

Moleküler

Biyoloji ve Genetik
Biliminde Güncel Tartışmalar

Editör
METİN ERTAŞ



BİDGE Yayınları

Moleküler Biyoloji ve Genetik Biliminde Güncel Tartışmalar

Editör: Assist. Prof. Dr. Metin ERTAŞ

ISBN: 978-625-6707-30-6

1. Baskı

Sayfa Düzeni: Gözde YÜCEL

Yayınlama Tarihi: 25.12.2023

BİDGE Yayınları

Bu eserin bütün hakları saklıdır. Kaynak gösterilerek tanıtım için yapılacak kısa alıntılar dışında yayıncının ve editörün yazılı izni olmaksızın hiçbir yolla çoğaltılamaz.

Sertifika No: 71374

Yayın hakları © BİDGE Yayınları

www.bidgeyayinlari.com.tr - bidgeyayinlari@gmail.com

Krc Bilişim Ticaret ve Organizasyon Ltd. Şti.

Güzeltepe Mahallesi Abidin Daver Sokak Sefer Apartmanı No: 7/9 Çankaya /
Ankara



İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	3
DNA Nanoteknoloji Biyosensörleri.....	4
Ayşe Nur PEKTAŞ	4
RNAi Terapötikleri: Viral Hastalıklar ve Kanser	38
Ayşe Nur PEKTAŞ	38
Glukoz Metabolizması ve Kanser	64
Şeyda BERK.....	64
Pankreas Kanserinin Progresyonunda Tümör Mikroçevrenin Rolü	92
Demet KAÇAROĞLU	92
Kolorektal Kanser Metastazında MikroRNA'lar	120
Şeyda BERK.....	120

BÖLÜM I

DNA Nanoteknoloji Biyosensörleri

Ayşe Nur PEKTAŞ¹

GİRİŞ

Sensörler, makine imalatı, tıp, inovasyon ve çevre izleme gibi farklı alanlardaki geniş uygulamaları nedeniyle oldukça fazla ilgi görmektedir. Biyosensörler, genellikle protein, peptid, DNA ve RNA gibi biyomoleküller olan hedef analitleri tespit etmeye yönelik küçük cihazların bir türüdür (Chao ve ark., 2016). Biyosensörlerin tıbbi teşhis ve tedavide önemli bir itici güç olmasının nedeni özellikle çeşitli hastalıklar için izlenebilir biyobelirteçlerin giderek artan şekilde tanımlanmasıdır (Kelley, 2017; Labib ve ark., 2016; Lin ve ark., 2016; Ye ve ark., 2018). Bununla birlikte, diyabetin izlenmesine yönelik glikoz ölçüm cihazları dışında, biyosensörlerin ticari başarısı ve gerçek dünyadaki uygulamaları çok az olmuştur. Pek çok olası neden arasında, biyosensörlerin performansının, in

¹ Öğr. Gör. Dr., Sivas Cumhuriyet Üniversitesi

vivo doğal muadilleriyle karşılaştırıldığında sınırlı kalması yer almaktadır. Karmaşık bir biyolojik ortam altında tek molekül düzeyindeki biyobelirteçlerin dakika ölçeğinde hızlı bir şekilde yakalanması öngörülebilir, ancak bu, mevcut biyosensörlerin yeteneğinden çok uzaktır (Kelley ve ark., 2014). Bu üst düzey gereksinimleri karşılamak için araştırmacılar, in vitro biyomoleküler etkileşimlerin gücünü artırmak amacıyla moleküler biyoteknoloji ve nanoteknoloji dahil olmak üzere çeşitli yaklaşımlardan yararlanmışlardır (Fan ve ark., 2003; Lu ve ark., 2013; Sage ve ark., 2014; Soleymani ve ark., 2009).

Biyosensörlerin bir alt alanı olarak DNA bazlı biyosensörler, hedefleri algılamak için DNA şeritlerini prob olarak kullanır ve hedef tanıma süreçleri her zaman iki şekilde gerçekleşir. Birincisi İn vitro DNA hasarı tespitine yönelik problemler de dahil olmak üzere çok çeşitli sensörlerin tasarlandığı, DNA veya RNA hedefleri ile problemlerin hibridizasyonu, ikincisi ise problemlerin hedeflerle veya hedeflerin belirli özelliklerine ilişkin alt birimlerle ilişkilendirilmesidir (Teles & Fonseca, 2008; Zhao ve ark., 2014). Örneğin aptamerlerin proteinler veya küçük moleküller ile ilişkilendirilmesine ve moleküllerin DNA çift sarmalına eklenmesine dayalı olarak çeşitli sensörler geliştirilmiştir. Enzim veya antikor bazlı yaygın biyosensörlerden farklı olarak duyarlılığı yüksek DNA bazlı biyosensörler, düşük maliyet ve yüksek montaj verimliliği ile hazırlanabilmektedir (Chao ve ark., 2016).

Yeni nanomateriyallerin kullanımı, hedef analizleri için akıllı, basit ve ucuz tespit hedefine yönelik DNA biyosensörlerinin geliştirilmesini teşvik etmiştir. Şu anda mevcut olan bu DNA biyosensörleri büyük umut vaat ediyor olsa da, iyileştirilmesi gereken temel birkaç problem vardır (Chao ve ark., 2016);

(1) Hassasiyeti artırmak için DNA problemlerinin tanıma katmanları üzerine montaj üretiminin geliştirilmesi,

(2) En düşük seviyelerde bile tespit edebilme için yeni büyütme yöntemlerinin kullanılması,

(3) Algılama stilini yerine getirmek için yeni çıkış sinyallerini oluşturabilmek.

DNA nanoteknolojisi bu yönlerde yeni fırsatlar sağlayabilir. Çift sarmal yapı, Watson-Crick baz eşleşme etkileşimleri ve programlanabilir diziler dahil olmak üzere nükleik asitlerin benzersiz özelliklerinden yararlanılarak, nano ölçekte hassasiyetle iyi tanımlanmış boyut, şekil ve geometriye sahip binlerce DNA nanoyapısı oluşturulmuştur (Chao ve ark., 2016).

DNA Nanoteknolojisinin İlkeleri ve Tarihsel Gelişimi

DNA, iyi bilinen çift sarmal yapıya sahip birincil genetik materyaldir. 1980'lerin başında, DNA'nın, tasarlanmış dizilere sahip tek kaptaki oligonükleotid karışımında kendiliğinden birleşerek iyi tanımlanmış nanoyapılar oluşturmak için bir yapı malzemesi olarak kullanılabileceği ilk kez önerildi (Jones ve ark., 2015; Ye ve ark., 2018).

DNA nanoyapıları, nükleik asitleri aşağıdan yukarıya kendi kendine birleşme için yapı taşları olarak kullanarak, canlı hücrelerde genetik bilgi taşıyıcıları olarak gören geleneksel anlayışı değiştirmiştir. Eşsiz baz eşleşmesi, çap hassasiyeti ve programlanabilir dizilere sahip çift sarmal, iyi tanımlanmış boyut, şekil ve geometriye sahip çeşitli DNA statik nanoyapıları ve hassas şekilde kontrol edilen hareket ve işlevlere sahip dinamik cihazlar dahil olmak üzere benzersiz DNA özelliklerine dayanarak, DNA nanoteknolojisinin tarihçesi ve güncel durumu şu şekilde verilmektedir:

1983'teki hareketsiz dört kollu bağlantının öncü çalışmasından bu yana, genetik rekombinasyonu temsil eden hareketli bir bağlantı noktası olan prototip Holliday Bağlantısı (**Şekil 1a**) DNA nanoteknoloji çalışmalarında çığır açan bir gelişme olmuştur (Kallenbach ve ark., 1983). Daha sonra bu bağlantı üç kollu, beş kollu, altı kollu, sekiz kollu ve hatta on iki kollu bağlantılarla genişletilmiştir (Ma ve ark., 1986; Wang & Seeman, 2007; Wang ve ark., 1991). Bu kol bağlantı noktalarına dayanarak

DNA karoları program tarafından tasarlanmış ve tavlama (annealing) yoluyla üretilmiştir. Bu DNA nanoyapılarının topolojisini mikroskop altında gözlemlemenin zorluğuyla ilgili olarak, DNA yapıları büyük tek boyutlu (1D) nanotüplerin ve şeritlerin, iki boyutlu (2D) arraylerin ve hatta üç boyutlu (3D) kristal yapı (**Şekil 1b**) üretiminde kullanılmıştır (Ding ve ark., 2004; Kuzuya ve ark., 2007; Wang ve ark., 2010; Winfree ve ark., 1998; Zheng ve ark., 2009; Zheng ve ark., 2006).

DNA origami teknolojisi, iyi tanımlanmış şekillere sahip 2D ve hatta 3D DNA nanoyapıları oluşturmak için yüzlerce zımba teli içeren, tek sarmallı ve 7249 nükleotid uzunluğunda virüs DNA'sından (M13mp18) yararlanarak geleneksel DNA döşeme tasarım konseptini değiştirmiştir. Zarif örnekler kare, üçgen, yunus, Çin haritası ve kutu şeklindeki DNA origamisi şeklinde (**Şekil 1c**) görülebilir (Andersen ve ark., 2008; Andersen ve ark., 2009; Qian ve ark., 2006; Rothmund, 2006). Daha sonra, 'altı sarmallı bal peteği kafesi', 'eşmerkezli halka' ve 'dört kollu' bağlantı köşesi stratejileri kullanılarak monolit ve raylı köprüler, küresel kabuklar ve nano şişeler ile ızgara benzeri toplar ve tüpler gibi daha karmaşık 3 boyutlu yapılar (**Şekil 1d**) oluşturulmuştur (Dietz ve ark., 2009; Douglas ve ark., 2009; Han ve ark., 2011; Han ve ark., 2013; Liedl ve ark., 2010). Son zamanlarda, karmaşık 2D ve 3D nanoyapılar üreten bir 2D/3D DNA kanvası üretmek için, birleştirilmiş yapışkan uçları olan tek iplikli fayanslar ve tuğlalar kullanılmaya başlanmıştır (**Şekil 1e**); bu strateji, karo ve origami montajının avantajlarını birleştirmeyi sağlamıştır. Ayrıca daha büyük veya daha küçük boyutlardaki DNA nanoyapılarının ilaç taşıyıcılığı ve plazmonikteki uygulamaları araştırılmıştır.

Dinamik DNA cihazları, insanın dünyayı nano ölçekte kontrol etme yeteneğini sunduğu için araştırma alanında hayati rol oynar. Dinamik DNA cihazlarını, öncelikle algılama için hedef analitler olan ve aşağıda gösterildiği gibi üç türe ayrılabilen "tetikleyiciler" ile gruptandırmak gerekir;

1) DNA veya RNA iplikçikleri:

DNA veya RNA iplikçiklerinde özel olarak tasarlanmış dizilere sahip çıkıntılar, cihazların dönüşümünü gerçekleştirmek için dal göçünü başlatabildikleri için "tetikleyiciler" olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Zarif örnekler DNA cımbızları, PX-JX2 tabanlı cihazlar ve DNA yürüteçleridir (Şekil 1f).

2) Enzimler veya deoksiribozimler (DNAzimler):

Enzimler tarafından tetiklenen ilk yürüme cihazı, iki DNA zincirini bir araya getirmek için DNA ligazını ve bağlantılarını kesmek için DNA kısıtlama enzimlerini kullanan bir DNA yürüteciydi (Şekil 1g). Benzer kavramlar daha sonra DNA çentikleme enzimi tarafından da gösterilmiştir. Fofodiester bölünmesi veya ligasyonu gibi belirli biyokimyasal reaksiyonları katalize eden DNAzimler veya ribozimler, aynı zamanda DNA motorlarını çift sarmallı yollar üzerinde yürümeye yönlendirebilir (Şekil 1h). Bu konsept aynı zamanda “moleküler örümceklerin” origami platformu üzerine kurulmuş 100 nm aralığındaki raylarda yürümesini tetiklemek için de kullanılmıştır.

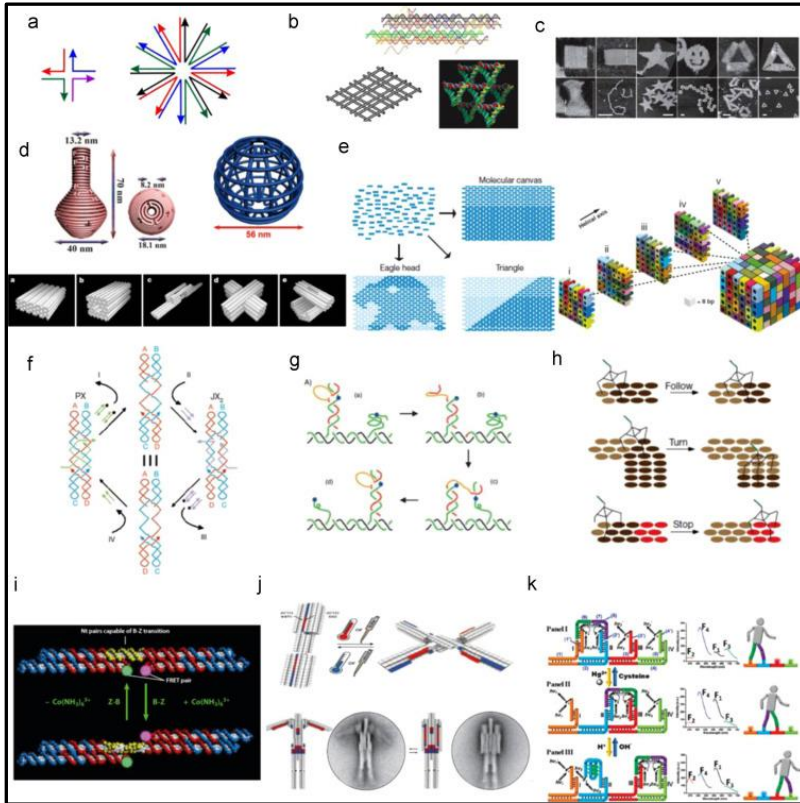
3) İyonlar:

Hekzaminkobalt (III) ($\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$) gibi belirli katyonlar, DNA'nın çift sarmalının B'den (sağ eli) Z yapısına (sol eli) geçişini sağlayabilir (Şekil 1i). Bu konsept ilk döner nanomekanik "B-Z cihazı"nın yapımında uygulanmıştır.

Ayrıca, magnezyum iyonları, DNA süpersarımı etkisi ve Holliday kavşağının nano ölçekli bir "metronom" olarak kompakt durumdan ters duruma geçişine yönelik bir konformasyon değişimi yoluyla nano ölçekli bir hareketin basit bir biçimini indükleyebilir. Daha yakın zamanlarda, magnezyum iyon konsantrasyonundaki değişiklik, bir aktüatör, değiştirilebilir bir dişli, katlanamayan bir nanokitap ve bir nanorobot dahil olmak üzere, şekil tamamlayıcılığı temelinde çözüm içinde özel olarak baz eşleşmesi olmadan kendi kendine bir araya getirilen (Şekil 1j) 3 boyutlu DNA nanocihazlarının dönüşümünü ince bir şekilde indükler (Gerling ve

ark., 2015). İyonların timin-Hg²⁺-timin kompleksi ve i-motif yapısı gibi belirli bazlara veya dizilere benzersiz bir afinitesi olduğundan, Hg²⁺/sistein ile H⁺/OH⁻ dört bağlı dayanaktan oluşan dairesel bir DNA şablonu üzerinde bir "iki ayaklı yürüteç" ve bir "iki ayaklı adım"ı tetiklemek için (Şekil 1k) kullanılmıştır.

Yukarıda bahsedilen dinamik DNA cihazlarının neredeyse tamamı, algılama için kolayca hazırlanmış olan florofor/söndürücü birimleri ile bileşenlerin uygun şekilde etiketlenmesi yoluyla optik olarak izlenmektedir (Chao ve ark., 2016).



Şekil 1 DNA nanoteknolojisinin gelişimi ve DNA cihazları (Chao ve ark., 2016).

DNA Nanoteknolojisi Tabanlı Biyosensörler

Biyosensörler, karmaşık biyoanalitik ölçümleri doğrudan ve anlaşılır sinyallerle çıkarmak için biyolojik bir algılama elemanını kemofizik dönüştürücülerle birleştiren analitik cihazlardır (Turner, 2013). Biyolojik algılama elemanı, örneğin küçük moleküller, proteinler, enzimler, antikolar, nükleik asitler, hücre reseptörleri, dokular, organeller vb., tespit edilen analitle etkileşime giren, ona bağlanan veya onu tanıyan biyolojik olarak türetilmiş bir madde veya biyomimetik bileşendir (Turner ve ark., 1987). Dönüştürücüler, hedefin miktarlarını analiz etmek için biyolojik tanıma aktivitelerini optik, elektriksel veya kütleye duyarlı sinyale dönüştürebilen çıkış bileşenlerini kullanır (Chao ve ark., 2016). Hedef tespitinin artırılmış hassasiyeti ve özgüllüğü, biyosensör geliştirmenin hedefi ve zorluğudur. DNA nanoteknolojisi, biyoalgılama arayüzlerinin topolojik yapısını düzenlemek için yüksek düzeyde programlanabilir ve biyoyumlu bir platform sağlar; bu, yüksek düzeyde biyomoleküler organizasyonla daha iyi tespit performansı sağlar (Huang ve ark., 2018; Ye ve ark., 2018). DNA nanoteknolojisine dayalı biyosensörlerin prensipleri, DNA nanoyapılarının hedef analitlere bağlanmasına dayanmaktadır; bu, değişikliklerin sinyal okumaları olarak kullanıldığı DNA nano mimarisinde yapısal bir değişikliğe neden olur. Tespit edilebilir uyaranlar arasında moleküller, nükleik asitler, peptidler, proteinler, kanser hücreleri ve virüsler bulunur (Zhang ve ark., 2019).

Küçük Molekülleri Algılama

Küçük moleküller birçok biyolojik aktivitede önemli rol oynar (Cho & Juliano, 1996). Bunlar kanserojenler ve toksinler gibi düşman molekülleri veya besinler veya ilaçlar gibi faydalı molekülleri içerir ve bunları tespit edip ölçecek cihazlar yüksek talep görmektedir. Şu anda, kütle spektrometrisi küçük moleküllerin tespiti için yaygın olarak kullanılan standarttır (Sudsakorn ve ark., 2011). Ancak gerekli operasyonların yanı sıra pahalı ve özel aletler de gerektirir. Küçük moleküllerin boyutu göz önüne alındığında, birden fazla tanıma elemanının (antikor) hedefe bağlanmasını

gerektiren tipik sandviç analizleri mümkün değildir (Han ve ark., 2010). Örneğin, fosfat omurgalarının negatif yükü nedeniyle, bazı pozitif yüklü moleküller, G-dörtlü kompleksler (Simonsson, 2001), iyon köprülü kompleksler (Tanaka ve ark., 2015) vb. gibi spesifik etkileşimler için artan şansa sahip olabilir. Ek olarak, işlevleri geleneksel nükleik asitlerin özelliklerini aşan bazı nükleik asitler, ribozimler, riboswitchler, aptamerler ve deoksiribozimler (DNAzimler) gibi hedef moleküllerle etkileşime girecek bir ligand görevi görebilir (Li & Lu, 2009).

DNA nanoyapılarının, iyonlar (örn. H^+ , K^+ ve Hg^{2+}), organik moleküller de dahil olmak üzere yüksek afiniteyle hedef küçük moleküllere spesifik olarak bağlanabilen tek sarmallı oligonükleotidler olan aptamerlerle birleştirilmesiyle yapılan küçük moleküllerin tespiti için birçok biyosensör (örneğin, adenosin trifosfat (ATP), amino asitler, kokain, toksinler, antibiyotikler ve vitaminler, organik boyalar, toksinler ve metabolitler) vardır (Röthlisberger & Hollenstein, 2018; Shanguan ve ark., 2006).

İyonların, özellikle de ağır metal iyonlarının tespiti çevresel izleme, biyoterörizmle mücadele ve gıda analizi için gereklidir (Falcó ve ark., 2006). Qu ve arkadaşları (Qu ve ark., 2017), birden fazla ağır metal iyonunu (yani Hg^{2+} , Ag^+ ve Pb^{2+}) 5 dakika içinde tespit edebilen DNA nanoyapılı bir mikro dizi geliştirdi; tespit limiti Hg^{2+} , Ag^+ ve Pb^{2+} için sırasıyla 10, 10 ve 20 nm'ye düştüğünü göstermiştir. Arttırılmış hassasiyet, algılama platformu yüzeyinde DNA nanoyapılarının oldukça düzenli dikey yönelimine katkıda bulunur. Daha sonra kabarcık aracılı mekik reaksiyonuyla hızlı bir analiz oluşturularak tespit süresini azaltarak hedef yakalama verimliliğini artırmıştır. pH (H^+) algılaması canlı hücreler veya organizmalar için önemlidir. I-motifleri, nötr veya yüksek pH'ta normal dubleks olarak kalan, düşük pH'ta C—C+ bağlanması nedeniyle triplekse dönüşen pH'daki değişikliklere yanıt olarak yapı dönüşümünü tetiklemek için entegre edilebilir (Shen ve ark., 2021). Krishnan'ın Laboratuvarı, in vitro ve in vivo floresanlarla pH değişikliklerini görüntülemek için bir dizi anahtarsız DNA geliştirmiştir (Modi ve ark., 2014; Modi ve ark., 2009; Surana ve

ark., 2011). Ricci'nin Laboratuvarı da pH'ın neden olduğu çeşitli DNA nanoanahtar problemlerini de göstermiştir (Porchetta ve ark., 2015).

Kokainin tespiti, reçeteli ilaçlara itaati izlemek veya aşırı dozda ilaç veya zehirlenmeyi tespit etmek ve tahmin etmek için çok önemlidir. Kolorimetri, floresans, elektrokimya, kemilüminesans, yüzeyle güçlendirilmiş Raman saçılımı (SERS), yüzey plazmon rezonansı (SPR) ve kuvars kristali mikro denge ölçümleri dahil olmak üzere çeşitli tespit yöntemleri kullanılarak testler sürekli olarak geliştirilmektedir (Mokhtarzadeh ve ark., 2015; Warner, 1993).

Wen ve ark. (Wen ve ark., 2011) kokaini son derece hassas ve spesifik olarak tespit etmek için DNA tetrahedrona dayalı bir elektrokimyasal aptamer sensörü (**Şekil 2A**) oluşturmuştur. Kokain önleyici aptamer iki alt birime ayrılır. Bir alt birim, elektrot yüzeyleri üzerindeki sert DNA tetrahedronunu değiştirerek yakalama ipliği görevi görür. Diğer alt birim, muhabir olarak çalışacak şekilde biyotinlerle değiştirilir. Kokain varlığında aptamerin iki yarısı bir sandviç yapı oluşturmak üzere birleşirken biyotin-avidin-HRP etkileşimleriyle çıkış sinyalleri üretir. DNA tetrahedronları sinyal-arka plan oranını doğrudan dört kat artırmıştır.

Birçok küçük molekül, ATP ölçümü gibi metabolizmanın yanı sıra hücresel ve hücre dışı yollarda da önemli bir rol oynar. Bu metabolitler biyolojiyi, metabolizmayı ve hastalıkları anlamak için faydalıdır (Sigel, 1992). Çeşitli ATP biyosensörleri üretilmiştir (Li & Liu, 2020). Walter ve ark. aynı anda floresan sinyalleri ve topolojik görüntüler elde ederek ATP'yi algılamak için bir DNA origami platformu (**Şekil 2B**) göstermiştir (Walter ve ark., 2017). Bölünmüş bir ATP aptameri, enerji transfer çifti olarak çalışan farklı floroforları taşır. DNA origami aptameri iki ATP molekülünü bağladığında, origami AFM tarafından görüntülendiğinde yapısal dönüşüm gösterir ve floresans rengi yeşilden (açık) kırmızıya (kapalı) değişir. Bu nedenle hedef bağlama aktivitesi, topolojik görüntülerin yanı sıra floresans okumaları ile de sağlanabilir. Küçük

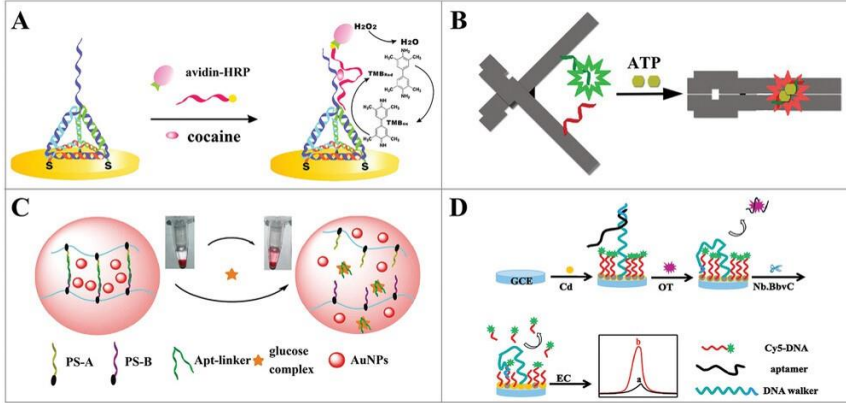
molekül bağlanma bölgelerinin DNA origamiye entegre edilmesi, aptamerlerin özgüllüğünü tek molekül seviyesinde ileri analizle birleştiren moleküler etkileşimleri incelemek için özel DNA cihazları oluşturur (Douglas ve ark., 2012).

Biyolojik numunelerdeki biyokimyasal analitlerin belirlenmesinin, biyomedikal teşhis alanında fizyolojik durumu ve hastalık süreçlerini izleyebileceği iyi bilinmektedir (Fraser & Harris, 1989). Örneğin biyolojik sıvılardaki glikoz seviyeleri fiziksel koşullarla ilişkilidir, çünkü anormal ölçülen seviyeler hipoglisemi veya diyabet gibi bazı hastalıkların göstergesi olabilir (Klonoff, 1997). DNA nanoteknolojisinde DNA hidrojel, 3 boyutlu bir DNA nanoyapısıdır ve birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ma ve ark. glikozu tespit etmek için DNA hidrojel bazlı hızlı ve taşınabilir bir biyosensör (**Şekil 2C**) önerilmiştir (Ma ve ark., 2018). Hidrojel, hedef aptamerden oluşur ve altın nanoparçacıklarını (AuNP'ler) kapsülleyen doğrusal bir poliakrilamid zincirine konjuge edilir. Glikoz komplekslerinin eklenmesiyle hidrojel çökerek çözeltide kırmızı renk gösteren AuNP'lerin salınmasına neden olur. Önerilen glikoz ölçümleri, UV-vis spektrofotometrisi ile tamponda tespit sınırının (LOD) 0,44 mm olduğu çıplak gözle de görselleştirilebilir (Shen ve ark., 2021).

Küçük molekülü toksinlerin tespiti, düzenli analizler, gıda güvenliğinde kirleticilerin izlenmesi veya su ve hava kirliliğinin tespiti için gereklidir (Wang & Wang, 2008). Mikotoksinlerin en önemlilerinden biri, büyük miktarda toksin üreten ve tarım ürünlerinde en yaygın kirletici olan Okratoksin A'dır (OTA) (Amézqueta ve ark., 2012). Wei ve arkadaşları, OTA'yı tespit etmek için DNA yürüyüş makinelerine dayalı bir elektrokemilüminesans (ECL) biyosensörü (**Şekil 2D**) geliştirmiştir (Wei ve ark., 2019).

DNA yürüme makinesi, bir DNA yürüteç zinciri ve yürütecin yönsel otonom hareketi yoluyla sinyalleri güçlendirir. En büyük avantaj, hedefler ve yürüyenler arasındaki etkileşimi tam olarak kontrol edebilen yeterli kontrol edilebilirlik ve mükemmel öngörülebilirliktir (Beissenhirtz & Willner, 2006). Biyosensörün

tamamı CdS QD'ler, aptamerler ve DNA yürüteçlerden oluşur. Sunulan OTA aptamerlere bağlanarak bunların ayrılmasına neden olur, Cy5-DNA ile serbest yürüteç hibridizasyonuna yol açar ve Cy5-DNA'yı Nb.BbvCI tarafından keserek Cy5-DNA'nın elektrot yüzeyinden ayrılmasına izin verir.



Şekil 2. DNA nanoteknolojisine dayalı molekül biyosensörleri (Shen ve ark., 2021).

Nükleik Asitlerin Biyoalgılanması

Biyolojide, nükleik asitlerin mutasyonu normal fiziksel aktivitenin bozulmasına neden olabilir ve hastalıklara, kansere veya viral enfeksiyonlara yol açabilir (Moreira ve ark., 2008). DNA veya RNA'nın tespiti ve tanımlanması için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) altın standart olmuştur (Bej ve ark., 1991). MikroRNA (miRNA), bitkilerde, hayvanlarda ve insanlarda RNA susturma ve gen ifadesinin transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde rol oynayan küçük RNA'lardır (18-24 nükleotid). miRNA'nın ekspresyon profilleri tanısal ve prognostik biyobelirteçler olarak kabul edilir ve kanser tedavisi için terapötik stratejiler olarak hizmet eder (Lu ve ark., 2005). Şu anda, miRNA'nın tespiti temel olarak gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonuna (gerçek zamanlı-qPCR), mikrodizi analizine ve Northern blotlamaya dayanmaktadır (Tian ve ark., 2015). Bununla birlikte, miRNA'nın kısa uzunluklara, yüksek dizi benzerliklerine ve düşük bolluğa sahip olması zorluklardır.

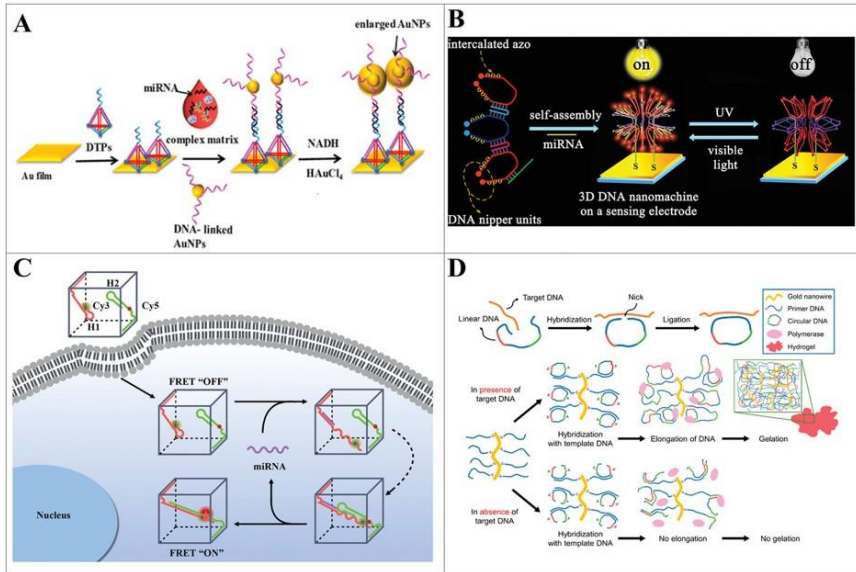
Hücrelerden de çıkarılmaları zordur (Chen ve ark., 2018; Koshiol ve ark., 2010). Bu sebeple miRNA analizi için basit ve hassas bir tespit platformu büyük ilgi görmüştür.

Nie ve arkadaşları, AuNP'lerin katalitik genişlemesiyle birlikte DNA tetrahedron problemlerini (DTP'ler) altın filme entegre ederek miRNA tespiti için düşük kirlilik yaratan ve hassas bir SPR sensörü (**Şekil 3A**) oluşturmuştur (Nie ve ark., 2018) . Hedef miRNA let-7a çözelti içinde görüldüğünde, hedef let-7a'nın, DNA'ya bağlı AuNP'lerin ve DTP'ler-Au filminin DNA hibridizasyonu yoluyla bir sandviç yapı oluşur. Sonuç olarak, AuNP'lerin boyutları genişledikçe SPR sinyali elektronik bağlantı yoluyla artar. Bu biyosensörün hassas tespit limiti 0,8 fm'dir ve let-7a'yı homolog ailesinden ayırarak üstün özgüllük göstermiştir. DNA tetrahedronun altın yüzeylerle entegrasyonu, karmaşık bir matristeki spesifik olmayan adsorpsiyonu önemli ölçüde zayıflattı ve bu da onun %100 insan serumu ve kanser hücresi lizatlarında miRNA'yı tespit etmesini sağlamıştır. Ayrıca, programlanabilir ve otonom bir moleküler hesaplama makinesi tasarlamak, miRNA'nın tespitini moleküler seviyeye yükseltebilir. Örneğin Wang ve ark. miRNA tespiti için DNA origami tabanlı mantık kapıları (YES ve AND kapısı) kurmuştur (Wang ve ark., 2014).

Araştırmacılar, yüksek hassasiyeti geliştirmenin yanı sıra, miRNA için kolay, hızlı tespit yöntemini de araştırıyorlar. Zhang ve arkadaşları, alansız 3D DNA nanoyapılarına (**Şekil 3B**) dayalı, ultra duyarlı ve hızlı, enzim içermeyen bir ECL miRNA biyosensörü kurmuştur (Zhang ve ark., 2018). miRNA birçok biyolojik aktivitede önemli rol oynadığından canlı hücrelerde yüksek doğrulukta hassas bir miRNA biyosensörünün geliştirilmesi önemlidir. Liu ve arkadaşları, mRNA tespiti için FRET tabanlı bir firkete-DNA basamaklı amplifikatör (HDCA) (**Şekil 3C**) geliştirmiştir (Liu ve ark., 2019).

Küçük miktardaki DNA hedeflerinin tespiti ve miktarının belirlenmesi hala esas olarak PCR'ye dayanmaktadır. Moleküler işaretler, mikroakışkan DNA mikrodizisi, nanomateryal bazlı

yöntem vb. gibi birçok PCR içermeyen DNA tespit yöntemi geliştirilmiştir. Arun ve arkadaşları, standart jel elektroforezi kullanarak DNA parçalarını tespit etmek için basit bir DNA nanoanahtarı oluşturmuştur (Chandrasekaran ve ark., 2016). Hedef DNA nanoanahtarla hibritlendiğinde iskele, elektroforetik hareketlilik değişimi analizleriyle ayırt edilebilecek bir döngü oluşturur. Hibrit dDNA nanoyapılarına dayanan Jeong ve arkadaşları, altın nanoteller (AuNW'ler) ve primer DNA'lar (**Şekil 3D**) arasındaki hedefle tetiklenen jelasyona dayalı olarak tek sarmallı patojen DNA'sını tespit etmek için etiketsiz bir biyosensör önermiştir (Jeong ve ark., 2015).



Şekil 3. DNA nanoteknolojisine dayalı nükleik asit biyosensörleri (Shen ve ark., 2021)

Protein Biyoalgılama

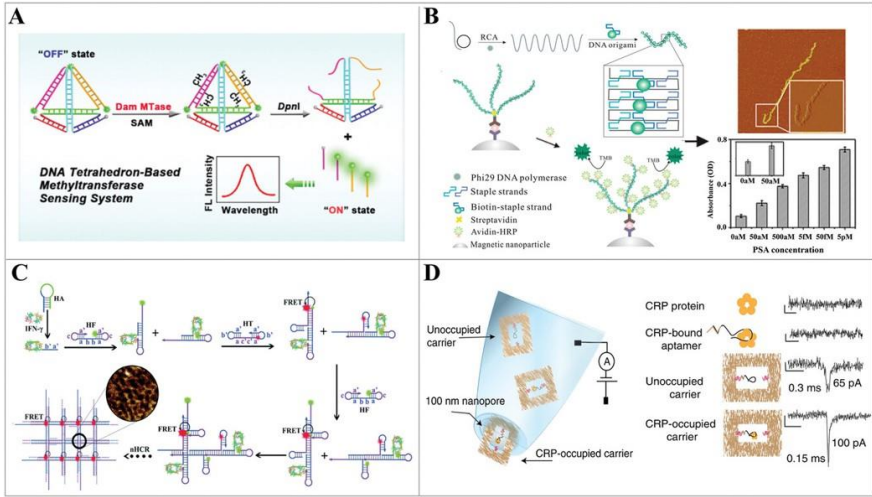
Proteinler organizmaların hayati bileşenleridir ve hücrelerin içindeki hemen hemen her sürece katılırlar. Enzimler olarak işlev görebilir, hücreyi hücre iskeleti olarak destekleyebilir, hücre sinyalini kolaylaştırabilir, bağışıklık tepkilerini tetikleyebilir, hücre

yapışmasını sağlayabilir ve hücre döngüsünü yönlendirebilirler. Belirli olarak eksprese edilen proteinler, organizmalar veya hücrelerdeki aktiviteler için biyobelirteçler olarak işlev görür; biyobelirteçlerin anormal ekspresyonu sıklıkla hastalıkların varlığıyla ilgilidir. Proteinler birçok hücreysel aktivite için çalışma birimi ve aynı zamanda göstergeler için önemli biyobelirteçler olarak hizmet ettiğinden, proteinlerin kesin ve doğru bir şekilde belirlenmesi sadece temel araştırmalar için değil aynı zamanda klinik teşhis için de gereklidir. Şimdiye kadar proteinler çoğunlukla enzim bağlantılı immünosorbent analizi (ELISA), immünobead analizi, western blotlama, mikrodiziler ve SPR, SERS, kolorimetrik, elektrokimyasal ve floresans biyosensörleri gibi analitik formatlardaki antikorlar tarafından tespit ediliyordu (Shen ve ark., 2021). Dinamik DNA nanoteknolojisi kullanılarak, glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6pDH)/NAD⁺ enzim/kofaktör çiftinin enzim aktivitesini tetiklemek ve karakterize etmek için DNA cımbız benzeri bir nano cihaz oluşturulmuştur (Liu ve ark., 2013). Sert ve uyarlanabilir DNA tetrahedron, biyoalgılama platformu olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Zhou ve arkadaşları, metiltransferazı floresansla tespit etmek için bir DNA tetrahedral probu (**Şekil 4A**) kurmuştur (Zhou ve ark., 2017). DNA tetrahedron, floresan boyalar ve söndürücülerle etiketlenmiş şeritlerden oluşur. Substrat hedef metiltransferaza maruz bırakıldığında, metillenmiş alanlar DNA tetrahedronunu çökertecek şekilde kesilebilir, bu da floresansın geri kazanılmasına neden olur. DNA tetrahedronun yardımıyla bu biyosensör, Dam metiltransferazı 0,045 U mL⁻¹ tespit limitiyle tespit edebilir ve gerçek bir numunede de iyi bir performansla sahiptir. Dahası, DNA nanoteknolojisi aracılığıyla enzimleri tek molekül seviyesinde inceleyebilir ve analiz edebiliriz, Tintoré ve arkadaşları, insan O6-alkilguanin-DNA alkiltransferazın enzimatik DNA onarım aktivitesini karakterize etmek için DNA origami yoluyla bir protein tanıma biyosensörü oluşturmuştur (Tintoré ve ark., 2013).

Protein biyobelirteçlerinin tespiti çeşitli hastalıkların teşhisi için çok önemlidir. Biyobelirteç tespiti için birçok biyosensör, DNA

nanoteknolojilerine dayalı olarak geliştirilmiştir (Shen ve ark., 2021). Örneğin, prostat spesifik antijen (PSA), prostat kanserinin teşhisi ve izlenmesinde en dikkate değer serum biyobelirtecidir. Yan ve arkadaşları, yuvarlanan daire amplifikasyonu (RCA) bazlı DNA kemerlerine ve manyetik boncuk bazlı ELISA'ya (**Şekil 4B**) dayalı olarak PSA'yı tespit etmek için hassas ve seçici bir biyosensör geliştirmiştir (Yan ve ark., 2014).

Biyobelirteçlerin tespitinin hassasiyetini arttırmak için RCA, saç tokası düzeneğini katalize etme, hibridizasyon zincir reaksiyonu (HCR) ve ayak parmağıyla tetiklenen iplikçik yer değiştirme reaksiyonu gibi birçok sinyal amplifikasyon stratejisi geliştirilmiştir (Abolhasan ve ark., 2019). Qin ve arkadaşları, sitokin interferon-gamayı (IFN- γ) yüksek hassasiyetle tespit etmek için hedefe duyarlı net benzeri HCR (nHCR) tarafından bir araya getirilen bir DNA nanoyapısı (**Şekil 4C**) önermiştir (Qin ve ark., 2019). Hedef IFN-y mevcut olduğunda, aptamer tanıma saç tokası problemleri konformasyonel değişikliklere sahip olabilir ve nHCR başlatıcı şeritlerini serbest bırakarak nHCR sürecini ağ benzeri DNA nanoyapıları oluşturmak üzere tetikleyebilir. DNA nanoyapılarının yapısı, enzim içermeyen yaklaşımlar aracılığıyla 1,2 pm tespit limitiyle IFN-y'yi tespit etmek için olağanüstü derecede güçlendirilmiş FRET sinyalleri tespit etmiştir (Shen ve ark., 2021). Ayrıca Raveendran ve arkadaşları, Kantitatif tek moleküllü biyoalgılama için nanopore okumasıyla birleştirilmiş DNA origamisini kullanan bir biyosensör platformu (**Şekil 4D**) geliştirmiştir (Raveendran ve ark., 2020).

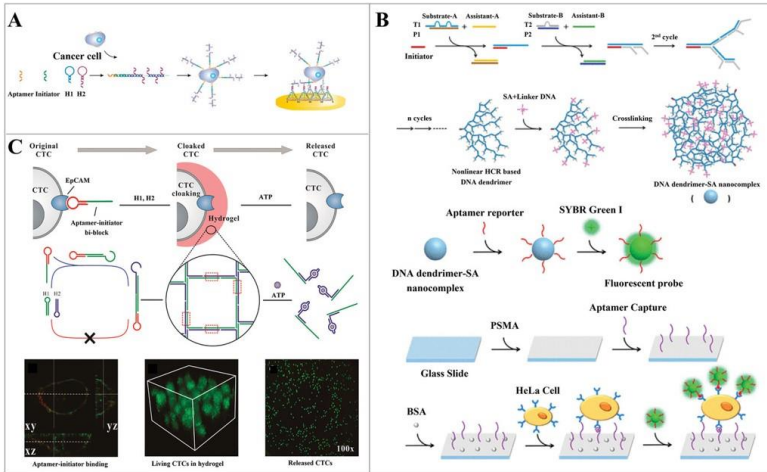


Şekil 4. DNA nanoteknolojisine dayalı protein biyosensörleri (Shen ve ark., 2021).

Tümör Hücresi Tespiti

Dolaşımdaki tümör hücreleri (CTC'ler), primer veya metastatik tümörden çıkıp kan dolaşımına giren kanser hücreleridir ve tümörün ilerlemesi, prognozu, metastazı ve nüksetmesinin önemli biyobelirteçleridir (Plaks ve ark., 2013). Ancak düşük konsantrasyonlarından dolayı CTC'lerin tespiti oldukça zordur (Shen ve ark., 2017). CTC'lerin tespiti için kolay ve hassas biyosensörlere olan talep acildir. Düşük konsantrasyonlu tümör hücrelerini tespit etmek için HCR gibi enzimsiz DNA amplifikasyon reaksiyonları uygulanmıştır. Zhou ve arkadaşları, DNA tetrahedral yüzeylerinde yakalanan çok dallı bir HCR (mHCR) ürününü kullanarak yüksek hassasiyet ve özgüllüğe sahip meme kanseri hücrelerinin (MCF-7) tespiti için bir biyosensör (Şekil 5A) geliştirmişlerdir (Zhou ve ark., 2014). Zhao ve arkadaşları, DNA dendrimer-streptavidin (SA) nanokompleks sinyal yükselticisini (Şekil 5B) kullanarak insan rahim ağzı kanseri hücreleri (HeLa) için bir biyoalgılama platformu oluşturmuştur (Zhao ve ark., 2017). Hedef hücre algılaması için, kuvars cam slayt, HeLa hücrelerini yakalamak için aynı hedefleme aptamerleriyle değiştirilir; yakalanan

hücrelere daha fazla bağlanmak için aptamer işlevselleştirilmiş nanokompleks eklenir; bu, 4.4×10^3 hücre mL^{-1} lik bir algılama limitiyle çıkış sinyali olarak artan bir floresans üretir. Dendrimer DNA nanoyapıları göz önüne alındığında, bu biyosensörün ayırma veya amplifikasyon için ekstra adımlara ihtiyacı yoktur (Shen ve ark., 2021). Daha gelişmiş DNA cihazları, kanser hücresi tespiti için biyosensörlerle birleştirilir. Cai ve arkadaşları, serbest çalışan bir DNA yürüteç aracılığıyla MCF-7 tespiti için sinyal artırıcı bir elektrokimyasal biyosensör geliştirmiştir (Cai ve ark., 2016). Hedef MCF-7 hücreleri ortaya çıktığında, DNA yürüteç (DNAzyme) serbest bırakılır ve substratları tekrar tekrar bağlar ve ayırır; bu, altın elektrot üzerine sabitlenen tüm dizilerin kısa şeritlere bölünmesine yol açar ve önemli ölçüde sinyal baskılanmasına neden olur. Bu DNA yürüteçinin tanıtılmasıyla 47 hücre/ mL^{-1} lik tahmini tespit limitine ulaşılabilir. CTC'lerin izolasyonu ve tespitine ek olarak, canlı CTC'lerin salınması ve sonraki analizi, moleküler profil ve fonksiyonel özellikler hakkında ek yararlı bilgiler sunabilir. Song ve arkadaşları, CTC'lerin DNA hidrojelleri tarafından algılanması ve kaplanması/serbest bırakılması için aptamer kaynaklı kenetlenmiş bir HCR yöntemi (Şekil 5C) önermiştir (Song ve ark., 2017).



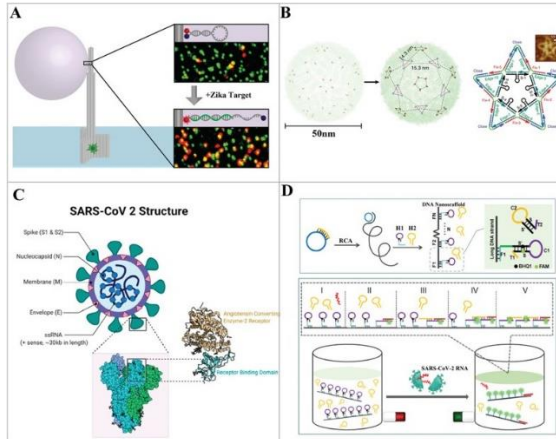
Şekil 5. DNA nanoteknolojisine dayalı kanser hücreleri biyosensörleri (Shen ve ark., 2021).

Bulaşıcı Virüs Tespiti

Viral enfeksiyonlar vücutta virüs bulunmasından kaynaklanır. Konakçı hücre zarındaki reseptörlere bağlanırlar, sızarlar ve viral nükleik asitleri hücrelere salarlar, bu da viral protein bileşenlerinin sentezlenmesine ve yeni viryonların bir araya getirilmesine yol açar. Virüsler nükleik asitlerden (DNA veya RNA) ve protein kaplamalardan oluşur. Son zamanlardaki salgınların çoğuna, şiddetli akut solunum sendromu ile ilişkili koronavirüs (SARS-CoV), Orta Doğu solunum sendromu ile ilişkili koronavirüs, Ebola virüsü ve Zika virüsü dahil olmak üzere zarflı virüsler neden olmuştur. Erken teşhis için hızlı, doğru ve hassas tespit yaklaşımlarına acil ihtiyaç vardır. Şu anda, sağlam virüslerin doğrudan tespiti, plak ve hemaglutinasyon analizlerinin virüs miktarının belirlenmesine izin verdiği elektron mikroskobu veya virüsle enfekte hücre kültürleri yoluyla yapılmaktadır (Killian, 2008; Shen ve ark., 2021; Yakimovich ve ark., 2015). Birincil serolojik test yöntemleri arasında ELISA, immünfloresan analizleri, western blotlama, hemaglutinasyon inhibisyonu, partikül aglutinasyonu, kompleman fiksasyonu ve plak azaltıcı nötralizasyon yer alır.[129, 130] Viral proteinlerin (antijenlerin) saptanması hâlâ serolojik tekniklere dayanmaktadır. Viral nükleik asit tespiti ise qPCR ve ters transkripsiyon-PCR ile gerçekleştirilir (Hoffmann ve ark., 2009). DNA nanoteknolojisi virüsle ilgili nükleik asitleri ve proteinleri tespit etmek için kullanılabilir. Ochmann ve arkadaşları, DNA origami tabanlı optik antenler kullanarak Zika'ya özgü yapay DNA ve RNA'nın (Şekil 7A) tespit yöntemini bildirmiştir (Ochmann ve ark., 2017).

Viral nükleik asitlerin tespitinin yanı sıra zarf proteinleri de DNA nanoteknolojileri ile tespit edilebilmektedir. Kwon ve arkadaşları, Dang humması (DENV) viral yüzeyindeki zarf protein alanı III (ED3) kümelerinin uzaysal düzenlemesine uyan, bir floresan sensör ve güçlü bir viral inhibitör görevi görebilen bir DNA yıldız mimarisi (Şekil 7B) oluşturmuştur (Kwon ve ark., 2020).

Coronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19) salgını, şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) virüsünün getirdiği bulaşıcı bir hastalıktır (Weissleder ve ark., 2020). Bu nedenle, COVID-19'un hızlı ve kesin tespiti, virüsün yayılmasının azaltılması ve test edilmemiş vaka sayısının azaltılması açısından önemlidir. Coronavirüslerin ana yapısal bileşenleri nükleokapsid (N), spike (S), zarf (E) ve membran (M) proteinleridir (**Şekil 7C**) (Bhalla ve ark., 2020). Zhang ve arkadaşları, koloidal altın immünokromatografik şeritlerle sandviçlenmiş bir aptamer tahlili oluşturan, COVID-19 nükleokapsid proteinini (Np) hedef alan ilk DNA aptamerini geliştirmiştir (Zhang ve ark., 2020). Seçimden elde edilen en iyi DNA dizisi, 0,49 nm ayrışma sabiti ile Np'ye yüksek bağlanma afinitesi göstermektedir. Ekip, Aptamerler ve koloidal altın immünokromatografik şeritler kullanarak bir sandviç analizi oluşturmuştur. Np'nin varlığında, insan serumu veya idrarındaki aptamerlerin 1 ng mL^{-1} hedef proteine bağlanmasına bağlı olarak test çizgisi maviye dönmektedir. Bildirilen aptamerlere göre Jiao ve arkadaşları da (**Şekil 7D**) DNA nano yapı iskelesi HCR'ye (DNHCR) dayalı SARS-CoV-2 RNA'nın hızlı tespiti için bir nükleik asit analizi geliştirmiştir (Jiao ve ark., 2020).



Şekil 6. DNA nanoteknoloji tabanlı virüs biyosensörü (Shen ve ark., 2021).

SONUÇ

DNA nanoteknolojisinin gelişmesiyle birlikte, çok sayıda çalışma DNA'nın nanoyapıların yapı taşı olarak işlevselliğini ortaya koymuştur. Uyarılara duyarlı dinamik nanoyapılar, belirli koşullar altında diğer biyomoleküllerle birleşerek biyosensörler veya hedef dağıtım araçları olarak işlev görür. Esnek programlanabilirlik avantajından yararlanılarak DNA nanoyapıları çeşitli biyomedikal uygulamalara uygulanabilir. Bu derlemede özellikle DNA nanoteknolojisine dayalı biyosensörler ve terapötikler üzerinde yoğunlaştık. Küçük moleküller, nükleik asitler, proteinler, kanser hücreleri ve virüsler de dahil olmak üzere çeşitli analitler, DNA tetrahedron, DNA origami, DNA hidrojel, RCA bazlı DNA düzenekleri, HCR bazlı DNA düzenekleri veya DNA ile kombinasyon halinde tespit edilebilir. diğer nanomalzemeler. Doğal biyoyumluluk ve biyolojik olarak parçalanabilirlik nedeniyle, DNA nanoyapıları aynı zamanda kemoterapi, gen terapisi, immünoterapi ve fototerapide terapötikler için oldukça ilgi çekici dağıtım araçlarıdır. Her ne kadar DNA nanoyapılarına dayanan çeşitli biyosensörler ve terapötikler geliştirilmiş olsa da, DNA nanoteknolojisinin pratik hale gelmesinden önce hala aşılması gereken bazı önemli zorluklar bulunmaktadır (Shen ve ark., 2021).

DNA nanoteknoloji sensörlerinin daha da geliştirilmesiyle, hızlı hastalık tespiti ile çeşitli biyomedikal uygulamalarda ve ileri sağlık hizmetleri uygulamalarında hızlı, pratik ve güvenilir olarak kullanabileceği öngörülmektedir.

KAYNAKÇA

Abolhasan, R., Mehdizadeh, A., Rashidi, M. R., Aghebati-Maleki, L., & Yousefi, M. (2019). Application of hairpin DNA-based biosensors with various signal amplification strategies in clinical diagnosis. *Biosens Bioelectron*, 129, 164-174. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.01.008>

Amézqueta, S., Schorr-Galindo, S., Murillo-Arbizu, M., González-Peñas, E., López de Cerain, A., & Guiraud, J. P. (2012). OTA-producing fungi in foodstuffs: A review. *Food Control*, 26(2), 259-268. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.042>

Andersen, E. S., Dong, M., Nielsen, M. M., Jahn, K., Lind-Thomsen, A., Mamdouh, W., Gothelf, K. V., Besenbacher, F., & Kjems, J. (2008). DNA origami design of dolphin-shaped structures with flexible tails. *ACS nano*, 2(6), 1213-1218.

Andersen, E. S., Dong, M., Nielsen, M. M., Jahn, K., Subramani, R., Mamdouh, W., Golas, M. M., Sander, B., Stark, H., & Oliveira, C. L. (2009). Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid. *Nature*, 459(7243), 73-76.

Beissenhirtz, M. K., & Willner, I. (2006). DNA-based machines. *Org Biomol Chem*, 4(18), 3392-3401. <https://doi.org/10.1039/b607033g>

Bej, A. K., Mahbubani, M. H., & Atlas, R. M. (1991). Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 26(3-4), 301-334. <https://doi.org/10.3109/10409239109114071>

Bhalla, N., Pan, Y., Yang, Z., & Payam, A. F. (2020). Opportunities and Challenges for Biosensors and Nanoscale Analytical Tools for Pandemics: COVID-19. *ACS nano*, 14(7), 7783-7807. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c04421>

Cai, S., Chen, M., Liu, M., He, W., Liu, Z., Wu, D., Xia, Y., Yang, H., & Chen, J. (2016). A signal amplification electrochemical aptasensor for the detection of breast cancer cell via free-running DNA walker. *Biosens Bioelectron*, 85, 184-189. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.05.003>

Chandrasekaran, A. R., Zavala, J., & Halvorsen, K. (2016). Programmable DNA Nanoswitches for Detection of Nucleic Acid Sequences. *ACS Sensors*, 1(2), 120-123. <https://doi.org/10.1021/acssensors.5b00178>

Chao, J., Zhu, D., Zhang, Y., Wang, L., & Fan, C. (2016). DNA nanotechnology-enabled biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 76, 68-79. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.007>

Chen, Y. X., Huang, K. J., & Niu, K. X. (2018). Recent advances in signal amplification strategy based on oligonucleotide and nanomaterials for microRNA detection-a review. *Biosens Bioelectron*, 99, 612-624. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.036>

Cho, M. J., & Juliano, R. (1996). Macromolecular versus small-molecule therapeutics: drug discovery, development and clinical considerations. *Trends Biotechnol*, 14(5), 153-158. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)10024-x](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)10024-x)

Dietz, H., Douglas, S. M., & Shih, W. M. (2009). Folding DNA into twisted and curved nanoscale shapes. *Science*, 325(5941), 725-730.

Ding, B., Sha, R., & Seeman, N. C. (2004). Pseudo-hexagonal 2D DNA crystals from double crossover cohesion. *Journal of the American Chemical Society*, 126(33), 10230-10231.

Douglas, S. M., Bachelet, I., & Church, G. M. (2012). A logic-gated nanorobot for targeted transport of molecular payloads. *Science*, 335(6070), 831-834. <https://doi.org/10.1126/science.1214081>

Douglas, S. M., Dietz, H., Liedl, T., Högberg, B., Graf, F., & Shih, W. M. (2009). Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes. *Nature*, 459(7245), 414-418.

Falcó, G., Llobet, J. M., Bocío, A., & Domingo, J. L. (2006). Daily intake of arsenic, cadmium, mercury, and lead by consumption of edible marine species. *J Agric Food Chem*, 54(16), 6106-6112. <https://doi.org/10.1021/jf0610110>

Fan, C., Plaxco, K. W., & Heeger, A. J. (2003). Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence-specific detection of DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(16), 9134-9137.

Fraser, C. G., & Harris, E. K. (1989). Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 27(5), 409-437. <https://doi.org/10.3109/10408368909106595>

Gerling, T., Wagenbauer, K. F., Neuner, A. M., & Dietz, H. (2015). Dynamic DNA devices and assemblies formed by shape-complementary, non-base pairing 3D components. *Science*, 347(6229), 1446-1452.

Han, D., Pal, S., Nangreave, J., Deng, Z., Liu, Y., & Yan, H. (2011). DNA origami with complex curvatures in three-dimensional space. *Science*, 332(6027), 342-346.

Han, D., Pal, S., Yang, Y., Jiang, S., Nangreave, J., Liu, Y., & Yan, H. (2013). DNA gridiron nanostructures based on four-arm junctions. *Science*, 339(6126), 1412-1415.

Han, K., Liang, Z., & Zhou, N. (2010). Design strategies for aptamer-based biosensors. *Sensors (Basel)*, 10(5), 4541-4557. <https://doi.org/10.3390/s100504541>

Hoffmann, B., Beer, M., Reid, S. M., Mertens, P., Oura, C. A., van Rijn, P. A., Slomka, M. J., Banks, J., Brown, I. H., Alexander, D. J., & King, D. P. (2009). A review of RT-PCR

technologies used in veterinary virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. *Vet Microbiol*, 139(1-2), 1-23. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.034>

Huang, R., He, N., & Li, Z. (2018). Recent progresses in DNA nanostructure-based biosensors for detection of tumor markers. *Biosensors and Bioelectronics*, 109, 27-34.

Jeong, J., Kim, H., & Lee, J. B. (2015). Enzymatic Polymerization on DNA Modified Gold Nanowire for Label-Free Detection of Pathogen DNA. *Int J Mol Sci*, 16(6), 13653-13660. <https://doi.org/10.3390/ijms160613653>

Jiao, J., Duan, C., Xue, L., Liu, Y., Sun, W., & Xiang, Y. (2020). DNA nanoscaffold-based SARS-CoV-2 detection for COVID-19 diagnosis. *Biosens Bioelectron*, 167, 112479. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112479>

Jones, M. R., Seeman, N. C., & Mirkin, C. A. (2015). Programmable materials and the nature of the DNA bond. *Science*, 347(6224), 1260901.

Kallenbach, N. R., Ma, R.-I., & Seeman, N. C. (1983). An immobile nucleic acid junction constructed from oligonucleotides. *Nature*, 305(5937), 829-831.

Kelley, S. O. (2017). Advancing ultrasensitive molecular and cellular analysis methods to speed and simplify the diagnosis of disease. *Accounts of chemical research*, 50(3), 503-507.

Kelley, S. O., Mirkin, C. A., Walt, D. R., Ismagilov, R. F., Toner, M., & Sargent, E. H. (2014). Advancing the speed, sensitivity and accuracy of biomolecular detection using multi-length-scale engineering. *Nature nanotechnology*, 9(12), 969-980.

Killian, M. L. (2008). Hemagglutination Assay for the Avian Influenza Virus. In E. Spackman (Ed.), *Avian Influenza Virus* (pp. 47-52). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-279-3_7

Klonoff, D. C. (1997). Noninvasive blood glucose monitoring. *Diabetes Care*, 20(3), 433-437. <https://doi.org/10.2337/diacare.20.3.433>

Koshiol, J., Wang, E., Zhao, Y., Marincola, F., & Landi, M. T. (2010). Strengths and limitations of laboratory procedures for microRNA detection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 19(4), 907-911. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.Epi-10-0071>

Kuzuya, A., Wang, R., Sha, R., & Seeman, N. C. (2007). Six-helix and eight-helix DNA nanotubes assembled from half-tubes. *Nano letters*, 7(6), 1757-1763.

Kwon, P. S., Ren, S., Kwon, S. J., Kizer, M. E., Kuo, L., Xie, M., Zhu, D., Zhou, F., Zhang, F., Kim, D., Fraser, K., Kramer, L. D., Seeman, N. C., Dordick, J. S., Linhardt, R. J., Chao, J., & Wang, X. (2020). Designer DNA architecture offers precise and multivalent spatial pattern-recognition for viral sensing and inhibition. *Nat Chem*, 12(1), 26-35. <https://doi.org/10.1038/s41557-019-0369-8>

Labib, M., Sargent, E. H., & Kelley, S. O. (2016). Electrochemical methods for the analysis of clinically relevant biomolecules. *Chemical reviews*, 116(16), 9001-9090.

Li, Y., & Lu, Y. (2009). Functional nucleic acids for analytical applications (pp. 15-16). New York: Springer.

Li, Y., & Liu, J. (2020). Aptamer-based strategies for recognizing adenine, adenosine, ATP and related compounds. *Analyst*, 145(21), 6753-6768. <https://doi.org/10.1039/d0an00886a>

Liedl, T., Högberg, B., Tytell, J., Ingber, D. E., & Shih, W. M. (2010). Self-assembly of three-dimensional prestressed tensegrity structures from DNA. *Nature nanotechnology*, 5(7), 520-524.

Lin, M., Song, P., Zhou, G., Zuo, X., Aldalbahi, A., Lou, X., Shi, J., & Fan, C. (2016). Electrochemical detection of nucleic acids, proteins, small molecules and cells using a DNA-nanostructure-

based universal biosensing platform. *nature protocols*, 11(7), 1244-1263.

Liu, L., Rong, Q., Ke, G., Zhang, M., Li, J., Li, Y., Liu, Y., Chen, M., & Zhang, X. B. (2019). Efficient and Reliable MicroRNA Imaging in Living Cells via a FRET-Based Localized Hairpin-DNA Cascade Amplifier. *Anal Chem*, 91(5), 3675-3680. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05778>

Liu, M., Fu, J., Hejesen, C., Yang, Y., Woodbury, N. W., Gothelf, K., Liu, Y., & Yan, H. (2013). A DNA tweezer-actuated enzyme nanoreactor. *Nat Commun*, 4, 2127. <https://doi.org/10.1038/ncomms3127>

Lu, C.-H., Willner, B., & Willner, I. (2013). DNA nanotechnology: from sensing and DNA machines to drug-delivery systems. *ACS nano*, 7(10), 8320-8332.

Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., Downing, J. R., Jacks, T., Horvitz, H. R., & Golub, T. R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435(7043), 834-838. <https://doi.org/10.1038/nature03702>

Ma, R.-I., Kallenbach, N. R., Sheardy, R. D., Petrillo, M. L., & Seeman, N. C. (1986). Three-arm nucleic acid junctions are flexible. *Nucleic Acids Research*, 14(24), 9745-9753.

Ma, Y., Mao, Y., An, Y., Tian, T., Zhang, H., Yan, J., Zhu, Z., & Yang, C. J. (2018). Target-responsive DNA hydrogel for non-enzymatic and visual detection of glucose. *Analyst*, 143(7), 1679-1684. <https://doi.org/10.1039/c8an00010g>

Modi, S., Halder, S., Nizak, C., & Krishnan, Y. (2014). Recombinant antibody mediated delivery of organelle-specific DNA pH sensors along endocytic pathways. *Nanoscale*, 6(2), 1144-1152. <https://doi.org/10.1039/c3nr03769j>

Modi, S., M, G. S., Goswami, D., Gupta, G. D., Mayor, S., & Krishnan, Y. (2009). A DNA nanomachine that maps spatial and

temporal pH changes inside living cells. *Nat Nanotechnol*, 4(5), 325-330. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.83>

Mokhtarzadeh, A., Ezzati Nazhad Dolatabadi, J., Abnous, K., de la Guardia, M., & Ramezani, M. (2015). Nanomaterial-based cocaine aptasensors. *Biosens Bioelectron*, 68, 95-106. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.12.052>

Moreira, P. I., Nunomura, A., Nakamura, M., Takeda, A., Shenk, J. C., Aliev, G., Smith, M. A., & Perry, G. (2008). Nucleic acid oxidation in Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med*, 44(8), 1493-1505. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.002>

Nie, W., Wang, Q., Zou, L., Zheng, Y., Liu, X., Yang, X., & Wang, K. (2018). Low-Fouling Surface Plasmon Resonance Sensor for Highly Sensitive Detection of MicroRNA in a Complex Matrix Based on the DNA Tetrahedron. *Anal Chem*, 90(21), 12584-12591. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02686>

Ochmann, S. E., Vietz, C., Trofymchuk, K., Acuna, G. P., Lalkens, B., & Tinnefeld, P. (2017). Optical Nanoantenna for Single Molecule-Based Detection of Zika Virus Nucleic Acids without Molecular Multiplication. *Anal Chem*, 89(23), 13000-13007. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04082>

Plaks, V., Koopman, C. D., & Werb, Z. (2013). Cancer. Circulating tumor cells. *Science*, 341(6151), 1186-1188. <https://doi.org/10.1126/science.1235226>

Porchetta, A., Idili, A., Vallée-Bélisle, A., & Ricci, F. (2015). General Strategy to Introduce pH-Induced Allostery in DNA-Based Receptors to Achieve Controlled Release of Ligands. *Nano Lett*, 15(7), 4467-4471. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b00852>

Qian, L., Wang, Y., Zhang, Z., Zhao, J., Pan, D., Zhang, Y., Liu, Q., Fan, C., Hu, J., & He, L. (2006). Analogic China map constructed by DNA. *Chinese Science Bulletin*, 51, 2973-2976.

Qin, Y., Li, D., Yuan, R., & Xiang, Y. (2019). Netlike hybridization chain reaction assembly of DNA nanostructures

enables exceptional signal amplification for sensing trace cytokines. *Nanoscale*, 11(35), 16362-16367. <https://doi.org/10.1039/c9nr04988f>

Qu, X., Yang, F., Chen, H., Li, J., Zhang, H., Zhang, G., Li, L., Wang, L., Song, S., Tian, Y., & Pei, H. (2017). Bubble-Mediated Ultrasensitive Multiplex Detection of Metal Ions in Three-Dimensional DNA Nanostructure-Encoded Microchannels. *ACS Appl Mater Interfaces*, 9(19), 16026-16034. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b03645>

Raveendran, M., Lee, A. J., Sharma, R., Wälti, C., & Actis, P. (2020). Rational design of DNA nanostructures for single molecule biosensing. *Nat Commun*, 11(1), 4384. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18132-1>

Rothemund, P. W. (2006). Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, 440(7082), 297-302.

Röthlisberger, P., & Hollenstein, M. (2018). Aptamer chemistry. *Adv Drug Deliv Rev*, 134, 3-21. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.04.007>

Sage, A. T., Besant, J. D., Lam, B., Sargent, E. H., & Kelley, S. O. (2014). Ultrasensitive electrochemical biomolecular detection using nanostructured microelectrodes. *Accounts of chemical research*, 47(8), 2417-2425.

Shangguan, D., Li, Y., Tang, Z., Cao, Z. C., Chen, H. W., Mallikaratchy, P., Sefah, K., Yang, C. J., & Tan, W. (2006). Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(32), 11838-11843. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602615103>

Shen, L., Wang, P., & Ke, Y. (2021). DNA Nanotechnology-Based Biosensors and Therapeutics. *Advanced Healthcare Materials*, 10(15), 2002205. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adhm.202002205>

Shen, Z., Wu, A., & Chen, X. (2017). Current detection technologies for circulating tumor cells. *Chem Soc Rev*, 46(8), 2038-2056. <https://doi.org/10.1039/c6cs00803h>

Sigel, H. (1992). Have adenosine 5'-triphosphate ATP⁴⁻ and related purine-nucleotides played a role in early evolution? ATP, its own 'enzyme' in metal ion facilitated hydrolysis! *Inorganica Chimica Acta*, 198-200, 1-11. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)92342-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)92342-9)

Simonsson, T. (2001). G-quadruplex DNA structures--variations on a theme. *Biol Chem*, 382(4), 621-628. <https://doi.org/10.1515/bc.2001.073>

Soleymani, L., Fang, Z., Sargent, E. H., & Kelley, S. O. (2009). Programming the detection limits of biosensors through controlled nanostructuring. *Nature nanotechnology*, 4(12), 844-848.

Song, P., Ye, D., Zuo, X., Li, J., Wang, J., Liu, H., Hwang, M. T., Chao, J., Su, S., Wang, L., Shi, J., Wang, L., Huang, W., Lal, R., & Fan, C. (2017). DNA Hydrogel with Aptamer-Toehold-Based Recognition, Cloaking, and Decloaking of Circulating Tumor Cells for Live Cell Analysis. *Nano Lett*, 17(9), 5193-5198. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.7b01006>

Sudsakorn, S., Phatarphekar, A., O'Shea, T., & Liu, H. (2011). Determination of 1,25-dihydroxyvitamin D₂ in rat serum using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 879(2), 139-145. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.11.025>

Surana, S., Bhat, J. M., Koushika, S. P., & Krishnan, Y. (2011). An autonomous DNA nanomachine maps spatiotemporal pH changes in a multicellular living organism. *Nat Commun*, 2, 340. <https://doi.org/10.1038/ncomms1340>

Tanaka, Y., Kondo, J., Sychrovský, V., Šebera, J., Dairaku, T., Saneyoshi, H., Urata, H., Torigoe, H., & Ono, A. (2015). Structures, physicochemical properties, and applications of T-

Hg(II)-T, C-Ag(I)-C, and other metallo-base-pairs. *Chem Commun (Camb)*, 51(98), 17343-17360. <https://doi.org/10.1039/c5cc02693h>

Teles, F., & Fonseca, L. (2008). Trends in DNA biosensors. *Talanta*, 77(2), 606-623.

Tian, T., Wang, J., & Zhou, X. (2015). A review: microRNA detection methods. *Org Biomol Chem*, 13(8), 2226-2238. <https://doi.org/10.1039/c4ob02104e>

Tintoré, M., Gállego, I., Manning, B., Eritja, R., & Fàbrega, C. (2013). DNA origami as a DNA repair nanosensor at the single-molecule level. *Angew Chem Int Ed Engl*, 52(30), 7747-7750. <https://doi.org/10.1002/anie.201301293>

Turner, A., Karube, I., & Wilson, G. S. (1987). *Biosensors: fundamentals and applications*. Oxford university press.

Turner, A. P. (2013). Biosensors: sense and sensibility. *Chemical Society Reviews*, 42(8), 3184-3196.

Walter, H. K., Bauer, J., Steinmeyer, J., Kuzuya, A., Niemeyer, C. M., & Wagenknecht, H. A. (2017). "DNA Origami Traffic Lights" with a Split Aptamer Sensor for a Bicolor Fluorescence Readout. *Nano Lett*, 17(4), 2467-2472. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.7b00159>

Wang, D., Fu, Y., Yan, J., Zhao, B., Dai, B., Chao, J., Liu, H., He, D., Zhang, Y., Fan, C., & Song, S. (2014). Molecular logic gates on DNA origami nanostructures for microRNA diagnostics. *Anal Chem*, 86(4), 1932-1936. <https://doi.org/10.1021/ac403661z>

Wang, T., Sha, R., Birktoft, J., Zheng, J., Mao, C., & Seeman, N. C. (2010). A DNA crystal designed to contain two molecules per asymmetric unit. *Journal of the American Chemical Society*, 132(44), 15471-15473.

Wang, X.-H., & Wang, S. (2008). Sensors and Biosensors for the Determination of Small Molecule Biological Toxins. *Sensors*, 8(9), 6045-6054. <https://www.mdpi.com/1424-8220/8/9/6045>

Wang, X., & Seeman, N. C. (2007). Assembly and characterization of 8-arm and 12-arm DNA branched junctions. *Journal of the American Chemical Society*, 129(26), 8169-8176.

Wang, Y., Mueller, J. E., Kemper, B., & Seeman, N. C. (1991). Assembly and characterization of five-arm and six-arm DNA branched junctions. *Biochemistry*, 30(23), 5667-5674.

Warner, E. A. (1993). Cocaine abuse. *Ann Intern Med*, 119(3), 226-235. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-119-3-199308010-00009>

Wei, M., Wang, C., Xu, E., Chen, J., Xu, X., Wei, W., & Liu, S. (2019). A simple and sensitive electrochemiluminescence aptasensor for determination of ochratoxin A based on a nicking endonuclease-powered DNA walking machine. *Food Chem*, 282, 141-146. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.011>

Weissleder, R., Lee, H., Ko, J., & Pittet, M. J. (2020). COVID-19 diagnostics in context. *Sci Transl Med*, 12(546). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc1931>

Wen, Y., Pei, H., Wan, Y., Su, Y., Huang, Q., Song, S., & Fan, C. (2011). DNA nanostructure-decorated surfaces for enhanced aptamer-target binding and electrochemical cocaine sensors. *Anal Chem*, 83(19), 7418-7423. <https://doi.org/10.1021/ac201491p>

Winfree, E., Liu, F., Wenzler, L. A., & Seeman, N. C. (1998). Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals. *Nature*, 394(6693), 539-544.

Yakimovich, A., Andriasyan, V., Witte, R., Wang, I. H., Prasad, V., Suomalainen, M., & Greber, U. F. (2015). Plaque2.0-A High-Throughput Analysis Framework to Score Virus-Cell Transmission and Clonal Cell Expansion. *PLoS One*, 10(9), e0138760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138760>

Yan, J., Hu, C., Wang, P., Liu, R., Zuo, X., Liu, X., Song, S., Fan, C., He, D., & Sun, G. (2014). Novel rolling circle amplification and DNA origami-based DNA belt-involved signal amplification

assay for highly sensitive detection of prostate-specific antigen (PSA). *ACS Appl Mater Interfaces*, 6(22), 20372-20377. <https://doi.org/10.1021/am505913d>

Ye, D., Zuo, X., & Fan, C. (2018). DNA Nanotechnology-Enabled Interfacial Engineering for Biosensor Development. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 11(1), 171-195. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061417-010007>

Zhang, L., Fang, X., Liu, X., Ou, H., Zhang, H., Wang, J., Li, Q., Cheng, H., Zhang, W., & Luo, Z. (2020). Discovery of sandwich type COVID-19 nucleocapsid protein DNA aptamers. *Chem Commun (Camb)*, 56(70), 10235-10238. <https://doi.org/10.1039/d0cc03993d>

Zhang, P., Jiang, J., Yuan, R., Zhuo, Y., & Chai, Y. (2018). Highly Ordered and Field-Free 3D DNA Nanostructure: The Next Generation of DNA Nanomachine for Rapid Single-Step Sensing. *J Am Chem Soc*, 140(30), 9361-9364. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b04648>

Zhang, Y., Pan, V., Li, X., Yang, X., Li, H., Wang, P., & Ke, Y. (2019). Dynamic DNA Structures. *Small*, 15(26), e1900228. <https://doi.org/10.1002/smll.201900228>

Zhao, W.-W., Xu, J.-J., & Chen, H.-Y. (2014). Photoelectrochemical DNA biosensors. *Chemical reviews*, 114(15), 7421-7441.

Zhao, Y., Hu, S., Wang, H., Yu, K., Guan, Y., Liu, X., Li, N., & Liu, F. (2017). DNA Dendrimer-Streptavidin Nanocomplex: an Efficient Signal Amplifier for Construction of Biosensing Platforms. *Anal Chem*, 89(12), 6907-6914. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01551>

Zheng, J., Birktoft, J. J., Chen, Y., Wang, T., Sha, R., Constantinou, P. E., Ginell, S. L., Mao, C., & Seeman, N. C. (2009). From molecular to macroscopic via the rational design of a self-assembled 3D DNA crystal. *Nature*, 461(7260), 74-77.

Zheng, J., Constantinou, P. E., Micheel, C., Alivisatos, A. P., Kiehl, R. A., & Seeman, N. C. (2006). Two-dimensional nanoparticle arrays show the organizational power of robust DNA motifs. *Nano letters*, 6(7), 1502-1504.

Zhou, G., Lin, M., Song, P., Chen, X., Chao, J., Wang, L., Huang, Q., Huang, W., Fan, C., & Zuo, X. (2014). Multivalent capture and detection of cancer cells with DNA nanostructured biosensors and multibranched hybridization chain reaction amplification. *Anal Chem*, 86(15), 7843-7848. <https://doi.org/10.1021/ac502276w>

Zhou, X., Zhao, M., Duan, X., Guo, B., Cheng, W., Ding, S., & Ju, H. (2017). Collapse of DNA Tetrahedron Nanostructure for "Off-On" Fluorescence Detection of DNA Methyltransferase Activity. *ACS Appl Mater Interfaces*, 9(46), 40087-40093. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b13551>

BÖLÜM II

RNAi Terapötikleri: Viral Hastalıklar ve Kanser

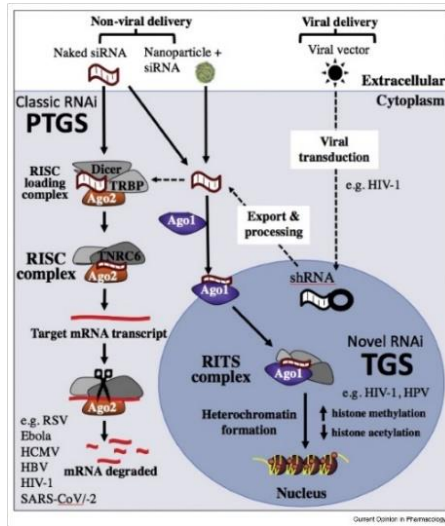
Ayşe Nur PEKTAŞ¹

Giriş

RNA interferens (RNAi), bir gen dizisini tamamlayıcı olan ve hedeflenen dizinin spesifik susturulmasına aracılık eden, tipik olarak 19-23 nükleotidden oluşan kısa RNA dizilerinin temel prensibine dayanır (Kelleher ve ark., 2020). RNAi molekülleri kısa müdahaleci (short/small interfering) **(si)RNA**, kısa saç tokası (short hairpin) **(sh)RNA** ve mikro **(mi)RNA**'yı içerir. RNAi gen susturulmasını oluşturan mekanizmalar genel olarak iki şekildedir (Şekil 1). 1998'de Fire ve Mello, RNAi adını verdikleri *Caenorhabditis elegans* adlı nematodda bu korunmuş biyolojik gen susturma sürecini keşfettiler ve bu özelliğiyle 2006'da Nobel ödülü aldılar (Fire ve ark., 1998).

¹ Öğr. Gör. Dr., Sivas Cumhuriyet Üniversitesi

İlk gen susturma yolu, sitoplazmik haberci RNA (mRNA) dizilerinin tamamlayıcı siRNA tarafından hedeflendiği ve ardından RNA kaynaklı susturma kompleksindeki (RISC) Argonaute 2 (**Ago2**) proteininin dilimleme aktivitesi tarafından geçici olarak bozulduğu **klasik RNAi**'dir (Wilson & Doudna, 2013). İkinci gen susturma yolu, aynı zamanda transkripsiyonel gen susturma veya **epigenetik susturma** olarak da adlandırılan **yeni RNAi**'dir; burada Argonaute 1 (**Ago1**) proteini, tamamlayıcı siRNA'nın gen promotör bölgesini hedeflemek ve RNA kaynaklı transkripsiyonel susturma (RITS) kompleksini oluşturmak için çekirdeğe girmesini sağlar, aşağı yöndeki gen ifadesini susturan kalıtsal, baskıcı epigenetik modifikasyonları indükler (Ahlenstiel ve ark., 2015). Bu korunmuş biyolojik gen susturma yolu, 1989'da Matzke tarafından bitkilerde ve daha sonra insanlarda Morris tarafından 2004'te keşfedildi (Matzke ve ark., 1989; Morris ve ark., 2004). Klasik RNAi, antiviral gelişim için en çok çalışılan strateji olmasına rağmen, yeni RNAi yolu bu alanda, özellikle insan immün yetmezlik virüsü tip 1 (HIV1) ve insan papilloma virüsünün (HPV) kronik enfeksiyonlarında daha çok ilgi görmüştür (Kelleher ve ark., 2020).



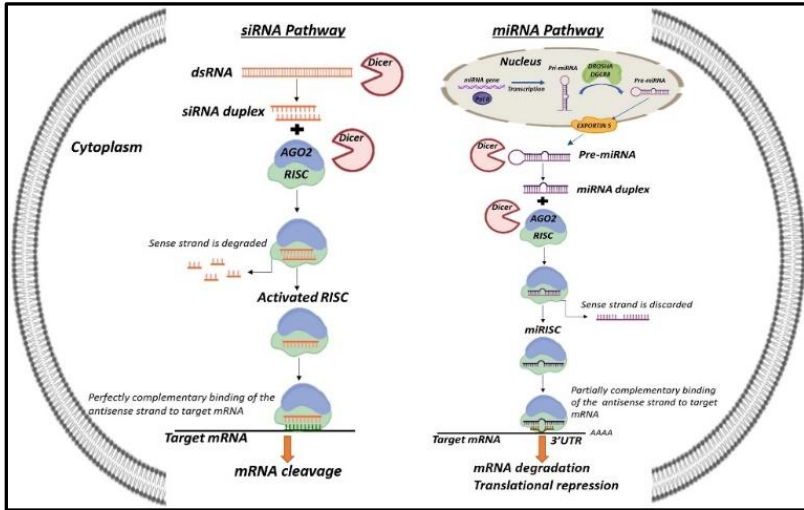
Şekil 7. Viral ilişkili RNAi yolağı (Kelleher ve ark., 2020).

Her iki RNAi yoluna da RNA dizilerinin viral veya viral olmayan dağıtımı aracılık edebilir. Klasik RNAi veya transkripsiyon sonrası gen susturma (PTGS), sitoplazmada spesifik mRNA bölünmesini başlatan RISC makinesi yoluyla gerçekleşir. Yeni RNAi veya transkripsiyonel gen susturma (TGS), çekirdekte RITS kompleksi başlatarak baskılayıcı epigenetik modifikasyonlar yoluyla meydana gelir. Ago1, Argonaute 1; Ago2, Argonaute 2; shRNA, kısa saç tokası RNA; RISC, RNA kaynaklı susturma kompleksi; RITS, RNA kaynaklı transkripsiyonel susturma kompleksi; TRBP, işlemsel yanıt (TAR) RNA bağlayıcı protein; TNRC6, 6 protein içeren trinükleotid tekrarı .

RNAi Bazlı Terapötiklerin Temel Kavramları

- **RNA interferens (RNAi)**

Bu, çift sarmallı RNA'lar (dsRNA'lar) tarafından tetiklenen ve tamamlayıcı bir dizi içeren hedef genlerin (mRNA'lar) ifadesinin susturulmasına ve ilgili proteinlerin üretiminin engellenmesine neden olan, evrimsel olarak korunmuş bir hücresel süreçtir (Chery, 2016; Kara ve ark., 2022; Ozcan ve ark., 2015). 2001 yılında Elbashir ve arkadaşları, memeli hücre hatlarındaki eksojen 21-nt uzun RNA'ların, RNAi yolunu kullanarak gen ekspresyonunu susturduğunu ilk kez göstermiştir (Elbashir ve ark., 2001). İki tür küçük RNA molekülünü temsil eden siRNA ve miRNA, en etkili RNAi efektörleridir. siRNA ve miRNA'nın RNAi aracılığıyla gen susturma mekanizmaları Şekil 2'de gösterilmektedir.



Şekil 2. siRNA ve miRNA yolları tarafından indüklenen RNAi aracılı gen susturma mekanizmaları (Kara ve ark., 2022).

- **Küçük/kısa interferens yapan RNA (siRNA)**

Kısa müdahaleci RNA veya susturucu RNA olarak da bilinen siRNA, RNAi yolu yoluyla etki eden, 20-27 baz çifti uzunluğunda çift sarmallı ncRNA moleküllerinin bir sınıfıdır. Genomda kodlanan uzun dsRNA'lar siRNA öncüleridir. Bu uzun dsRNA'lar, Dicer adı verilen sitozolik dsRNA'ya özgü RNaz aktivasyonu ile 3' uçta ve 5' fosfat gruplarında iki nükleotid içeren 20-25 nükleotid içeren siRNA fragmanlarına bölünür (Bernstein ve ark., 2001; Siomi & Siomi, 2009). Daha sonra siRNA, RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) ve kompleksin katalitik çekirdeği olan Argonaute 2 (AGO2) proteininden oluşan karmaşık bir yapıya dahil edilir. Bu etkileşimle, siRNA'nın antisens ipliği spesifik hedef mRNA üzerindeki tamamlayıcı diziye bağlanırken, sens ipliği kompleksten salınır ve parçalanır. siRNA'nın antisens ve mRNA dizisi arasındaki bağlanma mükemmel bir şekilde tamamlayıcı olduğunda, bölünme yolu tetiklenir ve AGO2 endoribonükleaz, hedef mRNA'yı küçük parçalara bölerek mRNA'nın fonksiyonel proteine çevrilmesini

bloke eder (Kara ve ark., 2022; Martinez ve ark., 2002; Meister & Tuschl, 2004).

- **MikroRNA (miRNA)**

miRNA'lar, RNAi'ye aracılık eden, evrimsel olarak korunmuş başka bir endojen ncRNA'lardır. miRNA biyogenezinde, çekirdekteki RNA polimeraz II aktivasyonu ile miRNA geninden birincil miRNA (pri-miRNA) olarak adlandırılan yaklaşık 33 nükleotid içeren bir kök ilmek veya kısa saç tokası yapısı oluşturulur. DROSHA ve DGCR8'den oluşan bir kompleks, pri-miRNA'yı neredeyse 70 nükleotide sahip öncü miRNA'ya (pre-miRNA) dönüştürür. Pre-miRNA daha sonra Exportin 5 yoluyla sitoplazmaya translokasyona tabi tutulur ve Dicer aktivasyonu ile bu pre-miRNA'lar 22 nükleotidlik olgun miRNA'lara işlenir. Olgun miRNA, RISC-AGO2 tarafından tanınır ve bu komplekse yüklenir; burada sens ipliği atılır ve kalan antisens ipliği, hedef mRNA'sını bulur ve mRNA'nın 3'-çevrilmemiş bölgesine (3'-UTR) kısmen tamamlayıcı olarak bağlanır. Son olarak, miRISC mRNA'yı böler ve mRNA'nın proteine çevrilmesini engeller (Kara ve ark., 2022; Mishra ve ark., 2016; Robb ve ark., 2017; To ve ark., 2020).

Viral Hastalıklar ve RNAi

- Akut virüs enfeksiyonları ve RNAi terapötikleri

Akut bir virüs enfeksiyonu, virüsün konakçı tarafından hızla temizlenmesine veya konağın virüs enfeksiyonuna yenik düşmesine neden olan, konakçı ile virüs arasındaki dengesizliğin olduğu nispeten kısa bir enfeksiyon süresiyle tanımlanır. Kısa, akut enfeksiyon süresi nedeniyle, akut enfeksiyonlar için geliştirilen tüm RNAi terapötikleri, geçici, klasik RNAi susturma mekanizmasını kullanmıştır (Tablo 1). Bazı virüs enfeksiyonlarının hem akut hem de kronik enfeksiyon evresine sahip olabilir (Kelleher ve ark., 2020).

- Solunum sinsityal virüsü (RSV)

İnsanlar üstünde proof-of-concept klinik deneylerine giren ilk RNAi terapötik, Alnylam Pharmaceuticals tarafından geliştirilen

ALN-RSV01'dir. ALN-RSV01, RSV yapısal olmayan nükleokapsid (N) proteininin mRNA'sını hedefleyen tek bir siRNA'dır. RSV, bronşiyolit ve zatürre gibi komplikasyonlarla birlikte ciddi alt solunum yolu hastalığına neden olur. ALN-RSV01, çıplak siRNA'nın verilmesi için bir solunum uygulama yolu kullanılarak Faz IIb denemelerinde başarılı bir şekilde ilerlemiştir. Bununla birlikte, etkinlik uç noktaları karşılanmamıştır ve potansiyel olarak kimyasal olarak modifiye edilmiş siRNA ve iletimi geliştirmek için bir nanotaşıyıcı kullanılarak siRNA stabilitesinin daha fazla optimizasyonuna yönelik gereksinimi göstermektedir (Alvarez ve ark., 2009; Gottlieb ve ark., 2016; Kelleher ve ark., 2020; Zamora ve ark., 2011).

- Ebolavirüs (EBOV)

EBOV şiddetli, hemorajik bir ateştir ve vaka ölüm oranları %25-90 arasında değişmektedir. Tekmira Pharmaceuticals (Arbutus Biopharma), Ebolavirüs Zaire ve Kikwit türlerini hedef alan RNAi terapötikleri geliştirme konusunda bir geçmişe sahiptir. 2014-2016'daki Batı Afrika Ebola virüsü salgını sırasında, L polimerazı hedef alan siLpol-2 RNA ve Viral Protein 35i hedef alan siVP35-2 RNA yoluyla Ebola-Zaire (Makona) virüsü replikasyonunu inhibe eden 3. nesil bir RNAi terapötik kombinasyonu olan TKM-130803'ü geliştirmiştir. TKM-130803 formülasyonu, 0,3 mg/kg/gün dozunda ~80 nm çapında bir lipit nanoparçacığı içinde intravenöz olarak verilen eşit oranda iki siRNA molekülünü içerir. Yüksek dereceli Ebolavirüs hastalığı olan hastalarda yapılan tek kollu Faz II denemesi, 2015 yılında Sierra Leone'deki salgın sırasında terapötik fayda olasılığının düşük olması nedeniyle durdurulmuştur (Scott ve ark., 2020; Thi ve ark., 2015).

- Şiddetli akut solunum sendromu (SARS)-koronavirüsü (CoV)

SARS-CoV ve SARS-CoV-2, viral pnömoni ve akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) gibi yaşamı tehdit eden komplikasyonlara yol açabilen ciddi solunum yolu hastalıklarıdır. Mevcut SARS-CoV-2 salgını, orijinal SARS-CoV'yi hedef alan

RNAi terapötikleriyle ilgili tüm patentlerin kapsamlı bir özetini sunan Liu ve arkadaşları tarafından incelenen, koronavirüs tedavisine yönelik RNAi terapötik gelişimini yeniden ateşlemiştir. Daha öncesinde Li ve arkadaşları tarafından, in vivo makak çalışmalarında yapılan bu RNAi terapötiklerinden biri, SARS-CoV'nin sırasıyla Spike protein kodlayan ve ORF1b (NSP12) bölgelerini hedef alan birleşik siRNA dizileri, siSC2 ve siSC5'i kullanmış ve önemli virüs baskılaması göstermiştir (Li ve ark., 2005; Liu ve ark., 2020).

- Bornavirüs

Bornavirüs enfeksiyonlarının ölümcül insan ensefalitine neden olduğu rapor edilmiştir. Şu anda bornavirüs için yalnızca iki antiviral ajan bulunmaktadır: ribavirin ve favipiravir (T-705). Teng ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada iki siRNA tanımlanmıştır; biri bornavirüs genomunun kapsüllenmesi için gerekli olan N mRNA'yı hedef alır ve diğeri viral RNA sentezi için gerekli olan RNA'ya bağımlı bir RNA polimerazı olan L mRNA'yı hedefler. Bu iki siRNA, bir TD-Borna kokteylinde birleştirildiğinde, 293T hücrelerinde N ve L mRNA'yı önemli ölçüde azaltmıştır (~%70); T-705 ile kombinasyon halinde kullanıldığında virüs ekspresyonundaki azalma bir hayli fazla olmuştur (Korn ve ark., 2018; Teng ve ark., 2019).

- Kronik virüs enfeksiyonları ve RNAi terapötikleri

Kronik bir virüs enfeksiyonu, insan vücudunda uzun süre devam eden bir enfeksiyondur. Bazı virüs enfeksiyonları yaşam boyu devam eder. Bu nedenle kronik enfeksiyonlar uzun vadeli/kalıcı RNAi'den faydalanabilir. Bu, kalıtsal baskılayıcı epigenetik modifikasyonları indüklemek için yeni RNAi veya transkripsiyonel gen susturma şeklinde olabilir veya konakçı genomuna lentivirüs entegrasyonu nedeniyle gen modifikasyonunun kurucu ifadesini sağlamak için klasik veya yeni RNAi'nin lentivirüs vektörü teslimi şeklinde olabilir. DNA herpes virüsleri ve RNA virüsü HIV-1 gibi bazı kronik virüs enfeksiyonları doğal olarak

latent bir aşamaya girer ve yeniden etkinleşme yeteneğine sahiptir (Kelleher ve ark., 2020).

- İnsan bağışıklık yetersizliği virüsü tip 1 (HIV-1)

HIV-1 durumunda, gizli virüs rezervuarını kontrol edebilen oldukça etkili antiretroviral tedavi (ART) geliştirilmiştir, ancak bu günlük, yaşam boyu tedavi gerektirir ve HIV/AIDS'le yaşayan yaklaşık 38 milyon insanın yalnızca yaklaşık 17 milyonuna uygulanabilir. Bu nedenle ART tam bir tedavi değildir ve alternatif yaklaşımlar geliştirilmektedir. HIV-1 enfeksiyonunu hedef alan en gelişmiş RNAi terapötik maddesi, bir shRNA CCR5 ve bir C46 füzyon peptidi inhibitörünü içeren bir lentiviral vektör olan Cal-1 olarak adlandırılan LVsh5/C46'dır. Cal-1, iki farklı hayvan modelinde (fare ve makaklar) hem in vitro hem de in vivo olarak kapsamlı bir şekilde karakterize edilmiştir ve HIV-1 virüs replikasyonunun güçlü bir şekilde susturulmasını sağlar. Cal-1 şu anda yüksek riskli lenfomalı HIV-1 hastalarındaki etkinliğini değerlendirmek için Faz I/II klinik deneylerindedir (Burke ve ark., 2015; Delville ve ark., 2019; Peterson ve ark., 2016; Wolstein ve ark., 2014). Yakın zamanda umut verici in vivo fare modeli verileri gösterilen başka bir HIV-1 kombinasyon gen terapisi ise, HIV-1 promotörünü hedefleyen bir RNAi terapötik, LTR-362, HIV-1 Tat ve Rev mRNA'yı hedefleyen RNAi terapötikleri ve anti-HIV- 1 gp120 aptamer, A-1'dir (Kelleher ve ark., 2020; Zhou ve ark., 2018).

- İnsan papilloma virüsü (HPV)

HPV servikal, anal ve orofarinks dahil olmak üzere bir dizi maligniteye neden olur. HPV ile ilişkili maligniteleri hedef alan RNAi terapötiklerinin sağlanmasındaki son gelişmeler, nanopartiküllerin biyomühendisliğini içermektedir (Kelleher ve ark., 2020). Bir çalışma, ağız kanseri hücrelerinde Bcl2 mRNA'yı ve Baculoviral IAP tekrar içeren 5 (BIRC5) mRNA'yı hedef alan terapötik siRNA'ları sağlamak için polietilenimin (PEI) ile modifiye edilmiş manyetik Fe₃O₄ nanopartiküllerinin geliştirildiğini ve her iki hedefin de önemli ölçüde gen susturulmasını sağladığını bildirmiştir (Jin ve ark., 2019). Yakın zamanda yapılan bir başka

çalışma, yenilikçi bir biyomimetik ikili ilaç dağıtım sisteminin (Si/PNPs@HeLa) faydalarını ortaya koymuştur. Bu dağıtım sistemi, E7'yi hedefleyen siRNA ve kemoterapi ilacı paklitaksel (PTX) ile birlikte yüklenen laktik-ko-glikolik asit (PLGA) nanopartiküllerini kamufle etmek için HeLa hücre zarlarını kullanır. HeLa hücrelerinde etkili in vitro gen susturmanın yanı sıra in vivo HeLa tümör taşıyan farelerde sinerjistik bir anti-tümör etkisi, %84'lük bir tümör hacmi inhibisyon oranıyla rapor edilmiştir. Bu çalışma, kombine kemo-gen terapisi yoluyla rahim ağzı kanseri tedavisi için yeni bir ikili ilaç dağıtım sistemini göstermektedir (Xu ve ark., 2020).

- Hepatit B virüsü (HBV)

HBV dünya çapında yaklaşık 300 milyon insanı enfekte etmektedir ve karaciğer sirozu, karaciğer yetmezliği ve hepatoselüler karsinomun önde gelen nedenidir (Kelleher ve ark., 2020). İyileştirici bir terapi mevcut olmadığından, RNAi terapötikleri potansiyel bir fonksiyonel tedavi olarak takip edilmiştir. Arrowhead Pharmaceuticals tarafından geliştirilen RNAi terapötik ARO-520, eşmolar oranda siHBV-74 ve siHBV-77'nin bir kombinasyonunu içerir; karaciğer tropik kolesterolüne konjuge edilir ve hücre girişini takiben endozomal kaçışı mümkün kılan, hepatosit hedefli, N-asetilgalaktozamin-konjuge melittin benzeri bir peptid (NAG-MLP) ile birlikte verilir (Wooddell ve ark., 2013). Alternatif bir RNAi terapötüğü, HBV mRNA'yı hedefleyen ve hepatositlere hedeflenen dağıtım için N-asetilgalktozamine (GalNAc) konjuge edilen AB-729-001'dir. Mart 2020'de erken dönemde yapılan insan Faz I klinik deneyinin olumlu ön sonuçlarını açıkladı; tedavi iyi tolere edilmiş ve 12 haftada HBsAg seviyelerinde ~1 log azalma görüldüğü rapor edilmiştir (Kelleher ve ark., 2020).

Tablo 1. Antiviral RNAi terapötiklerin gelişimi

Virüs	RNAi terapötik	RNAi yolağı ve hedef	Taşıma Metodu	Aşama/Şirket
RSV	ALN-RSV01	PTGS- N protein	Çıplak siRNA	Faz Iİb klinik deneme(Alnylam)
RSV	TRIM25/HRSV-F, RIG-I/ HRSV-N	PTGS	Çıplak siRNA	In vitro
Ebola	TKM-130803; siLpol-2, siVP35-2	PTGS- L polimeraz, VP35	Lipit NP	In vivo makak – Faz II klinik deneme (Tekmira/Arbutus)
SARS-CoV	siSC2, siSC5	PTGS- Spike protein, ORF1b		In vivo makak
SARS-CoV-2	VIR-2703 (ALN-COV)	PTGS		In vitro (Alnylam/Vir)
Bornavirüs	TD-Borna	PTGS	Çıplak siRNA	In vitro
HIV-1	LVsh5 (Cal-1)	PTGS-HIV CCR5 (& C46 füzyon inhibitör)	LV shRNA	In vivo fare In vivo makak Faz I/II (Calimmune Inc. /CSL)
HIV-1	PromA, 143	TGS-Promotör NF-kB & AP-1/COUP-TF	Çıplak siRNA, LV shRNA	In vitro In vivo fare
HIV-1	LTR-362, Tat/Rev, (& gp120 aptamer A-1)	TGS-Promotör, PTGS-Tat,Rev (gp120)	27mer Dicer substrat & gp120 aptamer	In vivo fare
HIV-1	HIV-1C	TGS- Promotör	Çıplak siRNA	In vitro
SIV	SIV2A	TGS- Promotör	LV shRNA	In vitro
HPV	HPV16	TGS- Promotör	Çıplak siRNA	In vitro
HPV	Si/PNPs@ HeLa	PTGS (& anti-tümör ilaç)	Membran kamuflej NP	In vitro In vivo fare
HPV	Bcl2, BIRC5	PTGS	Manyetik Fe3O4 NP	In vitro
HBV	ARC-520, ARO-HBV/ JNJ-3989	PTGS-All viral RNA	Kolesterol siRNA & NAG-MLP	In vivo fare /NHP Faz Iİb klinik deneme (Arrowhead/Janssen)
HBV	AB-729	PTGS	GalNAc konjuge siRNA	Faz I klinik deneme (Arbutus)
HCMV	siUL54B, siUL97A, siUL122B	PTGS	Çıplak siRNA	In vitro
EBV	E1(T2)	PTGS-EBNA1	Çıplak siRNA	In vitro

Kanser ve RNAi

• siRNA bazlı kanser terapötikleri

siRNA'ların, onkogenler gibi hedef gen ekspresyonunu diziye özgü bir şekilde yüksek verimlilikle susturmak için ilaç olarak potansiyel kullanımı, bu stratejinin hassas tıpta veya kanser ve diğer hastalıkların hedefe yönelik terapisinde kullanılması için büyük bir fırsat sağlamıştır (Ozcan ve ark., 2015; Ozpolat ve ark., 2014). Şu anda siRNA, kanser araştırmalarında in vitro hücre kültürü sistemlerinde veya in vivo preklinik hayvan modellerinde kanserin hücresel yollarındaki anahtar molekülleri etkili bir şekilde tanımlamak için kullanılıyor ve antikanser etkileri hakkında dikkate değer veriler sağlamaktadır (Pai ve ark., 2006). Sentetik siRNA terapötikleri, hücre proliferasyonunu, hücre istilasını, hayatta kalmayı, anjiyogenezi, metastazı, tümör oluşumunu ve ilerlemeyi ve radyoterapi ve kemoterapiye direnci destekleyen Bcl-2, kirsten sıçan sarkomu (KRAS), c-myc, Src gibi onkogenleri hedeflemek için özel olarak geliştirilmiştir (Papke ve ark., 2020; Pecot ve ark., 2014; Reyes-González ve ark., 2015; Tekedereli ve ark., 2013).

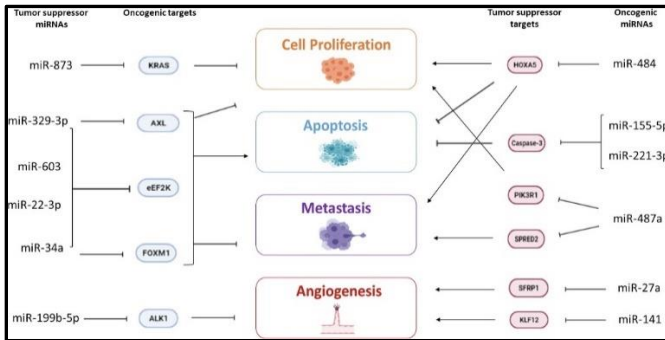
siRNA bazlı kanser tedavisinde ana strateji, uygun hedef genlerin seçimidir. Potansiyel aday genler genellikle tümörlerde yaygın olarak ve yüksek oranda eksprese edilir ve tümör büyüme yollarında, metastazda, anjiyogeneze, tümör oluşumunda ve ilaç direncinde kritik roller oynar. Son yıllarda hasta genomik veritabanlarını kullanarak kritik onkogenleri tanımlamak için büyük çaba sarf edilmiştir (Wang ve ark., 2017).

• miRNA bazlı kanser terapötikleri

miRNA mekanizmasındaki bazı faktörlerin hatalı ekspresyonu veya mutasyonu, miRNA'nın işlenmesinde, stabilitesinde veya hedeflenmesinde değişikliklere yol açarak kanser dahil ciddi hastalıklara neden olabilir (Mishra ve ark., 2016). Bugüne kadar birçok çalışma, miRNA genlerinin yarısından fazlasının sıklıkla genomdaki kanserle ilişkili ve/veya hassas bölgelerde bulunduğunu bildirmiştir (Garzon ve ark., 2009). Geçtiğimiz

yıllarda, geniş bir yelpazedeki kanser doku ve hücrelerinin mikrodizi ekspresyon verilerinden elde edilen kanıtların toplanması, anormal miRNA ekspresyonunun kanserin çeşitli özellikleriyle ilişkili olduğunu göstermiştir (Syeda, 2020). Düzensiz miRNA'ların kanserdeki biyolojik rolü onkogenik veya tümör baskılayıcı olarak sınıflandırılabilir. Kanser hücrelerinde tümör baskılayıcı genleri inhibe ederek kanser gelişimine katkıda bulunan yukarı regüle edilmiş miRNA'lar, onkogenik miRNA'lar (**oncomiR**) görevi görürken, proto-onkogenleri inhibe ederek karsinogenezi önleyen aşağı regüle edilmiş miRNA'ların aşırı ekspresyonu, tümör baskılayıcı miRNA'lar olarak işlev görür (Lai ve ark., 2019).

miR-21, miR-155, miR-181 ve miR-484 dahil olmak üzere bazı miRNA'lar oncomiR'ler gibi davranırken, miR-873, miR-329-3p, miR-603, miR-22-3p, miR-34a, miR-220b ve miR-199b-5p gibi bazı miRNA'lar meme kanserinde tümör baskılayıcı olarak görev yapar. Şekil 3, meme kanserindeki bu miRNA'lardan bazılarını ve çeşitli kanser türlerindeki diğer bazı tümör baskılayıcı miRNA'ları ve onkogenik miRNA'ları ve bunların ilgili kanser yolları ve hedef genlerle etkileşimlerini göstermektedir. MiRNA'ların ve bunların kanser gelişimi ve ilerlemesindeki hedeflerinin ayrıntılı olarak tanımlanması ve incelenmesi, potansiyel olarak yeni miRNA-(miRNA mimik veya anti-miR) bazlı kanser tedavilerinin geliştirilmesine yol açabilir (Kara ve ark., 2022).



Şekil 3. miRNA'lar, proliferatif sinyalleme sürdürmek, büyüme baskılayıcılardan kaçmak, hücre ölümüne direnmek, istilayı ve

metastazı aktive etmek ve anjiyogenezi indüklemek dahil olmak üzere kanserin ayırt edici özelliklerini etkileyen tümör baskılayıcı veya onkogenik olarak işlev görebilir(Kara ve ark., 2022).

- **Kanser tedavisine yönelik klinik çalışmalarda siRNA terapötikleri**
- **RRM2 hedefli siRNA-siklodekstrin bazlı polimerik nanopartiküller (CALAA-01)**

İlk hedefe yönelik siRNA ilacı CALAA-01 (Calando Pharmaceuticals), 2008 yılında ilerlemiş solid tümörlere karşı geliştirilmiştir. CALAA-01, doğrusal, katyonik siklodekstrin bazlı polimerik nanopartikül, stabilize edici bir madde olarak PEG, hedefleme ligandı olarak bir insan transferrin proteini ve RRM2 ekspresyonunu inhibe eden spesifik siRNA'lar dahil olmak üzere dört bileşene sahip olacak şekilde tasarlanmıştır. Hedeflenen nanopartiküllerin boyutu yaklaşık 70 nm'dir. RRM2 proteini, DNA replikasyonu ve hücre bölünmesinin tamamlanmasında anahtar bir moleküldür. RRM2'nin çeşitli tümör tiplerinde aşırı eksprese edildiği ve akciğer, baş ve boyun kanserlerinde Bcl-2 genini düzenleyerek tümörün ilerlemesinde önemli bir role sahip olduğu bildirildi. Ayrıca, RRM2'nin susturulmasının hücre proliferasyonunu azalttığı ve hücre döngüsü durmasını teşvik ettiği gösterilmiştir (Davis, 2009; Davis ve ark., 2010; Heidel ve ark., 2007; Zuckerman ve ark., 2014).

- **KRAS hedefli siRNA-polimerik nanopartikülleri (siG12D-LODER)**

siG12D-LODER, Silenseed Ltd. tarafından lokal ileri pankreas kanseri olan hastalar için tasarlanmıştır. Biyolojik olarak parçalanabilen polimer matris Lokal İlaç EluteR (LODER), kontrollü ve uzun süreli dağıtım için bir pankreatik tümör mikro ortamında lokal olarak G12D mutasyonlu KRAS hedefli siRNA'yı serbest bırakmak için kullanılmıştır (Zorde Khvalevsky ve ark., 2013).

- **PKN3 hedefli siRNA-katyonik lipopleks nanopartikülleri (Atu027)**

Atu027, protein kinaz N3'ü (PKN3) hedef alan katyonik LNP'leri ve siRNA'ları içeren bir lipopleks sistemidir. PKN3'ün prostat tümörlerinde kanser ilerlemesini ve lenf nodu metastazı oluşumunu azalttığı ortaya çıkan umut verici bir terapötik hedeftir. Atu027'nin dört bileşeni vardır; katyonik lipid AtuFECT01, nötr füzojenik lipid, PEGile edilmiş lipid ve PKN3-siRNA. Klinik öncesi çalışmalarda Atu027 farelere, sıçanlara ve sinomolgus maymunlarına intravenöz olarak uygulandığında PKN3'ün spesifik inhibisyonu gözlemlenmiştir. Atu027 tedavisi, prostat ve pankreas kanserleri için ortotopik fare modellerinde tümör büyümesini, lenf nodu metastazı ve lenf damarı yoğunluğunu önemli ölçüde azaltmıştır (Aleku ve ark., 2008; Santel ve ark., 2006).

- **EphA2 hedefli siRNA-lipozomal nanopartiküller (siRNA-EphA2-DOPC)**

Birçok kanserde yukarı regüle edilen ephrin tip-A reseptör 2 (EphA2) genini hedef alan siRNA'ları kapsülleyen nötr lipid (DOPC) bazlı lipozomlar, MD Anderson Kanser Merkezi'nde geliştirildi. Yumurtalık kanserinde bir reseptör tirozin kinaz olan EphA2'nin aşırı ekspresyonu, daha kötü klinik sonuçlarla ilişkilidir ve EphA2 inhibisyonunun meme ve pankreas kanserlerinin ilerlemesini azalttığı rapor edilmiştir. siRNA-EphA2-DOPC kompleksinin antitümör aktivitesi, yumurtalık kanserinin ortotopik fare modelinde test edildi. Tek bir siRNA-EphA2-DOPC enjeksiyonundan 48 saat sonra farelerde etkili bir şekilde azaltılmış bir EphA2 ekspresyonu elde edildi ve tedavilerin sonunda tümör büyümesi belirgin şekilde inhibe edilmiştir. Ayrıca siRNA-EphA2-DOPC ilacı paklitaksel ile kombine edildiğinde, tek başına paklitaksel tedavisine kıyasla tümör büyümesinin önemli ölçüde azaldığı da bildirilmiştir (Duxbury ve ark., 2004; Landen Jr ve ark., 2005; Noblitt ve ark., 2004; Thaker ve ark., 2004).

- **MYC hedefli siRNA-lipit bazlı nanopartiküller (DCR-MYC)**

Onkogen MYC'yi inhibe eden bir lipit nanoparçacık-siRNA sistemi olan DCR-MYC (Dicerna Pharmaceuticals), hepatoselüler karsinom (HCC), solid tümörler, lenfoma veya multipl miyelom dahil olmak üzere çeşitli kanser türleri için geliştirilmiştir. MYC'nin hücre sağkalımı, anjiyogenez, metastaz, ilaç direnci ve kötü hasta prognozundaki rolü nedeniyle önemli bir onkogenik hedef olduğu öne sürülmüştür. DCR-MYC'nin lipozomal dağıtım sistemi, özel Zarf ve Çekirdek lipit içerikleri nedeniyle tescilli EnCore Dicerna teknolojisine dayanmaktadır. MYC'yi hedeflemek için ilaç formülasyonunda Dicer-substrat siRNA (DsiRNA) kullanılmıştır. Daha uzun dubleks RNA'lar olan DsiRNA'lar, daha sonra siRNA'ya işlenecek Dicer substratlarıdır ve RNAi işlemede artan güce sahiptirler (Doré-Savard ve ark., 2008; Ganesh ve ark., 2015; Knies-Bamforth ve ark., 2004; Ma ve ark., 2010).

- **KSP ve VEGF hedefli siRNA'lar-SNALP'ler (ALN-VSP02)**

Solid tümörlere yönelik klinik deneylerde kullanılan ilk çift hedefli siRNA terapötik, ALN-VSP02'dir. Alnylam Pharmaceuticals, SNALP'leri ve KSP ve VEGF'yi hedef alan iki siRNA'yı kullanarak ALN-VSP02 ilacını üretmiştir. KSP ve VEGF çeşitli kanser türlerinde yüksek düzeyde eksprese edilir ve sırasıyla hücre proliferasyonu ve anjiyogenez süreçlerine katkıda bulunur. İyonlaşabilir bir katyonik lipit olan 1,2-dilinoleiloksi-3-dimetilaminopropan (DLinDMA), SNALP formülasyonunda Chol, PEG ve fosfolipid ile birlikte ana lipit bileşeni olarak kullanılmıştır. Önceki çalışmalar, DLinDMA'dan salınan siRNA'nın, kemirgenlerde 0,01 mg/kg ve insan olmayan primatlarda 0,1 mg/kg kadar düşük siRNA miktarlarında bile in vivo terapötik etkiye sahip olduğunu bildirmiştir (Mirkin ve ark., 2015; Semple ve ark., 2010).

- **PLK1 hedefli siRNA-lipid bazlı nanopartiküller (TKM-080301)**

LNP'ler içererek polo benzeri kinazı (PLK1) hedefleyen bir siRNA ilacı olan TKM-080301 veya TKM-PLK1, Arbutus Biopharma Corporation tarafından HCC, gastrointestinal nöroendokrin tümörler (GI-NET) ve adrenokortikal karsinom (ACC) hastalarını tedavi etmek için geliştirilmiştir. LNP formülasyonu, iyonlaşabilen katyonik bir lipit olan DLinDMA'yı içerir. Bir serin/treonin kinaz olan PLK1, geniş bir tümör yelpazesinde yüksek düzeyde eksprese edilir ve tümör hücresi çoğalmasında anahtar bir rol oynar (Wan ve ark., 2014).

▪ **Kanser tedavisine yönelik klinik çalışmalarda miRNA terapötikleri**

Son zamanlarda, insanda ilk kez kullanılan miRNA terapötikleri, faz I klinik çalışmalarda güvenli bulunmuş ve iyi tolere edilmiş ve mezotelyomada TargomiR (miR-16 mimik bazlı tedavi), Cobomarsen (anti- T hücreli lösemi/lenfomada miR-155) ve hepatit C enfeksiyonu olan bireylerde Miravirsen (anti-miR-122) terapötikleridir (Kara ve ark., 2022). Kanser klinik deneylerindeki miRNA terapötikleri Tablo 2'de listelenmiştir.

Tablo 2. Kanser klinik deneylerinde miRNA terapötikleri (Kara ve ark., 2022).

İlaç adı	Terapötik ajan	Hastalık	Dağıtım sistemi	Uygulama yolu	Şirket
MRX34	miR-34a taklitçisi	Çoklu solid tümörler	LNP'ler-Lipozomlar	IV	Mirna Therapeutics, Inc.
TargomiRs	miR-16 taklitçisi	Malign plevral mezotelyoma ve küçük olmayan hücreli akciğer kanseri	EGFR antikor hedefli mini hücreler	IV	EnGeneIC Limited
Cobomarsen	Anti-miR-155	T hücreli lösemi/lenfoma	LNA aracılı	Deri altı enjeksiyon veya IV	miRagen Therapeutics, Inc.

MRX34'ün Faz I denemeleri, miRNA taklitlerini kullanarak endojen miR-34'ü geri yükleme stratejisiyle, primer karaciğer kanseri, renal hücreli karsinom, multipl miyelom, lenfoma veya

küçük hücreli akciğer kanseri dahil olmak üzere çoklu katı tümörleri olan hastalarda 2013 yılında başlatılmıştır. Dağıtım stratejisi olarak yaklaşık 120 nm lipozom boyutuna sahip NOV340 teknolojisi (SMARTICLES, Marina Biotech, Bothell, WA; Mirna Therapeutics Inc., 2011) kullanılmıştır. Lipozom formülasyonu, nötr veya daha yüksek pH değerlerinde anyonik ve daha düşük pH değerlerinde katyonik olan amfoterik lipidlerden oluşur. NOV340 parçacıkları, düşük pH nedeniyle tümör bölgelerinde pozitif yüklü hale gelir ve bu onların tümör hücrelerine yapışmasını sağlar (Bader, 2012).

TargomiR'ler, kanser hastalarında taşıyıcı bazlı miRNA terapötiklerinin faz I denemelerini tamamlayan ilk teknolojidir. MPM'li hastalarda TargomiR'ler üzerinde açık etiketli, doz artırımı bir faz I çalışması gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, TargomiR'lerin iyi tolere edildiğini ve antitümör etkinliğinin erken belirtileriyle birlikte hastalarda hayatta kalmayı teşvik ettiğini göstermiştir (Hanna ve ark., 2019).

Cobomarsen veya MRG-106 (miRagen Therapeutics, Inc.), miR-155'in kilitli bir nükleik asit (LNA) ile modifiye edilmiş oligonükleotid inhibitörüdür. miR-155 yüksek seviyelerde bulunur ve lenfoma ve lösemide kötü prognozla ilişkilidir. Kütanöz T hücreli lenfomanın (CTCL) en sık görülen türü olan mikoz fungoidesin (MF) ilerlemesinde önemli bir rol oynar (Seto ve ark., 2018).

SONUÇ

RNAi bazlı gen susturma stratejisinin keşfi, yalnızca fonksiyonel genomik araştırmalarında değil, aynı zamanda viral hastalıklar ve kanser de dahil olmak üzere çok çeşitli patolojik durumlara yönelik hedefli terapötik ilaç üretimi uygulamalarında da önemli bir gelişim sağlamıştır. Bu bölümde RNAi terapötiklerinin viral hastalıklarda ve kanser türlerinde hangi yollar üzerinden kullanıldığı ilaçların klinik denemeleri hakkında bilgi verilmiştir.

KAYNAKÇA

Ahlenstiel, C. L., Suzuki, K., Marks, K., Symonds, G. P., & Kelleher, A. D. (2015). Controlling HIV-1: non-coding RNA gene therapy approaches to a functional cure. *Frontiers in Immunology*, 6, 474.

Aleku, M., Schulz, P., Keil, O., Santel, A., Schaeper, U., Dieckhoff, B., Janke, O., Endruschat, J., Durieux, B., & Röder, N. (2008). Atu027, a liposomal small interfering RNA formulation targeting protein kinase N3, inhibits cancer progression. *Cancer research*, 68(23), 9788-9798.

Alvarez, R., Elbashir, S., Borland, T., Toudjarska, I., Hadwiger, P., John, M., Roehl, I., Morskaya, S. S., Martinello, R., & Kahn, J. (2009). RNA interference-mediated silencing of the respiratory syncytial virus nucleocapsid defines a potent antiviral strategy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(9), 3952-3962.

Bader, A. G. (2012). miR-34—a microRNA replacement therapy is headed to the clinic. *Frontiers in genetics*, 3, 120.

Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., & Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *nature*, 409(6818), 363-366.

Burke, B. P., Levin, B. R., Zhang, J., Sahakyan, A., Boyer, J., Carroll, M. V., Colón, J. C., Keech, N., Rezek, V., & Bristol, G. (2015). Engineering cellular resistance to HIV-1 infection in vivo using a dual therapeutic lentiviral vector. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 4.

Chery, J. (2016). RNA therapeutics: RNAi and antisense mechanisms and clinical applications. *Postdoc journal: a journal of postdoctoral research and postdoctoral affairs*, 4(7), 35.

Davis, M. E. (2009). The first targeted delivery of siRNA in humans via a self-assembling, cyclodextrin polymer-based nanoparticle: from concept to clinic. *Molecular pharmaceuticals*, 6(3), 659-668.

Davis, M. E., Zuckerman, J. E., Choi, C. H. J., Seligson, D., Tolcher, A., Alabi, C. A., Yen, Y., Heidel, J. D., & Ribas, A. (2010). Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *nature*, 464(7291), 1067-1070.

Delville, M., Touzot, F., Couzin, C., Hmitou, I., Djerroudi, L., Ouedrani, A., Lefrère, F., Tuchman-Durand, C., Mollet, C., & Fabreguettes, J.-R. (2019). Safety of CD34+ Hematopoietic stem cells and CD4+ T lymphocytes transduced with LVsh5/C46 in HIV-1 infected patients with high-risk lymphoma. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 13, 303-309.

Doré-Savard, L., Roussy, G., Dansereau, M.-A., Collingwood, M. A., Lennox, K. A., Rose, S. D., Beaudet, N., Behlke, M. A., & Sarret, P. (2008). Central delivery of Dicer-substrate siRNA: a direct application for pain research. *Molecular Therapy*, 16(7), 1331-1339.

Duxbury, M. S., Ito, H., Zinner, M. J., Ashley, S. W., & Whang, E. E. (2004). EphA2: a determinant of malignant cellular behavior and a potential therapeutic target in pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene*, 23(7).

Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., & Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *nature*, 411(6836), 494-498.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *nature*, 391(6669), 806-811.

Ganesh, S., Ying, B., Koser, M., Cyr, W., Chopda, G., Dudek, H., Lai, C., Wang, W., Brown, B., & Abrams, M. T. (2015). Systemic delivery of CTNNB1 dicer-substrate siRNAs (DsiRNAs) leads to efficient oncogene silencing in diverse tumor types of extra hepatic origin. *Cancer research*, 75(15_Supplement), 3533-3533.

Garzon, R., Calin, G. A., & Croce, C. M. (2009). MicroRNAs in cancer. *Annual review of medicine*, 60, 167-179.

Gottlieb, J., Zamora, M. R., Hodges, T., Musk, A., Sommerwerk, U., Dilling, D., Arcasoy, S., DeVincenzo, J., Karsten, V., & Shah, S. (2016). ALN-RSV01 for prevention of bronchiolitis obliterans syndrome after respiratory syncytial virus infection in lung transplant recipients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 35(2), 213-221.

Hanna, J., Hossain, G. S., & Kocerha, J. (2019). The potential for microRNA therapeutics and clinical research. *Frontiers in genetics*, 10, 478.

Heidel, J. D., Liu, J. Y.-C., Yen, Y., Zhou, B., Heale, B. S., Rossi, J. J., Bartlett, D. W., & Davis, M. E. (2007). Potent siRNA inhibitors of ribonucleotide reductase subunit RRM2 reduce cell proliferation in vitro and in vivo. *Clinical Cancer Research*, 13(7), 2207-2215.

Jin, L., Wang, Q., Chen, J., Wang, Z., Xin, H., & Zhang, D. (2019). Efficient delivery of therapeutic siRNA by Fe₃O₄ magnetic nanoparticles into oral cancer cells. *Pharmaceutics*, 11(11), 615.

Kara, G., Calin, G. A., & Ozpolat, B. (2022). RNAi-based therapeutics and tumor targeted delivery in cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 182, 114113. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114113>

Kelleher, A. D., Cortez-Jugo, C., Cavalieri, F., Qu, Y., Glanville, A. R., Caruso, F., Symonds, G., & Ahlenstiel, C. L. (2020). RNAi therapeutics: an antiviral strategy for human infections. *Curr Opin Pharmacol*, 54, 121-129. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2020.09.011>

Knies-Bamforth, U. E., Fox, S. B., Poulsom, R., Evan, G. I., & Harris, A. L. (2004). c-Myc interacts with hypoxia to induce angiogenesis in vivo by a vascular endothelial growth factor-dependent mechanism. *Cancer research*, 64(18), 6563-6570.

Korn, K., Coras, R., Bobinger, T., Herzog, S. M., Lücking, H., Stöhr, R., Huttner, H. B., Hartmann, A., & Ensser, A. (2018). Fatal encephalitis associated with Borna disease virus 1. *New England Journal of Medicine*, 379(14), 1375-1377.

Lai, X., Eberhardt, M., Schmitz, U., & Vera, J. (2019). Systems biology-based investigation of cooperating microRNAs as monotherapy or adjuvant therapy in cancer. *Nucleic acids research*, 47(15), 7753-7766.

Landen Jr, C. N., Chavez-Reyes, A., Bucana, C., Schmandt, R., Deavers, M. T., Lopez-Berestein, G., & Sood, A. K. (2005). Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery. *Cancer research*, 65(15), 6910-6918.

Li, B.-j., Tang, Q., Cheng, D., Qin, C., Xie, F. Y., Wei, Q., Xu, J., Liu, Y., Zheng, B.-j., & Woodle, M. C. (2005). Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. *Nature medicine*, 11(9), 944-951.

Liu, C., Zhou, Q., Li, Y., Garner, L. V., Watkins, S. P., Carter, L. J., Smoot, J., Gregg, A. C., Daniels, A. D., & Jervy, S. (2020). Research and development on therapeutic agents and vaccines for COVID-19 and related human coronavirus diseases. In: ACS Publications.

Ma, L., Young, J., Prabhala, H., Pan, E., Mestdagh, P., Muth, D., Teruya-Feldstein, J., Reinhardt, F., Onder, T. T., & Valastyan, S. (2010). miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nature cell biology*, 12(3), 247-256.

Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Lührmann, R., & Tuschl, T. (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, 110(5), 563-574.

Matzke, M., Primig, M., Trnovsky, J., & Matzke, A. (1989). Reversible methylation and inactivation of marker genes in

sequentially transformed tobacco plants. *The EMBO journal*, 8(3), 643-649.

Meister, G., & Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *nature*, 431(7006), 343-349.

Mirkin, C. A., Meade, T. J., Petrosko, S. H., & Stegh, A. H. (2015). *Nanotechnology-based precision tools for the detection and treatment of cancer* (Vol. 166). Springer.

Mishra, S., Yadav, T., & Rani, V. (2016). Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics. *Critical reviews in oncology/hematology*, 98, 12-23.

Morris, K. V., Chan, S. W.-L., Jacobsen, S. E., & Looney, D. J. (2004). Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science*, 305(5688), 1289-1292.

Noblitt, L. W., Bangari, D. S., Shukla, S., Knapp, D. W., Mohammed, S., Kinch, M. S., & Mittal, S. K. (2004). Decreased tumorigenic potential of EphA2-overexpressing breast cancer cells following treatment with adenoviral vectors that express EphrinA1. *Cancer gene therapy*, 11(11), 757-766.

Ozcan, G., Ozpolat, B., Coleman, R. L., Sood, A. K., & Lopez-Berestein, G. (2015). Preclinical and clinical development of siRNA-based therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 87, 108-119.

Ozpolat, B., Sood, A. K., & Lopez-Berestein, G. (2014). Liposomal siRNA nanocarriers for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 66, 110-116.

Pai, S. I., Lin, Y., Macaes, B., Meneshian, A., Hung, C., & Wu, T. (2006). Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene therapy*, 13(6), 464-477.

Papke, B., Van Swearingen, A. E., Feng, A. Y., Azam, S. H., Harrison, E. B., Yang, R., Cox, A. D., Der, C. J., & Pecot, C. V. (2020). Abstract B32: Silencing of oncogenic KRAS by a mutant-

favoring short interfering RNA. *Molecular Cancer Research*, 18(5_Supplement), B32-B32.

Pecot, C. V., Wu, S. Y., Bellister, S., Filant, J., Rupaimoole, R., Hisamatsu, T., Bhattacharya, R., Maharaj, A., Azam, S., & Rodriguez-Aguayo, C. (2014). Therapeutic silencing of KRAS using systemically delivered siRNAs. *Molecular cancer therapeutics*, 13(12), 2876-2885.

Peterson, C. W., Haworth, K. G., Burke, B. P., Polacino, P., Norman, K. K., Adair, J. E., Hu, S.-L., Bartlett, J. S., Symonds, G. P., & Kiem, H.-P. (2016). Multilineage polyclonal engraftment of Cal-1 gene-modified cells and in vivo selection after SHIV infection in a nonhuman primate model of AIDS. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 3.

Reyes-González, J. M., Armaiz-Peña, G. N., Mangala, L. S., Valiyeva, F., Ivan, C., Pradeep, S., Echevarría-Vargas, I. M., Rivera-Reyes, A., Sood, A. K., & Vivas-Mejía, P. E. (2015). Targeting c-MYC in platinum-resistant ovarian cancer. *Molecular cancer therapeutics*, 14(10), 2260-2269.

Robb, T., Reid, G., & Blenkiron, C. (2017). Exploiting microRNAs as cancer therapeutics. *Targeted oncology*, 12(2), 163-178.

Santel, A., Aleku, M., Keil, O., Endruschat, J., Esche, V., Fisch, G., Dames, S., Löffler, K., Fechtner, M., & Arnold, W. (2006). A novel siRNA-lipoplex technology for RNA interference in the mouse vascular endothelium. *Gene therapy*, 13(16), 1222-1234.

Scott, J. T., Sharma, R., Meredith, L. W., Dunning, J., Moore, C. E., Sahr, F., Ward, S., Goodfellow, I., & Horby, P. (2020). Pharmacokinetics of TKM-130803 in Sierra Leonean patients with Ebola virus disease: plasma concentrations exceed target levels, with drug accumulation in the most severe patients. *EBioMedicine*, 52.

Semple, S. C., Akinc, A., Chen, J., Sandhu, A. P., Mui, B. L., Cho, C. K., Sah, D. W., Stebbing, D., Crosley, E. J., & Yaworski, E.

(2010). Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nature biotechnology*, 28(2), 172-176.

Seto, A. G., Beatty, X., Lynch, J. M., Hermreck, M., Tetzlaff, M., Duvic, M., & Jackson, A. L. (2018). Cobomarsen, an oligonucleotide inhibitor of miR-155, co-ordinately regulates multiple survival pathways to reduce cellular proliferation and survival in cutaneous T-cell lymphoma. *British journal of haematology*, 183(3), 428-444.

Siomi, H., & Siomi, M. C. (2009). On the road to reading the RNA-interference code. *nature*, 457(7228), 396-404.

Syeda, A. (2020). Z. et al.(2020)‘Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer’. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1723.

Tekedereli, I., Alpay, S. N., Akar, U., Yuca, E., Ayugo-Rodriguez, C., Han, H.-D., Sood, A. K., Lopez-Berestein, G., & Ozpolat, B. (2013). Therapeutic silencing of Bcl-2 by systemically administered siRNA nanotherapeutics inhibits tumor growth by autophagy and apoptosis and enhances the efficacy of chemotherapy in orthotopic xenograft models of ER (–) and ER (+) breast cancer. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 2.

Teng, D., Obika, S., Ueda, K., & Honda, T. (2019). A small interfering RNA cocktail targeting the nucleoprotein and large protein genes suppresses Borna disease virus infection. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2781.

Thaker, P. H., Deavers, M., Celestino, J., Thornton, A., Fletcher, M. S., Landen, C. N., Kinch, M. S., Kiener, P. A., & Sood, A. K. (2004). EphA2 expression is associated with aggressive features in ovarian carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 10(15), 5145-5150.

Thi, E. P., Mire, C. E., Lee, A. C., Geisbert, J. B., Zhou, J. Z., Agans, K. N., Snead, N. M., Deer, D. J., Barnard, T. R., & Fenton,

K. A. (2015). Lipid nanoparticle siRNA treatment of Ebola-virus-Makona-infected nonhuman primates. *nature*, 521(7552), 362-365.

To, K. K., Fong, W., Tong, C. W., Wu, M., Yan, W., & Cho, W. C. (2020). Advances in the discovery of microRNA-based anticancer therapeutics: latest tools and developments. *Expert opinion on drug discovery*, 15(1), 63-83.

Wan, C., Allen, T., & Cullis, P. (2014). Lipid nanoparticle delivery systems for siRNA-based therapeutics. *Drug delivery and translational research*, 4, 74-83.

Wang, T., Shigdar, S., Al Shamaileh, H., Gantier, M. P., Yin, W., Xiang, D., Wang, L., Zhou, S.-F., Hou, Y., & Wang, P. (2017). Challenges and opportunities for siRNA-based cancer treatment. *Cancer letters*, 387, 77-83.

Wilson, R. C., & Doudna, J. A. (2013). Molecular mechanisms of RNA interference [Article]. *Annual Review of Biophysics*, 42(1), 217-239. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130404>

Wolstein, O., Boyd, M., Millington, M., Impey, H., Boyer, J., Howe, A., Delebecque, F., Cornetta, K., Rothe, M., & Baum, C. (2014). Preclinical safety and efficacy of an anti-HIV-1 lentiviral vector containing a short hairpin RNA to CCR5 and the C46 fusion inhibitor. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 1.

Wooddell, C. I., Rozema, D. B., Hossbach, M., John, M., Hamilton, H. L., Chu, Q., Hegge, J. O., Klein, J. J., Wakefield, D. H., & Oropeza, C. E. (2013). Hepatocyte-targeted RNAi therapeutics for the treatment of chronic hepatitis B virus infection. *Molecular Therapy*, 21(5), 973-985.

Xu, C., Liu, W., Hu, Y., Li, W., & Di, W. (2020). Bioinspired tumor-homing nanoplatfrom for co-delivery of paclitaxel and siRNA-E7 to HPV-related cervical malignancies for synergistic therapy. *Theranostics*, 10(7), 3325.

Zamora, M. R., Budev, M., Rolfe, M., Gottlieb, J., Humar, A., DeVincenzo, J., Vaishnaw, A., Cehelsky, J., Albert, G., & Nochur, S. (2011). RNA interference therapy in lung transplant patients infected with respiratory syncytial virus. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 183(4), 531-538.

Zhou, J., Lazar, D., Li, H., Xia, X., Satheesan, S., Charlins, P., O'Mealy, D., Akkina, R., Saayman, S., & Weinberg, M. S. (2018). Receptor-targeted aptamer-siRNA conjugate-directed transcriptional regulation of HIV-1. *Theranostics*, 8(6), 1575.

Zorde Khvalevsky, E., Gabai, R., Rachmut, I. H., Horwitz, E., Brunschwig, Z., Orbach, A., Shemi, A., Golan, T., Domb, A. J., & Yavin, E. (2013). Mutant KRAS is a druggable target for pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(51), 20723-20728.

Zuckerman, J. E., Gritli, I., Tolcher, A., Heidel, J. D., Lim, D., Morgan, R., Chmielowski, B., Ribas, A., Davis, M. E., & Yen, Y. (2014). Correlating animal and human phase Ia/Ib clinical data with CALAA-01, a targeted, polymer-based nanoparticle containing siRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(31), 11449-11454.

BÖLÜM III

Glukoz Metabolizması ve Kanser

Şeyda BERK¹

Giriş

Kanser araştırmalarında sürekli ilerlemeler kaydedilmesine rağmen kanser yükü artmaya devam etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) verileri 2020 yılında dünya çapında 19,2 milyondan fazla yeni kanser vakalarının kaydedildiğini ve yaklaşık 10 milyon ölümün kanserden kaynaklı gerçekleştiğini göstermiştir (Sung & ark., 2021). Karsinogenez, tümör baskılayıcılar ve onkogenlerdeki genetik değişiklikler yoluyla ortaya çıkan karmaşık, çok adımlı bir süreçtir. Bu değişiklikler apoptoz ve yaşlanma gibi hücrenin neden olduğu engelleri ortadan kaldırarak kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olur (Paul & ark., 2022). Tümör mikro ortamı, hücreleri klonal genişlemeleri için seçen adaptif bir baskı uygulayarak kanser öncesi

¹ Dr. Öğretim Üyesi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi

lezyonlardan karsinogeneze geçişte çok önemli bir rol oynamaktadır (Annibaldi & Widmann, 2010; Gatenby & ark., 2007; Liotta & Kohn, 2001).

Hücrenel enerji metabolizması normal hücreden kanser hücrene geçişte etkilenen ana süreçlerden biridir. Özellikle tümör hücrelerinde glukoz metabolizması sıklıkla değişmektedir. Glikoliz, iki ATP ve iki indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) molekülünün üretimiyle bir glukoz molekülünü iki piruvata dönüştüren katabolik bir işlemdir. Oksijen varlığında piruvat, oksidatif fosforilasyon yolunda CO₂ ve H₂O'ya oksidasyona uğrar ve bunun sonucunda yaklaşık 36 ATP molekülü üretilir (Annibaldi & Widmann, 2010). Alternatif olarak, oksijenin yokluğunda piruvat, anaerobik glikoliz yolunda laktik asite dönüştürölür. Ancak oksijen varlığında glukozun laktik asite dönüşümü gerçekleşebilir ve bu Warburg etkisi veya aerobik glikoliz olarak bilinir (Warburg, 1956). Daha yüksek hücre çoğalmasının önündeki engellerden biri, hücrenel süreçler için gerekli olan makromoleküllerin sentezlenmesi için sürekli bir enerji ve hammadde tedarikinin sağlanmasıdır. Kanser hücrelerine yönelik artan enerji ve hammadde ihtiyacını karşılamaya yönelik metabolik adaptasyonlar uzun zaman önce gösterilmiştir. 1920'li yıllarda Otto Warburg ve meslektaşları, Warburg etkisi olarak bilinen kanser hücrelerinin daha yüksek miktarda glukoz tükettiğini ve oksijen varlığında bile mitokondriyal oksidasyon yerine glukozu laktata fermente ettiğini fark etmişlerdir (Warburg, 1925; Warburg & ark., 1926). Warburg için, kanser hücrelerinin neden glukozu TCA döngüsü yerine laktat üretimine verimsiz bir şekilde yönlendirdiği ve bunun da önemli ölçüde daha yüksek ATP üretimiyle sonuçlandığı da dahil olmak üzere birçok soru cevapsız kaldı. Warburg, kanser hücrelerindeki laktat üretiminin, mitokondriyal hasarın neden olduğu oksidatif fosforilasyonun bozulmasından kaynaklandığını öne sürmüştür (Warburg, 1956).

Bu teoriyi çevreleyen tartışmalar ve özellikle Warburg'un meslektaşlarından biri olan Sidney Weinhouse'dan kaynaklanan çelişkiler mevcuttur. İzotop izlemeyi kullanan Weinhouse'un deneyleri, hem normal hücrelerde hem de tümör hücrelerinde

oksidatif fosforilasyon oranlarının benzer olduğunu gösterdi; bu da tümör hücrelerinin mitokondrilerinin sağlam olduğunu akla getirmektedir (Weinhouse, 1951). Aksine, oksijen açısından zengin ortamlardaki tümör hücreleri, hızlı çoğalma hızlarını sürdürmek için hem aerobik glikoliz hem de oksidatif fosforilasyonu kullanır. Yalnızca tümör çekirdeği gibi hipoksik ortamlarda, anaerobik glikoliz yoluyla laktik asit üretim oranları, birincil enerji kaynağı olarak oksidatif fosforilasyonu geride bırakır (N. Hay, 2016). Warburg, bu fenomen ile kanser hücrelerinde işlevsiz mitokondriyi öne sürmüş olsa da geçtiğimiz yıllarda yapılan çalışmalar, akciğer ve beyin kanserlerinin fonksiyonel mitokondriye sahip olduğunu ve bunun da tümörün büyümesi ve ilerlemesi için gerekli olduğunu göstermiştir (Hensley & ark., 2016; Ju & ark., 2014; Maher & ark., 2012; Navarro & ark., 2016; Roth & ark., 2020).

Metabolik Bir Bozukluk Olarak Kanser

Warburg'un gözlemleri, kanserin bir metabolik hastalık olduğu fikrine yol açtı; bu fikir, kanserin genetik bir bozukluk olduğu kavramının ortaya çıktığı 1970'lere kadar geniş çapta desteklenmiştir (Liberti & Locasale, 2016). Son zamanlarda kanserin metabolik bir hastalık olduğu düşüncesi yeniden ortaya çıktı ve büyük ilgi görmüştür. İronik bir şekilde, bu büyüme, artan genetik veriler ve metabolomiklere artan erişilebilirlik ile birlikte gelişmiş dizilime teknolojileri ile desteklenmektedir. Bu alanlardaki ilerleme onkometabolitlerin (tümör büyümesini ve metastazını sürdüren tümörlerde biriken endojen hücrel metabolitler) keşfine yol açmıştır (Gyamfi & ark., 2022). Onkometabolitlerin keşfi, kanserin ortaya çıkışını enerji üretimindeki bozukluklara bağlayan metabolik durum hakkında kanıt sağlamaktadır.

Daha önce, kanserin bir metabolik bozukluk olduğu yönündeki destek, kanserin mitokondrideki oksidatif fosforilasyon (OxPhos) yoluyla enerji üretimindeki kusurlardan kaynaklandığını öne sürülmüştür (Seyfried & Shelton, 2010). OxPhos, hücrelerin ihtiyaç duyduğu enerjinin çoğunu karşılamaktadır; dolayısıyla mitokondrinin sayısı, yapısı ve işlevindeki herhangi bir kusur,

hücrelerdeki enerji üretimini değiştirecektir (Seyfried & Shelton, 2010). Yavaş yavaş, bu kusurlu enerji üretimi, yetersiz solunumun enerji üretimi için fermantasyonun yerini almasıyla neoplaziye sonuçlanan yolların aktivasyonu gerçekleşecektir (Seyfried, 2015; Seyfried & Shelton, 2010). Dolayısıyla laktik asidin aerobik fermantasyonu (Warburg etkisi) kanserlerin en yaygın patolojik fenotipidir. Son kanıtlar ayrıca tümör hücrelerinin, kusurlu solunumu telafi etmek için başka bir fermantasyon yolu olarak mitokondriyal substrat düzeyinde fosforilasyonu kullanabileceğini göstermektedir (Seyfried, 2015; Seyfried & Shelton, 2010). Mitokondriyal substrat düzeyinde fosforilasyon, daha önce Warburg'un teorisinde eksik olan kanıtları sağlar (Gyamfi & ark., 2022). Enerji için fermantasyona telafi edici bir şekilde bağlı olan kusurlu OxPhos, hem mutajenik hem de kanserojen olan reaktif oksijen türlerini (ROS) üretir (Gyamfi & ark., 2022). Bu nedenle, kanserin metabolik teorisine göre, somatik mutasyonlar ve kanserin diğer tüm özellikleri, hücresel enerji metabolizmasının başlangıçtaki bozukluklarından kaynaklanan alt epifenomenlerdir (Gyamfi & ark., 2022).

Hemen hemen tüm kanserlerin iyi bilinen bir özelliği, 2-deoksi-2(18F)-floro-D-glukozun yüksek alımıdır (Bomanji & ark., 2001; Castell & Cook, 2008). Pozitron emisyon tomografisi (PET) taramaları ile kanser teşhisinde kullanılan açıkça metabolik bir özellik olarak nitelendirilmektedir. Bu teknik, kanser hücrelerinin teşhis için glukoz ve glutamine artan bağımlılığına dayanmaktadır ve hem erken hem de geç evre kanserlerin bu metabolik özellik ile karakterize edildiğini açıkça göstermektedir. Bu özellik sadece kanserin bir alt grubuyla sınırlı olmayıp, eşlik eden genetik değişikliklere bakılmaksızın hemen hemen tüm kanser türlerinde ortaya çıkmaktadır ve farklı metabolik olayları aramanın kanser teşhisinde faydalı olabileceği konusunda kanserlere dair önemli bir fikir vermektedir (Gyamfi & ark., 2022). Kanserlerde tanımlanan çeşitli anahtar metabolitler (örneğin asetat, laktat, serin, sarkozin, asparajin veya kolin) kanda, tükürükte, nefeste veya idrarda taranabilmektedir (Wishart, 2015). Kolon polipleri ve erken evre

pankreas kanserindeki metabolitler üzerine yapılan son çalışmalar, metabolitlerin biyobelirteçler olarak potansiyel rolünü ortaya koymaktadır (Liu & ark., 2023; Perazzoli & ark., 2023; Urayama, 2015). Kanser onlarca yıldır genetik bir hastalık olarak kabul edilmesine ve kanserlerdeki genetik değişiklikler sürekli olarak vurgulanmasına rağmen kanser için kesin bir genetik tarama mevcut değildir. Tüm kanser türlerinde mutasyona uğramış tek bir genin bilinmemesi, buna rağmen kanserin genetik bir hastalık olarak kabul edilmesi şaşırtıcıdır; ancak kanserlerin %90'ından fazlasında gözlenen metabolik özellikler hâlâ gözden kaçırılmaktadır. Metabolit taraması, gelecekteki erken teşhis ve kanser öncesi tarama için büyük bir potansiyele sahiptir ve hızlı ve uygun maliyetli olacaktır. Bu, kanserlerin metabolik doğasını açıkça ortaya koyuyor ve kanserin metabolik temeline güven sağlıyor. Daha önce belirtildiği gibi, kanser yönetimindeki başarının büyük bir kısmı erken kanser tespitinden kaynaklanmaktadır ve kanser metabolit taraması bu açıdan değerli olacaktır.

Kanserin metabolik bir bozukluk olduğuna dair daha fazla kanıt nükleer sitoplazma transfer çalışmalarından gelmektedir. Bu deneyler, hasarlı mitokondrinin normal mitokondri ile değiştirilmesini veya kanserli bir hücrenin çekirdeğinin, hasarlı bir mitokondrinin veya hasarlı çekirdeğin kanserin kaynağı olarak görev yapıp yapmadığını belirlemek amacıyla normal bir çekirdekle değiştirilmesini içermektedir. Kanser hasarlı bir çekirdekten kaynaklanıyorsa, bunun sağlıklı bir çekirdekle değiştirilmesi, tümör büyümesini baskılayacaktır. Bununla birlikte, eğer kanser, mitokondri fonksiyon bozukluğundan kaynaklanan düzensiz metabolizmadan kaynaklanıyorsa, bunun normal bir mitokondri ile değiştirilmesi kanseri önleyecektir (Seyfried, 2015; Seyfried & Shelton, 2010). Bu deneyler, çekirdeği çıkarılmış normal hücrelerin sitoplazmasının çekirdekli tümör hücreleriyle kaynaştırılmasıyla oluşturulan hücreler olan sibridlerin kullanımını içermektedir. Üretilen sibridler bu nedenle tek bir çekirdeğe sahiptir ancak farklı hücrelerden oluşan harmanlanmış bir sitoplazmaya sahiptir. Koura ve arkadaşları tarafından yürütülen sibrid çalışmaları tüm kanserli

B16 fare melanom hücrelerinin ve çekirdeği çıkarılmış kanserli olmayan sıçan miyoblastlarının füzyonunu içeriyordu (Koura & ark., 1982). Oluşturulan sibiridler, normal hücrelerden gelen sağlıklı mitokondriyi, ancak kanser hücrelerinden gelen hasarlı çekirdeği içeriyordu. Yeniden oluşturulan melezler, ebeveyn hücrelerinkinden farklı, benzersiz bir morfoloji ve hücresel düzenlemeler sergilemiştir. Sulandırılmış klonların ve melezlerin tümünde izolasyonlarından hemen sonra tümör oluşumu azaldığı gözlemlenmiştir, ancak hücrelerin *in vitro* uzun süreli kültivasyonundan sonra bazı klonlarda tümör oluşumu yeniden ortaya çıkmıştır (Koura & ark., 1982). Bu çalışmalar, normal mitokondrinin kanser hücrelerinin malign fenotipini baskılamadaki potansiyel rolünü destekleyen somut kanıtlar sunmaktadır. Cybrid deneylerini destekleyen diğer kanıtlar Israel ve Schaeffer tarafından sağlandı. Normal hücreler içeren sitoplastlardan (çekirdek yok) malign hücrelerden üretilen nükleer/sitoplazmik hibritlerin, enjekte edilen hayvanların %97'sinde tümör ürettiğini göstermişlerdir (Israel & Schaeffer, 1987). Çalışmalarının önemli özelliği, dönüştürülmemiş ve dönüştürülmüş hücrelerin hepsinin ortak nükleer ve sitoplazmik arka plana sahip orijinal klonlanmış progenitor hücreden türetilmiş olmasıdır (Israel & Schaeffer, 1988; Seyfried, 2012). Bu bulgular, normal hücre çekirdeklerinin, tümör hücresi sitoplazmasına yerleştirildiğinde tümör oluşumunu baskılayamadığını göstermiştir. Başka bir deyişle, muhtemelen tümör baskılayıcı genleri içeren normal nükleer gen ekspresyonu, maligniteyi baskılayamamıştır. Alternatif bir görüş ise tümör hücresinin sitoplazmasının, çekirdeği tümör oluşturacak şekilde yeniden programlayabileceğidir. Bu bulgular, hücrelerin tümör oluşumunu belirleyen faktörün çekirdekten ziyade sitoplazma olduğunu gösteren Darlington'un görüşüyle tutarlı görünmektedir (Darlington, 1948). Israel ve Schaeffer, tümör oluşumunun sitoplazmik kontrolünün moleküler temelini belirlemediler, ancak nükleer gen ekspresyonundaki epigenetik değişikliklerin bu fenomenden sorumlu olabileceğini öne sürmüşlerdir (Seyfried, 2012). Bunun gibi birçok nükleer-sitoplazmik transfer çalışması,

kanserin metabolik temeline dair kanıt sağlamaktadır. Aynı zamanda bu çalışmalar, mitokondri ve hücrel metabolizmanın karsinogenezdeki rolünü ve düzensiz metabolizmanın karsinogenezdeki rolünü keşfetme ihtiyacını vurgulamaktadır.

Kanserde Glukoz Metabolizması

Kanser hücreleri, gelişmiş çoğalma durumlarını sürdürmek için yüksek bir makromolekül talebine sahiptir. Bu yüksek enerji durumunda kanser hücreleri, oksijen mevcudiyetine bakılmaksızın laktat üretimi ile ATP üretmek için gelişmiş glikolize güvenmektedir (Martinez-Outschoorn & ark., 2017; Soga, 2013). Warburg etkisi hızla büyüyen tümör hücrelerinin belirgin bir özelliği olarak ortaya konmuştur ve köken dokularına bakılmaksızın çeşitli kanser türlerinde gözlenmiştir (Martinez-Outschoorn & ark., 2017; Soga, 2013). Bu özellik, kanserin kökeni konusundaki, yani kanserin genetik mi yoksa metabolik bir bozukluk mu olduğu konusundaki çatışmaların çoğunu yönlendirmiştir. Glikolize artan bağımlılığın mitokondri fonksiyon bozukluğundan mı kaynaklandığı, yoksa kanser hücrelerinin proliferatif durumunu sağlıklı mitokondri ile sürdürmek için genetik değişiklikler sonrasında mı meydana geldiği sorusunu gündeme getirmektedir (Gyamfi & ark., 2022).

ATP ihtiyaçlarını karşılamak için glikolize güvenmek, glukozun tam oksidasyonu başına 34 molekül ATP üreten OxPhos'a kıyasla yalnızca iki molekül ATP üreten oldukça verimsiz bir süreçtir (Soga, 2013). Hızla çoğalan hücreler çok fazla ATP molekülüne ihtiyaç duyar, dolayısıyla kanserde glikolizin enerji üretimi için kullanılması neden oldukça verimsiz görünmekle birlikte bunun neden kanser hücrelerinin temel bir özelliği olduğu sorusunu gündeme getirmektedir. Kanser hücrelerindeki bu gözlemi açıklamak için Warburg, glikolize artan bağımlılığın kanser hücrelerindeki işlevsiz mitokondriden kaynaklandığını öne sürmüştür (Seyfried, 2015; Seyfried & Shelton, 2010). Son araştırmalar, fonksiyonel mitokondriye sahip kanser hücrelerinde glikolizin arttığına dair kanıtlar sunmaktadır (Kim, 2015; Shiratori & ark., 2019). Bu bulgular, glikolize artan bağımlılığın, örneğin

çeşitli anabolik yollar, riboz-6-fosfat ve kanser hücrelerinin ihtiyaç duyduğu biyomoleküller için temel öncüller olan glikolitik ara maddelerin üretilmesi gibi başka işlevlere de hizmet edebileceğini göstermektedir (Annibaldi & Widmann, 2010). Kanser bir metabolik hastalık olarak kabul edilebilmesi için, hasar görmüş veya yetersiz solunumdan kaynaklanan düzensiz metabolizmanın mevcut olması gerekmektedir. Düzensiz metabolizmanın tüm kanser türlerinin önemli bir özelliği olduğu açıkça ortadadır. Bu nedenle, cevaplanması gereken şey, genetik değişimin kanserde metabolizmanın değişmesine mi yol açtığı, yoksa düzensiz bir metabolizmanın kanserde görülen genetik değişikliğe mi yol açtığıdır (Seyfried & ark., 2020). Metabolik bir hastalık olarak kanser daha sonraki aşamaları destekler; bu nedenle kanser, düzensiz metabolizmadan kaynaklanır. Teori, kanser hücrelerinin metabolik düzensizliğinin, canlı kalmak ve çoğalmak için metabolizmayı düzenleyen genlerin yukarı regülasyonuna veya baskılanmasına yol açtığını öne sürmektedir (Seyfried & ark., 2020).

Glikoliz, tümör büyümesinde önemli rol oynayan glukoz metabolizmasının tek bileşeni değildir. Glikojenin glukoz-1-fosfata (G1P) ve daha sonra glikolitik yola girmek için glukoz-6-fosfata (G6P) dönüştürüldüğü süreç olan glikojenoliz, besin stresi karşısında tümörler için başka bir enerji kaynağı sağlar. Glikojen metabolizması, kanser araştırmacıları tarafından glikolizden çok daha az çalışılmış olmasına rağmen böbrek, meme, mesane, rahim, yumurtalık, deri ve beyin kanserleri de dahil olmak üzere birçok kanser türünde yukarı doğru düzenlenir. Kanser hücrelerinin glikojen içeriğinin replikasyon hızıyla ters orantılı olduğu gösterilmiştir (Rousset & ark., 1981). Klasik olarak histolojide berrak hücrelere sahip olan böbrek hücreli karsinom, yüksek glikojen içeriği nedeniyle bu şekilde ortaya çıkmaktadır (Bose & Le, 2018).

Tümör genetiğindeki ilerlemeler, tümör hücrelerinde glikojen metabolizmasındaki bu değişiklikleri yönlendiren tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin karakterizasyonuna bir kez daha izin vermiştir. Onkogen *Rab25*'in aşırı ekspresyonunun, AKT

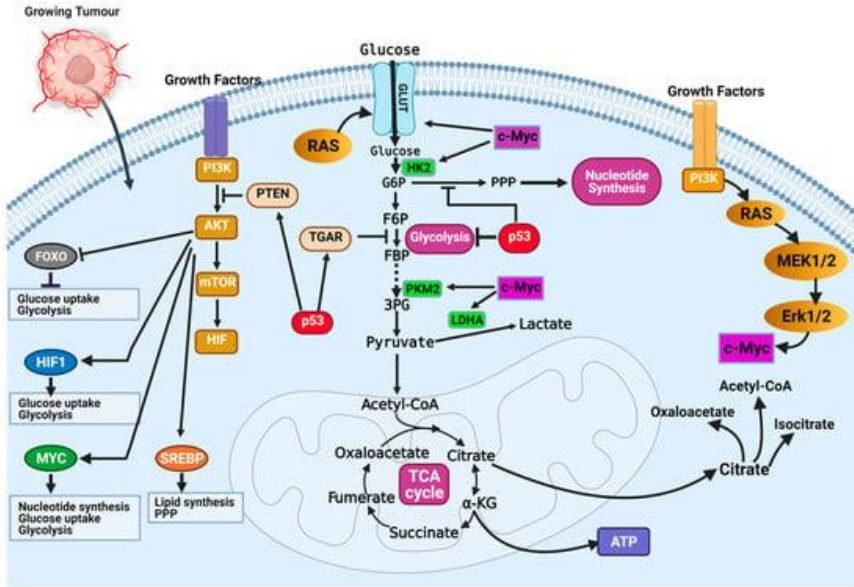
yolu yoluyla hücresel glikojen depolarının arttırılmasında bir sürücü olduğu gösterilmiştir (Cheng & ark., 2012). Mesane kanserinde, glikojen dallanmayı gideren enzim Amylo- α -1,6-glukosidazın (AGL) bir tümör baskılayıcı olduğu tespit edilmiştir. Ek olarak AGL'nin devre dışı bırakılması, anormal glikojen depolarının birikmesine yol açar ve ksenograft modellerinde tümör oluşumunu teşvik eder (Guin & ark., 2014).

Bunu göz önünde bulundurarak, Guo-Min Shen ve meslektaşları 2010 yılında hipoksi ortamında glikojen metabolizması üzerinde çalıştılar. Bir glikojen sentaz olan PPP1R3C'nin HIF-1 α indüksiyonu nedeniyle hipoksiden 24 ve 48 saat sonra meme kanseri hücrelerinde glikojenin biriktiği kaydedildi (Shen & ark., 2010). Daha sonraki çalışmalar glikojen sentezinin hipoksik koşullar altında kanser hücresinin hayatta kalmasını desteklediğini gösterdi (Pelletier & ark., 2012). Hem glikojenoliz hem de glikojen sentezi enzimlerinin, UGP2, PGM, GBE, GYS1 ve PPP1R3C dahil olmak üzere HIF-1 α bağımlılığı olan tümör hücreleri tarafından yukarı doğru düzenlendiği görülmektedir (Zois & ark., 2014). Glikojen sentaz kinaz 2 (GSK2) aktivitesinin baskılanmasına ilişkin *in vivo* çalışmalar, prostat tümörü büyümesinde bir azalma olduğunu göstermiştir (Zhu & ark., 2011). Glikojen metabolizması, kanser hücrelerinin, zayıf anjiyogenez nedeniyle besin eksikliği sırasında bile glikojeni bir enerji kaynağı olarak kullanabildiği göz önüne alındığında, tedavinin önemli bir hedefidir (Ros & Schulze, 2012).

Kanser Hücrelerinde Glukoz Metabolik Yeniden Programlama

Kanserde en düzensiz metabolik yol glukoz metabolizma yoludur (Şekil 1). Glukozun metabolik yeniden programlanması kanser türlerinde meydana gelir; ancak glukoz metabolik yeniden programlamasında yer alan spesifik mekanizmalar kanser türleri arasında ve hatta aynı kökene sahip kanserler arasında farklılık göstermektedir. Glukoz metabolizmasının yeniden programlanmasının merkezinde, glukoz metabolizmasında yer alan

enzimlerin ekspresyonundaki değişiklikler yer almaktadır (Şekil 1) (Seyfried & ark., 2014). Büyüyen bir tümör için oksijen ve besin kaynağı, tümörde oluşan kan damarlarının kıvrımlı yapısından dolayı zorlu bir süreçtir ve sınırlı oksijen kaynağı hipoksik bir ortam oluşturur. Kanser hücreleri daha sonra hipoksik koşullar sırasında genlerin ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörleri olan hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 ve 2'nin (HIF-1 ve HIF-2) ekspresyonunu indükler (Schito & Semenza, 2016; Vaupel, 2004; Wicks & Semenza, 2022). Normoksi altında HIF-1 α , prolil hidroksilaz 2 (PHD2) tarafından oksijene bağımlı hidroksilasyonu ve bunların von Hippel-Lindau tümör baskılayıcı (VHL) tarafından tanınmasını takiben parçalanır (Schito & Semenza, 2016; Vaupel, 2004; Wicks & Semenza, 2022). Hipokside, HIF-1 α 'nın VHL aracılı bozunması meydana gelmez, bu da bunların HIF-1 β ile birikmesine, dimerleşmesine ve çekirdekte lokalize olmasına olanak tanımaktadır. Çekirdekte HIF-1 dimerleri, hedef genlerin hipoksi yanıt elemanı (HRE) dizisine bağlanarak hedef genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir (Schito & Semenza, 2016; Vaupel, 2004; Wicks & Semenza, 2022). Birçok kanserdeki kronik hipoksik ortam, HIF-1'in glikolitik enzimlerin ekspresyonunu düzenlemek için yapısal olarak aktive olduğu anlamına gelmektedir. Artan HIF-1 ekspresyonu, glukoz taşıyıcıları GLUT1 ve GLUT3'ün ekspresyonunu arttırır, glukoz alımını artırır, heksokinaz 2'nin (HK2) fosforile olmasını sağlar ve glukozu glikolitik yola aktarır (Şekil 1) (Schito & Semenza, 2016; Vaupel, 2004; Wicks & Semenza, 2022). Kanserlerin bu gelişmiş glikolitik fenotipi, kanser hücresi göçünü ve istilasını arttırır, anjiyogenezi indükler ve terapötik yanıtı etkilemektedir.



Şekil 1. Kanserde glukoz metabolik yeniden programlamanın mekanizmaları. Hipoksi, kanser hücrelerinde metabolik yeniden programlamayı yönlendirir. HIF transkripsiyon faktörlerinin artan ekspresyonu, kanser hücrelerinin glikolitik fenotipini sürdürmek için onkogenleri (yani Ras, PI3K-Akt ve c-Myc) aktive eder veya tümör baskılayıcıları (p53 ve PTEN) etkisiz hale getirir. Tümör baskılayıcı gen TP53'ün etkisizleştirilmesi kanserlerde yaygın bir özelliktir ve glikolize bağımlılığın artmasına katkıda bulunur. p53'ün etkisizleştirilmesi, glukoz taşıyıcılarının (örneğin, GLUT1 ve GLUT4) baskılanmasını serbest bırakır ve bir glikolitik inhibitör olan TIGAR'ın ekspresyonunu azaltır. Büyüme faktörü reseptörlerinin aktivasyonu, onkogenik PI3K/Akt yolunu aktive eder ve kanser hücrelerinde glukoz metabolik yeniden programlamasına katkıda bulunan aşağı yöndeki hedefleri (FOXO'lar, HIF1a, c-Myc ve SREBP) aktive eder (Gyamfi & ark., 2022).

Onkogenik KRAS, onkogenik BRAF ve aktive PI3K/AKT dahil olmak üzere kanser hücrelerinde yaygın olarak mutasyona uğrayan veya genetik olarak değişen onkoproteinlerin, kanser

hücrelerinde glukoz metabolik yeniden programlanmasına yol açtığı gösterilmiştir (Şekil 1) (Nissim Hay, 2016). PI3K/Akt sinyal yolu, kanserde aktive olan çeşitli tirozin kinaz reseptörleri için bir yakınsama noktasıdır. PI3K/Akt yolu glukoz alımının ana düzenleyicisidir. Aktive edilmiş PI3K/Akt, GLUT1 ekspresyonunu ve bunun hücre yüzeyine translokasyonunu arttırmaktadır (Gyamfi & ark., 2022; Nissim Hay, 2016; Pavlova & Thompson, 2016). Akt ayrıca glukozu fosforile eden ve hücrelerden dışarı akışını önleyen hekzokinazın aktivitesini de güçlendirmektedir. PI3K/Akt yolunun aşağı akışında transkripsiyon faktörü c-Myc bulunmaktadır. c-Myc transkripsiyon faktörü (metabolizmanın ana transkripsiyon düzenleyicisi), insan tümörlerinin ~%70'inde aşırı eksprese edilmektedir. C-Myc, apoptozu, hücre büyümesini ve metabolizmayı düzenleyen genlerin aktivitesini transkripsiyonel olarak düzenleyen bir heterodimer oluşturmak üzere c-Myc ile ilişkili protein X (Max) ile dimerize olur (Gyamfi & ark., 2022; Soga, 2013). c-Myc ekspresyonunun büyüme faktörü uyarımı ile indüklendiği normal hücrelerin aksine, c-Myc ekspresyonu kanser hücrelerinde yapısal olarak aktive edilmektedir (Gyamfi & ark., 2022; Soga, 2013). Bu artan c-Myc ekspresyonu, glukoz taşınmasında (GLUT1) ve laktat akışında (MCT1) yer alan hedef genleri aktive ederek enerji üretimini ve biyomolekül sentezini (hızla çoğalan hücrelerde temel gereksinimler) desteklemektedir (Şekil 1) (Schito & Semenza, 2016; Soga, 2013). Geliştirilmiş glikolitik yollar ve Myc ekspresyonu, diğer metabolik yollarda kullanılan glikolitik ara maddeleri üretmektedir. İlginç bir şekilde HIF proteinleri, kanser hücrelerinin metabolik avantajlarını arttırmak için c-Myc ile de işbirliği yapabilir. Spesifik olarak HIF-2 α , c-Myc-Max kompleksini stabilize eder ve hedef genlerin transkripsiyonel düzenlemelerini güçlendirir (Schito & Semenza, 2016; Soga, 2013). Alternatif olarak normal hücrelerde HIF-1 α , Max'e bağlanarak HIF-2 α 'nın tersi yönde hareket eder ve HIF-1 α , c-Myc'yi etkisiz hale getirir. C-Myc'nin aşırı eksprese edildiği kanserlerde aktivitesi HIF-1 α 'dan etkilenmez. c-Myc'nin artan ekspresyonu, c-Myc-Max heterodimerlerini stabilize

eder ve kanser hücresi metabolizmasını, protein sentezini ve hücre döngüsü ilerlemesini yeniden programlar (Schito & Semenza, 2016).

Transkripsiyon faktörü p53, kanserde anahtar bir molekül olarak kabul edilmiştir (Lane, 1992; Oren, 1992). Bir tümör baskılayıcı olarak kabul edilen p53, en çok DNA hasarı tepkisi ve apoptozdaki işleviyle bilinmektedir. Son zamanlarda p53'ün glikoliz ve oksidatif fosforilasyonun düzenlenmesinde önemli rolleri olduğu rapor edilmiştir (Wang & ark., 2023). Fonksiyonel p53, glukoz taşıyıcılarının (yani, GLUT1 ve GLUT4) ekspresyonunu inhibe ederek ve glikolizde 3-fosfogliseratın 2-fosfogliserata dönüştürülmesinden sorumlu enzim olan fosfogliserat mutaz seviyelerini azaltarak glikolitik hızı azaltmaktadır (Şekil 1) (Itahana & Itahana, 2018). Yabani tip p53, PI3K yolunu inhibe eden tümör baskılayıcı fosfat ve tensin homologunun (PTEN) ekspresyonunu düzenler (Kitagishi & ark., 2014). PI3K'nin inhibisyonu, glikolizin temel itici güçleri olan Akt1 ve HIF proteinlerinin aktivasyonunun azalmasına yol açar (Şekil 1) (Soga, 2013). Kanselerde p53 mutasyonunun yüksek sıklığı, metabolik düzenlemeyi kontrol ettiği ve glikolizin kaybolduğu anlamına gelmektedir. Mutant p53'e sahip kanser hücrelerinde glukoz taşıyıcılarının, glikolitik enzimlerin ekspresyonu ve AKT ve HIF aktivasyonu artmıştır (Gomes & ark., 2018).

Birlikte ele alındığında, bu bulgular, kanserlerin genetik çalışmaları yoluyla tanımlanan çoklu büyüme sinyal düğümlerinin ve anahtar onkogenlerin, kanser hücrelerinin glukoz metabolizmasını düzenlemeye yönelik hücrel tepkilerini uzaktan kolaylaştırdığını ortaya koyuyor. Kanser hücrelerinde meydana gelen glukoz metabolik yeniden programlaması, GLUT1 ve diğer glukoz taşıyıcılarının plazma zarına artan ekspresyonunu ve translokasyonunu ve glikolizde yer alan enzimlerin artan ekspresyonunu içerir (Ediriweera & Jayasena, 2023; Nissim Hay, 2016). Bu metabolik yeniden programlama, onkoproteinleri ve onkogenik transkripsiyon faktörlerini içeren çoklu mekanizmalar tarafından yönetilmektedir.

Kanser Tedavi Hedefi: Glukoz Metabolizması

Enzimler ilgi çekici moleküler hedefler olduğundan, kanser tedavisi için metabolik yolların hedeflenmesi ilk bakışta cazip görünmektedir. Bununla birlikte, kanser tedavisine yönelik çekici bir aday olabilmek için, belirli bir enzimin aktivitesi açısından kanser hücreleri ile normal çoğalan hücreler arasında önemli bir fark olması gerekir. Belirli kanser türlerinde aşırı eksprese edilen birkaç potansiyel aday arasında GLUT1, heksokinaz-2 (HK2), fosfoglisarat dehidrojenaz (PHGDH), fosfofruktokinaz (PFK) ve laktat dehidrojenaz A (LDH-A) bulunur.

Daha önce belirtildiği gibi, glukoz taşıyıcıları (GLUT1-4), tümör hücrelerinde Myc ve HIF-1a tarafından yukarı doğru düzenlenmektedir. GLUT1'in küçük moleküllü inhibitörleriyle yapılan önceki denemelerde, renal hücreli karsinom hücre dizisinde (Chan & ark., 2011) ve hepatoselüler karsinom hücre dizisinde (Amann & Hellerbrand, 2009) *in vitro* tümör öldürücü etkiler gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, GLUT1 normal hücrelerde de yaygın bir glukoz taşıyıcısıdır ve bu muhtemelen klinik başarıyı engelleyecektir. Homozigot Glut1 silinmesi farelerde embriyonik olarak öldürücüdür ve heterozigot silinmesi, motor aktivitede bozulmaya ve nöbetlere neden olmuştur (Sborov & ark., 2015). Silibinin adı verilen bir GLUT1 inhibitörü, faz I klinik denemesinde prostata özgü antijende herhangi bir azalma göstermede başarısız oldu (Sborov & ark., 2015).

Heksokinaz, glikolizin ilk adımında glukozu glukoz-6-fosfata fosforile eder. HK2 çoğunlukla kanser hücrelerinde eksprese edilir ve tümörlerde işlev gören birincil heksokinazdır, dolayısıyla bir diğer potansiyel terapötik hedeftir. HK2'nin sistematik olarak silindiği deneyler farelerde iyi tolere edildiğini göstermiştir (Heikkinen & ark., 1999). Glukozun fosforilasyonunu engellemek amacıyla G6P izomerazını rekabetçi bir şekilde inhibe eden bir glukoz analogu olan 2-deoksiglukozun, glioblastoma multiforme'de iyi toleransla radyasyon tedavisi ile kombinasyon halinde bir faz I denemesi gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte, lonidamin adı

verilen bir HK inhibitörü, iki faz III randomize çalışmada herhangi bir fayda göstermede başarısız olmuştur (Sborov & ark., 2015).

PHGDH, 3-fosfoglisaratın serine dönüşümünde hız sınırlayıcı bir adım olan 3-fosfoglisaratı 3-fosfohidroksipiruvata dönüştürür. Son zamanlarda yapılan iki çalışma, insan melanomu ve meme kanseri alt gruplarının yüksek düzeyde PHGDH'ye sahip olduğunu ve bu kanser hücrelerinin büyüme için bu enzimlere bağımlı olduğunu bildirmişlerdir (Locasale & ark., 2011; Possemato & ark., 2011).

Fosfofruktokinaz (PFK), glikolizdeki ikinci adımı, yani fruktoz-6-fosfatın fruktoz-1,6-bisfosfata (F1,6-BP) dönüştürülmesini katalize eden enzimdir. Normal hücrelerde glikoliz için çok önemli olduğundan PFK'yi doğrudan inhibe etmek mümkün olmasa da dolaylı olarak hedeflemek mümkün olabilir. PFK, fruktoz-2,6-bisfosfonat (F2,6-BP) tarafından allosterik olarak güçlü bir şekilde aktive edilir. F2,6-BP, HIF-la'nın hedefi olan başka bir protein olan PFKFB3 tarafından aktive edilir. İn vitro ve *in vivo* çalışmalarda, 3PO adı verilen küçük bir molekül PFKFB3 inhibitörü ile glikolizin zayıflatılması sağlanmıştır (Clem & ark., 2008). PFKFB3 inhibitörlerinin aynı zamanda tümör anjiyogenezini azalttığı da gösterilmiştir (Schoors & ark., 2014).

NAD⁺ ile laktat ve NADH ile piruvat arasındaki redoks-bağlı dönüşüme karşılıklı olarak aracılık eden laktat dehidrojenaz A (LDHA) potansiyel terapötik hedef olmuştur (Doherty & Cleveland, 2013; Wu & ark., 2017). LDHA'nın yüksek ekspresyon seviyeleri, skuamöz baş ve boyun kanseri, kolorektal kanser ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri dahil olmak üzere birçok tümör tipinin ayırt edici özelliğidir (Doherty & Cleveland, 2013; Koukourakis & ark., 2005; Koukourakis & ark., 2003; Koukourakis & ark., 2009). FX-11 adı verilen küçük bir moleküler LDHA inhibitörünün, NADH/NAD⁺ oranını bozarak, sadece *in vitro* çalışmalarda değil aynı zamanda pankreas ve lenfoma ksenograftlarında da tümör hücrelerinde reaktif oksijen türlerini arttırdığı ve ardından hücre ölümü sağladığı gösterilmiştir (Le & ark., 2010). Gossypol,

galloflavin ve N-hidroksiindol bazlı inhibitörler gibi diğer bazı LDHA inhibitörleri klinik öncesi ortamlarda test edilmiştir (Granchi & ark., 2011; Le & ark., 2010; Manerba & ark., 2012; Vander Jagt & ark., 2000; Yu & ark., 2001). Bunlar arasında, LDH'nin seçici olmayan bir inhibitörü olan gossipol (AT-101), metastatik kolorektal kanseri (NCT00540722) hedef alan bir faz I klinik denemesinde test edilmiştir. LDH inhibitörlerinin geliştirilmesine yönelik aktif araştırmalara rağmen, gossipol, NADH'ye bağımlı enzimlerin (GAPDH) inhibisyonu gibi hedef dışı etkiler gösterdiğinden, oldukça seçici ve etkili LDH inhibitörlerine hala klinik bir ihtiyaç vardır (Vander Jagt & ark., 2000). Laktat metabolizmasını hedef alan bileşikler henüz onaylanmamış olsa da, LDH'yi hedefleyen stratejilerin kanser tedavisi için umut verici yaklaşımlar olduğu açıktır.

Pyruvate kinase isozymes M2 (PKM2) ekspresyonunun kanser hücreleri için proliferatif bir avantaj sağladığının bulunması, PKM2'nin kanser tedavisi için çekici bir hedef olabileceği ihtimalini artırmıştır. Tümörler normal kontrol dokularından daha yüksek seviyelerde PKM2 eksprese eder (Bluemlein & ark., 2011); ancak PKM2'nin inhibe edilmesi aynı zamanda glikolitik ara maddelerin birikmesine ve biyosentetik yolları beslemesine de izin vererek tümörün ilerlemesine neden olabilir (Hamanaka & Chandel, 2012). Dikkat çekici bir şekilde, kanser hücrelerinde PKM2'nin inhibe edilmesinin veya aktive edilmesinin tümör büyümesini azalttığını gösteren veriler mevcuttur (Anastasiou & ark., 2011; Goldberg & Sharp, 2012). PKM2 spesifik olarak sistein 358 üzerinde oksitlenir, aktivitesini inhibe eder ve glikolitik ara maddelerin pentoz fosfat yoluna (PPP) yönlendirilmesini teşvik eder, NADPH üretir ve redoks dengesini destekler. Oksitlenemeyen bir PKM2 mutantının ekspresyonu, PPP boyunca akışı azalttığı, oksidatif stresi arttırdığı ve tümör büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Anastasiou & ark., 2011). Bu sonuçlar, PKM2 aktivatörlerinin, özellikle oksidatif stresi arttırdığı bilinen radyasyon veya kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanıldığında geçerli kanser terapötikleri olabileceğini göstermektedir. Diğer yandan Goldberg ve Sharp, PKM2

aktivitesinin inhibisyonunun hücre kültüründe apoptozu artırdığını ve ayrıca tümör hücresi büyümesini de inhibe edebildiğini göstermişlerdir (Goldberg & Sharp, 2012).

Glikojen metabolizmasını veya glukoneogenezi hedef alan çok daha az sayıda tedavi geliştirilmiştir. Lee ve meslektaşları CP-320626 adı verilen bir bileşik ile pankreatik hücre hattında glikojen fosforilazı inhibe ederek normal insan fibroblastları üzerinde hiçbir etki olmaksızın tümör hücresi ölümüne yol açtığını rapor etmişlerdir (Lee & ark., 2004). Başka bir glikojen fosforilaz inhibitörü olan flavopiridol, prostat kanseri, renal hücreli karsinom ve kolorektal karsinom ile yapılan klinik çalışmalarda güvenli ve orta düzeyde etkinliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Aklilu & ark., 2003; Liu & ark., 2004; Van Veldhuizen & ark., 2005). Ancak flavopiridol aynı zamanda sikline bağımlı bir kinaz inhibitörü olduğundan anti tümör etkilerinin tamamen glikojen fosforilaz inhibisyonundan kaynaklanıp kaynaklanmadığı belirsizdir (Bose & Le, 2018).

Günümüzde metabolik kanser tedavilerinde çeşitli zorluklar bulunmaktadır. İlk olarak, metabolik fenotipler muhtemelen köken dokuya, tümör mikro ortamına, primer ve metastatik tümörlere ve mutasyon farklılıklarına göre değişmektedir. İkinci olarak *in vivo* fare çalışmalarının klinik deneylere dönüştürülmesinde sınırlamalar mevcuttur. Son olarak, tümörlerin yeni enerji kaynaklarına adaptasyonu ile metabolik inhibitörlerin üstesinden gelme potansiyellerinin olmasıdır. Kanser metabolizmasına olan ilginin artmasıyla birlikte, metabolik inhibitörlerin gelişimi de artmaya devam edecektir ve etkinliği arttırmak için bu tedavileri diğer tedavi yöntemleriyle birleştirmek en etkili yöntem olabilir.

KAYNAKÇA

Aklilu, M., Kindler, H. L., Donehower, R. C., Mani, S., & Vokes, E. E. (2003). Phase II study of flavopiridol in patients with advanced colorectal cancer. *Ann Oncol*, 14(8), 1270-1273. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdg343>

Amann, T., & Hellerbrand, C. (2009). GLUT1 as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Expert Opin Ther Targets*, 13(12), 1411-1427. <https://doi.org/10.1517/14728220903307509>

Anastasiou, D., Poulogiannis, G., Asara, J. M., Boxer, M. B., Jiang, J. K., Shen, M., Bellinger, G., Sasaki, A. T., Locasale, J. W., Auld, D. S., Thomas, C. J., Vander Heiden, M. G., & Cantley, L. C. (2011). Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses. *Science*, 334(6060), 1278-1283. <https://doi.org/10.1126/science.1211485>

Annibaldi, A., & Widmann, C. (2010). Glucose metabolism in cancer cells. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 13(4), 466-470. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32833a5577>

Bluemlein, K., Grüning, N. M., Feichtinger, R. G., Lehrach, H., Kofler, B., & Ralser, M. (2011). No evidence for a shift in pyruvate kinase PKM1 to PKM2 expression during tumorigenesis. *Oncotarget*, 2(5), 393-400. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.278>

Bomanji, J., Costa, D., & Ell, P. (2001). Clinical role of positron emission tomography in oncology. *The lancet oncology*, 2(3), 157-164.

Bose, S., & Le, A. (2018). Glucose Metabolism in Cancer. In A. Le (Ed.), *The Heterogeneity of Cancer Metabolism* (pp. 3-12). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77736-8_1

Castell, F., & Cook, G. (2008). Quantitative techniques in 18FDG PET scanning in oncology. *British Journal of Cancer*, 98(10), 1597-1601.

Chan, D. A., Sutphin, P. D., Nguyen, P., Turcotte, S., Lai, E. W., Banh, A., Reynolds, G. E., Chi, J. T., Wu, J., Solow-Cordero, D. E., Bonnet, M., Flanagan, J. U., Bouley, D. M., Graves, E. E., Denny, W. A., Hay, M. P., & Giaccia, A. J. (2011). Targeting GLUT1 and the Warburg effect in renal cell carcinoma by chemical synthetic lethality. *Sci Transl Med*, 3(94), 94ra70. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002394>

Cheng, K. W., Agarwal, R., Mitra, S., Lee, J. S., Carey, M., Gray, J. W., & Mills, G. B. (2012). Rab25 increases cellular ATP and glycogen stores protecting cancer cells from bioenergetic stress. *EMBO Mol Med*, 4(2), 125-141. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100193>

Clem, B., Telang, S., Clem, A., Yalcin, A., Meier, J., Simmons, A., Rasku, M. A., Arumugam, S., Dean, W. L., Eaton, J., Lane, A., Trent, J. O., & Chesney, J. (2008). Small-molecule inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase activity suppresses glycolytic flux and tumor growth. *Mol Cancer Ther*, 7(1), 110-120. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.Mct-07-0482>

Darlington, C. (1948). The plasmagene theory of the origin of cancer. *British Journal of Cancer*, 2(2), 118.

Doherty, J. R., & Cleveland, J. L. (2013). Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *J Clin Invest*, 123(9), 3685-3692. <https://doi.org/10.1172/jci69741>

Ediriweera, M. K., & Jayasena, S. (2023). The Role of Reprogrammed Glucose Metabolism in Cancer. *Metabolites*, 13(3), 345.

Gatenby, R. A., Smallbone, K., Maini, P. K., Rose, F., Averill, J., Nagle, R. B., Worrall, L., & Gillies, R. J. (2007). Cellular adaptations to hypoxia and acidosis during somatic evolution of

breast cancer. *Br J Cancer*, 97(5), 646-653.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603922>

Goldberg, M. S., & Sharp, P. A. (2012). Pyruvate kinase M2-specific siRNA induces apoptosis and tumor regression. *J Exp Med*, 209(2), 217-224. <https://doi.org/10.1084/jem.20111487>

Gomes, A. S., Ramos, H., Soares, J., & Saraiva, L. (2018). p53 and glucose metabolism: an orchestra to be directed in cancer therapy. *Pharmacological research*, 131, 75-86.

Granchi, C., Roy, S., Giacomelli, C., Macchia, M., Tuccinardi, T., Martinelli, A., Lanza, M., Betti, L., Giannaccini, G., Lucacchini, A., Funel, N., León, L. G., Giovannetti, E., Peters, G. J., Palchaudhuri, R., Calvaresi, E. C., Hergenrother, P. J., & Minutolo, F. (2011). Discovery of N-hydroxyindole-based inhibitors of human lactate dehydrogenase isoform A (LDH-A) as starvation agents against cancer cells. *J Med Chem*, 54(6), 1599-1612. <https://doi.org/10.1021/jm101007q>

Guin, S., Pollard, C., Ru, Y., Ritterson Lew, C., Duex, J. E., Dancik, G., Owens, C., Spencer, A., Knight, S., Holemon, H., Gupta, S., Hansel, D., Hellerstein, M., Lorkiewicz, P., Lane, A. N., Fan, T. W., & Theodorescu, D. (2014). Role in tumor growth of a glycogen debranching enzyme lost in glycogen storage disease. *J Natl Cancer Inst*, 106(5). <https://doi.org/10.1093/jnci/dju062>

Gyamfi, J., Kim, J., & Choi, J. (2022). Cancer as a Metabolic Disorder. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1155. <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/3/1155>

Hamanaka, R. B., & Chandel, N. S. (2012). Targeting glucose metabolism for cancer therapy. *J Exp Med*, 209(2), 211-215. <https://doi.org/10.1084/jem.20120162>

Hay, N. (2016). Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nature Reviews Cancer*, 16(10), 635-649.

Hay, N. (2016). Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nat Rev Cancer*, 16(10), 635-649. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.77>

Heikkinen, S., Pietilä, M., Halmekytö, M., Suppola, S., Pirinen, E., Deeb, S. S., Jänne, J., & Laakso, M. (1999). Hexokinase II-deficient mice. Prenatal death of homozygotes without disturbances in glucose tolerance in heterozygotes. *J Biol Chem*, 274(32), 22517-22523. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.32.22517>

Hensley, C. T., Faubert, B., Yuan, Q., Lev-Cohain, N., Jin, E., Kim, J., Jiang, L., Ko, B., Skelton, R., & Loudat, L. (2016). Metabolic heterogeneity in human lung tumors. *Cell*, 164(4), 681-694.

Israel, B. A., & Schaeffer, W. I. (1987). Cytoplasmic suppression of malignancy. *In vitro cellular & developmental biology*, 23(9), 627-632.

Israel, B. A., & Schaeffer, W. I. (1988). Cytoplasmic mediation of malignancy. *In vitro cellular & developmental biology*, 24(5), 487-490.

Itahana, Y., & Itahana, K. (2018). Emerging roles of p53 family members in glucose metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 776.

Ju, Y. S., Alexandrov, L. B., Gerstung, M., Martincorena, I., Nik-Zainal, S., Ramakrishna, M., Davies, H. R., Papaemmanuil, E., Gundem, G., & Shlien, A. (2014). Origins and functional consequences of somatic mitochondrial DNA mutations in human cancer. *elife*, 3, e02935.

Kim, A. (2015). Mitochondria in cancer energy metabolism: culprits or bystanders? *Toxicological research*, 31, 323-330.

Kitagishi, Y., Matsuda, S., Minami, A., Ono, Y., Nakanishi, A., & Ogura, Y. (2014). Regulation in cell cycle via p53 and PTEN tumor suppressors. *Cancer Stud Mol Med Open J*, 1(1), 1-7.

Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Simopoulos, C., Polychronidis, A., & Sivridis, E. (2005). Lactate dehydrogenase 5 (LDH5) relates to up-regulated hypoxia inducible factor pathway and metastasis in colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis*, 22(1), 25-30. <https://doi.org/10.1007/s10585-005-2343-7>

Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Bougioukas, G., Didilis, V., Gatter, K. C., & Harris, A. L. (2003). Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *Br J Cancer*, 89(5), 877-885. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601205>

Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Winter, S., Leek, R., Sivridis, E., & Harris, A. L. (2009). Lactate dehydrogenase 5 expression in squamous cell head and neck cancer relates to prognosis following radical or postoperative radiotherapy. *Oncology*, 77(5), 285-292. <https://doi.org/10.1159/000259260>

Koura, M., Isaka, H., Yoshida, M., Tosu, M., & Sekiguchi, T. (1982). Suppression of tumorigenicity in interspecific reconstituted cells and cybrids. *Gann= Gan*, 73(4), 574-580.

Lane, D. P. (1992). p53, guardian of the genome. *Nature*, 358(6381), 15-16.

Le, A., Cooper, C. R., Gouw, A. M., Dinavahi, R., Maitra, A., Deck, L. M., Royer, R. E., Vander Jagt, D. L., Semenza, G. L., & Dang, C. V. (2010). Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(5), 2037-2042. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914433107>

Lee, W. N., Guo, P., Lim, S., Bassilian, S., Lee, S. T., Boren, J., Cascante, M., Go, V. L., & Boros, L. G. (2004). Metabolic sensitivity of pancreatic tumour cell apoptosis to glycogen phosphorylase inhibitor treatment. *Br J Cancer*, 91(12), 2094-2100. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602243>

Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? *Trends in biochemical sciences*, 41(3), 211-218.

Liotta, L. A., & Kohn, E. C. (2001). The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*, 411(6835), 375-379. <https://doi.org/10.1038/35077241>

Liu, G., Gandara, D. R., Lara, P. N., Jr., Raghavan, D., Doroshow, J. H., Twardowski, P., Kantoff, P., Oh, W., Kim, K., & Wilding, G. (2004). A Phase II trial of flavopiridol (NSC #649890) in patients with previously untreated metastatic androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 10(3), 924-928. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-03-0050>

Liu, Y., Zhang, H., Dove, W. F., Wang, Z., Zhu, Z., Pickhardt, P. J., Reichelderfer, M., & Li, L. (2023). Quantification of serum metabolites in early colorectal adenomas using isobaric labeling mass spectrometry. *Journal of proteome research*, 22(5), 1483-1491.

Locasale, J. W., Grassian, A. R., Melman, T., Lyssiotis, C. A., Mattaini, K. R., Bass, A. J., Heffron, G., Metallo, C. M., Muranen, T., Sharfi, H., Sasaki, A. T., Anastasiou, D., Mullarky, E., Vokes, N. I., Sasaki, M., Beroukhi, R., Stephanopoulos, G., Ligon, A. H., Meyerson, M., . . . Vander Heiden, M. G. (2011). Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat Genet*, 43(9), 869-874. <https://doi.org/10.1038/ng.890>

Maher, E. A., Marin-Valencia, I., Bachoo, R. M., Mashimo, T., Raisanen, J., Hatanpaa, K. J., Jindal, A., Jeffrey, F. M., Choi, C., & Madden, C. (2012). Metabolism of [U-13C] glucose in human brain tumors *in vivo*. *NMR in biomedicine*, 25(11), 1234-1244.

Manerba, M., Vettraino, M., Fiume, L., Di Stefano, G., Sartini, A., Giacomini, E., Buonfiglio, R., Roberti, M., & Recanatini, M. (2012). Galloflavin (CAS 568-80-9): a novel inhibitor of lactate

dehydrogenase. *ChemMedChem*, 7(2), 311-317.
<https://doi.org/10.1002/cmdc.201100471>

Martinez-Outschoorn, U. E., Peiris-Pagés, M., Pestell, R. G., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2017). Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nature reviews Clinical oncology*, 14(1), 11-31.

Navarro, P., Bueno, M. J., Zagorac, I., Mondejar, T., Sanchez, J., Mouron, S., Munoz, J., Gomez-Lopez, G., Jimenez-Renard, V., & Mulero, F. (2016). Targeting tumor mitochondrial metabolism overcomes resistance to antiangiogenics. *Cell reports*, 15(12), 2705-2718.

Oren, M. (1992). p53: the ultimate tumor suppressor gene? *The FASEB journal*, 6(13), 3169-3176.

Paul, S., Ghosh, S., & Kumar, S. (2022). Tumor glycolysis, an essential sweet tooth of tumor cells. *Seminars in Cancer Biology*, 86, 1216-1230.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.09.007>

Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2016). The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell metabolism*, 23(1), 27-47.

Pelletier, J., Bellot, G., Gounon, P., Lacas-Gervais, S., Pouysségur, J., & Mazure, N. M. (2012). Glycogen Synthesis is Induced in Hypoxia by the Hypoxia-Inducible Factor and Promotes Cancer Cell Survival. *Front Oncol*, 2, 18.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00018>

Perazzoli, G., García-Valdeavero, O. M., Peña, M., Prados, J., Melguizo, C., & Jiménez-Luna, C. (2023). Evaluating metabolite-based biomarkers for early diagnosis of pancreatic cancer: a systematic review. *Metabolites*, 13(7), 872.

Possemato, R., Marks, K. M., Shaul, Y. D., Pacold, M. E., Kim, D., Birsoy, K., Sethumadhavan, S., Woo, H. K., Jang, H. G., Jha, A. K., Chen, W. W., Barrett, F. G., Stransky, N., Tsun, Z. Y., Cowley, G. S., Barretina, J., Kalaany, N. Y., Hsu, P. P., Ottina, K., . . . Sabatini, D. M. (2011). Functional genomics reveal that the serine

synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature*, 476(7360), 346-350. <https://doi.org/10.1038/nature10350>

Ros, S., & Schulze, A. (2012). Linking glycogen and senescence in cancer cells. *Cell Metab*, 16(6), 687-688. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.11.010>

Roth, K. G., Mambetsariev, I., Kulkarni, P., & Salgia, R. (2020). The mitochondrion as an emerging therapeutic target in cancer. *Trends in molecular medicine*, 26(1), 119-134.

Rousset, M., Zweibaum, A., & Fogh, J. (1981). Presence of glycogen and growth-related variations in 58 cultured human tumor cell lines of various tissue origins. *Cancer Res*, 41(3), 1165-1170.

Sborov, D. W., Haverkos, B. M., & Harris, P. J. (2015). Investigational cancer drugs targeting cell metabolism in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs*, 24(1), 79-94. <https://doi.org/10.1517/13543784.2015.960077>

Schito, L., & Semenza, G. L. (2016). Hypoxia-inducible factors: master regulators of cancer progression. *Trends in cancer*, 2(12), 758-770.

Schoors, S., De Bock, K., Cantelmo, A. R., Georgiadou, M., Ghesquière, B., Cauwenberghs, S., Kuchnio, A., Wong, B. W., Quaegebeur, A., Goveia, J., Bifari, F., Wang, X., Blanco, R., Tembuyser, B., Cornelissen, I., Bouché, A., Vinckier, S., Diaz-Moralli, S., Gerhardt, H., . . . Carmeliet, P. (2014). Partial and transient reduction of glycolysis by PFKFB3 blockade reduces pathological angiogenesis. *Cell Metab*, 19(1), 37-48. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.008>

Seyfried, T. (2012). *Cancer as a metabolic disease: on the origin, management, and prevention of cancer*. John Wiley & Sons.

Seyfried, T. N. (2015). Cancer as a mitochondrial metabolic disease. *Frontiers in cell and developmental biology*, 3, 43.

Seyfried, T. N., Arismendi-Morillo, G., Mukherjee, P., & Chinopoulos, C. (2020). On the origin of ATP synthesis in cancer. *Iscience*, 23(11).

Seyfried, T. N., Flores, R. E., Poff, A. M., & D'Agostino, D. P. (2014). Cancer as a metabolic disease: implications for novel therapeutics. *Carcinogenesis*, 35(3), 515-527.

Seyfried, T. N., & Shelton, L. M. (2010). Cancer as a metabolic disease. *Nutrition & metabolism*, 7, 1-22.

Shen, G. M., Zhang, F. L., Liu, X. L., & Zhang, J. W. (2010). Hypoxia-inducible factor 1-mediated regulation of PPP1R3C promotes glycogen accumulation in human MCF-7 cells under hypoxia. *FEBS Lett*, 584(20), 4366-4372. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.09.040>

Shiratori, R., Furuichi, K., Yamaguchi, M., Miyazaki, N., Aoki, H., Chibana, H., Ito, K., & Aoki, S. (2019). Glycolytic suppression dramatically changes the intracellular metabolic profile of multiple cancer cell lines in a mitochondrial metabolism-dependent manner. *Scientific reports*, 9(1), 18699.

Soga, T. (2013). Cancer metabolism: key players in metabolic reprogramming. *Cancer science*, 104(3), 275-281.

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 Cancer J Clin*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Urayama, S. (2015). Pancreatic cancer early detection: expanding higher-risk group with clinical and metabolomics parameters. *World journal of gastroenterology: WJG*, 21(6), 1707.

Van Veldhuizen, P. J., Faulkner, J. R., Lara, P. N., Jr., Gumerlock, P. H., Goodwin, J. W., Dakhil, S. R., Gross, H. M., Flanigan, R. C., & Crawford, E. D. (2005). A phase II study of flavopiridol in patients with advanced renal cell carcinoma: results

of Southwest Oncology Group Trial 0109. *Cancer Chemother Pharmacol*, 56(1), 39-45. <https://doi.org/10.1007/s00280-004-0969-9>

Vander Jagt, D. L., Deck, L. M., & Royer, R. E. (2000). Gossypol: prototype of inhibitors targeted to dinucleotide folds. *Curr Med Chem*, 7(4), 479-498. <https://doi.org/10.2174/0929867003375119>

Vaupel, P. (2004). The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *The oncologist*, 9(S5), 10-17.

Wang, H., Guo, M., Wei, H., & Chen, Y. (2023). Targeting p53 pathways: mechanisms, structures, and advances in therapy. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 92.

Warburg, O. (1925). The metabolism of carcinoma cells. *The Journal of Cancer Research*, 9(1), 148-163.

Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191), 309-314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>

Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1926). Ueber den stoffwechsel von tumoren im körper. *Klinische Wochenschrift*, 5(19), 829-832.

Weinhouse, S. (1951). Studies on the fate of isotopically labeled metabolites in the oxidative metabolism of tumors. *Cancer Res*, 11(8), 585-591.

Wicks, E. E., & Semenza, G. L. (2022). Hypoxia-inducible factors: cancer progression and clinical translation. *The Journal of clinical investigation*, 132(11).

Wishart, D. S. (2015). Is cancer a genetic disease or a metabolic disease? *EBioMedicine*, 2(6), 478-479.

Wu, S., Chen, W., Shen, L., Xu, L., Zhu, A., & Huang, Y. (2017). Risk factors of post-operative severe hyperlactatemia and lactic acidosis following laparoscopic resection for

pheochromocytoma. *Sci Rep*, 7(1), 403.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-00467-3>

Yu, Y., Deck, J. A., Hunsaker, L. A., Deck, L. M., Royer, R. E., Goldberg, E., & Vander Jagt, D. L. (2001). Selective active site inhibitors of human lactate dehydrogenases A4, B4, and C4. *Biochem Pharmacol*, 62(1), 81-89. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(01\)00636-0](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(01)00636-0)

Zhu, Q., Yang, J., Han, S., Liu, J., Holzbeierlein, J., Thrasher, J. B., & Li, B. (2011). Suppression of glycogen synthase kinase 3 activity reduces tumor growth of prostate cancer *in vivo*. *Prostate*, 71(8), 835-845. <https://doi.org/10.1002/pros.21300>

Zois, C. E., Favaro, E., & Harris, A. L. (2014). Glycogen metabolism in cancer. *Biochem Pharmacol*, 92(1), 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.09.001>

BÖLÜM IV

Pankreas Kanserinin Progresyonunda Tümör Mikroçevrenin Rolü

Demet KAÇAROĞLU¹

Giriş

Pankreas kanseri, endüstriyel ülkelerde kanserle ilişkili ölümlerde yedinci sıradadır ve 2030 yılına kadar akciğer kanserinden sonra dünyada en ölümcül kanser türü olacağı tahmin edilmektedir (Sunami ve ark., 2020). Klasik olarak uygulanan kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi gibi tedaviler yeterli olmadığı için sağ kalım oranı oldukça düşüktür (Carr ve Fernandez-Zapico, 2016). Bu tedavilerin başarısız olmasının asıl nedeni kullanılan terapötik ajanın pankreas kanserinde oluşan yoğun desmoplastik mikroçevreden dolayı hedef hücrelere ulaşamamasıdır (Feig ve ark., 2012). Tümör hücreleriyle sürekli etkileşim halinde olan ekstrasellüler matriks ve stromal hücrelerin oluşturduğu tümör mikroçevresinin; tümör gelişimi, invazyon, metastaz, kemoresistans,

¹ Arş.Gör.Dr., Lokman Hekim Üniversitesi, Tıp Fakültesi, demet.kacaroglu@lokmanhekim.edu.tr

apoptozis ve immün sistemin baskılanması süreçlerini aktif olarak etkilediği bilinmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Normal şartlarda stroma antitümörojenik özelliğe sahiptir fakat stromayı oluşturan hücreler çeşitli uyaranlarla transforme olduklarında tümör gelişimini desteklemeye başlamaktadır. Bu koşullar altında stromal hücreler, tümör hücreleriyle birlikte değişerek; çeşitli sitokinleri, kemokinleri, büyüme faktörlerini ve proteazları anormal düzeyde sentezleyecek şekilde farklılaşırlar (Junttila ve De Sauvage, 2013).

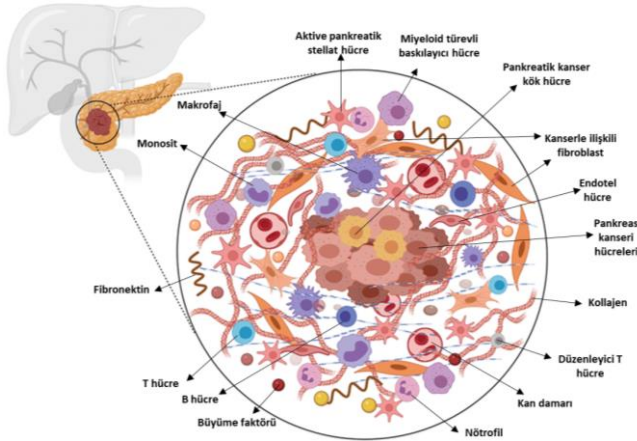
Pankreas kanseri mikroçevresi; kanser hücreleri, stromal hücreler ve hücre dışı bileşenlerden oluşur. Hücresel bileşenler; MKHler, fibroblastlar, pankreatik yıldızsı hücre(PSC)ler, kanserle ilişkili fibroblast(CAF)'lar, düzenleyici T hücre(Treg)leri, miyeloid türevli baskılayıcı hücre(MDSC)ler ve tümörle ilişkili makrofajlar (TAM)dır. CAFlar, endotelial hücreler, MKHler , PSCler ve immün sistem hücrelerinin hepsi stromal hücreleri oluşturur (Baştopcu, 2022). Bu hücreler ve kanser hücreleri, mikroçevreyi korumak için ekstrasellüler matriks, MMPler, büyüme faktörleri ve TGF- β gibi hücre dışı bileşenleri salgılar. Hücrelerin etrafında yüksek oranda ekstrasellüler matriks proteinleri olduğu için yüksek interstisiyel sıvı basıncına sahip ve fiziksel olarak sert bir tümördür (Hessmann ve ark., 2020). Hücre dışı bileşenler ise ekstrasellüler matriks (ECM) ve sitokinler, büyüme faktörleri, DNA ve küçük RNA'lardan oluşmaktadır. Bu stroma, tümör büyümesini, vaskülarizasyonunu, ilaç yanıtını, bağışıklık yanıtlarını ve metastazı düzenleyen çok önemli dinamik bir yapıdır. Pankreas kanserinde oluşan yoğun desmoplastik mikroçevreyi daha derin anlamak ve manipüle edebilmek için mikroçevre elemanları'nın davranışlarının aydınlatılması çok önemlidir.

Bu kitap bölümünde pankreas kanserinin en yaygın türü olan Pankreatik Adenoduktal Karsinoma (PDAC)'nın mikroçevresinde bulunan hücresel ve hücresel olmayan yapılar açıklanmıştır. Hedefli kanser terapilerinde önemli bir potansiyel taşıyan mikroçevre hedefli terapötik yaklaşımların geliştirilebilmesi için yüksek önem taşımaktadır. Bu alanda çalışan moleküler ve kanser biyologlarına araştırma süreçlerinde faydalı olması beklenmektedir.

Pankreatik Tümör Mikroçevresi

Pankreatik duktal adenokarsinom stroması zengin tümörlerdendir. Desmoplastik stroma, tümör kütesinin yaklaşık %50-90 oluşturmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar mikroçevrenin, malign transformasyon sürecinde ve progresyon mekanizmasında büyük rol oynadığı anlaşılmıştır. Stromadaki yüksek matriks düzeyi kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Protoonkogenlerdeki ve tümör supresör genlerdeki mutasyonlar da hem tümör epitelinde hem de stromal hücrelerde gösterilebilmiştir. Normal pankreas stroması tümör gelişimini engeller veya geciktirirken, anormal stromal komponentler tümör gelişiminde rol oynamaktadır (Feig ve ark., 2012).

Pankreatik duktal adenokarsinom stroması selüler ve aselüler komponentlerden oluşan heterojen bir ortamdır. Bu komponentler fibroblastlar, miyofibroblastlar, PSCLer, düz kas hücreleri, adipositler, makrofajlar ve diğer inflamatuvar hücreler, kan ve lenfatik damarlar, ECM, sitokinler ve büyüme faktörleridir (Şekil 1). Kanser hücreleri ve stromal hücreler arasında çeşitli sinyaller yoluyla birbirlerini aktive eden parakrin etkileşim döngüsü bulunmaktadır (Kleeff ve ark., 2007).



Şekil 1. Pankreas tümörü mikroçevresinin şematik gösterimi (Patil ve ark., 2021)

1. Hücresel Komponentler

a. Kanserle ilişkili fibroblastlar

Fibroblastlar bağ dokuda en fazla bulunan ve salgıladıkları ECM proteinleri ile dokuların temel yapısını oluşturan hücrelerdir. Fibroblastlar sağlıklı dokularda ECM'nin yeniden şekillenmesi ve yara iyileşmesi sürecindeki rolleri ile yapıların fonksiyonlarının devamlılığını düzenler. Normal koşullarda durağan halde olan fibroblastlar yara iyileşmesi ve fibrozis durumlarında aktifleşerek “miyofibroblast” olarak adlandırılan aktif hücre grubuna dönüşür. Miyofibroblastlar kontraktıl yeteneği olan stress liflerine sahiptir, α -düz kas aktini ve fibronektinin varyant formu olan ED-A fibronektini eksprese ederler. Çok sayıda çalışma fibroblastların tümörjenezde esansiyel oyuncular olduklarını göstermektedir. Özellikle de pankreatik, meme ve prostat kanserlerinde tümörün etrafındaki stromal hücrelerin büyük çoğunluğunu oluşturduklarını ifade etmektedir (Monteran ve Erez, 2019).

Tümör stromasında yer alan ve “CAF” olarak adlandırılan bu aktifleşmiş fibroblastlar, yara iyileşmesi ve inflamasyon süreçlerinde rol alan bu miyofibroblastlarla pek çok benzer özellik göstermektedir. Doku hasarı olduğu zaman o bölgedeki fibroblastlar parakrin sinyallere yanıt olarak miyofibroblastlara dönüşür. Miyofibroblastların indüklenmesi kanser gelişimini indükleyen organ fibrozisine de neden olmaktadır. Endotelial hücreler, düz kas hücreleri, miyoepitelyal hücreler ya da mezenkimal hücreler gibi çeşitli hücre grupları CAF'ları oluşturan hücre gruplarıdır (Mhaidly ve Mechta-Grigoriou, 2020). CAFların esansiyel fonksiyonları arasında ECM'nin deposizyonu, epitelyal farklılaşmanın düzenlenmesi, inflamasyonun düzenlenmesi ve yara iyileşmesi yer almaktadır. Bu hücreler hepatosit büyüme faktörü (HGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), stromal hücre kaynaklı faktör-1 (SDF1/CXCL12) ve çeşitli fibroblast büyüme faktörlerini (FGF) eksprese ve sekrete ederek kanser hücrelerinde proliferasyonu indüklemeye yeteneğindedir. CAF'lar tümör hücrelerinin proliferasyonunu, anjiyogenezi,

apoptozisten kaçışını, kemorezistansı ve metastazını desteklemektedir. CAFlar çeşitli kemokinler, sitokinler, büyüme faktörleri, miRNA'lar, eksozomlar üretir. Ayrıca CAFlar salgıladığı sitokinlerle de immün sistem hücrelerinin baskılayarak tümör progresyonunun hızlanmasına neden olur. Bu durumdan anlaşıldığı üzere CAFlar tümör hücresi ve mikroçevre için önemli bir regülatördür ve farklı mekanizmalar üzerinden terapiler araştırılmaktadır (Pereira ve ark., 2019). CAFların tümör mikroçevresinde farklı alt tipleri vardır. Pankreas mikroçevresinde tümörün yerine ve evresine göre üç farklı tip CAF tanımlanmıştır. CAFların fonksiyonel rolleri'nin belirlenmesi ve yönetilebilmesi pankreas kanseri için elzemdir (Geng ve ark., 2021) .

b. Mezenkimal kök hücreler

MKHler, yüksek rejeneratif kapasitesi olan, çok yönlü farklılaşabilen, immünmodülatuar özelliklere sahip fibroblast benzeri stromal hücrelerdir. MKHler kolay izole edilebilmeleri, vücutta pek çok yerde bulunabilmeleri, immün yanıt oluşturmamaları, antiinflamatuvar, anjiyojenik ve antiapoptotik gibi özellikleri olması nedeniyle tıpta birçok alanda oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (Pountos ve Giannoudis, 2005). MKHler kemik iliği, adipoz doku, umbilikal kord, iskelet kası, plasenta, dental pulpa ve endometrium gibi çok farklı dokulardan elde edilebilir (Berebichez-Fridman ve Montero-Olvera, 2018; Ding ve ark., 2011). Adipoz doku, daha fazla miktarda hücre elde edilmesi, daha az invaziv olması ve klinik uygulamadaki yüksek başarısından dolayı son dönemlerde izolasyonda daha çok tercih edilmektedir (Strioga ve ark., 2012). MKHler terapötik olarak Graft Versus Host hastalığı, otoimmün hastalıklar, hematolojik maligniteler, kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik hastalıklar, organ nakilleri, diabetes ve rejeneratif tıpta allojenik veya otolog olarak kullanılmaktadır (Squillaro ve ark., 2016). MKHler bulunduğu çevreden aldığı sinyallere yanıt olarak sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri, enzimler, eksozomlar salgılayarak veya direkt temas ederek mikroortamı düzenler. MKHlerin hücresel biyolojisi araştırmaları arttıkça kanserde de teröpatik amaçla kullanılıp, kullanılamayacağı araştırılmaktadır

(Lin ve ark., 2019). Özellikle naif MKHlerin yani tümör hücresiyle karşılıklı etkileşime girmemiş olan MKHlerin zamanla aldığı sinyaller doğrultusunda tümör hücreleri tarafından eğitilmiş hale geldiği ve tümör hücrelerini birçok mekanizma üzerinden desteklediği düşünülmektedir (Sun ve ark., 2014). Tümör mikroçevresinde naif MKH ortama ilk geldiği zaman proinflamatuvar ve antitümörojenik fenotipteyken zamanla ortamdan aldığı sinyaller doğrultusunda antiinflamatuvar ve protümörojenik karaktere dönüşmektedir (Rivera-Cruz ve ark., 2017). MKHlerin tümör mikroçevresindeki etkilerine genel olarak bakılacak olursa; MKH'nin büyüme faktörleri salgılaması (HGF, İnsülin benzeri büyüme faktörü-1, FGF gibi), proanjiyojenik ajanlar salgılaması (Vasküler endotelial büyüme faktörü, TGF- β gibi), immün sistem hücrelerini baskılaması (indoleamin 2,3-dioksijenaz, IL-8, IL-10 aracılığıyla) ve kendisinin de CAF'a dönüşmesi tümörü destekleyici özellikleri arasında gösterilebilir. Antitümör özellikleri olarak ise antianjiyojenik ajanlar salgılaması, sitotoksik ajanlar salgılaması (TRAIL, TNF- α gibi), antiproliferatif ajanlar salgılaması ve immün sistem hücrelerini aktive etmesi gösterilebilir (Hmadcha ve ark., 2020).

c. Pankreatik yıldızlı hücreler

Pankreas stellat hücreleri (PSCler) pankreasta yerleşik olarak bulunan hücrelerdir. Kronik pankreatit ve pankreas kanseri ile ilişkili fibroziste bir araştırma noktası haline gelmiştir . Normalde, PSCler hareketsizdir ve ECM üretimini düzenler. Bununla birlikte, tümörjenez sırasında stroma ve pankreas kanseri hücreleri, PSCleri aktive etmek için çeşitli uyarıcı faktörler (TGF- β gibi) salgılar. Ardından, aktif PSCler uygun bir mikro ortam oluşturabilir ve pankreas kanserinde aşırı fibrozis, tümör metastazını teşvik etme , kemoterapi ve radyoterapi direncini indüklemeye ve immünmodülasyon yaparak kanserin ilerlemesini kolaylaştırabilir (Jin ve ark., 2020). PSClerin PDAC progresyonundaki kritik rolleri arasında ECM üretimi, desmoplastik reaksiyonun düzenlenmesi ve hücre proliferasyonu, göçü, invazyonu, anjiyogenez ve ilaç direncinde PDAC malignitesinin modülasyonu yer alır. Aktive edilmiş PSCler, PCC'lerin çoğalmasını, göçünü ve invazyonunu

düzenleyen çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri salgılar. Ek olarak, PSCler IL-1, IL-6, koloni stimüle edici faktör 1 ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) gibi sitokinleri salgılar. PSCler ayrıca endotel hücreleri, bağışıklık hücreleri ve nöronal hücreler gibi diğer stroma hücreleri ile etkileşime girerek PDAC'nin agresif fenotipine daha fazla katkıda bulunur (Wu ve ark., 2021) .

d. İmmün sistem hücreleri

Memeli immün sistemi, organizmayı yabancı patojenlere karşı korumak için non-immün hücreler ile diğer hücreler arasında kompleks ve dinamik bir ağ ile etkileşim kurmuş olan çok çeşitli hücre grupları ve mediatörlerden meydana gelmektedir. Sağlıklı organizmada, doğuştan gelen immün sistem içsel veya dışsal tehlike sinyallerine karşı savunma halindedir. İmmün sistemin esasansiyel rolü “kendiden olmayanları” ayırmaktır. Bu özellik en küçük virüsten, en büyük çok hücreli parazite kadar tüm yabancı organizmaların saptanması ve elimine edilmesine olanak sağlamaktadır. İmmün sistem genel olarak kalıtsal ve adaptif olmak üzere iki ana başlıkta incelenmesine rağmen, hücrelerin doku hasarına hızlıca yanıt vermelerine olanak sağlayan sofistike bir iletişim ağına sahip immün sistem hücreleri, antijen spesifitesi ve hücresel kompozisyon bakımından birbirlerinden farklılık göstermektedir (Abbas ve ark., 2016).

İmmün sistem hücrelerinin ve inflamasyonun tümör ilerlemesini kontrol etmede ve katkıda bulunmada önemi yıllardır kabul edilmektedir. Hem doğuştan gelen hem de adapte bağışıklık bileşenleri vücudu aktif olarak tarayarak başlangıç aşamasındaki tümör hücrelerini tanımlar ve yok ederler. Tümör içindeki efektör ve bellek fonksiyonlarına sahip lenfositlerin tanımlanması başlıca tümörlerde ve metastazlarında sıklıkla tarif edilmiştir. Bağışıklık hücrelerinin varlığı genellikle iyi bir prognoz ile ilişkilendirilir; ancak, bu büyük ölçüde tümörün türüne, hücrelerin konumuna ve aktivasyon durumlarına bağlıdır (Barnes ve Amir, 2018) . Tümör hücreleri, kanser hücreleri tarafından aşırı ifade edilen genler tarafından kodlanan mutasyona uğramış neo-antijenler, mutasyona

uğramamış antijenler veya kanserin köken aldığı dokularla ilgili farklılaşma genleri tarafından kodlanan antijenleri ifade eder. Dendritik hücreler tümör antijenlerini işleyerek T hücrelerine sunumunu teşvik eder ve anti-tümör yanıt üretir. T hücreleri içinde, CD8+ sitotoksik T hücreleri, anti-tümör bağışıklığın en etkili araçları olarak kalmaktadır ve CD4+ T yardımcı 1 hücreleri veya Th17 hücreleri tarafından yönlendirilen bir yanıt, CD8+ efektör T hücre yanıtlarını teşvik eder. Büyük oranda CD8+ sitotoksik T hücre infiltrasyonu, meme kanseri, yumurtalık kanseri, akciğer kanseri ve kolorektal kanser gibi farklı kanser türlerinde olumlu bir prognozla ilişkilendirilmiştir (Papait ve ark., 2020).

Epidemiyolojik çalışmalardan önemli kanıtlar olsa da, kronik pankreatit'in PDAC için bir risk faktörü olduğu, çoğu durumda PDAC'nin klinik olarak belirgin bir inflamasyon olmadan spontan olarak geliştiği bilinmektedir. Hala ölümcül bir hastalık olan sporadik PDAC örneklerinde, kanserden ölümlere neden olan dördüncü önde gelen neden oluşturmaktadır, bağışıklık hücrelerinin birikimi tarif edilmiştir. Şimdiye kadar, bu hücrelerin masum seyirciler mi yoksa pankreatik kanser gelişiminde önemli oyuncular mı olduğu hala net değildir. Pankreas kanserinde bağışıklık etkileşimleri, pankreatik tümör hücrelerinin ve adaptif ve doğal bağışıklık yanıtı'nın etkileşimlerini birleştiren dinamik ve karmaşık bir sistemdir. Tümör içindeki bağışıklık hücreleri, birbirleriyle ve tümör hücreleriyle karmaşık, sinerjik ve karşıt bir şekilde etkileşime girerler ve pankreas tümörünü çeşitli yollarla etkileyebilirler. Hücrel bağışıklık sitokinler ve kemokinler tarafından büyük ölçüde etkilenir; bunlar pankreatik tümör hücrelerinden (örneğin, IL-6, IL-1, IL-10 vb.) veya diğer bağışıklık hücrelerinden (IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ vb.) türemiş olabilir ve böylece tümör mikroçevresinin karmaşıklığını artırır (Wörmann ve ark., 2013) .

I. Dendritik hücreler

Dendritik hücre (DC)ler immünite ve toleransın önemli araçlarıdır ve tam olarak aktive olduklarında profesyonel antijen sunucu hücreleri olarak işlev görürler. Tümör hücreleri,

immüno-surveillance'ı atlatma ve DC'lerin olgunlaşmasını ve işlevlerini inhibe eden immüno-supresif bir ortam oluşturma yeteneğine sahiptir. Bağışıklık sisteminin temel bileşeni olan dendritik hücreler (DC'ler) temel olarak adaptif bağışıklık tepkilerine katılır; ancak, TME'de ikili bir işlevi vardır. Bir yandan olgun immünojenik DC'ler, antijen alımı, işlenmesi ve sunulması yoluyla T hücresi aracılı antitümör tepkilerine katkıda bulunur. Öte yandan, olgunlaşmamış veya kısmen farklılaşmış miyeloid DCler, antitümör immün tepkilerini indükleyemez; bunun yerine, düzenleyici DCler olarak, TME'de bağışıklık bastırma ve toleransa katkıda bulunurlar. İmmünojenik DC'lerin işlev bozukluğu, bağışıklık sürveyansında ve tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında başarısızlıklara yol açar (Zhu ve ark., 2020).

Pankreas kanseri ile ilgili çeşitli klinik çalışmalarda ilk kez azalmış sayıda tümörle ilişkili tam olarak aktive olmuş DC'ler gözlemlenmiştir. Önemli olan, kanserde DC kusurlarına neden olan ana mekanizma olarak anormal miyelopoezin onaylandığıdır ve bu da olgunlaşmamış DC'lerin artan üretim ve birikimine neden olur. Dahası, periferik kan dolaşımındaki DC'ler pankreas kanserli hastalarda sayıca azalmış ve işlevleri bozulmuştur. Non-rezekte edilebilir pankreas kanseri hastalarındaki sirküle olan miyeloid ve lenfoid DC'leri inceleyerek, yüksek seviyelerde dolaşan miyeloid DC'lerin, non-rezekte edilebilir pankreas kanseri hastalarında bağımsız bir olumlu prognostik faktör olarak ilişkilendirildiği ve yaşam süresini artırdığı önerilmiştir. İnsan PDAC dokularında immün modülatör ve kemotaktik faktörlerin (IL-6, TGF- β , IDO, COX-2, CCL2 ve CCL20) ve makrofajlardan, miyeloid ve plazmasitoid DC'lerden gelen immün hücre özgül belirteçlerinin önemli ölçüde artmış seviyeleri tespit edilmiştir. Düşük DC belirteci seviyeleri, sağkalım oranı ile negatif olarak ilişkilendirilmiştir. Daha önce PDAC'daki DC infiltrasyonu ile CD4+/CD8+ tümör infiltrat lenfosit hücreleri arasında pozitif bir korelasyon ve iyi bir prognoz arasında bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir (Wörmann ve ark., 2013).

II. Miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler

Kaçış veya baskılama stroma'nın bağışıklık yanıtı, kanser gelişiminde kritik bir özellik olarak tanımlanır. Bu bağışıklık baskılanması veya kaçınmanın mekanizmaları tam olarak açık değildir. MDSCler, nitrik oksit sentaz ve reaktif oksijen türlerinin yükseltilmesi, neoanjiojenezin teşvik edilmesi ve düzenleyici T hücresi'nin çoğalması da dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalarla primer tümör büyümesini ve invazyonunu teşvik edebilen bir hücre popülasyonu olarak tanımlanmıştır. MDSCler lenfosit aktivasyonunu inhibe ederek tümör kaynaklı bağışıklık baskılanmasını ve bağışıklık kaçınmasını sağlayabilirler. Makrofajlar, granülositler ve diğer hücreler gibi myeloid hücrelerin heterojen bir popülasyonu oluşturan MDSCler hem Gr-1 hem de CD11b'yi ifade eder. Pankreas kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanser tiplerinde artmış sayıda MDSC sıklıkla bulunur (Greten ve ark., 2011).

İnsan PDAC örneklerinde, MDSClerin sadece stromada değil, aynı zamanda periferik kanda, kemik iliğinde ve dalakta da tespit edildiği görülmüştür. Bu, MDSClerin sistematik olarak genişletildiğini ve tümörün yerine çekildiğini göstermektedir. Bununla birlikte, MDSClerin nasıl çekildiği tam olarak açık değildir. Pankreas tümörleri tarafından salgılanan büyüme faktörü granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör, MDSClerin erken ve önemli bir aracısı olarak ortaya çıkarılmıştır. Tümör hücreleri ve MDSCler arasındaki parakrin döngünün granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktöre dayalı olarak bozulması, MDSC birikimini inhibe etmiş, CD8+ sitotoksik T hücre bağışıklığını geri kazandırmış ve T hücreleri üzerindeki bağışıklık baskısını aşmaya yardımcı olmuştur (Wörmann ve ark., 2013).

III. Tümörle ilişkili makrofajlar

Solid tümörlerde inflamatuvar hücrelerin ana popülasyonu, ya alınan kan monositlerinden ya da yerel dokuda bulunan dokuların makrofajlarından türeyen TAMlardır. Farklı aktivasyon ve polarizasyon durumları TAMlar için tanımlanmıştır. Bir yandan Toll

benzeri reseptör ligandları lipopolisakkarit veya interferon-gamma (IFN-gamma), anti-tümöral bir yanıtı tetikleyen ve tümör hücrelerine karşı hareket eden klasik/M1-aktive makrofajları ortaya çıkarır. Öte yandan, IL-4, IL-10, IL-13, FcγR-sinyali veya hipoksi tarafından uyarılan "alternatif"/M2-aktive makrofajlar, öncelikle anjiyogenez ve invazyonu teşvik ederek protumorojenik eylemler başlatır, doku hasarını onarır ve inflamatuvar yanıtları ayarlar. İmmün hücrelerden (örneğin, IL-4 üreten Th2 hücreleri), tümör hücrelerinden (örneğin, IL-10) veya düzensizleşmiş komşu dokulardan (örneğin, hipoksi sinyalleri) elde edilen çeşitli sinyallerin entegrasyonu, TAM alt tiplerinin nihai bileşimini belirler ve TAM polarizasyonunun dinamik yapısını vurgular. Sonuç olarak, pankreatik kansere makrofaj infiltrasyonunu değerlendiren son bir çalışmanın sonuçları, CD68 (genel makrofaj belirteci) veya CD163 (spesifik M2 makrofaj belirteci) ifadesiyle karakterize edilen zıt fonksiyonlu iki farklı TAM tipinin varlığını ortaya koydu. CD68 pozitif TAMların artan miktarları, pankreatik tümör rezeksiyonu sonrası daha kısa bir sağkalım eğilimindeyken, CD163 pozitif TAM'lar önemli bir sağkalım avantajı sağladı. Ancak, başka bir çalışmada, M2-polarize TAM'ların pankreatik kanserin invaziv ön yüzünde yoğun şekilde biriktiği gösterildi. Bunların infiltrasyon derecesi, artmış lenfangiogenez ve kötü prognoz ile ilişkiliydi. Ayrıca, M1'den pan-makrofajlara oranı (%M1) son zamanlarda pankreatik kanserde daha uzun bir sağkalım ile ilişkilendirildi. Bu nedenle, makrofajların basit M1/M2 sınıflandırması, tümör teşvikindeki etkilerine göre yeterli olmayabilir (Von Itzstein ve ark., 2020).

Tümörde veya mikroçevresinde ifade edilen granülosit makrofaj koloni-stimüle edici faktör gibi faktörler, TAMların olgunlaşmasını ve farklılaşmasını düzenleme kapasitesine sahiptir. İnvaziv karsinomlarda açık olmanın yanı sıra, TAMların en düşük dereceli PanIN lezyonları etrafında tümöre erken dönemde kolonize oldukları görülmektedir. Dahası, TAMlar yalnızca masum izleyiciler değil, aynı zamanda PanIN ilerlemesinin önemli düzenleyicileridir. KrasG12D farelerin PanIN lezyonlarında TAM'ların IL-6'ın baskın

kaynağı olduğu ve STAT3 sinyallemesini başlatarak kanser gelişimini teşvik ettiği gösterildi. Bunun yanı sıra, NFκB-aktive monositlerin sonic hedgehog üretimi yoluyla pankreatik kanser hücrelerinin proliferasyonunu uyarma görevleri olduğu belirtilmiştir. TAM'ların polarizasyon durumunun önemi fare ve insan çalışmalarında vurgulanmıştır. CD40 ko-stimülatör molekülüne agonist antikor kullanarak M2 benzeri TAM'ları anti-tümör M1 benzeri TAM'lar olarak yeniden programlama imkanı sağlandı. CD40 aktive edilen makrofajlar hızla pankreatik tümöre sızdı, tümöre karşı toksik hale geldi ve insan ve fare modellerinde tümör stromasının azaltılmasına yardımcı olarak tümör immün gözetimini yeniden sağladılar (Wörmann ve ark., 2013).

IV. Tümör İnfiltrate Lenfositler

Tümör mikroçevresini istila eden (infiltrate eden) çeşitli T hücre popülasyonları mevcuttur. Bu T hücrelerinin salgıladıkları sitokin profiline bağlı olarak immün yanıtı kontrol ettikleri bilinmektedir. Bu hücre grupları arasında, tümör hücrelerini öldürme yeteneğine sahip olan ve iyi prognoz ile ilişkilendirilen sitotoksik CD8+ hafıza T hücreleri (memory T cells), interlökin-2 (IL-2) ve interferon gama (IFN- γ) üretimiyle karakterize olan CD4+ T-yardımcı 1 (T-helper 1, Th1) hücreleri tarafından desteklenmektedir. Bu sitokinlerin tümör mikroçevresindeki yüksek ekspresyonu da iyi prognozla ilişkilidir. B hücresi yanıtını indükleyen IL-4, IL-5 ve IL-13 gibi interlökinleri üreten Th2 hücreleri gibi diğer CD4+ hücre gruplarının ise genellikle tümör büyümesiyle ilişkili oldukları düşünölmektedir. Tümör mikroçevresi'nde bulunan bütün T hücreleri'nin tipleri ve fonksiyonları Tablo 1 de özetlenmiştir (Goulart ve ark., 2021).

Tablo 1. Tümör mikroçevresindeki T hücreleri'nin alt tipleri

T hücresi fenotipi	Yüzey işaretleri	Bağışıklık tepkisi	Efektör fonksiyonları
Sitotoksik T hücresi			
CTL'ler	CD8	Tümör öldürme	IFN- γ , TNF- α sitokinleri, granzimler, FasL
Yardımcı T hücresi			
Th1	CD4 STAT4 T-bahsi	Tümör öldürme	IFN- γ , IL-2 sitokinleri, CTL aktivitesini artırır
Th2	CD4 STAT6 GATA3	Tümör toleransı	IL-4, IL-5, IL-13 sitokinleri, CTL aktivitesini azaltır
Th17	STAT3 ROR γ t	Tümör toleransı	IL-17 sitokini
$\gamma\delta$ T hücreleri	TCR γ/δ	Tümör toleransı	IL-4, IL-10, TGF- β sitokinleri ve CTL aktivitesi
Düzenleyici T hücresi			
Tregler	CD4 CD25 FOXP3	Tümör toleransı	IL-10, TGF- β sitokinleri, CTLA-4

V. CD8+ Sitotoksik T hücreleri

Sitotoksik CD8+ T lenfositleri, tümöre özgü hücrel adaptif bağışıklığın önemli bileşenleridir. Tümörle ilişkili antijen peptitlerini büyük histokompatibilite kompleksi sınıf I ile yüzeyinde sunan tümör hücrelerini etkili bir şekilde tanırlar ve saldırırlar. CD8+ sitotoksik T hücreleri, malign hücrelere IFN- γ aracılığıyla doğrudan etki ederek ve makrofaj tümörisidal aktivitesinin indüksiyonu yoluyla tümör hücrelerini yok etme kapasitesine sahiptir. Birçok kanser türünün önceki çalışmaları, tümör-infiltrate eden CD8+ hücrelerin antitümör aktivitesine ve klinik sonuçlara ve hastanın sağkalımına olumlu bir etkisinin olduğunu kanıtlamaktadır. Örneğin, kolorektal, over, özofagus, böbrek, akciğer ve pankreas tümörlerinde olduğu gibi (Wörmann ve ark., 2013). Yeni antijen naif CD8+ T hücreleri normal çevresel dokulara etkin bir şekilde sızamaz ve tümörngenizasyonun erken aşamalarında tümör spesifik CD8+ T hücreleri, antijen ifade eden kanser hücrelerinden habersiz kalabilirler. Tümör ilerledikçe ve yeterli miktarda tümör antijeni, lenf düğümlerinde sunulduğunda, tümör spesifik T hücreleri, çoğunlukla inflamasyonlu ve uyaran olmayan bir bağlamda, drenaj lenf nodunda veya tümör dokusunda aktive edilebilir ve anejik, erken işlevsiz T hücre durumunu indükleyebilir (1. aşama). Tümör ilerlemeye devam eder ve immünsupresif bir mikroçevre oluşur. Kalıcı tümör antijeni ve mikroçevresel sinyaller, tümör spesifik T

hücrelerini geç işlevsiz bir duruma sürükler (2. aşama) (Philip ve Schietinger, 2021) .

İnsan pankreas kanserinde, CD8+ T lenfositleri baskın T lenfosit alt kümesini oluşturur ve olumlu klinik sonuçlarla ve ölüm oranı azalmasıyla ilişkilendirilir. CD8+ hücreler daha önce bir xenograft fare modelinde gösterildiği gibi tümör büyümesinin azalması ile de ilişkilidir. Ancak, pankreas kanserinde sitolitik immün kaçışa dair kanıtlar vardır. CD8+ T hücrelerinin sayısı ve işlevi, pankreas kanserli hastaların kanında, sağlıklı bağışıklık sistemine sahip kişilerle karşılaştırıldığında bozulmuş olarak bulunmuştur. Ayrıca, CD8+ T hücreleri fibroz stromada (potansiyel etkileyici bölgesinde olmayan) kanser hücrelerinden uzakta bulunmuştur. Bu bulgular, daha önce bildirilen hücre içi bağlantı noktalarındaki adezyon molekül ligandı E-kadherin'in düzenlenmesi ve pankreas kanser hücrelerinde TGF- β 'nin aşırı ifadesi ile birlikte, pankreas kanser hücrelerinin sitotoksik T hücrelerinden kaçınarak fibroz doku içinde toplanmalarını teşvik ettiklerini göstermektedir. Ayrıca, sitotoksik CD8+ T lenfositlerin aktivasyon işaretleyicilerinin düşük düzeyde ifadesi de pankreas kanserine karşı sitotoksik aktivitelerini azaltabilir (Wörmann ve ark., 2013).

VI. CD4+ T hücreleri ve alt tipleri

-Th1,Th17 ve Th2 hücreleri

Birçok kanser türünde Th1 hücreleri ve ürettikleri sitokinler (örneğin IFN- γ), olumlu bir klinik sonuç sağlamaya güçlü bir şekilde katkıda bulunurlar. Th17 hücreleri gibi diğer T hücresi popülasyonları için ise, pro veya anti-tümör rolü net olarak tanımlanamamıştır. Çeşitli kanser türlerine ilişkin önceki çalışmalar, IL-17A ve Th17 hücrelerinin tümör oluşumunu destekleyici bir etkisini tanımlamıştır. Ancak, Th17 hücrelerinin tümör koruyucu bir rolünü gösteren bazı çalışmalar da bulunmaktadır. Farelerde pankreas kanserinde, tümör mikroçevresindeki Th17 hücrelerinin artması pankreas tümör oluşumunu yavaşlatmış ve hayatta kalımı iyileştirmişken, son zamanlarda insan pankreas kanserinde, Th17 hücrelerinin artan seviyeleri ve ilgili sitokinleri, invazyonu ve

metastazı hastanın prognozunu etkilemiştir. Th2 hücrelerinin protümörojenik etkileri olduğu görülmektedir; insan kanserlerinde kötü prognoz ve azalmış hayatta kalım ile ilişkilidirler. Th2 yanıtları, pankreas kanseri ve diğer karsinomlarda tümörü destekleyici işlev sergileyerek hastalık ilerlemesini hızlandırmakta ve hayatta kalımı azaltmaktadır. Bu gözlemlerin arkasındaki tam patomekanizmalar ve sinyal yolları tam olarak anlaşılmamaktadır. Çeşitli çalışmalar, pankreas kanserinde genel bir Th2 çoğalmasına dair kanıt sundu. Böylece, pankreas kanserli hastaların plazmasında Th2 sitokinlerinin (IL-5, IL-6 ve IL-10) ve özellikle IL-13'ün hakimiyeti tespit edildi. Ayrıca, pankreas kanserli hastaların periferik kanındaki Th1 bağışıklık yanıtı, tümör hücre kaynaklı TGF- β ve IL-10 ile dolaylı olarak inhibe edilirken, uyarılmış periferik kan mononükleer hücrelerinin IFN- γ ve IL-12 üretimindeki azalma ve IL-4'ün artan salınımı ile birlikte genel bir Th1 yanıtı baskılanmış gibi görünmektedir (Wörmann ve ark., 2013).

Pankreas karsinomunda tümör stroması öncelikle Th2 hücreleri yerine Th1 hücreleri tarafından infiltrasyona uğramaktadır , bu da bağımsız bir kötü sağkalım öngörücü belirleyicidir. Tümör bağışıklık yanıtı infiltrasyonunda Th2/Th1 hücre oranı cerrahi rezeksiyondan sonra azalmış sağkalım ile önemli ölçüde ilişkiliydi, bu da TME'deki Th2 ve Th1 hücreleri arasındaki denge öneminin klinik sonuçlarda belirleyici olduğunu göstermektedir . Ayrıca bu bulgular, Th1-polarize CD4+ T hücrelerinin tümör korumasını aracılık edebileceğini ve PC'de uzamış sağkalımla ilişkili olabileceğini öne sürmektedir. Pankreas kanseri'nde Th17 hücrelerinin rolleri hem protümoral hem de antitümöral etkilerin gözlemlenmesi nedeniyle tartışmalı kalmaktadır, muhtemelen model oluşturulmasındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Ancak, Th17 hücrelerinin fonksiyonları öncelikle IL-17 aracılığıyla iletilir. PanIN için fare modeli kullanarak, McAllister ve ark. onkogenik KRAS'ın Th17 hücre infiltrasyonunu indüklediğini ve IL-17 aşırı ifadesinin tümör başlangıcını ve ilerlemesini dramatik bir şekilde artırdığını bulmuştur. IL-17, mikroçevrede ifade edilir ve $\gamma\delta$ T hücreleri, miyeloid türevli baskılayıcı hücreler ve tümör hücreleri arasındaki

karmaşık mekanizmalarla protümöral etkilere sahiptir. Dahası, immün hücre kaynaklı IL-17, PanIN'in başlatılmasına ve ilerlemesine katkıda bulunarak PC hücrelerinde kök hücre özelliklerinin indüksiyonuna yol açabilir. Bir klinik çalışma, IL-17 reseptörü aşırı ifadesinin postoperatif metastaz ve PC hastalarında kötü bir ilerlemeye güçlü bir şekilde bağlı olduğunu ve genetik veya farmakolojik blokajının antitümör etkilerinin olduğunu ortaya koymuştur. Buna karşılık, subkutanöz fare PC tümörlerinde (Pan02) Th17 hücre infiltrasyonu, belirli sitokinlerin TME'de tümör ilişkili immün baskıyı tersine çevirebilecek olmaları nedeniyle tümör büyümesini ve hayatta kalma süresini geciktirerek antitümöral bir etki gösterir. Örneğin, IL-6, TGF- β varlığında Treg gelişimini baskılamaya ve Th17 hücrelerini indüklemeye yeteneğe sahiptir . Tek hücre sekanslama gibi yeni teknolojiler, Th17 hücrelerinin pankreas kanserindeki tam rollerini yakın zamanda ortaya çıkaracaktır (Zhou ve ark., 2020).

-Düzenleyici T hücreleri

Düzenleyici T hücreleri (Treg), bağışıklık homeostazını sürdürmek için gereklidir ve immünsupresif hücrelerdir. Özellikle T hücre aktivasyonunu engelleyerek tolere edilmesini sağlayarak mikroçevredeki immünolojik olayları modüle eder. Düzenleyici T hücreleri, PDACde tümör bölgesine çekmek için CCL5 üreten Foxp3 ile bol miktarda ifade edilir. Düzenleyici T hücreleri, düşük glukoz konsantrasyonları gibi zorlu ortamlarda kararlıdır ve tüm CD4+ T hücrelerinin %5-10'unu oluştururlar. Düzenleyici T hücreleri üzerinde, interleukin-2 reseptörü α zinciri (CD25), TNF reseptör ailesi ve sitotoksik T hücreye bağlı antijen 4 (CTLA-4) yüksek düzeyde ifade edilir. Tregs, anatomik konumuna bağlı olarak doğal veya indüklenmiş olarak sınıflandırılır. İlkleri timüsten köken alır ve periferik göç eder; ikinciler ise Foxp3-CD4+ T hücrelerinden periferde gelişir. Düzenleyici T hücreleri'nin adlandırılması 2012 yılında değiştirildi. Farklılaşmanın anatomik konumu gösterildiğinde, "Timus-kaynaklı Treg hücreleri" veya "Periferik-kaynaklı Treg hücreleri" olarak adlandırılır. Anatomik konumu belirsiz olduğunda "FoxP3+ Treg hücreleri" kullanılır. Düzenleyici

T hücreleri çeşitli mekanizmalar aracılığıyla bağışıklık mikroçevresini yeniden şekillendirir, tümör hücrelerinin immün sistemden kaçışını sağlar ve tümör invazyonu ve metastazını teşvik eder (Gao ve ark., 2022).

Çeşitli insan kanserlerinde, tümör-infiltrate olan lenfositler açık bir şekilde hasta sağkalımıyla ilişkilidir. Böylece, CD4+ CD25+ FoxP3+ tümör infiltrate olan lenfositler, uyumlu bağışıklık tepkisini baskılar ve kanserde kötü prognozla ilişkilidir. Pankreas kanserinde, Treg premalign aşamadan ilerlemiş kansere kadar antitümör bağışıklık tepkisini kontrol eder ve kötü prognozun bir belirteçidir. Fare pankreas kanserinde normal histolojiden PanIN ve PDA'ya ilerleme, progresif bir şekilde CD45+ hücrelerin baskın infiltrasyonu ile eşlik eder. Bununla birlikte, TAMlar, MDS'ler ve Tregs gibi immüsupresif hücreler, invaziv kanser ve preinvaziv lezyonların her ikisinde de baskındırlar. Özellikle, FoxP3+ Treg'in erken invaziv lezyonlara infiltrasyonunda ve PDAC ilerlemesi sırasında artışında CD8+ T hücre infiltrasyonunda bir azalmaya karşılık geldiği gösterilmiştir, bu da kötü klinik sonuç ve genel sağkalımın katkısına yol açar ve böylece insan bulgularını doğrular. Mekanistik olarak, Treg'lerin tümör mikroçevresine yerleşmesi, önceden inoküle edilmiş Panc02 hücreleri için fare modelinde daha önce gösterildiği gibi tümör hücre kaynaklı CCL5 ve TGF- β ile ilgili olabilir, böylece Treg'lerin çekilmesini ve CD4+ CD25- naif T hücrelerinin Treg'e dönüşmesini sağlar. Ayrıca Treg frekansı, insan PDA hastalarında tümör metastazı ve kötü prognoz ile pozitif korelasyon gösterir. Treg'lerin tükenmesi, bir CD8 + T hücresi aracılı anti-tümör bağışıklık tepkisine yol açtığı, farelerde nakledilen pankreas kanseri modelinde test edilmiştir (Wörmann ve ark., 2013).

VII. Nötrofiller

Nötrofiller, dolaşımdaki en yaygın immün hücrelerdir ve enfeksiyon ve inflamatuvar hasarlara karşı doğal immün sistemin önemli bir parçasını oluştururlar. Son çalışmalar, yüzey işaretleyicileri CD71 ve CD117 ile tanımlanan erken homojen nötrofil progenitor alt kümesinin insan kemik iliğinde bulunduğunu

keşfetmiştir. Bu CD71+ nötrofiller kanser hastalarının kanları ve tümörlerinde proliferasyon ve genişleme gösterirler. Nötrofillerin birçok kanser türünde, PDAC dahil , meme kanseri, kolorektal kanser , melanom , renal hücreli karsinoma , hepatoselüler karsinom , ve diğerlerinde önemli bir oranını oluşturduğu açığa çıkmıştır. Tümör içi nötrofiller ve yüksek IL-8 seviyeleri, ileri evre kanserli hastalarda immün kontrol noktası inhibitörlerine karşı kötü sonuçlarla ve daha kötü sağkalımla ilişkilidir. Bununla birlikte, nötrofillerin tümör gelişimindeki rolü hala belirsizdir. Bazı çalışmalar TANların tümör baskılayan N1 nötrofilleri ve tümör teşvik eden N2 nötrofilleri olmak üzere iki polarizasyon durumuna ayırmayı önermiştir . Akciğer kanseri modelinde, TGF- β inhibisyonu N1 tipi nötrofillerin rekrütasyonunu ve aktivasyonunu sağlayarak tümör hücrelerini öldürebildiği ve tümör gelişimini engellediği görülmüştür . N1 fenotipine nötrofilleri polarize etmek için interferon- β sinyali gösterilmiştir. Ayrıca, N1 nötrofillerinden salınan pro-inflamatuar veya immün uyarıcı sitokinler, örneğin interleukin-12 (IL-12), CXCL9, CXCL10 ve CCL3, CD8+ T hücrelerinin rekrütasyonunu ve aktivasyonunu kolaylaştırır . Öte yandan, TGF- β 'ye maruz kalmak nötrofilleri N2 fenotipine dönüştürür. N2 nötrofillerinin güçlü immünsüpresif ve tümör teşvik eden fonksiyonları, tümör metastazlarını ve anjiyogenezisi teşvik etmek de dahil olmak üzere rapor edilmiştir . N1 nötrofiller, CD101+, CD177+, CD170 düşük, CD54+, HLA-DR+, CD86+ ve CD15 yüksek olarak karakterize edilmiştir (Jin ve ark., 2021). Nötrofiller, tümör tarafındab salgılayan faktörler ile PDAC mikro ortamına alınabilir. CXCL1, CXCL2, CXCL5 ve CXCL8 dahil olmak üzere, birkaç CXC kemokin ailesine nötrofil alımında önemli bir rol atfedilmiştir. Nötrofiller, tümörden türetilen CXC ailesi kemokinlerine yanıt verebilen CXC reseptörleri CXCR1 ve CXCR2'yi eksprese eder. CXCR1, CXCL6 ve CXCL8 kemokinlerine bağlanır ve CXCR2, CXCL1–3 ve CXCL5–8 kemokinlerine bağlanır (Jin ve ark., 2021) .

Erken dönem çalışmaları nötrofillerin sitotoksik T hücrelerinin tümör hücrelerine saldırısını düzenlediğini

göstermesine rağmen, geçmiş kanıtlar bu hücrelerin kanser gelişiminde ve metastazda potansiyel bir rolü olduğunu öne sürmektedir. Aslında, TANların birkaç kanser türü için bildirildiği görülmüştür. İlişki çalışmaları TAN yoğunluğunun daha yüksek tümör derecesi ve kısa süreli sağkalım ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Son zamanlarda, pankreas kanseri tiplerinde nötrofillerin kapsamlı bir analizi, sadece küçük bir pankreatik neoplazm alt kümesinde TAN birikimini ortaya koymuştur. Bunların pankreatik onkogenezdaki rolü ise hala belirsizdir. PDAC'nin bir fare modeli kullanılarak yapılan son bir çalışmada, TANların matriks metalloproteaz-9 salınımı aracılığıyla metastatik nişin şekillenmesinde yer aldığını öne sürmektedir.

VIII. Doğal Katil Hücreler

Doğal katil (NK) hücreleri, adaptif immün sistemde yer alan diğer lenfositler (T ve B hücreleri) ile karşılaştırıldığında daha az anlaşılan doğal immün sistem bileşenleri olan büyük granüler lenfositlerdir. Viral enfekte ve malign hücelere karşı ilk savunma hattı olarak hareket eden NK hücreleri, CD56+ CD3- hücreleri olarak sınıflandırılır. Bu sınıflandırma daha da iki ana etkili popülasyona ayrılabilir: sitokin salınımı (özellikle interferon (IFN)- γ) yoluyla fonksiyonlarını düzenleyen immünomodülatör CD56+ CD16- hücreleri ve sitotoksik CD56+ CD16+ etkili hücreler. NK hücrelerinin aktivasyonu, engelleyici ve aktive edici hücre yüzey reseptörlerinden aldığı sinyallerin dengesine bağlıdır. Öldürücü hücre immünoglobulin benzeri reseptörler ve doğal öldürücü grup 2 üye dahil olmak üzere C-tipi lektin benzeri reseptörlerden oluşan inhibe edici reseptörler, özellikle major histokompatibilite kompleksi sınıf 1 moleküllerini tanırlar. Bu ligandlar, non-transforme "kendinden" hücrelerde yüksek düzeyde ifade edilir ve sonuç olarak NK hücrelerinin konak hücelere karşı zararlı aktivasyonunu önlerler. Buna karşılık, malign hücreler sıklıkla yüzey MHC-1 moleküllerinin ifadesini düşürerek T hücrelerinin tespitinden kaçınır. Bu "eksik kendilik" sinyali, NK hücrelerinin inhibisyonunu önleyerek sitotoksik etkililiğe yol açar. NK hücreleri, programlanmış ölüm 1 gibi kontrol noktası proteinleri tarafından da

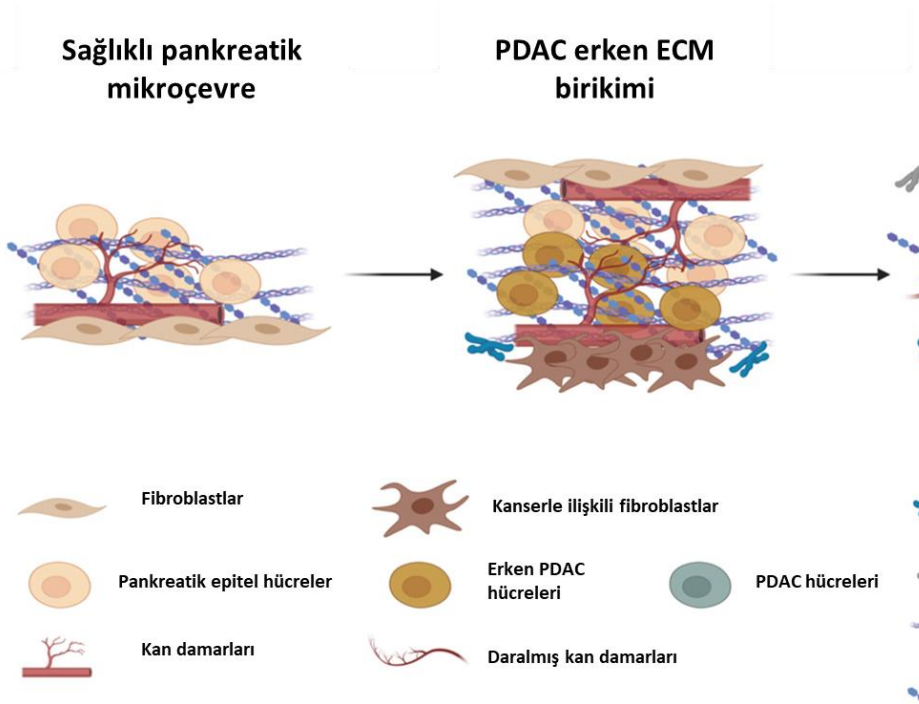
negatif olarak düzenlenebilir. PD-1, programlanmış ölüm ligandı 1 ve 2 ligandlarına bağlanır. Aktive edici reseptörler arasında, tip 1 transmembran doğal sitotoksikite reseptörleri NKp46 , NKp30 ve NKp44 , C-tipi lektin benzeri reseptörler NKG2C ve NKG2D, aktive edici KIR'ler ve DNAX aksesuar molekülü 1 DNAM1 bulunur (Ann Fincham ve ark., 2021).

2. Hücresel Olmayan Komponentler

Desmoplastik stroma, stromal hücreler ve hücre dışı matriksten oluşur. Fibroblastik popülasyonun, pankreas kanserinin tüm tümör kitlesinin %90'ını oluşturabileceğini bildiren stroma boyutunun solid kanserli hastalar için prognostik bir faktör sunabileceği bildirilmiştir. Hücre dışı matriks, kollajen, integrin, laminin, fibronektin, glikozaminoglikan, matris metalloproteinaz (MMP) ve sistein açısından zengin, asidik salgılanan protein SPARC gibi çeşitli malzemelerden oluşur. Normal koşullar altında, hücre dışı matris, displaziyi inhibe ederken hücre polariteyi, proliferasyonu ve göçü korur. Buna karşılık, pankreas kanseri dokusunda bazal membranda görülen düzensiz integrin alt birimleri, kanser hücresinin hayatta kalmasına ve istilasına katkıda bulunur. Bir glikozaminoglikan olan hyaluronan, yüksek oranda depolanır. Hyalüronan reseptörü CD44'e bağlandığında, sonraki etkileşimler kanser hücresinin hayatta kalmasını uzatır ve kanser hücresi büyümesini destekler (Murakami ve ark., 2019).

Ekstrasellüler matriks, tüm dokularda bulunan ve hücresel olmayan bir bileşendir. Su, proteinler ve polisakkaritlerden oluşan ECMnin bileşimi, mikroortamın ihtiyaçlarına göre ayarlanır. ECM yapısındaki değişiklik, birçok kanserde malign hücre transformasyonunun bir sonucudur, dolayısıyla ECMden gelen biyomekanik işaretlerin etkisini gösterir. Tümör stroması sıklıkla kanserin gelişimine ve tümörün ilerlemesine katkıda bulunan bir faktör olarak tasvir edilmiştir. Bununla birlikte, son zamanlarda yapılan birkaç prelinik ve klinik çalışma, stroma tükenmesinin daha agresif bir hastalığa yol açabileceğini göstermiştir. Bu nedenle, stroma ve ECM, mikroçevrede tümörü teşvik eden ve tümörü inhibe

eden bir bileşen olarak ikili bir rol oynar. Bununla birlikte, bunun başarılı olması için stroma ve TME'nin daha eksiksiz bir şekilde anlaşılması gereklidir. PDAC, ECM tümü çeşitli mekanizmalar aracılığıyla tümör hücreleriyle etkileşime giren kolajenlerden, integrinlerden, proteoglikanlardan, glikoproteinlerden ve proteazlardan oluşur. Bunlar arasında kolajenler en bol bulunan bileşendir (Perez ve ark., 2021) .



Şekil 2. Pankreas duktal adenokarsinomunda (PDAC) ECM değişiklikleri (Ferrara ve ark., 2021)

PDAC, zengin stromal bileşenlerden oluşan karmaşık bir tümör mikroçevresine sahip kanserlerden biridir. PDAC stromasında

bulunan birçok özellik, bu tümörün sitotoksik ve immünoterapötik tedavilere karşı direncine ve metastaz yapma eğilimine katkıda bulunur. Hücresel düzeyde, PDAC hücreleri fibroblastlar, endotel hücreleri ve immün hücreler gibi neoplastik olmayan hücre tipleriyle karmaşık bir etkileşime girer. Bu karmaşık etkileşimler bu agresif kanserin ilerlemesini ve terapötik direncini besler. Çalışmalar özellikle immün sistem hücre ve fibroblast popülasyonları gibi bu hücre tiplerinin polarizasyonunun, PDAC tümörlerinin nasıl büyüdüğünü, metastaz yaptığını ve tedaviye nasıl yanıt verdiğini belirlediğini öne sürmektedir. Bu nedenle, mevcut araştırmalar, bu popülasyonlara nasıl en iyi şekilde hedefleneceğine odaklanmaktadır ve böylece tümörlerin tedaviye yanıt vermesi sağlanabilir. Bu kitap bölümü tümör mikroçevresinin genel bir bakışını sunmakta ve mikroçevrehedeflenerek hastaların sonuçlarının iyileştirilebileceği konusunda öngörülerde bulunmaktadır. Tüm bunlar bir araya getirildiğinde, PDAC tümör mikroçevresinin, tümör gelişiminin tüm aşamalarında yaygın olarak iletişim halinde olan sayısız ve çeşitli hücre tiplerinden oluştuğu artık açıktır. Bu sürekli iletişim, etkili anti-tümör bağışıklığı için olumsuz bir ortamın gelişimini yönlendirir.

KAYNAKÇA

1. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2016). Basic Immunology: Functions and of the Immune System.
2. Ann Fincham, R. E., Delvecchio, F. R., Goulart, M. R., Sheng Yeong, J. P., & Kocher, H. M. (2021). Natural killer cells in pancreatic cancer stroma. *World Journal of Gastroenterology*, 27(24), 3483. <https://doi.org/10.3748/WJG.V27.I24.3483>
3. Barnes, T. A., & Amir, E. (2018). HYPE or HOPE: the prognostic value of infiltrating immune cells in cancer. *British Journal of Cancer*, 118(2), e5. <https://doi.org/10.1038/BJC.2017.417>
4. BAŞ TOPCU, K. S. (2022). Tümör İlerlemesinde Tümör Mikroçevrenin Rolü. *Türk Nöroşir Derg*, 1(98), 98–104. <https://www.rndsystems.com/product-highlights/>
5. Berebichez-Fridman, R., & Montero-Olvera, P. R. (2018). Sources and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 18(3), e264–e277. <https://doi.org/10.18295/squmj.2018.18.03.002>
6. Carr, R. M., & Fernandez-Zapico, M. E. (2016). Pancreatic cancer microenvironment, to target or not to target? *EMBO Molecular Medicine*, 8(2), 80–82. <https://doi.org/10.15252/emmm.201505948>
7. Ding, D. C., Shyu, W. C., & Lin, S. Z. (2011). Mesenchymal stem cells. *Cell Transplantation*, 20(1), 5–14. <https://doi.org/10.3727/096368910X>
8. Feig, C., Gopinathan, A., Neesse, A., Chan, D. S., Cook, N., & Tuveson, D. A. (2012). The pancreas cancer microenvironment. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(16), 4266. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3114>

9. Ferrara, Benedetta, Cataldo Pignatelli, Méli ssande Cossutta, Antonio Citro, José Courty, and Lorenzo Piemonti. (2021). "The Extracellular Matrix in Pancreatic Cancer: Description of a Complex Network and Promising Therapeutic Options" *Cancers* 13, no. 17: 4442. <https://doi.org/10.3390/cancers13174442>
10. Gao, Z., Zhang, Q., Zhang, X., & Song, Y. (2022). Advance of T regulatory cells in tumor microenvironment remodeling and immunotherapy in pancreatic cancer. *European Journal of Inflammation*, 17. https://doi.org/10.1177/1721727X221092900/ASSET/IMA GES/LARGE/10.1177_1721727X221092900-FIG1.JPEG
11. Geng, X., Chen, H., Zhao, L., Hu, J., Yang, W., Li, G., Cheng, C., Zhao, Z., Zhang, T., Li, L., & Sun, B. (2021). Cancer-Associated Fibroblast (CAF) Heterogeneity and Targeting Therapy of CAFs in Pancreatic Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 1766. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.655152/BIBTEX>
12. Goulart, M. R., Stasinos, K., Fincham, R. E. A., Delvecchio, F. R., & Kocher, H. M. (2021). T cells in pancreatic cancer stroma. *World Journal of Gastroenterology*, 27(46), 7956. <https://doi.org/10.3748/WJG.V27.I46.7956>
13. Greten, T. F., Manns, M. P., & Korangy, F. (2011). Myeloid derived suppressor cells in human diseases. *International Immunopharmacology*, 11(7), 802–807. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2011.01.003>
14. Gunaydin, G. (2021). CAFs Interacting With TAMs in Tumor Microenvironment to Enhance Tumorigenesis and Immune Evasion. *Frontiers in Oncology*, 11, 2669. <https://doi.org/10.3389/FONC.2021.668349/BIBTEX>
15. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>

16. Hessmann, E., Buchholz, S. M., Demir, I. E., Singh, S. K., Gress, T. M., Ellenrieder, V., Neesse, A., Hessmann, E., Buchholz, S. M., Demir, I. E., Singh, S. K., Gress, T. M., Ellenrieder, V., & Neesse, A. (2020). Microenvironmental determinants of pancreatic cancer. *Physiological Reviews*, 100(4), 1707–1751. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00042.2019/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0042029550009.JPEG>
17. Hmadcha, A., Martin-Montalvo, A., Gauthier, B. R., Soria, B., & Capilla-Gonzalez, V. (2020). Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells for Cancer Therapy. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(January), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00043>
18. Jin, G., Hong, W., Guo, Y., Bai, Y., & Chen, B. (2020). Molecular Mechanism of Pancreatic Stellate Cells Activation in Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer. *Journal of Cancer*, 11(6), 1505. <https://doi.org/10.7150/JCA.38616>
19. Jin, L., Kim, H. S., & Shi, J. (2021). Neutrophil in the Pancreatic Tumor Microenvironment. *Biomolecules*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/BIOM11081170>
20. Junttila, M. R., & De Sauvage, F. J. (2013). Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*, 501(7467), 346–354. <https://doi.org/10.1038/nature12626>
21. Kleeff, J., Beckhove, P., Esposito, I., Herzig, S., Huber, P. E., Löhr, J. M., & Friess, H. (2007). Pancreatic cancer microenvironment. *International Journal of Cancer*, 121(4), 699–705. <https://doi.org/10.1002/ijc.22871>
22. Lin, W., Huang, L., Li, Y., Fang, B., Li, G., Chen, L., & Xu, L. (2019). Mesenchymal Stem Cells and Cancer: Clinical Challenges and Opportunities. *BioMed Research*

- International, 2019, 1–12.
<https://doi.org/10.1155/2019/2820853>
23. Mhaidly, R., & Mechta-Grigoriou, F. (2020). Fibroblast heterogeneity in tumor micro-environment: Role in immunosuppression and new therapies. *Seminars in Immunology*, 48, 101417.
<https://doi.org/10.1016/j.smim.2020.101417>
 24. Monteran, L., & Erez, N. (2019). The dark side of fibroblasts: Cancer-associated fibroblasts as mediators of immunosuppression in the tumor microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 10(AUG), 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01835>
 25. Murakami, T., Hiroshima, Y., Matsuyama, R., Homma, Y., Hoffman, R. M., & Endo, I. (2019). Role of the tumor microenvironment in pancreatic cancer. In *Annals of Gastroenterological Surgery* (Vol. 3, Issue 2, pp. 130–137). Wiley-Blackwell Publishing Ltd.
<https://doi.org/10.1002/ags3.12225>
 26. Papait, A., Stefani, F. R., Cargnoni, A., Magatti, M., Parolini, O., & Silini, A. R. (2020). The Multifaceted Roles of MSCs in the Tumor Microenvironment: Interactions With Immune Cells and Exploitation for Therapy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 447.
<https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.00447>
 27. Patil, K., Khan, F. B., Akhtar, S., Ahmad, A., & Uddin, S. (2021). The plasticity of pancreatic cancer stem cells: implications in therapeutic resistance. *Cancer Metastasis Reviews*, 40(3), 691–720. <https://doi.org/10.1007/S10555-021-09979-X>
 28. Pereira, B. A., Vennin, C., Papanicolaou, M., Chambers, C. R., Herrmann, D., Morton, J. P., Cox, T. R., & Timpson, P. (2019). CAF Subpopulations: A New Reservoir of Stromal

- Targets in Pancreatic Cancer. *Trends in Cancer*, 5(11), 724–741. <https://doi.org/10.1016/J.TRECAN.2019.09.010>
29. Perez, V. M., Kearney, J. F., & Yeh, J. J. (2021). The PDAC Extracellular Matrix: A Review of the ECM Protein Composition, Tumor Cell Interaction, and Therapeutic Strategies. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FONC.2021.751311>
 30. Philip, M., & Schietinger, A. (2021). CD8⁺ T cell differentiation and dysfunction in cancer. *Nature Reviews Immunology* 2021 22:4, 22(4), 209–223. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00574-3>
 31. Pountos, I., & Giannoudis, P. V. (2005). Biology of mesenchymal stem cells. *Injury*, 36 Suppl 3, S8. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2005.07.028>
 32. Rivera-Cruz, C. M., Shearer, J. J., Figueiredo Neto, M., & Figueiredo, M. L. (2017). The immunomodulatory effects of mesenchymal stem cell polarization within the tumor microenvironment niche. *Stem Cells International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/4015039>
 33. Squillaro, T., Peluso, G., & Galderisi, U. (2016). Clinical trials with mesenchymal stem cells: An update. *Cell Transplantation*, 25(5), 829–848. <https://doi.org/10.3727/096368915X689622>
 34. Strioga, M., Viswanathan, S., Darinskas, A., Slaby, O., & Michalek, J. (2012). Same or not the same? comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells and Development*, 21(14), 2724–2752. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0722>
 35. Sun, Z., Wang, S., & Zhao, R. C. (2014). The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. *Journal of Hematology & Oncology*

- 2014 7:1, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-7-14>
36. Sunami, Y., Häußler, J., & Klee, J. (2020). Cellular heterogeneity of pancreatic stellate cells, mesenchymal stem cells, and cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer. *Cancers*, 12(12), 1–15. <https://doi.org/10.3390/cancers12123770>
 37. von Itzstein, M. S., Burke, M. C., Brekken, R. A., Aguilera, T. A., Zeh, H. J., & Beg, M. S. (2020). Targeting TAM to Tame Pancreatic Cancer. *Targeted Oncology*, 15(5), 579–588. <https://doi.org/10.1007/S11523-020-00751-9/FIGURES/1>
 38. Wörmann, S. M., Diakopoulos, K. N., Lesina, M., & Algül, H. (2013). The immune network in pancreatic cancer development and progression. *Oncogene* 2014 33:23, 33(23), 2956–2967. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.257>
 39. Wu, Y., Zhang, C., Jiang, K., Werner, J., Bazhin, A. V., & D’Haese, J. G. (2021). The Role of Stellate Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Targeting Perspectives. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.621937>
 40. Zhou, Q., Tao, X., Xia, S., Guo, F., Pan, C., Xiang, H., & Shang, D. (2020). T Lymphocytes: A Promising Immunotherapeutic Target for Pancreatitis and Pancreatic Cancer? *Frontiers in Oncology*, 10, 382. <https://doi.org/10.3389/FONC.2020.00382/BIBTEX>
 41. Zhu, S., Yang, N., Wu, J., Wang, X., Wang, W., Liu, Y. J., & Chen, J. (2020). Tumor microenvironment-related dendritic cell deficiency: a target to enhance tumor immunotherapy. *Pharmacological Research*, 159, 104980. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2020.104980>

BÖLÜM V

Kolorektal Kanser Metastazında MikroRNA'lar

Şeyda BERK¹

Giriş

MikroRNA'lar (miRNA'lar), hedef mRNA'ların tamamlayıcı 3'-çevrilmemiş bölgelerine (UTR'ler) bağlanarak transkripsiyon sonrası gen düzenleyicileri olarak görev yapan ~22 nükleotit uzunluğuna sahip, yüksek oranda korunmuş, küçük, kodlamayan RNA'ların bir sınıfıdır (Bartel, 2009). İnsan protein kodlayan genlerin %60'ından fazlasının miRNA'lar tarafından düzenlendiği göz önüne alındığında, miRNA'ların farklılaşma, metabolizma, çoğalma, hayatta kalma ve apoptoz gibi temel hücrel biyolojik süreçlerde rol aldığı düşünülmektedir (Friedman & ark., 2009). Ek olarak, uzun 3'UTR'ye sahip genler sıklıkla birden fazla miRNA bağlanma bölgesine sahiptir, bu da miRNA ağının karmaşıklığını göstermektedir (Croce, 2009). İlk miRNA olan lin4, 1993 yılında

¹ Dr. Öğretim Üyesi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi

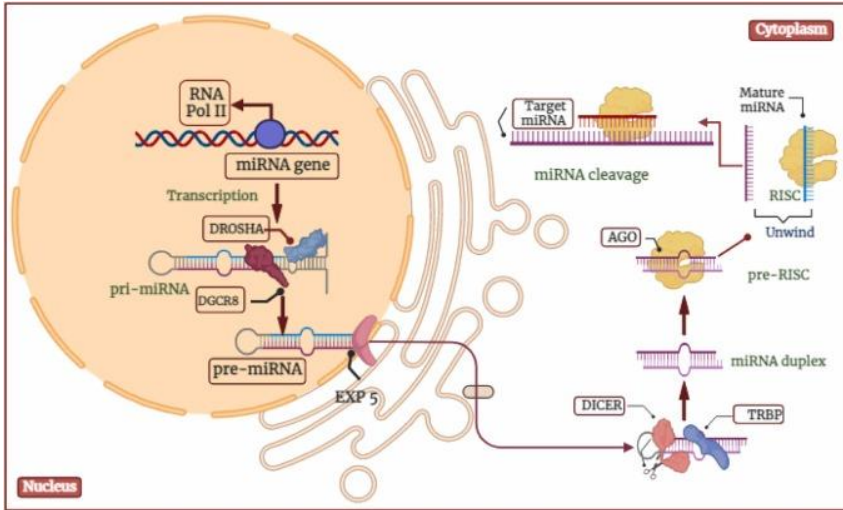
Caenorhabditis elegans (*C.elegans*) model organizmasında keşfedilmiştir (Lee & ark., 1993). 2000 yılında ilk memeli miRNA'sı olan let-7'nin, mRNA'sının 3'-UTR'leri ile diziye özgü RNA-RNA etkileşimi yoluyla heterokronik gen lin-41'in ekspresyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir (Pasquinelli & ark., 2000; Reinhart & ark., 2000). 2002 yılında Dr. Croce grubu ilk kez miRNA'nın insan kanseri patogeneğinde rol oynadığını bildirmiştir (Calin & ark., 2002). 13q14 kromozom bölgesinde bulunan miR-15a ve miR-16-1'in, B hücreli kronik lenfositik lösemide (KLL) sıklıkla silindiğine dair en eski kanıtı göstermişlerdir (Calin & ark., 2002). Geçtiğimiz on yılda, bir dizi çalışma, miRNA'ların, başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıklardaki fonksiyonlarını ortaya çıkarmıştır (Rupaimoole & Slack, 2017).

Dünya Sağlık Örgütü'nün Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) 2020 yılı verilerine göre dünya genelinde yeni kolorektal kanser vaka sayısının yaklaşık 2 milyon iken yaklaşık 936.000 ölümün kolorektal kanserden kaynaklı gerçekleşmiştir (Sung & ark., 2021). Kolorektal kanser (KRK), 2020'de 230.000'den fazla vakanın meydana geldiği tahmin edilen Türkiye'deki akciğer ve meme kanserinden sonra en yaygın üçüncü malignitedir (Sung & ark., 2021). KRK'ye bağlı ölümlerin yaklaşık %90'ı metastazlardan kaynaklanmaktadır, ancak bu sürecin altında yatan mekanizma belirsizliğini korumaktadır (Muhammad & ark., 2014). Metastazın karmaşık çok adımlı süreci, çevre dokuların invazyonu, damar içine damar yoluyla geçiş, sistemik dolaşım yoluyla translokasyon, uzak ikincil bölgelerin (karaciğer ve akciğerler) parankimine ekstrasvazyon, mikrometastazların kurulması ve son olarak makroskobik ikincil tümörlerin oluşumu oluşması dahil olmak üzere çok sayıda aşamaya ayrılabilir (Mani & ark., 2007) Son zamanlarda metastazda rol oynayan genleri ve bunların ürünlerini araştırmak için çok sayıda çalışma yürütülmektedir (Gui & Bivona, 2022).

KRK'nin erken teşhisi ve önlenmesi, hastalığın prekanseröz poliplerden invaziv kansere ve son dönem hastalığa kadar sinsi doğası sayesinde mümkün olmaktadır. Tarama yoluyla kanserin erken tespiti, kanser öncesi büyümelerin giderilebilmesi nedeniyle

tedavinin daha başarılı olmasını sağlar (Venugopal & Stoffel, 2019). Farmakolojik ajanlar ve kimyasal bileşiklerden oluşan kemoterapi, ileri kanser evrelerinde temel terapötik yaklaşım olarak veya metastatik hastalığın varlığında cerrahi prosedürlerin ardından yardımcı bir müdahale olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Ades, 2009). Bununla birlikte, bu terapötik müdahaleler sıklıkla önemli advers reaksiyonlarla ve kemoterapilere karşı direnç gelişimiyle ilişkili olmuştur (Wu & ark., 2013).

RNA'lar, proteinler, epigenetik değişiklikler ve glikoproteinler dahil olmak üzere KRK için birçok potansiyel biyobelirteç arasında miRNA'lar yeni terapötik, prognostik ve tanısal biyobelirteçler olarak ortaya çıkmıştır (Yaghoubi & ark., 2021). Hücrenin içeriğine bağlı olarak miRNA'lar, tümör baskılayıcı veya onkogen olarak rol oynayabilir (Chen & ark., 2019). Son yıllarda yapılan çalışmalar, KRK'nın oluşumunda ve ilerlemesinde mikroRNA'ların (miRNA'lar) rolünü kanıtlamıştır (X. Huang & ark., 2021; Muhammad & ark., 2014). MiRNA genlerinin %50'sinden fazlasının yer aldığı hassas kromozomal bölgeler, tümörün ilerlemesi sırasında değişmektedir (Vickers & ark., 2012). MiRNA'lar, hedef genlerin ekspresyonunu transkripsiyon sonrası modüle eden küçük, endojen, düzenleyici RNA molekülleridir. MiRNA'lar, protein kodlayan genler arasındaki aralayıcı bölgelerde veya protein kodlayan genlerin intronlarında bulunur ve ya kendi promoterlerine sahiptirler ya da protein kodlayan genlerle aynı promoterleri kullanırlar ve protein kodlayan genlerin mRNA'larıyla aynı şekilde birincil miRNA'lar (pri-miRNA'lar) olarak kopyalanırlar. Pri-miRNA'lar çekirdekte işlendikten sonra miRNA öncüleri (pre-miRNA'lar) haline gelir ve bunlar daha sonra sitoplazmaya taşınır ve burada olgun miRNA'lara dönüştürülür (Şekil 1) (Doghish & ark., 2023). Transkripsiyon sonrası olarak, miRNA'lar mükemmel tamamlayıcılık durumunda hedef mRNA'yı bozar ve kusurlu tamamlayıcılık durumunda çevirileri engeller, dolayısıyla gen ekspresyonunu kontrol eder (Doghish & ark., 2022; Elrebehy & ark., 2022).



Şekil 1. miRNA biyogenez yolu. Ago: argonaute1; DGCR8:DiGeorge Kritik Bölge 8; Dicer: insanlarda DICER1 geni tarafından kodlanan bir endoribonükleaz enzimi; Drosha: çift sarmallı RNA'ya özgü endoribonükleaz; Ran: RAS ile ilişkili Nükleer protein; RISC: RNA kaynaklı susturma kompleksi; RNA Pol II: RNA polimeraz II; TRBP: işlem yanıt elemanı RNA bağlayıcı protein (Mohammed, 2023).

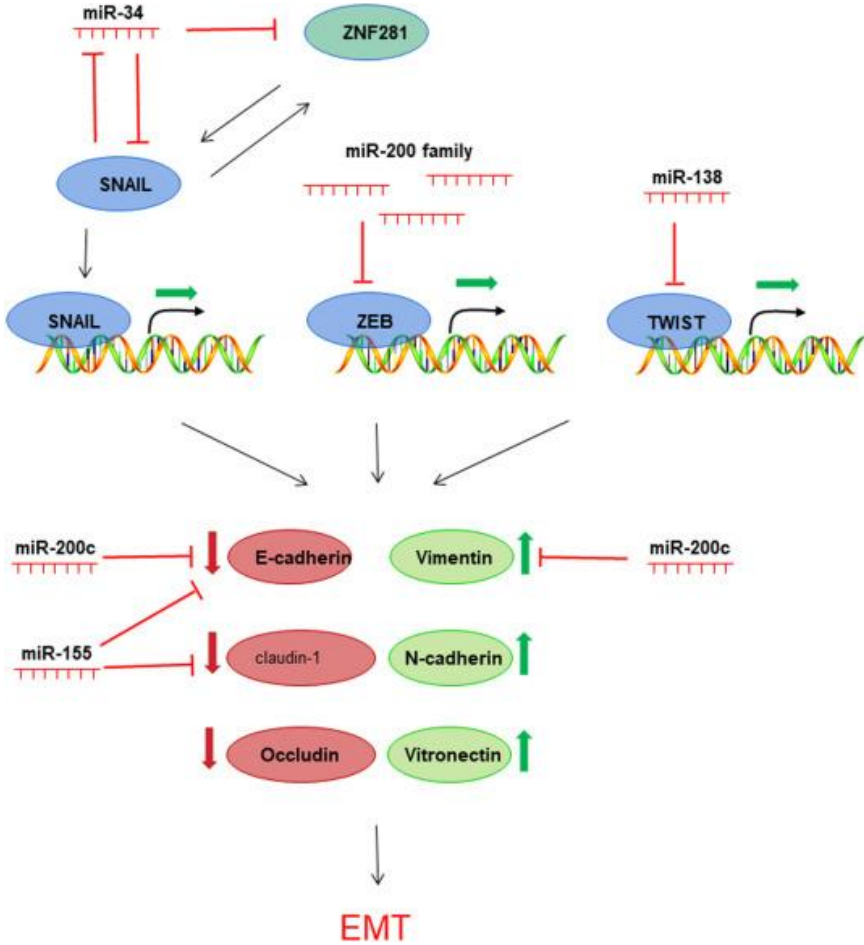
MiRNA'lar evrimsel olarak korunmuş moleküllerdir ve kanser kök hücre biyolojisini, anjiyogenezi, epitelyal-mezenkimal ve mezenkimal-epitelyal geçişi veya ilaç direncini etkileyerek KRK metastazı dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlere katılabilirler (Ha, 2011). MiRNA'ların ifadesindeki bir sapma, KRK'nın ilerlemesine yol açar (Schetter & ark., 2008). Bu etki, miRNA lokuslarının silinmesi, amplifikasyonu veya nokta mutasyonları, epigenetik susturma, transkripsiyon faktörlerinin serbestleştirilmesi (miRNA ifadesinin değiştiricileri) veya birincil miRNA'nın olgun formuna işlenmesinin inhibisyonu ile oluşabilmektedir (Valadi & ark., 2007). Belirli spesifik miRNA'lar, yukarı regüle edildiklerinde, büyüme/çoğalma inhibisyonundan sorumlu genleri baskılayabilir ve diğer spesifik miRNA'ların aşağı regülasyonu, büyüme/çoğalma teşvikinden sorumlu genlerin

ekspresyonunu arttırarak kanserin gelişmesine veya ilerlemesine neden olabilir. Ancak insan kanserlerinde miRNA'ların düzensiz ekspresyon süreçleri hala tam olarak anlaşılamamıştır (Muhammad & ark., 2014).

MiRNA'lar: Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT)

EMT, tümörün ilerlemesinde ve metastazında temel bir rol oynamaktadır. SNAIL1/2, ZEB1/2 ve TWIST1 dahil olmak üzere çeşitli transkripsiyon faktörlerinin EMT'nin güçlü sürücüsü olduğu rapor edilmiştir (Craene & Berx, 2013). miRNA'lar, Kolorektal kanserde EMT'de rol oynayan genleri inhibe ederek EMT'yi düzenleyebilmektedir (Şekil 2). miR-200 ailesi, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c ve miR-429'dan oluşan iyi bilinen bir tümör baskılayıcıdır. miR-200 ailesinin, KRK dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde ZEB1 ve ZEB2'yi hedefleyerek EMT'yi baskılayarak metastatik potansiyeli inhibe ettiği rapor edilmiştir (Chen & ark., 2014; Pecot & ark., 2013; Toiyama & ark., 2014). Hur ve meslektaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada miR-200c'nin birincil KRK dokularının istilacı ön kısmında aşağı regüle edildiği gösterilmiştir (Keun Hur & ark., 2013). miR-200c, doğrudan ZEB1, ETS1, fms ile ilişkili tirozin kinaz 1'i (FLT1) hedefleyerek ve dolaylı olarak E-kadherin ve vimentin ekspresyonunu düzenleyerek KRK metastazında kritik işlevlere sahip olduğu gösterilmiştir (Keun Hur & ark., 2013). Ek olarak miR-200c-3p, KRK'de yeni bir onkojenik kodlamayan RNA olan N-BLR'yi hedefleyerek ve E-kadherin ve ZEB1 ile çapraz etkileşim kurarak KRK göçünü ve istilasını baskılamaktadır (Rigoutsos & ark., 2017). MiR-200 ailesinin EMT sürecindeki kritik fonksiyonları göz önüne alındığında, bu miRNA'ların KRK metastazı için potansiyel biyobelirteçler olabileceği düşünülebilir. Ayrıca, yukarı regüle edilmiş miRNA-155, E-kadherin ve claudin-1 ekspresyonlarını inhibe ederek KRK göçünü ve istilasını teşvik etmek için EMT'yi düzenlemektedir (Zhang & ark., 2013). Çinko parmak proteini 281 (ZNF281), EMT'nin bir düzenleyicisidir ve ZNF281'in miR-34 aracılı aşağı regülasyonu mezenkimal-epitelyal geçişi (MET) indüklerken, EMT indükleyen faktör SNAIL doğrudan ZNF281

transkripsiyonunu indükleyerek kolorektal kanserde ZNF281 mRNA'nın aşağı regülasyonunu hafifletmek için miR-34'ü baskılamaktadır (Hahn & ark., 2013).



Şekil 2. miRNA'ların kolorektal kanserde EMT'yi düzenlemesi (X. Huang & ark., 2021).

MiRNA'lar: İnvazyon

Kanser hücreleri, açık metastatik lezyonların gelişmesinden önce çevredeki dokulara ve uzak organlara göç etme ve istila etme

eğilimi ile tutarlı özellikler sergiler (L. F. Lu & A. Liston, 2009). Tümör ilerlemesindeki erken bir adım, kanser hücrelerinin tümör kitlesinden komşu dokuya yayılmasıdır. Proteolitik enzimlerin (metaloproteazlar dahil) yönlü aktivasyonu, hücre dışı matrisin bozulması, kanser fenotipinin epitelyalden mezenkimale (EMT) geçişi ve kanser hücrelerinin translokasyonu dahil olmak üzere, kötü huylu hücrelerin yerel ve uzak bölgelere yayılma potansiyellerinin artması, çeşitli hücresel olaylarla bağlantılı olduğu bilinmektedir (Muhammad & ark., 2014). İnvazyon sürecine katkıda bulunan çeşitli miRNA'lar Tablo 1'de listelenmiştir.

Tablo 1. İnvazyon, anjiyogenez, intravazasyon, ekstrasvazasyon ve kolonizasyon süreçlerinde rol oynayan mikroRNA'lar

MicroRNA'lar ve invazyon			
miRNA	Regülasyonu	Etkisi	Referans
miR-31	↑	KRK hücrelerinin in vitro ve in vivo invazyonu	(Arndt & ark., 2009)
miR-122	↑	Neoplastik olmayan dokudan displaziye geçiş	(Fu & ark., 2012)
	↓	İnflamatuvar bağırsak hastalığı ile ilişkili KRK'ye displazi	(Fu & ark., 2012)
miR-200 ailesi	↑	Agresif bir fenotip özellik sergileme	(Huang & ark., 2010)
miR-328	↓	Kanser kök hücresine benzer özellikler gösteren yüksek oranda yan popülasyon (SP) hücrelerinin artışı ile ilişkili	(Sundaram & ark., 2011)
miR-143	↓	Hücre büyümesi, göçü ve invazyonun uyarılması	(Zhang & ark., 2012)
miR-145, miR-103, miR-107	↑	Fare modelinde teşvik edilen lokal	(Pu & ark., 2010)

		invazyon ve karaciğer metastazı	
miR-29a	↑	Normal epitel dokusuyla karşılaştırıldığında KRK tümör örneklerinde yüksek ekspresyon; Karaciğer metastazı olan KRK'yi metastatik olmayan KRK'den ayıran spesifik ve hassas bir belirteç	(Nakajima & ark., 2006; Xing & ark., 2012)
miR-21, miR-17, miR-19a	↑	Hücre çoğalması ve KRK metastazı	(Motoyama & ark., 2009)
MicroRNAlar ve anjiyogenez			
miRNA	Hedef genler/aktivatörler	Etkisi	Referans
miR-194	THBS1(thrombospondin 1)	↑	(Fish & ark., 2008)
miR-221, miR-222	c-Kit, Stat5A(Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 5A'nın aktivatörü), eNOS (Endotelial nitrik oksit sentaz), ve ETS1 (v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1)	↓	(Ota & ark., 2012)
miR-17-92 (Oncomir-1)	TSP-1 (tümör baskılayıcı bölge 1) ve CTGF (Bağ dokusu büyüme faktörü)	↑	(Wang & ark., 2012)
miR-126	SPRED1 (Sprouty ile ilgili EVH1 Domaini 1) ve PIK3R2 (fosfoinositid-3-kinaz düzenleyici alt birim 2), p85beta	↑	(Wang & ark., 2010)
miR-210	KRAS mutasyonunun eşlik ettiği hipoksi kaynaklı miR-210 aktivasyonu	↑	(Kanaan & ark., 2012)

miR-497	IGF1-R (insülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü)	↓	(K. Hur & ark., 2013)
miR-424	Anjiyojenik genlerin hipoksi kaynaklı aktivasyonu	↑	(K. Xu & ark., 2012)
MicroRNAlar ve intravazasyon, ekstrasvazasyon, kolonizasyon			
miRNA	Regülasyonu	Etkisi	Referans
Intravasatıon, extravasatıon			
miR-21	↓ Pdc4 (programlanmış hücre ölümü 4)	↑ İntravazasyon ve metastatik potansiyel	(Li-Fan Lu & Adrian Liston, 2009; X. Xu & ark., 2012)
miR-126	↓ VCAM-1 (vasküler hücre adezyon molekülü 1)	↓ Hücre-hücre adhezyonunun azalması, lökosit-epitelyal hücre adhezyonu, inflamasyon	(Ma & ark., 2011)
miR-155		Adaptif ve doğuştan gelen bağışıklık için gereklidir	(Chen & ark., 2012)
miR-17-92		B hücrelerinin ve konvansiyonel T hücrelerinin adaptif farklılaşması	(Chen & ark., 2012)
Kolonizasyon			
miR-328	↓ SP hücrelerinde	Düşük miR-328 ifadesi, yüksek SP fraksiyonuyl koreledir	(Sundaram & ark., 2011)
miR-26b	↓ HUES-17 (insan embriyonik kök hücre (hESC) hattı) ve KRK hücre hatları	↓ Hücre büyümesi ve apoptozun indüksiyonu	(Zhu & ark., 2011)
miR-103/107	↓ DAPK (ölümle ilişkili protein kinaz) ve KLF4 (Kruppel benzeri transkripsiyon faktörü 4)	↑ Kolonizasyon	(Fish & ark., 2008)

MiRNA'lar: Anjiyogenez

Anjiyogenez olarak da bilinen yeni kan damarlarının oluşumu, kanser de dahil olmak üzere çeşitli patolojik durumlarda düzensizleşebilen önemli bir fizyolojik süreçtir (Poliseno & ark., 2006). Herhangi bir bölgedeki hem birincil hem de ikincil (metastatik) tümör büyümesi, anjiyogenezin temel bileşenleridir (Bonauer & ark., 2009). Pro- ve anti-anjiyogenik faktörler tarafından düzenlenen, tümörün yakınındaki anjiyogenez, büyümesi ve kan dolaşımıyla teması için gereklidir (Friedl & Alexander, 2011). Yapılan çalışmalar, miRNA'ların pro-anjiyogenik veya anti-anjiyogenik etkiler uygulayarak anjiyogenezi düzenleyebileceğini göstermektedir (Bierie & Moses, 2006; Bockhorn & ark., 2007). MiRNA'ların, anjiyogenezin inhibitörlerini veya aktivatörlerini kodlayan mRNA'ların seviyelerini düzenleyerek KRK anjiyogenezinde ayırt edici roller oynayabileceği görülmektedir. Anjiyogenezde yer alan çeşitli miRNA'lar Tablo 1'de listelenmiştir.

MiRNA'lar: İnvazasyon, ekstrasvazasyon ve kolonizasyon

Bir kanser hücresinin bazal membranı geçerek kan/lenf damarlarına nasıl girdiğinin kesin mekanizması hâlâ belirsizdir. MiRNA'ların tümör büyümesi, istilası ve invazasyonu ile bağlantısı, karmaşık mekanizmalar hala tam olarak anlaşılmamasına rağmen, yakın zamanda yayınlanan çalışmalarla gösterilmiştir. Kayma stresi ve bağışıklık sistemi saldırıları nedeniyle kanser hücrelerinin kan dolaşımına girdiklerinde bozulması meydana gelebilir (Penna & ark., 2011). MiRNA'ların kesin rolü hala bilinmese de miRNA'lar, kanser hücrelerinin kan/lenf damarlarındaki bağışıklık sistemi tarafından tanınmaktan kaçmasına yardımcı oluyor gibi görünmektedir (Muhammad & ark., 2014). Kanser hücrelerinin kılcal damarlardan kaçarak parankimi istila etmesi, birincil tümörden uzakta kanser hücresi kolonileri oluşturmadan önceki bir adımdır. MiRNA'lar tarafından düzenlenen bu süreçlere dayanarak, yalnızca birkaç çalışmada gösterildiği gibi miRNA'ların kanser hücresi ekstrasvazasyonunu etkileyebileceği

hipotezi öne sürülmektedir (Dieter & ark., 2011; He & ark., 2009). Kanser metastazındaki son adım uzak ikincil bölgelere kolonizasyondur ve yeni organın mikroçevresi oldukça önemlidir. Bu mikro çevreye metastatik kolonizasyon, kanser hücrelerinin çoğalma ve yeni koşullara uyum sağlama yeteneğine bağlı olabilmektedir. Kendini yenileme ve çok potansiyelli olma yeteneği ile karakterize edilen kanser kök hücreleri, uzak metastazların oluşumuna yardımcı olabilecek kanser hücrelerinin bir alt popülasyonudur (Muhammad & ark., 2014). MiRNA'lar kök hücrelerin fenotipi için gerekli olan yolları kontrol edebilir. Kök olmayan muadilleriyle karşılaştırıldığında kanser kök hücrelerinde anormal miRNA seviyeleri gözlemlenmiştir (Hwang & ark., 2021). Bu miRNA'ların kanser hücrelerinin kök hücre özelliklerini düzenleyebileceği göz önüne alındığında, muhtemelen KRK metastazında rol oynayabilmektedirler ve KRK hücrelerinin metastatik bir bölgede kolonizasyonunu sağlayabilmektedirler ancak bunun kesin mekanizması henüz tam aydınlatılamamıştır (Bandres & ark., 2009). İntravazasyon, ekstrasvazasyon kolonizasyon süreçlerini düzenleyen MiRNA'lar Tablo 1'de listelenmiştir.

KRK'de miRNA'ların klinik uygulaması

Karsinoembriyonik antijen (CEA) ve karbonhidrat antijeni 19-9 (CA19-9), en sık kullanılan plazma biyobelirteçleridir; CEA, zayıf özgüllükleri ve duyarlılıklarına rağmen KRK nüksünü tanımlamak için kullanılmaktadır (Duffy, 2001; Elkady & ark., 2016). Bu nedenle, KRK'nin en erken aşamalarında son derece doğru, düşük çaba gerektiren tespitini mümkün kılmak için teşhis ve prognostik yaklaşımların iyileştirilmesine ihtiyaç vardır. miRNA'ların hem stabilite hem de hassasiyet sergiledikleri bulunmuştur, bu da onları çeşitli numune türlerinde güvenilir ve niceliksel tespit için uygun hale getirmiştir. Bu numuneler plazmayı, dokuları, serumu, balgamı, idrarı, dışkıyı ve tükürüğü kapsamaktadır (J. Huang & ark., 2021). Ayrıca, klinik öncesi ortamlarda farklı miRNA'ların ve araştırma teknolojilerinin değerlendirilmesine ilişkin devam eden çalışmalar bulunmaktadır (Mitchell & ark., 2008).

Birçok araştırma serum, eksozomal ve dışkı dahil olmak üzere çeşitli vücut sıvılarındaki miRNA'ların erken tanıya yardımcı olabileceğini göstermiştir. Çoğu çalışma dolaşımdaki serum miRNA'larına odaklanmıştır çünkü tek bir miRNA bile KRK'yi teşhis etmek için kullanılabilir (Kijima & ark., 2017; Maierthaler & ark., 2017). Örneğin, miR-21 ve miR-210 aşırı ekspresyonu ve miR-126 aşağı regülasyonu, KRK'nın erken tespiti için büyük potansiyel göstermektedir (Liu & ark., 2021; Sabry & ark., 2019). KRK hastaları üzerinde yapılan çok sayıda çalışma, tespit açısından stabilitesi ve erken evre KRK ile pozitif bağlantısı nedeniyle kan miR-203'ü geçerli bir tanı faktörü olarak tanımlamıştır (Okugawa & ark., 2019; Ye & ark., 2017). Hem erken evre KRK hastaların hem de ileri evre KRK hastaların serumunda eksozomal miR-126, miR-940, miR-23a ve miR-1290'ın önemli ölçüde yukarı regüle edildiği gösterilmiştir (Shi & ark., 2021).

KRK teşhisi için potansiyel biyobelirteçlerin örnekleri arasında, KRK hastalarda görülen GPC1 + eksozomlarda miR-96–5p ve miR-149'un aşağı regülasyonu yer almaktadır (Li & ark., 2017; Salman & ark., 2014; Zhao & ark., 2021). Benzer şekilde, miR-17–5p ve miR-92a-3p, erken evre KRK hastalarından alınan eksozomlarda daha fazla miktarda bulunmuştur (Fu & ark., 2018). Hem miR-4478 hem de miR-1295b-3p, erken evre KRK'de aşağı regülasyon gösterir, bu da onların hastalık için yararlı tanılabilir belirteçler olarak hizmet edebileceklerini göstermektedir (Ghanbari & ark., 2015; Ghanbari & ark., 2017).

KRK'de genel sağkalım ve tedaviye yanıt verme yeteneğinin tümü, hastalık gelişimiyle bağlantılı olan miRNA ekspresyon seviyelerine dayalı olarak tahmin edilebilmektedir. KRK hastalarında miRNA'ların tanımlanması, gelişmiş tedavi stratejilerine bilgi sağlama potansiyeline sahiptir. Metastazda yer alan birçok miRNA'nın, KRK hastalarında potansiyel prognostik göstergeler olduğu ileri sürülmüştür (Dong & ark., 2011). MiR-106–5p ve miR-592 dahil olmak üzere bazı miRNA'lar KRK prognozu ile ilişkilendirilmiştir (Drusco & ark., 2014). Aynı şekilde, spesifik bir miRNA profili, yukarı regüle edilmiş miR-21 (Zedain & ark.,

2020), miR-103 (Wang & ark., 2018) ve miR-93 (Wei & ark., 2019) ve aşağı regüle edilmiş miR-566 dahil olmak üzere, KRK hastalarında prognoz ve metastazı öngörmek için faydalı olmuştur (Drusco & ark., 2014).

KRK hastalarının prognozu eksozomal miRNA'lardan da etkilenebilmektedir (Kosaka & ark., 2010). Daha yüksek TNM evreli KRK'li hastalarda eksozomal miR-21 düzeyleri daha yüksek bulunmuştur, bu da miR-21'in başlı başına KRK riskinin bir göstergesi olabileceğini düşündürmektedir (Tsukamoto & ark., 2017). Serum eksozomlarındaki düşük miR-548c-5p seviyeleri aynı zamanda KRK hastalarında artan TNM evresi ve daha kötü genel sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (Peng & ark., 2019). Araştırmacılar arasında KRK'li bireylerde prognozu tahmin etmek için dışkıdaki miRNA'ların kullanılmasına büyük ilgi vardır (Chi & Zhou, 2016). Yüksek düzeyde miR-92a, KRK'de kötü prognozla ilişkilendirilmiştir ve kan örneklerinde ve dışkıda prognozun bir göstergesi olarak bulunmuştur (Chen & ark., 2018).

MiRNA, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde merkezi bir role sahiptir ve anormal miRNA ekspresyonu, KRK'nin patogenezinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Yapılan birçok çalışma ile miRNA'ların KRK'nin tanısı, prognozu, ilerlemesi, metastazı ve ilaç direnci ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Her ne kadar miRNA'lar metastatik kaskad boyunca çok önemli bir role ve KRK'nin tanı ve tedavisinde önemli bir role sahip olsa da, gerçekçi beklentileri belirlemek için birden fazla bağımsız kohortta daha geniş ölçekli değerlendirmelerin gerçekleştirilmesinde fayda olacaktır. Ek olarak, miRNA bazlı terapötiklerde başarıya ulaşmak için belirli bir tümör tipinde miRNA sinyallemeinin derinlemesine anlaşılması gerekir. Ayrıca, ileriki çalışmaların miRNA'ların istenmeyen hedef dışı etkilerini en aza indirmeye ve daha verimli ve spesifik miRNA dağıtım yöntemleri geliştirmeye odaklanması gerekmektedir.

KAYNAKÇA

Ades, S. (2009). Adjuvant chemotherapy for colon cancer in the elderly: moving from evidence to practice. *Oncology*, 23(2), 162-162.

Arndt, G. M., Dossey, L., Cullen, L. M., Lai, A., Druker, R., Eisbacher, M., Zhang, C., Tran, N., Fan, H., Retzlaff, K., Bittner, A., & Raponi, M. (2009). Characterization of global microRNA expression reveals oncogenic potential of miR-145 in metastatic colorectal cancer. *BMC cancer*, 9, 374.
<https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-374>

Bandres, E., Bitarte, N., Arias, F., Agorreta, J., Fortes, P., Agirre, X., Zarate, R., Diaz-Gonzalez, J. A., Ramirez, N., & Sola, J. J. (2009). microRNA-451 regulates macrophage migration inhibitory factor production and proliferation of gastrointestinal cancer cells. *Clinical Cancer Research*, 15(7), 2281-2290.

Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *cell*, 136(2), 215-233.

Bierie, B., & Moses, H. L. (2006). Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer*, 6(7), 506-520.
<https://doi.org/10.1038/nrc1926>

Bockhorn, M., Jain, R. K., & Munn, L. L. (2007). Active versus passive mechanisms in metastasis: do cancer cells crawl into vessels, or are they pushed? *Lancet Oncol*, 8(5), 444-448.
[https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(07\)70140-7](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(07)70140-7)

Bonauer, A., Carmona, G., Iwasaki, M., Mione, M., Koyanagi, M., Fischer, A., Burchfield, J., Fox, H., Doebele, C., & Ohtani, K. (2009). MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science*, 324(5935), 1710-1713.

Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., & Rai, K. (2002).

Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the national academy of sciences*, 99(24), 15524-15529.

Chen, B., Xia, Z., Deng, Y.-N., Yang, Y., Zhang, P., Zhu, H., Xu, N., & Liang, S. (2019). Emerging microRNA biomarkers for colorectal cancer diagnosis and prognosis. *Royal Society Open Biology*, 9(1), 180212.

Chen, E., Li, Q., Wang, H., Yang, F., Min, L., & Yang, J. (2018). MiR-92a promotes tumorigenesis of colorectal cancer, a transcriptomic and functional based study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 1370-1377.

Chen, H.-Y., Lin, Y.-M., Chung, H.-C., Lang, Y.-D., Lin, C.-J., Huang, J., Wang, W.-C., Lin, F.-M., Chen, Z., & Huang, H.-D. (2012). miR-103/107 promote metastasis of colorectal cancer by targeting the metastasis suppressors DAPK and KLF4. *Cancer research*, 72(14), 3631-3641.

Chen, L., Gibbons, D. L., Goswami, S., Cortez, M. A., Ahn, Y.-H., Byers, L. A., Zhang, X., Yi, X., Dwyer, D., & Lin, W. (2014). Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression. *Nature communications*, 5(1), 5241.

Chi, Y., & Zhou, D. (2016). MicroRNAs in colorectal carcinoma-from pathogenesis to therapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35(1), 1-11.

Craene, B. D., & Berx, G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature Reviews Cancer*, 13(2), 97-110.

Croce, C. M. (2009). Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature reviews genetics*, 10(10), 704-714.

Dieter, S. M., Ball, C. R., Hoffmann, C. M., Nowrouzi, A., Herbst, F., Zavidij, O., Abel, U., Arens, A., Weichert, W., Brand, K., Koch, M., Weitz, J., Schmidt, M., von Kalle, C., & Glimm, H.

(2011). Distinct types of tumor-initiating cells form human colon cancer tumors and metastases. *Cell Stem Cell*, 9(4), 357-365. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.08.010>

Doghish, A. S., Elballal, M. S., Elazazy, O., Elesawy, A. E., Elrebehy, M. A., Shahin, R. K., Midan, H. M., & Sallam, A.-A. M. (2023). The role of miRNAs in liver diseases: Potential therapeutic and clinical applications. *Pathology-Research and Practice*, 154375.

Doghish, A. S., Ismail, A., Elrebehy, M. A., Elbadry, A. M., Mahmoud, H. H., Farouk, S. M., Serea, G. A. A., Elghany, R. A. A., El-Halwany, K. K., & Alsawah, A. O. (2022). A study of miRNAs as cornerstone in lung cancer pathogenesis and therapeutic resistance: A focus on signaling pathways interplay. *Pathology-Research and Practice*, 154053.

Dong, Y., Wu, W., Wu, C., Sung, J., Yu, J., & Ng, S. (2011). MicroRNA dysregulation in colorectal cancer: a clinical perspective. *British journal of cancer*, 104(6), 893-898.

Drusco, A., Nuovo, G. J., Zanesi, N., Di Leva, G., Pichiorri, F., Volinia, S., Fernandez, C., Antenucci, A., Costinean, S., & Bottoni, A. (2014). MicroRNA profiles discriminate among colon cancer metastasis. *PloS one*, 9(6), e96670.

Duffy, M. J. (2001). Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clinical chemistry*, 47(4), 624-630.

Elkady, M. A., Abd-Allah, G. M., Doghish, A. S., Yousef, A. A., & Mohammad, O. I. (2016). Matrix metalloproteinase (MMP)-2-1306 C> T gene polymorphism affects circulating levels of MMP-2 in Egyptian asthmatic patients. *Gene Reports*, 5, 57-61.

Elrebehy, M. A., Al-Saeed, S., Gamal, S., El-Sayed, A., Ahmed, A. A., Waheed, O., Ismail, A., El-Mahdy, H. A., Sallam, A.-A. M., & Doghish, A. S. (2022). miRNAs as cornerstones in colorectal cancer pathogenesis and resistance to therapy: A spotlight

on signaling pathways interplay—A review. *International journal of biological macromolecules*, 214, 583-600.

Fish, J. E., Santoro, M. M., Morton, S. U., Yu, S., Yeh, R.-F., Wythe, J. D., Ivey, K. N., Bruneau, B. G., Stainier, D. Y., & Srivastava, D. (2008). miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Developmental cell*, 15(2), 272-284.

Friedl, P., & Alexander, S. (2011). Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *cell*, 147(5), 992-1009. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.016>

Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*, 19(1), 92-105.

Fu, F., Jiang, W., Zhou, L., & Chen, Z. (2018). Circulating exosomal miR-17-5p and miR-92a-3p predict pathologic stage and grade of colorectal cancer. *Translational oncology*, 11(2), 221-232.

Fu, J., Tang, W., Du, P., Wang, G., Chen, W., Li, J., Zhu, Y., Gao, J., & Cui, L. (2012). Identifying microRNA-mRNA regulatory network in colorectal cancer by a combination of expression profile and bioinformatics analysis. *BMC Syst Biol*, 6, 68. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-6-68>

Ghanbari, R., Mosakhani, N., Asadi, J., Nouraei, N., Mowla, S. J., Poustchi, H., Malekzadeh, R., & Knuutila, S. (2015). Decreased expression of fecal miR-4478 and miR-1295b-3p in early-stage colorectal cancer. *Cancer biomarkers*, 15(2), 189-195.

Ghanbari, R., Rezasoltani, S., Hashemi, J., Mohamadkhani, A., Tahmasebifar, A., Arefian, E., Mobarra, N., Asadi, J., Mojarad, E. N., & Yazdani, Y. (2017). Analysis of Previously Verified Fecal and Plasma Down-regulated MicroRNAs in FFPE Tissue Samples of CRC Patients. *Archives of Iranian Medicine*, 20(2), 0-0.

Gui, P., & Bivona, T. G. (2022). Evolution of metastasis: New tools and insights. *Trends in Cancer*, 8(2), 98-109.

Ha, T. Y. (2011). MicroRNAs in Human Diseases: From Cancer to Cardiovascular Disease. *Immune Netw*, 11(3), 135-154. <https://doi.org/10.4110/in.2011.11.3.135>

Hahn, S., Jackstadt, R., Siemens, H., Hüntten, S., & Hermeking, H. (2013). SNAIL and miR-34a feed-forward regulation of ZNF281/ZBP99 promotes epithelial–mesenchymal transition. *The EMBO journal*, 32(23), 3079-3095.

He, X. X., Chen, K., Yang, J., Li, X. Y., Gan, H. Y., Liu, C. Y., Coleman, T. R., & Al-Abed, Y. (2009). Macrophage migration inhibitory factor promotes colorectal cancer. *Mol Med*, 15(1-2), 1-10. <https://doi.org/10.2119/molmed.2008.00107>

Huang, J., Zhang, Y., Xu, Y., Xie, Q., Wu, S., Dong, Y., Chen, B., Xia, Y., Guo, L., & Li, Q. (2021). MiRNA-202-5p promotes Colorectal Carcinogenesis through suppression of PTEN. *Journal of Cancer*, 12(11), 3154.

Huang, X., Zhu, X., Yu, Y., Zhu, W., Jin, L., Zhang, X., Li, S., Zou, P., Xie, C., & Cui, R. (2021). Dissecting miRNA signature in colorectal cancer progression and metastasis. *Cancer Letters*, 501, 66-82. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.12.025>

Huang, Z., Huang, D., Ni, S., Peng, Z., Sheng, W., & Du, X. (2010). Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *International journal of cancer*, 127(1), 118-126.

Hur, K., Toiyama, Y., Takahashi, M., Balaguer, F., Nagasaka, T., Koike, J., Hemmi, H., Koi, M., Boland, C. R., & Goel, A. (2013). MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis. *Gut*, 62(9), 1315-1326. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301846>

Hur, K., Toiyama, Y., Takahashi, M., Balaguer, F., Nagasaka, T., Koike, J., Hemmi, H., Koi, M., Boland, C. R., & Goel, A. (2013). MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal

transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis. *Gut*, 62(9), 1315-1326.

Hwang, G. R., Yuen, J. G., & Ju, J. (2021). Roles of microRNAs in Gastrointestinal Cancer Stem Cell Resistance and Therapeutic Development. *Int J Mol Sci*, 22(4). <https://doi.org/10.3390/ijms22041624>

Kanaan, Z., Rai, S. N., Eichenberger, M. R., Barnes, C., Dworkin, A. M., Weller, C., Cohen, E., Roberts, H., Keskey, B., Petras, R. E., Crawford, N. P., & Galandiuk, S. (2012). Differential microRNA expression tracks neoplastic progression in inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer. *Hum Mutat*, 33(3), 551-560. <https://doi.org/10.1002/humu.22021>

Kijima, T., Hazama, S., Tsunedomi, R., Tanaka, H., Takenouchi, H., Kanekiyo, S., Inoue, Y., Nakashima, M., Iida, M., & Sakamoto, K. (2017). MicroRNA-6826 and-6875 in plasma are valuable non-invasive biomarkers that predict the efficacy of vaccine treatment against metastatic colorectal cancer. *Oncology reports*, 37(1), 23-30.

Kosaka, N., Iguchi, H., & Ochiya, T. (2010). Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer science*, 101(10), 2087-2092.

Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *cell*, 75(5), 843-854.

Li, J., Li, B., Ren, C., Chen, Y., Guo, X., Zhou, L., Peng, Z., Tang, Y., Chen, Y., & Liu, W. (2017). The clinical significance of circulating GPC1 positive exosomes and its regulative miRNAs in colon cancer patients. *Oncotarget*, 8(60), 101189.

Liu, T., Liu, D., Guan, S., & Dong, M. (2021). Diagnostic role of circulating MiR-21 in colorectal cancer: A update meta-analysis. *Annals of Medicine*, 53(1), 87-102.

Lu, L. F., & Liston, A. (2009). MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system. *Immunology*, 127(3), 291-298.

Lu, L. F., & Liston, A. (2009). MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system. *Immunology*, 127(3), 291-298. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03092.x>

Ma, Y. L., Zhang, P., Wang, F., Moyer, M. P., Yang, J. J., Liu, Z. H., Peng, J. Y., Chen, H. Q., Zhou, Y. K., & Liu, W. J. (2011). Human embryonic stem cells and metastatic colorectal cancer cells shared the common endogenous human microRNA-26b. *Journal of cellular and molecular medicine*, 15(9), 1941-1954.

Maiertaler, M., Benner, A., Hoffmeister, M., Surowy, H., Jansen, L., Knebel, P., Chang-Claude, J., Brenner, H., & Burwinkel, B. (2017). Plasma miR-122 and miR-200 family are prognostic markers in colorectal cancer. *International journal of cancer*, 140(1), 176-187.

Mani, S. A., Yang, J., Brooks, M., Schwaninger, G., Zhou, A., Miura, N., Kutok, J. L., Hartwell, K., Richardson, A. L., & Weinberg, R. A. (2007). Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(24), 10069-10074. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703900104>

Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogossova-Agadjanyan, E. L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Brian, K. C., & Allen, A. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the national academy of sciences*, 105(30), 10513-10518.

Mohammed, O. A. (2023). From strings to signals: Unraveling the impact of miRNAs on diagnosis, and progression of colorectal cancer. *Pathology - Research and Practice*, 251, 154857. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.prp.2023.154857>

Motoyama, K., Inoue, H., Takatsuno, Y., Tanaka, F., Mimori, K., Uetake, H., Sugihara, K., & Mori, M. (2009). Over-and under-expressed microRNAs in human colorectal cancer. *International journal of oncology*, 34(4), 1069-1075.

Muhammad, S., Kaur, K., Huang, R., Zhang, Q., Kaur, P., Yazdani, H. O., Bilal, M. U., Zheng, J., Zheng, L., & Wang, X. S. (2014). MicroRNAs in colorectal cancer: role in metastasis and clinical perspectives. *World J Gastroenterol*, 20(45), 17011-17019. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i45.17011>

Nakajima, G., Hayashi, K., Xi, Y., Kudo, K., Uchida, K., Takasaki, K., Yamamoto, M., & Ju, J. (2006). Non-coding microRNAs hsa-let-7g and hsa-miR-181b are associated with chemoresponse to S-1 in colon cancer. *Cancer genomics & proteomics*, 3(5), 317-324.

Okugawa, Y., Toiyama, Y., Hur, K., Yamamoto, A., Yin, C., Ide, S., Kitajima, T., Fujikawa, H., Yasuda, H., & Koike, Y. (2019). Circulating miR-203 derived from metastatic tissues promotes myopenia in colorectal cancer patients. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 10(3), 536-548.

Ota, T., Doi, K., Fujimoto, T., Tanaka, Y., Ogawa, M., Matsuzaki, H., Kuroki, M., Miyamoto, S., Shirasawa, S., & Tsunoda, T. (2012). KRAS up-regulates the expression of miR-181a, miR-200c and miR-210 in a three-dimensional-specific manner in DLD-1 colorectal cancer cells. *Anticancer research*, 32(6), 2271-2275.

Pasquinelli, A. E., Reinhart, B. J., Slack, F., Martindale, M. Q., Kuroda, M. I., Maller, B., Hayward, D. C., Ball, E. E., Degan, B., & Müller, P. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *nature*, 408(6808), 86-89.

Pecot, C. V., Rupaimoole, R., Yang, D., Akbani, R., Ivan, C., Lu, C., Wu, S., Han, H.-D., Shah, M. Y., & Rodriguez-Aguayo, C. (2013). Tumour angiogenesis regulation by the miR-200 family. *Nature communications*, 4(1), 2427.

Peng, Z. Y., Gu, R. H., & Yan, B. (2019). Downregulation of exosome-encapsulated miR-548c-5p is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Journal of cellular biochemistry*, 120(2), 1457-1463.

Penna, E., Orso, F., Cimino, D., Tenaglia, E., Lembo, A., Quaglino, E., Polisenio, L., Haimovic, A., Osella-Abate, S., & De Pittà, C. (2011). microRNA-214 contributes to melanoma tumour progression through suppression of TFAP2C. *The EMBO journal*, 30(10), 1990-2007.

Polisenio, L., Tuccoli, A., Mariani, L., Evangelista, M., Citti, L., Woods, K., Mercatanti, A., Hammond, S., & Rainaldi, G. (2006). MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood*, 108(9), 3068-3071.

Pu, X. x., Huang, G. l., Guo, H. q., Guo, C. c., Li, H., Ye, S., Ling, S., Jiang, L., Tian, Y., & Lin, T. y. (2010). Circulating miR-221 directly amplified from plasma is a potential diagnostic and prognostic marker of colorectal cancer and is correlated with p53 expression. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 25(10), 1674-1680.

Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R., & Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *nature*, 403(6772), 901-906.

Rigoutsos, I., Lee, S. K., Nam, S. Y., Anfossi, S., Pasculli, B., Pichler, M., Jing, Y., Rodriguez-Aguayo, C., Telonis, A. G., & Rossi, S. (2017). N-BLR, a primate-specific non-coding transcript leads to colorectal cancer invasion and migration. *Genome biology*, 18, 1-21.

Rupaimoole, R., & Slack, F. J. (2017). MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature reviews Drug discovery*, 16(3), 203-222.

Sabry, D., El-Deek, S. E., Maher, M., El-Baz, M. A., El-Bader, H. M., Amer, E., Hassan, E. A., Fathy, W., & El-Deek, H. E. (2019). Role of miRNA-210, miRNA-21 and miRNA-126 as diagnostic biomarkers in colorectal carcinoma: impact of HIF-1 α -VEGF signaling pathway. *Molecular and cellular biochemistry*, 454, 177-189.

Salman, T. M., Omran, G. A., El-Naa, M. M., Doghish, A. S., Youns, S., & Awad, M. M. (2014). Protective effect of proanthocyanidins on nephrotoxicity induced by antitumor dose of cisplatin in ehrlich solid tumor-bearing mice. *Arab. J. Lab. Med*, 40(2), 953-965.

Schetter, A. J., Leung, S. Y., Sohn, J. J., Zanetti, K. A., Bowman, E. D., Yanaihara, N., Yuen, S. T., Chan, T. L., Kwong, D. L., Au, G. K., Liu, C. G., Calin, G. A., Croce, C. M., & Harris, C. C. (2008). MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *Jama*, 299(4), 425-436. <https://doi.org/10.1001/jama.299.4.425>

Shi, Y., Zhuang, Y., Zhang, J., Chen, M., & Wu, S. (2021). Four circulating exosomal miRNAs as novel potential biomarkers for the early diagnosis of human colorectal cancer. *Tissue and Cell*, 70, 101499.

Sundaram, P., Hultine, S., Smith, L. M., Dews, M., Fox, J. L., Biyashev, D., Schelter, J. M., Huang, Q., Cleary, M. A., & Volpert, O. V. (2011). p53-responsive miR-194 inhibits thrombospondin-1 and promotes angiogenesis in colon cancers. *Cancer research*, 71(24), 7490-7501.

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 Cancer J Clin*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Toiyama, Y., Hur, K., Tanaka, K., Inoue, Y., Kusunoki, M., Boland, C. R., & Goel, A. (2014). Serum miR-200c is a novel

prognostic and metastasis-predictive biomarker in patients with colorectal cancer. *Annals of surgery*, 259(4), 735.

Tsukamoto, M., Iinuma, H., Yagi, T., Matsuda, K., & Hashiguchi, Y. (2017). Circulating exosomal microRNA-21 as a biomarker in each tumor stage of colorectal cancer. *Oncology*, 92(6), 360-370.

Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*, 9(6), 654-659.

Venugopal, A., & Stoffel, E. M. (2019). Colorectal cancer in young adults. *Current treatment options in gastroenterology*, 17, 89-98.

Vickers, M. M., Bar, J., Gorn-Hondermann, I., Yarom, N., Daneshmand, M., Hanson, J. E., Addison, C. L., Asmis, T. R., Jonker, D. J., & Maroun, J. (2012). Stage-dependent differential expression of microRNAs in colorectal cancer: potential role as markers of metastatic disease. *Clinical & experimental metastasis*, 29, 123-132.

Wang, C.-J., Stratmann, J., Zhou, Z.-G., & Sun, X.-F. (2010). Suppression of microRNA-31 increases sensitivity to 5-FU at an early stage, and affects cell migration and invasion in HCT-116 colon cancer cells. *BMC cancer*, 10(1), 1-11.

Wang, D.-S., ZHANG, M.-S., GAO, Y., & ZHONG, B. (2018). Upregulation of serum miR-103 predicts unfavorable prognosis in patients with colorectal cancer. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 22(14).

Wang, X., Wang, J., Ma, H., Zhang, J., & Zhou, X. (2012). Downregulation of miR-195 correlates with lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Medical oncology*, 29, 919-927.

Wei, H., Yang, Z., & Lin, B. (2019). Overexpression of long non coding RNA CA3-AS1 suppresses proliferation, invasion and promotes apoptosis via miRNA-93/PTEN axis in colorectal cancer. *Gene*, 687, 9-15.

Wu, S., Wang, X., Chen, J., & Chen, Y. (2013). Autophagy of cancer stem cells is involved with chemoresistance of colon cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 434(4), 898-903.

Xing, J., Wan, S., Zhou, F., Qu, F., Li, B., Myers, R. E., Fu, X., Palazzo, J. P., He, X., & Chen, Z. (2012). Genetic polymorphisms in pre-microRNA genes as prognostic markers of colorectal cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 21(1), 217-227.

Xu, K., Liang, X., Shen, K., Sun, L., Cui, D., Zhao, Y., Tian, J., Ni, L., & Liu, J. (2012). MiR-222 modulates multidrug resistance in human colorectal carcinoma by down-regulating ADAM-17. *Exp Cell Res*, 318(17), 2168-2177.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.04.014>

Xu, X., Xu, Q., Tong, J., Zhu, M., Nie, F., Chen, X., Xiao, S., & Ran, Z. (2012). MicroRNA expression profiling identifies miR-328 regulates cancer stem cell-like SP cells in colorectal cancer. *British journal of cancer*, 106(7), 1320-1330.

Yaghoubi, N., Avval, F. Z., Khazaei, M., & Aghaee-Bakhtiari, S. H. (2021). MicroRNAs as potential investigative and predictive biomarkers in colorectal cancer. *Cellular Signalling*, 80, 109910.

Ye, H., Hao, H., Wang, J., Chen, R., & Huang, Z. (2017). miR-203 as a novel biomarker for the diagnosis and prognosis of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *OncoTargets and therapy*, 3685-3696.

Zedain, A., Badrawy, H., Fawzy, M., Abd El Razik, D. I., Saber, S., & Ibrahim, A. (2020). Evaluation the Possibility of Using

of miRNA-21 as a Prognostic and Predictive Factor in Colorectal Cancer (South Egypt Experience). *Journal of Cancer Therapy*, 11(2), 88-97.

Zhang, G.-J., Xiao, H.-X., Tian, H.-P., Liu, Z.-L., Xia, S.-S., & Zhou, T. (2013). Upregulation of microRNA-155 promotes the migration and invasion of colorectal cancer cells through the regulation of claudin-1 expression. *International journal of molecular medicine*, 31(6), 1375-1380.

Zhang, J., Xiao, Z., Lai, D., Sun, J., He, C., Chu, Z., Ye, H., Chen, S., & Wang, J. (2012). miR-21, miR-17 and miR-19a induced by phosphatase of regenerating liver-3 promote the proliferation and metastasis of colon cancer. *British journal of cancer*, 107(2), 352-359.

Zhao, G., Zhou, A., Li, X., Zhu, S., Wang, Y., Zhang, S., & Li, P. (2021). The Significance of Exosomal RNAs in the Development, Diagnosis, and Treatment of Gastric Cancer. *Genes*, 12(1), 73.

Zhu, N., Zhang, D., Chen, S., Liu, X., Lin, L., Huang, X., Guo, Z., Liu, J., Wang, Y., & Yuan, W. (2011). Endothelial enriched microRNAs regulate angiotensin II-induced endothelial inflammation and migration. *Atherosclerosis*, 215(2), 286-293.

