



Ekim 2025

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK

ALANINDA ULUSLARARASI AKADEMİK ARAŞTIRMA VE ÇALIŞMALAR

EDİTÖR **DOÇ. DR. ASLI GİRAY**

Genel Yayın Yönetmeni / Editor in Chief • C. Cansın Selin Temana

Kapak & İç Tasarım / Cover & Interior Design • Serüven Yayınevi

Birinci Basım / First Edition • © Ekim 2025

ISBN •978-625-5897-84-8

© copyright

Bu kitabın yayın hakkı Serüven Yayınevi'ne aittir.

Kaynak gösterilmeden alıntı yapılamaz, izin almadan hiçbir yolla çoğaltılamaz.

The right to publish this book belongs to Serüven Publishing. Citation can not be shown without the source, reproduced in any way without permission.

Serüven Yayınevi / Serüven Publishing

Türkiye Adres / Turkey Address: Kızılay Mah. Fevzi Çakmak 1. Sokak

Ümit Apt No: 22/A Çankaya/ANKARA

Telefon / Phone: 05437675765

web: www.seruvenyayinevi.com

e-mail: seruvenyayinevi@gmail.com

Baskı & Cilt / Printing & Volume

Sertifika / Certificate No: 47083

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK

ALANINDA ULUSLARARASI AKADEMİK
ARAŞTIRMA VE ÇALIŞMALAR

EKİM 2025

EDİTÖR DOÇ. DR. ASLI GİRAY

İÇİNDEKİLER

BÖLÜM 1

MODERN BİTKİ ISLAHINDA CRISPR/CAS TEKNOLOJİSİ VE UYGULAMALARI

Dilay ŞENTÜRK 1

Osman TELLİ 1

BÖLÜM 2

KANSER TANI VE TEDAVİ PERSPEKTİFLERİNDE BİYOBELİRTEÇ OLARAK ENZİMLER

Cuma ZEHRİOĞLU..... 25

BÖLÜM 3

VİRÜSLERE KARŞI BİTKİ SAVUNMASININ MOLEKÜLER MEKANİZMASI

Nihan GÜNEŞ..... 47

Osman TELLİ 47

BÖLÜM 4

EPİGENETİK, BEYİN DALGALARI, BİLİNÇ VE KUANTUM: İNSAN DENEYİMİNİN ÇOK KATMANLI ANALİZİ “NÖROBİLİMSEL VE MOLEKÜLER PERSPEKTİFLERDEN DİSİPLİNLERARASI BİR DEĞERLENDİRME”

Aslı GİRAY..... 77

Hasan AKGÜL 77

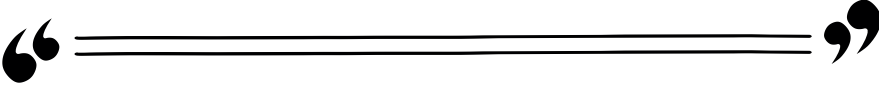
BÖLÜM 5

BİTKİ BİYOTEKNOLOJİSİNDE RESTRİKSİYON ENZİMLERİNDEN CRISPR/CAS: YENİLİKÇİ GENOM DÜZENLEME YÖNTEMLERİ

Dilay ŞENTÜRK 99



MODERN BİTKİ ISLAHINDA CRISPR/CAS TEKNOLOJİSİ VE UYGULAMALARI



Dilay ŞENTÜRK¹

Osman TELLİ²

¹ Tohumluk Bilimi ve Teknolojisi Ana Bilim Dalı, Üretim ve Teknoloji Bölümü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ege Üniversitesi, İzmir, TR35040. e-posta: 91250000130@ogrenci.ege.edu.tr ORCID ID: 0009-0002-9022-1757

² Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Fen Edebiyat Fakültesi, Kırklareli Üniversitesi, Kırklareli, TR39100. e-posta: osman.telli@klu.ed.tr ORCID ID: 0000-0001-7337-8109
Bu çalışmanın bir kısmı Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Ziraat Fakültesi/ Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nde 2021 yılında "Bitki Biyoteknolojisi'nde CRISPR/Cas Teknolojisi" başlıklı lisans tezinden yararlanılarak hazırlanmıştır. Tez danışmanım: [Sergül Ergin, Dr. Öğr. Üyesi].

1. GİRİŞ

Son yıllarda biyoteknoloji alanındaki hızlı gelişmeler, bitki ıslahında da köklü değişimlere yol açmıştır. Geleneksel yöntemler olan melezleme, mutasyon ve transgenik ıslah teknikleri, uzun süre boyunca tarımsal üretimde önemli kazanımlar sağlamış olsa da; zaman, maliyet, öngörülemezlik ve düzenleyici sınırlamalar gibi çeşitli kısıtlarla karşı karşıya kalmıştır. Bu bağlamda, CRISPR/Cas genom düzenleme teknolojisi, modern bitki ıslahına hız, doğruluk ve esneklik kazandıran devrim niteliğinde bir araç olarak öne çıkmaktadır (Chen vd., 2019).

Bu noktada CRISPR/Cas teknolojisi, bitki genomunu doğrudan ve hassas bir şekilde düzenleme imkânı sunarak tarımın geleceğini şekillendiren en güçlü araçlardan biri olarak öne çıkmaktadır. Teknoloji yalnızca verim artışı veya hastalıklara dayanıklılık sağlamakla kalmıyor; aynı zamanda iklim değişikliği, su stresi ve besin değerlerini artırma gibi daha geniş çaplı zorluklara da yanıt olabilecek potansiyel sunuyor.

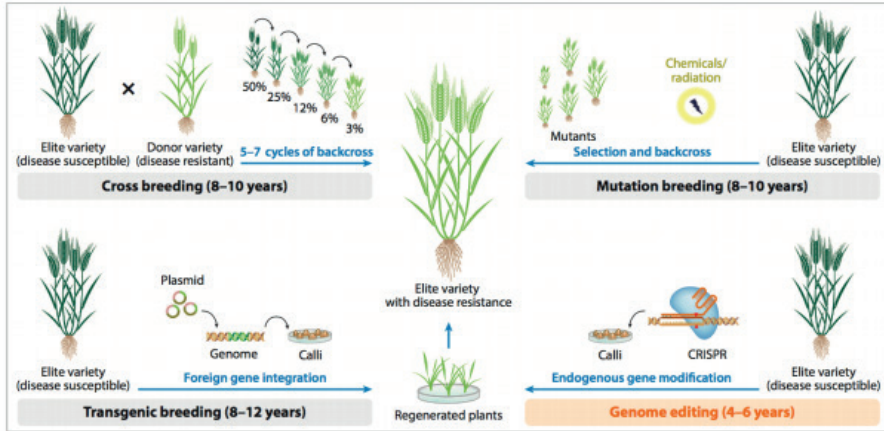
Jennifer A. Doudna, *Yaratılıştaki Çatlak* kitabında CRISPR/Cas teknolojisiyle ilgili görüşünü şöyle dile getiriyor: “Bu alanın ilerleyişi, herhangi bir akademik araştırma merkezinin dört duvarı arasında zapt edilemez.” Bu söz, teknolojinin sadece laboratuvar sınırlarıyla sınırlı kalmayacağını; aksine, dünyanın farklı bölgelerinde tarımsal üretimi ve beslenme güvenliğini dönüştürme kapasitesine sahip olduğunu vurgular.

CRISPR/Cas’ın sağladığı hız, esneklik ve doğa-özdeş yaklaşım, onu sürdürülebilir tarım uygulamaları için benzersiz bir araç hâline getiriyor. Bu bölümde, teknolojinin bitki ıslahındaki yeri, mevcut ve potansiyel uygulama alanları ile geleceğe dair sunduğu vizyon ele alınacak; okuyucuya yalnızca teknik bir çerçeve değil, aynı zamanda tarımın dönüşüm yolculuğuna dair bir perspektif sunulacaktır.

2. MODERN BİTKİ ISLAHINDA CRISPR/Cas TEKNOLOJİSİ

CRISPR/Cas teknolojisi yararlı, hızlı ve etkili bir genom düzenleme aracı sağlar. Tarımda verimliliği ve sürdürülebilirliği artırmak için yeni bir ıslah tekniği olarak uygulanmaktadır. Modern tarımda, yaygın olarak kullanılan bitki ıslah teknikleri melezleme ıslahı, mutasyon ıslahı ve transgenik ıslah olarak sıralanabilir. Melezleme ıslahı, ebeveynlerinden farklı olarak üstün özelliklere sahip birey ve popülasyonlar geliştirilmesine dayanır. İstenilen özellik bakımından birçok nesil boyunca geri dönüş (geri melezleme) sağlanabilmektedir. Mutasyon ıslahı, kimyasal veya fiziksel mutajenlerin neden olduğu rastgele mutagenез (bir organizmanın genetik bilgisinin bir mutasyon üreterek değiştirildiği bir süreçtir) ile istenen bir özelliğin geliştirilmesine dayanır. Transgenik ıslah ise eksojen (dışarıdan) gen veya genlerin transferi ile istenen bir özellik geliştirmeye dayanır. Buna karşılık, yeni bir ıslah tekniği

olarak genom düzenleme, hedeflenen gen üzerinde genetik modifikasyon ile istenen bir özelliğin iyileştirilmesini sağlar. Ek olarak, geleneksel ıslah teknikleri çeşitli sınırlamalarla uzun yıllar sürerken, yeni bir ıslah tekniği olarak genom düzenleme, zamanı optimize etmekte ve sınırlamaların üstesinden gelmektedir (Şekil 10) (Chen ve ark., 2019).



Şekil 1. Modern tarımda yaygın olarak kullanılan bitki ıslah teknikleri ve CRISPR/Cas genom düzenleme teknolojisi (Chen vd., 2019).

CRISPR/Cas genom düzenleme teknolojisi, genetiği değiştirilmiş olmayan (GD olmayan) ürünlerin geliştirilmesini sağlar. GD (genetiği değiştirilmiş) bitkiler “doğal olarak gerçekleşmeyecek şekilde değiştirilmiş” olarak tanımlanır. Bununla birlikte, CRISPR/Cas teknolojisi farklı bir organizmadan yabancı genetik materyal sokulmadan, geleneksel bitki ıslahı yöntemleri ile doğal olarak ortaya çıkabilecek DNA modifikasyonları (delesyon (silme), yer değiştirme, insersiyon (ekleme)) gerçekleştirmeyi sağlar (El-Mounadi vd., 2020). Bu nedenle CRISPR/Cas ile düzenlenmiş bitkiler; genetiği değiştirilmiş (GD) değil, genomları düzenlenmiş (GE; gene editing) ürünler olarak kabul edilir. Genomları düzenlenmiş ürünlerin kamusal düzenlemeleri ülkeler tarafından iki farklı şekilde ele alınır; süreç düzenlenir veya nihai ürünün özellikleri düzenlenir. Transgenik olmayan, genomu düzenlenmiş bitkiler geleneksel bitki ıslahı ile doğal olarak oluşturulacağından, bu bitkiler transgenik bitkiler için oluşturulmuş kamusal düzenlemelerin üstesinden gelebilir. USDA (Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı), geleneksel bitki ıslahı ile eşdeğer olan genom düzenlemeli bitkilerin bir düzenleme gerektirmediğini açıklamıştır. Ayrıca CRISPR ile düzenlenen ürünler geliştirilmiş ve ABD pazarında ticari olarak satışa sunulmuştur. Hiçbir düzenleme olmadan ticarileştirilen ilk ürünler, kahverengileşmeye karşı direnci olan bir mantar ve amilopektin bileşimi de dahil olmak üzere nişasta içeren mumsu bir mısırdır.

(Waltz, 2016). Benzer şekilde, CRISPR tarafından düzenlenen iki ürün keşildiğinde kahverengileşmeyen elma ve patatestir, Kanada’da geliştirilmiş ve onaylanmıştır. Ayrıca Arjantin, Şili, Brezilya CRISPR tarafından düzenlenen ürünlere özel bir düzenleyici sistem kurmuştur. Buna karşılık, AB (Avrupa Birliği) ülkeleri genom düzenleme ile üretilmiş ürünlerin genetiği değiştirilmiş organizmalara uygulanan aynı kamusal düzenlemelere dahil ettiğini açıklamıştır (Uslu, 2020).

3. BİTKİLERDE GENOM DÜZENLEME İÇİN CRISPR/Cas VEKTÖRLERİ

Hedeflenen hücre içindeki Cas9 ve sgRNA ekspresyonu, bitki genomlarını modifiye etmek için yeterlidir. Bitkiye özgü RNA polimeraz III promotorları [(tU6 (Arabidopsis); TaU6 (buğday); OsU6 veya OsU3 (çeltik)], bitkilerde Cas9 ve gRNA’yı eksprese etmek için kullanılmaktadır. Bitkilerde Cas9 veya Cas9 varyantlarını ve gRNA’ları eksprese etmek için ticari olarak temin edilebilen birkaç vektör vardır. Addgene, şu anda ikili (binary) vektörlerde 30’dan fazla boş gRNA omurgasını (backbones) kullanıma sunabilen, plazmidler için küresel, kâr amacı gütmeyen bir havuzdur. Boş gRNA omurgaları, bitki RNA polimeraz III destekleyicisine ve gRNA’yı ekleyebileceği gRNA yapısını içermektedir (Jaganathan vd., 2018).

3.1.sgRNA Ekspresyon Kasetleri

Tipik bir sgRNA 98 nükleotid içermektedir (20 nükleotidlik hedef sekans dahil) ve Cas9/ sgRNA nükleaz kompleksinde bir kılavuz olarak işlev görmektedir (Nishimasu vd., 2014). Bitkilerdeki sgRNA’ların ekspresyonu genellikle U3 veya U6 küçük nükleer RNA gen promotorları tarafından yönlendirilmekte ve sgRNA’lar, RNA polimeraz III tarafından kopyalanmaktadır (Jiang vd., 2013; Li vd., 2013; Nekrasov vd. 2013; Shan vd., 2013). sgRNA ekspresyon kasetleri küçük olduğundan (300- 600 bç), hedef sekanslarla sgRNA ekspresyon kasetlerini oluşturmak için hedef adaptör ligasyonu veya overlap PCR kullanılabilir (Li vd., 2013; Mao vd., 2013; Shan vd., 2013; Xie ve Yang, 2013; Ma vd., 2015). Ma vd. (2015), sgRNA ekspresyon kasetlerini hızlı bir şekilde hazırlamak için PCR temelli, orta düzeyde klonlamasız bir strateji tasarlamışlardır ve bu kasetler, Golden Gate klonlaması veya Gibson montajı ile CRISPR/Cas binary vektörlerine doğrudan klonlanmaktadır. Başka bir strateji ise RNA polimeraz II tarafından kopyalanan bir pre-RNA’yı işleyerek işlevsel sgRNA üretmek için ribozim (ribonükleik asit enzim) sistemini kullanmaktadır. Bu sayede düzenli dokuya özgü sgRNA’ları ifade etmek için bu sistem kullanılabilir (Gao ve Zhao, 2014).

3.2. Cas9 Ekspresyon Kasetleri

Cas9’un orijinal kodlama dizisi 4107 bç uzunluğundadır. Ökaryotlarda, Cas9’un nükleer lokalizasyonu, Cas9 kodlama dizisine tekli veya ikili bir NLS

(nuclear localization signal – nükleer lokalizasyon sinyali) füzyonunu gerektirmektedir. Çeltik ve diğer buğdaygillerde buğdaygiller genlerini taklit eden yüksek bir düzenleme etkinliğine sahip kodon ile optimize edilmiş Cas9 geni (Cas9p) kullanılmaktadır (Wong vd., 2002). Bununla birlikte, bitkilerdeki bazı uygulamalarda bitki olmayan türler için optimize edilmiş Cas9 kodonu kullanılmıştır. Ancak düzenleme verimliliğinin bitki için optimize edilmiş yöntemlerden nispeten daha düşük olabildiği bildirilmiştir (Jiang vd., 2013; Mao vd., 2013; Nekrasov vd., 2013; Xie ve Yang, 2013; Lawrenson vd., 2015). Genel olarak mısır, çeltik ve Arabidopsis, Ubiquitin geni ve Karnabahar mozaik virüsü (CaMV) 35S gibi promotorlar, kallus bazlı transformasyon yöntemlerinde etkili genom düzenlemesine aracılık etmek için monokot ve dikot bitkilerde Cas9 genini çalıştırma gereksinimini karşılayabilmektedirler. Çoğu durumda, daha güçlü Ubiquitin promotorları, CaMV 35S promotorundan daha yüksek düzenleme verimliliğine sahiptir (Ma vd., 2016).

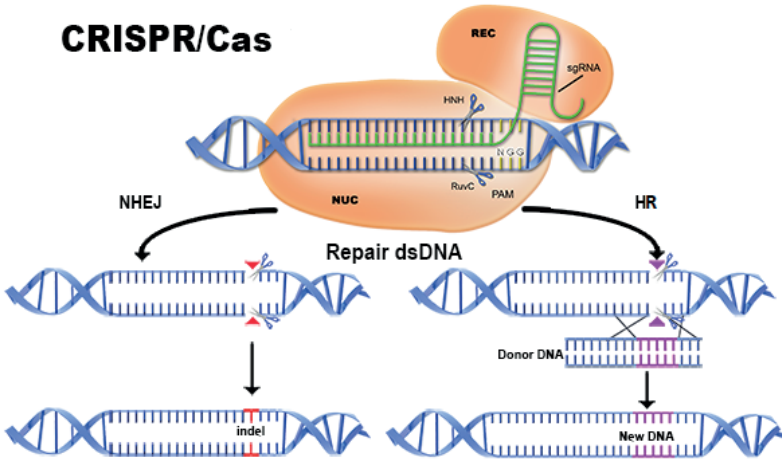
3.3. Cas9 ve sgRNA İfade Kasetlerinin Bitki Hücrelerine Gönderilmesi

In vivo genom düzenlemesine aracılık etmek için, Cas9 ve sgRNA ekspresyon kasetlerini taşıyan vektör yapılarının bitki hücrelerine iletilmesi gerekmektedir. CRISPR/Cas sisteminin uygulanabilirliğini ve verimliliğini doğrulamak için, araştırmacılar genellikle Cas9 ve sgRNA ekspresyon kasetlerini taşıyan plazmidleri protoplastlara veya tütün, Arabidopsis yapraklarına vakum infiltrasyonu yöntemini kullanmışlardır (Jiang vd., 2013). Cas9 kasetleri ve sgRNA kasetleri, ayrı veya tekli yapılarda düzenlenebilir (Jiang vd., 2013; Li vd., 2013; Nekrasov vd., 2013; Shan vd., 2013; Xie ve Yang, 2013). Cas9 ve sgRNA ekspresyon yapılarını bitki genomlarına entegre etmek ve kalıtsal mutasyonlar üretmek için kallus ve olgunlaşmamış embriyoların biyolistik dönüşümü kullanılabilir. (Shan vd., 2013). Biyolistik dönüşüm ayrıca in vitro sentezlenmiş sgRNA'yı doğrudan Cas9 ile dönüştürülmüş bitki hücrelerine iletebilir ve hedeflenen mutasyonları indükleyebilmektedir (Svitashev ve ark., 2015). Agrobacterium aracılı transformasyon yöntemi birçok bitki için en etkili yöntem olduğundan, bitkilerdeki CRISPR/Cas uygulamalarının çoğu hem Cas9 hem de sgRNA ekspresyon kasetlerini taşıyan T-DNA'ları bitki genomlarına entegre etmek için bu yöntem kullanılmaktadır. Arabidopsis'in genom düzenlemesi için genellikle Agrobacterium aracılı 'Floral dip transformasyon' yöntemi kullanılmaktadır. Çeltik, mısır, tütün, domates, patates ve kavak gibi diğer monokot ve dikot bitkiler için CRISPR / Cas ile genom düzenleme için genellikle kallus, olgunlaşmamış embriyolar veya diğer dokuların Agrobacterium ile transformasyonu kullanılmaktadır. Ayrıca agroinfiltrasyon (istenilen bir proteini üretmek için bitki biyolojisinde bitki hücrelerinin kültürlerinin geçici ekspresyonunu indüklemek için kullanılan bir yöntem) yaklaşımı sgRNA ekspresyon kaseti taşıyan tütün çingirak virüsü DNA'sını Cas9 ile genomu düzenlenmiş tütün elde etmek için kullanılmıştır (Yin vd., 2015; Ali vd., 2015; Baltacı ve Arslan, 2020).

4. YAPILAN BAZI ÇALIŞMALAR

CRISPR/Cas genom düzenlemesi, metabolik yollar, biyotik ve abiyotik streslere tolerans, besin içeriği, verim, kalite, haploid tohumlar ve herbisitlere karşı direnç geliştirilmesi açısından bitkilerin iyileştirilmesini sağlar (Uslu, 2020). Bugüne kadar birçok bitkinin genomu CRISPR teknolojisi kullanılarak modifiye edilmiştir. Modifiye edilen bitki türleri arasında çeltik (Jiang vd., 2013; Zhang vd., 2014; Sun vd., 2016) buğday, (Zhang vd., 2016b), mısır (Svitashev vd., 2016), sorgum (Jiang vd., 2013), domates (Cermak vd., 2015; Pan vd., 2016;), patates (Wang vd., 2015; Butler vd., 2015), hıyar (Chandrasekaran vd., 2016), asma (Wang vd., 2016; Ren vd., 2016; Malnoy vd., 2016), elma (Nishitani vd., 2016; Malnoy vd., 2016), şeker portakalı (Jia ve Wang, 2014), limon (Jia vd., 2016), kavak (Fan vd., 2015) soya fasulyesi (Michno vd., 2015), ketencik (Jiang vd., 2016), yonca (Michno vd., 2015) ve tütün (Nekrasov vd., 2013; Jiang vd., 2013) gibi önemli tarım ürünleri mevcuttur (Akbulak ve Kontbay, 2017). CRISPR/Cas gen düzenleme teknolojisi bugüne kadar yaklaşık 20 farklı bitki türünde çalışılmıştır (Taştan vd., 2020).

Zhou vd. (2014) yaptıkları çalışmada CRISPR sistemiyle çeltik bitkisinde büyük delesyonlar oluşturulabileceğini gösterirken aynı yıl Schiml vd. (2014) CRISPR teknolojisinin bitki genomuna HR yoluyla bir direnç kaseti eklenebileceğini bildirmiştir. Tüm bu çalışmalar CRISPR sisteminin mutagenез oluşturma etkinliği, kesim özgüllüğü, kromozomal delesyonlar oluşturma ya da gen ekleme potansiyeli gibi özelliklerini içeren karşılaştırmalı veriler sağlamıştır (Bortesi vd., 2015).



Şekil 2. CRISPR/ Cas sisteminde NHEJ ve HR tamiri (Işıkdere, 2017).

CRISPR/Cas teknolojisi ile meyve ve sebzelerden birim alandan daha yüksek verim alınabilmektedir. Örneğin; aynı anda olgunlaşabilen daha bü-

yük meyvelerin ve yüksek düzeyde C vitamini içeren ürünlerin üretimine, hastalıkların ve tuza dayanıklı bitkilerin yetiştirilmesine ve sapa daha iyi tutunan meyve ve sebzelerin üretimine yer verilebilir. Bu teknolojinin tarımsal üretimde kullanımına ilişkin çalışmaların sayısı da giderek artmaktadır. Yayımlanan çoğu kavramsal makalede çoğunlukla olumlu sonuçlar bildirilmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda uygulamaya yönelik çalışmaların yanı sıra ticarileştirilmiş ürünlerle de karşılaşmaktadır. CRISPR/Cas teknolojisi kullanılarak yapılmış çalışmalarda, soya, mısır, domates, çeltik, sorgum, mantar, portakal gibi birçok bitki türünde farklı genler hedeflenmiştir (Taştan vd., 2020).

Azot fiksasyonu tarımla ilgili diğer çevre sorunlarından biridir. Bitkiler topraktaki farklı azot bileşiklerinin çoğunu doğrudan bünyelerine alamazlar. Fasulye ve bezelye gibi baklagiller, havadaki azotu bitki köklerindeki nodüllerle bağlar ve toprakta bitki köklerine yakın yerlerde bulunan azotobakterler bu azotu bitkiler için yararlı hale getirir. CRISPR/Cas teknolojisi azot fiksasyonunun artırılması konusunda da kullanılır (Taştan vd., 2020).

- **Herbisite dirençli çeltik bitkileri elde edilmesi;** çeltikte asetolaktaz sentaz enzimini kodlayan ALS geni homolog rekombinasyon yoluyla hedeflenmektedir. Asetolaktat sentaz enziminin klorsulfuron ve Bispyribac-Sodiyum (BS) gibi herbisitlerin hedefi olmasından dolayı, bu gende yapılan değişikliklerle herbisite dirençli çeltik bitkileri elde edilmiştir (Sun vd., 2016; Jia ve Wang, 2014) ise CRISPR sisteminin turuncgillerde de etkili bir genom düzenleme aracı olduğunu şeker portakalında CsPDS geninde hedef-dışı etki olmadan mutagenез oluşturarak kanıtlamışlardır (Akbulak ve Kontbay, 2017).

- **Tek hücreli bir yeşil algde sitotoksisteye yol açmadan mutasyonlar yapılması;** mikroalgler ileri jenerasyon biyoyakıt üretiminde hammadde olarak kullanılabilirler. Yapılan çalışmalar *Chlamydomonas reinhardtii* (tek hücreli bir yeşil alg) genomunda CRISPR aracılığıyla sitotoksisteye yol açmadan knock-in (gen aktifleştirme) ve knock-out (gen susturma) yoluyla mutasyonlar yapılabileceği ortaya koymuşlardır (Jiang vd., 2014; Shin vd., 2016).

- **Haşhaşa metabolik yolların manipüle edilmesi;** CRISPR'dan temel biyoloji çalışmalarında da yararlanılmaktadır. Haşhaşa CRISPR teknolojisi ile metabolik yolların manipüle edilebileceği gösterilmektedir (Alagöz vd., 2016).

- **Ciğer otunda mutagenез ile evrim çalışması;** Sugano vd. (2014), kara bitkilerinin evrimi ile ilgili çalışmalarda model olarak kullanılan damarsız bir bitki türü olan *Marchantia polymorpha* L.'da (Ciğer otu) auxin response factor 1 (ARF1) geninde CRISPR/Cas sistemiyle mutagenез yapılabileceğini göstermişlerdir.

- **Bir çeşit yosunda tek tek veya çoklu gen susturulması;** damarsız bitkilerden *Physcomitrella patens*'de (bir çeşit yosun) CRISPR'lar kullanılarak endojen genlerin tek tek veya çoklu şekilde %100'e yakın bir etkinlikle susturabileceği gösterilmiştir (Collonnier vd., 2016; Lopez-Obando vd., 2016).

- **Pirinçte tane büyüklüğünün artırılması;** pirinçte (*Oryza sativa* L.) tane büyüklüğünü (uzunluk ve genişlik olarak) olumsuz yönde etkileyen GS3 ve GL3.1 kantitatif özellikteki genlerin etkinliğini ortadan kaldırmak üzere CRISPR/Cas sistemi kullanılmıştır.

Yapılan çalışmada CRISPR/Cas sisteminin tane büyüklüğünden sorumlu birden fazla genin düzenlenmesinde etkili bir araç olduğunu ortaya koymuşlardır. Hem GS3 hem de GL3.1 genlerinin çoklu nakavt sisteminde yüksek verimlilik sergilediğini ortaya koymuşlardır (Yuyu vd., 2020).

- **Pirinçte amiloz içeriğinin azaltılarak yüksek verimli hale getirilmesi;** Amiloz, *Waxy (Wx)* geni tarafından kodlanan GRANULE-BOUND STARCH SYNTHASE I enzimi tarafından sentezlenmektedir. Bu durum öğütülmüş pirincin şeffaflığının azalmasına ve pişmiş pirincin daha yumuşak hale gelmesine yol açmaktadır.

CRISPR/Cas sistemi ile *Wx* geninde baz düzenlemesi yapılarak, bu genin etkinliği tamamen ortadan kaldırılmıştır. Daha da önemlisi, oluşturulan bu hatların görünümünün, kalitesinin ve verimle ilgili özelliklerinin bozulmadığını ortaya koymuşlardır. Tüm bu transgen içermeyen ve homozigot hatlar bir yıldan kısa bir sürede üretilmiş ve bu da geleneksel üreme yöntemine kıyasla önemli miktarda zaman ve emek tasarrufu sağlamışlardır. Ayrıca bu çalışmada, bir hedef gen ürününün kritik etki alanına yakın amino asitleri düzenleyerek faydalı mutasyonlar oluşturmanın mümkün olduğunu belirtmişlerdir (He vd., 2020).

- **Tohumunda lipoksigenaz içermeyen soya fasulyesi üretimi;** soya fasulyesinde lipoksigenaz enzimini [Lipoksigenaz enzimleri; iki ya da daha fazla doymamış bağ bulunduran yağ asitlerine oksijen katarak oksitleyen, yapısında hem grubu olmayan demir taşıyıcı dioksigenazlardır (Kesebir, 2019)]. Bu enzimi kodlayan LOX genini nakavt etmek (devre dışı bırakmak) amacıyla CRISPR/Cas sistemini kullanmışlardır.

Ayrıca bu çalışmada; M2 soylarında transgen içermeyen beş bitki tespit etmişlerdir. Sonuç olarak; havuza alınmış CRISPR/Cas popülasyonunda transgen içermeyen hatlar elde etmenin de mümkün olduğunu göstermişlerdir (Wang vd., 2020).

- **İki farklı muz türünde besin içeriğinin artırılması;** iki farklı muz türünde (*Musa spp.*) PDS geni (PDS, karotenoid sentezinin kontrolünden sorumlu enzimi (Phytoene desaturase) kodlayan gendir.) marker olarak kullanılarak besin içeriğini artırmak amacıyla CRISPR/Cas sistemi kullanılmıştır.

Bu çalışma aynı zamanda; aynı CRISPR/Cas kasetine sahip iki farklı muz grubunda PDS'i kesintiye uğratarak ve daha büyük DNA parçasının ($\Delta 723b\epsilon$) silinmesiyle yeni mutant bitkilerin meydana geldiğini bildiren ilk çalışmadır (Ntuj vd., 2020).

- **Soya fasulyesinde erken çiçeklenmenin sağlanması;** soya fasulyesinde (*Glycine max* (L.) Merr.) CRISPR/Cas aracı kullanılarak; *LNK2* geni (LNK genleri; sirkadiyen bileşenlerindendir. Bitkide periyoda bağlı bazı düzenlemelerin yanı sıra büyüme kontrolü, yaprak sapı uzunluğu ve yaprak büyümesi gibi özellikleri kontrol eder) nakavt edilmiş ve uzun fotoperiyot altında çiçeklenme süresi kısaltılmıştır.

CRISPR/Cas sisteminin uygulanması *LNK2* transgeni içermeyen homozigot mutant bitki elde ettiler. Bu mutant bitkide uzun fotoperiyot koşulunda çiçeklenme süresinin kıaldığı görülmüştür. Bu bulguların soya fasulyesinde çiçeklenme zamanını düzenleyici mekanizmalar hakkında bilgi verdiği ortaya konulmuştur (Li vd., 2020).

- **Lahana besin içeriğinin artırılması;** lahanada (*Brassica oleracea*) *BoPDS* geni ve paralog geni, birden fazla sgRNA (gRNA) kullanılarak etkinliği durdurulmuştur. Mutant bitkilerde *BoPDS* geninin nakavtı, kavak, petunya, patates ve karpuz gibi diğer birçok bitki türünde bildirilen *PDS* mutantlarına benzeyen albino fenotipinin üretildiği gözlemlenmiştir.

CRISPR/Cas sisteminin lahana hücrelerinde kullanılması genomum verimli bir şekilde düzenlenebildiğini göstermiştir. Ayrıca bu işlemle birden fazla genin hedeflenebileceği ortaya konmuştur (Ma vd. 2019).

- **Karpuz iç renginin değiştirilmesi;** karpuz üzerine yapılmış bir çalışmada, CRISPR/Cas ile fitoen desaturaz (PDS) enzimini (likopen oluşumunda görev alan enzimdir) kodlayan CIPDS geni hedeflenmiş ve sonuçta albino mutant karpuz bitkileri elde edilmiştir (Tian vd., 2016). Bu çalışma CRISPR/Cas sisteminin karpuz yetiştirme programlarında başarıyla kullanılabileceği gösterilmiştir (Taştan vd., 2020).

- **Portakalda kansere karşı direncin artırılması;** CRISPR/Cas sistemi *Xanthomonas citri* subsp. bakteriye dayanıklı portakalları barındıran hatların geliştirilmesi için kullanılmıştır. Araştırmacılar, portakalda kansere duyarlılık sağlayan CsLOB1 geninin promotorunu hedef alarak bu hastalığa karşı direnci artırılmış hatları meydana getirmeyi hedeflemişlerdir (Peng vd., 2017; Taştan vd., 2020).

- **Domateste meyve iriliğinin ve likopen pigmentinin artırılması;** domates, CRISPR teknolojisine sahip gıdaların en başarılı örneklerinden biridir. Yeni domates çeşitleri, bir tür Kiraz domatesi olan yabani domates-ten (*Solanum pimpinellifolium*) geliştirilmiştir. CRISPR/Cas teknolojisi ile domates boyutunda 3 kat artış, hayatta kalan bitki sayısında 10 kat artış ve

meyvede likopen (karoten pigmenti) birikiminde artış (Zsögön vd., 2018) elde etmişlerdir (Taştan vd., 2020).

- **Domateste raf ömrünün uzatılması;** CRISPR/Cas sistemiyle ürünlerin kalitelerinin artırılmasına yönelik çalışmalar da mevcuttur. Ito vd. (2015) yaptıkları çalışmada CRISPR kullanarak domateste RIN geninde başarıyla mutasyonlar oluşturmuşlardır. Meyve olgunlaşması ile ilgili olan RIN genin susturulması domateste raf ömrünü uzattığı görülmüştür (Akbulak ve Kontbay, 2017).

- **Domateste fotoperiyoda olan tepkinin değiştirilmesi;** Soyk vd. (2017), domates bitkisinin fotoperiyoda tepkisini değiştirmek için CRISPR/Cas sistemini kullandı. Bu amaçla, çiçeklenmeyi baskılayan SELF-PRUNING5G (SP5G) geninde çeşitli mutasyonlar ürettiler. CRISPR/Cas ile yapılan bu mutasyonlar, domates bitkilerinde hızlı çiçeklenme, yoğun bir şekilde büyüme ve erken verim sonuçlarını gözlemlemişlerdir (Taştan vd., 2020).

- **Süs bitkilerinden petunyada yaprak şeklinin değiştirilmesi üzerine;** bu çalışmada pek çok bitki ve süs bitkisinde ekonomik değere sahip yaprak şekli üzerinde durulmuştur. Arabidopsis, Domates, Tütün ve Petunya'da bulunan hücre bölünmesi ve uzaması ile yaprak şeklini kontrol etmede rol alan Knotted-1 (Kn1) geni CRISPR/Cas sistemi ile hedeflemişlerdir (Moazzam, 2020).

- **Altın çilekte bitki boyutunun, meyve boyutunun ve sayısının artırılması;** Türkiye'de yapılan bir çalışmada CRISPR/Cas teknolojisi ile altın meyve, öğütülmüş kiraz veya kabuklu domates olarak bilinen *Physalis pruinosa*'da, bitki ve meyvenin boyutunu ve meyve sayısını artırmışlardır (Chen vd., 2019; Taştan vd., 2020).

- **Kakao ağacında spesifik bir hastalığa karşı direnç geliştirilmesi;** TcNPR3 geni CRISPR/Cas tekniği ile bloke edilmiş ve kakao ağaçlarının neslini yok ettiği görülen *Phytophthora tropicalis*'in neden olduğu hastalığa karşı direnç geliştirmişlerdir (Fister vd., 2018; Taştan vd., 2020).

- **Viral enfeksiyonlar üzerine Mutant tütün bitkisinde yapılmış bir çalışma;** virüsler, zirai üretimdeki en önemli sorunlardan biridir ve genellikle mücadele etmek imkansızdır. Her yıl üretimde büyük kayıplara neden olan virüslerle mücadele etmenin en etkili yolu dirençli bitkiler yetiştirmektir.

Dünya genelinde bitkisel üretimde en sık karşılaşılan viral enfeksiyonların çoğu tek iplikli dairesel DNA genomuna sahip Gemini virüslerinden (Geminiviridae) kaynaklanmaktadır. CRISPR/Cas sistemi son zamanlarda bitkilerde Gemini virüslerine karşı direnç kazandırmak için tasarlanmıştır. Gemini virüs replikasyonunu azaltmak için modifiye sgRNA içeren CRISPR/Cas sistemi kullanılarak Fasulye sarı mozaik virüsünün (BeYDV) genomunun altı farklı bölgesini hedef almışlardır. Böylece genetiği değiştirilmiş tütün bit-

kisinde BeYDV virüsünün kopya sayısında önemli azalmalar gözlemlenmiştir (Baltes vd., 2015). Gemini virüslerinde ilk kez uygulanan bu tekniğin, farklı sgRNA'ların tek bir mutantta toplanmasına ve birkaç nükleaz enziminin birden fazla virüse yönlendirilmesine izin verebileceğini düşünmektedirler (Taştan vd., 2020).

- **İki bitki türünde şeker pancarı tepe kıvrıcıklığı virüsüne karşı yapılmış bir çalışma;** Ji vd. (2018), virüslere ait iki adet indüklenebilir CRISPR/Cas vektörü tasarlamışlar ve Şeker pancarı tepe kıvrıcıklık virüsü (BSCTV) *Arabidopsis thaliana* ve *Nicotiana benthamiana* bitkilerinde etkili bir şekilde inhibe etmişlerdir. *Arabidopsis* üzerinde yapılan detaylı sekanslama çalışmalarında hedef-dışı mutasyona rastlamamışlardır (Taştan vd., 2020).

- **Bir çeşit tütün bitkisinde domates sarı yaprak kıvrıcıklık virüsüne karşı yapılmış bir çalışma;** CRISPR/Cas sistemi kullanılarak, *Nicotiana benthamiana* (bir çeşit tütün bitkisi)'nin Domates sarı yaprak kıvrıcıklık virüsüne (TYLCV) karşı moleküler bağışıklığı artırmışlardır (Ali vd., 2015). Tasarlanan sgRNA'lar, TYLCV'nin kodlanmış ve kodlanmamış dizileri için özel olarak tasarlanmıştır. Virüs genomunun intergenik (baskılayıcı) bölgesinde replikasyon kökeni üzerine kök döngü dizisini hedefleyen SgRNA'lar daha güçlü bir etki gösterdi. Böylece virüs genomuna başarıyla müdahale edilmiş ve bitkideki viral DNA kopyalarının sayısı azaltılmıştır (Taştan vd., 2020).

- **Arabidopsis bitkisinde turp mozaik virüsüne karşı direnç geliştirme;** RNA virüsü olan Potyvirusler de bitkisel üretimde önemli kayıplara neden olmaktadır. Arabidopsis bitkisinde Turp mozaik virüsüne (TuMV) karşı genetik direnç geliştirmek için CRISPR/Cas teknolojisini uygulamışlardır. TuMV'ye direnç, virüsün hayatta kalması için gerekli olan konakçı faktörüne ait eIF (iso) 4E geninin delesyonu (silinmesi) ile elde etmişlerdir. CRISPR/Cas transgen mutasyonunun ayrılması, M2 generasyonunda transgen taşımayan TuMV'ye dirençli bitkiler elde etmişlerdir (Pyott vd., 2016).

- **Ispanakta çiçeklenme sorununun çözülmesi üzerine;** Ispanakta (*Spinacia oleracea*) sıkça karşılaşılan çiçeklenme sorunu için çıplak tohumlu bazı bitkilerin çiçeklenmesinden sorumlu ana genlerden T (Ft) lokusu ve Ft ile etkileşen protein 1 (FtPI1) seçilmiş; CRISPR/Cas sistemi ile çiçeklenme sorununun giderilmesi hedeflenmiştir (Khan, 2020).

- **Mısır ve Soya' da kuraklık, herbisit toleransını artırma ve tohum yağı bileşimini iyileştirme;** mısırdaki ve soya fasulyesinde CRISPR/Cas sistemi kullanılarak kuraklık toleransını artırma, tohum yağı bileşimini iyileştirme ve herbisit toleransı sağlanmasını hedeflemiştir (Chilcoat vd., 2017).

- **Patates virüs direnci ve stres toleransında coilin geninin fonksiyonel analizi;** patatesteki (*Solanum tuberosum*) biyotik ve abiyotik streslere karşı

direnç mekanizmalarında görev alan coilin geninin rolünü, CRISPR-Cas teknolojisini kullanarak incelemişlerdir. Coilin geninin düzenlenmesi için, Cas9 endonükleaz ve kısa bir gRNA'dan oluşan bir kompleks yapıdan faydalanmışlardır. Coilin geninin en az bir allelinin düzenlenmesi, düzenlenen hatların Patates Y virüsü ile enfeksiyona karşı dirençlerini, tuza ve osmotik strese karşı toleranslarını önemli ölçüde artırdığını gözlemlemişlerdir (Makhotenko vd. 2019).

- **Patateste invertaz inhibitör geninin etkisizleştirilmesi;** patateste zarar yapan ve verimi düşüren çeşitli hastalık etmenleri her yıl büyük ölçüde ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Apoplastik (hücre duvarı) invertaz enzimi, patojen enfeksiyonu durumunda apoplastik invertaz inhibitörü tarafından post-translasyonel olarak düzenlenen bitki savunma mekanizmasında potansiyel bir rol oynayabilir. Bu çalışmada, CRISPR/Cas teknolojisi ile patateste apoplastik invertaz inhibitör genini hedeflemişlerdir (Dangol, 2021).

- **Ayçiçeğinde linoleik asit içeriğinin artırılması;** Uslu (2020), CRISPR/Cas teknolojisini kullanarak oleik asidin ayçiçeğindeki linoleik aside dönüşümünü katalize eden *FAD2-1* geninin susturulması hedeflenmiştir. Bu çalışmada yüksek oleik asit içeriğine sahip ayçiçeği geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma ile CRISPR/Cas teknolojisinin ilk defa ayçiçeği bitkisinde uygulandığı dile getirilmektedir. Çalışmada iki tane düşük oleik asit içeriğine sahip ayçiçeği genotipi kullanılmış, iki adet kılavuz DNA tasarlanmış, kılavuz DNA ekspresyon kasetleri tek bir reaksiyonla Golden Gate klonlama ile vektöre monte edilmiştir. Sonucunda ayçiçeğinin, yüksek oleik asit içeriğine sahip ayçiçeği geliştirmek için CRISPR/Cas genom düzenleme sistemi ile değiştirilebileceği gösterilmiştir.

4.1. Son Üç Yıl İçerisinde Yapılmış Güncel Çalışmalar

- **Soyada SMV'ye karşı CasRx kullanımı ile direnç sağlanması;** soyada yapılan bir çalışmada CRISPR/CasRx sistemi kullanılarak Soybean mosaic virus (SMV)'e karşı dayanıklılık sağlanmıştır. CasRx, RNA'yı hedef alabilen yeni nesil CRISPR araçlarından biridir ve virüs genomunu doğrudan parçalayarak bitkide enfeksiyonu baskılamaktadır. Bu yaklaşım, RNA virüslerine karşı yeni ve etkili bir biyoteknolojik strateji ortaya koymuştur (Gao vd., 2024).

- **Asma (Grapevine) bitkisinde GVA'ya karşı direnç çalışması;** asmalarda görülen grapevine virus A (GVA) hastalığına karşı CRISPR tabanlı sistemler kullanılmıştır. Araştırmacılar, hedef gen düzenlemeleri sayesinde GVA'ya karşı dirençli hatlar geliştirmiştir. Çalışma, özellikle bağcılıkta virüs kaynaklı kayıpları azaltmak için umut verici bir örnek oluşturmaktadır (Spencer vd., 2023).

- **CRISPR/Cas ile bitki virüs direncinde kullanılan stratejiler - genel derleme;** Zhan ve arkadaşları, CRISPR/Cas sistemlerinin bitki virüslerine

karşı geliştirilmesinde kullanılan stratejileri derlemişlerdir. Çalışmada özellikle Cas13 tabanlı RNA hedefleme yaklaşımlarının etkinliği ve uygulama potansiyeli vurgulanmıştır. Bu derleme, virüs direncinin mühendisliğinde CRISPR teknolojisinin geldiği noktayı özetlemektedir (Zhan vd., 2024).

- **Base editing ile soya bitkisinde herbisit direnci geliştirilmesi;** soya bitkisinde yapılan bir çalışmada base editing yöntemi kullanılarak herbisit direnci geliştirilmiştir. Tek nükleotid düzeyinde değişiklikler yapılarak hedef genin aminoasit dizisi değiştirilmiş ve herbisitlere karşı dayanıklılık sağlanmıştır. Bu yaklaşım, kimyasal tarım girdilerine dirençli çeşitlerin geliştirilmesi açısından önemli bir adım olarak değerlendirilmektedir (Wei vd., 2023).

- **HDR tabanlı glifosat dirençli pirinç hatlarının eldesi;** pirinçte yapılan bir çalışmada CRISPR/Cas9 aracılığıyla homology-directed repair (HDR) yöntemi kullanılmıştır. OsEPSPS geninde belirli bir nokta mutasyonu hedeflenerek glifosata karşı dirençli pirinç hatları elde edilmiştir. Bu yöntem, tarımda kullanılan yaygın bir herbisite karşı dayanıklı çeşit geliştirilmesi için HDR'nin etkin şekilde uygulanabileceğini göstermektedir (Sony vd., 2023).

- **Domatesin raf ömrü ve kalite iyileştirmelerinin hedeflenmesi;** domateste meyve olgunlaşma sürecinde görev alan genler CRISPR ile düzenlenerek raf ömrünün uzatılması hedeflenmiştir. RIN, ALC ve pektin parçalayan genlerde yapılan mutasyonlar sayesinde olgunlaşma geciktirilmiş ve raf ömrü uzamıştır. Bu çalışmalar, ürünlerin tedarik zincirindeki dayanıklılığını artırma açısından önem taşımaktadır (Sharma vd., 2023).

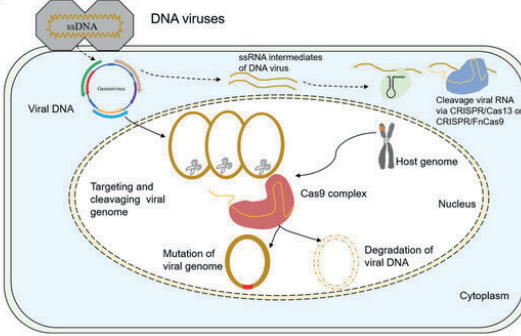
- **Domates ıslahında CRISPR/Cas genom düzenlemesi: Gelişmeler ve uygulamalar;** domateste CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak bitki mimarisi, çiçek özellikleri, meyve olgunlaşması ve kalite (likopen, karotenoid, antosiyanin vb.) ile hastalık ve stres dirençlerinde önemli düzenlemeler yapılmıştır. Ayrıca yeni Cas enzimleri ve DNA-serbest yöntemler gibi teknik gelişmeler domates ıslahını hızlandırmaktadır (Tiwari vd., 2023).

- **Prime editing teknolojisi üzerine güncel gelişmeler;** prime editing teknolojisi son yıllarda bitki biyoteknolojisinde önemli bir araç haline gelmiştir. Vu ve arkadaşları, prime editing'in bitki türlerinde uygulanabilirliğini ve karşılaşılan zorlukları derlemiş; özellikle dicot türlerde kalıtsal düzenleme başarısını ele almışlardır. Bu çalışma, prime editing'in gelecekteki kullanım alanlarını ortaya koymaktadır (Vu vd., 2023).

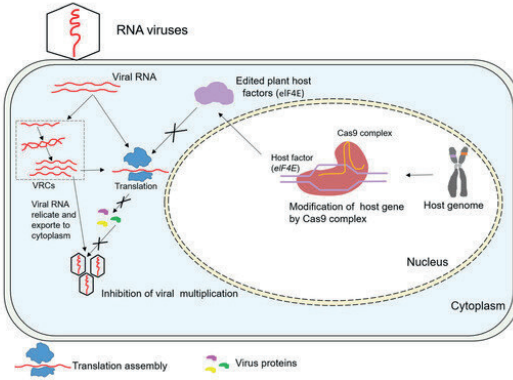
- **Virüs direncinde CRISPR uygulamaları üzerine kapsamlı derleme;** Zhan ve arkadaşları tarafından hazırlanan bir diğer derleme çalışması, CRISPR/Cas teknolojilerinin bitkilerde virüs direnci sağlamak için nasıl kullanılabileceğini kapsamlı şekilde değerlendirmiştir. Cas9, Cas12 ve Cas13 gibi farklı CRISPR varyantlarının avantaj ve sınırlılıkları detaylandırılmıştır. Bu derleme, virüs kaynaklı hastalıklarla mücadelede güncel stratejileri göster-

mektedir (Zhan vd., 2024).

(A)

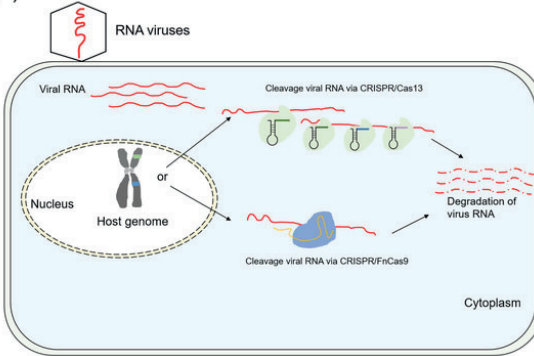


(B)



RNA virüslerinin bozulmasını sağlar.

(C)



(A) DNA virüslerine karşı CRISPR/Cas9 mekanizması: Cas9/sgRNA kompleksi, viral DNA'yı hedefleyerek keser ve mutasyon/bozunma süreçlerini başlatır. FnCas9 ve Cas13a efektörleri ise viral RNA transkriptlerini keserek DNA virüslerinin çoğalmasını engeller.

(B) RNA virüslerine karşı direnç: RNA virüsleri konakçı duyarlılık genleriyle etkileşir; CRISPR/Cas9 ile bu genler hedeflenerek viral replikasyon engellenebilir. FnCas9 ve Cas13a da viral RNA'yı keserek

(C) RNA virüslerinde FnCas9 ve Cas13a, viral genom veya RNA transkriptlerini hedefleyip keserek viral genomun bozulmasını sağlar.

Şekil 3. Bitkilerde virüslerle mücadele için Sınıf 2 CRISPR/Cas stratejilerinin şematik diyagramı (Zhan vd., 2024).

• **Domateste pektinaz enzimlerinin çift CRISPR nakavtı ile raf ömrü ve kalite iyileştirilmesi;** bu çalışmada, domates meyvesinin yumuşamasında rol oynayan pektinaz enzimleri olan polygalacturonase (SLPG2a) ve pectate lyase (SPL) genleri çift CRISPR/Cas9 sistemiyle hedeflenerek nakavt edilmiştir. Sonuçlar, bu düzenlemenin meyve sertliğini artırarak raf ömrünü uzattığını ve meyve kalitesini (şeker-asid oranı, aroma bileşenleri, kabuk rengi) olumsuz etkilemeden iyileştirdiğini göstermiştir. Bu yaklaşım, domatesin post-harvest kayıplarının azaltılmasında etkili bir yöntem olarak öne çıkmaktadır (Ortega-Salazar vd., 2023).

• **Domates ve *Nicotiana benthamiana*'da CRISPR-Cas13a ile viroid direnci sağlanması;** bu çalışmada, domates (*Solanum lycopersicum*) ve *Nicotiana benthamiana* bitkilerinde, patates iğsi tüp viroidine (PSTVd) karşı CRISPR-Cas13a sistemi kullanılarak gen düzenlemesi yapılmıştır. CRISPR-RNA'lar (crRNA) ile hedeflenen PSTVd genomu, viroid RNA'sının birikimini önemli ölçüde azaltmış ve hastalık semptomlarını hafifletmiştir. Bu sonuçlar, Cas13a sisteminin RNA virüsleri ve viroidlere karşı etkili bir direnç stratejisi sunduğunu göstermektedir (Khoo vd., 2024).

5. SONUÇ

Dünyada özellikle son 10 yıldır gözle görülebilir şekilde iklim değişikliğinin olumsuz etkilerinin giderek arttığı, bununla birlikte tatlı su kaynaklarının, tarım yapılabilir arazilerin azaldığı ve bazı bitki gen kaynaklarının neslinin tükendiği bazılarının da tükenme tehlikesiyle karşı karşıya kaldığı olumsuz durumlara rağmen dünya nüfusu her geçen gün katlanarak ve hızlı bir şekilde artmaya devam etmektedir. Dünya nüfusu bu denli artış gösterirken doğada tahrip olan alan sayısı da doğru orantılı olarak artmaktadır. 1940'lı yıllarda dünyadaki gıda sorununa dolayısıyla tarımsal üretime bir çözüm bulabilmek amacıyla ortaya çıkan yeşil devrimin 1980'ler itibarıyla sonuna gelindiği, gen aktarım teknikleri kullanılarak elde edilen bitki ve hayvanlarda verim artışını hedefleyen biyoteknoloji devriminin de sınırlarının zorlandığı günümüzde, mevcut ıslah yöntemleriyle artan dünya nüfusunu beslemeye yetecek kadar tarımsal ürünün, mevcut ekolojik koşullara adapte olabilen verimi yüksek ürünlerin elde edilmesi ve sürdürülebilir bir üretim yapmak oldukça güçleşmiştir.

Üçüncü ve yeni bir devrim olarak adlandırabileceğimiz, yeni nesil genom düzenleme teknolojilerinin bitki ıslahında kullanımı, klasik ıslah yöntemleri ve halihazırda kullanılan biyoteknolojik yöntemlere göre daha hızlı, ucuz ve güvenilir bir alternatif sunmaktadır. Genom düzenleme teknolojileri, verim ve kalitenin artırılması, hastalıklara, zararlılara ve abiyotik streslere dayanım sağlamak için genomda yapılmak istenilen düzenlemelere herhangi bir gen aktarımına gerek kalmaksızın yapılmasına imkân vermektedir. Nükleotid seviyesinde yapılabilecek bu genetik değişiklikler sayesinde, seleksiyon, geri

melezleme gibi yoğun emek ve zaman gerektiren uygulamalar için gereken zaman ve maliyetten de büyük ölçüde tasarruf sağlanabilmektedir. Yeni nesil genom düzenleme tekniklerinin kısa bir geçmişe sahip oldukları düşünüldüğünde, yüksek geliştirilme kapasitesine ve ıslah alanında da oldukça geniş bir yenilik potansiyeline sahip oldukları ortadadır.

CRISPR/Cas teknolojisi, gün geçtikçe daha hassas ve verimli hale gelmektedir ve işlevsel genomik çalışmalar ile ürünlerin özelliklerinin geliştirilmesinde etkili bir araç olarak kullanılmaya devam edeceği düşünülmektedir. Sürdürülebilir bir tarımsal üretim için CRISPR araçlarının heyecan verici pratik uygulamaları üzerinde çalışmalar yapılabilir. Halihazırda kontrol altına alınmış türlerin çevresel ve hastalık toleransını geliştirmek yerine, farklı ortamlara zaten iyi adapte olmuş bitki türlerinin yüksek değerli özellikler ile geliştirilmesinin daha anlamlı olacağı vurgulanmaktadır.

CRISPR/Cas teknolojisinin tarımda kullanılmasına yönelik bazı potansiyel sorunlarının, elde edilen bitkilerin toplum tarafından kabulü ve kamusal düzenlemeler olduğu düşünülmektedir. Bu tekniklerle elde edilen bitkilerden elde edilen ürünlerin, genetiği değiştirilmiş organizmalardan (GDO) farkının anlaşılıp güvenilirliklerinin onaylanmasıyla, toplum tarafından kabul göreceği düşünülmektedir. Bu sayede doğa-özdeş CRISPR uygulamalarının genetiği değiştirilmiş organizmalarla bir tutulması gerekmeyecektir. Gelecekte bitki ıslahı ile de günümüze kadar yapıla gelen doğa ile özdeş (doğa-özdeş) uygulamalar, işin etik kısmı da göz önünde bulundurularak bu teknoloji ile daha da geliştirilebilecektir.

Yakın bir gelecekte CRISPR/Cas aracılı genom mühendisliği tarafından sağlanan hassasiyet, erişim ve esneklik giderek artan dünya nüfusunu besleyici, kaliteli ve güvenilir gıdalarla beslemek amacıyla farklı özelliklere sahip yeni kültür bitkilerinin yaşamımızın bir parçası olarak marketlerde yerini almasının kaçınılmaz olacağı öngörülmektedir.

Jennifer Doudna'nın (2016) da belirttiği gibi, "Tüm bilim alanlarında yeni bulguları desteklemeye devam etmeli, bu keşiflere gözcülük etmeyi bütün kalbimizle kucaklamalı, bu işi özenle yerine getirmeliyiz. Çünkü, tarihin gösterdiği gibi, bilimsel ilerlemeye hazır olmamak, bunun gerçekleşmeyeceği anlamına gelmez. Ne zaman doğanın sırlarından birinin kilidini açsak, bu gelişme bir deneyin sona erdiğine, pek çok başka deneyin başladığına işaret eder." (Doudna ve Sternberg, 2018).

TEŞEKKÜR

Hazırlamış olduğum içerik konusunda akademik bilgi birikimini, desteğini ve anlayışını her zaman hissettiren, beni yönlendirerek bilimsel bakış açısı kazanmamı sağlayan proje danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sergül ERGİN'e; bu araştırmamı bir kitap bölümüne dönüştürmem konusunda beni teşvik eden ve bilimsel bakış açımı derinleştiren Sayın Dr. Öğr. Üyesi Osman TELLİ'ye de teşekkür ederim. Ayrıca, araştırmamın yazımında ve içeriğinin düzenlenmesinde sağladığı değerli destek için kardeşim ve bölümüdaşım Nilay ŞENTÜRK'e; eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen annem Sabriye RAHİM'e teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

- Akbudak, M. A. ve Kontbay, K. 2017. Yeni Nesil Genom Düzenleme Teknikleri: ZFN, TALEN, CRISPR'lar ve Bitkilerde Kullanımı. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 26(1), 111-126.
- Alagöz, Y., Gurkok T., Zhang B. H., Unver T. 2016. Manipulating the Biosynthesis of Bioactive Compound Alkaloids for Next-Generation Metabolic Engineering in Opium Poppy Using CRISPR-Cas 9 Genome Editing Technology, Scientific Reports 6, Article number: 30910.
- Ali, Z., Abulfaraj, A., Idris, A., Ali, S., Tashkandi, M., Mahfouz, M. M. 2015. CRISPR-Cas9- mediated viral interference in plants. Genome Biol. 16: 238.
- Baltacı, A. M., Arslan, M. 2020. Bitki Islahında CRISPR/Cas9 Uygulamaları. Dergi-Park Akademik. ISSN: 2651-5334.
- Baltes, N. J., Hummel, A.W., Konecna, E., Cegan, R., Bruns, A.N., Bisaro, D. M., Voytas, D. F. 2015. Conferring resistance to geminiviruses with the CRISPR-Cas prokaryotic immune system. Nat. Plants, 1: 15145.
- Bortesi, L., Fischer R., 2015. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. Biotechnology Advances, 33(1):41-52.
- Butler, N.M., Atkins PA., Voytas D.F., Douches D.S. 2015. Generation and Inheritance of Targeted Mutations in Potato (*Solanum tuberosum* L.) Using the CRISPR/Cas System. Plos One 10(12): e0144591.
- Cermak, T., Baltes N.J., Cegan R., Zhang Y., Voytas D.F., 2015. High-frequency, precise modification of the tomato genome, Genome Biology 16:232.
- Chandrasekaran, J., Brumin M., Wolf D., Leibman D., Klap C., Pearlsman M., Sherman A., Arazi T., Gal-On A. 2016. Development of broad virus resistance in non transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. Molecular plant pathology, 17.7: 1140-1153.
- Chen, K., Wang, Y., Zhang, R., Zhang, H., Gao, C. 2019. CRISPR-Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. Annual review of plant biology, 70: 667-697.
- Chilcoat, D., Liu Z., Sander J. 2017. Chapter Two- Use of CRISPR/Cas9 for Crop Improvement in Maize and Soybean. Progress in Molecular Biology and Translational Science. 149: 27- 46.
- Collonnier, C., Epert A., Mara K., Maclot F., Maclot F., Guyon-Debast A., Charlot F., Charles White C., Schaefer D.G., Nogué F. 2016. CRISPR-Cas9-mediated efficient directed mutagenesis and RAD51-dependent and RAD51-independent gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. Plant Biotechnology Journal 15(1):122-131.
- Dangol, S. D., 2021. Knockout Of Invertase Inhibitor Gene By CRISPR/Cas9 Method In Potato. Doktora Tezi. Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. v s. (yayımlanmış).

- Doudna, J.A., Sternberg, S.H., 2018. Yaratılıştaki Çatlak. 2. Baskı. No: 10,11,13,221, İstanbul.
- El-Mounadi, K., Morales-Floriano, M. L., Garcia-Ruiz, H. 2020. Principles, applications, and biosafety of plant genome editing using CRISPR-Cas9. *Frontiers in Plant Science*, 11.
- Fan, D., Liu T.T., Li C.F., Jiao B., Li S., Hou Y.S., Luo K. 2015. Efficient CRISPR/Cas9-mediated Targeted Mutagenesis in *Populus* in the First Generation. *Scientific Reports*, 5:12217.
- Fister, AS, Landherr L, Maximova SN, Guiltinan MJ. 2018. Transient expression of CRISPR-Cas9 machinery targeting TcNPR3 enhances defense response in *Theobroma cacao*. *Frontiers in plant science*, 9: 268.
- Gao, Y., Zhao, Y. 2014. Self-processing of ribozyme- flanked RNAs into guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR-mediated genome editing. *Journal of integrative plant biology*, 56(4), 343-349.
- Gao, L., Xie L., Xiao, Y., Cheng X., Pu, R., Zhang, Z., Liu, Y., Gao, S., Zhang, Z., Qu, H., Zhi, H., Li, K. 2024. CRISPR/CasRx-mediated resistance to Soybean mosaic virus. *The Crop Journal*, 12(4), 1093-1101.
- He, L. vd. 2020. High-Efficiency Reduction of Rice Amylose Content via CRISPR/Cas9-Mediated Base Editing. *ScienceDirect*. Volume 27, Issue 6, Pages 445-448.
- Işıkdere, A. 2017. *crispr-1*.
- <https://bilimdili.com/doga-cevre/tip/crispr-cas9/attachment/crispr-1/> [Erişim Tarihi: 25.04.2021]
- Ito, Y., Nishizawa-Yokoi A., Endo M., Mikami M., Toki S. 2015. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 467(1):76-82.
- Jaganathan, D., Ramasamy, K., Sellamuthu, G., Jayabalan, S., Venkataraman, G. 2018. CRISPR for crop improvement: an update review. *Frontiers in plant science*, 9, 985.
- Jia, H.G., Wang N., 2014. Targeted Genome Editing of Sweet Orange Using Cas9/sgRNA. *Plos One*, 9(4): e93806.
- Jia, H., Zhang Y., Orbović V., Xu J., White F.F., Jones J.B., Wang N. 2016. Genome editing of the disease susceptibility gene *CsLOB1* in citrus confers resistance to citrus canker. *Plant Biotechnology Journal*, DOI: 10.1111/ pbi.12677.
- Ji, X., Si, X., Zhang, Y., Zhang, H., Zhang, F., Gao, C. 2018. Conferring DNA virüs resistance with high specificity in plants using virus-inducible genome editing system. *Genome Biology*, 19(1): 197.
- Jiang, Z. J., Henry, I. M., Lynagh, P. G., Comai, L., Cahoon, E. B., Weeks, D. P. 2016. Significant enhancement of fatty acid composition in seeds of the allohexaploid, *Camelina sativa*, using CRISPR/Cas9 gene editing. *Plant Biotechnology Journal*, 15(5): 648-657.

- Jiang, W. Z., Zhou H. B., Bi H. H., Fromm M., Yang B., Weeks D. P. 2013. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Research*, 41(20): e188.
- Kesebir, A., Kılıç, D., Küfrevioğlu, Ö. 2019. Lipoksigenaz Enziminin Sığır Karaciğerinden Kısmi Saflaştırılması, Karakterizasyonu, Salisilik Asitin ve Bazı Flavonların Enzim Üzerine Etkileri. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 9(3): 1452-1459.
- Khan, I. S. 2020. Optimizing CRISPR/Cas Method To Resolve Bolting In Spinach And Use Of Cytokinin Oxidase Inhibitors For Efficient Plant Transformation Of 14 Species. Yüksek lisans tezi. Graduate School of Applied and Natural Science. vii s. (yayımlanmış).
- Khoo, Y. W., Wang, Q., Liu, S., Zhan, B., Xu, T., Lv, W., Liu, G., Li, S., & Zhang, Z. (2024). Resistance of the CRISPR-Cas13a gene-editing system to potato spindle tuber viroid infection in tomato and *Nicotiana benthamiana*. *Viruses*, 16(9), 1401.
- Shin, S-E., Lim, J-M., Koh, H. G., Kim, E. K., Kang, N. K., Jeon, S., Kwon, S., Shin, W-S., Lee, B., Hwangbo, K., Kim, J., Ye, S. H., Yun, J-Y., Seo, H., Oh, H-M., Kim, K-J., Kim, J-S., Jeong, W-J., Chang, Y. K., Jeong, B-R. 2016. CRISPR/Cas9-induced knockout and knockin mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Scientific Reports* 6:27810.
- Lawrenson, T., Shorinola, O., Stacey, N., Li, C., Østergaard, L., Patron, N., Harwood, W. 2015. Induction of targeted, heritable mutations in barley and *Brassica oleracea* using RNA-guided Cas9 nuclease. *Genome biology*, 16(1), 258.
- Li, Z., Cheng, Q., Gan, Z., Hou, Z. 2020. Multiplex CRISPR/Cas9-mediated knockout of soybean LNK2 advances flowering time. *ScienceDirect*. DOI:[10.1016/j.cj.2020.09.005](https://doi.org/10.1016/j.cj.2020.09.005)
- Li, J. F., Norville, J. E., Aach, J., McCormack, M., Zhang, D., Bush, J., Sheen, J. 2013. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature biotechnology*, 31(8), 688-691.
- Lopez-Obando M., Hoffmann B., Géry C., Guyon Debast A., Téoulé E, Rameau C, Bonhomme S., Nogué F. 2016. Simple and Efficient Targeting of Multiple Genes Through CRISPR-Cas9 in *Physcomitrella patens*. *G3: Genes Genomes Genetics*, 6(11): 3647-3653.
- Ma, C. vd. 2019. Efficient BoPDS Gene Editing in Cabbage by the CRISPR/Cas9 System. *ScienceDirect*, 5 (4): 164-169.
- Ma, X.L., Zhu Q.L., Chen Y.L., Liu Y.G. 2016. CRISPR/Cas9 Platforms for Genome Editing in Plants: Developments and Applications. *Molecular Plant* 9(7):961-74.
- Ma, X., Zhang, Q., Zhu, Q., Liu, W., Chen, Y., Qiu, R., Xie, Y. 2015. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Molecular plant*, 8(8), 1274-1284.

- Makhotenko, A.V., Khromov, A.V., Snigir, E.A., Makarova, S.S., Makarov, V.V., Suprunova, T.P., YOK. Kalinina, Taliansky M.E. 2019. Functional Analysis of Coilin in Virus Resistance and Stress Tolerance of Potato *Solanum tuberosum* using CRISPR-Cas9 Editing. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 484: 88–91.
- Malnoy, M., Viola R., Jung M.H., Koo O.J., Kim S., Kim J.S., Velasco R., Kanchiswamy C.N., 2016. DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 Ribonucleoproteins. *Frontiers in Plant Science*, 7:1904.
- Mao, Y., Zhang, H., Xu, N., Zhang, B., Gou, F., Zhu, J. K. 2013. Application of the CRISPR–Cas system for efficient genome engineering in plants. *Molecular plant*, 6(6), 2008–2011.
- Michno J.M., Wang X.B., Liu J.Q., Curtin S.J., Kono T.J.Y., Stupar R.M. 2015. CRISPR/Cas mutagenesis of soybean and *Medicago truncatula* using a new web-tool and a modified Cas9 enzyme. *GM Crops & FoodBiotechnology in Agriculture and the Food Chain*, 6(4):243–52.
- Moazzam, M. 2020. Changing Leaf Shape In Ornamentals By Genome Editing CRISPR-Cas9 Changing Leaf Shape Of *Petunia*. Yüksek lisans tezi. Graduate School of Applied and Natural Science, vii s. (yayımlanmış).
- Nekrasov V., Staskawicz B., Weigel D., Jones J.D.G., Kamoun S. 2013. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology*, 31(8):691–693.
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., Nureki, O. 2014. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 156(5), 935–949.
- Ntuj, V., Tripathi, J., Tripathi, L. 2020. Robust CRISPR/Cas9 mediated genome editing tool for banana and plantain (*Musa spp.*). *ScienceDirect*. 21, 100128.
- Ortega-Salazar, I., Crum, D., Sbodio, A. O., Sugiyama, Y., & Blanco-Ulate, B. (2023). Double CRISPR knockout of pectin degrading enzymes improves tomato shelf-life while ensuring fruit quality. *Plants People Planet*. 6, 330–340.
- Pan C., Ye L., Qin L., Liu X., He Y.J., Wang J., Chen L., Lua G., 2016. CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations. *Scientific Reports* 6:24765.
- Peng, A., Chen, S., Lei, T., Xu, L., He, Y., Wu, L., Zou, X. 2017. Engineering canker-resistant plants through CRISPR-Cas9-targeted editing of the susceptibility gene *Cs LOB 1* promoter in citrus. *Plant biotechnology journal*, 15(12): 1509–1519.
- Pyott DE, Sheehan E, Molnar A. 2016. Engineering of CRISPR-Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free *Arabidopsis* plants. *Mol. Plant Pathol*, 17:1276–1288.
- Ren C., Liu XJ., Zhang Z., Wang Y., Duan W., Li S.H., Liang Z. 2016. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Scientific Reports* 6:32289.

- Schimpl, S., Fauser, F., Puchta H. 2014. The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for in planta gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in Arabidopsis resulting in heritable progeny. *Plant Journal*, 80(6):1139-1150.
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., Gao, C. 2013. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature biotechnology*, 31(8), 686-688.
- Sharma, P., Pandey, A., Malviya, R., Dey, S., Karmakar, S., Gayen, D. 2023. Genome editing for improving nutritional quality, post-harvest shelf life and stress tolerance of fruits, vegetables, and ornamentals. *Frontiers in Genome Editing*, 10, 1234567.
- Sony, S. K., Kaul, T., Motelb, K. F. A., Thangaraj, A., Bharti, J., Kaul, R., Verma, R., Nehra, M. 2023. CRISPR/Cas9-mediated homology donor repair base editing confers glyphosate resistance to rice (*Oryza sativa L.*). *Frontiers in Plant Science*, 14, 1122926.
- Soyk, S., Müller, N.A., Park, S.J., Schmalenbach, I., Jiang, K., Hayama, R., Zhang, L., Van Eck, J., Jiménez-Gómez, J.M., Lippman, Z.B. 2017. Variation in the flowering gene SELF PRUNING 5G promotes day-neutrality and early yield in tomato. *Nature Genetics*, 49(1): 162–168.
- Stephenson, J., Newman, K. ve Mayhew, S. 2010. Population dynamics and climate change: what are the links?. *Journal of Public Health*, 32(2), 150- 156. *J rice res*, 2, e105.
- Sun Y.W., Zhang X., Wu CY., He YB., Ma Y., Hou H., Guo X., Du W., Zhao Y., Xia L., 2016. Engineering Herbicide-Resistant Rice Plants through CRISPR/Cas9-Mediated Homologous Recombination of Acetolactate Synthase. *Molecular Plant*, 9(4):628-631.
- Sugano S. S., Shirakawa M., Takagi J., Matsuda Y., Shimada T., Hara-Nishimura I., Kohchi T. 2014. CRISPR/Cas9-Mediated Targeted Mutagenesis in the Liverwort *Marchantia polymorpha L.* *Plant and Cell Physiology*, 55(3): 475–481.
- Svitashev S., Schwartz C., Lenderts B., Young J.K., Cigan A.M., 2016. Genome editing in maize directed by CRISPRCas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature Communications*, 7, Article number: 13274.
- Svitashev, S., Young, J. K., Schwartz, C., Gao, H., Falco, S. C., Cigan, A. M. 2015. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. *Plant physiology*, 169(2), 931-945.
- Spencer, K. P., Burger, J. T., Campa, M. 2023. CRISPR-based resistance to grapevine virus A. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1296251.
- Taştan, C., Yaşar, S., Tanyolaç, M. B., Turgut, K., Sireli, U. T., Atak, C., Haliloğlu, K., Benlioğlu, K., Taşkın, K. M., Barlas, N., Yıldız, G. 2020. CRISPR-Of-Things: Applications and Challenges of the Most Popular Gene Editing Tool in the Fields of Health, Agriculture and Environment. *Uluslararası Fen Araştırmalarında Yenilikçi Yaklaşımlar Dergisi*, 4(4): 153-190.

- Tian S, Jiang L, Gao Q, Zhang J, Zong M, Zhang H, Ren Y, Guo S, Gong G, Liu F, Xu Y. 2016. Efficient CRISPR-Cas9-based gene knockout in watermelon. *Plant Cell Reports*, 36 (3): 399–406.
- Tiwari, J. K., Singh, A. K., Behera, T. K. 2023. CRISPR/Cas genome editing in tomato to improve: Advances and applications. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1121209.
- Uslu, Y. Z. 2020. APPLICATIONS OF CRISPR/CAS9 TECHNOLOGY IN SUNFLOWER (*Helianthus annuus* L.). Yüksek lisans tezi. Marmara Üniversitesi Temel ve Uygulamalı Bilimler Lisansüstü Eğitim Enstitüsü. 12-14 s. (yayınlanmıştır).
- Xie, K., Yang, Y. 2013. RNA -guided genome editing in plants using a CRISPR –Cas system. *Molecular plant*, 6(6), 1975 -1983.
- Vu, T. V., Nguyen, N. T., Kim, J., Hong, J. C. Kim, J. 2023. Prime editing: Mechanism insight and recent applications in plants. *Plant Biotechnology Journal*. 74, 123–145.
- Waltz, E. 2016. Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature* 532, 293. DOI: 10.1038/nature.2016.19754.
- Wang S. H., Zhang S. B., Wang W. X., Xiong X. Y., Meng F. R., Cui X., 2015. Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system. *Plant Cell Reports*, 34(9):1473-1476.
- Wang, J., Kuang, H., Zhang, Z., Yang, Y., Yan, L., Zhang, M., Song, S., Guan, Y. 2020. Generation of seed lipooxygenase-free soybean using CRISPR- Cas9. *ScienceDirect*. Volume 8, Issue 3, Pages 432-439.
- Wang Y., Liu X. J., Ren C., Zhong G. Y., Yang L., Li S. H., Liang Z. 2016. Identification of genomic sites for CRISPR/Cas9-based genome editing in the *Vitis vinifera* genome. *BMC Plant Biology*, 16:96.
- Wei, T., Jiang, L., You, X., Ma, P., Xi, Z., Wang, N. N. 2023. Generation of herbicide-resistant soybean by base editing. *Biology*, 12(5), 741.
- Wong, G. K. S., Wang, J., Tao, L., Tan, J., Zhang, J., Passey, D. A., Yu, J. 2002. Compositional gradients in Gramineae genes. *Genome research*, 12(6), 851- 856.
- Yin, K., Han, T., Liu, G., Chen, T., Wang, Y., Yu, A. Y. L., Liu, Y. 2015. A geminivirus-based guide RNA delivery system for CRISPR/Cas9 mediated plant genome editing. *Scientific reports*, 5, 14926.
- Yuyu, C., Aike, Z., Pao, X., Xiaoxia, W., Yongrun, C., Beifang, W., Yue, Z., Liaqat, S., Shihuna, C., Liyong, C., Yingxin, Z. 2020. Effects of GS3 and GL3.1 for Grain Size Editing by CRISPR/Cas9 in Rice. *ScienceDirect*, 27(5): 405-413.
- Zhan, X., Zhang, F., Li, N., Xu, K., Wang, X., Gao, S., Yin, Y., Yuan, W., Chen, W., Ren, Z., Yao, M., & Wang, F. 2024. CRISPR/Cas: An emerging toolbox for engineering virus resistance in plants. *Plants*, 13(23), 3313.
- Zhang H., Zhang J.S., Wei P.L., Zhang B.T., Gou F., Feng Z.Y., Mao Y., Yang L., Zhang H., Xu N., Zhu J.K., 2014. The CRISPR/Cas9 system produces specific and ho-

mozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnology Journal*, 12(6):797-807.

Zhang Y., Liang Z., Zong Y., Wang YP., Liu JX., Chen K.L., Chen, Qiu J.L. and Gao C., 2016b. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nature Communications*, 7 Article number: 12617.

Zhou, H. B., Liu, B., Weeks, D. P., Spalding, M. H., Yang, B. 2014. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Research* 42(17):10903-10914.

Zsögön, A., Čermák T, Naves, E. R., Notini, M. M., Ede, K. H., Wein, S., Freschi, L., Voytas, D. F., Kudla, J., Peres, L. E. P. 2018. De novo domestication of wild tomato using genome editing. *Nature Biotechnology*, 36(12): 1211-1216.



KANSER TANI VE TEDAVİ PERSPEKTİFLERİNDE BİYOBELİRTEÇ OLARAK ENZİMLER

“ ”

Cuma ZEHİROĞLU¹

¹ Dr, Gümüşhane Üniversitesi, Rektörlük, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü, Gümüşhane, czehiroglu@gumushane.edu.tr, ORCID: orcid.org/0000-0002-7185-9977

Dünya çapında en ölümcül halk sağlığı sorunlarından biri haline gelen kanser, Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre kontrolsüz hücresel çoğalma ve konakçı düzenleyici mekanizmalardan kaçınma ile karakterize edilen geniş bir hastalık grubudur (İbrahim, Peeters, Van Camp, & Op de Beeck, 2023; Zafar vd., 2025). Kanser, 2022'de dünya çapında 20 milyondan fazla vaka ile önemli bir halk sağlığı sorununu temsil etmekte ve 2050 yılına kadar beklenen vaka sayısının 35 milyona yükselmesi beklenmektedir (Bray vd., 2024).

Kanser Gelişiminin Moleküler Mekanizmaları

Çok genli (multigenic) ve çok faktörlü (multifactorial) bir hastalık olan kanser, genomdaki moleküler değişikliklerin birikmesi sonucu hücrelerin normal fizyolojik özelliklerinde meydana gelen bozulmalarla ortaya çıkmaktadır (Patel, 2020; Wu, Zhu, Thompson, & Hannun, 2018). Proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar, hücre proliferasyonunun artmasına ve programlı hücre ölümü (apoptoz) mekanizmasının baskılanmasına yol açmaktadır. Genetik temelli etkenlerin dışında, çeşitli çevresel ve yaşam tarzı faktörleri de kanser gelişiminde rol oynamaktadır. Bu faktörler arasında epigenetik mekanizmalardaki değişiklikler; iyonlaştırıcı radyasyon maruziyeti; kurşun, arsenik ve bazı mikotoksinler gibi kimyasal karsinojenler; insan papilloma virüsü, hepatit C virüsü ve insan T-hücreli lenfotropik virüs gibi enfeksiyöz ajanlar; yaşlanma süreci; ayrıca alkol tüketimi, sigara kullanımı, obezite ve dengesiz beslenme gibi yaşam tarzına bağlı unsurlar yer almaktadır (Wu vd., 2018).

Kanserli lezyonlar hemen hemen her vücut dokusunda veya organında başlayabilir ve metastaz yoluyla diğer bölgelere yayılabilir (İbrahim vd., 2023). Kanserlin metastatik süreci, tümör hücrelerinin primer odaktan ayrılıp kan veya lenfatik sistem aracılığıyla organizmanın diğer bölgelerine taşınması sonucu meydana gelmektedir (Rao Bommi vd., 2023). Ortalama hücre büyümesi, tipik bir hücre döngüsünde hücreler tarafından kendilerini çoğaltmak için gerçekleştirilen mitoz sürecinden kaynaklanır. Sonuçta, apoptoz adı verilen planlı hücre ölümü süreci, kontrollü büyümeyi sürdürmek için hücrelerin ölümüyle sonuçlanır. Bu mekanizma bozulduğunda, hücreler dengesiz hale gelir ve kontrolden çıkarak etraflarındaki dokuları istila eden kanserli tümörler oluşturur. Kanser hücresi, lenfatik veya dolaşım sistemleri yoluyla çeşitli vücut organlarına gidebilir ve oradan yayılabilir (Yang vd., 2020).

Kontrolsüz şekilde çoğalan hücreler, malign tümör hücreleri olarak tanımlanır ve kansere yol açar. İleri evreye ulaşmış metastatik kanserler, kanser hastalarında mortalitenin temel nedeni olarak kabul edilmektedir. Tümörler, benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) olarak sınıflandırılmaktadır (Patel, 2020). Benign tümörler, primer bölgede lokalize kalan, düşük proliferasyon hızına sahip hücre kitleleridir ve vücudun uzak bölgelerine invazyon yapmazlar. Bu tümörler genellikle yavaş proliferasyon gösterir ve çoğu

durumda ciddi klinik problemlere neden olmazlar. Proliferasyon yeteneğine sahip olup metastaz yapabilen türünün kemik, karaciğer, akciğer ve beyin gibi yaygın ikincil bölgelere metastaz yapabildiğini ortaya koymuştur (Rao Bommi vd., 2023).

Kanserler, onkogenik dönüşüm gösteren hücre veya doku tipine bağlı olarak sınıflandırılmaktadır. Temel kanser türleri arasında en yaygın form olan karsinomun yanı sıra sarkom, lenfoma, lösemi ile beyin ve omurilik kaynaklı tümörler bulunmaktadır. İç organları, kanalları ve derinin dış yüzeyini oluşturan epitel hücrelerinin malign transformasyonu karsinom olarak tanımlanmaktadır. Karsinom; karaciğer, meme, rahim, prostat, akciğer, kolon ve pankreas gibi organlarda gelişebilmektedir (Sukumar, Gast, Quiroga, Lustberg, & Williams, 2021).

Karsinomlar, köken aldıkları hücre tipine göre farklı alt sınıflara ayrılmaktadır. Bu alt tipler arasında adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom, duktal karsinom ve bazal hücreli karsinom yer almaktadır (Sukumar vd., 2021). Öte yandan, sarkomlar kas, kemik, kıkırdak ve kan damarları gibi destekleyici ya da bağ dokularından gelişen malign tümörlerdir (Mouliere vd., 2011). Lösemiler ise, genellikle “kan kanseri” olarak tanımlanan ve beyaz kan hücrelerinin üretiminden sorumlu dokulardan, özellikle de kemik iliğinden kaynaklanan hematolojik malignitelerdir. Kemik iliği, normal işlevlerini yerine getiremeyen ve kanda biriken olgunlaşmamış beyaz kan hücrelerini aşırı miktarda üretir (W. Zhang, Dai, Liu, & Yang, 2018).

Lenfoma ise, lenfatik sistemin yanı sıra dalak ve lenf düğümlerini etkileyen malign bir hastalık grubunu ifade etmektedir. Lenfoma, bağışıklık sistemi hücrelerinden olan lenfositlerin kontrolsüz şekilde çoğalmaya başlaması ve olgunlaşmaması sonucu ortaya çıkar; bu durum onların immünolojik işlevlerini yerine getirememelerine yol açar. Miyelom, kemik iliğinde bulunan ve antikor sentezinden sorumlu plazma hücrelerinin malign dönüşümü sonucu gelişen bir kanser türüdür. Merkezi sinir sisteminde yer alan beyin ve omurilik hücrelerinden gelişen malign oluşumlar, merkezi sinir sistemi tümörleri olarak sınıflandırılmaktadır. Bu tümörler arasında, glial hücre kökenli neoplazmlar olan gliomlar, en yaygın görülen primer beyin tümörü grubunu oluşturmaktadır (Rao Bommi vd., 2023).

Başlıca Kanser Türleri

Prostat Kanseri

Prostat kanseri, erkeklerde en sık rastlanan habis tümörlerden biri olup, dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin başlıca nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Prostat kanserinin erkeklerde yaklaşık 1.414.000 yeni vaka ve 375.304 ölüm ile beşinci en sık görülen malignite olduğu rapor edilmiştir (L. Wang vd., 2022).

Kanser metastazı, malign hücrelerin primer tümör bölgesinden ayrılarak kan veya lenfatik sistem aracılığıyla uzak dokulara taşınması ve burada sekonder tümör odakları oluşturmasıyla karakterize, çok aşamalı ve karmaşık bir biyolojik süreçtir. Bu süreçte anjiyogenez, epitel-mezenkimal geçiş, hipoksi ve tümör mikroçevresindeki moleküler faktörler kritik rol oynamaktadır.

Metastaz süreci, genel olarak invazyon, intravazasyon, dolaşımda hayatta kalma, ekstrasvazasyon ve uzak dokuda kolonizasyon aşamalarını içerir (Nie vd., 2021; Singh vd., 2022). Süreç primer tümörde başlar; kanser hücreleri ekstrasellüler matriksi yıkan proteazları aktive ederek çevre dokulara invaze olur. Epitel-mezenkimal geçiş geçiren hücreler, artmış motilite ve invazivlik kazanarak kan veya lenf damarlarına girer ve dolaşım sisteminde taşınır. Hedef organa ulaştıklarında, damar endoteline tutunup ekstrasvazasyon gerçekleştirirler. Uzak dokuda yerleştikten sonra, mezenkimal-epitelyal geçiş süreci ile yeni mikroçevreye uyum sağlar ve kolonizasyon başlar (Castaneda, den Hollander, Kuburich, Rosen, & Mani, 2022; Singh vd., 2022).

Prostat kanseri, dünya genelinde erkeklerde en sık görülen malign hastalıklardan biri olmayı sürdürmektedir (Bray vd., 2024). Hastalık çoğu zaman erken evrelerinde belirti göstermediğinden, bu durum erken tanı konulmasını ve uygun tedavi stratejilerinin geliştirilmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, tedavi gerektiren prostat kanseri olgularının aktif izlem altında takip edilebilecek düşük riskli vakalardan doğru biçimde ayrılması, hastalığın yönetimi açısından büyük önem taşımaktadır (Litwin & Tan, 2017; Tosoian vd., 2020).

Osteosarkom kanseri

Osteosarkom, çoğunlukla çocuklar ve genç ergenlerde görülen tüm kemik malignitelerinin yaklaşık %20–40'ını oluşturan en yaygın primer kemik kanseri türüdür (Beird vd., 2022; Valery, Laversanne, & Bray, 2015). Çocukluk ile ergenlik döneminde lenfomalar ve beyin tümörlerinden sonra en sık görülen üçüncü kanser türü olarak tanımlanmaktadır (Luetke, Meyers, Lewis, & Juergens, 2014). Osteosarkom hücreleri mezenkimal kökenli olup, osteoid madde ve/veya olgunlaşmamış kemik dokusu üretmi ile karakterizedir (Czarnecka vd., 2020; Ritter & Bielack, 2010; Simpson & Brown, 2018). Osteosarkom genellikle uzun kemiklerin metafiz bölgelerinde ortaya çıkar; özellikle distal femur, proksimal tibia, proksimal femur ve proksimal humerus en sık etkilenen anatomik bölgelerdir (Isakoff, Bielack, Meltzer, & Gorlick, 2015). Lokalize osteosarkom olgularında beş yıllık genel sağkalım oranı ortalama %80 civarındayken, metastatik kemik karsinomu bulunan hastalarda bu oran belirgin biçimde düşmektedir (Rojas, Hubbard, Diessner, Ribeiro, & Spector, 2021).

Epidemiyolojik veriler, olguların yaklaşık %60'ının 10–20 yaş aralığındaki bireylerde görüldüğünü ve osteosarkomun bu yaş grubunda kansere bağlı

ölümlerin ikinci önde gelen nedeni olduğunu göstermektedir (Beird vd., 2022). Yüksek metastaz potansiyeline sahip agresif bir tümör osteosarkom insidansı, yılda milyon kişi başına 3–5 vaka olarak bildirilmektedir (Bacci vd., 2008; Zhou vd., 2020). Nadir görülmesine karşın, hastalık yüksek morbidite ve mortalite oranları ile seyretmektedir.

Breast Cancer

Dünya genelinde 2020 yılında 2,3 milyondan fazla yeni meme kanseri vakası ve yaklaşık 685.000 ölüm bildirilmiştir (Arnold vd., 2022). Nüfus artışı ve yaşlanmaya bağlı olarak, 2040 yılına kadar meme kanseri insidansının %40'tan fazla artarak yılda yaklaşık 3 milyon vakaya, ölümlerin ise %50'den fazla artışla 1 milyona ulaşması öngörülmektedir (Arnold vd., 2022). Tüm kanser vakalarının yaklaşık %25'ini ve kanser ölümlerinin %15'ini oluşturan meme kanseri, dünya genelinde ciddi bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Kadınlarda kansere bağlı ölümlerin en yaygın nedeni olan bu hastalık, yaşam boyu her sekiz kadından birini ve her 1000 erkekten birini etkilemektedir (Ali vd., 2020; Bray vd., 2024; Gucalp vd., 2019; Kern & Schroeder, 2014; Nagaraju vd., 2012; Tabassum, Zaki, Afzal, & Arjmand, 2014; Torre vd., 2015).

Meme karsinom hücrelerinde eksprese edilen hormon reseptörlerinin tipine bağlı olarak, hastalık dört ana moleküler alt tipe ayrılmaktadır:

- Luminal A (ER/PR pozitif, HER2 negatif): Tüm meme kanseri vakalarının yarısından fazlasını oluşturan bu alt tipte, tümör hücreleri östrojen ve/veya progesteron reseptörleri taşır.
- Luminal B (ER/HER2 pozitif, PR negatif): Hormon tedavisi ve kemoterapiye yanıt verebilen bir alt tiptir.
- HER2 pozitif alt tip (ER/PR negatif, HER2 pozitif): HER2 hedefli tedavilere duyarlıdır ve agresif seyir gösterebilir.

Üçlü negatif meme kanseri – TNBC (ER/PR/HER2 negatif): Östrojen, progesteron ve HER2 reseptörlerinin eksprese edilmemesi nedeniyle hedefe yönelik tedavi seçeneklerinin sınırlı olduğu, bu yönüyle en zorlu klinik alt tip olarak kabul edilmektedir (Łukasiewicz vd., 2021).

Yumurtalık Kanserleri

Yumurtalık kanseri, tüm jinekolojik kanserler arasında en yüksek mortalite ve etkili tanı araçlarının yetersizliği nedeniyle halen önemli bir küresel sağlık sorunu olmaya devam etmektedir (Bowtell vd., 2015; Cannistra, 2004; Sung vd., 2021). Yumurtalık kanserleri, histopatolojik özellikleri temel alınarak yüksek dereceli seröz karsinom (HGSC), düşük dereceli seröz karsinom (LGSC), endometrioid karsinom (EC), berrak hücreli karsinom (CCC) ve müsinöz karsinom (MC) olmak üzere beş ana alt tipe ayrılmaktadır. Bu alt tipler arasında HGSC, tüm olguların yaklaşık %70'ini oluşturmaktadır.

olup en agresif histolojik alt tip olarak kabul edilmektedir (Bhavsar vd., 2024). Hasta prognozunun iyileştirilmesi ve optimal tedavi stratejilerinin belirlenmesi açısından kritik öneme sahip olan yumurtalık kanseri erken evreye özgü belirti ve etkili tarama yöntemlerinin bulunmaması nedeniyle, hastalar genellikle hastalığın ileri evrelerinde tanı almaktadır (Rampes, Bolina, & Choy, 2022). Tıbbi görüntüleme ve tümör görselleştirme, yumurtalık kanserinin tanılma süreçlerinde temel bileşenler olup, görüntülemeye dayalı doğru değerlendirme hem tanı hem de evreleme aşamalarında belirleyici bir rol oynamaktadır (Saida vd., 2022). Bu amaçla manyetik rezonans görüntüleme (MRG), ultrasonografi (USG), bilgisayarlı tomografi (BT) ve pozitron emisyon tomografisi (PET) yaygın olarak kullanılmaktadır (Delgado Bolton vd., 2021).

Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, hem erkeklerde hem de kadınlarda en sık teşhis edilen ikinci kanser türü olmasına rağmen, kansere bağlı ölümler arasında ilk sırada yer almaktadır. 2020 yılında, meme, kolorektal ve prostat kanserlerinin toplamından daha fazla ölüme neden olmuştur (Brahmer vd., 2015; Bray vd., 2018; Reck vd., 2016; Roointan, Sharifi-Rad, Badrzadeh, & Sharifi-Rad, 2016; Siegel, Miller, Wagle, & Jemal, 2023; Werner vd., 2013; Ye vd., 2015). Küresel ölçekte, akciğer kanseri insidansının 2035 yılına kadar 3 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (Bray vd., 2018; Ferlay vd., 2019; Keikha & Esfahani, 2018). Genellikle ileri evrede teşhis edilen bu hastalıkta, kanser hücreleri hızla lenf veya kan dolaşımı yoluyla karaciğer ve beyin gibi diğer organlara yayılır. Bu durum, akciğer kanserinin yüksek mortalite oranlarıyla ilişkilendirilmesine neden olmaktadır (Ramalingam & Belani, 2008).

Kanserin Belirlenmesi ve Tanı Yöntemleri

Kanser insidansı ve mortalite oranları her yıl artış göstermektedir (Siegel vd., 2023). Kanser, küresel ölçekte özellikle 70 yaşın altındaki bireylerde ölüm oranlarına en çok katkıda bulunan hastalıklardan biridir (Thun, DeLancey, Center, Jemal, & Ward, 2010). Erken ve doğru kanser teşhisi, hastanın sağkalımını iyileştirmek ve yaşam kalitesini artırmak için kritik öneme sahiptir (Bognár vd., 2024; Chambers, Groom, & MacDonald, 2002). Erken evrelerde (evre 1 ve 2) daha fazla tedavi seçeneği bulunurken, ilerlemiş evrelerde (evre 3 ve 4) iyileştirici alternatiflerin azlığı ve düşük tedavi yanıtı nedeniyle sağkalım oranları önemli ölçüde düşmektedir (Bognár vd., 2024; P. Jiang vd., 2022).

Dolayısıyla, kanserin erken teşhisi ve tedavisi, malign tümörlerin ilerlemesini engelleyen ve mortalite oranlarını azaltan en etkili stratejilerden biridir (Crosby vd., 2022; B. Zhang, Shi, & Wang, 2023).

Nitekim, düzenli meme kanseri taramalarının mortalite oranlarını yaklaşık %40 (Mukama vd., 2020), akciğer kanseri taramasının %20 (National

Lung Screening Trial Research Team vd., 2011), özofagus yassı hücreli karsinom taramasının ise %30–60 oranında azalttığı bildirilmiştir (M. Liu vd., 2022). Prostat kanserinde, Prostat Spesifik Antijen (PSA) ile yapılan erken tarama mortalite oranında %21’lik bir azalma sağlamaktadır (Kern & Schroeder, 2014).

Ancak kanser tedavisindeki en büyük engellerden biri, genellikle erken dönem belirtilerin belirgin olmaması nedeniyle geç tanı konulmasıdır (Frick vd., 2023; Lawrence, Watters, Davies, Pantel, & Lu, 2023). Bu nedenle, erken kanser teşhisi için etkili ve hassas yöntemlerin geliştirilmesine acil ihtiyaç vardır (Crosby vd., 2022). Erken kanser teşhisinin odak noktası, tedaviyi hızlı ve etkili bir şekilde kolaylaştırmak için semptomatik bireyler arasındaki hastalığı en erken aşamalarında (tercihen başlangıcında) tanımlamaktır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), erken teşhisin bazı faydalarının şunları içerebileceğini belirtmektedir: 1) tanı anında hastalığın evresinde bir azalma ve 2) tedavi gecikmesi olmaksızın, tanıdan 3 ila 5 yıl sonra belirgin olan mortalitede bir azalma (Aguiar-Ibáñez, Mbous, Sharma, & Chawla, 2025). Nanoteknoloji tabanlı yeni yaklaşımlar, kanserin erken evrede tespit edilmesini ve daha doğru bir ilk tanının konulmasını sağlayabilecek önemli araçlar sunmaktadır (Crosby vd., 2022).

Kanserin tespitine yönelik yöntemler, vücutta kanserli hücrelerin veya tümörlerin belirlenmesini sağlayan çeşitli yaklaşımları kapsamaktadır. Bu yöntemler genel olarak tarama testleri, görüntüleme testleri, moleküler yöntemler ve biyopsiler olarak sınıflandırılabilir. Moleküler tanı teknikleri arasında polimeraz zincir reaksiyonu, enzim bağlantılı immünosorbent analizi, radyoimmünassay, immünohistokimya ve akış sitometrisi gibi yöntemler yer almaktadır (Cui, Zhou, & Zhou, 2020; Khanmohammadi vd., 2020; Li vd., 2022). Tarama testleri, semptom göstermeyen bireylerde uygulanarak kanserin klinik belirtiler ortaya çıkmadan önce erken evrede tespit edilmesine olanak tanımaktadır. Bununla birlikte, görüntüleme temelli testler; x-ışını, bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntüleme, ultrasonografi ve pozitron emisyon tomografisi gibi ileri teknolojilerden yararlanarak iç organların ve dokuların ayrıntılı olarak incelenmesini sağlamaktadır. Bu sayede anormal büyümelerin tespit edilmesi mümkün olmaktadır. Biyopsi yönteminde ise şüpheli tümörden veya anormal bölgeden küçük bir doku ya da hücre örneği alınarak mikroskopik inceleme yapılmakta ve kesin kanser tanısı konulmaktadır. Ancak, bu yöntemler kanserin yalnızca belirli evrelerinde tespitine olanak sağlamak ve örnekleme ile malignite doğrulaması gerektirdiğinden süreç zaman açısından kısıtlayıcı olabilmektedir (Wahab vd., 2023). Dolayısıyla, bu yaklaşımların erken ve kesin kanser tanısında belirli sınırlılıklar taşıdığı bildirilmektedir. Bu tür teknikler öncelikle tümörlerin fiziksel özelliklerine dayanır, bu da küçük ve gizli tümörlerin doğru bir şekilde bulunmasını ve özelliklerinin belirlenmesini

zorlaştırır. Bununla birlikte, biyopsi tümörlerin karakterizasyonunda halen önemli bir yöntem olarak kullanılmakla birlikte; yüksek maliyet, kanama riski, operatöre bağımlılık, komplikasyon olasılığı ve yanlış negatif sonuç verme eğilimi gibi çeşitli dezavantajlara sahiptir (Haick, Broza, Mochalski, Ruzsanyi, & Amann, 2014; Kwong vd., 2021; Van Huijgevoort, Del Chiaro, Wolfgang, Van Hooft, & Besselink, 2019).

Kanserde Biyobelirteçlerin Rolü

Biyobelirteçler, dokular veya vücut sıvılarında saptanabilen biyolojik moleküller olup, bir hastalığın ya da fizyolojik sürecin normalden sapma gösterip göstermediğine dair önemli göstergeler sunmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü, biyobelirteci organizmada ölçülebilen biyolojik bir bileşen, yapı ya da aktivite olarak tanımlamaktadır (Kok & Yu, 2020). Benzer şekilde, Ulusal Kanser Enstitüsü biyobelirteçleri; kan, doku veya diğer vücut sıvılarında bulunan ve patolojik ya da fizyolojik bir durumu, tıbbi bir koşulu veya hastalığı (örneğin kanseri) yansıtan biyolojik kaynaklı moleküller olarak tanımlamaktadır (Bray vd., 2018).

Reseptör ve enzim gibi proteinler, nükleik asitler (DNA ve RNA), gen ekspresyonundaki değişiklikler, peptitler, antikorlar, proteomik ve metabolomik profiller ile hücresel düzeydeki mutasyonlar, potansiyel biyobelirteç grupları arasında yer almaktadır. Kanser biyobelirteçleri ise, tümör hücreleri tarafından salgılanan veya tümör varlığına karşı organizmanın yanıtı sonucu ortaya çıkan kimyasal bileşiklerdir ve özellikle kanser araştırmalarında tümörlerin tespiti ve takibinde önemli rol oynamaktadır (Goossens, Nakagawa, Sun, & Hoshida, 2015). Kandaki veya vücut sıvılarındaki varlıkları sayesinde kolaylıkla değerlendirilebilirken; doku kaynaklı olduklarında ise doku biyopsisi veya özel görüntüleme yöntemleri ile değerlendirilmesi gerekmektedir. Biyobelirteçlerin klinik uygulamalarda da geniş kullanım potansiyeli bulunmaktadır (Hofman, 2019). Bu kapsamda; hastalık olasılığının belirlenmesi, gizli primer kanserlerin incelenmesi, malign ve benign bulguların ayırt edilmesi, kanserli bireylerin prognozunun öngörülmesi, hastalığın ilerlemesi veya nüksünün izlenerek tedaviye yanıtın değerlendirilmesi gibi çeşitli klinik bağlamlarda kullanılabilmektedir (Bodaghi, Fattahi, & Ramazani, 2023).

Kanserde Enzimlerin Biyobelirteç Olarak Kullanımı

Enzimler, erken kanser teşhisi için önemli biyobelirteçler olarak kabul edilmekte ve yaygın şekilde tümör göstergeleri olarak kullanılmaktadır (Gu vd., 2016; Gu, Zhu, & Peng, 2019; Hu vd., 2019; Lee, In, Mehta, Kishore, & Lee, 2018; Sakabe vd., 2013). Çeşitli kanser türlerinde, in vivo koşullarda gerçek zamanlı olarak izlenebilen belirli enzimlerin aşırı ekspresyonu, erken tanı için potansiyel hedefler sunmaktadır (Baig vd., 2019; Mooney, Abdul Majid, Batalla, Annala, & Aboody, 2017). Proteinlerin ve enzimlerin organizmalarda

temel biyomoleküller olduğu, bazı enzimlerin ise doğrudan protein yapısında bulunduğu bilinmektedir. Enzimler, biyokimyasal reaksiyonların katalizlenmesi, hücre büyümesi ve metabolizmanın düzenlenmesi gibi yaşamsal süreçlerde kilit rol oynamaktadır (Hanigan & Ricketts, 1993; Nakamura, Nakamura-Takahashi, Kasahara, Yamaguchi, & Azuma, 2020; Shim vd., 2003; H. Zhang vd., 2019). Normal fizyolojik koşullarda enzimlerin aktivite ve ekspresyon düzeyleri dengeli seyrederken, organ veya dokularda patolojik durumlar geliştiğinde bazı enzimlerin aktiviteleri anormal şekilde artış göstermektedir (Asanuma vd., 2015; Nunes, Barros, Costa, Moreira, & Correia, 2019). Son yıllarda yapılan çok sayıda çalışma, bu tür anormal enzim ekspresyonlarının sıklıkla kanser gelişimi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Copeland, Harpel, & Tummino, 2007; H.-W. Liu vd., 2018).

Kanser Tanı ve Tedavisinde Kullanılan Seçilmiş Enzimler

Gama-glutamil transpeptidaz (GGT)

Gamma-glutamil transpeptidaz (GGT), glutatyondan bir başka peptit ya da amino aside gamma-glutamil grubunun aktarımını katalize ederek amino asit metabolizmasında rol oynayan bir enzimdir. GGT, insan vücudundaki birçok dokuda bulunmakla birlikte, en yüksek düzeyde böbreklerde, ardından pankreas ve karaciğerde ifade edilmektedir. Embriyonik gelişim döneminde ise GGT'nin en yoğun bulunduğu organ karaciğerdir. Bu enzim, hücrel redoks dengesinin sürdürülmesinde kritik öneme sahip olup, pek çok metabolik süreçte temel bir görev üstlenmektedir (Alevizos, Spengos, Vassilopoulos, & Stefanis, 1976; Hanigan & Ricketts, 1993; Okada, Suzuki, Wada, Kumagai, & Fukuyama, 2006; West vd., 2013).

GGT düzeyleri, birçok hepatobilier hastalıkta artış göstermekte ve bu nedenle tanı ile tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde yararlı bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Brancaccio vd., 2019; Goldberg & Martin, 1975; Idéo, Morganti, & Dioguardi, 1972). Glutasyon metabolizması için gerekli olan GGT, bu antioksidan sistem aracılığıyla hücreleri oksidatif hasardan korur (Das, Dey, Devireddy, & Gartia, 2023). Ayrıca, over, karaciğer ve serviks gibi çeşitli malign tümörlerde aşırı eksprese edildiği bildirilmiş olup, bu özelliği ile önemli bir tümör ilişkili biyobelirteç olarak değerlendirilmektedir (Grimm vd., 2013; Polterauer vd., 2011; Staudigl vd., 2015).

Yüksek serum GGT düzeyleri, meme, akciğer, prostat ve gastrointestinal sistem kanserleri için artan risk ile ilişkilendirilmiştir; bu ilişkinin glutasyon metabolizmasının koruyucu etkisinden veya kanser patogenezinin dahil henüz tam olarak açıklanamamış hücrel mekanizmalardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Ramandi vd., 2025). GGT özellikle sindirim sistemi kanserlerinde tanısallık, prognostik ve prediktif bir biyobelirteç olarak test

edilmiştir (Kazemi-Shirazi vd., 2007; Neuman, Malnick, & Chertin, 2020). Bu kanserler ya en yaygın görülenler (örneğin kolon, mide ve karaciğer) ya da sinsi seyirli olanlar (örneğin özofagus ve pankreas) arasındadır (Ramandi vd., 2025). Bu nedenle, GGT düzeyleri bu kanserlerin erken evrede tespit edilmesine yönelik önemli ipuçları sunabilir. Yapılan araştırmalar, yüksek GGT düzeylerinin tüm nedenlere bağlı mortaliteyle, özellikle de kansere bağlı ölüm oranlarıyla ilişkili olduğunu göstermektedir (Long, Zeng, Shi, Tian, & Chen, 2014). Ayrıca, serum GGT'nin meme kanseri (Sun vd., 2020), hepatoselüler karsinom (P. Sun, Li, Chang, & Tian, 2019), pankreas kanseri (Xiao vd., 2019), nazofarenks karsinomu (Wen vd., 2017) ve over kanseri (Grimm vd., 2013) gibi çeşitli maligniteler için bağımsız bir prognostik belirteç olabileceği yönünde giderek artan bir görüş birliği bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, serum GGT düzeyleri ile ürolojik malignitelerdeki klinik sonuçlar arasında da anlamlı ilişkiler ortaya koymuştur.

Alkalen fosfataz (ALP)

Alkalen fosfatazlar, doğada geniş dağılım gösteren ve prokaryotlardan ökaryotlara kadar bulunan, birkaç yüksek bitki türü dışında, yaygın membrana bağlı glikoproteinlerdir (Jassas vd., 2023).

İnsan vücudunda karaciğer, kemik, plasenta ve bağırsaklar gibi çeşitli dokularda bulunan kritik işlevler üstlenen enzim gruplarından biridir (Haarhaus vd., 2022). Nükleotidleri nükleozitlere dönüştürmek de dâhil olmak üzere fosfat gruplarının yüksek pH düzeyinde hidrolizini katalizleyerek inorganik fosfat oluşumunu sağlayan ALP, kemik oluşumu ve karaciğer fonksiyonu gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli rol oynamaktadır (C. Jiang, Hu, Xia, & Guo, 2023; Zaher vd., 2020). Ayrıca, karmaşık molekülleri daha basit ve vücut tarafından emilebilecek formlara parçalayarak sindirime katkı sağlamaktadır (Green & Sambrook, 2020).

Tıbbi tanı uygulamalarında serum alkalen fosfataz (ALP) düzeylerinin çeşitli hastalıkların belirlenmesinde önemli bir biyokimyasal gösterge olduğu ortaya konmuştur (Brichacek & Brown, 2019). İlaç kaynaklı karaciğer hasarı ve karaciğer kanseri önemli klinik sorunlar arasında yer almakta olup, hepatositlerde ALP ve diğer enzimlerin düzeylerindeki artış invaziv tümör hücrelerinin neden olduğu karaciğer hasarını işaret edebilir (Ashby vd., 2021; Ma vd., 2021). Bu durum, birçok araştırmada doğrulanmış olup, ALP düzeylerinin klinisyenler için anlamlı bir tanısal parametre olarak kullanılabileceğini göstermektedir (C. Jiang vd., 2023; Shu, Tan, Li, Huang, & Yang, 2022; Titau vd., 2023). Bununla birlikte, yalnızca karaciğer metastazı değil, pankreas ve akciğer kanseri olan hastalarda da artmış ALP düzeyleri rapor edilmiştir. (Martínez vd., 2018; Xiao vd., 2019).

Bu nedenle, ALP ekspresyonunun gerçek zamanlı izlenmesi, karaciğer hastalıklarının erken tanısı açısından büyük klinik önem taşımaktadır. Son

yıllarda, ALP aktivitesinin tespitine yönelik çeşitli yöntemler geliştirilmiş olup, bunlar arasında floresan yöntemi, üstün özellikleri nedeniyle önemli bir ilgi görmüştür (Gomez vd., 1995; Huang vd., 2020; Shen vd., 2016; H. Sun vd., 2008; K. Wang vd., 2021).

Sonuç

Kanser, dünya genelinde artan insidansı ve yüksek mortalite oranlarıyla en ciddi halk sağlığı sorunlarından biri olmayı sürdürmektedir. Erken ve doğru tanı, hastaların yaşam süresi ve kalitesi üzerinde belirleyici bir rol oynamaktadır. Bu bağlamda, enzimler erken evre kanserlerin saptanmasında önemli biyobelirteçler olarak öne çıkmakta ve tanı, prognoz ile tedavi süreçlerinde değerli bilgiler sunmaktadır. Özellikle gamma-glutamil transferaz (GGT) ve alkalen fosfataz (ALP) gibi enzimlerin ekspresyon düzeyleri, tümör gelişimi ve ilerlemesiyle yakından ilişkilidir. Enzim temelli biyobelirteçlerin klinik tanı sistemlerine entegrasyonu, bireyselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesini destekleyebilir ve kanserle ilişkili mortalitenin azaltılmasına katkı sağlayabilir. Gelecekteki araştırmaların, bu enzimlerin moleküler mekanizmalarının ve tümör hücreleriyle etkileşimlerinin daha derinlemesine incelenmesine odaklanması, kanserin erken teşhisi ve etkili tedavisi açısından büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Aguir-Ibáñez, R., Mbous, Y. P. V., Sharma, S., & Chawla, E. (2025). Assessing the clinical, humanistic, and economic impact of early cancer diagnosis: A systematic literature review. *Frontiers in Oncology*, 15, 1546447. <https://doi.org/10.3389/fonc.2025.1546447>
- Alevizos, B., Spengos, M., Vassilopoulos, D., & Stefanis, C. (1976). γ -Glutamyl transpeptidase. *Journal of the Neurological Sciences*, 28(2), 225-231. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(76\)90105-2](https://doi.org/10.1016/0022-510X(76)90105-2)
- Ali, O. M., Bekhit, A. A., Khattab, S. N., Helmy, M. W., Abdel-Ghany, Y. S., Teleb, M., & Elzoghby, A. O. (2020). Synthesis of lactoferrin mesoporous silica nanoparticles for pemetrexed/ellagic acid synergistic breast cancer therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 188, 110824. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110824>
- Arnold, M., Morgan, E., Rumgay, H., Mafra, A., Singh, D., Laversanne, M., ... Soerjomataram, I. (2022). Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 66, 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2022.08.010>
- Asanuma, D., Sakabe, M., Kamiya, M., Yamamoto, K., Hiratake, J., Ogawa, M., ... Ura-no, Y. (2015). Sensitive β -galactosidase-targeting fluorescence probe for visualizing small peritoneal metastatic tumours in vivo. *Nature Communications*, 6(1), 6463. <https://doi.org/10.1038/ncomms7463>
- Ashby, K., Zhuang, W., González-Jimenez, A., Alvarez-Alvarez, I., Lucena, M. I., Andrade, R. J., ... Chen, M. (2021). Elevated bilirubin, alkaline phosphatase at onset, and drug metabolism are associated with prolonged recovery from DILI. *Journal of Hepatology*, 75(2), 333-341. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.03.021>
- Bacci, G., Rocca, M., Salone, M., Balladelli, A., Ferrari, S., Palmerini, E., ... Briccoli, A. (2008). High grade osteosarcoma of the extremities with lung metastases at presentation: Treatment with neoadjuvant chemotherapy and simultaneous resection of primary and metastatic lesions. *Journal of Surgical Oncology*, 98(6), 415-420. <https://doi.org/10.1002/jso.21140>
- Baig, M. H., Adil, M., Khan, R., Dhadi, S., Ahmad, K., Rabbani, G., ... Choi, I. (2019). Enzyme targeting strategies for prevention and treatment of cancer: Implications for cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology*, 56, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.12.003>
- Beird, H. C., Bielack, S. S., Flanagan, A. M., Gill, J., Heymann, D., Janeway, K. A., ... Gorlick, R. (2022). Osteosarcoma. *Nature Reviews. Disease Primers*, 8(1), 77. <https://doi.org/10.1038/s41572-022-00409-y>
- Bhavsar, D., Raguraman, R., Kim, D., Ren, X., Munshi, A., Moore, K., ... Ramesh, R. (2024). Exosomes in diagnostic and therapeutic applications of ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research*, 17(1), 113. <https://doi.org/10.1186/s13048-024-01417-0>

- Bodaghi, A., Fattahi, N., & Ramazani, A. (2023). Biomarkers: Promising and valuable tools towards diagnosis, prognosis and treatment of Covid-19 and other diseases. *Heliyon*, 9(2), e13323. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13323>
- Bognár, S. A., Teutsch, B., Bunduc, S., Veres, D. S., Szabó, B., Fogarasi, B., ... Hegyi, P. (2024). Psychological intervention improves quality of life in patients with early-stage cancer: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Scientific Reports*, 14(1), 13233. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63431-y>
- Bowtell, D. D., Böhm, S., Ahmed, A. A., Aspuria, P.-J., Bast, R. C., Beral, V., ... Balkwill, F. R. (2015). Rethinking ovarian cancer II: Reducing mortality from high-grade serous ovarian cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 15(11), 668-679. <https://doi.org/10.1038/nrc4019>
- Brahmer, J., Reckamp, K. L., Baas, P., Crinò, L., Eberhardt, W. E. E., Poddubskaya, E., ... Spigel, D. R. (2015). Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 373(2), 123-135. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1504627>
- Brancaccio, M., Russo, M., Masullo, M., Palumbo, A., Russo, G. L., & Castellano, I. (2019). Sulfur-containing histidine compounds inhibit γ -glutamyl transpeptidase activity in human cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 294(40), 14603-14614. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009304>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229-263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Brichacek, A. L., & Brown, C. M. (2019). Alkaline phosphatase: A potential biomarker for stroke and implications for treatment. *Metabolic Brain Disease*, 34(1), 3-19. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0322-3>
- Cannistra, S. A. (2004). Cancer of the ovary. *The New England Journal of Medicine*, 351(24), 2519-2529. <https://doi.org/10.1056/NEJMra041842>
- Castaneda, M., den Hollander, P., Kuburich, N. A., Rosen, J. M., & Mani, S. A. (2022). Mechanisms of cancer metastasis. *Seminars in Cancer Biology*, 87, 17-31. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.10.006>
- Chambers, A. F., Groom, A. C., & MacDonald, I. C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews. Cancer*, 2(8), 563-572. <https://doi.org/10.1038/nrc865>
- Copeland, R. A., Harpel, M. R., & Tummino, P. J. (2007). Targeting enzyme inhibitors in drug discovery. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 11(7), 967-978. <https://doi.org/10.1517/14728222.11.7.967>

- Crosby, D., Bhatia, S., Brindle, K. M., Coussens, L. M., Dive, C., Emberton, M., ... Balasubramanian, S. (2022). Early detection of cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 375(6586), eaay9040. <https://doi.org/10.1126/science.aay9040>
- Cui, F., Zhou, Z., & Zhou, H. S. (2020). Review—Measurement and Analysis of Cancer Biomarkers Based on Electrochemical Biosensors. *Journal of The Electrochemical Society*, 167(3), 037525. <https://doi.org/10.1149/2.0252003JES>
- Czarnecka, A. M., Synoradzki, K., Firlej, W., Bartnik, E., Sobczuk, P., Fiedorowicz, M., ... Rutkowski, P. (2020). Molecular Biology of Osteosarcoma. *Cancers*, 12(8), 2130. <https://doi.org/10.3390/cancers12082130>
- Das, S., Dey, M. K., Deviredy, R., & Gartia, M. R. (2023). Biomarkers in Cancer Detection, Diagnosis, and Prognosis. *Sensors*, 24(1), 37. <https://doi.org/10.3390/s24010037>
- Delgado Bolton, R. C., Aide, N., Colletti, P. M., Ferrero, A., Paez, D., Skanjeti, A., & Giammarile, F. (2021). EANM guideline on the role of 2-[18F]FDG PET/CT in diagnosis, staging, prognostic value, therapy assessment and restaging of ovarian cancer, endorsed by the American College of Nuclear Medicine (ACNM), the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging (SNMMI) and the International Atomic Energy Agency (IAEA). *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 48(10), 3286-3302. <https://doi.org/10.1007/s00259-021-05450-9>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., ... Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*, 144(8), 1941-1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
- Frick, C., Rumgay, H., Vignat, J., Ginsburg, O., Nolte, E., Bray, F., & Soerjomataram, I. (2023). Quantitative estimates of preventable and treatable deaths from 36 cancers worldwide: A population-based study. *The Lancet. Global Health*, 11(11), e1700-e1712. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(23\)00406-0](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(23)00406-0)
- Goldberg, D. M., & Martin, J. V. (1975). Role of γ -Glutamyl Transpeptidase Activity in the Diagnosis of Hepatobiliary Disease. *Digestion*, 12(4-6), 232-246. <https://doi.org/10.1159/000197682>
- Gomez, B., Ardakani, S., Ju, J., Jenkins, D., Cerelli, M. J., Daniloff, G. Y., & Kung, V. T. (1995). Monoclonal antibody assay for measuring bone-specific alkaline phosphatase activity in serum. *Clinical Chemistry*, 41(11), 1560-1566.
- Goossens, N., Nakagawa, S., Sun, X., & Hoshida, Y. (2015). Cancer biomarker discovery and validation. *Translational Cancer Research*, 4(3), 256-269. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2015.06.04>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2020). Alkaline Phosphatase. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020(8), pdb.top100768. <https://doi.org/10.1101/pdb.top100768>
- Grimm, C., Hofstetter, G., Aust, S., Mutz-Dehbalaie, I., Bruch, M., Heinze, G., ... Polterauer, S. (2013). Association of gamma-glutamyltransferase with severity of disease at diagnosis and prognosis of ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, 109(3), 610-614. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.323>

- Gu, K., Xu, Y., Li, H., Guo, Z., Zhu, S., Zhu, S., ... Zhu, W.-H. (2016). Real-Time Tracking and In Vivo Visualization of β -Galactosidase Activity in Colorectal Tumor with a Ratiometric Near-Infrared Fluorescent Probe. *Journal of the American Chemical Society*, 138(16), 5334-5340. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b01705>
- Gu, K., Zhu, W.-H., & Peng, X. (2019). Enhancement strategies of targetability, response and photostability for in vivo bioimaging. *Science China Chemistry*, 62(2), 189-198. <https://doi.org/10.1007/s11426-018-9382-3>
- Gucalp, A., Traina, T. A., Eisner, J. R., Parker, J. S., Selitsky, S. R., Park, B. H., ... Cardoso, F. (2019). Male breast cancer: A disease distinct from female breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 173(1), 37-48. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4921-9>
- Haarhaus, M., Cianciolo, G., Barbuto, S., La Manna, G., Gasperoni, L., Tripepi, G., ... Magnusson, P. (2022). Alkaline Phosphatase: An Old Friend as Treatment Target for Cardiovascular and Mineral Bone Disorders in Chronic Kidney Disease. *Nutrients*, 14(10), 2124. <https://doi.org/10.3390/nu14102124>
- Haick, H., Broza, Y. Y., Mochalski, P., Ruzsanyi, V., & Amann, A. (2014). Assessment, origin, and implementation of breath volatile cancer markers. *Chem. Soc. Rev.*, 43(5), 1423-1449. <https://doi.org/10.1039/C3CS60329F>
- Hanigan, M. H., & Ricketts, W. A. (1993). Extracellular glutathione is a source of cysteine for cells that express γ -glutamyl transpeptidase. *Biochemistry*, 32(24), 6302-6306. <https://doi.org/10.1021/bi00075a026>
- Hofman, P. (2019). The challenges of evaluating predictive biomarkers using small biopsy tissue samples and liquid biopsies from non-small cell lung cancer patients. *Journal of Thoracic Disease*, 11(S1), S57-S64. <https://doi.org/10.21037/jtd.2018.11.85>
- Hu, S., Wang, T., Zou, J., Zhou, Z., Lu, C., Nie, J., ... Wang, F. (2019). Highly chemoselective fluorescent probe for the detection of tyrosinase in living cells and zebrafish model. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 283, 873-880. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.12.105>
- Huang, S., Gao, T., Bi, A., Cao, X., Feng, B., Liu, M., ... Zeng, W. (2020). Revealing aggregation-induced emission effect of imidazolium derivatives and application for detection of Hg²⁺. *Dyes and Pigments*, 172, 107830. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107830>
- Ibrahim, J., Peeters, M., Van Camp, G., & Op de Beeck, K. (2023). Methylation biomarkers for early cancer detection and diagnosis: Current and future perspectives. *European Journal of Cancer*, 178, 91-113. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2022.10.015>
- Idéo, G., Morganti, A., & Dioguardi, N. (1972). γ -Glutamyl Transpeptidase: A Clinical and Experimental Study. *Digestion*, 5(6), 326-336. <https://doi.org/10.1159/000197206>
- Isakoff, M. S., Bielack, S. S., Meltzer, P., & Gorlick, R. (2015). Osteosarcoma: Current Treatment and a Collaborative Pathway to Success. *Journal of Clinical Onco-*

- logy: *Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(27), 3029-3035. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.4895>
- Jassas, R. S., Naeem, N., Sadiq, A., Mehmood, R., Alenazi, N. A., Al-Rooqi, M. M., ... Ahmed, S. A. (2023). Current status of N -, O -, S -heterocycles as potential alkaline phosphatase inhibitors: A medicinal chemistry overview. *RSC Advances*, 13(24), 16413-16452. <https://doi.org/10.1039/D3RA01888A>
- Jiang, C., Hu, F., Xia, X., & Guo, X. (2023). Prognostic value of alkaline phosphatase and bone-specific alkaline phosphatase in breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *The International Journal of Biological Markers*, 38(1), 25-36. <https://doi.org/10.1177/03936155231154662>
- Jiang, P., Sinha, S., Aldape, K., Hannenhalli, S., Sahinalp, C., & Rupp, E. (2022). Big data in basic and translational cancer research. *Nature Reviews. Cancer*, 22(11), 625-639. <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00502-0>
- Kazemi-Shirazi, L., Endler, G., Winkler, S., Schickbauer, T., Wagner, O., & Mar-sik, C. (2007). Gamma glutamyltransferase and long-term survival: Is it just the liver? *Clinical Chemistry*, 53(5), 940-946. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.081620>
- Keikha, M., & Esfahani, B. N. (2018). The Relationship between Tuberculosis and Lung Cancer. *Advanced Biomedical Research*, 7, 58. https://doi.org/10.4103/abr.abr_182_17
- Kern, K. M., & Schroeder, J. R. (2014). Comparison of cantharidin toxicity in breast cancer cells to two common chemotherapeutics. *International Journal of Breast Cancer*, 2014, 423059. <https://doi.org/10.1155/2014/423059>
- Khanmohammadi, A., Aghaie, A., Vahedi, E., Qazvini, A., Ghanei, M., Afkhami, A., ... Bagheri, H. (2020). Electrochemical biosensors for the detection of lung cancer biomarkers: A review. *Talanta*, 206, 120251. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120251>
- Kok, V. C., & Yu, C.-C. (2020). Cancer-Derived Exosomes: Their Role in Cancer Biology and Biomarker Development. *International Journal of Nanomedicine, Volume 15*, 8019-8036. <https://doi.org/10.2147/IJN.S272378>
- Kwong, G. A., Ghosh, S., Gamboa, L., Patriotis, C., Srivastava, S., & Bhatia, S. N. (2021). Synthetic biomarkers: A twenty-first century path to early cancer detection. *Nature Reviews Cancer*, 21(10), 655-668. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00389-3>
- Lawrence, R., Watters, M., Davies, C. R., Pantel, K., & Lu, Y.-J. (2023). Circulating tumour cells for early detection of clinically relevant cancer. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 20(7), 487-500. <https://doi.org/10.1038/s41571-023-00781-y>
- Lee, H., In, B., Mehta, P. K., Kishore, M. Y. L. N., & Lee, K.-H. (2018). Dual Role of a Fluorescent Peptidyl Probe Based on Self-Assembly for the Detection of Heparin and for the Inhibition of the Heparin-Digestive Enzyme Reaction. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10(3), 2282-2290. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b15411>

- Li, G., Wu, J., Qi, X., Wan, X., Liu, Y., Chen, Y., & Xu, L. (2022). Molecularly imprinted polypyrrole film-coated poly(3,4-ethylenedioxythiophene):polystyrene sulfonate-functionalized black phosphorene for the selective and robust detection of norfloxacin. *Materials Today Chemistry*, 26, 101043. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2022.101043>
- Litwin, M. S., & Tan, H.-J. (2017). The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA*, 317(24), 2532-2542. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.7248>
- Liu, H.-W., Chen, L., Xu, C., Li, Z., Zhang, H., Zhang, X.-B., & Tan, W. (2018). Recent progresses in small-molecule enzymatic fluorescent probes for cancer imaging. *Chemical Society Reviews*, 47(18), 7140-7180. <https://doi.org/10.1039/C7CS00862G>
- Liu, M., Zhou, R., Liu, Z., Guo, C., Xu, R., Zhou, F., ... Ke, Y. (2022). Update and validation of a diagnostic model to identify prevalent malignant lesions in esophagus in general population. *eClinicalMedicine*, 47, 101394. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101394>
- Long, Y., Zeng, F., Shi, J., Tian, H., & Chen, T. (2014). Gamma-glutamyltransferase predicts increased risk of mortality: A systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Free Radical Research*, 48(6), 716-728. <https://doi.org/10.3109/10715762.2014.902055>
- Luetke, A., Meyers, P. A., Lewis, I., & Juergens, H. (2014). Osteosarcoma treatment – Where do we stand? A state of the art review. *Cancer Treatment Reviews*, 40(4), 523-532. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.11.006>
- Łukasiewicz, S., Czezelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., & Stanisławek, A. (2021). Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. *Cancers*, 13(17), 4287. <https://doi.org/10.3390/cancers13174287>
- Ma, X., Fan, Y., Chen, Z., Zhang, Y., Wang, S., & Yu, J. (2021). Blood Biomarkers of Bone Metastasis in Digestive Tract Malignant Tumors. *Future Oncology*, 17(12), 1507-1518. <https://doi.org/10.2217/fon-2020-0509>
- Martínez, V. R., Aguirre, M. V., Todaro, J. S., Piro, O. E., Echeverría, G. A., Naso, L. G., ... Williams, P. A. M. (2018). Interaction of Zn with Losartan. Activation of Intrinsic Apoptotic Signaling Pathway in Lung Cancer Cells and Effects on Alkaline and Acid Phosphatases. *Biological Trace Element Research*, 186(2), 413-429. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1334-x>
- Mooney, R., Abdul Majid, A., Batalla, J., Annala, A. J., & Aboody, K. S. (2017). Cell-mediated enzyme prodrug cancer therapies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 118, 35-51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.09.003>
- Mouliere, F., Robert, B., Arnau Peyrotte, E., Del Rio, M., Ychou, M., Molina, F., ... Thierry, A. R. (2011). High Fragmentation Characterizes Tumour-Derived Circulating DNA. *PLoS ONE*, 6(9), e23418. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023418>
- Mukama, T., Fallah, M., Brenner, H., Xu, X., Sundquist, K., Sundquist, J., & Kharazmi,

- E. (2020). Risk of invasive breast cancer in relatives of patients with breast carcinoma in situ: A prospective cohort study. *BMC Medicine*, 18(1), 295. <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01772-x>
- Nagaraju, G. P., Aliya, S., Zafar, S. F., Basha, R., Diaz, R., & El-Rayes, B. F. (2012). The impact of curcumin on breast cancer. *Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro*, 4(9), 996-1007. <https://doi.org/10.1039/c2ib20088k>
- Nakamura, T., Nakamura-Takahashi, A., Kasahara, M., Yamaguchi, A., & Azuma, T. (2020). Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the osteogenic differentiation of osteoprogenitor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 524(3), 702-709. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.01.136>
- National Lung Screening Trial Research Team, Aberle, D. R., Adams, A. M., Berg, C. D., Black, W. C., Clapp, J. D., ... Sicks, J. D. (2011). Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *The New England Journal of Medicine*, 365(5), 395-409. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1102873>
- Neuman, M. G., Malnick, S., & Chertin, L. (2020). Gamma glutamyl transferase—An underestimated marker for cardiovascular disease and the metabolic syndrome. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences: A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques*, 23(1), 65-74. <https://doi.org/10.18433/jpps30923>
- Nie, H., Liao, Z., Wang, Y., Zhou, J., He, X., & Ou, C. (2021). Exosomal long non-coding RNAs: Emerging players in cancer metastasis and potential diagnostic biomarkers for personalized oncology. *Genes & Diseases*, 8(6), 769-780. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.12.004>
- Nunes, A. S., Barros, A. S., Costa, E. C., Moreira, A. F., & Correia, I. J. (2019). 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(1), 206-226. <https://doi.org/10.1002/bit.26845>
- Okada, T., Suzuki, H., Wada, K., Kumagai, H., & Fukuyama, K. (2006). Crystal structures of γ -glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli*, a key enzyme in glutathione metabolism, and its reaction intermediate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(17), 6471-6476. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511020103>
- Patel, A. (2020). Benign vs Malignant Tumors. *JAMA Oncology*, 6(9), 1488. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.2592>
- Polterauer, S., Hofstetter, G., Grimm, C., Rahhal, J., Mailath-Pokorny, M., Kohl, M., ... Reinthaller, A. (2011). Relevance of gamma-glutamyltransferase – a marker for apoptotic balance – in predicting tumor stage and prognosis in cervical cancer. *Gynecologic Oncology*, 122(3), 590-594. <https://doi.org/10.1016/j.ygy-no.2011.05.027>
- Ramalingam, S., & Belani, C. (2008). Systemic Chemotherapy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Recent Advances and Future Directions. *The Oncologist*, 13(S1), 5-13. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.13-S1-5>

- Ramandi, A., George, J., Behnouch, A. H., Delavari, A., Mohammadi, Z., Poustchi, H., & Malekzadeh, R. (2025). The Association Between Serum Gamma-Glutamyl Transferase and Gastrointestinal Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancer Medicine*, 14(2), e70581. <https://doi.org/10.1002/cam4.70581>
- Rampes, S., Bolina, A., & Choy, S.-P. (2022). Early diagnosis of symptomatic ovarian cancer in primary care in the UK: Opportunities and challenges. *Primary Health Care Research & Development*, 23, e52. <https://doi.org/10.1017/S146342362200041X>
- Rao Bommi, J., Kummari, S., Lakavath, K., Sukumaran, R. A., Panicker, L. R., Marty, J. L., & Yugender Goud, K. (2023). Recent Trends in Biosensing and Diagnostic Methods for Novel Cancer Biomarkers. *Biosensors*, 13(3), 398. <https://doi.org/10.3390/bios13030398>
- Reck, M., Rodríguez-Abreu, D., Robinson, A. G., Hui, R., Csőszi, T., Fülöp, A., ... Brahmer, J. R. (2016). Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 375(19), 1823-1833. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606774>
- Ritter, J., & Bielack, S. S. (2010). Osteosarcoma. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 21 Suppl 7, vii320-325. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq276>
- Rojas, G. A., Hubbard, A. K., Diessner, B. J., Ribeiro, K. B., & Spector, L. G. (2021). International trends in incidence of osteosarcoma (1988-2012). *International Journal of Cancer*, 149(5), 1044-1053. <https://doi.org/10.1002/ijc.33673>
- RooIntan, A., Sharifi-Rad, M., Badrzadeh, F., & Sharifi-Rad, J. (2016). A comparison between PLGA-PEG and NIPAAm-MAA nanocarriers in curcumin delivery for hTERT silencing in lung cancer cell line. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*, 62(9), 51-56.
- Saida, T., Mori, K., Hoshiai, S., Sakai, M., Urushibara, A., Ishiguro, T., ... Nakajima, T. (2022). Diagnosing Ovarian Cancer on MRI: A Preliminary Study Comparing Deep Learning and Radiologist Assessments. *Cancers*, 14(4), 987. <https://doi.org/10.3390/cancers14040987>
- Sakabe, M., Asanuma, D., Kamiya, M., Iwatate, R. J., Hanaoka, K., Terai, T., ... Urano, Y. (2013). Rational Design of Highly Sensitive Fluorescence Probes for Protease and Glycosidase Based on Precisely Controlled Spirocyclization. *Journal of the American Chemical Society*, 135(1), 409-414. <https://doi.org/10.1021/ja309688m>
- Shen, C., Li, X., Rasooly, A., Guo, L., Zhang, K., & Yang, M. (2016). A single electrochemical biosensor for detecting the activity and inhibition of both protein kinase and alkaline phosphatase based on phosphate ions induced deposition of redox precipitates. *Biosensors and Bioelectronics*, 85, 220-225. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.05.025>
- Shim, J. S., Kim, J. H., Cho, H. Y., Yum, Y. N., Kim, S. H., Park, H.-J., ... Kwon, H. J. (2003). Irreversible Inhibition of CD13/Aminopeptidase N by the Antian-

- giogenic Agent Curcumin. *Chemistry & Biology*, 10(8), 695-704. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(03\)00169-8](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(03)00169-8)
- Shu, J., Tan, A., Li, Y., Huang, H., & Yang, J. (2022). The correlation between serum total alkaline phosphatase and bone mineral density in young adults. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 23(1), 467. <https://doi.org/10.1186/s12891-022-05438-y>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(1), 17-48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>
- Simpson, E., & Brown, H. L. (2018). Understanding osteosarcomas. *JAAPA: Official Journal of the American Academy of Physician Assistants*, 31(8), 15-19. <https://doi.org/10.1097/01.JAA.0000541477.24116.8d>
- Singh, A., Malvankar, S., Ravi Kumar, Y. S., Seervi, M., Srivastava, R. K., & Verma, B. (2022). Role of various non-coding RNAs in EMT, cancer, and metastasis: Recent trends and future perspective. *Advances in Cancer Biology - Metastasis*, 4, 100039. <https://doi.org/10.1016/j.adcanc.2022.100039>
- Staudigl, C., Concin, N., Grimm, C., Pfeiler, G., Nehoda, R., Singer, C. F., & Polterauer, S. (2015). Prognostic Relevance of Pretherapeutic Gamma-Glutamyltransferase in Patients with Primary Metastatic Breast Cancer. *PLOS ONE*, 10(4), e0125317. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125317>
- Sukumar, J., Gast, K., Quiroga, D., Lustberg, M., & Williams, N. (2021). Triple-negative breast cancer: Promising prognostic biomarkers currently in development. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 21(2), 135-148. <https://doi.org/10.1080/14737140.2021.1840984>
- Sun, H., Lu, C. H. S., Uttamchandani, M., Xia, Y., Liou, Y., & Yao, S. Q. (2008). Peptide Microarray for High-Throughput Determination of Phosphatase Specificity and Biology. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(9), 1698-1702. <https://doi.org/10.1002/anie.200703473>
- Sun, P., Li, Y., Chang, L., & Tian, X. (2019). Prognostic and clinicopathological significance of Gamma-Glutamyltransferase in patients with hepatocellular carcinoma: A PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine*, 98(19), e15603. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000015603>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tabassum, S., Zaki, M., Afzal, M., & Arjmand, F. (2014). Synthesis and characterization of Cu(II)-based anticancer chemotherapeutic agent targeting topoisomerase Ia: In vitro DNA binding, pBR322 cleavage, molecular docking studies and cytotoxicity against human cancer cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 74, 509-523. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.12.046>
- Thun, M. J., DeLancey, J. O., Center, M. M., Jemal, A., & Ward, E. M. (2010). The global burden of cancer: Priorities for prevention. *Carcinogenesis*, 31(1), 100-110. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp263>

- Tिताux, C., Ternynck, C., Pauchet, M., Stichelbout, M., Bizet, G., Maboudou, P., ... Chu-dzinski, A. (2023). Total alkaline phosphatase levels by gestational age in a large sample of pregnant women. *Placenta*, 132, 32-37. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2022.12.005>
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87-108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>
- Tosoian, J. J., Mamawala, M., Epstein, J. I., Landis, P., Macura, K. J., Simopoulos, D. N., ... Gorin, M. A. (2020). Active Surveillance of Grade Group 1 Prostate Cancer: Long-term Outcomes from a Large Prospective Cohort. *European Urology*, 77(6), 675-682. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2019.12.017>
- Valery, P. C., Laversanne, M., & Bray, F. (2015). Bone cancer incidence by morphological subtype: A global assessment. *Cancer Causes & Control: CCC*, 26(8), 1127-1139. <https://doi.org/10.1007/s10552-015-0607-3>
- Van Huijgevoort, N. C. M., Del Chiaro, M., Wolfgang, C. L., Van Hooft, J. E., & Besse-link, M. G. (2019). Diagnosis and management of pancreatic cystic neoplasms: Current evidence and guidelines. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(11), 676-689. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0195-x>
- Wahab, M. R. A., Palaniyandi, T., Ravi, M., Viswanathan, S., Baskar, G., Surendran, H., ... Rajendran, B. K. (2023). Biomarkers and biosensors for early cancer diagnosis, monitoring and prognosis. *Pathology - Research and Practice*, 250, 154812. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2023.154812>
- Wang, K., Wang, W., Zhang, X.-Y., Jiang, A.-Q., Yang, Y.-S., & Zhu, H.-L. (2021). Fluorescent probes for the detection of alkaline phosphatase in biological systems: Recent advances and future prospects. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 136, 116189. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116189>
- Wang, L., Lu, B., He, M., Wang, Y., Wang, Z., & Du, L. (2022). Prostate Cancer Incidence and Mortality: Global Status and Temporal Trends in 89 Countries From 2000 to 2019. *Frontiers in Public Health*, 10, 811044. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.811044>
- Wen, Y.-F., Yang, X.-Z., Zeng, L.-S., Peng, H.-H., Huang, W.-J., Cai, L.-M., ... Lin, X.-D. (2017). Prognostic impact of pretherapeutic gamma-glutamyltransferase on patients with nasopharyngeal carcinoma. *PloS One*, 12(2), e0172345. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172345>
- Werner, M. E., Cummings, N. D., Sethi, M., Wang, E. C., Sukumar, R., Moore, D. T., & Wang, A. Z. (2013). Preclinical evaluation of Genexol-PM, a nanoparticle formulation of paclitaxel, as a novel radiosensitizer for the treatment of non-small cell lung cancer. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 86(3), 463-468. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2013.02.009>
- West, M. B., Chen, Y., Wickham, S., Heroux, A., Cahill, K., Hanigan, M. H., & Mooers, B. H. M. (2013). Novel Insights into Eukaryotic γ -Glutamyltranspeptidase 1 from the Crystal Structure of the Glutamate-bound Human Enzyme. *Jour-*

nal of Biological Chemistry, 288(44), 31902-31913. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.498139>

- Wu, S., Zhu, W., Thompson, P., & Hannun, Y. A. (2018). Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. *Nature Communications*, 9(1), 3490. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05467-z>
- Xiao, Y., Lu, J., Chang, W., Chen, Y., Li, X., Li, D., ... Yang, H. (2019). Dynamic serum alkaline phosphatase is an indicator of overall survival in pancreatic cancer. *BMC Cancer*, 19(1), 785. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6004-7>
- Yang, L., Shi, P., Zhao, G., Xu, J., Peng, W., Zhang, J., ... Cui, H. (2020). Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 8. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0110-5>
- Ye, M., Zhang, J., Zhang, J., Miao, Q., Yao, L., & Zhang, J. (2015). Curcumin promotes apoptosis by activating the p53-miR-192-5p/215-XIAP pathway in non-small cell lung cancer. *Cancer Letters*, 357(1), 196-205. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.11.028>
- Zafar, S., Hafeez, A., Shah, H., Mutiullah, I., Ali, A., Khan, K., ... Leyva-Gómez, G. (2025). Emerging biomarkers for early cancer detection and diagnosis: Challenges, innovations, and clinical perspectives. *European Journal of Medical Research*, 30(1), 760. <https://doi.org/10.1186/s40001-025-03003-6>
- Zaher, D. M., El-Gamal, M. I., Omar, H. A., Aljareh, S. N., Al-Shamma, S. A., Ali, A. J., ... Iqbal, J. (2020). Recent advances with alkaline phosphatase isoenzymes and their inhibitors. *Archiv Der Pharmazie*, 353(5), e2000011. <https://doi.org/10.1002/ardp.202000011>
- Zhang, B., Shi, H., & Wang, H. (2023). Machine Learning and AI in Cancer Prognosis, Prediction, and Treatment Selection: A Critical Approach. *Journal of Multidisciplinary Healthcare*, 16, 1779-1791. <https://doi.org/10.2147/JMDH.S410301>
- Zhang, H., Zhuo, C., Zhou, D., Zhang, F., Chen, M., Xu, S., & Chen, Z. (2019). Association between the expression of carbonic anhydraseII and clinicopathological features of hepatocellular carcinoma. *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10242>
- Zhang, W., Dai, Z., Liu, X., & Yang, J. (2018). High-performance electrochemical sensing of circulating tumor DNA in peripheral blood based on poly-xanthurenic acid functionalized MoS2 nanosheets. *Biosensors & Bioelectronics*, 105, 116-120. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.01.038>
- Zhou, Y., Yang, D., Yang, Q., Lv, X., Huang, W., Zhou, Z., ... Hu, H. (2020). Single-cell RNA landscape of intratumoral heterogeneity and immunosuppressive microenvironment in advanced osteosarcoma. *Nature Communications*, 11(1), 6322. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20059-6>



VİRÜSLERE KARŞI BİTKİ SAVUNMASININ MOLEKÜLER MEKANİZMASI

“ ”

Nihan GÜNEŞ¹

Osman TELLİ²

¹ Bitki Koruma Bölümü, Ziraat Fakültesi, Ege Üniversitesi, İzmir, TR35100. e-posta: nihan.gunes@ege.edu.tr ORCID ID: 0000-0002-6608-4871

² Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Fen Edebiyat Fakültesi, Kırklareli Üniversitesi, Kırklareli, TR39100. e-posta: osman.telli@klu.edu.tr ORCID ID: 0000-0001-7337-8109

Giriş

Bitki virüsleri, dünya genelinde tarım ürünlerinde ciddi hastalıklara yol açan önemli patojenlerdir. Sadece nükleik asit ve protein yapılı bir kapsitten oluşan virüsler obligat parazittir ve konukçu hücre dışında canlı organizma özellikleri sergileyememektedir. Viral genomlar, enfekte ettikleri bitki hücrelerinin genomlarına kıyasla oldukça küçük olduğundan, virüsler viral işlevlerini yerine getirmek ve çoğalmak için konukçunun moleküler mekanizmalarını kullanmak zorundadır (Piron et al., 2010; Zhao et al., 2019).

Genellikle bitki virüsleri, enfeksiyon döngüsünü tamamlamak için yalnızca 4 ile 10 protein kodlamaktadır. Sınırlı sayıda proteine sahip olmalarına rağmen, bitki içinde başarılı bir şekilde çoğalabilmektedir ve yayılabilmektedir. Virüsler, hücreden hücreye yayılımı plasmodesmata (tekil: plasmodesma) aracılığıyla, uzun mesafeli taşınmayı ise bitkinin vasküler sistemi yoluyla gerçekleştirmektedir (Whitham ve Wang, 2004). Ancak, plasmodesmatanın fiziksel bir bariyer oluşturması, yalnızca virionların bulaşıcı olması ve kapsid kapasitesindeki sınırlamalar nedeniyle, bilinen tüm bitki virüslerinin oldukça küçük (yaklaşık 1-20 kilobaz) genomlara sahip olmasının başlıca nedenleri arasında gösterilmektedir. Özellikle RNA ve tek zincirli DNA (ssDNA) genomlarına sahip virüslerin, yüksek mutasyon oranı da genom boyutunu kısıtlayan bir diğer faktör olarak kabul edilmektedir (Belshaw et al., 2008).

Son yıllarda RNA susturma (RNA interference, RNAi), virüs kaynaklı gen susturma (Virus Induced Gene Silencing, VIGS), büyük ölçekli genom analizi ve epigenetik analizler gibi tekniklerle bitki virolojisi alanında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu yöntemler, viral patojenite ve konukçu tepkilerinin antiviral dirençteki rolünü aydınlatmada büyük katkı sağlamıştır.

Viral Replikasyon Kompleksleri (VRC'ler)

Viral genomun replikasyon stratejisi ve konukçu bitki tarafından algılanma şekli, enfeksiyon sürecinde kritik bir rol oynamaktadır. Tüm virüsler bir nükleik asit genomuna sahiptir ve bu genomun yapısı—RNA veya DNA, lineer, dairesel ya da segmentli—replikasyonun nasıl ve nerede gerçekleşeceğini belirlemektedir. Bugüne kadar tanımlanan bitki virüslerinin çoğu, pozitif anlamlı tek sarmallı RNA [(+)ssRNA] genomuna sahiptir ve bu RNA virüsleri, konukçu hücrenin endomembranlarını yeniden şekillendirerek viral replikasyon kompleksleri (viral replication complexes, VRC'ler) adı verilen özel yapılar oluşturmaktadır. Bu kompleksler, vakuoller, kloroplastlar, mitokondriler veya peroksizomlar gibi farklı hücresel organellerden köken alabilmektedir (Carbonell et al., 2016).

Tek sarmallı DNA'ya (ssDNA) sahip geminivirüsler ve nanovirüsler ise enfekte hücrenin çekirdeğinde konukçunun DNA replikasyon mekanizmasını kullanarak çoğalmaktadır. Buna karşılık çift sarmallı DNA'ya (dsDNA)

sahip Caulimovirus cinsi virüsler, virüs tarafından kodlanan P6 proteininin oluşturduğu bir matriks üzerinde diğer viral proteinler ile DNA ve partikülleri içeren sitoplazmik VRC'ler oluşturmaktadır (Zhao et al., 2019).

Bir virüsün bitki içinde sistemik enfeksiyon oluşturabilmesi için yalnızca genomunun çoğalmasını ve yayılmasını sağlaması yeterli değildir. Bitkiler, virüsleri algılayarak bunları potansiyel tehdit olarak tanımlayabilme yeteneğine sahiptir. Bu da bitki bağışıklık sisteminin temel bir parçası olarak kabul edilen antiviral yanıtı harekete geçirmektedir. Bundan dolayı virüslerin bitkide enfeksiyon sürecinde aynı zamanda konukçunun antiviral savunmasını da baskılaması gerekmektedir (Jin et al., 2021).

Bitkiler, hayvanlarda olduğu gibi özel bağışıklık hücrelerine, dolaşım sistemine veya adaptif (kazanılmış) bağışıklık sistemine sahip değildir. Neredeyse tüm hücreleri kendi yapısını yabancı organizmalardan ayırt edebilme yeteneğine sahiptir. Bu özellik sayesinde bitkiler, biyotik tehditlere karşı etkili savunma mekanizmaları geliştirebilmektedir. Bu süreç **bitkisel doğuştan gelen bağışıklık** (plant innate immunity) olarak tanımlanmaktadır (Wang et al., 2020a).

Bitki Bağışıklık Sisteminin Temelleri

Bitki bağışıklık sisteminin nasıl çalıştığını açıklamak için **Jones & Dangl (2006)**, “zig-zag modeli” olarak adlandırılan bir savunma modeli önermiştir. Bu model, bitkilerin savunma tepkilerini birbirine bağlı iki temel katmanda ele almaktadır:

1. Paternle Tetiklenen Bağışıklık (Pattern-Triggered Immunity, PTI): Bitki hücre yüzeyindeki bağışıklık reseptörleri, patojenlere özgü moleküler desenleri tanıyarak bağışıklık tepkisini başlatmaktadır. Bu mekanizma, ilk savunma hattı olarak işlev görmektedir ve yüzey bağışıklığı olarak da bilinmektedir.

2. Efektörle Tetiklenen Bağışıklık (Effector-Triggered Immunity, ETI): Virüslerin veya diğer patojenlerin, bitkinin bağışıklık sistemini aşmak için salgıladığı efektör proteinleri bitki tarafından tanındığında aktive olan daha güçlü ve spesifik bir bağışıklık yanıtıdır. Hücre içi bağışıklık olarak da bilinmektedir.

Bu iki mekanizma birlikte çalışarak bitkilerin viral enfeksiyonlara karşı kendilerini korumasını sağlamaktadır.

Paternle Tetiklenen Bağışıklık

Yüzey bağışıklığı, **hücre zarı üzerinde bulunan patern tanıma reseptörleri** (Pattern-Recognition Receptors, PRR'ler) aracılığıyla harekete geçmektedir. PRR'ler, **mikroorganizma ile ilişkili moleküler desenler** (microbe-associated molecular patterns, MAMP'ler) ve **patojen ile ilişkili moleküler de-**

senler (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMP'ler) olarak bilinen, patojenlere özgü korunmuş moleküler yapıları algılamaktadır. Bu moleküller, büyük organizma gruplarına özgüdür ve seçim baskısı altında evrimleşmiş yapılardır. Örneğin, bakteriyel flagellin ve fungal kitin, ilgili patojenlerin yaşam döngüsünde kritik roller oynamaktadır (Tsuda & Katagiri, 2010).

Bitkilerde **hücre yüzeyi bağışıklık reseptörleri**, yabancı moleküler desenleri algılayarak bağışıklık tepkisini başlatmaktadır. Bu reseptörler iki ana gruba ayrılmaktadır:

1. Reseptör Benzeri Kinazlar (Receptor-Like Kinases RLK'ler): Kinaz bölgesi içermektedir.

2. Reseptör Benzeri Proteinler (Receptor-Like Proteins, RLP'ler): Kinaz bölgesi içermemektedir.

Bu bağışıklık reseptörleri, virüslerin neden olduğu hücresel stresi algılayarak savunma mekanizmalarını harekete geçirebilmektedir. Her iki reseptör grubunda bağışıklık dışında büyüme, gelişme, üreme, abiyotik stres yanıtı ve simbiyoz gibi çeşitli işlevlere de sahip olup genellikle başka bir RLK ile birlikte çalışmaktadır (Jamieson et al., 2018; Escocard de Azevedo Manhães et al., 2021).

PRR'ler üç ana bölgeden oluşmaktadır:

1. Hücre dışı bölge: PAMP'leri tanımaktadır.

2. Transmembran bölge: Hücre zarı boyunca uzanmaktadır.

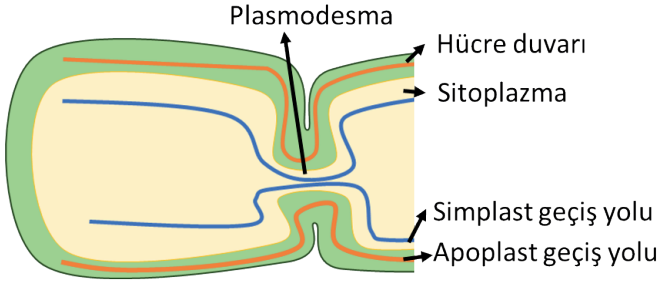
3. Hücre içi bölge: Sinyal iletimini başlatmaktadır.

Bir PAMP, PRR'in hücre dışı bölgesine bağlandığında, PRR ile bir koreseptör arasında birleşme sağlanmaktadır. Bu kompleks, otofosforilasyon ve transfosforilasyon olaylarını tetikleyerek sinyal iletimini başlatmaktadır. Bu süreç reaktif oksijen türlerinin (ROS) ani artışı, MAPK (mitojenle aktive olan protein kinaz) kaskadlarının aktivasyonu, kalloz birikimi ve savunma genlerinin ekspresyonu gibi temel bağışıklık tepkilerine yol açmaktadır. Sonuç olarak PTI olarak adlandırılan bağışıklık tepkisi oluşmaktadır (Bentham et al., 2020).

Virüslerin Bitki Bağışıklık Sistemiyle Etkileşimi

Mevcut iki aşamalı bitki bağışıklık sistemine virüslerin nasıl dahil edileceği, özellikle virüslerin yüzey bağışıklığı ile etkileşimi bağlamında bazı zorluklar barındırmaktadır. Virüs, enfeksiyon sürecinin tamamını hücre içinde geçirmektedir. Hücre içi parazitik doğası nedeniyle bakteriler, funguslar ve oomycetes gibi hücre dışı patojenlerden farklıdır. Viral genom replikasyonu ve protein sentezi enfekte olmuş hücrede gerçekleştiği için, bitki hücresinin virüsleri tanınması da genellikle hücre içi mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşmektedir (Jones & Dangl, 2006; Nakahara & Masuta, 2014).

Virüslerin hücre içi doğası ve ürettikleri viral bileşenlerin azlığı, bağışıklık sisteminin onları tanımamasını zorlaştırmaktadır. En büyük soru, hücresel süreçler tarafından üretilen viral bileşenlerin nasıl “yabancı” olarak algılandığıdır. Enfeksiyon sırasında viral bileşenler genellikle sitoplazma ve plasmodesmata içinde bulunmaktadır. Çoğu bitki virüsü, böcekler, nematodlar veya funguslar tarafından taşınarak doğrudan bitkinin simplastına aktarılmaktadır. Mekanik olarak bulaştırılan virüsler ise bitkinin hücresel bariyerlerini aşmak için selit gibi aşındırıcı ajanlara ihtiyaç duymaktadır. Virüs, başlangıç hücrelerini ele geçirdikten sonra hücreler arası yayılımı plasmodesmata yoluyla, uzun mesafeli taşınımı ise vasküler sistem aracılığıyla gerçekleştirmektedir. Bu süreçlerin anlaşılması, bitki-virüs etkileşimlerinin moleküler mekanizmalarını çözmek ve yeni antiviral stratejiler geliştirmek açısından büyük önem taşımaktadır (Kozieł et al., 2023).



Şekil 1. *Simplast ve Apoplast Geçiş Yolları. Simplast geçiş yolu sitoplazma ve plasmodesmata aracılığıyla gerçekleşirken apoplast geçiş yolu hücre duvarları ve hücreler arası boşluklar üzerinden gerçekleşmektedir.*

Virüslerin Bitki Tarafından Tanınması

Bitkiler, patojenleri tanımak için MAMP'leri kullanmaktadır. Ancak virüsler, bakteriler ve funguslardan farklı olarak, tüm türleri kapsayan ortak tanınabilir moleküllere sahip değildir. Her virüs familyası kendine özgü protein ve yapılar içerdiğinden, tanıma mekanizmaları genellikle viral familyaya özgüdür (Tsuda & Katagiri, 2010; Rosas-Diaz et al., 2018).

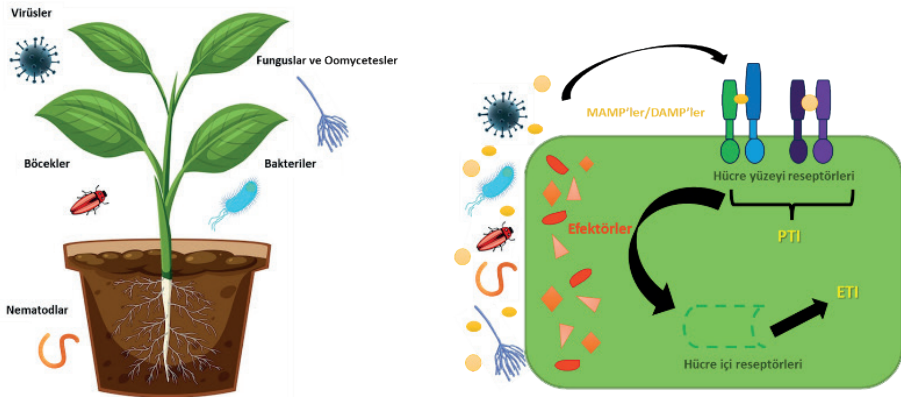
Virüsler, birbirinden bağımsız evrimsel kökenlere sahip olan polifiletik organizmalardır. Oldukça farklı genetik ve yapısal özelliklere sahiptir. Bu nedenle, bakterilerdeki flagellin veya funguslardaki kitin gibi yaygın ve kolayca tanınabilir ortak moleküller taşımadıkları için bitkilerin virüsleri tanınması daha karmaşıktır (Felix et al., 1999). Virüslerin konukçu bitki tarafından geniş bir patojen sınıfı olarak tanınmalarını kolaylaştıran ayırt edici özelliklere sahip olup olmadığının araştırılması gerekmektedir. Virüslerin büyük popülasyon boyutları, kısa nesil süreleri ve yüksek genetik çeşitlilikleri nedeniyle konukçularına kıyasla daha hızlı evrimleşme eğiliminde olduğu bilinmektedir. Bundan dolayı diziye özgü tanıma mekanizmalarının, hücre içi zorunlu

parazitler olan virüslere karşı etkili bir strateji olup olmadığı tartışmalıdır (Belshaw et al., 2008; Escocard de Azevedo Manhães et al., 2021).

DAMP İle Tetiklenen Bağışıklık

Bitkiler, sadece patojenlere karşı değil, aynı zamanda doku hasarı veya stres durumlarını işaret eden endojen molekülleri algılayarak da bağışıklık yanıtı geliştirmektedir. Hasar veya tehlike sinyali taşıyan peptitler, “Hasarla İlişkili Moleküler desenler” (Damage-Associated Molecular Patterns, DAMPs) olarak adlandırılmaktadır. Bu moleküllerin algılanması, bağışıklık sistemi aktive etmektedir ve “DAMP ile Tetiklenen Bağışıklık” (DTI) tepkisini başlatmaktadır (Li et al., 2020a).

DTI, PTI ile benzer özellikler taşıdığından, bu iki mekanizmayı birleştiren “İstilaya Dayalı Model” önerilmiştir. Bu modele göre bitkiler, patojenin türüne veya kaynağına bakmaksızın tehlike sinyallerini algılamaktadır ve bağışıklık yanıtı oluşturmaktadır (Cook et al., 2015).



Şekil 2. Bitki bağışıklığına genel bakış (Bentham et al., 2020'den uyarlanmıştır).

Bitkiler hem hava hem de toprak kaynaklı patojenler ve zararlılar tarafından enfekte olabilmektedir veya zarar görebilmektedir (Şekil 2, sol). Patojenler ve zararlılar, bitki yüzeyindeki bağışıklık reseptörleri tarafından ya da MAMP'ler ve DAMP'ler olarak bilinen moleküler yapıların algılanması yoluyla tanınmaktadır. Ayrıca, hücre içi bağışıklık reseptörleri de bu patojenleri tespit edebilmektedir. Hücre yüzeyindeki reseptörler tarafından başlatılan sinyal iletimi PTI etkinleştirirken, etkötör proteinlerin hücre içi bağışıklık reseptörleri tarafından algılanması ETI başlatmaktadır (Şekil 2, sağ).

Virüse Özgü Moleküler Desenler

Daha önce belirtildiği gibi virüslerin ortak bir kökeni yoktur. Bakteriyel flagellin örneğinde olduğu gibi, tüm virüslerde ortak olarak bulunan korunmuş diziler ya da yapısal moleküller mevcut değildir. Ancak, bitkiler, bazı virüs

gruplarına özgü yapısal özellikleri tanıyabilmektedir. Örneğin, RNA virüslerinde bulunan RNA-bağımlı RNA polimeraz (RdRP) enzimlerinin ya da dairesel Rep (replication-associated protein) kodlayan tek sarmallı DNA (Circular Rep Encoding Single-Stranded; CRESS) ailesine ait tek iplikli DNA (ssDNA) virüslerinin Rep proteinlerinin yapısal özellikleri, diziden bağımsız bir şekilde bitki hücreleri tarafından tanınması mümkündür (Zhao et al., 2019).

Bununla birlikte, bitkideki viral enfeksiyonlarla kaçınılmaz şekilde ilişkili olan en az bir molekül bulunmaktadır: çift sarmallı RNA (dsRNA). dsRNA'nın bitkide PTI yanıtını aktive edebileceği öne sürülmekle birlikte şu ana kadar bitkilerde nükleik asitleri tanıyabilen spesifik bir PRR henüz tanımlanmamıştır. Ancak dsRNA, hücrede viral saldırı olmadığında bol miktarda bulunmayan bir molekül olduğundan dolayı bitki tarafından bir tehlike sinyali olarak tanımlanabilmektedir. Bitkide viral enfeksiyon sırasında dsRNA çok yüksek seviyelere ulaşabilmektedir ve bu da onu “mükemmel bir haberci molekül” yapmaktadır (Ruiz-Ferrer & Voinnet, 2009; Pumplin & Voinnet, 2013).

Enfekte bir hücrede bulunan dsRNA farklı kaynaklara sahip olabilmektedir. Örneğin RNA virüslerinde enfekte hücrelerde viral genomun kendisi olabileceği gibi veya replikasyon sırasında bir ara ürün olarak oluşabilmektedir. Tek zincirli RNA (ssRNA) genomuna sahip virüsler ise bitki RNA-bağımlı RNA polimerazlarının (RDR'ler) tarafından dsRNA sentezi için şablon olarak kullanılabilir. DNA virüsleri de antiviral RNA susturmasına tabi tutulabilmektedir. DNA virüslerinde açık okuma çerçevesinin (ORF) tamamlayıcı zinciri olabilmektedir veya konukçu RDR'lerin virüs kaynaklı RNA moleküllerine etkisiyle üretilabilmektedir (Teixeira et al., 2021).

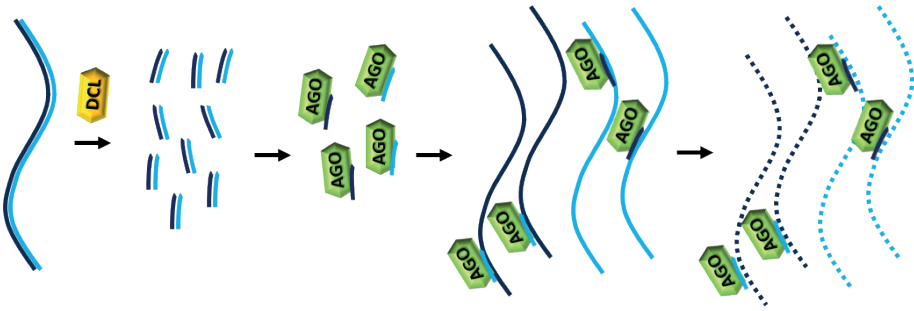
dsRNA, mevcut katı PAMP tanımına tam olarak uymasa da, işlevsel açıdan klasik PAMP'lara eşdeğer bir molekül olarak değerlendirilmektedir. Bundan dolayı virüs genomunun çoğaltılması sırasında doğal olarak oluşan dsRNA, **virüse özgü moleküler desenler** (virus-associated molecular pattern, VAMPs) olarak tanımlanmaktadır ve bitkide RNAi mekanizmasını başlatmaktadır. Bu doğuştan gelen bağışıklık tepkisi oldukça esnek ve neredeyse tüm bitki virüslerine yanıt olarak devreye girmektedir (Ruiz-Ferrer & Voinnet, 2009; Pumplin & Voinnet, 2013).

RNA Susturma (RNAi)

Virüsler RNA veya DNA genomu içeren hücre içi parazitler olduğundan, RNA susturma istilacı nükleik asitlere karşı evrimsel olarak korunmuş bir adaptif bağışıklık mekanizmasıdır. Bu mekanizma bitkilerdeki en önemli antiviral savunma stratejilerinden birisi olarak kabul edilmektedir (Baulcombe, 2022). Viral enfeksiyonun bir göstergesi olan dsRNA varlığıyla tetiklenen RNAi, transkripsiyon sonrası gen susturma (posttranscriptional gene silencing, PTGS) ve transkripsiyonel gen susturma (transcriptional gene silencing, TGS) olarak ikiye ayrılmaktadır.

Transkripsiyon Sonrası Gen Susturma

PTGS, hedef RNA'nın küçük RNA'lar tarafından parçalanarak veya translasyonu engellenerek susturulmasını içermektedir. Bitki hücresinde dsRNA, Dicer-benzeri (Dicer-like, DCL) ribonükleazlar tarafından 20-24 nükleotid (nt) uzunluğunda küçük RNA moleküllerine (small RNAs, sRNA'lar) parçalanmaktadır. sRNA'lar, köken aldıkları moleküle bağlı olarak farklı isimler taşıyabilmektedir. Virüs kaynaklı dsRNA'dan türeyen bu küçük RNA'lar, **virüs türevli küçük girişimci RNA'lar** (virus-derived small interfering RNAs, vsiRNAs) olarak adlandırılmaktadır. vsiRNA'lar, RNA ile indüklenen susturma komplekslerine (RISC) bağlanan ARGONAUTE (AGO) proteinlerine yüklenerek viral RNA'nın parçalanmasını veya translasyonunun baskılanmasını sağlamaktadır. Baz eşleşmesi sonrasında ve bu nedenle son derece özgül bir şekilde RISC'ler viral RNA moleküllerini kesebilmektedir ve/veya viral transkriptlerin çevirisini baskılayabilmektedir. PTGS hem sitoplazmada hem de çekirdekte gerçekleşebilmektedir ve hem RNA hem de DNA virüslerini hedef almaktadır (Wang et al., 2011; Baulcombe, 2022).



Şekil 3. RNA susturmadaki temel süreç, dsRNA'nın veya baz eşleşmesi yapmış RNA'nın DCL nükleazlarının etkisiyle siRNA'lara dönüştürülmesini içermektedir. Bu siRNA ipliklerinden biri, AGO nükleazlarını hedef RNA'lara yönlendirmede kılavuz görevi yapmaktadır. Hedef RNA'lar genellikle siRNA'nın 10. pozisyonunun karşısından kesilmektedir. Kesilen RNA'lar, bitki hücresinde diziye özgü olmayan nükleazlar tarafından çoğunlukla parçalanmaktadır (Baulcombe, 2022'den uyarlanmıştır).

siRNA moleküllerinin hücreler arasında simplastik yol üzerinden hareket etme yeteneği sayesinde hareketli siRNA'ların enfekte bir bitkide virüs hastalığının yayılımını da etkileyebileceği hipotezi öne sürülmektedir (Melnik et al., 2011). Eğer viral siRNA'lar virüse birlikte ya da ondan önce yayılabilirse, RNA susturmaya dayalı savunma sistemlerini önceden aktive ederek virüsün, başlangıçta enfekte olmayan uzak hücrelere girmesini engelleyebilir. Ancak virüs enfeksiyonları sırasında hareketli siRNA'ların rolünü doğrudan kanıtlayan net bir bulgu hâlâ bulunmamaktadır (Baulcombe, 2022; Lopez-Gomollon & Baulcombe, 2022).

PTGS, sırasıyla DCL1/DCL4 veya DCL2'nin etkileriyle üretilen 21 veya 22 nt uzunluğundaki sRNA'lar tarafından gerçekleştirilmektedir ve bu sRNA'lar farklı roller oynamaktadır. DCL2 tarafından üretilen 22-nt sRNA'lar, RISC'teki AGO proteininden dışarı çıkarak, SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3 (SGS3) proteini ile transkripsiyonel duraklamaya neden olmaktadır. 22-nt sRNA'lar tarafından hedeflenen RNA'lar, bitki RDR'lerin etkisiyle dsRNA'ya dönüştürülebilmektedir. Yeni üretilen dsRNA'lar, DCL1/DCL4'ün yeni sRNA'lar üretmesi için şablon olarak kullanılarak çoğalma döngüsü oluşturmaktadır. 22-nt sRNA'lar, hedeflenen RNA'ların dsRNA'ya dönüşümüne neden olarak bir geri besleme döngüsü oluşturmaktadır. 21-nt sRNA'lar, RISC'i viral RNA'yı kesmek için yönlendirmektedir (Baulcombe, 2022; Lozano-Durán, 2024).

RNAi aşamasında rol olan AGO1 ve AGO2 proteinlerinin antiviral savunmada örtüşmeyen işlevlere sahip olduğu ve bu durumun filogenetik uzaklıklarıyla tutarlı olduğu gösterilmiştir. AGO2, vsiRNA aşamasında birincil yürütücü iken, AGO1 doğrudan bir vsiRNA efektörü olarak hareket edebilmektedir ve ayrıca patojen kaynaklı endojen miRNA yolundaki bozulmalara yanıt olarak aktive olan diğer konukçu savunma yollarını etkileyebilmektedir (Pumplin & Voinnet, 2013).

DCL4, PTGS sürecinde rol oynayan ana DCL proteinidir ve RNA susturmasını başlatmaktadır. DCL2 ise ikincil ve yedekleyici bir işlev görmektedir; yalnızca DCL4 doyumluğa ulaştığında ve dsRNA konsantrasyonu belirli bir eşiği aştığında aktive olmaktadır. Son çalışmalar DCL2'nin viral dsRNA'yı algılayarak hücrel NLR aracılı bağışıklığı aktive eden bir bitki sensörü olabileceğini öne sürmektedir. Yeni önerilen modele göre DCL2'nin temel işlevi RNA susturmasını güçlendirmek değil, L5 ve RPP9 gibi en az iki farklı NLR'yi aktive ederek RNA susturmadan bağımsız bir bağışıklık tepkisi başlatmaktır. Daha da önemlisi DCL2/L5/RPP9 modülü RNA susturmasının yokluğunda bazal antiviral bağışıklığı devreye sokmaktadır. Bu bağlamda DCL2 ve DCL4 farklı antiviral bağışıklık katmanlarını etkinleştirerek virüslere karşı çok yönlü bir savunma sağlamaktadır. Ancak NLR'lerin aktivasyonunun moleküler temelleri ve bu süreci takip eden aşağı yönlü olaylar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Nielsen et al., 2023).

5' kap ve 3' poli(A) kuyruk bağlayıcı proteinlerin varlığının, RDR'lerin (RNA-bağımlı RNA polimerazlar), DCL'lerin (Dicer-like proteinler) veya sRNA biyogenezinde görev alan diğer faktörlerin konukçu hücrenin mRNA'sına erişimini engelleyebileceği öne sürülmüştür (Lopez-Gomollon & Baulcombe, 2022). Pek çok virüs 5' kap ve 3' poli(A) kuyruk bağlayıcı proteinleri ele geçirse de enfeksiyon sırasında viral transkriptlerin aşırı birikiminin belirli bir noktada ilgili moleküler mekanizmaların kapasitesini aşabileceğini ve böylece RDR'lerin erişebileceği modifiye edilmemiş viral RNA moleküllerinin üretimine yol açabileceğini varsaymak mümkündür. Bu eşik mode-

li, RNA susturmanın bir hücrede yalnızca enfeksiyon şiddetli hale geldikten sonra başlayacağını ve dolayısıyla susturma mekanizmasının artık çok geç kalacağı anlamına gelmektedir. Ancak vsiRNA'ların (hücreler arasında hareket edebildiği göz önünde bulundurulduğunda, bu geç başlayan susturma yine de henüz virüsle enfekte olmamış komşu hücrelerde antiviral RNA susturmanın başlatılmasını sağlayabilir. Lozano-Durán, 2024).

dsRNA'nın yaygın bir "yabancı tehlike sinyali" olarak algılanması, virüs- lere karşı bağışıklık yanıtlarının başlatılmasına neden olmaktadır. RNAi'nin antiviral etkisi dizi spesifikliğine dayandığından dolayı PTI ve DTI'dan farklı olarak geniş spektrumlu direnç sağlamamaktadır. RNAi, hücre yüzeyinde değil, virüs ile konukçunun doğrudan etkileşime girdiği hücre içi hücre içi alanda gerçekleşmektedir. Ayrıca, PTI ve DTI ile ilişkilendirilen yanıtları aktive etmemektedir (Jin et al., 2021). Bununla birlikte, son yıllarda yapılan çalışmalar, antiviral RNAi yanıtına ek olarak, RNA virüsü enfeksiyonlarının aynı zamanda PTI yanıtını da aktive ettiğini ortaya koymuştur (Körner et al., 2013). Bu bağlamda dsRNA, yalnızca RNAi sürecinde değil, aynı zamanda güçlü bir uyarıcı olarak PTT'da da rol oynamaktadır (Niehl et al., 2016). RNAi'den farklı olarak, PTI yanıtı MAMP'ler ya da PAMP'ler, PRR'ler tarafından özgül olarak algılanmasıyla başlatılan bir savunma sinyalleme sürecidir (DeFalco & Zipfel, 2021). Önemli olarak, dsRNA'nın tetiklediği PTI yanıtı, molekülün dizi içeriğinden bağımsızdır. Dolayısıyla bu yanıt hem viral dsRNA hem de viral olmayan kaynaklardan türetilmiş dsRNA molekülleri tarafından da başlatılabilmektedir (Huang et al., 2023).

RNA susturma mekanizmaları üzerine yapılan araştırmalar, viral dsRNA ve siRNA'nın dışsal uygulanmasının bitki hastalıklarına karşı koruma sağlayabileceğini ortaya koymuştur (Kim et al., 2019). Tütün bitkisinde virüs direnci indüksiyonu için tomato spotted wilt virus (TSWV; species *Orthotospovirus tomatomaculae*, genus *Orthotospovirus*, family *Tospoviridae*)-türevli dsRNA uygulaması, bitki-virüs etkileşimlerinde spray ile indüklenen gen susturmanın umut verici bir potansiyel taşıdığını göstermektedir (Kona-kalla et al., 2021).

Transkripsiyonel Gen Susturma

TGS ise hedef DNA'nın metilasyonuna yol açarak transkripsiyonu engellemektedir. Çekirdek içinde gerçekleşen bu süreç, özellikle çekirdekte çoğalan DNA virüslerine karşı etkili bir savunma mekanizmasıdır. Bitkilerde DNA metilasyonunun, RNA'ya bağlı DNA metilasyon (RNA-directed DNA methylation, RdDM) mekanizması aracılığıyla gerçekleştiği öne sürülmektedir. Bu süreç, RNA polimeraz II'ye (Pol II) benzeyen özel RNA polimerazların, Pol IV ve Pol V, aktivitesini gerektirmektedir. Pol IV, hedef DNA'yı şablon olarak kullanarak RNA transkriptleri oluşturmaktadır. Bu transkriptler, RDR2 tarafından dsRNA'ya dönüştürülmektedir. Ardından DCL3 tarafın-

dan 24 nükleotidlik küçük RNA'lara parçalanmaktadır. Oluşan 24-nt sRNA'lar, AGO4 proteinine yüklenerek Pol V tarafından üretilen tamamlayıcı molekülere yönlendirilmektedir. AGO4, de novo metiltransferaz DRM2 aracılığıyla hedef DNA dizilerinin metilasyonunu katalize etmektedir. RdDM, özellikle geminivirüsler gibi viral DNA genomları üzerinde doğrudan etkili olabilmektedir ve transkripsiyona dirençli bir kromatin ortamı oluşturarak TGS'ye neden olmaktadır (Sijen et al., 2001; Baulcombe, 2022).

Virüsler, hücreyi sadece tanınmaktan kaçmak veya tanımayı baskılamak için değil, aynı zamanda kendi işlevleri için yeniden düzenlemek amacıyla da ustaca manipüle edebilmektedir. Bu ihtimale işaret eden bazı örnekler zaten tanımlanmıştır. Örneğin, bazı vsiRNA'ların savunma ile ilişkili genlerin ifadesini baskılayarak virülensliği arttırdığı gösterilmiştir (Lopez-Gomollon & Baulcombe, 2022) RNA genomlarına sahip virüsler, bitki gen ekspresyonunu kendi avantajlarına göre düzenleyerek TGS'yi manipüle edebilmektedir (Jin et al., 2021). Begomovirüs cinsine ait virusler, viral DNA'nın metilasyonunun, gen ifadesinin zamanlamasını sağlamanın yanı sıra bu genetik materyalin "kendine ait değil" olarak tanınmaktan kaçınmasını da kolaylaştırdığı öne sürülmüştür. Begomovirüs cinsine ait virusler, C4 proteinleri, enfeksiyonun algılanmasını takiben kloroplasta taşınarak SA bağımlı savunma tepkisini baskılamaktadır. Ancak, bu durumda virüslerin bitkiler tarafından nasıl algılandığına dair mekanistik bilgiler henüz netleşmemiştir (Piedra-Aguilera et al., 2019).

RNA Susturmanın Viral Enfeksiyonlardaki Rolü: İyileşme Fenomeni

Bitki-virüs etkileşimlerinde RNAi'nin ne kadar etkili bir savunma mekanizması olduğunu gösteren en çarpıcı örneklerden biri, **"iyileşme" (recovery) fenomenidir**. Bu durumda, enfekte bitkide (belirli virüs-konukçu kombinasyonunda) alt yapraklarda belirtiler görülürken, yeni gelişen yapraklarda belirtilerin ve viral yükün azalması dikkat çekmektedir. Bu iyileşme süreci, hem RNA hem de DNA virüslerine karşı RNAi ile ilişkilendirilmiştir (Goshal & Sanfacon, 2014; Cenicerós-Ojeda et al., 2016; Körner et al., 2018). Örneğin, TSWV enfeksiyonu nedeniyle sistemik belirtiler gösteren *Capsicum annuum* bitkilerinin %25'inde, 15 gün sonra yeni çıkan yapraklarda iyileşme gözlemlenmiştir. Bitki, virüsün sistemik yayılımına rağmen savunma yanıtını aktive etmiş ve genç dokuları koruma altına almıştır (Chung et al., 2018). Benzer şekilde, *Solanum habrochaites* bitkilerinde tomato brown rugose virus (ToBRFV; species *Tobamovirus fructirugosum*, genus *Tobamovirus*, family *Virgaviridae*) enfeksiyonu nedeniyle 33°C sıcaklıkta şiddetli belirtiler ortaya çıkarken, bitkiler 24±2°C'ye transfer edildiklerinde yeni çıkan yaprakların belirti göstermediği ve virüsten arındığı belirlenmiştir (Jewehan et al., 2022). Bu durum, çevresel koşulların da RNAi aracılığıyla verilen savunma yanıtlarını etkileyebileceğini göstermektedir. Bu fenomen, bitkinin yalnızca pasif bir hedef olmadığını, aksine virüse karşı aktif, adapte olabilen savunma stratejileri geliştirebilen dinamik bir organizma olduğunu ortaya koymaktadır.

Antiviral Susturmanın Baskılanması veya Kaçınılması

Patojenler ve konukçuları arasındaki bitmeyen moleküler silahlanma yarışının değişmez bir ilkesi, patojenlerin konukçu savunma yollarını atlatma, aktif olarak baskılama veya hatta ele geçirme yeteneğidir. Antiviral susturma da bu kuralın bir istisnası değildir. RNAi ile viral RNA'lar tespit edilmektedir ve yok edilmek üzere işaretlenmektedir. Ancak, virüsler bu mekanizmayı bloke edebilecek proteinler üretebilmektedir.

Gen Susturmayı Baskılayıcı Protein: VSR'ler

Bitkide RNAi mekanizması güçlü ve yaygın olduğu için, çoğu bitki virüsü bu yolu zayıflatmaya veya engellemeye yönelik viral susturucular (viral suppressor of RNA silencing, VSR'ler) geliştirmiştir. İlk olarak, potyviral helper-component proteinase (HcPro) ve cucumoviral 2b proteini gibi daha önce virülens faktörleri olarak tanımlanan proteinlerin susturmayı bastırdığı tespit edildiğinde bu durum anlaşılmıştır (Brigneti et al., 1998). RNAi'nin virüslere karşı savunmadaki rolü, bugüne kadar tanımlanan hemen hemen tüm bitki virüslerinin, VSR kodlamasıyla ortaya konmuştur. Bu bulgu, bitkiler ile patojenleri arasındaki evrimsel etkileşimleri "silahlanma yarışı" olarak değerlendiren anlayışla uyum göstermektedir (Burguán & Havelda, 2011).

Viral enfeksiyonların başarılı olabilmesi için bitkisel bağışıklık mekanizmalarının baskılanması gerekmektedir. VSR'ler bitkinin savunma sistemine müdahale ederek RNAi sürecini engellemektedir ve virüsün çoğalmasını ve yayılmasını sağlamaktadır (Burguán & Havelda, 2011).

VSR'ler farklı virüs familyalarından bağımsız olarak evrimleşmiş olmalarına rağmen, RNAi mekanizmasını hedef alma konusunda benzer stratejiler geliştirmiştir. RNAi'nin viral enfeksiyona karşı etkinliği yalnızca etkili VSR'lerin varlığına ya da yokluğuna değil, aynı zamanda viral nükleik asitlerin susturma mekanizmasına erişilebilirliğine de bağlı olmasıdır. Birçok bitki virüsü oluşturduğu VRC, viral RNA'ları hücrel koruyarak, onların RNA susturma sürecinde kaynak yada hedef molekül olarak görev yapmalarını engelleyebilmektedir. Bazı VSR'ler, dsRNA moleküllerini doğrudan bağlayarak veya bunlardan elde edilen vsiRNA'ları hapsederek susturmayı etkisiz hale getirerek ya da susturmada gerekli olan konukçu proteinlerini parçalayarak bitki tarafından tanınmayı önleyebilmektedir (Csorba et al., 2015).

Örneğin, Cauliflower mosaic virus (CaMV; species *Caulimovirus tessellobrassicae*, genus *Caulimovirus*, family *Caulimoviridae*) etmeninin P6 proteini, DCL4 kofaktörü DRB4 ile doğrudan etkileşime girerek siRNA üretimini engellemektedir (Haas et al., 2008). Peanut clump virus (PCV; species *Pecluvirus arachidis*, genus *Pecluvirus*, family *Virgaviridae*) tarafından kodlanan P15 proteini ise, siRNA'ları peroksizomlara yönlendirerek susturma mekanizmasından kaçmalarını sağlamaktadır (Incarbone et al., 2017). Rice yellow stunt

virus (RYSV; species *Alphanucleorhabdovirus oryzae*, genus *Alphanucleorhabdovirus*, family *Rhabdoviridae*) P6 proteini ise ikincil siRNA üretimini durdurmaktadır (Guo et al., 2013). Bazı VSR'ler ise, antiviral savunmada kilit rol oynayan AGO proteinlerini doğrudan hedef almaktadır. Örneğin, Turnip crinkle virus (TCV; species *Betacarmovirus brassicae*, genus *Betacarmovirus*, family *Tombusviridae*) etmeninin P38 proteini, AGO1 ve AGO2'yi bağlayarak onların siRNA yüklemesini engellemektedir (İki et al., 2017). Potato virus X (PVX; species *Potexvirus ecspotati*, genus *Potexvirus*, family *Alphaflexiviridae*) P25 proteini de AGO1 ve AGO2'nin yıkımını teşvik etmektedir (Chiu et al., 2010). Bazı VSR'ler ise susturma mekanizmasının güçlenmesini engellemektedir. Tobacco mosaic virus (TMV; species *Tobamovirus tabaci*, genus *Tobamovirus*, family *Virgaviridae*) P126 proteini, vsiRNA'lerin ve siRNA'ların HEN1 aracılığıyla stabilize edilmesini engellemektedir (Vogler et al., 2007).

İlginç bir biçimde, bazı bitki virüsleri birden fazla VSR proteini üretme kapasitesine sahiptir. Örneğin, Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV; species *Begomovirus coheni*, genus *Begomovirus*, family *Geminiviridae*) RNA'yi baskılamak için en az yedi farklı VSR proteini kullanmaktadır. Bu virüs tarafından kodlanan mevcut proteinlerin %77'si RNA susturmayı baskılama yeteneğine sahiptir (Liu et al. 2023; Luna et al., 2012; Zhao et al., 2022.) Virüslerin sınırlı genetik kodlama kapasitesinin bu denli büyük bir kısmını tek bir bağışıklık mekanizmasını hedef almaya ayırmasının altında yatan nedenler dikkat çekicidir. Bu strateji, viral nükleik asitlerin, enfeksiyon döngüsü boyunca konukçu savunmasını etkisiz hale getirme yeteneği ile kısmen açıklanabilmektedir. Söz konusu durum, virüslerin bitki bağışıklık sistemine karşı geliştirdiği evrimsel uyum stratejilerinin karmaşıklığını ve önemini bir kez daha gözler önüne sermektedir. Bu mekanizmaların detaylı anlaşılması, bitkilerin viral enfeksiyonlara karşı daha dayanıklı hale getirilmesi için önemli bir bilimsel temel sağlamaktadır (Lozano-Durán, 2024).

RNA susturmanın viral enfeksiyonlara karşı etkinliği, sadece etkili VSR'lerin varlığı veya yokluğuna değil aynı zamanda viral nükleik asitlerin susturma mekanizmasına erişilebilirliğine de bağlıdır. Birçok bitki virüsünün, hücrenin yeniden düzenlenmiş membranlarının viral RNA'ları koruduğu VRC'ler oluşturduğu ve bu yapıların RNA susturma için kaynak veya hedef moleküller olarak işlev görmelerini engelleyebileceği bilinmektedir (Lozano-Durán, 2024).

Viral RNA'nın, konukçu RNA'dan yoksun hücresel alt bölmelerde veya yapılarda örneğin VRC'ler bulunması, bitkinin viral RNA'yı tanıma sürecinde belirleyici olabilmektedir. Nitekim, VRC'ler dahil olmak üzere DCL'ler, AGO'lar ve RNA susturma ile ilişkili diğer proteinlerin belirli hücre içi bölgelerde lokalize olduğu bilinmektedir. Örneğin, tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV; species *Begomovirus coheni*, genus *Begomovirus*, family *Geminiviridae*) genomunun antiviral metilasyonunda, AGO4'ün Cajal cisim-

ciklerinde konumlanması büyük önem taşımaktadır. Viral genomun AGO4'e bağımlı metilasyonu, virüs tarafından kodlanan V2 proteini tarafından engellenmektedir. V2 proteini RdDM yolunun merkezi bileşeni olan AGO4 ile Cajal cisimciğinde bağlanarak onun viral DNA'ya bağlanmasını bozmaktadır. V2'nin viral DNA metilasyonunu baskılayıcı etkisini göstermesi için V2-AGO4 etkileşiminin Cajal cisimciğinde lokalize olması gereklidir. Ayrıca V2 proteini, AGO4 aracılığıyla viral birikimin kısıtlanmasını da engellemektedir. Bu süreç etmenin bitki savunma mekanizmasını etkisiz hale getirmek için V2 proteini nasıl evrimleştiğini göstermektedir (Wang et al., 2020b).

Bitkilerin antiviral savunma mekanizmaları arasında; antiviral RNA interferans (RNAi) mekanizması, R geni aracılı direnç ve resesif direnç mekanizmaları bulunmaktadır. Viral algılama stratejilerinin büyük bir bölümü, RNAi ve NLR aracılı viral bağışıklık gibi hücre içi tanıma mekanizmalarına dayanmaktadır. Bununla birlikte, artan sayıda çalışma bitkilerde nükleik asitlerin yüzey algısının mümkün olduğunu, yüzey bağışıklığının bitkilerde antiviral savunmada rol oynayabileceğini, PTI bileşenlerinin (PAMP) antiviral işlev gösterebileceğini ve bitki virüslerinin PTI sinyallerini baskılamak için evrimleşmiş olabileceğini göstermektedir (Pumplin & Voinnet, 2013). Ayrıca, ubiquitin-proteozom makinesi (Luo, 2016), otofaji (Gomes & Dikic, 2014) ve DNA metilasyonu (Butterbach et al., 2014) gibi antiviral savunma mekanizmaları da rapor edilmiştir.

Çift Zincirli RNA Bağlayıcı Proteinler ve Antiviral Savunmadaki İşlevi

Çift sarmallı RNA bağlayıcı protein (double-stranded RNA binding protein, DRB) ailesinin üyelerinin bitkilerde dsRNA sensörleri olarak hareket ettiği öne sürülmüş olup model bitki *A. thaliana*'da beş DRB proteini (DRB1-5) tanımlanmıştır. Bu proteinlerden DRB1 ve DRB4 *thaliana*'da PTGS sırasında dsRNA'nın sRNA'lara parçalanmasını sorumlu DCL1 ve DCL4'ün aktivitesi için kritik öneme sahiptir (Hiraguri et al., 2005). DRB2, DRB3 ve DRB5'in de RNAi mekanizmasında yer aldığı öne sürülmüş olup (Eamens et al., 2012) turnip mosaic virus (TuMV; species *Potyvirus rapae*, genus *Potyvirus*, family *Potyviridae*), cucumber mosaic virus (CMV; species *Cucumovirus CMV*, genus *Cucumovirus*, family *Bromoviridae*) ve TSWV VRC'lerine lokalize olduğu gösterilmiştir (Barton et al., 2017). Bu lokalizasyon, DRB proteinlerinin doğrudan enfeksiyonun merkezine ulaştığını ve savunma işlevlerini burada gerçekleştirdiğini düşündürmektedir. DRB2'nin tobacco rattle virus'un (TRV; species *Tobravirus tabaci*, genus *Tobravirus*, family *Virgaviridae*) VR-C'sine lokalize olduğu ve RNA genomuna sahip etmene antiviral etki gösterdiği doğrulanmıştır (Incarbone et al., 2021). DRB3 ise TuMV enfeksiyonunu baskılamada katkıda bulunmaktadır. *N. benthamiana*'da bitkisinde yapılan çalışmalarda ise DRB2'nin potato virus X (PVX; species *Potexvirus ecspotati*, genus *Potexvirus*, family *Alphaflexiviridae*) enfeksiyonu üzerine sistemik

nekrozu tetiklediği öne sürülmektedir. Bu bulgu, DRB2'nin dsRNA'yı tanımasının, RNAi dışında başka bir bağışıklık yanıtını başlatabileceğini öne sürülmektedir (Fátyol et al., 2020).

Kalloz Birikimi ve Plasmodesmata Kapanışı

dsRNA ile tetiklenen PTI benzeri yanıtların, bitki hücre duvarlarında hücreler arası iletişimi sağlayan ve virüslerin hücreden hücreye yayılmak için kullandığı plazmodezmataları hedef aldığı ortaya koyulmuştur. Plasmodesmata da kallos birikimini tetikleyerek ve geçirgenliği azaltarak enfekte hücreden sonraki viral hareketi sınırlamaktadır. *A. thaliana*'da bu sinyal yolu, Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase 1 (SERK1) ve Botrytis Induced Kinase1/AVRPPHB Susceptible1-Like Kinase1 (BIK1/PBL1), Plasmodesmata-Located Proteins 1/2/3 (PDL1/PDL2/PDL3), Calmodulin-Like 41 (CML41) ve Ca²⁺ kalsiyum (Ca²⁺) sinyalleri gibi bileşenleri içeren özgün bir sinyal yoluyla gerçekleşmektedir. Virüslerin bu savunma katmanını aşmak üzere geliştirdiği mekanizmalar da dikkat çekicidir. Pek çok virüs, dsRNA uygulaması sonrası PD'de lokalize olan kallos birikimini baskılayarak bu yapıları açık tutan hareket proteinlerini (MP'ler) kodlamaktadır. Bu durum viral hareketin kolaylaşmasına ve sistemik enfeksiyonun yayılmasına olanak tanımaktadır (Huang et al., 2023). Bu bulgular, dsRNA aracılı PTI yanıtının virüsle enfekte hücrelerin komşu hücrelere yayılımını sınırlamada biyolojik olarak önemli bir savunma mekanizması olduğunu ve virüslerin bu savunmayı hedef alarak bağışıklık sistemini aşma stratejileri geliştirdiğini ortaya koymaktadır.

Efektörle Tetiklenen Bağışıklık (ETI)

Bitkiler, hücre yüzeyinde bulunan reseptörler aracılığıyla patojenlere karşı savunma oluştururken, hücre içinde ise patojenlerin salgıladığı efektör proteinleri tespit ederek bağışıklık yanıtı başlatmaktadır. Hücre yüzeyinde sağlanan bağışıklık oldukça iyi araştırılmış olsa da hücre içi reseptörlerin rolü ve iki bağışıklık yolu arasındaki etkileşimler henüz tam olarak anlaşılmamıştır.

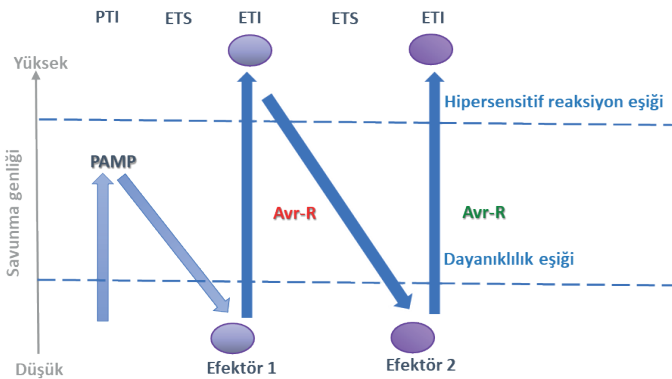
PTI, patojenle ilişkili yapılar veya proteinlere karşı verilen yanıt olarak patojen istilasını engelleyen temel bir savunma mekanizmasını temsil etmektedir. Patojen PTI yanıtını baskıladığında ve efektörlerini üretmeyi başarıyla gerçekleştirdiğinde bitkiler duyarlılık yanıtı göstermektedir. ETI, savunma yanıtının ikinci aşamasıdır ve R geni ürünleri belirli efektörlerin varlığını doğrudan veya dolaylı olarak tespit ettiğinde tetiklenmektedir. Sonuç olarak, etkili bir ETI bitkilerde dayanıklılık sağlarken yetersiz bir ETI hastalığın oluşumuna yani duyarlılığa neden olmaktadır. PTI ve ETI işlevsel olarak bağlantılıdır ve ETI'nin aktivasyonu için PTI'nin varlığı gereklidir (Cook et al., 2015).

Viral Efektörler ve Virülenslikteki Rollerini

Patojen ile bitki bağışıklık sistemi arasındaki etkileşimi en iyi şekilde anlamak için öncelikle efektörleri ve virülenslikteki rollerini anlamak önemlidir. En geniş tanımıyla efektörler; mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlar gibi farklı organizmaların başka bir organizmanın aktivitesini modüle etmek için kullandığı moleküllerdir. Bu incelemede, “efektörler” terimi, virüsler tarafından konukçu bitkiyi enfekte etmek amacıyla kodlanan protein moleküllerini tanımlamak için kullanılmaktadır.

Viral efektörler genellikle bitkinin bağışıklık yanıtını baskılamak veya yönlendirmek için evrimleşmiştir. Bitki bağışıklık sisteminin algısından kaçınmaya yönelik seçim baskısı, bu adaptasyonun önemli bir itici gücüdür. Efektör genleri, virüs genomunda en hızlı evrilen genler arasında yer almaktadır ve genellikle eş anlamlı olmayan mutasyonların eş anlamlı mutasyonlara oranla yüksek olduğu bir hız sergilemektedir (Varden et al., 2007; Cook et al., 2015).

Efektörler, hücre dışı alana taşınabildiği gibi doğrudan konukçu hücre içine de gönderilebilmektedir. Bitki bağışıklık reseptörleri, bu efektörleri hem hücre yüzeyinde hem de hücre içinde kendine ait olmayan işaretler olarak tanıyabilmektedir. Efektörlerin veya bunların aktivitelerinin hücre içindeki algılanması, direnç proteini veya R proteini olarak da adlandırılan “nükleotid-bağlayıcı lösin-zengin tekrarlar” (nucleotide-binding leucine-rich-repeat, **NLR**) reseptör protein tarafından gerçekleştirilmektedir. NLR reseptörleri, bu efektörleri doğrudan veya dolaylı olarak algılamaktadır ve ETI’yı tetiklemektedir. NLR’lerin aktivasyonu, genellikle güçlü ve uzun süreli bir bağışıklık yanıtına neden olmaktadır. ETI, genellikle hipersensitif yanıt (HR) oluşturarak patojenin yayılımını sınırlamaktadır (Wan et al., 2019; Yuan et al., 2021).



Şekil 3. Bitki bağışıklık sisteminin zikzak modeli.

Bu model, bitkilerin hastalıklara karşı dayanıklılığının veya duyarlılığının [PTI – ETS + ETI] dengesine bağlı olduğunu göstermektedir. PTI: Bitki, PRR'ler aracılığıyla MAMP'leri veya PAMP'leri algılamaktadır ve PTI yanıtını başlatmaktadır. ETS: Bazı patojenler, PTI'yi baskılayan veya patojenin yayılımını kolaylaştıran efektörler salgılamaktadır. Bu durum ETS'ye yol açmaktadır. ETI: Bir efektör, bitkideki NB-LRR proteini tarafından tanınarak ETI'nin etkinleşmesini sağlamaktadır. ETI, genellikle hipersensitif yanıtı (HR) tetiklemektedir. Patojenin Adaptasyonu: Seçilim baskısı altında bazı patojenler, efektörü kaybetmektedir ve yeni efektörler kazanmaktadır. Bu efektörler, ETI'yi baskılamaya yardımcı olabilmektedir. Ancak doğal seçilim, bitkide yeni NB-LRR alellerinin ortaya çıkmasını teşvik etmektedir ve bu da yeni efektörleri tanıyarak tekrar ETI'yi aktive etmektedir. Bu süreç, bitki-patojen etkileşiminde dinamik bir silahlanma yarışı olarak tanımlanmaktadır (Jones & Dangl, 2006; Pumplin & Voinnet, 2013)

Virüslerin NLR aracılı bağışıklığın tetikleyicileri ve hedefleri olduğu genel olarak kabul edilse de virüslerin yüzey bağışıklığı (PTI) ile olası etkileşimleri hâlâ tartışmalıdır. Bu tartışma, virüslerin PAMP olarak kabul edilebilecek moleküllere sahip olup olmadığına veya hücre yüzeyinde tanınıp tanınmadığına odaklanmanın ötesinde yüzey bağışıklığının aktivasyonunun, diğer patojenlerde olduğu gibi virüs kaynaklı ETI'yi tetiklemek için gerekli olup olmadığı konusunu da içermektedir.

Dominant Dayanıklılık Genleri ile Antiviral Savunma

Modifiye edilmiş zig-zag modelinde RNAi, PTI için ana antiviral mekanizma olarak kabul edilmektedir. VSR'ler konukçu RNA susturmasını aşmak için ETI tarafından efektörler olarak tanınmaktadır. Efektörler PTI'yi aştığında, bitkiler bir sonraki evrimsel adım olarak ETI'yi aktive etmek için R-proteinlerini geliştirmiştir. Bu süreçte konukçu proteinleri, efektörleri avirülans (Avr) faktörleri olarak tanımaktadır ve bu da PTI'ye benzer şekilde güçlendirilmiş bir direnç tepkisini tetiklemektedir. (Nakahara & Masuta, 2014).

Bitki R proteinleri tarafından tanınan efektörlere “avirülans faktörleri” denmektedir. Bu faktörleri salgılayan patojenler (avirulent patojenler olarak adlandırılmaktadır) genellikle güçlü ETI aktivasyonu nedeniyle konukçuda çoğalamamaktadır (Pumplin & Voinnet, 2013). Konukçu R genleri, genellikle patojenlerin Avr genlerine yanıt olarak ırka özgü bir direnç sağlamaktadır ancak Avr proteinleri herhangi bir ortak yapı paylaşmamaktadır (Jones & Dangl, 2006). NB-LRR aracılı Avr efektör tanıma, savunma yanıtlarını hem doğrudan hem de hücrel kofaktörler aracılığıyla dolaylı olarak başlatabilmektedir (Akhter et al., 2021).

R genlerinin çoğu nükleotid bağlanma bölgesi (nucleotide-binding site, NBS) ve lösün açısından zengin tekrar (leucine-rich repeats, LRRs) bölgelerini

kodlamaktadır. Bitkilerin virüslere karşı bağışıklık yanıtlarının temel bileşenleri olan NB-LRR proteinleri merkezde NBS, C terminalinde bir LRR ve N terminalinde bir sarmal ya da Toll ve Human Interleukin Receptor (TIR) bölgesi olmak üzere üç ana bölgeden oluşmaktadır. NBS bölgesi ayrıca Apaf-1/R protein/CED4 (ARC) adı verilen, ATP hidrolizine bağlı sinyal transduksiyonu yoluyla R protein aktivasyonunu düzenlediği düşünülen bir moleküler anahtar içermektedir. N-terminali, Avr faktörü ile özgül etkileşimde önemli bir rol oynamaktadır (Jones & Dangl, 2006; Akhter et al., 2021).

Bitki-virüs etkileşimleri tek bir hücrede gerçekleştiğinde bir R geni, enfekte olmuş hücreleri hızla öldüren ve virüsün yayılmasını engelleyen bir tür programlanmış hücre ölümü olan HR (aşırı duyarlılık tepkisi) başlatmaktadır. HR genellikle salisilik asit (SA), jasmonik asit (JA), mitojen-aktif protein kinaz sinyalleşmesi, kalsiyum iyon girişi (calcium ion influx), plasmodesmata da kallos birikimi, hücre zarı geçirgenliği değişimi, patojenezle ilişkili (PR) proteinlerin ekspresyonu, reaktif oksijen türleri (ROS) ve nitrik oksidin (NO) ani birikimi gibi çeşitli moleküler olaylarla ilişkilidir (Yang et al., 2001; Akhter et al., 2021).

Antiviral savunmayı tetikleyen R genlerine dair literatürde çok sayıda örnek bulunmaktadır. Ancak, NLR'leri aktive eden viral proteinlerin bilindiği durumlarda bile birçok viral efektör ve R genleri arasındaki doğrudan fiziksel veya işlevsel etkileşimlere dair deneysel kanıtlar sınırlıdır. Antiviral NLR aracılı bağışıklık hakkında mekanistik bir anlayış eksikliği bulunmaktadır bu nedenle moleküler mekanizmaların daha fazla araştırılması gerekmektedir (Akhter et al., 2021; Lozano-Durán, 2024).

N geni (N), *Nicotiana glutinosa* bitkisinden izole edilen, virüsle ilişkili keşfedilen ilk R genidir. N proteini tarafından TMV etmeninin avirülans (Avr) proteini olarak virüsün TMV replikaz proteinini (126 kDa) tanınmaktadır. N (TIR-NLR) geni TIR bölgesi aracılığıyla ve bir ara protein olan N reseptör etkileşim proteini 1 (NRIP1) katkısıyla TMV replikaz proteininin 50-kDa'lık helikaz bölgesini (p50) tanımaktadır ve sonunda antiviral direnci aktive etmektedir. N ve replikaz proteini arasındaki moleküler etkileşim, HR ile ilişkilenen direnci başlatmaktadır ve ardından sistemik kazanılmış direnç (SAR) oluşmaktadır. N geni taşıyan tütün bitkileri TMV ile enfekte olduğunda, SA birikmektedir ve bu da savunma ile ilgili genlerin ifadesini başlatmaktadır. Ayrıca enfekte olmayan kısımlarda SAR gelişimine katkı sağlamaktadır (Dinesh-Kumar et al., 2000).

Sw-5b, *Solanum peruvianum*'dan elde edilen ve TSWV etmenine karşı direnç sağlayan bir CNL'dir. Bu direnci, viral hareket proteininin (NSm) içindeki küçük bir peptidi tanıyarak sağlamaktadır (Li et al., 2019). Oldukça büyük leucine-rich repeat (LRR) domaini içeren *Tsw* ise *Capsicum chinense*'den elde edilmistir ve biberde *O. tomatomaculæ* etmenine dayanıklılık

sağlamaktadır. *Tsw*'nin tanıma mekanizması dolaylıdır ve yakın zamanda ortaya çıkarılmıştır. TSWV tarafından kodlanan yapısal olmayan NSs proteini, fitohormon reseptörlerinin (COI1, TIR1, MAX2) bir baskılayıcısı olan Teosinte Branched1/Cycloidea/Proliferating Cell Factor1 21 (TPC21)'i hedef alarak, bu reseptörlerle etkileşimini artırmaktadır. Böylece hormonal yanıtların baskılanmasını sağlamaktadır. Dolayısıyla TCP21, *Tsw* tarafından viral NSs proteininin aktivitesini algılamak üzere “korunan” bir efektör hedefi olarak kullanılmaktadır (Chen et al., 2023). Ancak son yıllarda, domatestes *Sw5b* geninin, biberde ise *Tsw* geninin sağladığı dayanıklılığın kırıldığı bildirilmiş olup, farklı ülkelerde dayanıklılığı kıran izolatlardaki mutasyonlar hâlen rapor edilmektedir. *Tsw* geninin dayanıklılığının kırılmasında, virüsün NSs geninde meydana gelen mutasyonlar etkili olurken *Sw5b* geninin dayanıklılığının kırılmasında ise esas olarak NSm genindeki mutasyonlar rol oynamaktadır (Lopez et al., 2011; Almási et al., 2020).

Tm-2² geni, başka bir CNL sınıfı direnç geni olup TMV ile tomato mozaik virus (ToMV; species *Tobamovirus tomatotessellati*, genus *Tobamovirus*, family *Virgaviridae*) etmenlerine karşı uzun yıllardır direnç sağlamaktadır. Bu direnç, hücre zarında virüsün hareket proteini (MP) aracılığıyla tanınması ile gerçekleşmektedir. Ancak ToBRFV, domatestes uzun yıllar boyunca dayanıklılık sağlayan dominant *Tm-1* ve *Tm-2/Tm-2²* genlerine sahip bitkileri enfekte edebilmektedir. Güncel araştırmalar, ToBRFV'ye ait hareket proteininin amino asit diziliminde meydana gelen belirli değişimlerin, bu proteinin *Tm-2²* tarafından tanınmasını engellediğini göstermektedir (Hak & Spiegelman, 2021).

Konukçu Faktörlerinin Manipülasyonu ile Virüs Enfeksiyonu

Hücre içi parazitik yapıları nedeniyle virüsler, hayatta kalabilmek için konukçu bitkinin hücresel mekanizmalarına bağımlıdır. Virüs, bitki hücrelerine girdikten sonra viral genom kapsitten serbest bırakılmaktadır ve ardından viral proteinler sentezlenmektedir. Sınırlı sayıda gene sahip olmaları nedeniyle virüsler, başarılı bir enfeksiyon döngüsünü (replikasyon, transkripsiyon ve translasyonun yanı sıra hücreden hücreye ve uzun mesafeli hareket) gerçekleştirmek için birçok konukçu faktörüne ihtiyaç duymaktadır. Gerçekleştirilen çalışmalarda virüs enfeksiyonunda kullanılan yüzden fazla gen tanımlanmıştır, ancak virüs türleri açısından genlerin çok azının ortak olması, her bir virüsün konukçu faktörlerini farklı şekilde kullandığını göstermektedir (Truniger & Aranda, 2009).

Resesif Dayanıklılık

Virüs enfeksiyon döngüsü için gerekli bir konukçu faktörünün yokluğu veya değiştirilmesi etkili bir savunma yaklaşımı olarak görülmektedir ve pasif dayanıklılık biçimi olarak kabul edilmektedir. Bu tür pasif direnç genellikle resesif kalıtım sergilemektedir. Örneğin, eIF4E, Messenger RNA'ları

ribozomal komplekse olarak translasyon başlangıcında önemli bir rol oynamaktadır ve farklı viral etmenlerin enfeksiyonu için gerekli bir konukçu faktör olarak farklı tanımlanmıştır. eIF4E'nin doğal varyasyonu, potyviruslere karşı bitkilerde direnç sağlayabilmektedir; bu nedenle, konukçu faktörlerinin modifikasyonu, dirençli çeşitlerin geliştirilmesi kullanılabilir (Yeaman et al., 2007; Gunes, 2024).

Virüs için gerekli olan konukçu faktörlerini değiştirmek, bitkilerde viral direnç sağlamak için ilgi çekici bir yaklaşımdır ancak hedef konukçu faktörünün işlevi iyi anlaşılmamışsa ilgili genin devre dışı bırakılması bitkinin büyümesini ve gelişimini olumsuz etkileyebilmektedir. Ancak, işlevsel olarak bitki için gereksiz olan faktörler potansiyel etkisi açısından ise dayanıklılığı kıran viral ırklar da başka bir risk oluşturmaktadır. Ayrıca bir resesif genin yokluğu bazı virüslere karşı duyarlılığı artırırken diğerlerine karşı direnç kazandırabilmektedir. Bu, bitki-virüs etkileşimlerinin karmaşıklığını göstermektedir (Akhter et al., 2021).

Öte yandan, antiviral direnç sağlamada, eIF4E1'in anlamlı olmayan baz değişimleri veya küçük çerçeveye içi silmeler taşıyanlar işlevsel alellerinin, domates bitkilerinde null aleli göre daha iyi olduğu bildirilmiştir. Domates bitkisi iki eIF4E (eIF4E1 ve eIF4E2), eIF(iso)4E ve nCBP proteinlerine sahiptir. Doğal bir eIF4E1 aleli olan *pot1*, yabani bir domates türünden (*Solanum habrochaites*) izole edilmiştir ve bu alelin, Potato virus Y (PVY; species *Potyvirus yituberosi*, genus *Potyvirus*, family *Potyviridae*) ve tobacco etch virus (TEV; species *Potyvirus nicotianainsculpentis*, genus *Potyvirus*, family *Potyviridae*) ırklarına karşı EMS (etil metansülfonat) ile rastgele mutasyona uğratılmış domates bitkileri kullanılarak elde edilen null alele kıyasla daha geniş dayanıklılık spektrumu sağladığı gösterilmiştir (Gauffier et al., 2016).

Pot1'in sağladığı geniş dayanıklılık spektrumunun, *eIF4E1* ve *eIF4E2* double mutantının sağladığı dirençle karşılaştırılabilir olduğu bulunmuştur. *Pot1*'in virüs enfeksiyonunu destekleme işlevine sahip olmadığı ancak *eIF4E2* ile rekabet edebildiğini veya onun virüslerle etkileşimini engelleyebildiği gösterilmiştir. *eIF4E1* ve *eIF4E2* double mutant hattında gözlemlenen büyüme bozukluğu, *pot1* alelinin domates üretimindeki faydasını ortaya koymaktadır. Bu bulgular, örneğin *pot1* gibi doğal varyantların bitki üretiminde gen düzenlemelerine göre daha sürdürülebilir ve etkili bir çözüm olabileceğini göstermektedir (Piron et al., 2010).

Bazı virüsler alışılmadık konukçu faktörlerini kullanabilmektedir. Bu yüzden virüse dayanıklılık sağlamak amacıyla virüsün ihtiyaç duyduğu konukçu faktörlerini manipüle etmek için öncelikle viral enfeksiyon döngüsünün ayrıntılı bir şekilde anlaşılması gerekmektedir. Bununla birlikte konukçu faktörlerinin virüs yaşam döngüsünde yeni keşfedilen işlevleri ile orijinal işlevleri arasında tutarsızlıklar olabilmektedir. (Akhter et al., 2021). Örneğin,

bir reseptör benzeri kinaz olan BAM1'in, *A. thaliana*'da RNA susturulmasının sistemik yayılmasını kolaylaştırmak için plasmodesmatada bulunduğu gösterilmişken (Rosas-Diaz et al., 2018), *N. benthamiana*'da TMV'nin hareket proteiniyle bağlanarak enfeksiyonun erken aşamasında TMV'nin hücreden hücreye hareketini desteklediği bildirilmiştir (Tran and Citovsky, 2021). Ayrıca rgs-CaM, RNA susturulmasının endojen bir baskılayıcısı olarak tanımlanırken SA sinyalleme altında CMV etmeninin RNA susturma baskılayıcısı olan 2b'ye bağlanarak ve onun yıkımını yönlendirerek etmene karşı savunmada görev almaktadır (Tadamura et al., 2012). Çalışmalarda ortaya çıktığı gibi savunma ile ilgili genler bile antiviral direnç oluşturmak için etkili bir hedef haline gelme potansiyeline sahiptir. Normalde, antiviral savunma mekanizmalarında görev alan bazı genlerin yokluğu farklı mekanizmaların devreye girmesiyle daha güçlü bir savunma sağlayabilmektedir.

Son yıllarda genom düzenleme teknolojilerinin gelişmesiyle, artık çeşitli hedef konukçu faktörleri özel olarak düzenlenebilmektedir. Bazı düzenlemeler sonucu bitkiler, sadece hedef virüse karşı değil aynı zamanda diğer virüslere karşı da beklenmedik dayanıklılık kazanabilmektedir. Dayanıklılık sağlamak için ümit vaat eden konukçu faktörlerini keşfetmek ve bunların için nasıl düzenlenebileceğini bulmak adına daha fazla bilgiye ve araştırmaya ihtiyaç vardır. Bu nedenle, konukçu faktörlerinin işlevleri anlaşılıp manipüle edilerek virüs dayanıklı bitkiler üretme olasılığı kapsamlı bir şekilde araştırılmalıdır (Akhter et al., 2021).

Viral Proteinlerin Otofajik Yıkım Hedefleri Olarak Tanınması

Otofaji, hücrel homeostaz ve stres tepkileri için hayati öneme sahip, evrimsel olarak korunmuş bir yıkım ve geri dönüşüm sistemidir. Otofajinin hedefi, tek bir proteinden büyük protein komplekslerine ve hatta tüm organelle kadar değişebilmektedir. Memelilerde otofaji, viral proteinleri ve hatta tüm viryonları yok ederek antiviral bir rol oynamaktadır (Kushwaha et al., 2019; Wu et al., 2022). Otofaji, hücrenin içinde bulunan viral bileşenlerin (proteinler ve RNA) hücre içindeki bir çöp torbasına yerleştirilip yok edilmesidir.

Son yıllarda, yapılan pek çok çalışma otofajinin bitki-virüs etkileşimlerinde de önemli bir rol oynadığını göstermekte, virüsler de bu yolla etkisiz hale getirilmektedir. Hedefler, Fagofor (phagophore) adı verilen özel bir çift zar yapısı tarafından çevrelenerek içeriği parçalamak üzere vakuolle birleşen ve otofagozom (autophagosome) adı verilen bir vezikül oluşturmaktadır. Bu süreç, otofajiyle ilişkili genlerin (ATG'ler, ATGs) aktivasyonu ile başlatılmaktadır. ATG8 ailesi proteinleri hem otofagozom oluşumunun hem de seçici kargo alımının ana düzenleyicileridir (Gomes & Dikic, 2014; Yang et al., 2020; Wu et al., 2022).

Belirli viral proteinlerin otofaji hedefi olduğu gösterilmiştir; bu da bir tanıma mekanizmasının varlığını ima etmektedir. Otofaji kargo reseptörü

olan NEIGHBOR OF BRCA1 (NBR1), CaMV etmeninin kapsid proteinine ve tüm viryonlarına doğrudan bağlanarak onların vakuolde parçalanmasını sağlamaktadır (Hafrén et al., 2017). Ayrıca, NBR1, TuMV tarafından kodlanan HC-Pro adlı VSR'yi hedef almaktadır ve bu sayede antiviral bir etki göstermektedir (Hafrén et al., 2018). Potyvürüslerden HC-Pro ve CMV'den 2b proteini gibi VSR'lerin, otofajik yıkım için, çift sarmallı RNA bağlanma bölgelerini tanıyabilen rgs-CaM adlı kalmodülün benzeri protein tarafından hedeflendiği öne sürülmektedir. Buda bağımsız olarak evrilen çeşitli virüslerden gelen VSR'lerin tanınmasını sağlar. rgs-CaM'in, çift sarmallı RNA'ya bağlanan bölgeleri tanıyarak, evrimsel olarak bağımsız şekilde gelişmiş çeşitli virüslerin VSR proteinlerini tanıdığı düşünülmektedir (Hafrén et al., 2017; Hafrén et al., 2018; Wu et al., 2022).

Otofajinin temel bileşenlerinden biri olan Beclin1/ATG6, TuMV etmeninin RdRP (N1b) proteininin hedeflenmesi yoluyla antiviral seçici kargo reseptörü olarak işlev gördüğü ileri sürülmüştür. Dikkat çekici bir şekilde Beclin1'in, plum pox virus (PPV; species *Potyvirus plumipoxi*, genus *Potyvirus*, family *Potyviridae*), Soybean mosaic virus (SMV; species *Potyvirus glycitesellati*, genus *Potyvirus*, family *Potyviridae*), Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV; species *Tobamovirus viridimaculæ*, genus *Tobamovirus*, family *Virgaviridae*) ve pepino mosaic virus (PepMV; species *Potexvirus pepini*, genus *Potexvirus*, family *Alphaflexiviridae*) gibi diğer virüslerden gelen RdRP'lerle de etkileşime girdiği bulunmuştur. Muhtemelen bu etkileşim, bu viral proteinlerde bulunan korunmuş GDD motifini hedefleyerek gerçekleşmektedir. Bu sonuçlar, Beclin1'in GDD motifine sahip RdRP'lere sahip geniş bir virüs yelpazesini hedef alacak şekilde evrimleşmiş olabileceğini göstermektedir (Li et al., 2018).

Viral proteinleri tanıyan başka bir önerilen seçici otofaji kargo reseptörü P3IP'dir. Bu reseptör, hem Rice stripe virus (RSV; species *Tenuivirus oryzalavatae*, genus *Tenuivirus*, family *Phenuiviridae*) P3 proteini hem de ATG8 ile etkileşerek, P3'ün otofajik yıkımını ve virüsün enfeksiyonunu sınırlamaktadır (Jiang et al., 2021). ATG8 ile doğrudan etkileşimin, tomato leaf curl virus (ToLCV; species *Begomovirus solanumaustraliaense*, genus *Begomovirus*, family *Geminiviridae*) Rep proteininin ve cotton leaf curl Multan virus (CL-CUMV; species *Begomovirus gossypimultanense*, genus *Begomovirus*, family *Geminiviridae*) bC1 proteininin yıkımını sağladığı düşünülmektedir (Li et al., 2020).

Viral Proteinlerin Ubikuitin/Proteazom Sistemi Yoluyla Yıkım Hedefleri Olarak Tanınması

Ubikuitin/proteazom sistemi (ubiquitin/proteasome system, UPS), küçük peptid ubikuitinin (ubiquitin) hedef proteine bağlanmasını sağlayan enzimatik bir kaskad ile başlayıp bu proteinin 26S proteazom (proteasome) ta-

rafından yıkımıyla sonuçlanan ana hücrel proteolitik yoldur. Otofaji gibi, UPS de hücrel homeostazın korunması için gereklidir ve antiviral savunma dahil olmak üzere stres tepkilerinde rol oynamaktadır (Dubiella et al., 2021).

Bitki virüsleri tarafından kodlanan ve UPS'nin doğrudan hedefi olan proteinlere dair örnekler literatürde bulunmaktadır. Bu durum, ubiquitinasyon kaskadının (ubiquitination cascade) son adımını yöneten ve sürece özgüllük kazandıran ubiquitin ligaz enzimlerinin, viral proteinleri tanıyabileceğini göstermektedir. Ancak, viral proteinlerin modifikasyonunu sağlayan ubiquitin ligazların ne olduğu genellikle belirsizdir. İstisnalar arasında, tütün Ring Finger Protein 1 (NtRFP1), tomato yellow leaf curl China virus (TY-LCCN; species *Begomovirus solanumflavuschinaense*, genus *Begomovirus*, family *Geminiviridae*) bC1 proteiniyle etkileşerek onun ubiquitinasyonunu sağlamaktadır (Shen et al., 2016; Dubiella et al., 2021).

SONUÇ

Virüs-bitki etkileşimlerinin incelenmesi heyecan verici bir araştırma alanı olmakla beraber kendi zorluklarını da beraberinde getirmektedir. Virüsler, bir nükleik asit genomu ve protein kapsidinden oluşan, polifiletik bir grup hücre içi parazitlerdir. Virüslerin özgün yaşam döngüleri ve enfeksiyon süreçleri nedeniyle, genel bitki-patojen etkileşimleri ve bitki bağışıklığının işleyişine ilişkin mevcut çerçeve, virüsleri ve savunma ile etkileşimlerini tam olarak kapsayamamaktadır.

Bununla birlikte, viral nükleik asitler ve virüs tarafından kodlanan proteinler veya viral aktiviteler, enfekte olmuş bitki hücrelerinde algılanabilmektedir. Viral proteinlerin doğrudan tanınması, enfekte olmuş hücrenin kendi moleküler mekanizması tarafından üretilen proteinleri “kendinden olmayan” olarak ayırt edebilmesini gerektirmektedir. Virüslerin ve bitki konukçularının birlikte evrimleşmesi, potansiyel bir patojen virüs tarafından kodlanan belirli polipeptitlere bağlanabilen hücrel proteinlerin seçilmesini sağlayabilmektedir. Ancak, virüslerin muazzam çeşitliliği göz önüne alındığında, büyük viral tür grupları tarafından kodlanan proteinler arasında paylaşılan ortak noktaların tanınması daha etkili bir strateji olabilir. Virüsler bitkide hücrel mekanizmaları ele geçirerek hücre işlevlerini altüst etmektedir ve hücrel ortamda dramatik değişikliklere neden olmaktadır. Bu nedenle, bu tür değişikliklerin bir patojen saldırısı işareti olarak algılanabileceği ve savunma mekanizmalarını harekete geçirebileceği düşünülebilir. Örneğin, Tsw'de olduğu gibi NLR'ler tarafından dolaylı algılama aslında viral bileşenlerin değil, viral aktivitenin algılanması olabilir. RNA susturma yollarına yönelik viral müdahale de algılanabilir. Viral döngüye yönlendirilen belirli hücrel bileşenlerin tükenmesi, enfekte hücre tarafından algılanabilmektedir. Örneğin, konukçu mRNA ve protein seviyelerindeki azalma, viral enfeksiyonun bir işareti olarak algılanabilmektedir. Ancak, viral aktivitelerin hücre

resel homeostazı bozmasının algılanmasına ilişkin moleküler mekanizmalar henüz tam olarak karakterize edilmemiştir.

Bitkilerin hücrelerine yapılan viral saldırıyı algıladığı ve virüs kaynaklı tehlike sinyallerinin antiviral yanıtları başlattığı açıktır. Bu olası sinyallerin doğası ve çeşitliliği ile bunların algılanmasının mekanistik temelleri yeni açıklığa kavuşmaktadır. RNA susturma (RNAi), bitkilerde ana antiviral savunma mekanizması olarak kabul edilmektedir. RNAi, bitkide viral enfeksiyonun bir işareti olan çift sarmallı RNA'nın (dsRNA) varlığı ile tetiklenmektedir. Ancak virüsler, virüs kodlu VSR'ler (RNA susturma baskılayıcıları) ile RNA susturmasını baskılayabilmektedir. RNA susturmasında yer almayan bazı bitki proteinleri, hücre içine giren viral nükleik asitleri algılayabilmektedir. Bitkiye harici olarak nükleik asitler de bitkilerde savunma yanıtlarını tetikleyebilmektedir, ancak bunların algılanmasının moleküler ve hücresel temelleri tam olarak açıklanmamıştır. PTI, antiviral rol oynamakla birlikte virüs tarafından kodlanan proteinler de bu yanıtları baskılayabilmektedir. Virüs tarafından kodlanan proteinler, farklı hücre altı konumlarda NLR'ler tarafından tanınarak direnç mekanizmalarını harekete geçirebilmektedir. Virüs kaynaklı proteinler, otofaji veya Ubikuitin/Proteazom Sistemi yoluyla parçalanabilmektedir. Sonuç olarak, virüs-bitki etkileşimlerini bitki viral hastalıkların yayılmasını önlemek veya azaltmak için etkili stratejilerin tasarlanması adına kritik bir hedeftir.

Kaynakça

- Akhter, M. S., Nakahara, K. S., & Masuta, C. (2021). Resistance induction based on the understanding of molecular interactions between plant viruses and host plants. *Virology journal*, 18(1), 176.
- Almási, A., Nemes, K., & Salanki, K. (2020). Increasing diversity of resistance breaking pepper strains of Tomato spotted wilt virus in the Mediterranean region. *Phytopathologia Mediterranea*, 59(2), 385-391.
- Barton DA, Roovers EF, Gouil Q, da Fonseca GC, Reis RS, et al. 2017. Live cell imaging reveals the relocation of dsRNA binding proteins upon viral infection. *Mol. Plant Microbe Interact.* 30:435-43
- Baulcombe DC. 2022. The role of viruses in identifying and analyzing RNA silencing. *Annu. Rev. Virol.* 9:353-73
- Belshaw, R., Gardner, A., Rambaut, A., & Pybus, O. G. (2008). Pacing a small cage: mutation and RNA viruses. *Trends in ecology & evolution*, 23(4), 188-193.
- Bentham AR, De la Concepcion JC, Mukhi N, Zdrzalek R, Draeger M, et al. 2020. A molecular roadmap to the plant immune system. *J. Biol. Chem.* 295:14916-35
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W. X., Ji, L. H., Ding, S. W., & Baulcombe, D. C. (1998). Retracted: Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *The EMBO journal*.
- Burguán J, Havelda Z. Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci.* 2011; 16:265-72.
- Butterbach P, Verlaan MG, Dullemans A, Lohuis D, Visser RGF, Bai Y, et al. Tomato yellow leaf curl virus resistance by Ty-1 involves increased cyto sine methylation of viral genomes and is compromised by cucumber mosaic virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111:12942-7.
- Carbonell A, García JA, Simón-Mateo C, Hernández C. 2016. Plant virus RNA replication. *eLS*.
- Ceniceros-Ojeda EA, Rodríguez-Negrete EA, Rivera-Bustamante RF. 2016. Two populations of viral minichromosomes are present in a geminivirus-infected plant showing symptom remission (recovery). *J. Virol.* 90:3828-38
- Chen, J., Zhao, Y., Luo, X., Hong, H., Yang, T., Huang, S., ... & Tao, X. (2023). NLR surveillance of pathogen interference with hormone receptors induces immunity. *Nature*, 613(7942), 145-152.
- Chiu, M. H., Chen, I. H., Baulcombe, D. C. & Tsai, C. H. The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Mol. Plant Pathol.* 11, 641-649 (2010).
- Chung, B. N., Lee, J. H., Kang, B. C., Koh, S. W., Joa, J. H., San Choi, K., & Ahn, J. J. (2018). HR-mediated defense response is overcome at high temperatures in *Capsicum* species. *The plant pathology journal*, 34(1), 71.

- Cook DE, Mesarich CH, Thomma BPHJ. 2015. Understanding plant immunity as a surveillance system to detect invasion. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53:541–63
- Csorba T, Kontra L, Burgyán J. 2015. viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology* 479:85–103
- DeFalco TA, Zipfel C. Molecular mechanisms of early plant pattern-triggered immune signaling. *Mol Cell.* 2021;81(17):3449–3467
- Dinesh-Kumar SP, Tham WH, Baker BJ. Structure-function analysis of the tobacco mosaic virus resistance gene N. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97:14789–14789
- Dubiella U, Serrano I. 2021. The ubiquitin proteasome system as a double agent in plant-virus interactions. *Plants* 10:928
- Eamens AL, Wook Kim K, Waterhouse PM. 2012. DRB2, DRB3 and DRB5 function in a non-canonical microRNA pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal. Behav.* 7:1224–29
- Escocard de Azevedo Manhães AM, Ortiz-Morea FA, He P, Shan LB. 2021. Plant plasma membrane-resident receptors: surveillance for infections and coordination for growth and development. *J. Integr. Plant Biol.* 63:79–101
- Fátyol K, Fekete KA, Ludman M. 2020. Double-stranded-RNA-binding protein 2 participates in antiviral defense. *J. Virol.* 94: e00017-20
- Felix, G., Duran, J. D., Volko, S. & Boller, T. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* 18,265–276 (1999)
- Gauffer C, Lebaron C, Moretti A, Constant C, Moquet F, Bonnet G, et al. A TILLING approach to generate broad-spectrum resistance to potyviruses in tomato is hampered by eIF4E gene redundancy. *Plant J.* 2016; 85:717–29.
- Gomes LC, Dikic I. Autophagy in antimicrobial immunity. *Mol Cell.* 2014; 54:224–33
- Guo, H., Song, X., Xie, C., Huo, Y., Zhang, F., Chen, X., ... & Fang, R. (2013). Rice yellow stunt rhabdovirus protein 6 suppresses systemic RNA silencing by blocking RDR6-mediated secondary siRNA synthesis. *Molecular plant-microbe interactions*, 26(8), 927-936.
- Ghoshal B, Sanfacon H. 2014. Temperature-dependent symptom recovery in *Nicotiana benthamiana* plants infected with tomato ringspot virus is associated with reduced translation of viral RNA2 and requires ARGONAUTE 1. *Virology* 456:188–9
- Güneş, N. (2024). Bitki Virüslerine Dayanıklılıkta Ökaryotik Translasyon Başlatma Faktörü (eIF4). *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 79.
- Haas, G., Azevedo, J., Moissiard, G., Geldreich, A., Himber, C., Bureau, M., ... & Voinnet, O. (2008). Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. *The EMBO journal*, 27(15), 2102-2112.
- Hafrén A, Macia J-L, Love AJ, Milner JJ, Drucker M, Hofius D. 2017. Selective autophagy limits cauliflower mosaic virus infection by NBR1-mediated targeting of

viral capsid protein and particles. PNAS 114:E2026–35

- Hafrén A, Üstün S, Hochmuth A, Svenning S, Johansen T, Hofius D. 2018. Turnip mosaic virus counteracts selective autophagy of the viral silencing suppressor HCpro. *Plant Physiol.* 176:649–62
- Hak, H., & Spiegelman, Z. (2021). The tomato brown rugose fruit virus movement protein overcomes Tm-22 resistance in tomato while attenuating viral transport. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 34(9), 1024–1032.
- Hiraguri A, Itoh R, Kondo N, Nomura Y, Aizawa D, et al. 2005. Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 57:173–88
- Huang C, Sede AR, Elvira-González L, Yan Y, Rodriguez ME, et al. 2023. dsRNA-induced immunity targets plasmodesmata and is suppressed by viral movement proteins. *Plant Cell* 35:3845–69
- Iki, T., Tschopp, M. A., & Voinnet, O. (2017). Biochemical and genetic functional dissection of the P38 viral suppressor of RNA silencing. *Rna*, 23(5), 639–654.
- Incarbone M, Zimmermann A, Hammann P, Erhardt M, Michel F, Dunoyer P. 2017. Neutralization of mobile antiviral small RNA through peroxisomal import. *Nat. Plants* 3:17094
- Incarbone M, Clavel M, Monsion B, Kuhn L, Scheer H, et al. 2021. Immunocapture of dsRNA-bound proteins provides insight into Tobacco rattle virus replication complexes and reveals *Arabidopsis* DRB2 to be a wide-spectrum antiviral effector. *Plant Cell* 33:3402–20
- Jamieson, P. A., Shan, L., and He, P. (2018) Plant cell surface molecular cypher: receptor-like proteins and their roles in immunity and development. *Plant Sci.* 274, 242–251 CrossRef Medline
- Jewehan, A., Salem, N., Tóth, Z., Salamon, P., & Szabó, Z. (2022). Evaluation of responses to tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) and selection of resistant lines in *Solanum habrochaites* and *Solanum peruvianum* germplasm [Erratum: July 2022, v. 88 (4); p. 285].
- Jin, Y., Zhao, J. H., & Guo, H. S. (2021). Recent advances in understanding plant antiviral RNAi and viral suppressors of RNAi. *Current Opinion in Virology*, 46, 65–72.
- Jiang L, Lu Y, Zheng X, Yang X, Chen Y, et al. 2021. The plant protein NbP3IP directs degradation of Rice stripe virus p3 silencing suppressor protein to limit virus infection through interaction with the autophagy-related protein NbATG8. *New Phytol.* 229:1036–51
- Jones JDG, Dangl JL. The plant immune system. *Nature.* 2006; 444:323–9.
- Kim H, Shimura H, Masuta C. Advancing toward commercial application of RNA silencing-based strategies to protect plants from viral diseases. *J Gen Plant Pathol.* 2019; 85:321–8.
- Konakalla NC, Bag S, Deraniyagala AS, Culbreath AK, Pappu HR. Induction of plant

- resistance in tobacco (*Nicotiana tabacum*) against tomato spotted wilt orthotospovirus through foliar application of dsRNA. *Viruses*. 2021; 13:662.
- Körner CJ, Klauser D, Niehl A, Dominguez-Ferreras A, Chinchilla D, Boller T, Heinlein M, Hann DR. The immunity regulator BAK1 contributes to resistance against diverse RNA viruses. *Mol Plant Microbe Interact*. 2013;26(11):1271–1280.
- Körner CJ, Pitzalis N, Peña EJ, Erhardt M, Vazquez F, Heinlein M. 2018. Crosstalk between PTGS and TGS pathways in natural antiviral immunity and disease recovery. *Nat. Plants* 4:157–64
- Kozieł, E., Bujarski, J. J., & Kozieł, K. O. (2023). Plant cell apoplast and symplast dynamic association with plant-RNA virus interactions as a vital effect of host response. In *Plant RNA Viruses* (pp. 311–328). Academic Press.
- Kushwaha NK, Hafrén A, Hofius D. 2019. Autophagy–virus interplay in plants: from antiviral recognition to proviral manipulation. *Mol. Plant Pathol*. 20:1211–16
- Li F, Zhang C, Li Y, Wu G, Hou X, et al. 2018. Beclin1 restricts RNA virus infection in plants through suppression and degradation of the viral polymerase. *Nat. Commun*. 9:1268
- Li, J., Huang, H., Zhu, M., Huang, S., Zhang, W., Dinesh-Kumar, S. P., & Tao, X. (2019). A plant immune receptor adopts a two-step recognition mechanism to enhance viral effector perception. *Molecular plant*, 12(2), 248–262.
- Li Q, Wang C, Mou Z. 2020a. Perception of damaged self in plants. *Plant Physiol*. 182:1545–65
- Liu H, Chang Z, Zhao S, Gong P, Zhang M, et al. 2023. Functional identification of a novel C7 protein of tomato yellow leaf curl virus. *Virology* 585:117–26
- Li F, Zhang M, Zhang C, Zhou X. 2020b. Nuclear autophagy degrades a geminivirus nuclear protein to restrict viral infection in solanaceous plants. *New Phytol*. 225:1746–61
- Lopez, C., Aramburu, J., Galipienso, L., Soler, S., Nuez, F., & Rubio, L. (2011). Evolutionary analysis of tomato Sw-5 resistance-breaking isolates of Tomato spotted wilt virus. *Journal of General Virology*, 92(1), 210–215.
- Lopez-Gomollon S, Baulcombe DC. 2022. Roles of RNA silencing in viral and non-viral plant immunity and in the crosstalk between disease resistance systems. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio*. 23:645–62
- Lozano-Durán, R. (2024). Viral Recognition and Evasion in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 75.
- Luna AP, Morilla G, Voinnet O, Bejarano ER. 2012. Functional analysis of gene-silencing suppressors from tomato yellow leaf curl disease viruses. *Mol. Plant Microbe Interact*. 25:1294–306
- Luo H. Interplay between the virus and the ubiquitin-proteasome system: molecular mechanism of viral pathogenesis. *Curr Opin Virol*. 2016; 17:1–10.
- Melnyk CW, Molnar A, Baulcombe DC. 2011. Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *EMBO J*. 30(17):3553–63

- Nakahara KS, Masuta C. 2014. Interaction between viral RNA silencing suppressors and host factors in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol.* 20:88–95.
- Niehl A, Wyrsh I, Boller T, Heinlein M. Double-stranded RNAs induce a pattern-triggered immune signaling pathway in plants. *New Phytol.* 2016;211(3):1008–1019.
- Nielsen, C. P. S., Arribas-Hernández, L., Han, L., Andersen, S. U., Pumplin, N., & Brodersen, P. (2023). Evidence for an RNAi-independent role of DICER-LIKE2 in conferring growth inhibition and basal antiviral resistance. *bioRxiv*, 2023-01.
- Piedra-Aguilera A, Jiao C, Luna AP,Villanueva F, Dabad M,et al. 2019. Integrated single-base resolution maps of transcriptome, sRNAome and methylome of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in tomato. *Sci. Rep.* 9:2863
- Piron F, Nicolai M, Minoia S, Piednoir E, Moretti A, Salgues A, et al. An induced mutation in tomato eiF4E leads to immunity to two potyviruses. *PLoS ONE.* 2010;5: e11313.
- Pumplin, N., & Voinnet, O. (2013). RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 745-760.
- Rosas-Diaz T, Zhang D, Fan P, Wang L, Ding X, Jiang Y, et al. A virustargeted plant receptor-like kinase promotes cell-to-cell spread of RNAi. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018; 115:1388–93
- Ruiz-Ferrer, V. & Voinnet, O. Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 485–510 (2009).
- Shen Q, Hu T, Bao M, Cao L, Zhang H, et al. 2016. Tobacco RING E3 ligase NtRFP1 mediates ubiquitination and proteasomal degradation of a geminivirus-encoded bC1. *Mol. Plant* 9:911–25
- Sijen, T., Vijn, I., Rebocho, A., van Blokland, R., Roelofs, D., Mol, J. N., & Kooter, J. M. (2001). Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Current Biology*, 11(6), 436-440.-
- Tadamura K, Nakahara KS, Masuta C, Uyeda I. Wound-induced rgs- CaM gets ready for counterresponse to an early stage of viral infection. *Plant Signal Behav.* 2012; 7:1548–51.
- Teixeira RM, Ferreira MA, Raimundo GAS, Fontes EPB. Geminiviral triggers and suppressors of plant antiviral immunity. *Microorganisms.* 2021; 9:775.
- Tran PT, Citovsky V. Receptor-like kinase BAM1 facilitates early movement of the Tobacco mosaic virus. *Commun Biol.* 2021; 4:1–11.
- Truniger V, Aranda MA. Recessive resistance to plant viruses. *Adv Virus Res.* 2009; 75:119–59
- Tsuda, K., & Katagiri, F. (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current opinion in plant biology*, 13(4), 459-465.

- Varden, F. A., De la Concepcion, J. C., Maidment, J. H. R., and Banfield, M. J. (2017) Taking the stage: effectors in the spotlight. *Curr. Opin. Plant Biol.* 38, 25–33
- Vogler, H., Akbergenov, R., Shivaprasad, P. V., Dang, V., Fasler, M., Kwon, M. O., ... & Heinlein, M. (2007). Modification of small RNAs associated with suppression of RNA silencing by tobamovirus replicase protein. *Journal of virology*, 81(19), 10379-10388.
- Wan L, Essuman K, Anderson RG, Sasaki Y, Monteiro F, et al. 2019. TIR domains of plant immune receptors are NADC-cleaving enzymes that promote cell death. *Science* 365:799–803
- Wang, X. B. et al. The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative Argonautes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23, 1625–1638 (2011).
- Wang, W., Feng, B., Zhou, J. M., & Tang, D. (2020a). Plant immune signaling: Advancing on two frontiers. *Journal of integrative plant biology*, 62(1), 2-24.
- Wang, L., Ding, Y., He, L., Zhang, G., Zhu, J. K., & Lozano-Duran, R. (2020b). A virus-encoded protein suppresses methylation of the viral genome through its interaction with AGO4 in the Cajal body. *Elife*, 9, e55542.
- Whitham, S. A., & Wang, Y. (2004). Roles for host factors in plant viral pathogenicity. *Current opinion in plant biology*, 7(4), 365-371.
- Wu W, Luo X, Ren M. 2022. Clearance or hijack: universal interplay mechanisms between viruses and host autophagy from plants to animals. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 11:786348
- Yang KY, Liu Y, Zhang S. Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98:741–6.
- Yang M, Ismayil A, Liu YL. 2020. Autophagy in plant-virus interactions. *Annu. Rev. Virol.* 7:403–19
- Yeam I, Cavatorta JR, Ripoll DR, Kang BC, Jahn MM. Functional dissection of naturally occurring amino acid substitutions in eIF4E that confers recessive potyvirus resistance in plants. *Plant Cell*. 2007; 19:2913–28.
- Yuan M, Jiang Z, Bi G, Nomura K, Liu M, et al. 2021. Pattern-recognition receptors are required for NLR-mediated plant immunity. *Nature* 592:105–9
- Zhang T, Tamman H, Wallant KC, Kurata T, LeRoux M, et al. 2022. Direct activation of a bacterial innate immune system by a viral capsid protein. *Nature* 612:132–40
- Zhao L, Rosario K, Breitbart M, Duffy S. 2019. Eukaryotic circular Rep-encoding single-stranded DNA (CRESS DNA) viruses: ubiquitous viruses with small genomes and a diverse host range. *Adv. Virus Res.* 103:71–133
- Zhao S, Gong P, Ren Y, Liu H, Li H, et al. 2022. The novel C5 protein from tomato yellow leaf curl virus is a virulence factor and a suppressor of gene silencing. *Stress Biol.* 2:19



**EPIGENETİK, BEYİN DALGALARI, BİLİNÇ
VE KUANTUM: İNSAN DENEYİMİNİN ÇOK
KATMANLI ANALİZİ “NÖROBİLİMSEL
VE MOLEKÜLER PERSPEKTİFLERDEN
DİSİPLİNLERARASI BİR DEĞERLENDİRME”**

“ ”

Aslı GİRAY¹

Hasan AKGÜL²

¹ Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Antalya, Türkiye, Orcid: 0000-0002-5374-3727.

² Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Antalya, Türkiye, Orcid: 0000-0001-8514-9776.

İnsan zihni, yalnızca psikolojik süreçlerin toplamı değil; moleküler, nöro-fizyolojik ve çevresel etkilerin bir etkileşim ağı olarak anlaşılması gereken çok katmanlı bir sistemdir. Son yıllarda nörobilim, epigenetik, bilinç araştırmaları ve kuantum fiziği gibi farklı alanlarda elde edilen bulgular, zihinsel süreçlerin biyolojik, moleküler ve fiziksel boyutlarla derin bir ilişki içerisinde olduğunu ortaya koymaktadır. Günümüzde bilim insanları, zihinsel deneyimlerin gen ekspresyonunu şekillendirebileceğini ve uzun dönemli biyolojik izler bırakabileceğini göstermektedir. Bu bağlamda epigenetik mekanizmalar, bireyin çevresel deneyimlerinin genetik düzeyde bir yansıması olarak değerlendirilmektedir. Buna ek olarak, beyin dalgaları ve nöral osilasyonlar, bilinç durumlarını ve zihinsel süreçlerin dinamiklerini ortaya koymada kritik bir gösterge sunmaktadır. Kuantum fiziği ise, bilincin geleneksel nörobiyolojik modellerle açıklanamayacak bazı özelliklerini inceleyerek, insan deneyiminin sınırlarını yeniden tartışmaya açmaktadır. Bu bölümde epigenetik mekanizmalar, beyin dalgaları, bilinç süreçleri ve kuantum perspektiflerinin insan deneyiminin bütünsel bir şekilde anlaşılmasına nasıl katkı sağlandığı incelenmektedir. Bununla birlikte sadece kuramsal katkılarla sınırlı kalmayacak; klinik uygulamalarda, eğitimde, psikoterapide ve zihinsel performans geliştirme yöntemlerinde de uygulanabilir bulgular sunma potansiyeline sahiptir. Böylece, bireyin zihinsel deneyimleri ile biyolojik ve fiziksel süreçleri arasındaki bağlantılar daha bütüncül bir çerçevede ele alınabilecektir.

Zihni tek bir perspektiften anlamak, karmaşık yapısı nedeniyle yetersiz kalmaktadır. Bu yüzden zihni tam anlamıyla anlamak için, tek bir disiplinin sınırlarının dışına çıkmak gerekir. Epigenetik, çevresel ve deneyimsel etkilerin genetik düzenlemeler üzerindeki rolünü ortaya koyarken; nörobilim, beyin dalgaları ve nöral devrelerin bilinç ve davranış üzerindeki etkilerini anlamamıza olanak tanır. Kuantum fiziği ise, bilinç süreçlerinin atomik ve moleküler düzeydeki olasılık temelli özelliklerini inceleyerek yeni bir perspektif sunar.

Bu farklı disiplinlerin birleştirilmesi, insan deneyimini psikolojik, biyolojik ve fiziksel boyutlarıyla bütüncül olarak ele alma fırsatı sağlar. Disiplinlerarası yaklaşım, yalnızca teorik modellerin geliştirilmesine katkıda bulunmakla kalmaz, aynı zamanda uygulamalı araştırmaların (meditasyon, davranışsal terapi, bilinçaltı dönüşüm teknikleri) bilimsel temellere dayandırılmasını mümkün kılar. Böylece, bilimsel literatürde sıklıkla ayrı ele alınan konular arasındaki etkileşimler sistematik biçimde incelenebilir.

Mevcut literatür, epigenetik değişimlerin stres, travma veya psikolojik bozukluklarla ilişkisini ortaya koysa da genellikle belirli durumlarla sınırlı kalmaktadır. Benzer şekilde, beyin dalgaları ve bilinç durumları üzerine yapılan araştırmalar yoğun olsa da çoğu çalışmada bu bulgular epigenetik ve kuantum perspektifleriyle entegre edilmemiştir. Kuantum-bilinç teorileri ise büyük ölçüde kuramsal düzeyde kalmakta ve deneysel doğrulama eksikliği

nedeniyle bilimsel çevrelerde tartışmalı bir konumda bulunmaktadır.

Bu çalışma, literatürdeki boşlukları gidermeyi hedeflemektedir ve şu temel sorulara yanıt arayacaktır:

- Bireyin zihinsel ve duygusal deneyimleri, epigenetik mekanizmalar üzerinde nasıl etkiler bırakır?
- Beyin dalgaları ve bilinç durumları, epigenetik düzenlemeler ile nasıl ilişkilendirilebilir?
- Kuantum süreçleri, insan deneyimini açıklamada işlevsel bir model sunabilir mi?
- Disiplinlerarası yaklaşım, psikoloji, nörobilim ve sağlık bilimlerine hangi yeni bakış açıları kazandırabilir?

Bu soruların yanıtları, yalnızca bilimsel literatürdeki boşluğu doldurmakla kalmayacak; aynı zamanda bireyin zihinsel ve biyolojik bütünlüğünü anlamada yeni bir perspektif sunacaktır. Bununla birlikte insan deneyiminin biyolojik, nörofizyolojik ve kuramsal katmanlarını birleştiren bütüncül bir anlayış geliştirmeye olanak sağlayacaktır.

Epigenetik Kavramının Tarihsel Gelişimi

Epigenetik, genetik materyalin DNA dizisini değiştirmeksizin gen ekspresyonunu modüle eden biyolojik mekanizmaları inceleyen bir bilim dalıdır. 1940'larda Conrad Waddington tarafından ilk kez tanımlanan bu kavram (Waddington, 1942), son yıllarda çevresel faktörlerin genetik düzeydeki etkilerini anlamada önemli bir araç haline gelmiştir. Bu süreç, çevresel etkilerin genetik materyal üzerindeki etkilerini inceleyen bir bilim dalıdır. Örneğin, stres, beslenme ve toksinler gibi çevresel faktörlerin epigenetik düzenlemelerle bireylerin genetik ifadesini nasıl değiştirdiği üzerine yapılan çalışmalar, epigenetiğin önemini vurgulamaktadır (Fredriksson, 2023).

Bilinç ve Bilinçaltı Üzerine Nörobilimsel Yaklaşımlar

Bilim tarihi boyunca "bilinç" kavramı, felsefi tartışmaların alanı olarak görülmüş; deneysel bilimin dışına itilmiştir. Ancak 20. yüzyılın ortalarından itibaren nörobilim, kuantum fiziği ve genetik alanlarında yaşanan gelişmeler, bilincin artık yalnızca sinaptik bir çıktı değil, aynı zamanda kuantum düzeyde örgütlenmiş bir fenomen olabileceğini düşündürmektedir (Hameroff & Penrose, 2014).

Bilinç, çevremizdeki dünyayı algılamamızı ve buna tepki vermemizi sağlayan karmaşık bir zihinsel durumdur. Nörobilim, bilincin nörolojik temellerini anlamaya çalışırken, bilinçaltı süreçler, bireylerin farkında olmadan gerçekleştirdiği düşünce ve davranışları ifade eder. Modern nörobilimsel yaklaşımlar, bilinç ve bilinçaltı süreçlerin beyin yapıları ve işlevleriyle nasıl

ilişkilendirildiğini araştırmaktadır. Özellikle, bilinçli ve bilinçdışı süreçlerin beyin dalgaları ve nörotransmitter sistemleri aracılığıyla nasıl etkileşime girdiği üzerine yapılan çalışmalar, bu alandaki anlayışımızı derinleştirmektedir (Koch, 2024; Georgiev, 2023).

Bilincin kökenine ilişkin klasik modeller, sinir ağlarının kimyasal ve elektriksel etkileşimleriyle sınırlı kalırken, son dönemde yapılan çalışmalar mikrotübül düzeyinde kuantum tutarlılığının bilinç oluşumunda rol oynayabileceğini öne sürmektedir. Bu yaklaşım, “Orch-OR” (Orchestrated Objective Reduction) modeli olarak adlandırılmakta ve kuantum fiziğini biyolojik süreçlerle birleştiren ilk kapsamlı teorilerden biridir. Bilinç, yalnızca beyinde üretilen bir süreç değildir. DNA’nın elektromanyetik alanlarıyla beyin dalgaları arasında rezonans kurulabileceğini ileri süren kuantum biyolojik modeller, bilincin hücresel düzeyde yaygın bir özellik olabileceğini savunur (Hameroff & Penrose, 2014). Bu yeni anlayışa göre, bilinç yalnızca beyin ürettiği bir epifenomen değildir; tersine, evrensel kuantum alanı ile biyolojik sistemler arasındaki etkileşimin bir sonucu olabilir. Bu bağlamda epigenetik, yalnızca genlerin dışsal çevreye tepkisini değil, aynı zamanda zihinsel ve kuantumsal süreçlerin gen ifadesi üzerindeki rolünü de anlamamıza olanak tanır (Lipton, 2005).

Bu bakış açısına göre:

- Bilinç, nöronlar arasındaki kuantum dolanıklığın bir sonucu olabilir.
- DNA, bilinç bilgisini saklayan biyofotonik bir ağ olarak görev yapar.
- Epigenetik değişimler, bilinç durumlarının fiziksel izdüşümleridir (Lipton, 2005).

Bu bütünsel yaklaşım, insan deneyimini sadece nörolojik bir olgu değil, evrensel bilinçle senkronize olmuş bir enerji akışı olarak yorumlar. Kuantum bilgi teorisine göre, bilgi enerjiyle birlikte var olur ve yok olmaz; yalnızca form değiştirir (Wheeler, 1990). Bu durumda, atalarımızın yaşadığı deneyimler, yalnızca genetik materyalde değil, enerji alanlarında da kodlu olabilir. Bu “kuantum genetik bellek”, epigenetik mirasın ötesine geçer ve ruhsal kalıtım kavramına bilimsel bir temel sunar (Gariaev, 2013). Bilinç, bu bilginin “gözlemcisi” olarak işlev görür. Gözlemci etkisiyle, birey kendi genetik olasılıklarını yeniden yapılandırabilir. Bu, modern epigenetikte gözlemlenen “düşünceyle gen düzenleme” fenomenine kuantum açıklama getirir. Epigenetik ve kuantum birleştiğinde, insan yalnızca biyolojik bir varlık değil, bilinçli bir bilgi sistemi olarak tanımlanır.

Kuantum fiziği, atom altı düzeydeki parçacıkların davranışını açıklarken, bu davranışların makroskobik dünyada da etkileri olabileceğini göstermiştir. Uzun yıllar boyunca bilim insanları, canlı sistemlerin kuantum tutarlılığı sürdüremeyeceğini —çünkü “çok sıcak, çok ıslak ve çok gürültülü”

olduklarını— savunmuşlardır (Tegmark, 2000). Ancak son 20 yılda yapılan araştırmalar, doğanın bu beklentiyi aştığını göstermiştir. Örneğin, fotosentez sürecinde enerji transferinin kuantum koherens sayesinde %95'in üzerinde verimlilikle gerçekleştiği saptanmıştır (Engel et al., 2007). Benzer şekilde, kuşların manyetik yön bulma yetisi, fotonlar arası kuantum dolanıklık (entanglement) süreçleriyle ilişkilendirilmiştir (Ritz et al., 2004). Bu bulgular, kuantum süreçlerin biyolojik organizasyonun temelinde olabileceğini göstermektedir. Beyinde de benzer bir durumun yaşanabileceği düşünülmektedir. Çin'de yapılan son bir araştırma, nöron senkronizasyonunun kuantum dolanıklıkla açıklanabileceğine dair bulgular sunmuştur (Hu & Wu, 2023). Araştırmacılar, beynin yüksek düzeyde senkronize osilasyonlarının klasik sinaptik iletimle açıklanamayacağını, kuantum alan etkilerinin bu koordinasyonu sağlayabileceğini ileri sürmüştür.

İnsan beyni, maddenin en küçük bileşenlerinden oluşur. Bu bileşenler (elektron, foton, atom vs.) klasik fizik kurallarından ziyade kuantum mekaniği yasalarına tâbidir. Bazı bilim insanları, bu kuantum parçacıkların etkileşimlerinin, bilincin doğasını anlamada ipucu olabileceğini ileri sürer. Ama bu hipotez hâlâ tartışmalıdır ve deneysel kanıtları sınırlı düzeydedir (Koch, 2024). Kuantum parçacıkları, gözlemlenmediği sürece birden çok durumda (süperpozisyon) olabilir. Gözlemlenme/dış etki ile bu durum “çöker” ve tek bir duruma “karar verilir”. Koch ve ekibi, bilinçli deneyimin, bu süperpozisyonun olduğu an ile bağlantılı olabileceği fikrini ortaya koyuyor. Yani süperpozisyon çökmeleri bilinç haline (ya da proto-bilinç haline) eşlenebilir. Bu yaklaşım, Penrose–Hameroff modeline benzer ama bazı yönlerde ondan ayrılmaktadır. Bilinç, beyindeki nöronların mikrotübül adı verilen iskelet yapılarında gerçekleşen kuantum süreçlerden doğmaktadır. Mikrotübüller, hücre içinde yapı taşı görevi gören silindirik proteinlerdir. Hameroff, bu mikrotübüllerin kuantum hesaplama için uygun yapılar olduğunu öne sürmektedir. Penrose ise kuantum süperpozisyonlarının, evrenin temel yapısı gereği, belli bir süre sonunda objektif çökme yaşayacağını savunmaktadır (Objective Reduction – OR) (Penrose, 1994). Bu iki görüşün birleşimi neticesinde, mikrotübüllerdeki kuantum süperpozisyonların “orchestrated” (düzenlenmiş) biçimde çökmesiyle bilinçli deneyimlerin ortaya çıktığı öne sürülmektedir. Yani Orch-OR modeli, bilincin mikrotübül düzeyindeki kuantum çöküşlerden kaynaklandığını ifade etmektedir (Hameroff ve Penrose, 2014). Her iki yaklaşımda da bilincin ortaya çıkışı, kuantum süperpozisyonların çökmesiyle ilişkilendirilir. Yani burada “kuantum olay = bilinç deneyiminin tetikleyicisi” fikri ortak noktadır. Hem Penrose–Hameroff hem de Koch, yalnızca klasik sinirbilim modelleriyle bilincin tam açıklanamayacağını kabul etmektedir. Orch-OR modeline göre özellikle mikrotübüller, bilinç için ana sahne olarak görülmektedir. Koch'a göre ise mikrotübüller gibi belirli bir biyolojik yapıyı merkeze almaz; daha geniş ölçekte kuantum süreçlerin bilinçle ilişkili

olabileceği ileri sürülmektedir. Penrose, süperpozisyonların “evrenin temel yapısı” gereği çökmesi gerektiğini savunmaktadır (objektif çöküş). Koch, süperpozisyonların çökmesi bilinçle ilişkili olabileceğini ama bunun “objektif” bir zorunluluk değil, biyolojik süreçlere gömülü bir olasılık olduğunu ifade etmektedir. Koch, bilinci dereceli (basitten karmaşığa değişen) bir süreç olarak tanımlamaktadır (Koch, 2019; Koch, 2014). Penrose–Hameroff ise daha çok “çökme” anına odaklanmaktadır, bilinçli deneyimlerin her birinin böyle anlık kuantum olaylarla ortaya çıktığını vurgulamaktadırlar. Hameroff daha çok teorik/hipotetik çerçevede kalırken, Koch özellikle xenon izotopları gibi deneysel verilerle test edilebilir hipotezler geliştirmeye çalışmaktadır. Özetlemek gerekirse her iki yaklaşım da bilinci, kuantum süperpozisyonlarının çökmesiyle ilişkilendirir. Ancak, Penrose–Hameroff modeli mikrotübüllere odaklanırken ve “objektif çökme” teorisine dayanırken; Koch ise mikrotübüllere özel bir rol atfetmez, bilinci dereceli bir fenomen olarak görür ve daha deneysel temellere yaslanmaya çalışmaktadır.

Koch’un önerdiği model, bilincin keskin bir sınırı olmadığı, sürecin karmaşıklığına bağlı olarak “dereceli” olduğu yönünde. Yani süperpozisyon potansiyelinin büyüklüğü ile bilinç deneyiminin karmaşıklığı arasında bir ilişki olabilir. Bu model, basit bilinç biçimlerinin bile yaygın olabileceği anlamına gelebilir; yani yalnızca insan beyni değil, başka sistemler de (uygun kuantum süreçler varsa) “basit bilinç” benzeri durumlar deneyimleyebilir. En ilgi çekici önerilerden biri, insan beynini kuantum işlemci ile entangle etmeye çalışmak — yani beyinle kuantum bilgisayar arasında kuantum bağlantı kurmak. Ancak mevcut teknoloji ile bu öneri pratik olarak gerçekleştirilemez görünüyor. Daha “küçük ölçekli” deneyler öneriliyor: örneğin, farklı kimyasal izotopların (xenon gibi) kuantum özelliklerinin bilinç üzerindeki etkilerini incelemek. Özellikle 2018’de yapılan bir deneyde, kimyasal olarak aynı ama spin değerleri farklı xenon izotoplarının, farelerde farklı anestezi etkileri olduğu gözlemlenmiş. Bu, kuantum spin özelliklerinin bilinçle bağlantılı olabileceği hipotezini besliyor. Koch ve çalışma grubu şu an bu tür deneyleri meyve sinekleri (flies) ve laboratuvar ortamında yetiştirilmiş insan beyin hücreleri üzerinde tekrar etmeye çalışıyor. En büyük eleştirilerden biri: “Sıcak, ıslak ve gürültülü beyin ortamında kuantum koherensinin (süperpozisyonların) uzun süre devam etmesi zordur.” Bu durumda süperpozisyon çok hızlı çökecek ve nörobiyolojik süreçlere katkı sağlayamayacaktır (Tegmark, 2000). Bir diğer eleştiri: Kuantum kuramları ile bilinci ilişkilendiren pek çok öneri teorik olarak ilginç olsa da pratik olarak kesin testler getirmemiştir. Deneysel doğrulama eksikliği önemli bir engeldir. Ayrıca, kuantum çökmeleri ile bilinç arasındaki ilişkiyi doğrudan kurmak felsefi ve bağıntılı yorumlara açık bir konudur — “hard problem of consciousness” (bilincin subjektif yönü ile fiziksel süreç arasındaki açıklanamayan uçurum) hâlâ büyük bir tartışma alanıdır (Koch ve Hepp, 2006; Koch, 2024).

Kuantum Fiziğinin Temel İlkeleri ve Biyolojik Sistemlerle Etkileşimi

21. yüzyılın başlarında geliştirilen kuantum fiziği, doğanın klasik Newtoncu anlayışını kökten değiştirmiştir. Atomaltı düzeyde gerçekleşen olayların, olasılık dalgaları ve gözlemle çöken süperpozisyon durumlarıyla açıklanması, fiziksel gerçekliğin doğası hakkında derin felsefi sorular doğurmuştur (Heisenberg, 1927; Schrödinger, 1935). Kuantum teorisi yalnızca fiziksel sistemlerin davranışlarını değil, aynı zamanda maddenin yapıtaşlarının bilgi taşıyıcıları olarak işlev görme biçimlerini de açıklamaktadır (Penrose, 1994).

Son yıllarda yapılan araştırmalar, kuantum süreçlerinin yalnızca fiziksel parçacıklarla sınırlı kalmayıp biyolojik sistemlerde de işleyebileceğini göstermiştir. Bu görüş, “kuantum biyoloji” adıyla bilinen yeni bir araştırma alanının doğmasına yol açmıştır (Lambert et al., 2013). Özellikle fotosentez, kuşların manyetik navigasyonu, enzimatik reaksiyonlar ve DNA mutasyon dinamikleri gibi süreçlerde kuantum etkilerinin gözlemlenmesi, yaşamın temelinde kuantum yasalarının rol oynayabileceğini düşündürmektedir (McFadden & Al-Khalili, 2014).

Kuantum fiziği, atom altı parçacıkların davranışlarını açıklayan bir fizik dalıdır. Bu teorinin temel ilkeleri arasında süperpozisyon, kuantum dolanıklık ve dalga-fonksiyon çöküşü yer alır. Süperpozisyon, bir parçacığın birden fazla durumda aynı anda bulunabilmesini ifade ederken, kuantum dolanıklık, iki parçacığın birbirinden uzakta olmalarına rağmen birinin durumunun diğerini anında etkilemesini açıklar. Dalga-fonksiyon çöküşü ise, bir gözlemci tarafından yapılan ölçüm sonucunda bir parçacığın belirli bir duruma geçişini ifade eder. Bu ilkeler, bilincin doğası ve işleyişi hakkında yeni bakış açıları sunmaktadır (Penrose, 1989; Wagh, 2024).

Kuantum Fiziğinin Temel Kavramları

Süperpozisyon

Süperpozisyon ilkesi, bir parçacığın aynı anda birden fazla olası durumda bulunabileceğini belirtir. Gözlem veya ölçüm gerçekleştiğinde, bu olasılıklar tek bir duruma “çöker”. Bu durum, Schrödinger’in ünlü “kedi paradoksu” örneğiyle açıklanmıştır: bir sistem hem “ölü” hem de “diri” durumda bulunabilir, ta ki bir gözlemci onu gözlemleyene kadar (Schrödinger, 1935).

Bu kavramın biyolojik sistemlere uygulanması, özellikle DNA’daki baz çiftlerinin tünelleme yoluyla farklı konformasyonlarda bulunabilmesiyle ilişkilendirilmiştir (McFadden, 2001). Yani genetik bilgi taşıyıcıları da olasılık temelli bir doğaya sahip olabilir.

Dolanıklık (Entanglement)

Dolanıklık, iki veya daha fazla parçacığın birbirinden uzakta olsa bile kuantum düzeyinde bağlı kalması durumudur (Einstein, Podolsky & Rosen,

1935). Einstein bu olayı “uzaktan hayaletimsi etki” olarak adlandırmıştır. Günümüzde yapılan deneyler, dolanıklığın fotonlar, elektronlar ve hatta makromoleküller arasında bile oluşabildiğini göstermiştir (Aspect et al., 1982).

Bazı nörofizyolojik modeller, sinapslar arası iletişimde dolanıklığın rol oynayabileceğini, hatta nöron ağları arasında kuantum korelasyonlarının oluşabileceğini öne sürmektedir (Fisher, 2015). Bu durum, beynin yalnızca klasik biyokimyasal bir ağ değil, aynı zamanda kuantum bilgiyi işleyen bir sistem olabileceği fikrini güçlendirmektedir.

Dalga Fonksiyonu ve Çökme

Dalga fonksiyonu (ψ), bir sistemin olası durumlarının matematiksel temsilidir. Bu fonksiyon, gözlem anında “çöker” ve sistem belirli bir duruma geçer. Gözlemci etkisi olarak bilinen bu olgu, bilincin fiziksel olayları nasıl etkileyebileceği sorusunu gündeme getirir (von Neumann, 1932).

Kuantum bilincin savunucuları, gözlemci etkisinin fiziksel sistemdeki olasılıkların çökmesini sağladığını ve bilincin bu süreçte aktif bir rol oynayabileceğini savunmaktadır (Wigner, 1961). Böylece bilinç, evrendeki olasılık dalgalarının gerçekleşmesinde aktif bir “seçici gözlemci” olarak yorumlanır.

Kuantum Biyolojinin Doğuşu

Kuantum biyolojinin ilk izleri 1930’larda Erwin Schrödinger’in *What is Life?* (1944) adlı eserinde görülür. Schrödinger, canlı organizmaların “negatif entropi” ile beslenerek termodinamik yasaların ötesinde bir düzen kurduğunu belirtmiştir. Bu fikir, yaşamın kuantum düzeyde bilgi düzenleme kapasitesi olduğuna dair ilk düşünsel temelleri atmıştır.

Günümüzde kuantum biyoloji alanında yapılan çalışmalar, şu dört ana uygulama üzerinde yoğunlaşmaktadır:

1. Fotosentetik enerji transferi: Bitkilerdeki fotosistemlerde elektron transferinin kuantum koherensle gerçekleştiği kanıtlanmıştır (Engel et al., 2007).

2. Kuşların manyetik algısı: Avrupa kızılgerdanlarının yön bulma mekanizması, kuantum dolanıklıkla açıklanmaktadır (Ritz et al., 2000).

3. Enzimatik reaksiyonlar: Proton tünellemesi, bazı biyokimyasal reaksiyonlarda enerji verimliliğini artırmaktadır (Masgrau et al., 2006).

4. DNA mutasyonları: Baz çiftleri arasındaki proton tünellemesi, spontan mutasyonların kuantum etkilerinden kaynaklanabileceğini göstermektedir (McFadden & Al-Khalili, 2014).

Bu örnekler, yaşamın en temel düzeylerinde kuantum süreçlerinin etkin olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, genetik bilginin aktarımı ve bilinç gibi yüksek düzeyli fenomenlerin de bu yasalarla açıklanabileceği yönünde güçlü argümanlar doğmuştur.

Kuantum Genetiğe Giden Yol

Kuantum genetik, klasik moleküler biyolojinin “DNA–RNA–Protein” doğrusal modelini genişleterek, gen ifadesinin olasılık temelli ve çevresel bilinçle etkileşimli olduğunu savunan bir yaklaşımdır. Bu görüşe göre, genler yalnızca biyokimyasal diziler değil, aynı zamanda enerji ve bilgi alanlarıyla sürekli etkileşim hâlinindedir (Popp, 1999).

Kuantum genetik yaklaşımı üç temel ilkeye dayanır:

1. Enerji-Bilgi Birliği: DNA yalnızca genetik bilgi depolamaz, aynı zamanda elektromanyetik frekanslar yayar (Popp & Chang, 1998).

2. Dalga-Bilgi Etkileşimi: Genetik ifadeler, dışsal bilinç durumları veya elektromanyetik alanlarla rezonansa girebilir.

3. Epigenetik-Kuantum Entegrasyonu: Duygular, düşünceler ve çevresel faktörler gen ifadesini yalnızca kimyasal değil, kuantum düzeyde de etkileyebilir (Lipton, 2005). Klasik genetik modeli, DNA dizisinin hücresel kaderi belirlediğini savunur. Ancak bu model, organizmanın çevreyle etkileşimini, duygusal deneyimleri veya bilişsel süreçlerini açıklamada yetersiz kalmıştır. Bu boşluğu dolduran **epigenetik**, gen ifadesinin DNA dizisinde değişiklik olmadan çevresel faktörler tarafından düzenlenebildiğini göstermiştir (Bird, 2007). Epigenetik mekanizmalar – DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve RNA temelli düzenleme – dış dünyadaki deneyimlerin genetik düzeyde kalıcı izler bırakabileceğini kanıtlamıştır (Meaney, 2010). Yani stres, sevgi, korku, meditasyon veya travma gibi deneyimler genetik anlatımın biçimini değiştirebilir. Bu süreç, yalnızca biyokimyasal değil, aynı zamanda **enerjetik** bir süreçtir. Çünkü hücreler yalnızca moleküllerle değil, **elektromanyetik frekanslarla** da iletişim kurarlar (Frohlich, 1968). Bu da kuantum bilginin genetik sistemlerde işlev gördüğünü düşündürür.

Kuantum fiziği, yaşamın moleküler düzeydeki mekanizmalarını anlamada devrim yaratmaktadır. Bilincin, genetik düzenin ve biyolojik süreçlerin klasik kimya yasalarının ötesinde, kuantum yasalarına dayandığına dair kanıtlar giderek güçlenmektedir. Bu perspektif, “bilinç–madde” ikiliğini sorgulamakta ve yaşamı enerji, bilgi ve olasılık akışı olarak yeniden tanımlamaktadır.

Beyin Dalgaları ve Nöral Osilasyonların Sınıflandırılması

Beyin dalgaları, nöronların elektriksel aktivitesinin bir sonucudur ve farklı frekans bantlarında sınıflandırılır. Bu sınıflandırma, beyin aktivitesinin farklı zihinsel durumlarla ilişkisini anlamada önemlidir. Örneğin, alfa dalgaları genellikle rahatlama ve meditasyon durumlarıyla ilişkilendirilirken, beta dalgaları aktif düşünme ve odaklanma ile ilişkilidir. Delta ve teta dalgaları ise uyku ve derin meditasyon durumlarıyla bağlantılıdır. Nöral osi-

lasyonlar, bu beyin dalgalarının beyin bölgeleri arasındaki iletişimi ve bilgi işleme süreçlerini nasıl etkilediğini araştıran bir alandır (Chen, 2024; Friston, 2023).

Disiplinlerarası Etkileşim: Kavramsal Köprüler

Zihinsel süreçlerin anlaşılmasında, farklı disiplinlerin bir araya gelmesi önemlidir. Epigenetik, çevresel ve deneyimsel etkilerin genetik düzenlemeler üzerindeki rolünü ortaya koyarken; nörobilim, beyin dalgaları ve nöral devrelerin bilinç ve davranış üzerindeki etkilerini anlamamıza olanak tanır. Kuantum fiziği ise, bilinç süreçlerinin atomik ve moleküler düzeydeki olasılık temelli özelliklerini inceleyerek yeni bir perspektif sunar. Bu farklı disiplinlerin birleştirilmesi, insan deneyimini **psikolojik, biyolojik ve fiziksel boyutlarıyla** bütüncül olarak ele alma fırsatı sağlar.

Kuantum Genetik ve Bilinç: Canlılığın Derin Kodları

21. yüzyıl biyolojisi, yaşamın yalnızca kimyasal ve mekanik süreçlerden ibaret olmadığı yönünde güçlü kanıtlar ortaya koymaktadır. Genetik yapı, uzun yıllar boyunca DNA dizilimlerinin sabit bir yazılım gibi işlediği varsayımıyla açıklanmış, organizmanın tüm özelliklerinin bu “moleküler şifre” tarafından belirlendiği düşünülmüştür (Watson & Crick, 1953). Ancak son otuz yılda yapılan araştırmalar, genetik bilginin tek başına yeterli olmadığını, gen ifadesinin çevresel, psikolojik ve hatta enerjetik faktörlerden etkilendiğini göstermiştir. Bu durum, klasik moleküler biyolojiden epigenetiğe uzanan yeni bir bakış açısının doğmasına neden olmuştur (Bird, 2007).

Bu yeni paradigma, canlı sistemlerde yalnızca kimyasal etkileşimlerin değil, aynı zamanda kuantum düzeydeki olasılık süreçlerinin de rol oynayabileceğini öne sürmektedir. Bazı fizikçiler, gen ifadesinin, protein katlanmasının ve hücresel iletişimin, kuantum düzeyindeki tutarlılık (coherence) süreçleriyle ilişkili olabileceğini ileri sürmektedir (McFadden & Al-Khalili, 2014). Bu yaklaşımlar, bilincin biyolojik temellerine dair tartışmaları yeniden şekillendirmekte ve yaşamı anlamada yeni bir epistemolojik zemin oluşturmaktadır.

Genetiğin Evrimi: Klasik Yaklaşımdan Moleküler Döneme

Modern genetik biliminin temelleri 19. yüzyılda Gregor Mendel’in bezelye deneyleriyle atılmıştır. Mendel’in bulguları, kalıtımın istatistiksel bir mantığa sahip olduğunu, belirli “birimlerin” (bugün gen olarak adlandırdığımız yapılar) nesilden nesle aktarıldığını ortaya koymuştur (Mendel, 1866). Ancak bu yapısal birimlerin fiziksel karşılıkları ancak 20. yüzyıl ortalarında keşfedilmiştir.

1953’te James Watson ve Francis Crick, DNA’nın çift sarmallı yapısını tanımlayarak genetik bilginin moleküler doğasını açıklamışlardır (Watson &

Crick, 1953). Böylece, yaşamın temel kodu olarak DNA, biyolojide merkezi dogma hâline gelmiştir:

DNA → RNA → Protein

Bu dogma, bilginin tek yönlü bir akışla genetik materyalden hücre işlevine geçtiğini savunur. Ancak 1980'lerden itibaren yapılan çalışmalar, bu mekanizmanın aslında geri bildirim döngüleriyle çevrili olduğunu göstermiştir. Genler, çevresel uyarıcılara göre aktif veya pasif hâle gelebilmekte; stres, beslenme, duygusal durum gibi faktörler gen ifadesini değiştirebilmektedir (Meaney, 2001; Weaver ve ark., 2004).

Fizik ve Genin Moleküler Anlayışı

Ünlü teorik fizikçi Erwin Schrödinger, klasik kitabı “What is Life?” (Yaşam Nedir?) adlı eserinde biyolojinin en temel sorularından birini ele aldı:

“Canlı bir organizma fizik ve kimya yasalarıyla nasıl açıklanabilir?” (Schrödinger, 1944).

Schrödinger, bu soruya yanıt ararken genin merkezi rolüne dikkat çekmiş ve genetik bilginin fiziksel doğasını açıklamaya çalışmıştır. Genlerin doğasının anlaşılması için mutasyonların doğasının açıklığa kavuşturulması gerektiğini savundu. O dönemde genin kimyasal yapısı bilinmiyordu — Avery ve arkadaşlarının DNA'nın kalıtsal madde olduğunu gösteren makalesi (Avery ve ark., 1944) What is Life? hâlâ baskıdayken yayımlanmıştı. Schrödinger, Max Delbrück'ün atom fiziğine dayalı gen modelini temel alarak genin doğrusal, bir boyutlu ve “aperiyodik” bir kristal olabileceğini öne sürmüştür (Timofeeff-Ressovsky ve ark., 1935). Bu yaklaşım, biyolojik düzenin temeline fiziksel düzeni yerleştiren ilk teorik çabalardan biri olmuştur.

Linus Pauling, Schrödinger'in dalga mekaniği teorisini, “modern biyolojinin doğuşunun temeli” olarak nitelendirmiştir (Dronamraju, 1999). Böylece biyoloji, fizik ve kimya arasındaki sınırların giderek bulanıklaştığı yeni bir disiplinler arası yapıya evrilmiştir.

Schrödinger'in kitabı her biyolog tarafından olumlu karşılanmasa da hatta eleştirmenlerinden biri olan Linus Pauling bile onun 1925'te geliştirdiği dalga mekaniği teorisinin, 1933'te Nobel Ödülü almasını sağlayan bu çalışmanın, “modern biyolojinin temellerinden biri” olduğunu kabul etmişti. Çünkü bu teori, kuantum mekaniğinin kimya anlayışına kattığı yeni bakış sayesinde biyolojinin gelişimini mümkün kılmıştı (Pauling, 1987; Dronamraju, 1999).

Gerçekten de kuantum mekaniği Schrödinger'in genin doğasına dair düşüncelerinin merkezindeydi. Schrödinger'in kuantum mekaniğine dayanan bu yaklaşımı, 1950'lerde biyolojiye yeni bir perspektif sunmuştur ve çoğu fizik eğitimi almış olan yeni “moleküler biyologlar” kuşağını (Max Delbrück, Linus Pauling, Francis Crick, Matthew Meselson vb.) derinden etkilemiştir.

Schrödinger'in öngörüsünü takiben moleküler biyolojinin gelişimi, genin nükleotid dizilerinden oluşan bir DNA molekülü olarak tanımlanmasına ve fenotipin ifadesini kontrol eden temel birim olarak kabul edilmesine yol açmıştır. Bu, moleküler biyoloji devriminin başlangıcıydı — genlerin ve genomların yapısını anlamada dev bir sıçramaya yol açtı. Artık genin, büyüme ve gelişme sürecinde fenotipin ifadesini etkileyen veya belirleyen ürünleri kodlayan, nükleotid bazlarından oluşmuş bir nükleik asit molekülü olduğu kabul edildi.

Erken Epigenetik Perspektif ve “Parakromatin” Kavramı

İlginçtir ki, genin doğasına ilişkin epigenetik olarak tanımlanan tamamlayıcı bir bakış açısı da 1930'lar ve 1940'larda ortaya çıktı. Bu epigenetik perspektif, genlerin doğasının daha karmaşık bir gerçekliği işaret ettiğini öne sürüyordu; ancak moleküler biyoloji devrimi sırasında bu yaklaşım geri planda kaldı. Bunun nedeni de basitti: epigenetik perspektifin moleküler temelleri, ancak moleküler biyolojinin araçları geliştikçe anlaşılabilirdi.

İki yaklaşım (moleküler biyoloji ve epigenetik) uzun süre paralel olarak var oldu, çünkü epigenetik süreçleri çözümleyebilmek için önce moleküler biyoloji olgunlaşmak zorundaydı.

Brink (1960), epigenetik düşüncenin kökeninin Thomas Hunt Morgan'a (1934) dayandığını belirtir. Morgan, genlerin “gelişim sürecinde yer aldıkları protoplazmaya yanıt olarak giderek artan şekilde değişebileceğini” ileri sürmüştür. Bu, “gelişim boyunca temel özelliklerini yitirmeden değişen gen” anlayışıydı ve son yıllarda yeniden önem kazanmıştır. Çünkü artık DNA merkezli gen anlayışının, “kromatin merkezli epigenetik bakış açısı” olmadan eksik olduğu kabul edilmektedir.

Parakromatin: Kromozom Temelli Epigenetik Durumlar

Kromatine odaklanan epigenetik bakış açısı, 50 yıl önce R. Alexander Brink tarafından detaylandırılmıştır. Brink (1960), ökaryotik kromozomların yalnızca genetik değil, aynı zamanda “paragenetik” bir işleve de sahip olduğunu öne sürdü.

Bir genetik lokusun iki tür kromatin içerdiğini belirtti:

- Ortokromatin, bireydeki tüm hücre çekirdeklerinde sabit kalan ve DNA'yı içeren yapı;
- Parakromatin ise, gelişim veya çevresel faktörlerle değişebilen, mitozla aktarılabilir alternatif kromatin durumlarıydı.

Bu görüş, Barbara McClintock ve Edward Coe ile 1950'lerde yapılan mısır genetiği çalışmalarıyla desteklenmişti. Bu araştırmalar, klasik mutasyonlar dışında, “paramutasyonlar” olarak adlandırılan yönlendirilmiş genetik değişimlerin de varlığını gösterdi. Paramutasyonlar çevresel faktörlerle te-

tiklenebilir, geri dönüşlü olabilir ve Mendel yasalarını ihlal eder. Ancak bu durum, genlerin gelişim boyunca değişip yine de temel genetik kimliğini koruyabileceğini düşündürür.

Brink'in tanımladığı "parakromatin", modern anlamda histon proteinleri, kromatin düzenleyici kompleksler ve küçük RNA moleküllerinin (örneğin siRNA) oluşturduğu dinamik bir yapı olarak yeniden yorumlanabilir. Günümüzde bu yapı, kromatinin "epigenetik kod" ya da "histon dili" olarak tanımlanan süreçleriyle ilişkilendirilmektedir. Brink'in "parakromatin" kavramı 1960'ta moleküler düzeyde açıklanamasa da 2000'lerde histon kodu teorisinin ortaya çıkmasıyla birlikte moleküler biyoloji bu kavrama yaklaşılmaya başlamıştır.

Gen Bir "Olasılık Alanı" mı?

Mendel genetiğinden "moleküler epigenetiğe" uzanan evrimsel süreç, fizikte Newton mekaniğinden kuantum mekaniğine geçişle dikkat çekici bir paralellik gösterir. Nasıl ki atom, Newton fiziğinde bölünemez bir parçacık olarak görülürken kuantum mekaniğiyle birlikte "olasılık alanı" olarak yeniden tanımlandıysa, gen de başlangıçta bölünmez bir birim olarak kabul edilmiş, daha sonra rekombinasyonla bölünebilir bir nükleotid dizisi, şimdi ise farklı kromatin durumlarının olasılık alanı olarak görülmeye başlanmıştır. Brink'in terminolojisiyle, bu parakromatin alanı, belirli bir DNA dizisi etrafında şekillenen, çeşitli protein, RNA ve kimyasal modifikasyon durumlarından oluşan dinamik bir olasılık evrenidir. Bu bakış açısı, genin artık sadece sabit bir DNA dizisi değil, aynı zamanda moleküler, çevresel ve kuantum düzeyinde sürekli etkileşim hâlinde olan çok katmanlı bir sistem olduğunu öne sürmektedir. Bu bağlamda, DNA molekülünün, yalnızca biyokimyasal bir yapı değil, aynı zamanda elektromanyetik bir anten gibi çalıştığını söylemek mümkündür.

Her baz çifti titreşir ve bu titreşimler kuantum koherens (uyum) oluşturabilir (Montagnier et al., 2011). Bazı deneylerde DNA, elektromanyetik alanlar aracılığıyla çevresine "bilgi" aktarabilmiştir. Bu, kuantum dolanıklıkla açıklanabilecek bir fenomendir (Bischof, 2003).

Bir DNA dizisinin çevredeki foton alanlarıyla etkileşime girip kuantum tünelleme veya süperpozisyon durumları yaratabileceği öne sürülmüştür (McFadden & Al-Khalili, 2014). Bu durumda gen ifadesi yalnızca "ne yazılıysa o" değildir; aynı zamanda enerji alanı tarafından yönlendirilen olasılık dalgaları biçiminde çalışır.

Epigenetik Devrim: Gen İfadesinin Sessiz Kuralları

Epigenetik, DNA dizilimini değiştirmeden gen ifadesini düzenleyen süreçlerin bütünüdür (Allis & Jenuwein, 2016). DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve RNA tabanlı düzenlemeler, genlerin ne zaman "açılıp kapanacağını" belirler.

Bu süreçler yalnızca biyokimyasal değildir; organizma çevresine uyum sağlarken, çevresel deneyimler de bu düzenleyici sistemlere “yazılabilir”. Farelerle yapılan epigenetik çalışmalar, annelik davranışlarının yavrularda DNA metilasyon kalıplarını değiştirdiğini ve bunun nesiller arası aktarılabilirliğini göstermiştir (Weaver et al., 2004). Epigenetik, böylece biyolojide deterministik (belirlenimci) bir anlayıştan olasılıksal ve dinamik bir modele geçişi temsil eder. Bu noktada kuantum fiziğiyle şaşırtıcı paralellikler ortaya çıkar: Her iki alanda da sistemin durumu, gözlem koşullarına ve çevresel etkileşimlere bağlı olarak değişir.

Epigenetik mekanizmaların keşfiyle birlikte, gen artık yalnızca sabit bir DNA dizisi olarak değil, farklı kromatin konfigürasyonlarının olasılık alanı olarak değerlendirilmektedir. Bu yaklaşım, fizik tarihindeki dönüşüme benzer biçimde yorumlanabilir: Nasıl ki atom, Newton fiziğinde bölünemez bir parçacık olarak tanımlanırken kuantum mekaniği ile birlikte olasılık dalgalarıyla tanımlanan bir enerji alanına dönüşmüşse, gen de Mendel genetiğinde bölünemez bir birimken, şimdi epigenetik ve kuantum biyoloji perspektifiyle dinamik, sürekli değişen bir olasılıklar alanı olarak görülmektedir (Tegmark, 2015; McFadden & Al-Khalili, 2021).

Schrödinger’in “aperiyodik kristal” öngörüsü ile Brink’in “parakromatin” kavramı arasında geçen yaklaşık bir yüzyıl, gen anlayışında fizikten biyolojiye uzanan bir epistemolojik dönüşümün göstergesidir. Günümüz moleküler genetiği artık yalnızca DNA dizilerine değil, epigenetik düzenleme, çevresel etkiler ve hatta kuantum süreçlerinin etkileşimine odaklanmaktadır.

Bu doğrultuda gen, sabit bir yapı olmaktan çok, çevresel, kimyasal ve olasılıksal etkileşimlerle şekillenen bir “moleküler alan” olarak değerlendirilmektedir. Bu yaklaşım, gelecekte epigenetik ile kuantum biyolojinin birleştiği yeni bir bütünsel yaşam bilimi doğurabilir.

Kuantum Fiziği ile Paralellik: Determinizmden Olasılığa

20. yüzyılın başlarında Newtoncu determinizm — her olayın belirli bir neden-sonuç zinciriyle açıklanabileceği inancı — fizik alanında kuantum mekaniği tarafından sarsılmıştır. Heisenberg’in belirsizlik ilkesi, bir parçacığın konumu ve momentumunun aynı anda tam olarak bilinemeyeceğini göstermiştir (Heisenberg, 1927). Schrödinger’in dalga fonksiyonu ise, parçacığın belirli bir yerde değil, olasılık dağılımı içinde bulunduğunu ileri sürer.

Benzer şekilde, genetik sistemler de artık yalnızca “gen → sonuç” mantığıyla açıklanamamaktadır. Epigenetik süreçler, gen ifadesinin birçok olasılık düzleminde değişebileceğini göstermektedir. Tıpkı bir elektronun konumunun gözlem anında çöktüğü gibi, genetik olasılıklar da çevresel bir “gözlemci” etkisiyle somut biyolojik ifadeye dönüşmektedir (McFadden, 2000).

Bu benzetme metaforik gibi görünse de bazı fizikçi-biyologlar kuantum

süreçlerinin canlı dokularda gerçekten rol oynayabileceğine dair teoriler geliştirmiştir. Özellikle Penrose-Hameroff “Orch-OR” (Orchestrated Objective Reduction) modeli, bilinçli deneyimin mikrotübül düzeyindeki kuantum çöküşleriyle ilişkili olabileceğini öne sürmektedir (Hameroff & Penrose, 2014). Her ne kadar bu modelin biyolojik uygulanabilirliği tartışmalı olsa da deterministik biyolojiden kuantum olasılıklı biyolojiye geçiş fikri, yaşamı anlamada yepyeni bir felsefi ufuk açmaktadır.

Epigenetik ve Kuantum Mekanik Arasındaki Benzerlikler

Epigenetik ile kuantum mekaniği, yüzeyde birbirinden tamamen farklı iki bilim alanı gibi görünse de her ikisi de olasılıksal davranış, çevresel bağımlılık ve dinamik denge ilkeleri üzerine kuruludur. Bu iki disiplinin kesişiminde, yaşamın ne kadar derin bir belirsizlik ve potansiyel alanı içinde var olduğunu gösteren felsefi bir paralellik vardır (McFadden & Al-Khalili, 2014; Davies, 2004).

Epigenetik düzeyde, gen ifadesi yalnızca DNA dizilimine değil, hücrenin içinde bulunduğu mikro-çevresel koşullara bağlıdır (Allis & Jenuwein, 2016). Genom, her hücrede aynı olmasına rağmen, farklı hücre tipleri farklı gen kümelerini aktive eder. Bu durum, tıpkı kuantum süperpozisyonunda olduğu gibi, genetik potansiyelin çoklu olasılıklar hâlinde bulunabileceğini düşündürür. Bir gen, belirli bir çevresel sinyal geldiğinde aktifleşir — yani “çöker.” Bu, Schrödinger’in dalga fonksiyonunun gözlem anında çökmesiyle benzer bir yapısal analogi taşır (Schrödinger, 1935).

Örneğin, DNA metilasyonu belirli genlerin susturulmasına yol açar. Ancak bu susturma kalıcı değildir; beslenme, stres, travma veya bilinçli farkındalık pratikleri gibi faktörlerle yeniden değiştirilebilir (Dusek & Benson, 2009). Bu, kuantum ölçümünde “sistemin durumunun gözlemle yeniden tanımlanması” sürecine karşılık gelebilir. Her iki durumda da sistem, gözlemlenmeden önce birden fazla olasılık hâlinindedir; gözlem, enerjinin ve bilginin yeni bir düzenlemesine yol açar (Radin, 2006).

Bu benzerlik, sadece metaforik bir anlatım değildir. Son yıllarda yapılan deneyler, canlı sistemlerde kuantum tutarlılığının (coherence) gerçekten de biyolojik süreçlerde rol oynayabileceğini göstermektedir. Özellikle fotosentez sırasında enerji aktarımının, klasik difüzyon modellerine göre çok daha verimli bir şekilde gerçekleştiği, bunun da kuantum koherens sayesinde olabileceği gösterilmiştir (Engel et al., 2007; Collini et al., 2010).

Bu bulgu, canlı sistemlerin rastgele kimyasal sistemler olmadığını, doğanın bilgi işlemeyi kuantum düzeyinde optimize etmiş olabileceğini düşündürmektedir. Aynı ilke, epigenetik düzenlemelerde de geçerli olabilir — genler, yalnızca kimyasal sinyallere değil, aynı zamanda enerji, frekans ve bilgi düzeyindeki etkileşimlere de duyarlı olabilir.

Kuantum Biyoloji Deneylerinden Kanıtlar

DNA sadece bir kimyasal molekül değildir; aynı zamanda bilgi taşıyıcısıdır. Fritz-Albert Popp'un "biyofoton" araştırmaları, DNA'nın düşük yoğunlukta fotonlar yaydığını ve bu ışımının hücreler arası iletişimde rol oynayabileceğini göstermiştir (Popp, 1992). Bu tür ışık emisyonlarının, hücresel süreçlerin koordinasyonunda kuantum düzeyde bir bilgi alışverişi sağlayabileceği düşünülmektedir. Bu bağlamda, genetik materyal yalnızca biyokimyasal değil, aynı zamanda enerjetik ve dalgasal bir yapıdır. Epigenetik düzenlemeler, bu bilgi akışını modüle eden "ayar noktaları" gibidir. Örneğin, meditasyon, nefes çalışmaları ve zihinsel farkındalık, stres hormonlarını azaltarak DNA metilasyon kalıplarını değiştirebilir (Kaliman et al., 2014). Bu durum, bilincin biyolojiyi etkileyebileceğini göstermekte ve klasik "gen belirlenimciliği" anlayışına meydan okumaktadır.

Son yıllarda yapılan kuantum biyoloji araştırmaları, canlı sistemlerin kuantum prensiplerine göre işlediğini gösteren çarpıcı bulgular sunmaktadır.

Fotosentezde Kuantum Koherens: Engel ve arkadaşları (2007), yeşil sülfür bakterilerinde enerji transferinin femtosaniye düzeyinde gerçekleştiğini ve bu süreçte kuantum koherens izlerinin bulunduğunu göstermiştir.

Manyetosensörlük ve Kuantum Dolanıklık: Robin ve ekibi (2000), kuşların manyetik alanı algılamasında kuantum dolanıklığın rol oynayabileceğini öne sürmüştür.

Enzimatik Reaksiyonlarda Tünelleme Etkisi: Enzimlerin substratları dönüştürme sürecinde, proton veya elektron tünelleme mekanizmasının işlediği bulunmuştur (Klinman, 2006).

Bu örnekler, canlılığın karmaşık yapısının yalnızca klasik biyokimyasal yasalarla açıklanamayacağını göstermektedir. Kuantum düzeyde bilgi akışı ve enerji senkronizasyonu, genetik ve epigenetik süreçlerde de rol oynuyor olabilir.

Yeni Paradigma: Kuantum Epigenetik

"Kuantum Epigenetik" kavramı, henüz akademik literatürde standart bir terim olmasa da çeşitli araştırmacılar tarafından biyolojik süreçlerin kuantum prensipleriyle açıklanabileceğini öne süren bütüncül bir yaklaşım olarak şekillenmektedir (Marcer & Schempp, 1997; Popp, 1992; McFadden & Al-Khalili, 2014). Bu paradigma, bilinci, enerjiyi ve genetik sistemi tek bir bilgi ağı olarak görür.

Sonuç

Epigenetik, beyin dalgaları, bilinç ve kuantum süreçleri arasındaki etkileşim, insan deneyiminin yalnızca biyolojik bir olgu olmadığını, aynı zamanda dinamik ve çok katmanlı bir enerji alanı içinde şekillendiğini göstermek-

tedir. Nörobilimsel veriler, zihinsel süreçlerin sinaptik bağlantılar ve nöroplastisite üzerinden fiziksel beyni dönüştürebildiğini; epigenetik araştırmalar ise bu dönüşümün gen ifadesi düzeyinde kalıcı izler bırakabildiğini ortaya koymaktadır. Beyin dalgalarının farklı frekansları, bilincin çok boyutlu doğasına işaret ederken; kuantum yaklaşımı, bu süreçlerin olasılık temelli ve gözlemle şekillenen bir yapı sergilediğini öne sürmektedir.

Dolayısıyla insan bilinci, yalnızca nöronların etkileşiminden ibaret bir sistem değil, madde ile enerjinin, gözlem ile gerçekliğin, bilgi ile varoluşun kesişim noktasında işleyen bir kuantum bilinç alanıdır. Bu bütüncül bakış, insan zihninin hem biyolojik hem de enerji temelli doğasını anlamada yeni bir paradigma sunmaktadır. Gelecekte disiplinlerarası çalışmaların, bilincin bu kuantum temelli derin boyutlarını daha net aydınlatması, yalnızca nöro-bilim ve genetik değil, felsefe, fizik ve psikoloji arasındaki sınırları da dönüştürecektir.

Kaynaklar

- Allis, C. D., & Jenuwein, T. (2016). The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews Genetics*, 17(8), 487–500.
- Aspect, A., Dalibard, J., & Roger, G. (1982). Experimental test of Bell's inequalities using time-varying analyzers. *Physical Review Letters*, 49(25), 1804–1807.
- Avery, O. T., MacLeod, C. M., & McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *Journal of Experimental Medicine*, 79(2), 137–158.
- Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature*, 447(7143), 396–398.
- Bischof, M. (2003). *Biophotons – The light in our cells*. McGraw Hill.
- Brink, R. A. (1960). Paramutation and paragenetic function of chromosomes. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 24, 379–391.
- Chen, Y.-C., et al. (2024). “Researchers Explore Quantum Entanglement’s Potential Role in Neural Synchronization.” *The Quantum Insider*.
- Collini, E., Wong, C. Y., Wilk, K. E., Curmi, P. M., Brumer, P., & Scholes, G. D. (2010). Coherently wired light-harvesting in photosynthetic marine algae at ambient temperature. *Nature*, 463(7281), 644–647.
- Davies, P. (2004). The quantum life: How physics can revolutionize biology. *Nature*, 430(6999), 599–600.
- Dusek, J. A., & Benson, H. (2009). Mind–body medicine: A model of the comparative clinical impact of the acute stress and relaxation responses. *Minnesota Medicine*, 92(5), 47–50.
- Dispenza, J. (2019). *Becoming supernatural: How common people are doing the uncommon*. Hay House.
- Dronamraju, K. R. (1999). Erwin Schrödinger and the origins of molecular biology. *Genetics*, 153(3), 1071–1076.
- Engel, G. S., Calhoun, T. R., Read, E. L., Ahn, T. K., Mancal, T., Cheng, Y. C., ... & Fleming, G. R. (2007). Evidence for wavelike energy transfer through quantum coherence in photosynthetic systems. *Nature*, 446(7137), 782–786.
- Fisher, M. P. A. (2015). Quantum cognition: The possibility of processing with nuclear spins in the brain. *Annals of Physics*, 362, 593–602.
- Fredriksson, I. (2023). “Consciousness influences epigenetics.” *Journal of Neurology Research Reviews & Reports*, 5(9), 2-9.
- Friston, K., et al. (2023). “The inner screen model of consciousness: applying the free energy principle directly to the study of conscious experience.”
- Frohlich, H. (1968). Long-range coherence and energy storage in biological systems. *International Journal of Quantum Chemistry*, 2(5), 641–649.

- Gariaev, P. P. (2013). *The Wave Genome: A Theory of Linguistic Wave Genetics*. Moscow: Quantum Genetics Institute.
- Gassab, L., et al. (2024). Quantum Models of Consciousness from a Quantum Information Science Perspective.
- Georgiev, D. D. (2023). Causal potency of consciousness in the physical world. *Frontiers in Psychology*, 14, 1198921. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2023.1198921>.
- Kaliman, P., Álvarez-López, M. J., Cosín-Tomás, M., Rosenkranz, M. A., Lutz, A., & Davidson, R. J. (2014). Rapid changes in histone deacetylases and inflammatory gene expression in expert meditators. *Psychoneuroendocrinology*, 40, 96–107.
- Klinman, J. P. (2006). Linking protein structure and dynamics to catalysis: The role of hydrogen tunneling. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 361(1472), 1323–1331.
- Hameroff, S., & Penrose, R. (2014). Consciousness in the universe: A review of the ‘Orch OR’ theory. *Physics of Life Reviews*, 11(1), 39-78.
- Heisenberg, W. (1927). Über den anschaulichen Inhalt der quantentheoretischen Kinematik und Mechanik. *Zeitschrift für Physik*, 43, 172–198.
- Hu, H., & Wu, M. (2023). Quantum entanglement and neural synchronization in the human brain. *Physical Review E*, 107(4), 045401.
- Koch, C., & Hepp, K. (2006). Quantum mechanics in the brain. *Nature*, 440(7084), 611–612.
- Koch, C. (2019). *The Feeling of Life Itself: Why Consciousness Is Widespread but Can’t Be Computed*. MIT Press.
- Koch, C. (2024). Quantum mechanics and the puzzle of human consciousness. Allen Institute for Brain Science.
- Lambert, N., Chen, Y. N., Cheng, Y. C., Li, C. M., Chen, G. Y., & Nori, F. (2013). Quantum biology. *Nature Physics*, 9(1), 10–18.
- Lipton, B. H. (2005). *The biology of belief: Unleashing the power of consciousness, matter & miracles*. Hay House.
- Masgrau, L., Roujeinikova, A., Johannissen, L. O., Hothi, P., Basran, J., Ranaghan, K. E., Scrutton, N. S. (2006). Atomic description of an enzyme reaction dominated by proton tunneling. *Science*, 312(5771), 237–241.
- Matarèse, B.F.E., et al. (2023). “Quantum Biology and the Potential Role of Entanglement.”
- McFadden, J. (2000). *Quantum evolution: How physics’ weirdest theory explains life’s biggest mystery*. HarperCollins.
- McFadden, J., & Al-Khalili, J. (2021). *Life on the edge: The coming of age of quantum biology*. Crown.
- McFadden, J., & Al-Khalili, J. (2014). *Life on the edge: The coming of age of quantum biology*. Crown Publishing.

- Mendel, G. (1866). Versuche über Pflanzenhybriden. Verhandlungen des naturforschenden Vereins, 4, 3–47.
- Meaney, M. J. (2001). Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 1161–1192.
- Meaney, M. J. (2010). Epigenetics and the biological definition of gene $\times$ environment interactions. *Child Development*, 81(1), 41–79.
- Montagnier, L. et al. (2011). DNA waves and water. *Journal of Physics: Conference Series*, 306(1), 012007.
- Morgan, T. H. (1934). *Embryology and genetics*. Columbia University Press.
- Pauling, L. (1986). *The nature of the chemical bond and the structure of molecules anjitaavr crystals: An introduction to modern structural chemistry* (3rd ed.). Cornell University Press.
- Penrose, R. (1989). *The Emperor's New Mind: Concerning Computers, Minds and The Laws of Physics*. Oxford University Press.
- Penrose, R. (1994). *Shadows of the Mind*. Oxford University Press.
- Popp, F. A. (1992). About the coherence of biophotons. In M. P. Ho, F. A. Popp & U. Warnke (Eds.), *Bioelectrodynamics and biocommunication* (pp. 27–42). World Scientific.
- Popp, F. A. (1999). About the coherence of biophotons. *Macroscopic Quantum Coherence*, 1(1), 1–9.
- Radin, D. (2006). *Entangled minds: Extrasensory experiences in a quantum reality*. Paraview Pocket Books.
- Ritz, T., Âdem, S., & Schulten, K. (2000). A model for photoreceptor-based magneto-reception in birds. *Biophysical Journal*, 78(2), 707–718.
- Robin, J. M., Hore, P. J., & Ritz, T. (2000). Quantum coherence and magnetoreception in birds. *Nature*, 406(6793), 183–186.
- Schrödinger, E. (1935). Die gegenwärtige Situation in der Quantenmechanik. *Naturwissenschaften*, 23, 807–812. Gassab, L., et al. (2024). Quantum Models of Consciousness from a Quantum Information Science Perspective.
- Schrödinger, E. (1944). *What is Life? The physical aspect of the living cell*. Cambridge University Press.
- Tegmark, M. (2000). The importance of quantum decoherence in brain processes. *Physical Review E*, 61(4), 4194–4206.
- Tegmark, M. (2015). Consciousness as a state of matter. *Chaos, Solitons & Fractals*, 76, 238–270.
- Timofeeff-Ressovsky, N. W., Zimmer, K. G., & Delbrück, M. (1935). Über die Natur der Genmutation und der Genstruktur. *Nachrichten von der Gesellschaft der Wissenschaften zu Göttingen*.

- Waddington, C.H. (1942). "Canalization of development and the inheritance of acquired characters." *Nature*, 150(3811), 563–565.
- Wagh, M. (2024). Your Consciousness Can Connect With the Whole Universe, Groundbreaking New Research Suggests. *Popular Mechanics*.
- Watson, J. D., & Crick, F. H. C. (1953). Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356), 737–738.
- Weaver, I. C. G., et al. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature Neuroscience*, 7(8), 847–854.
- Wheeler, J. A. (1990). Information, physics, quantum: The search for links. In *Complexity, Entropy, and the Physics of Information* (pp. 3–28). Addison-Wesley.



BİTKİ BİYOTEKNOLOJİSİNDE RESTRİKSİYON ENZİMLERİNDEN CRISPR/CAS'A: YENİLİKÇİ GENOM DÜZENLEME YÖNTEMLERİ

“ ”

Dilay ŞENTÜRK¹

¹ Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Ziraat Fakültesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, TR26040. e-posta: senturkdilay@gmail.com ORCID ID: 0009-0002-9022-1757

Bu çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Ziraat Fakültesi/ Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nde 2021 yılında "Bitki Biyoteknolojisi'nde CRISPR/Cas Teknolojisi" başlıklı lisans tezinden yararlanılarak hazırlanmıştır. Tez danışmanım: [Sergül Ergin, Dr. Öğr. Üyesi].

1. GİRİŞ

Son yıllarda adından sıkça söz ettiren ve yeni bir gen düzenleme teknolojisi olan CRISPR/Cas Teknolojisi, bitkiler üzerinde klasik ıslah, modern ıslah ve hali hazırda kullanılan gen düzenleme teknikleri ile yapılmakta olan ve yapılmak istenen birçok genom düzenleme uygulamasına yeni bir boyut kazandırmıştır.

Moleküler biyoloji ve genetik biliminde yaşanan çarpıcı gelişmeler ve bitki biyoteknolojisi alanında yapılan çalışmalar başta olmak üzere yapılan diğer alanlardaki çalışmalar bizlere yeni bir çağa girdiğimizi gösteriyor. Son on yıl içerisinde hayatın şifresini barındıran DNA dizilimine hızlı ve etkin şekilde müdahale edilebildiği ve dizilimin istenilen şekilde değiştirilebildiği fark edildi. Artık “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (Düzenli Aralıklarla Kümelenmiş Kısa Palindromik Tekrarlar)” anlamına gelen CRISPR tekniği sayesinde adaptasyon ve doğal seleksiyona dayalı olarak milyonlarca yıldır süregelen evrim sürecini laboratuvarında hayata geçirilebildiğini görmek sağlık, bilim ve teknoloji açısından büyük imkanlar sunmakla birlikte aynı derecede büyük kaygılar da uyandırmaktadır (Ertaş ve Yakın, 2019). Jennifer A. Doudna kitabında CRISPR/Cas Teknolojisi ile ilgili görüşünü şu şekilde dile getiriyor; “Bu alanın ilerleyişi, herhangi bir akademik araştırma merkezinin dört duvarı arasında zapt edilemez.” (Doudna ve Sternberg, 2018).

Bitki Biyoteknolojisi alanında birçok çalışma örneği ile karşımıza çıkan bu teknolojinin daha şimdiden bizlere vaat ettiği birçok yenilik var. CRISPR/Cas Teknolojisi ile yapılmış ve yapılan her çalışma incelendiğinde görülmektedir ve görülecektir ki gelecek nesillerin ve tüm canlıların sağlıklı gıda ihtiyacının karşılanmasından tutunda bitkilerin dahil olduğu tüm alanların daha verimli hale gelmesinde büyük bir öneme sahiptir. Tabii ki sahip olduğu bu önem doğrultusunda da etik ve ahlaki değerler başta olmak üzere daha birçok konu göz önünde bulundurularak ilerlemeler gerçekleştirilmelidir.

Bitkiler aleminde kültür bitkisi genomlarını düzenlemek amacıyla CRISPR/Cas Sistemi yaygın bir şekilde kullanılmaya başlandı, böylece insanların beslenme düzenini olağanüstü iyileştirebilecek zirai ilerlemelerin yolu döşenmiş oldu.

Aynı ilerlemeler, dünyanın gıda güvenliğine destek olabilir. Gen düzenleme deneyleri, hastalığa dirençli pirinç, daha yavaş olgunlaşan domates, daha sağlıklı doymamış çoklu yağ içeren soya fasulyesi, güçlü nörotoksin seviyesi düşük patates üretti. Gıda bilimcileri bu iyileştirmeleri, gen aktarımı teknikleri sayesinde (yani, türün DNA’sını farklı bir türün genomuna entegre ederek) değil, organizmanın kendi DNA’sının birkaç harfinde (nükleotidinde) değişiklik yapmayı içeren ince ayarlı genetik ilerlemelerle başarıyorlar (Doudna ve Sternberg, 2018). Doudna ve Sternberg (2018), bakterilerin, virüs

enfeksiyonuna karşı kendilerini savunma sistemini “Virüs DNA’sını muazzam hassasiyetle parçalayan ve çeşitli hücre türlerinde DNA’yı işlemeyi beceren bir makine.” olarak açıklamışlardır.

İnsan nüfusu hızlı bir şekilde artmakta olup, 2050 yılına kadar bu rakamın 9,1 milyara ulaşacağı tahmin edilmektedir (Stephenson vd., 2010). Tarımsal üretkenliğin nüfus artışına paralel olarak artmamasından dolayı, gıda yetersizliklerinin ileride büyük bir problem olacağı düşünülmektedir. Ayrıca, küresel ısınma ve bunun getirdiği tehlikeli sonuçlar bitkilerin yaşam sürecini önemli derecede etkilemektedir. Bitkiler hareketsiz olduğu için çevresel durumdaki değişikliklerden çok fazla etkilenmektedir. Çeşitli biyotik ve abiyotik stres etkenleri, dünya çapındaki tarımsal ürün verimliliğini sınırlandıran faktörler arasında yer almaktadır (Wani ve Sah, 2014). Abiyotik stres durumları içerisinde yer alan sıcaklık, soğuk, kuraklık, tuzluluk ve besin stresleri gibi faktörler dünya çapında mahsül üretiminde büyük bir zarara neden olmaktadır. Bu faktörler nedeniyle önemli bitkilerden elde edilen temel ürünlerin verimleri %50 oranında azalmıştır. Ayrıca bitkiler mantar, bakteri, virüs, nematod ve herbivor böcekler de dahil olmak üzere çeşitli patojenlerle mücadele etmek zorundadır. Bitkilerdeki çevresel stres tepkisi ve dayanıklılık mekanizmaları hayvanlara göre çok daha farklı ve karmaşıktır. Buna ek olarak bitkiler, doğadaki evrimlerinden dolayı çeşitli abiyotik streslere eş zamanlı olarak maruz kalabilmektedirler (Çiftçi ve Uncuoğlu, 2019).

2. GEÇMİŞTEN GÜNÜMÜZE ISLAH YÖNTEMLERİ

İslah biliminin başlangıcı tarih öncesi dönemde yaşayan insanların hast edebilecekleri üstün özellikteki bitkileri aramasına dayanmaktadır. İlk ıslahçılar kendi kabiliyetleri ile üstün özelliklere sahip bitkileri seçmişlerdir. Buna seleksiyon yöntemi denmektedir. 1850 yılı ve sonrasında ise sistematik ve bilinçli tozlama çalışmaları başlamış olup, 1930 yılı ve sonrasında türler arası melezleme çalışmaları ile özel gen kombinasyonları oluşturulmuştur. Yapılan melezleme çalışmaları sonucunda ortaya çıkan melezleme tekniği temel bitki ıslahı metodu haline gelmiştir. 1975 yılı ve sonrasında hücre füzyonu çalışmaları yürütülmüştür. Rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesi, hedeflenen genlerin klonlanması ve bitkilere aktarılabilmesi sonucunda tarımsal biyoteknoloji çalışmaları önem kazanmış olup klasik ıslah yöntemleri ile aktarılması mümkün olmayan yabancı genlerin kültür çeşitlerine aktarılması ve performanslarının arttırılması biyoteknolojik yöntemlerle sağlanabilmiştir. Bu durum günümüzde yürütülen biyoteknolojik yöntemlerin ıslah çalışmalarının çok daha farklı bir noktaya taşınmasına imkân sağlamıştır. Doku kültürleri, somatik hibridizasyon, embriyo kurtarma, moleküler markerler, gen haritalama ve son aşama olarak gen transferi ıslah çalışmalarına çok büyük ivme kazandırmıştır. 1900 ile 1920 yılları arasındaki süre zarfında bitki ıslahı uygulamaları ve temel ilkeleri açısından çok sayıda bulguya ulaşılmıştır. 1941 ile 1960 dönemde kantitatif genetik ve biyokimyasal genetikle

ilgili çalışmalar yapılmıştır. 1970 yılı ve sonraki yıllarda ise ıslahta biyoteknolojik yöntemlerin kullanımına başlanmıştır. Bu yöntemlerin kullanılması ile rekombinant DNA tekniğinin bilinirliği artmıştır. Son yıllarda bitki genetik mühendisliği alanındaki gelişmeler bitki ıslahının önemini daha da artırmıştır (Cohen, 2003).

Geleneksel bitki ıslahı tekniklerinin başarısı, bitki stres dayanıklılık mekanizmalarının karmaşıklığı nedeniyle sürdürülebilir tarım ürünlerinin geliştirilmesinde sınırlı kalmaktadır. Bu nedenle, dünyada artan gıda talebini karşılamak için yeni ve güçlü yaklaşımlar geliştirilmelidir (Hussain Wani vd., 2013). Son zamanlarda popüler bir araştırma alanı haline gelen genom düzenleme (genome editing) teknolojisi; özgün genlerde mutasyon oluşturma, epigenetik markörlerin yeniden programlanması ve diziye özgü değişiklikler yapılması gibi birçok işleve sahiptir (Ran vd., 2017). Yeni nesil ıslah teknikleri aynı zamanda bilim insanlarına istenen özellikleri geleneksel yetiştirmeye göre daha hassas ve hızlı bir şekilde ekleme yeteneği sağlamaktadır (Baltacı ve Arslan, 2020). Genom düzenleme teknolojilerinin tüm bu işlevlerine ve diğer birçok işlevine baktığımızda ortaya çıktığı ilk günden günümüze kadar yapılmış çalışmalar incelendiğinde zamandan ve maliyetten tasarruf edilmesini de sağladığı görülmektedir. Genom düzenleme teknolojisi, üzerine daha fazla düşülmesi ve düşünülmesi, var olan uygulama ve tekniklerin geliştirilmesi gereken umut verici yeni teknolojileri barındırmaktadır.

2.1. Restriksiyon Enzimleri

Restriksiyon enzimleri, kısa nükleotid dizilerini tanıyan, DNA'yı içten ve yalnızca bu belirli bölgelerden, yani restriksiyon bölgelerinden kesen bakteri ve arkeler tarafından kodlanan, bölgeye özgü endonükleazlardır (Maurya, 2019). 1960'larda mikrobiyologlar, bazı bakterilerin faj replikasyonunu kısıtlayarak bakteriyofajların kendilerini parçalamasını engelleyebildiklerini buldular. Bilim insanı Werner Arber bazı bakterilerin viral DNA'yı küçük parçacıklara ayıran enzimlere sahip olmaları nedeniyle faj üremesini kısıtladıklarını ileri sürdü. Bu özellik nedeniyle bu enzimlere "restriksiyon enzimleri" adı verildi. 1970'de, *Haemophilus influenza* ile çalışan Hamilton Smith, DNA klonlamada kullanılan en iyi tanımlanmış ilk restriksiyon olan *Hind*III'ü izole etti.

Restriksiyon enzimleri DNA molekülünü, DNA dizisindeki nükleotidleri birleştiren fosfodiester bağı (şeker-fosfat omurgasındaki) ayırarak keserler. Ancak bu rastgele bir kesim olmadığı gibi, tüm restriksiyon enzimleri DNA'yı aynı yerden kesmez. Restriksiyon enzimleri, DNA'ya "restriksiyon bölgeleri" olarak adlandırılan spesifik noktalardan bağlanır, tanır ve keserler. Restriksiyon enzimleri bakteriyel hücrelerde bulunan DNA'yı kesemezler. Çünkü bakteriyel DNA'nın bazı nükleotidlerinde restriksiyon enzimlerinin etkisini engelleyen metil grupları bulunur.

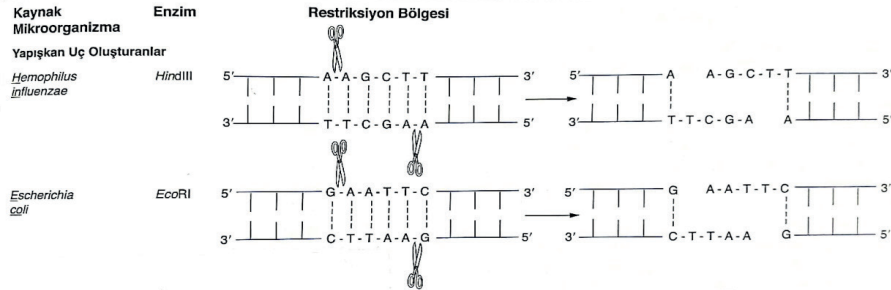
Restriksiyon enzimleri, tipik olarak dört veya altı nükleotidlik bir bölgeyi tanıdıklarından, genellikle dört veya altı baz çifti kesici olarak adlandırılırlar. Sekiz baz çifti kesicilerde tanımlanmıştır. Her restriksiyon bölgesi nükleotidlerin tersten de aynı şekilde okunabildiği bir “palindrom”dur. *EcoRI* gibi, bazı restriksiyon enzimleri DNA’yı kestiklerinde “yapışkan uçlar” olarak adlandırılan tek iplikçiklikli serbest uçlar oluşturur; başka enzimler ise “küt uç” olarak adlandırılan, çift iplikçiklikli uçlar oluştururlar. Yapışkan uçlu DNA parçacıklarının kolayca birleşebilmeleri, yapışkan uç oluşturan enzimlerin küt uç oluşturan enzimlere göre daha sık tercih edilmesine neden olur (Thieman ve Palladino, 2013).

Enzim	Organizma	Tanım dizisi ^a	Küt veya yapışkan uç
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	GAATTC	Yapışkan
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GGATCC	Yapışkan
<i>BglII</i>	<i>Bacillus globigii</i>	AGATCT	Yapışkan
<i>PvuI</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	CGATCG	Yapışkan
<i>PvuII</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	CAGCTG	Küt
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> R _d	AAGCTT	Yapışkan
<i>HinfI</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> R _f	GANTC	Yapışkan
<i>Sau3A</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	GATC	Yapışkan
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	AGCT	Küt
<i>TaqI</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	TCGA	Yapışkan
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GGCC	Küt
<i>NotI</i>	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	GCGGCCGC	Yapışkan
<i>SfiI</i>	<i>Streptomyces fimbriatus</i>	GGCCNNNNNGGCC	Yapışkan

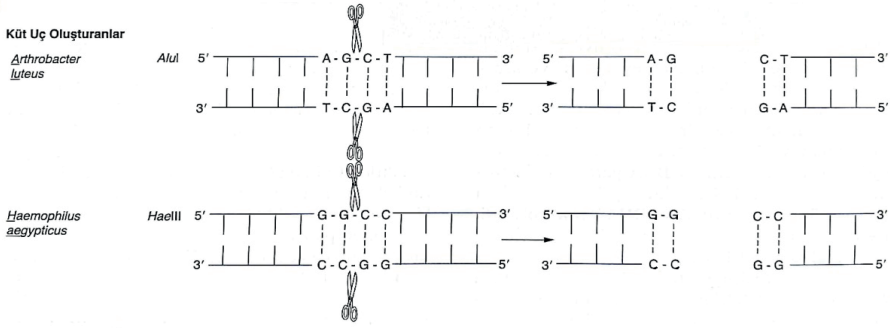
CS CamScanner ile tarandı

Tablo 1. En sık kullanılan restriksiyon endonükleazların bazılarına ait tanıma dizileri (Brown, 2013).

Restriksiyon enzimlerinin kesim şekilleri aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir.



Şekil 1. Yapışkan uç oluşturan bazı restriksiyon enzimlerinin kesim şekli (Thieman ve Palladino, 2013).



Şekil 2. Küt uç oluşturan bazı restriksiyon enzimlerinin kesim şekli (Thieman ve Palladino, 2013).

2.2. Restriksiyon Enzimlerinin Sınıflandırılması

Restriksiyon enzimlerinin tipleri; enzim alt birim bileşimine, kofaktör gereksinimlerine, hedef dizilerinin yapısına ve hedef diziye ve restriksiyon bölgelerinin konumuna bağlı olarak, Tip I, II, III ve IV olmak üzere dört tiptedir.

Tip I RE'ler: Bir tanıma bölgesinden (asimetrik yapıdan) uzaktaki bölgeleri keser ve çalışabilmeleri için kofaktör olarak hem ATP hem de S-adenosil-L-metionin'e (AdoMet) gereksinim duyarlar. Hem restriksiyon kesimi hem de metilasyon yapabilme özellikleri vardır (Maurya, 2019).

Tip II RE'ler: Bir tanıma bölgesine (palindromik yapıdan) yakın mesafeden veya hedef bölgeden kesim yapan enzimlerdir. İşlev görmeleri için çoğunlukla Mg^{+2} iyonlarına gereksinim duyarlar. Metilasyondan bağımsız sadece restriksiyon kesimi özelliğine sahiptirler (Maurya, 2019). Bu tipteki enzimler gen klonlamada oldukça önemli olan kesici enzimlerdir (Brown, 2013).

Tip III RE'ler: Palindromik olmayan ve ters yönlü iki ayrı diziyi tanırlar. Bir tanıma bölgesinden 20-30 baz çifti mesafeden kesim yaparlar. Birden fazla alt birim içerir ve restriksiyon kesimi için ATP ve DNA metilasyonu için de S-adenosil-L-metionin'e ihtiyaç duyarlar (Maurya, 2019).

Tip IV RE'ler: Modifiye edilmiş DNA'yı (metillenmiş, hidroksimetillenmiş ve glukosil-hidroksimetillenmiş) tanırlar (Maurya, 2019).

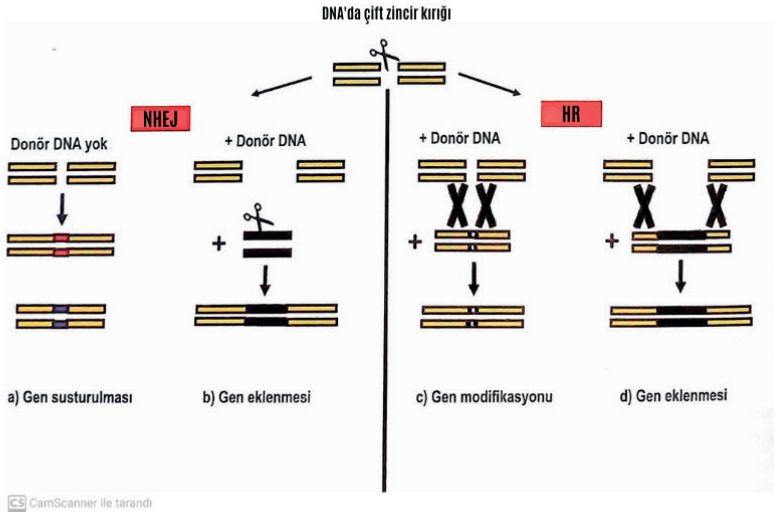
3. YENİ NESİL BİTKİ ISLAHI YÖNTEMLERİ

Genom düzenleme, diziye özgü nükleazlar kullanılarak, önceden oluşturulan bir gen bölgesinde hedeflenen çift zincirli DNA'nın kırılması ile başlar (Çiftçi ve Uncuoğlu, 2019). Bu nükleazlar arasında, ZFN (Zinc Finger Nucleases- Çinko Parmak Nükleazları), TALEN (Transcription Activator Like Effector Nucleases -Transkripsiyon Aktivatörü Benzeri Nükleazlar) ve CRISPR

(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats- Düzenli Aralıklarla Kümelenmiş Kısa Palindromik Tekrarlar) ümitvar yöntemler olup her üç yöntemle de hedef lokusa ait DNA dizilerine ekleme, çıkarma, değiştirme ve modifikasyonlar yapılmasına imkân sağlanmaktadır. Homolog ve homolog olmayan rekombinasyon temelli tamir mekanizmaları kullanılarak yapılan genom düzenleme yöntemlerinde kullanılan bitkilerden bazıları mısır, soya, domates, biber ve çeltiktir (Fu vd., 2014).

3.2. Genom Düzenleme Araçları

ZFN'ler, TALEN'ler ve CRISPR teknolojilerinin temelinde genom düzenleme aracı olarak kullanılan, diziye özgü nükleazlar yer almaktadır. Bu nükleazlar tıpta, moleküler biyoloji ve bitki ıslahı alanlarında da son birkaç yıldır geniş bir kullanım alanı bulmuştur (Akbudak ve Kontbay, 2017). Genom düzenleme, genomda istenilen bölgede bir adet çift zincir kırılması oluşumunu başlatan diziye özgü nükleazların aktivitesine dayanmaktadır (Belhaj vd., 2015). Bu nükleazlar restriksiyon enzimlerine benzer şekilde, genomun düzeltilileceği bölgede çift zincir kırıkları oluşturarak DNA'yı keserler. DNA'daki bu kırılmalar Homolog Rekombinasyon (HR: Homolog Recombination veya HDR: Homology Directed Repair) ve Homolog Olmayan Uçların Birleştirilmesi (NHEJ: Non-Homologous End Joining) olarak adlandırılan iki DNA tamir mekanizması tarafından onarılır (Şekil 3).

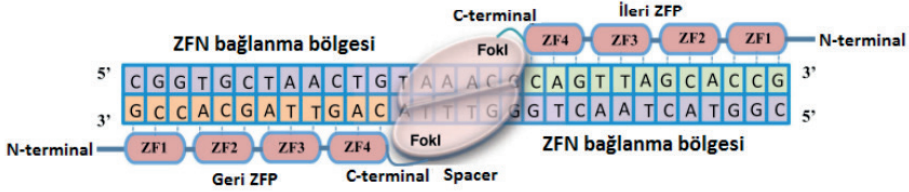


Şekil 3. DNA tamir mekanizmaları (Çiftçi ve Uncuoğlu, 2019).

3.2.1. Çinko Parmak Nükleazları (ZFN'ler)

Çinko parmak nükleazlar, yapay olarak üretilen nükleazlardır. Çinko parmak motifi, ilk olarak *Xeonopus laevis* kurbağasına ait TFIIIA'da bulunmuştur. Çinko parmak (ZF), DNA dizisini tanıyan ve transkripsiyon faktörlerinde sıkça rastlanan bir protein motifidir. DNA bağlanma bölgesi ve endonükleaz bölgesi olmak üzere iki alt domain içermektedir. Merkezde bulunan çinko atomu, 3-6 sistein ve 19-23 histidin aa'larına bağlanmakta ve parmak yapısı oluşturmaktadır. Her parmakta 23 aa bulunur ve parmakta yer alan aa'lar özgül DNA dizileri ile eşleşebilir. Her bir ZF motifi 3 nükleotidlik bir diziye tanıyıp bağlanabilir. Böylece istenilen diziye özgü olacak şekilde çinko parmakları arka arkaya birleştirilir ve bu şekilde enzimin DNA bağlanma bölgesi tasarlanır. Enzimin DNA bağlanma bölgesi hedef bölgeye uygun olacak şekilde tasarlandıktan sonra kesim yapacak olan katalitik bölge ile birleştirilir. Kesim yapacak olan bu bölge *FokI* enziminden elde edilir. *FokI*, *Flavobacterium okeanokoites* bakterisinde tanımlanmış olan tipIIS restriksiyon enzimidir. Kesim yapabilmek için homodimer olarak çalışır. Dimer oluşumunu sağlamak için, 2 tane ZF-*FokI* hibrit proteini üretilip hedef genoma eş zamanlı olarak, birlikte iletilmelidir. Böylece, bir monomer DNA'nın ileri yönündeki zincirine ve diğer monomer de DNA'nın geri yönündeki zincirine bağlanır. Ayrıca dimer oluşumu, katalitik aktivite ve çift zincir kırıklarının oluşması için 2 *FokI* monomeri birbirine çok yakın olmalıdır. Her çalışma için iki farklı ZFN üretilir. Böylece *FokI* enzimi dimer oluşturarak kesim yapabilir. *FokI* kesim domaini özgül bir diziye ihtiyaç duymadığı için kesim özgünlüğü ZF motifleri ile sağlanır. Kesim sonucunda HR ya da NHEJ ile ilgili bölgede değişiklik yapılmış olur.

ZFN'nin özgüllüğü; sol ZF-DNA bağlanma modülüyle verilen ileri-zincir dizisi, sağ ZF-DNA bağlanma modülüyle verilen geri-zincir dizisi ve iki bağlanma bölgesi arasındaki "spacer" (aralık, ara dizi) ile sağlanır (Şekil 4). Bu üç elementin birleşmiş etkisiyle, genom içinde ZFN bağlanma özgüllüğü oldukça yüksektir. ZFN ile çalışmanın olumsuz taraflarından biri genomda çalışılacak olan her bölge için yeniden ZFN üretilmesinin gerekmesidir. Bu durum maliyeti arttırmakta ve zaman kaybına yol açmaktadır. DNA 4 farklı bazdan oluştuğu için muhtemel bütün 3'lü diziler için 64 farklı ZF motifi gerekmektedir. Bununla birlikte, henüz 64 farklı üçlü nükleotid kombinasyonları için ZF motifi üretilmemiştir. Bu nedenle genomda istenilen her bölge ile çalışmak mümkün değildir. ZFN'ler kullanılarak bitki genom düzenlemesine yönelik birçok araştırma yapılmıştır (Lloyd vd., 2005; Kumar vd., 2015).



Şekil 4. Çinko Parmak Nükleazın DNA'yı kesmesi (Tufan ve Keleş, 2019).

3.2.2. Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Efektör Nükleazlar (TALEN'ler)

Dizi spesifik nükleaz ailesinin ikinci üyesi olan TALEN sistemi ZFN sistemine bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır (Joung ve Sander, 2013). TALEN sistemi de ZFN sistemi gibi bir DNA bağlanma domaini ve *FokI* DNA kesim domaininden oluşmaktadır (Budhagatapalli vd., 2015). TALEN sisteminde DNA'ya bağlanmayı sağlayan TAL efektörleri ilk olarak bir bitki patojeni olan *Xanthomonas* bakterisinin türlerinde keşfedilmişlerdir (Boch vd., 2009; Moscou vd., 2009). Enfeksiyon sırasında *Xanthomonas* türüne ait bakteriler transkripsiyon aktivatör benzeri (Transcription Activator-Like - TAL) efektörleri (seçici olarak DNA/proteinlere bağlanan ve onların biyolojik aktivitelerini düzenleyen küçük moleküller) bitki hücrelerine göndermekte ve bu efektörler spesifik bitki geni promotorlarına bağlanarak bu genleri aktive etmektedirler. *Xanthomonas* türleri bu yolla bitkilerde hastalık yapmaktadırlar (Scholze vd., 2011; Voytas, 2013).

Bitki patojeninde doğal olarak bulunan TALE (Transcription Activator-Like Effector) proteinlerinin genom modifikasyonunda kullanılabileceği ilk defa bitki genomik DNA'sının manipülasyonu ile gösterilmiştir. Böylece TALE proteinlerinin DNA bağlanma mekanizmasının anlaşılmasında ilk adımlar atılmıştır (Cermak vd., 2011; Miller vd., 2011).

Genom modifikasyonu aracı olarak kullanılan TALEN'ler, her biri farklı bir nükleotidi tanıyıp bağlanan TALE protein dizisi ve *FokI* endonükleazının birleştirilmesiyle oluşturulmuştur (Pattanayak vd., 2014). TALE proteinleri çeşitli kopya sayılarında her biri 33-35 amino asitten oluşan tekrarlar içerirler. Her tekrarın 12. ve 13. pozisyonunda "repeat variable diresidue (RVDs)" olarak adlandırılan ikili aminoasit, hedef DNA sekansıya baz eşleşmesini sağlar (Kumar vd., 2015). En yaygın RVD'ler, yani aminoasitler, NI, NG, NN ve HD'dir. Bunlar sırasıyla adenin, timin, guanin ya da sitozine bağlanırlar (Voytas 2013).

DNA'nın istenen bölgesinde kesim yapmak için alt ve üst ipliklerden karşılıklı DNA ipliklerine bağlanan bir çift TALEN gereklidir. Alt ve üst DNA ya bağlanan TALEN'ler dimerize olmadan (birbirleriyle temas kurmadan) TALEN' in nükleaz aktivitesi gerçekleşemez. Yani tek bir TALEN kendi ba-

şına kesim etkinliğine sahip değildir. Karşılıklı olarak bağlanan iki TALEN yapısı arasında 14–18 bç (baz çifti) kadar mesafe olmalıdır. Bu dimerize yapı oluştuğunda *FokI* endonükleazları hedeflenen DNA sekansında çift iplik kesikleri oluşturur (Şekil 5) (Akbudak ve Kontbay, 2017).

Her biri farklı bir bazı tanıyan RVD'lerden oluşturulmuş TAL efektör proteinleri, hedeflenecek DNA dizisine göre yeniden oluşturulabilirler (Reyon vd., 2012). İsteğe göre tasarlanan TAL efektörlerinin inşası kolay değildir. TALE proteinlerindeki tekrarların sekansı birbirine çok benzer olduğundan PCR stratejisi kullanarak RVD'leri sıralı bir biçimde birleştirmek neredeyse imkânsızdır. Birçok grup TAL efektör tekrarlarını kodlayan kasetlerin birleştirilmesi için ligasyon temelli birleştirme metotları önermiştir. Bunlar arasında en popüler olanı Golden Gate Assembly metodudur (Cermak vd., 2011). Bu yaklaşımda TAL efektörü (TALE) kodlayan farklı RVD sekansları tek reaksiyonla birleştirilebilir (Voytas 2013). TALEN sisteminde kullanıcının belirlediği hemen hemen her sekans hedeflenebilir (Gaj vd., 2013; Jung ve Sander, 2013).

Her ne kadar TALEN sisteminin spesifikliği oldukça yüksek olsa da TALEN kullanılarak genom düzenlemede hedef-dışı mutasyonların olabileceği rapor edilmiştir (Clasen vd., 2016). DNA'ya bağlanacak TALE sekanslarının belirlenmesinde hedef sekansa olan spesifisiteyi sağlamak ve aynı zamanda hedef-dışı sekanslara bağlanmayı önlemek için bazı web temelli programlar geliştirilmiştir (Akbudak ve Kontbay, 2017).

TALEN sistemi DNA üzerinde istenen bölgeye bağlanıp çift iplik kesiği oluşturduğunda bu kesiğin NHEJ ya da HR tamiri ile mayada, bitkilerde, nematodlarda, zebra balığında, farelerde, insan somatik hücrelerinde ve pluripotent kök hücrelerde endojen genlerin değiştirilebileceği gösterilmiştir (Reyon vd., 2012; Char vd., 2015). TALEN'ler verim artışı yanında tarım ürünlerinde kalitenin artırılmasında ve pazar payının yükseltilmesinde de kullanılabilir (Akbudak ve Kontbay, 2017).

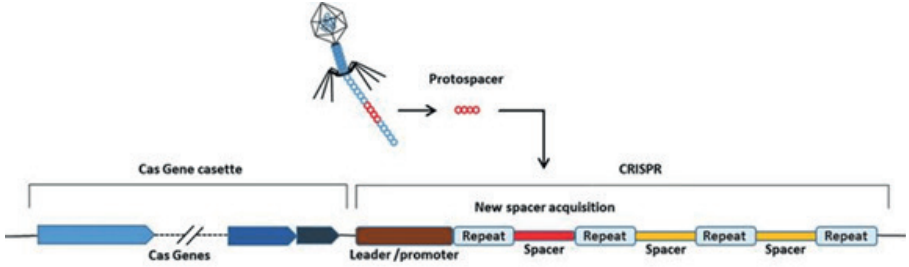
Nükleaz domaini olmayan TALE'ler gen ifadesinin düzenlenmesinde kullanılmaktadır. TALE'ler yardımıyla genlerin ekspresyonunu güçlendirmek, azaltılmak ya da tamamen durdurulabilmek mümkün olmaktadır. Bu amaç için kesim domaini TALEN vektörüne eklenmemekte, uzaklaştırılmakta veya inaktive edilmektedir. Bunu takiben TALE dizisi, transkripsiyonel aktivatörler ya da represörler ile birleştirilip oluşan füzyon protein, promotor ve çevresine bağlanacak şekilde düzenlendiğinde ilgili genin ekspresyonu kontrol altına alınabilmektedir (Baltes ve Voytas, 2015).

TALEN teknolojisi CRISPR'ların maliyet ve kolay elde edilebilme gibi avantajlarına rağmen, hedef lokustaki yüksek spesifisitesi nedeniyle (Char vd., 2015) yine de birçok araştırmacı tarafından tercih edilmektedir. Farklı TALEN yapılarının geliştirilmesi ve başka bakteri türlerinden doğal TALE

ki tartışmaları uzun süre devam ederken ortak paydada buluştukları nokta CRISPR/Cas sisteminin RNA aracılı bir savunma mekanizması olabileceği olmuştur. 2012 yılında Jennifer Doudna ve Emmanuelle Charpentier'in Cas proteinlerinin ve Tip II CRISPR sisteminin moleküler mekanizmasını aydınlatmasıyla CRISPR çalışmalarını ileri seviyeye taşımışlardır (Jiang ve Doudna, 2015).

4.1. CRISPR Lokusunun Bileşenleri

CRISPR dizileri ve Cas genleri mikrobiyal türler arasında farklılık göstermekte olup palindromik tekrar sekansları, aralayıcı (spacer) DNA bölgele-ri, lider dizide açık okuma çerçevesinin (ORF) bulunmayışı ve Cas genlerinin bulunması özelliği ile evrenselliğe sahiptir (Semenova vd., 2011). Bakteriyel kromozomda CRISPR bölgesinin yapısı Şekil 5'te gösterilmiştir.

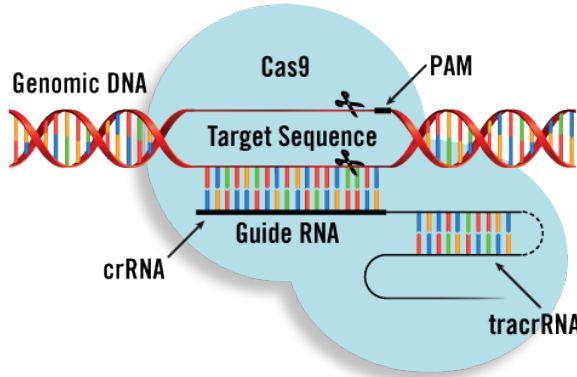


Şekil 6. Genelleştirilmiş CRISPR/Cas Lokusu (Soni, 2017).

CRISPR lokusunda palindromik tekrar dizilerinin uzunluğu ve dizi içeriği büyük oranda korunmuş olmakla birlikte türler arasında farklılık gösterebilmektedir. Söz konusu dizilerin uzunluğu değişmekte olup 24 ile 47 baz çifti arasındadır. Aralayıcı (spacer) DNA bölgeleri olarak isimlendirilen dizilerin uzunluğu ise 26 ile 72 baz çifti arasında değişiklik göstermektedir (Sorek vd., 2008). Genomdaki aralayıcı DNA bölgesi tek olabildiği gibi birden fazla sayıda da olabilmektedir. Lider dizi ise yaklaşık 500 nükleotit içermekte olup açık okuma çerçevesi yoktur (Haft vd., 2005).

Mikroorganizmalardaki orijinal CRISPR sisteminde Cas9 proteinine rehberlik eden crRNA ve tracrRNA olmak üzere iki CRISPR RNA'sı bulunur. Genom düzenlemede kullanılan yeniden programlanmış CRISPR sisteminde ise crRNA'nın 3' bölgesi ile tracrRNA'nın 5' ucunun birleştirilmesiyle meydana getirilen sgRNA (single guide RNA) olarak adlandırılan tek bir RNA söz konusudur (Bortesi vd., 2015). Bu sayede CRISPR teknolojisinden yararlanmak için Cas9 olarak adlandırılan DNA endonükleaz ve genomda hangi bölge hedeflenecekse ona göre dizayn edilen 20 nükleotidlik bir RNA dizisi yeterli olmaktadır. Sistemin bu iki elemanının DNA'daki hedef bölgeye bağ-

lanıp bir protein (Cas 9) – RNA (SgRNA) – DNA (genomik DNA) kompleksi oluşturmasıyla hedef bölgede çift iplik kesikleri meydana gelir (Fichtner vd., 2014; Schaeffer vd., 2015). Hedef bölgenin tanınması ve Cas9/sgrRNA kompleksinin DNA üzerinde kesim yapabilmesi için tek ön koşul hedef bölgenin 3' ucunda PAM ismi ile adlandırılmış bir NGG sekansının bulunmasının gerekliliğidir (Gasiunas vd., 2012; Mahfouz vd., 2014). CRISPR sisteminin çalışma mekanizması Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 7. CRISPR sisteminin çalışma mekanizması (Anonim, 2019).

4.2. CRISPR/Cas Sistemi Tipleri

İki ana sınıf, altı tip ve 20'den fazla alt tipe sınıflandırılmış olan CRISPR sistemlerinin alt tipleri farklı efektör kompleksler kullanmaktadır. Tip I, tip II ve tip V sistemleri DNA'yı, tip VI sistemi RNA'yı, tip III sistemi ise RNA'yı ve DNA'yı hedeflemektedir. Sınıf 1 sistemlerdeki interferans mekanizması (tip I, III ve IV) birden fazla Cas proteininden oluşur ancak sınıf 2 sistemlerde (tip II, V ve VI) interferans için tek bir efektör Cas proteini gerekmektedir. Genom düzenleme için günümüzde en yaygın kullanılan CRISPR/Cas sistemi tip II sistemidir (McGinn ve Marraffini, 2019).

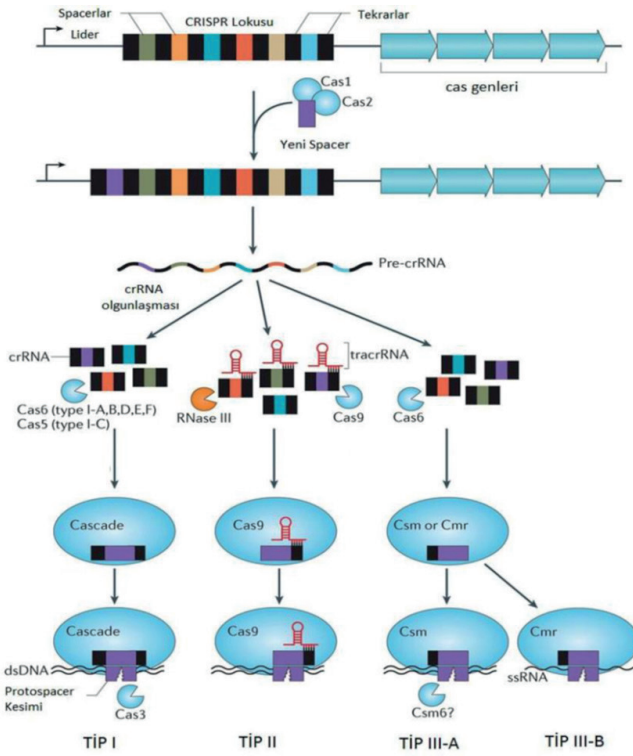
Sınıf	Tip	Alt Türleri	Cas endonükleaz	Hedef	tracrRNA
Sınıf I	Tip I	7	Cas3	DNA	Gerekli değil
	Tip III	4	Cas10	DNA/RNA	Gerekli değil
	Tip IV	1	—	—	—
Sınıf II	Tip II	3	Cas9	DNA	Gerekli
	Tip V	3	Cas12	DNA	1 alt türde gerekli
	Tip VI	3	Cas13	DNA	Gerekli değil

Tablo 2. Cas endonükleazları, hedefleri ve tracrRNA'nın gereksinim durumu açısından altı türe ayrılmış iki CRISPR/Cas sistemi sınıfı (Mah, 2019).

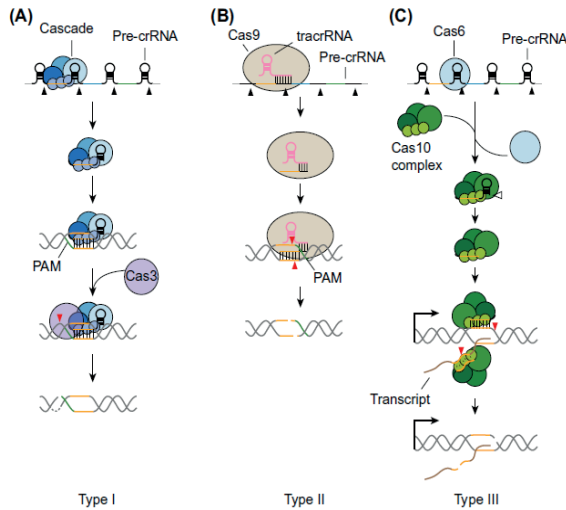
İlk defa *Escherichia coli* bakterisinde tanımlanan (Brouns vd, 2008).

Tip I CRISPR/Cas sistemi Tip I sisteminde helikaz ve DNaz bölgeleri içeren büyük bir kompleks proteini olan Cas3 proteini görev almakta olup söz konusu protein istilacı genomun parçalanmasına ve yok edilmesine katkı sağlamaktadır (Staals vd., 2013). İlk defa *Streptococcus thermophiles* bakterisinde tanımlanan Tip II CRISPR/Cas sistemi, Cas9 endonükleazı, Cas9 enzimine rehberlik eden crRNA ve crRNA'nın olgunlaşmasından sorumlu tracrRNA olmak üzere 3 bileşenden oluşmaktadır (Jinek vd., 2012). Cas9 proteinin birden fazla fonksiyonu bulunmaktadır. Daha sonraki bölünme için faj ve plazmit DNA'yı bağlayacak crRNA-tracrRNA şeklinde bir ribonükleoprotein kompleksi oluşturarak Cas9'un rehberlik etmesini kolaylaştırmaktadır. Hedef DNA'nın kesilmesini crRNA ve tracrRNA'nın yardımı ile gerçekleştirmektedir (Mei vd., 2016). Tip III sistemi Cas10 alt birimini paylaşarak DNA veya RNA hedefleri için özgünlüklerine göre tip IIIA (CSM) ve tip IIIB (CMR) şeklinde alt sınıflara ayrılmaktadır (Savić ve Schwank, 2016). Bu sistem Cascade yapısına benzeyen Csm/Cmr kompleksleri oluşumu ile karakterize olup pre-crRNA'dan oluşan crRNA Cmr/Cas10 veya Csm/Cas10 proteinleri ile kompleks oluşturmaktadır. Oluşan kompleksteki Cas proteinleri yabancı DNA'yı kesmektedir (Aslan, 2020).

RNA hedefli nükleaz aktivitesine sahip olan Tip I ve Tip III CRISPR Cas sistemleri büyük bir multimerik crRNA-Cas ribonükleoprotein kompleksi oluşturmaktadır dolayısıyla bu durum söz konusu sistemlerin geliştirilmelerini zorlaştırmaktadır. Tip II sisteminde ise Tip I ve Tip III'ün aksine hedef DNA molekülünü kesen tek bir endonükleaz aktivitesi söz konusu olduğu için daha pratiktir (Sapranaukas vd, 2011).



Şekil 8. *Tip I, Tip II ve Tip III CRISPR sistemlerinin moleküler mekanizması (Aslan, 2020).*



Şekil 9. *Sırasıyla CRISPR/Cas Sistem tiplerinin (Tip I, Tip II, Tip III) crRNA biyogenez ve hedeflendirme mekanizması (Ilıkkın, 2019).*

4.3. ZFN, TALEN ve CRISPR Teknolojilerinin Karşılaştırılması

CRISPR ile kıyaslandığında, ZFN ve TALEN'leri dizayn etmek ve hazırlamak hem zor hem zaman alıcıdır (Fichtner vd., 2014). Özellikle ZFN konstraktlarının manipüle edilmelerinin zor ve pahalı olması (Schiml vd., 2016) bitkiler dâhil birçok organizmada kullanımını kısıtlamıştır. TALEN'lerin oluşturulması ZFN'lere kıyasla kolay olmakla birlikte, yine de deneyim istemektedir (Ma vd., 2016).

CRISPR vektörlerinin hazırlanmasının kolaylığı yanında, Cas9 nükleazın kesim yapılabilmesi için dimerize olmasına ihtiyaç olmaması bu sistemin önemli avantajları arasında yer almaktadır. Cas9 hedef DNA'yı ona rehberlik eden sgRNA ile hedef dizi arasındaki Watson-Crick baz eşleşmesine göre tanımaktadır (Ding vd., 2016). Bu sayede ZFN ve TALEN'lerde olduğu gibi iki ayrı yapının hazırlanmasına ihtiyaç duyulmamaktadır (Akbulak ve Kontbay, 2017).

Maliyetlerine bakıldığında ZFN ve TALEN sistemleri CRISPR sistemine göre daha pahalıdır (Ceasar vd., Samanta 2016). Protein dizaynının ve sentezinin zorluğu ZFN ve TALEN'lerin rutin olarak kullanılmalarını engellemiştir. Oysa CRISPR da farklı bir hedef için sadece 20 nükleotidlik bir sgRNA modifiye edilmesi yeterli olup, yoğun bir iş gücü gerektirmemektedir (Samanta vd., 2016). Hedef-dışı etki oranı en düşük olan teknoloji TALEN'dir. Fakat ZFN ve CRISPR sistemlerinin de hedef spesifiteleri arttırılabilir (Kumar ve Jain, 2015; Fichtner vd., 2014).

ÖZELLİK	ZFN	TALEN	CRISPR
Bağlanma prensibi	RNA-DNA	Protein-DNA	Protein-DNA
Metilasyon duyarlılığı	Duyarlı Değil	Duyarlı	Duyarlı
Maliyet	Yüksek	Orta	Düşük
Hedeflenen etki	Sınırlı	Ortalama	İyi
Temel bileşenler	Çinko Parmak Protein Fok I Füzyon Proteinini	TALE ve Fok I Füzyon Proteinini	Rehber RNA Cas Protein
Tasarlanma süresi	Uzun (7-15 gün)	Uzun (5-7 gün)	Kısa (1-3 gün)
Çoklu gen mutasyonları	Sınırlı	Sınırlı	Sınırsız
Hedef dışı etki	Yüksek	Düşük	Düşük
Hedef dizi uzunluğu	18-24 Baz Çifti 4-7 Aralayıcı	30-60 Baz Çifti 13-33 Aralayıcı	20 Baz Çifti
Orijin	Doğada yaygın olarak bulunan çinko parmak proteinlerinden uyarlanmıştır	Bitki patojenlerinde TAL efektör proteinlerinden uyar- lanmıştır	<i>S. pyogenes</i> bakteriyel bağ- ışıklık sisteminin uyarlan- mıştır
Sitotoksosite	Değişken/Yüksek	Düşük	Düşük
Tasarlanma durumu	Çok Kompleks	Kompleks	Basit
Kullanılan nükleaz	Fok I	Fok I	Cas
Başarı oranı	Düşük (%24)	Yüksek (>%99)	Yüksek (>%90)
Mutasyon oranı	Düşük/Değişken (%10)	Yüksek (%20)	Düşük (≤%10)

CamScanner ile tarandı

Tablo 3. ZFN, TALEN ve CRISPR genom düzenleme teknolojilerinin karşılaştırması (Çiftçi ve Uncuoğlu, 2019).

2013 yılının başlarında Cas9 sisteminin insan hücre kültürlerinin genom modifikasyonu için kullanılabileceği gösterilmesiyle CRISPR sisteminin diğer ökaryot organizmalarda kullanılabileceği de anlaşılmıştır (Schiml ve Puchta, 2016). Aynı yılın Ağustos ayında ise CRISPR sisteminin bitkilerde kullanılabileceğini rapor eden 3 makale yayımlanmıştır (Bortesi vd., 2015; Schiml ve Puchta, 2016). Bu farklı gruplar *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana*, çeltik ve buğday protoplastı kullanılarak Cas9 proteinin bitki genomunda aktif bir şekilde kesim yaptığını ortaya koymuşlardır (Bortesi vd., 2015; Samanta vd., 2016).

Hedef-dışı etki genom düzenleme çalışmalarının başlıca sorunudur (Zhang vd., 2016a; Zhang vd., 2016b). Bu durum genom modifikasyon araçlarının (her ne kadar genomda belli bir bölgeye göre tasarlanmış olsa da) genomda yanlış yere bağlanıp kesim yapması ve istenmeyen diğer mutasyonları da oluşturmaktadır. Bu yanlış kesimin nedeni çoğunlukla genomda hedeflenen dizinin sekansına benzeyen başka dizi veya dizilerin bulunmasıdır. Genomda böyle yanlış eşleşme ve akabinde yanlış kesim oluşturabilecek dizilerin varlığı çeşitli bilgisayar programları yardımıyla önceden tahmin edilebilmektedir (Zhang vd., 2016a; Zhang vd., 2016b). Bu programların kullanılabilmesindeki en önemli kısıt DNA'sı kesilmek istenen bitki türünün genomunun sekanslanmış olmasının gerekliliğidir (Akbudak ve Kontbay, 2017).

CRISPR sisteminin en önemli avantajlarından biri, tek bir sgRNA ile homolog genlerin eş zamanlı susturulabilmesidir (Endo vd., 2015; Zhang vd., 2016a). Diğer yandan, çoklu sgRNA'lar içeren Cas9/sgRNA ekspresyon vektörlerinin kullanılmasıyla bir gen ailesi üyelerinin görev aldıkları yollarındaki fonksiyonları incelenebilir (Xing vd., 2014; Zhang vd., 2016a; Zhang vd., 2016c).

Cas9 ve sgRNA'nın hücre içerisine protein ve RNA olarak yollanabilmesi sayesinde GDO (Genetiği Değiştirilmiş Organizma)'lardaki endişenin temel nedenlerinden biri olan, organizmalar arası gen aktarımı ve bunun getireceği muhtemel sorunların önüne geçilebileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Woo vd., (2015) CRISPR sistemiyle *Arabidopsis*, tütün, marul ve çeltikte yaptıkları çalışmada Cas9 proteini ve sgRNA'yı direkt olarak PEG (polietilen glikol) varlığında bitki protoplastlarına göndermiş ve %46'ya varan oranlarda hedeflenmiş mutagenез yapılabileceğini rapor etmişlerdir. Benzer şekilde Cas9-sgRNA ribonükleoprotein kompleksini biolistik yolla mısır embriyolarına gönderen Svitashev vd. (2016), bu embriyolardan rejenere olan bitkilerde hedeflenen mutasyonlar gözlemlenmiştir. Her iki çalışmayla da istenen modifikasyonu içeren ama yabancı DNA ve markör kullanılmaksızın bitkilerin elde edilebileceği gösterilmiştir (Akbudak ve Kontbay, 2017).

5. SONUÇ

Tarımın geleceği, giderek şiddetlenen iklim değişikliği, azalan su ve toprak kaynakları ile genetik çeşitliliğin kaybı gibi küresel ölçekteki tehditler karşısında yeniden düşünölmek zorundadır. Dünya nüfusunun hızla artışı, gıda üretimine olan ihtiyacı katlayarak artırırken, mevcut ıslah yöntemlerinin bu talebi karşılamada sınırlı kaldığı görölmektedir. Geçmişte Yeşil Devrim ve biyoteknoloji devrimi ile önemli ilerlemeler sağlanmış olsa da, günümüzde artan ekolojik baskılar ve sürdürülebilirlik ihtiyacı yeni çözümleri zorunlu kılmaktadır.

Bu noktada, yeni nesil genom düzenleme teknolojileri bitki ıslahında bir dönüm noktası olarak karşımıza çıkmaktadır. ZFN ve TALEN gibi yöntemlerin ardından, CRISPR/Cas sisteminin sunduğu hız, maliyet etkinliği ve hassasiyet, klasik ıslah ve gen aktarım yöntemlerinin ötesine geçilmesini sağlamaktadır. Genom üzerinde nükleotid seviyesinde gerçekleştirilebilen düzenlemeler, uzun ve zahmetli seleksiyon süreçlerini kısaltmakta; aynı zamanda doğa-özdeş değişiklikler yapılabilmesine imkân tanıyarak toplumsal kabul için de önemli bir avantaj sunmaktadır.

Bu gelişmeler yalnızca teknik bir ilerleme değil, aynı zamanda küresel gıda güvenliği, iklim değişikliğine uyum ve sürdürülebilir üretim için de stratejik bir fırsat oluşturmaktadır. Yine de, teknolojinin yaygın kullanımında etik tartışmalar, kamuoyunun yaklaşımı ve düzenleyici çerçeveler belirleyici olacaktır. Jennifer Doudna'nın da belirttiği gibi:

“Tüm bilim alanlarında yeni bulguları desteklemeye devam etmeli, bu keşiflere gözcöölük etmeyi bütün kalbimizle kucaklamalı, bu işi özenle yerine getirmeliyiz. Çünkü, tarihin gösterdiği gibi, bilimsel ilerlemeye hazır olmamak, bunun gerçekleşmeyeceği anlamına gelmez. Ne zaman doğanın sırlarından birinin kilidini açsak, bu gelişme bir deneyin sona erdiğine, pek çok başka deneyin başladığına işaret eder.” (Doudna ve Sternberg, 2018).

Sonuç olarak, restriksiyon enzimlerinden CRISPR/Cas teknolojisine uzanan yolculuk, yalnızca bilimsel bir evrim değil, aynı zamanda insanlığın gelecekteki gıda güvenliği ve sürdürülebilir tarım için umut verici bir yol haritası olarak değerlendirilebilir.

TEŞEKKÜR

Hazırlamış olduğum içerik konusunda akademik bilgi birikimini, desteğini ve anlayışını her zaman hissettiren, beni yönlendirerek bilimsel bakış açısı kazanmamı sağlayan proje danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sergöl ERGİN'e teşekkür ederim. Ayrıca, araştırmamın yazımında ve içeriğinin düzenlenmesinde sağladığı değerli destek için kardeşim ve bölümdaşım Nilay ŞENTÜRK'e; eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen annem Sabriye Rahim'e teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

- Akbudak, M. A. ve Kontbay, K. 2017. Yeni Nesil Genom Düzenleme Teknikleri: ZFN, TALEN, CRISPR'lar ve Bitkilerde Kullanımı. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 26(1), 111-126.
- Anonim, 2019. Genom Düzenleme. <https://www.bezelyedergi.net/post/genom-d%C3%BCzenleme> [Erişim Tarihi: 25.04.2021]
- Aslan, E. Ş., 2020. CRISPR-Cas9 Sistemi Kullanılarak Erkek Kısır Tütün (Nicotina tabaccum) Bitkilerinin Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü. 11, 13 s. (yayınlanmamış).
- Baltacı, A. M., Arslan, M. 2020. Bitki Islahında CRISPR/Cas9 Uygulamaları. Dergi-Park Akademik. ISSN: 2651-5334.
- Baltes, N. J., Voytas D. F. 2015. Enabling plant synthetic biology through genome engineering. Trends in Biotechnology, 33(2):120-131.
- Barrangou, R., Marraffini, L. A. 2014. CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. Molecular cell, 54:2, 234-244.
- Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., Patron, N. J. ve Nekrasov, V. 2015. Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. Current opinion in biotechnology, 32, 76-84.
- Boch, J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A., Bonas U., 2009. Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. Science, 326(5959):1509-1912.
- Bortesi, L., Fischer R., 2015. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. Biotechnology Advances, 33(1):41-52.
- Brown, T. A. 2013. Gen Klonlama ve DNA Analizi. No: 64, 65. Ankara.
- Brouns, S. J. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J. H., Snijders, A. P. L., Dickman, M. J., Makarova, K. S., Koonin, E. V., Oost, J. V. 2008. Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. Science, 321(5891): 960-964.
- Budhagatapalli, N., Rutten T., Gurushidze M., Kumlehn J., Hensel G., 2015. Targeted Modification of Gene Function Exploiting Homology-Directed Repair of TALEN-Mediated Double-Strand Breaks in Barley. G3-Genes Genomes Genetics, 5(9):1857- 1863.
- Cesar, S.A., Rajan V., Prykhodzhiy S.V., Berman J.N., Ignacimuthu S. 2016. Insert, remove or replace: A highly advanced genome editing system using CRISPR/Cas9. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research, 1863(9):2333-2344.
- Cermak, T., Doyle E.L., Christian M., Wang L., Zhang Y., Schmidt C., Baller J.A., Somia N. V., Bogdanov A. J., Voytas D. F., 2011. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. Nucleic Acids Research, 39(17):7879.

- Char, S. N., Unger-Wallace E., Frame B., Briggs S. A., Main M., Spalding M.H., Volbrecht E., Wang K., Yang B. 2015. Heritable site-specific mutagenesis using TALENs in maize. *Plant Biotechnology Journal*, 13(7): 1002-1010.
- Clasen, B. M., Stoddard T. J., Luo S., Demorest Z. L., Li J., Cedrone F., Tibebu R., Davison S., Ray E. E., Daulhac A., Coffman A., Yabandith A., Retterath A., Haun W., Baltes N. J., Mathis L., Voytas D. F., Zhang F., 2016. Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnology Journal*, 14(1):169-176.
- Cohen, J. E. 2003. Human population: the next half century. *science*, 302:5648, 1172-1175.
- Çiftçi, Y. Ö., Uncuoğlu, A. A. 2019. Bitki Biyoteknolojisinde Güncel Yaklaşımlar. No: 171- 173. Ankara.
- Ding, Y. D., Li H., Chen L. L., Xie K. B. 2016. Recent Advances in Genome Editing Using CRISPR/ Cas9. *Frontiers in Plant Science*, 7:703.
- Doudna, J.A., Sternberg, S.H., 2018. Yaratılıştaki Çatlak. 2. Baskı. No: 10,11,13,221, İstanbul.
- Endo, M., Mikami M., Toki S. 2015. Multigene Knockout Utilizing Off-Target Mutations of the CRISPR/Cas9 System in Rice. *Plant and Cell Physiology*, 56(1):41-47.
- Ertaş, S., Yakın, K., 2019. Üreme Hücrelerinde Genomik Editleme. *TSRM Blast*, Temmuz 2019 Sayısı.
- Fichtner, F., Castellanos R. U., Ulker B., 2014. Precision genetic modifications: a new era in molecular biology and crop improvement. *Planta*, 239(4):921-39.
- Fu, Y., Sander, J. D., Reyon, D., Cascio, V. M., Joung, J. K., 2014. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature biotechnology*, 32:3, 279-284.
- Gasiunas, G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V., 2012. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(39): E2579-E86.
- Gaj, T., Gersbach, C. A., Barbas III, C. F. 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 31:7, 397-405.
- Haft, D. H., Selengut, J., Mongodin, E. F., Nelson, K. E. 2005. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol*, 1:6, e60.
- Hussain, Wani, S., Brajendra Singh, N., Haribhushan, A. Iqbal Mir, J. 2013. Compatible solute engineering in plants for abiotic stress tolerance-role of glycine betaine. *Current genomics*, 14(3), 57-165.
- Hwang, W. Y., Fu Y. F., Reyon D., Maeder M. L., Tsai S. Q., Sander J. D., Peterson R. T., Yeh J-R J., Joung J. K. 2013. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31(3):227-229.

- Ilıkkın, Ö. K. 2019. Tip 1, Tip 2, Tip 3 Crispr/Cas sistemi. <https://drozgekahramanilikkan.com/2019/01/09/tip-1-tip-2-tip-3-crispr-cas-sistemi/> [Erişim Tarihi: 25.04.2021]
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., Nakata, A. 1987. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, 169:12, 5429-5433.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. ve Charpentier, E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *science*, 337:6096, 816-821.
- Jiang, F., Doudna, J. A. 2015. The structural biology of CRISPR-Cas systems. *Current opinion in structural biology*, 30, 100-111.
- Joung, J. K., Sander J. D., 2013. INNOVATION TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(1):49-55.
- Kumar, V., Jain, M., 2015. The CRISPR-Cas system for plant genome editing: advances and opportunities. *Journal of Experimental Botany*, 66(1):47-57.
- Lee, H. B., Sundberg, B. N., Sigafos, A.N., Clark, K. J. 2016. Genome Engineering with TALE and CRISPR Systems in Neuroscience. *Frontiers in Genetics*, 7 (DOI: 10.3389/fgene.2016.00047).
- Lloyd, A., Plaisier, C. L., Carroll, D., Drews, G. N. 2005. Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 2232-2237.
- Mah, A. (2019). Classy CRISPR: Differences between Class 1 and Class 2 systems. <https://www.synthego.com/blog/crispr-system> [Erişim Tarihi: 10.12.2020]
- Mahfouz, M.M., Piatek A., Stewart C. N., 2014. Genome engineering via TALENs and CRISPR/Cas9 systems: challenges and perspectives. *Plant Biotechnology Journal*, 12(8):1006-1014.
- Maurya, G. K. 2019. Restriction Enzyme. Springer Nature Link. *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior*, 6002-6006.
- Mei, Y., Wang, Y., Chen, H., Sun, Z. S., Ju, X.-D. 2016. Recent progress in CRISPR/Cas9 technology. *Journal of Genetics and Genomics*, 43:2, 63-75.
- McGinn, J., Marraffini, L. A. 2019. Molecular mechanisms of CRISPR-Cas spacer acquisition. *Nature Reviews Microbiology*, 17(1):7-12.
- Miller J.C., Tan S., Qiao G., Barlow K.A., Wang J., 2011. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature biotechnology*, 1;29(2):143-148.
- Moscou M.J., Bogdanove A.J., 2009. A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. *Science*, 326(5959):1501.
- Nejat N., Rookes J., Mantri N.L., Cahill D.M., 2016. Plant-pathogen interactions: toward development of next-generation disease-resistant plants. *Critical re-*

views in biotechnology, 37(2):229-237.

- Pattanayak V., Guilinger J.P., Liu D.R., 2014. Determining the Specificities of TALENs, Cas9, and Other Genome-Editing Enzymes. Use of CRISPR/Cas9, ZFNs, and TALENs in Generating Site-Specific Genome Alterations. *Methods in Enzymology*, 546:47-78.
- Ran, Y., Liang, Z. Gao, C. 2017. Current and future editing reagent delivery systems for plant genome editing. *Science China Life Sciences*, 60(85), 490-505.
- Rani R., Yadav P., Barbadikar K.M., Baliyan N., Malhotra E.V., Singh B.K., Kumar A., Singh D., 2016. CRISPR/Cas9: a promising way to exploit genetic variation in plants. *Biotechnology Letters*, 38(12):1991- 2006.
- Reyon D., Tsai S. Q., Khayter C., Foden J. A., Sander J. D., Joung J. K., 2012. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nature Biotechnology*, 30(5):460-465.
- Samanta MK., Dey A., Gayen S., 2016. CRISPR/Cas9: an advanced tool for editing plant genomes. *Transgenic Research*, 25(5):561-73.
- Sapranaukas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P. Ve Siksnys, V. 2011. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 39:21, 9275- 9282.
- Savić, N., Schwank, G. 2016. Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. *Translational Research*, 168, 15-21.
- Schaeffer S. M., Nakata P. A., 2015. CRISPR/ Cas9-mediated genome editing and gene replacement in plants: Transitioning from lab to field. *Plant Science*, 240:130-42.
- Schimpl S., Puchta H., 2016. Revolutionizing plant biology: multiple ways of genome engineering by CRISPR/Cas. *Plant Methods*, 12:8.
- Scholze, H., Boch, J. 2011. TAL effectors are remote controls for gene activation. *Current Opinion in Microbiology*, 14(1):47-53.
- Semenova, E., Jore, M. M., Datsenko, K. A., Semenova, A., Westra, E. R., Wanner, B., Van Der Oost, J., Brouns, S. J., Severinov, K. 2011. Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108:25, 10098-10103.
- Soni, M. M. 2017. SEMINAR ON CRISPR. <https://www.slideshare.net/manmohansoni9378/seminar-on-crispr-77127552> [Erişim Tarihi: 25.04.2021].
- Sorek, R., Kunin, V., Hugenholtz, P. 2008. CRISPR—a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 6:3, 181-186.
- Staals, R. H., Agari, Y., Maki-Yonekura, S., Zhu, Y., Taylor, D. W., Van Duijn, E., Barendregt, A., Vlot, M., Koehorst, J. J., Sakamoto, K. 2013. Structure and activity of the RNA-targeting Type III-B CRISPR-Cas complex of *Thermus thermophilus*. *Molecular cell*, 52:1, 135-145.

- Stephenson, J., Newman, K. ve Mayhew, S. 2010. Population dynamics and climate change: what are the links?. *Journal of Public Health*, 32(2), 150- 156. J rice res, 2, e105.
- Svitashev S., Schwartz C., Lenderts B., Young J.K., Cigan A.M., 2016. Genome editing in maize directed by CRISPRCas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature Communications*, 7, Article number: 13274.
- Thieman, W. J., Palladino, M. A. 2013. *Biyoteknolojiye Giriş*. No: 59-61. Ankara.
- Tufan, F., Keleş, E. N. 2019. Genom Düzenleme Teknolojileri ve Bitkilerdeki Uygulamaları. *Haliç Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2/1: 113-133.
- Voytas D.F., 2013. Plant Genome Engineering with Sequence-Specific Nucleases. *Annual Review of Plant Biology*, 64: 327-50.
- Yi, P., Li, W., Ou, G., 2014. The application of transcription activator-like effector nucleases for genome editing in *C. elegans*. *Semantic Scholar*. DOI:10.1016/j.ymeth.2014.04.013.
- Zhang D.D., Li Z.X., Li J.F. 2016a. Targeted Gene Manipulation in Plants Using the CRISPR/ Cas Technology. *Journal of Genetics and Genomics*, 43(5):251-62.
- Zhang Y., Liang Z., Zong Y., Wang YP., Liu JX., Chen K.L., Chen, Qiu J.L. and Gao C., 2016b. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nature Communications*, 7 Article number: 12617.
- Zhang Z.J., Mao Y.F., Ha S., Liu W.S., Botella J.R., Zhu J.K. 2016c. A multiplex CRISPR/ Cas9 platform for fast and efficient editing of multiple genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports* 35(7):1519-1533.
- Xing H. L., Dong L., Wang Z. P., Zhang H. Y., Han C. Y., Liu B, Wang X. C., Chen Q. J., 2014. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biology*, 14.1(2014): 327.
- Wani, S. H. ve Sah, S. K. 2014. Biotechnology and abiotic stress tolerance in rice. *Researchgate, Rice Research: Open Access*, 2(2):100e105.
- Woo J. W., Kim J., Kwon S., Corvalán C., Cho S. W., Kim H., Kim S. G., Kim S. T., Choe S., Kim J.S. 2015. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nature Biotechnology*, 33(11):1162-1164.