileşimlerinde rol oynayan metabolitlerin anlaşılmasına yardımcı olur (Hayward ve Colinet, 2023).

Çoklu omiklerin birlikte uygulanması sayesinde böceklerin ekolojik adaptasyonları, davranışları ve adaptasyon mekanizmaları daha net bir şekilde anlaşılmaktadır (Misof ve ark., 2014).

7. GELECEK PERSPEKTİFLER

Böcek araştırmalarının geleceğinde, taşınabilir DNA dizileme cihazlarının saha çalışmalarında yaygınlaşması bekleniyor. Bu cihazlar, türlerin anında tanımlanmasını sağlayacak ve biyoçeşitlilik izleme çalışmalarını hızlandıracaktır.

Ayrıca, tek hücreli omik yaklaşımlar, böcek gelişim süreçlerinin hücresel düzeyde anlaşılmasına katkıda bulunacaktır. Yapay zekâ ve makine öğrenimi tabanlı biyoenformatik araçları, moleküler verilerin analizinde giderek daha önemli bir rol oynayacaktır.

Açık bilim uygulamalarının yaygın olarak benimsenmesi, büyük ölçekli veri tabanlarının geliştirilmesi ve artan uluslararası iş birlikleri, moleküler entomoloji alanındaki ilerlemeleri daha da hızlandıracaktır.

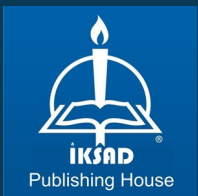
SONUÇ

Moleküler biyoloji, böcek araştırmalarını kökten değiştirerek tür tanımlama, popülasyon genetiği, simbiyotik ilişkiler ve biyoteknoloji gibi alanlarda önemli yeniliklere yol açmıştır. Bu alanın önümüzdeki yıllarda daha da gelişmesi ve tarım, sağlık ve çevre yönetimine doğrudan katkı sağlaması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- Attathom, T. (2002). Biotechnology for insect pest control. Sustainable Agricultural System in Asia, 2, 73-84.
- Dilani, P. V. D., Gunawardene, Y. I. N. S., & Dassanayake, R. S. (2022). Genetic improvements to the sterile insect technique (Sit) for the control of mosquito population. In Genetically Modified and other Innovative Vector Control Technologies: Eco-bio-social Considerations for Safe Application (pp. 43-65). Singapore: Springer Singapore.
- Douglas, A. E. (2015). Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. Annual Review of Entomology, 60, 17-34.
- Dunaevsky, Y. E., & Elpidina, E. N. (2024). Special Issue "Transcriptomics in the Study of Insect Biology". International Journal of Molecular Sciences, 25(23), 12582.
- Ffrench-Constant, R. H. (2013). The molecular genetics of insecticide resistance. Genetics, 194(4), 807-815.
- Hajibabaei, M., Singer, G. A., Hebert, P. D., & Hickey, D. A. (2007). DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. Trends in Genetics, 23(4), 167-172.
- Hammond, A. et al. (2016). A CRISPR–Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. Nature Biotechnology, 34(1), 78-83.
- Hayward, S. A., & Colinet, H. (2023). Metabolomics as a tool to elucidate biochemical cold adaptation in insects. Current Opinion in Insect Science, 58, 101061.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 270(1512), 313-321.
- Li, F., Zhao, X., Li, M., He, K., Huang, C., Zhou, Y., ... & Walters, J. R. (2019). Insect genomes: progress and challenges. Insect molecular biology, 28(6), 739-758.

- Liu, Z., Klümper, U., Liu, Y., Yang, Y., Wei, Q., Lin, J. G., ... & Li, M. (2019). Metagenomic and metatranscriptomic analyses reveal activity and hosts of antibiotic resistance genes in activated sludge. *Environment international*, 129, 208-220.
- Misof, B., et al. (2014). Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science*, 346(6210), 763-767.
- Raman, C., Goldsmith, M. R., & Agunbiade, T. A. (Eds.). (2015). *Short Views on Insect Genomics and Proteomics: Insect Proteomics*, Vol. 2 (Vol. 4). Springer.
- Ranson, H., N'Guessan, R., Lines, J., Moiroux, N., Nkuni, Z., & Corbel, V. (2011). Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends in Parasitology*, 27(2), 91-98.
- Steinhaus, E. A. (1940). The microbiology of insects: with special reference to the biologic relationships between bacteria and insects. *Bacteriological Reviews*, 4(1), 17-57.
- Stork, N. E. (2018). How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on Earth? *Annual Review of Entomology*, 63, 31-45.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21(8), 1789-1793.
- Zabalou, S., et al. (2004). *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(42), 15042-15045.



ISBN: 978-625-378-305-1