



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

FINDIK (*Corylus avellana* L.) HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE
METABOLİZMA MÜHENDİSLİĞİ YAKLAŞIMI ile
TAKSAN BİYOSENTEZİNİN UYARILMASI

Ahmet DOĞAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Şule ARI

Mayıs, 2023

İSTANBUL

Bu çalışma, 29.05.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Şule ARI(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Aslıhan TEMEL
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Sevgi MARAKLI
Yıldız Teknik Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2021-38138 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Lisans döneminden beri ilgi ve emeğini üzerimde hissettiğim, Yüksek Lisans süreci boyunca tez çalışmamın her aşamasında değerli bilgi, tecrübe ve zamanını benimle büyük bir içtenlikle paylaşan ve ufkumu açan, öğrencilerine verdiği değer ve onları da teşvik eden çalışma disiplini ile akademik hayatı seçmemi, benimsememi ve bu yolda devam etmemi sağlayan, bütün bunların yanı sıra sadece akademisyen olarak değil hayatın her alanında kendime örnek aldığım çok saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Şule ARI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca değerli bilgilerini benimle paylaşan ve tez çalışmalarım için gerekli olan her türlü imkanı sağlayan Prof. Dr. Ercan ARICAN, Prof. Dr. Neslihan TURGUT KARA, Doç. Dr. Murat PEKMEZ, Doç. Dr. Aslıhan TEMEL, Dr. Öğr. Üyesi Elif Çepni YÜZBAŞIOĞLU'na olmak üzere bütün İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyeleri ve Araştırma Görevlilerine teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmasında kullandığım bitki materyallerini temin ettiğim Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ümit SERDAR'a ve örnek ekstraksiyonu için bana laboratuvarlarının kapısını açan ve çalışmalarımında her zaman yardımcı olan İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Meslek Bilimleri Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nur TAN, Arş. Gör. Fatma Memnune UÇAR ve Nur TANIR'a teşekkür ederim.

Laboratuvarda çalışmayı keyifli hale getiren ve sorunların üstesinden gelebilmeyi öğreten değerli İlayda GÖKTEPE'ye, desteğini her zaman arkamda hissettiğim dostum Arş. Gör. Baki YAMAN'a, elisitörlerin hücre süspansiyon kültürleri üzerindeki etkisinin incelenmesinde çok büyük emeği olan Berkay ASLAN'a ve Bitki Biyoteknolojisi ve Metabolizması laboratuvarındaki çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

TÜBİTAK 2210 Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı desteği alarak Yüksek Lisans sürecimi başarıyla bitirdiğimi belirtip, TÜBİTAK'a bana bu fırsatı sunduğu için teşekkür ederim.

Son olarak attığım her adımı destekleyen ve her koşulda yanımda olan canım aileme ve sevgili Uzman Tıbbi Mikrobiyolog Esranur TÜRK'e tüm kalbimle teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs 2023

Ahmet DOĞAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xii
ÖZET	xiv
SUMMARY	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	5
2.1. FINDIK BİTKİSİ	5
2.2. TERPENOİDLER	8
2.3. PAKLİTAKSEL.....	10
2.3.1. Paklitaksel Biyosentezi.....	11
2.3.2. Taksol®'ün Anti-tümöral Mekanizması	12
2.3.3. Paklitaksel Tabanlı İlaçlar	13
2.3.4. Paklitakselin Üretimi	14
2.4. SEKONDER METABOLİTLERİN BİTKİLERDE ÜRETİMİ	16
2.4.1. Hücre Süspansiyon Kültürleri	18
2.4.2. Paklitakselin Hücre Dışına Salgılanması.....	18
2.4.3. Elisitasyon	20
2.4.4. Koronatin	21
2.4.5. Fenilalanin	23
2.4.6. Metil-β-siklodekstrin	23
2.5. YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC).....	25
3. MALZEME VE YÖNTEM	27
3.1. BİTKİ MATERYALİ.....	27
3.2. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ	27
3.2.1. Besiyeri Hazırlanması	27
3.2.2. Yüzey Sterilizasyonu ve Tohum Ekimi.....	28
3.2.3. Kallus Kültürlerinin Kurulması	29

3.2.4. Hücre Süspansiyon Kültürlerinin Kurulması	29
3.3. ELİSİTASYON	30
3.3.1. Elisitörlerin Uygulanması.....	30
3.3.2. Koronatin Uygulanması.....	31
3.3.3. Fenilalanin Uygulanması.....	31
3.3.1. Metil- β -siklodekstrin Uygulanması.....	31
3.4. BİYOKÜTLE BİRİKİMİ VE CANLILIK ÖLÇÜMÜ	31
3.4.1. Yaş Ağırlık ve Kuru Ağırlık Ölçümü	32
3.4.2. Hücre Üremesi ve Canlılığının Belirlenmesi	32
3.5. EKSTRAKSİYON	33
3.5.1. Hücre Süspansiyon Kültürlerinin Toplanması	33
3.5.2. Liyofilizasyon.....	33
3.5.3. Hücre İçi Taksanların Ekstraksiyonu	33
3.5.4. Hücre Dışı Taksanların Ekstraksiyonu	34
3.6. HPLC.....	34
3.7. İSTATİKSEL ANALİZLER.....	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. KALLUS OLUŞTURMA FREKANSI.....	37
4.2. ELİSİTASYONUN BİYOKÜTLE BİRİKİMİ VE HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ	38
4.2.1. Yaş Ağırlık	38
4.2.2. Kuru Ağırlık	41
4.2.3. Hücre Üremesi.....	43
4.2.4. Hücre Canlılığı	45
4.3. ELİSİTASYONUN TAKSAN ÜRETİMİNE ETKİSİ	47
4.3.1. Elisitasyonun Hücre İçi Taksan Üretimine Etkisi	47
4.3.2. Elisitasyonun Hücre Dışı Taksan Üretimine Etkisi.....	51
4.3.3. Elisitasyonun Taksanların Salgılanma Oranına Etkisi	53
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	55
KAYNAKLAR.....	61
EKLER	73
ÖZGEÇMİŞ	74

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Fındık meyvesi ve zurufu (Allegrini ve diğ., 2022).....	6
Şekil 2.2: Dünya fındık ihracatı (A) ve Türkiye'nin fındık ihraç ettiği ülkeler (B).....	7
Şekil 2.3: Sekonder metabolitlerin başlıca biyosentetik yolları (Mohaddab ve diğ., 2022).....	9
Şekil 2.4: Paklitaksel biyosentetik yolağı (Mutanda ve diğ., 2021).....	12
Şekil 2.5: Kanser hücrelerinde paklitakselin etki mekanizması (Gallego-Jara ve diğ., 2020)....	13
Şekil 2.6: Paklitaksel ve ticari olarak önemli diğer taksanların yapısı (Gallego ve diğ., 2017)..	15
Şekil 2.7: Bitki hücre kültürü sistemlerinde sekonder metabolitlerin üretimini artırmak için kullanılan biyoteknolojik yaklaşımlar (Bouzroud ve diğ., 2023).....	17
Şekil 2.8: Hücre içinde paklitaksel birikimi ve hücre dışına transportu (Cusido ve diğ., 2014).	20
Şekil 2.9: Siklodekstrinlerin yapısı ve biyoaktif moleküller ile inklüzyon kompleksi oluşturması (Almagro & Pedreño, 2020).....	24
Şekil 2.10: Taxus hücre süspansiyon kültürlerinde elisitörlerin (Metil jasmonat, koronatin, siklodekstrin + metil jasmonat) paklitaksel biyosentezindeki indüklediği genler (Cusido ve diğ., 2014).....	25
Şekil 2.11: HPLC sistemi (Lozano-Sánchez ve diğ., 2018).....	26
Şekil 3.1: Elisitasyon uygulamaları (COR: koronatin, Phe: Fenilalanin, MBCD: Metil-β-siklodekstrin, COR + Phe: Koronatin + fenilalanin, COR + MBCD: Koronatin + metil-β-siklodekstrin, Phe + MBCD: Fenilalanin + metil-β-siklodekstrin, COR + Phe + MBCD: Koronatin + fenilalanin + metil-β-siklodekstrin).....	30
Şekil 4.1: <i>C. avellana</i> fındığın farklı dokularının (embriyo (A), endosperm (B) ve endospermli embriyo (C) 2 mg/L 2,4-D ve 0,2 mg/L BAP içeren MS besiyerinde yetiştirilmesiyle elde edilen 30 günlük kallus görüntüleri.....	37
Şekil 4.2: <i>C. avellana</i> eksplant tiplerinin 2 mg/L 2,4-D ve 0,2 mg/L BAP içeren MS besiyerinde ekiminden 30 gün sonra kallus oluşturma frekansına etkisi.....	38
Şekil 4.3: <i>C. avellana</i> hücre süspansiyon kültürlerinde 2 hafta boyunca elisitörlerin ayrı ayrı uygulandığında kültürlerin yaş ağırlığı üzerindeki etkileri (COR: koronatin, Phe: Fenilalanin, MBCD: Metil-β-siklodekstrin) Veriler two-way ANOVA ve Tukey testi ile analiz edilmiştir. p değeri <0,05'ten küçük değerler anlamlı kabul edilmiştir (*: p<0,05, **: p<0,01).....	40

Şekil 4.4: *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde 2 hafta boyunca elisitörlerin kombinasyon halinde uygulandığında kültürlerin yaş ağırlığı üzerindeki etkileri (COR + Phe: 1 µM koronatin ve 3 µM fenilalanin; COR + MBCD: 1 µM koronatin ve 50 mM metil-β-siklodekstrin; Phe + MBCD: 3 µM fenilalanin ve 50 mM metil-β-siklodekstrin; COR + Phe + MBCD: 1 µM koronatin, 3 µM fenilalanin ve 50 mM metil-β-siklodekstrin). Veriler two-way ANOVA ve Tukey testi ile analiz edilmiştir. p değeri <0,05'ten küçük değerler anlamlı kabul edilmiştir. (*: p<0,05, **: p<0,01).....40

Şekil 4.5: *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde 2 hafta boyunca elisitörlerin ayrı ayrı uygulandığında kültürlerin kuru ağırlığı üzerindeki etkileri (COR: koronatin, Phe: Fenilalanin, MBCD: Metil-β-siklodekstrin) Veriler two-way ANOVA ve Tukey testi ile analiz edilmiştir. p değeri <0,05'ten küçük değerler anlamlı kabul edilmiştir (*: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001).....42

Şekil 4.6: *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde 2 hafta boyunca elisitörlerin kombinasyon halinde uygulandığında kültürlerin kuru ağırlığı üzerindeki etkileri (COR + Phe: 1 µM koronatin ve 3 µM fenilalanin; COR + MBCD: 1 µM koronatin ve 50 mM metil-β-siklodekstrin; Phe + MBCD: 3 µM fenilalanin ve 50 mM metil-β-siklodekstrin; COR + Phe + MBCD: 1 µM koronatin, 3 µM fenilalanin ve 50 mM metil-β-siklodekstrin) Veriler two-way ANOVA ve Tukey testi ile analiz edilmiştir. p değeri <0,05'ten küçük değerler anlamlı kabul edilmiştir (*: p<0,05, **: p<0,01).....43

Şekil 4.7: *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde 2 hafta boyunca elisitörlerin ayrı ayrı uygulandığında kültürlerin hücre üremesi üzerindeki etkileri (COR: 1 µM koronatin; Phe: 3 µM fenilalanin; MBCD: 50 mM metil-β-siklodekstrin). Veriler two-way ANOVA ve Tukey testi ile analiz edilmiştir. p değeri <0,05'ten küçük değerler anlamlı kabul edilmiştir (*: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001).....44

Şekil 4.8: *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde 2 hafta boyunca elisitörlerin kombinasyon halinde uygulandığında kültürlerin hücre üremesi üzerindeki etkileri (COR + Phe: 1 µM koronatin ve 3 µM fenilalanin; COR + MBCD: 1 µM koronatin ve 50 mM metil-β-siklodekstrin; Phe + MBCD: 3 µM fenilalanin ve 50 mM metil-β-siklodekstrin; COR + Phe + MBCD: 1 µM koronatin, 3 µM fenilalanin ve 50 mM metil-β-siklodekstrin) Veriler two-way ANOVA ve Tukey testi ile analiz edilmiştir. p değeri <0,05'ten küçük değerler anlamlı kabul edilmiştir (*: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001).....45

Şekil 4.9: *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde 2 hafta boyunca elisitörlerin ayrı ayrı uygulandığında kültürlerin hücre canlılığı üzerindeki etkileri (COR: 1 µM koronatin; Phe: 3 µM fenilalanin; MBCD: 50 mM metil-β-siklodekstrin) Veriler two way ANOVA ve Tukey testi ile analiz edilmiştir. p değeri <0,05'ten küçük değerler anlamlı kabul edilmiştir (*, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001).....46

Şekil 4.10: *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde 2 hafta boyunca elisitörlerin kombinasyon halinde uygulandığında kültürlerin hücre canlılığı üzerindeki etkileri (COR + Phe: 1 µM koronatin ve 3 µM fenilalanin; COR + MBCD: 1 µM koronatin ve 50 mM metil-β-siklodekstrin; Phe + MBCD: 3 µM fenilalanin ve 50 mM metil-β-siklodekstrin; COR + Phe + MBCD: 1 µM koronatin, 3 µM fenilalanin ve 50 mM metil-β-siklodekstrin) Veriler two-way ANOVA ve Tukey testi ile analiz edilmiştir. p değeri <0,05'ten küçük değerler anlamlı kabul edilmiştir.....47

Şekil 4.11: *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerindeki hücrelerin mikroskop altındaki görüntüleri (A: Canlı; B: Ölü).....47

Şekil 4.12: : *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde elisitörlerin taksanların hücre içi ve hücre dışı üretimi. (1: 10-deasetil bakkatin III, 2: bakkatin III, 3: sefalomannin, 4: paklitaksel).....49

Şekil 4.13: *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde elisitörlerin ayrı ayrı ve birlikte uygulandığında hücre içi taksan üretimine etkileri (COR: 1 μ M koronatin; Phe: 3 μ M fenilalanin; MBCD: 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe: 1 μ M koronatin ve 3 μ M fenilalanin; COR + MBCD: 1 μ M koronatin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; Phe + MBCD: 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe + MBCD: 1 μ M koronatin, 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin) Veriler two-way ANOVA ve Tukey testi ile analiz edilmiştir. p değeri <0,05'ten küçük değerler anlamlı kabul edilmiştir (*: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001, ns: anlamlı değil).....50

Şekil 4.14: *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde elisitörlerin ayrı ayrı ve birlikte uygulandığında hücre dışı taksan üretimine etkileri (COR: 1 μ M koronatin; Phe: 3 μ M fenilalanin; MBCD: 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe: 1 μ M koronatin ve 3 μ M fenilalanin; COR + MBCD: 1 μ M koronatin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; Phe + MBCD: 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe + MBCD: 1 μ M koronatin, 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin) Veriler two-way ANOVA ve Tukey testi ile analiz edilmiştir. p değeri <0,05'ten küçük değerler anlamlı kabul edilmiştir (*: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001, ns: anlamlı değil).....52

Şekil 4.15: *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde elisitörlerin ayrı ayrı ve birlikte uygulandığında taksanların hücre dışına salgılanma oranına etkileri (COR: 1 μ M koronatin; Phe: 3 μ M fenilalanin; MBCD: 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe: 1 μ M koronatin ve 3 μ M fenilalanin; COR + MBCD: 1 μ M koronatin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; Phe + MBCD: 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe + MBCD: 1 μ M koronatin, 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin) Veriler ordinary two-way ANOVA ve Tukey testi ile analiz edilmiştir. p değeri <0,05'ten küçük değerler anlamlı kabul edilmiştir (***: p<0,001).....54

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

- Tablo 2.1:** Fındık (*Corylus avellana* L.) taksonomik sınıflandırması.....6
- Tablo 2.2:** Bitki hücre süspansiyon kültürlerinde başarıyla üretilen sekonder metabolitler.....18
- Tablo 2.3:** Sekonder metabolit üretimini artırmak için kullanılan elisitörler.....21
- Tablo 3.1:** Taksanların analizinin gerçekleştirilmesi için kromatografik şartlar.....35
- Tablo 3.2:** Taksanların analizinin gerçekleştirildiği yöntem.....35
- Tablo 3.3:** Taksan Bileşikleri ve alıkonma zamanları.....35
- Tablo 4.1:** *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerine elisitörler eklendikten sonra 0. günden 14. güne kadar kültürlerin yaş ağırlık değişimleri (g/mL) (COR: 1 µM koronatin; Phe: 3 µM fenilalanin; MBCD: 50 mM metil-β-siklodekstrin; COR + Phe: 1 µM koronatin ve 3 µM fenilalanin; COR + MBCD: 1 µM koronatin ve 50 mM metil-β-siklodekstrin; Phe + MBCD: 3 µM fenilalanin ve 50 mM metil-β-siklodekstrin; COR + Phe + MBCD: 1 µM koronatin, 3 µM fenilalanin ve 50 mM metil-β-siklodekstrin).....39
- Tablo 4.2:** *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerine elisitörler eklendikten sonra 0. günden 14. güne kadar kültürlerin kuru ağırlık değişimleri (g/mL) (COR: 1 µM koronatin; Phe: 3 µM fenilalanin; MBCD: 50 mM metil-β-siklodekstrin; COR + Phe: 1 µM koronatin ve 3 µM fenilalanin; COR + MBCD: 1 µM koronatin ve 50 mM metil-β-siklodekstrin; Phe + MBCD: 3 µM fenilalanin ve 50 mM metil-β-siklodekstrin; COR + Phe + MBCD: 1 µM koronatin, 3 µM fenilalanin ve 50 mM metil-β-siklodekstrin).....42
- Tablo 4.3:** *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerine elisitörler eklendikten sonra 0. günden 14. güne kadar kültürlerin hücre üremesi değişimleri ($\times 10^4$) (COR: 1 µM koronatin; Phe: 3 µM fenilalanin; MBCD: 50 mM metil-β-siklodekstrin; COR + Phe: 1 µM koronatin ve 3 µM fenilalanin; COR + MBCD: 1 µM koronatin ve 50 mM metil-β-siklodekstrin; Phe + MBCD: 3 µM fenilalanin ve 50 mM metil-β-siklodekstrin; COR + Phe + MBCD: 1 µM koronatin, 3 µM fenilalanin ve 50 mM metil-β-siklodekstrin).....44
- Tablo 4.4:** *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerine elisitörler eklendikten sonra 0. günden 14. güne kadar kültürlerin hücre canlılığı değişimleri (%) (COR: 1 µM koronatin; Phe: 3 µM fenilalanin; MBCD: 50 mM metil-β-siklodekstrin; COR + Phe: 1 µM koronatin ve 3 µM fenilalanin; COR + MBCD: 1 µM koronatin ve 50 mM metil-β-siklodekstrin; Phe + MBCD: 3 µM fenilalanin ve 50 mM metil-β-siklodekstrin; COR + Phe + MBCD: 1 µM koronatin, 3 µM fenilalanin ve 50 mM metil-β-siklodekstrin).....46
- Tablo 4.5:** Elisitörlerin *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde taksanların hücre içindeki üretimine etkisi (µg/mL) (COR: 1 µM koronatin; Phe: 3 µM fenilalanin; MBCD: 50 mM metil-β-siklodekstrin; COR + Phe: 1 µM koronatin ve 3 µM fenilalanin; COR + MBCD: 1 µM

koronatin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; Phe+MBCD: 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe + MBCD: 1 μ M koronatin, 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin).....50

Tablo 4.6: Elisitörlerin *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde taksanların hücre dışındaki üretimine etkileri (μ g/mL) (COR: 1 μ M koronatin; Phe: 3 μ M fenilalanin; MBCD: 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe: 1 μ M koronatin ve 3 μ M fenilalanin; COR + MBCD: 1 μ M koronatin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; Phe + MBCD: 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe + MBCD: 1 μ M koronatin, 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin).....52

Tablo 4.7: Elisitörlerin hücre süspansiyon kültürlerinde taksanların salgılanma oranına etkileri (μ g/mL) (COR: 1 μ M koronatin; Phe: 3 μ M fenilalanin; MBCD: 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe: 1 μ M koronatin ve 3 μ M fenilalanin; COR + MBCD: 1 μ M koronatin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; Phe + MBCD: 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe + MBCD: 1 μ M koronatin, 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin).....53

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
β	: Beta
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat derece
%	: Yüzde
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
atm	: Atmosfer
cm	: Santimetre
g	: Göreceli santrifüj kuvveti / gram
L	: Litre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
MCF-7	: Meme kanseri hücre hattı
N	: Normalite
pH	: Asit-baz derecesi
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
UV	: Ultraviyole

Kısaltmalar	Açıklama
2,4-D	: 2,4- diklorofenoksiasetik asit
BAP	: 6-benzilamino pürin
Bcl-2	: B-hücre lösemisi 2
CFA	: Poliketid koronafasik asit
CMA	: Koronamik asit
dH₂O	: Distile su
DMAPP	: Dimetilallil difosfat
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ER	: Endoplazmik retikulum
HMG-CoA	: 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
GGPP	: Geranil geranil pirofosfat
IPP	: İzopentenil difosfat
MS	: Murashige & Skoog besiyeri
MCF-7	: Meme kanseri hücre hattı
MEP	: 2-C-Methyl-D-erythritol-4-fosfat
MVA	: Mevalonat
M.Ö.	: Millattan önce
OPDA	: 12-okso-fitodienoik asit
RNA	: Ribonükleik Asit
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
TXS	: Taksadien sentaz

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FINDIK (*Corylus avellana* L.) HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE METABOLİZMA MÜHENDİSLİĞİ YAKLAŞIMI ile TAKSAN BİYOSENTEZİNİN UYARILMASI

Ahmet DOĞAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Şule ARI

Paklitaksel akciğer, yumurtalık ve meme kanserinin yanı sıra Kaposi sarkomunun tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir diterpenoiddir. Fındık (*Corylus avellana* L.) hücre süspansiyon kültürleri, paklitakselin yanı sıra 10-deasetil bakkatin III, bakkatin III ve sefalomannin gibi önemli taksanların üretimi için uygun sistemlerdir. Bununla birlikte, *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde taksanların üretiminin artırılması için çeşitli elisitörlerin kullanılması gerekmiştir. Bu tez çalışması kapsamında taksan üretimini artırmaya yönelik elisitasyon uygulaması için antikanser taksanları içeren bir Türk fındık çeşidi olan *Corylus avellana* cv. Kalınkara'da aktif bölünen kalluslar elde edilmiş ve bu kalluslardan hücre süspansiyon kültürleri kurulmuştur. Altı aylık homojenize hücre süspansiyon kültürlerine, logaritmik evrenin ortasına karşılık gelen kültürlemenin 17. gününde yapılan 1 μ M koronatin elisitörü, 3 μ M fenilalanin öncülü ve 50 mM metil- β -siklodekstrin nano-taşıyıcısının ayrı ayrı ve kombinasyon halindeki uygulamaların etkileri kültürlerin üreme özellikleri (biyokütle birikimi ve hücre canlılığı) ile taksan metabolitlerinin üretimi arasındaki ilişkinin anlaşılması için incelenmiştir.

C. avellana cv. Kalınkara hücre süspansiyon kültürlerinde koronatin, fenilalanin ve koronatin + fenilalanin uygulamaları kültürlerin üreme özelliklerini (yaş ağırlık, kuru ağırlık, hücre sayısı) ve hücre canlılığını negatif etkilemiş, metil- β -siklodekstrinin ise biyokütle birikimini arttırmıştır. Metil- β -siklodekstrinin diğer elisitörlerle birlikte uygulanması (koronatin + metil- β -siklodekstrin, fenilalanin + metil- β -siklodekstrin ve koronatin + fenilalanin + metil- β -

siklodekstrin) ise elisitörlerin hücre süspansiyon kültürlerinin biyokütle birikimine ve hücre canlılığına verdikleri zararı nispeten azaltmıştır.

Elisitasyon uygulanmamış kontrol hücre süspansiyon kültürlerinde hücre içinde 10-deasetil bakkatin III 0,878 µg/mL, bakkatin III 36,424 µg/mL, sefalomannin 0,519 µg/mL, paklitaksel 16,812 µg/mL üretilmiştir. Hücre süspansiyon kültürlerine 1 µM koronatin eklendiğinde ise hücre içinde üretilen 10-deasetil bakkatin III (0,648 µg/mL) ve bakkatin III (3,126 µg/mL) miktarı azalırken, sefalomannin (1,747 µg/mL) ve paklitaksel (32,00 µg/mL) kontrole göre sırasıyla 3,36 ve 1,90 kat artmıştır. Koronatin + fenilalanin ilave edilmiş hücre süspansiyon kültürlerinde ise kontrole göre 10-deasetil bakkatin III, bakkatin III, sefalomannin ve paklitaksel arasından sadece paklitaksel üretimi (17,34 µg/mL) artmıştır. Diğer uygulamalar (koronatin + metil-β-siklodekstrin, fenilalanin + metil-β-siklodekstrin ve koronatin + fenilalanin + metil-β-siklodekstrin) taksan üretimini artırılmasında etkili olmamıştır.

Paklitakselin hücre dışına en fazla salgılandığı (3,793 µg/mL) koşul ise 50 mM metil-β-siklodekstrin uygulamasıdır. Koronatinin fenilalanin ve metil-β-siklodekstrin ile ikili uygulandığı kültürlerde hücre dışına salgılanan taksan miktarında önemli biçimde artışlar gözlenmiştir. 1 µM koronatin + 3 µM fenilalanin ve 1 µM koronatin + 50 mM metil-β-siklodekstrin eklenmiş hücre süspansiyon kültürlerinde hücre dışı 10-deasetil bakkatin III miktarı (0,796 µg/mL ve 0,753 µg/mL) kontrol ile benzerken, bakkatin miktarı ise 4,63 (2,109 µg/mL) ve 3,26 (1,482 µg/mL) kat artmıştır. Bu iki kültürdeki hücre dışına salgılanan sefalomannin miktarı ise, 1 µM koronatin uygulamasına göre, sırasıyla yaklaşık olarak 5,5 (3,656 µg/mL) ve 10 (6,016 µg/mL) kat artmıştır. Ayrıca bu kültürlerde hücre dışına sırasıyla 1,569 µg/mL ve 2,771 µg/mL paklitakselin de salgılandığı gösterilmiştir.

Kontrol kültürlerde hücre içinde üretilen taksan miktarı, total taksan (hücre içi + hücre dışı) miktarının %97,77'si iken, 1 µM koronatin, 3 µM fenilalanin ve 50 mM metil-β-siklodekstrinin ayrı ayrı eklendiği kültürlerde total taksan miktarlarının hücre içi taksanlara oranları sırasıyla %91,74, %83,545 ve %74,95 olarak bulunmuştur. Bu elisitasyon uygulamaları ile hücre dışına salgılanma oranları ise sırasıyla %8,25, %16,455 ve %25,04'tür. Elisitörler birlikte uygulandıklarında ise hücre dışına salgılanma oranları (koronatin + fenilalanin için %25,15, koronatin + metil-β-siklodekstrin için %36,48, fenilalanin + metil-β-siklodekstrin için %41,85, koronatin + fenilalanin + metil-β-siklodekstrin için %40,22) artmıştır.

Bu çalışmanın sonucunda, koronatin elisitörü ile hücre içinde üretilen paklitaksel miktarı artırılırken, metil-β-siklodekstrinin varlığında elisitörlerin hücre biyokütlesine ve hücre canlılığına olan toksik etkileri azaltılmıştır. Ayrıca koronatin + metil-β-siklodekstrin, fenilalanin + metil-β-siklodekstrin ve koronatin + fenilalanin + metil-β-siklodekstrin eklenmiş hücre süspansiyon kültürlerinde taksanların hücre dışına salgılanmasında sinerjistik bir etki görülmüştür. Bu çalışma ile fındık hücre süspansiyon kültürlerinde hem biyokütle hem de antikanser taksanların üretimini artırılmasına yönelik elisitasyon koşulları ilk kez belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların fındıkta biyoteknolojik yolla taksan üretimi çalışmalarına temel oluşturabileceği düşünülmüştür.

Mayıs 2023, 92 sayfa.

Anahtar kelimeler: Koronatin, fenilalanin, metil-β-siklodekstrin, biyokütle, salgılama, hücre süspansiyon kültürleri, paklitaksel, *Corylus avellana*

SUMMARY

M.Sc. THESIS

INDUCTION OF TAXANE BIOSYNTHESIS IN HAZELNUT (*Corylus avellana* L.) CELL CULTURES THROUGH METABOLISM ENGINEERING APPROACH

Ahmet DOĞAN

Istanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Şule ARI

Paclitaxel is a diterpenoid that is broadly used for the treatment of lung, ovarian and breast cancer as well as Kaposi sarcoma. Hazelnut (*Corylus avellana* L.) cell suspension cultures represent feasible systems for the production of the invaluable taxanes including 10-deacetyl baccatin, baccatin III, cephalomannine alongside of paclitaxel. However the limited-scale production of taxanes in *C. avellana* cell suspension cultures has necessitated the use of several elicitors. In this thesis study, actively dividing callus cultures were obtained from a Turkish hazelnut variety, *Corylus avellana* cv. Kalinkara containing anti-cancer taxanes, for elicitation treatment aimed at increasing taxane production. Later, cell suspension cultures were established from the callus. The effects of separate and combined treatments of 1 μ M coronatine elicitor, 3 μ M phenylalanine precursor, and 50 mM methyl- β -cyclodextrin nano-carrier on the growth characteristics (biomass accumulation and cell viability) of the cultures and the production of taxane metabolites were investigated to understand the relationship between them. These treatments were performed on the 17th day of culturing, corresponding to the middle of the logarithmic phase.

The treatments of coronatine, phenylalanine, and coronatine + phenylalanine negatively affected the growth characteristics (fresh weight, dry weight, cell count) and cell viability of hazelnut (*C. avellana* cv. Kalinkara) cell suspension cultures. However, the treatment of methyl- β -cyclodextrin increased the biomass accumulation of *C. avellana* cell suspension

cultures. Furthermore, when methyl- β -cyclodextrin was applied together with other elicitors (coronatine + phenylalanine, phenylalanine + methyl- β -cyclodextrin, coronatine + phenylalanine + methyl- β -cyclodextrin), it relatively eliminated the damage caused by elicitors to the biomass accumulation and the cell viability of the cell suspension cultures.

In the control cell suspension cultures without elicitation, 10-deacetyl baccatin III (0,878 $\mu\text{g/mL}$), baccatin III (36,424 $\mu\text{g/mL}$), cephalomannine (0,519 $\mu\text{g/mL}$), and paclitaxel (16,812 $\mu\text{g/mL}$) were produced inside the cells. When 1 μM coronatine was added to the cell suspension cultures, the amounts of 10-deacetyl baccatin III (0,648 $\mu\text{g/mL}$) and baccatin III (3,126 $\mu\text{g/mL}$) produced inside the cells decreased, while the amounts of cephalomannine (1,747 $\mu\text{g/mL}$) and paclitaxel (32,00 $\mu\text{g/mL}$) increased by 3,36 and 1,9 fold, respectively, compared to the control. In the cell suspension cultures with the addition of both coronatine and phenylalanine, only the production of paclitaxel (17,34 $\mu\text{g/mL}$) increased, among 10-deacetyl baccatin III, baccatin III, cephalomannine and paclitaxel, compared to the control. Other treatments (coronatine + methyl- β -cyclodextrin, phenylalanine + methyl- β -cyclodextrin, coronatine + phenylalanine + methyl- β -cyclodextrin) did not effectively increase taxane production.

The condition where paclitaxel was secreted the most outside the cell (3,793 $\mu\text{g/mL}$) was the treatment of 50 mM methyl- β -cyclodextrin. Dramatic enhancement in the amount of secreted taxanes outside the cell was observed when coronatine was applied in combination with phenylalanine and methyl- β -cyclodextrin. In cell suspension cultures which coronatine + phenylalanine and coronatine + methyl- β -cyclodextrin were added, the amounts of 10-deacetyl baccatin III secreted outside the cell (0,796 $\mu\text{g/mL}$ and 0,753 $\mu\text{g/mL}$) was similar to the control, while the amount of baccatin III increased by 4,63 (2,109 $\mu\text{g/mL}$) and 3,26 (1,482 $\mu\text{g/mL}$) fold, respectively, compared to the 1 μM coronatine treatment. Additionally, it was shown that 1,569 $\mu\text{g/mL}$ and 2,771 $\mu\text{g/mL}$ of paclitaxel were secreted outside the cell in these cultures, respectively.

In the control cell suspension cultures, the amount of taxanes produced inside the cells was observed to be 97,77% of the total taxane (cell-associated + extracellular) amount. In cell suspension cultures treated with 1 μM coronatine, 3 μM phenylalanine, and 50 mM methyl- β -cyclodextrin separately, the ratios of the total taxane amount to the intracellular taxane amount were 91,74%, 83,545%, and 74,95%, respectively. The ratios of secretion outside the cell with these elicitation treatments were 8,25%, 16,455%, and 25,04%, respectively. When the elicitors were applied together (coronatine + phenylalanine, coronatine + methyl- β -cyclodextrin, phenylalanine + methyl- β -cyclodextrin, coronatine + phenylalanine + methyl- β -cyclodextrin), the ratios of secretion outside the cell (25,15%, 36,48%, 41,85%, %40,22) increased even more.

As a result of this study, while the amount of paclitaxel produced inside the cells was increased by the coronatine elicitor, the toxic effects of the elicitors on cell biomass and cell viability were reduced in the presence of methyl- β -cyclodextrin. Furthermore, a synergistic effect was observed in the secretion of taxanes outside the cells in cell suspension cultures treated with coronatine + methyl- β -cyclodextrin, phenylalanine + methyl- β -cyclodextrin, and coronatine + phenylalanine + methyl- β -cyclodextrin. This study aimed to determine the elicitation conditions for increasing both biomass and anti-cancer taxane production in hazelnut cell suspension cultures for the first time. The results obtained may provide a basis for biotechnological taxane production studies in hazelnut.

May 2023, 92 pages.

Keywords: Coronatine, phenylalanine, methyl- β -cyclodextrin, biomass, excretion, cell suspension cultures, paclitaxel, *Corylus avellana*



1. GİRİŞ

Bitkisel kaynaklı terapötik ilaçlara olan ihtiyaç sürekli bir şekilde artmaktadır. Ancak, bu ilaçların tedariki, büyüyen terapötik ilaç pazarının taleplerini karşılamak için yeterli değildir. Ayrıca doğal bitkisel kaynakların doğrudan terapötik ilaçların üretiminde kullanılması, birçok bitki türünün aşırı kullanılması ve yok olması ile sonuçlanacaktır (Gallego ve diğ., 2017). Bitki hücre süspansiyon kültürleri ise biyoaktif bileşiklerin üretilmesinde çevre dostu ve sürdürülebilir bir sistem olarak kabul edilmektedir (Halder ve diğ., 2019; Farhadi ve diğ., 2020; Perez-Matas ve diğ., 2022). Bugüne kadar birçok çalışmada çeşitli bitkilerde farklı terapötik amaçlar için paklitaksel gibi önemli birçok farklı sekonder metabolitin üretilmesine yönelik çalışmalar yürütülmüştür (Hurtado-Gaitán ve diğ., 2021; Khan ve diğ., 2021; Perez-Matas ve diğ., 2022; Alfieri ve diğ., 2022). Bitki hücre süspansiyon kültürlerinin kurulması ve bu kültürlerde değerli sekonder metabolitlerin üretilmesi ile ilgili geniş kapsamlı çalışmalar yapılmasına karşın ticari olarak başarılı oldukça az örnek vardır. Bunun nedenleri arasında bitki sekonder metabolizmasının karmaşıklığı ve *in vitro* koşullarda kontrol edilmesinin zorluğu gösterilmektedir (Cusido ve diğ., 2014; Ramirez-Estrada ve diğ., 2016; Lange, 2017).

Taksol® ticari ismiyle satılan paklitaksel günümüzde AIDS ilişkili Kaposi sarkomunun yanı sıra akciğer, ovaryum, meme kanseri gibi birçok hastalığa karşı en etkili kemoterapötik ilaçlardan biridir (Cragg ve diğ., 1993; Perez-Matas ve diğ., 2022). Paklitaksel, 1967 yılında *Taxus brevifolia* ağaçlarının kabuklarından ilk kez ekstrakte edilmiştir (Mansukhlal ve diğ., 1971). Paklitakselin kimyasal sentezi ve *Taxus* (Porsuk ağacı) hücre süspansiyon kültürleri aracılığıyla biyosentezi, Taksol® ilacına olan artan ihtiyacı karşılamakta yetersiz kalmaktadır (Gallego ve diğ., 2017; Espinosa-Leal ve diğ., 2018). Sonuç olarak bu değerli sekonder metabolitin üretimi için alternatif kaynaklar araştırılmıştır. Fındık (*Corylus avellana* L.), porsuğun endofitik mantarları ve fındık ağacı endofitik mantarları gibi bazı mikroorganizmalar, paklitaksel üretimi için diğer ham madde kaynaklarıdır (Gallego ve diğ., 2015a; Salehi ve diğ., 2018; Cao ve diğ., 2022). Eski çağlardan beri insan diyetinde yer alan fındığın bu kıymetli tıbbi bileşik paklitakselin üreticisi olduğuna ilişkin ilk bulgulara önceleri mesafeli bir yaklaşım sergilenmiştir. Fındık (*Corylus avellana* L.) bitkisinin filogenetik sınıflandırması, başlıca paklitaksel üreticisi *Taxus* türlerinden çok uzak olmasına karşın yapılan çalışmalar *C. avellana*'nın önemli bir paklitaksel kaynağı olduğunu göstermiştir (Raeispour Shirazi ve diğ., 2021).

Paklitaksel üreten bütün doğal kaynaklar, paklitakselin endüstriyel boyutta kullanımını için yeterli değildir (Hoffman ve diğ., 1998; Malik ve diğ., 2011; Mohammadi Ballakuti ve diğ., 2022). Paklitaksel, total kimyasal sentez ile sentezlenebilmektedir, ancak kimyasal sentez ile paklitaksel üretimi, paklitakselin kimyasal yapısının kompleksliği nedeniyle zaman alıcı, pahalı ve düşük verimlidir (Holton ve diğ., 1994). Bu nedenle paklitaksel üretimi için önemli bir kaynak olan *Taxus* türlerinin hücre kültürleri kurulmuştur (Fett-Neto ve diğ., 1992; Navia-Osorio ve diğ., 2002; Malik ve diğ., 2011; Vidal-Limon ve diğ., 2016; Xiong ve diğ., 2021). Bununla beraber fındık ağaçları, porsuk ağaçlarından daha yaygın olarak bulunur, *in vivo* ortamda daha hızlı büyür ve *in vitro* koşullarda yetiştirilmesi daha kolaydır (Bestoso ve diğ., 2006; Ottaggio ve diğ., 2008; Miele ve diğ., 2012; Bemani ve diğ., 2013). Bu nedenle özellikle elisitasyon gibi güncel stratejiler, *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde paklitakselin yüksek miktarda üretiminin gerçekleştirilmesi için kullanılmaktadır (Gallego ve diğ., 2015a; Rahpeyma ve diğ., 2015; Salehi ve diğ., 2019a, 2020).

Elisitasyon, bitki hücre süspansiyon kültürlerinde ticari olarak önemli biyoaktif sekonder metabolitlerin büyük ölçekli üretimiyle ilişkili çeşitli zorluklarının aşılmasında efektif bir stratejidir (Halder ve diğ., 2018, 2019; Gantait & Mukherjee, 2021). Sekonder metabolitlerin *in vitro* ortamda birikimi ve hücre içinden kültür ortamına salgılanması, biyotik ve abiyotik elisitörlerin düşük konsantrasyonlarda uygulanması ile çeşitli bitki türlerinin hücre süspansiyon kültürlerinde çalışılmıştır (Gallego ve diğ., 2017; Narayani & Srivastava, 2017; Changxing ve diğ., 2020). Koronatin, bitki bakterisi *Pseudomonas syringae*'nin çeşitli patovarları tarafından üretilen bir fitotoksindir. Ayrıca bitkilerde sekonder metabolit üretiminde önemli bir rol oynamaktadır (Uppalapati ve diğ., 2005; Onrubia ve diğ., 2013). Koronatin, özellikle *Taxus* spp. hücre süspansiyon kültürlerinde paklitaksel ve ilişkili diğer taksanların miktarını çarpıcı bir şekilde artırmaktadır (Escrich ve diğ., 2021; Kashani ve diğ., 2018, 2022). Ancak, koronatin her ne kadar taksan biyosentezini önemli ölçüde artırsa da, bitki hücre süspansiyon kültürlerinin biyokütle birikimini negatif olarak etkilemektedir (Onrubia ve diğ., 2013; Gallego ve diğ., 2015a; Escrich ve diğ., 2021). Bu nedenle kültürlerin biyokütlesine zarar veren koronatin gibi elisitörlerin negatif etkisini azaltacak stratejiler geliştirilmektedir.

Fenilalanin ise paklitaksel metabolik yolağında yan zincirin sentezlenmesinde yer alan bir aminoasittir (Croteau ve diğ., 2006). *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerine fenilalanin ilavesinin paklitaksel ve paklitaksel türevlerinin üretimini artırdığı gösterilmiştir (Bemani ve

diğ., 2013; Rahpeyma ve *diğ.*, 2015, 2017). Ayrıca fenilalanin başka elisitörlerle (metil jasmonat ve vanadil sülfat) birlikte kullanıldığında taksan üretimini artırdığı bildirilmiştir (Rahpeyma ve *diğ.*, 2015; Andi ve *diğ.*, 2019).

Siklodekstrinler, D-glikopiranoz bakiyelerinin α -(1,4)-glikozidik bağlarıyla bağlanması sonucu oluşan siklik oligosakkaritlerdir (Almagro & Pedreño, 2020). Siklodekstrinler, anti-tümör ve immünoregulator ilaçların etkili bir taşıyıcısı olarak değerlendirilmiştir. Siklodekstrinler, ilaç taşıyıcısı olarak işlev gördüklerinde, ilaç kararlılığını ve çözünürlüğünü artırmaktadır. Ayrıca ilaçların hücre membranından geçişini kolaylaştırmaktadır (Cardillo ve *diğ.*, 2021; Escrich ve *diğ.*, 2021). Bununla birlikte, doğal siklodekstrinlerin ilaç taşımada bazı dezavantajları mevcuttur. Özellikle metil- β -siklodekstrinler, düşük moleküler ağırlıklı organik moleküller ile kararlı inklüzyon kompleksi oluşturmada doğal siklodekstrinlere göre daha uygundur. Ayrıca metil- β -siklodekstrin ile inklüzyon kompleksi oluşturmuş organik bileşikler, sulu çözeltilerde daha fazla çözünür hale gelmektedir (Upadhyay ve *diğ.*, 2006; McElroy & Jennewein, 2017; Almagro & Pedreño, 2020). Metil- β -siklodekstrinlerin çeşitli kanser hatlarında düşük çözünürlüğe ve kararsız yapıya sahip antikanser ilaçların kullanılmasında nanotaşıyıcı olarak yüksek etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Charoenwongpaiboon ve *diğ.*, 2022). Paklitaksel yüklü metil- β -siklodekstrin nanopartikülünün MCF-7 kanser hattında tümör sferoidlerinin küçülmesini daha fazla uyarmıştır (Baek ve *diğ.*, 2017). Metil- β -siklodekstrinlerin ilaç kararlılığı ve çözünürlüğe katkılarının yanı sıra son yıllarda bitki hücre kültürlerinde gerçek bir elisitör gibi kullanılıp kullanılmayacağı araştırılmıştır. Metil- β -siklodekstrinlerin bitki savunma mekanizmasının uyarılmasında etkili bir ajan olarak işlev görebileceği görülmüştür (Bru ve *diğ.*, 2006; Lijavetzky ve *diğ.*, 2008; Zamboni ve *diğ.*, 2009). Bunların yanı sıra metil- β -siklodekstrinler, paklitaksel ve paklitaksel türevleri gibi hidrofobik bileşikler ile inklüzyon kompleksi oluşturmaktadır ve hücrelerden kültür ortamına salgılanmasını kolaylaştırmaktadır. Böylece bitki hücre süspansiyon kültürlerinde üretici hücrelerde sentezlenen paklitaksel miktarı ve paklitakselin hücre için oluşturduğu toksisite, hücre canlılığına zarar vermeyen belli bir düzeyin üzerine çıkamamaktadır (Exposito ve *diğ.*, 2010; Kashani ve *diğ.*, 2018). Ayrıca hücre süspansiyon kültürlerinde hücre içinde biriken paklitaksel birikimi, geri bildirim inhibisyonuna ve son ürün degradasyonuna sebep olmaktadır. Bu durum, hücre süspansiyon kültürlerinde paklitaksel ve paklitaksel türevlerinin verimini düşürmektedir (Sabater-Jara ve *diğ.*, 2014). Bu nedenle son yıllarda yapılan çalışmalar paklitaksel biyosentezini artırmanın yanı sıra hücre

içinde üretilen paklitakseli hücre dışına salgılamak için kitosan, kalik[8]saren ve siklodekstrin gibi nano boyuttaki taşıyıcıların kullanılmasına dikkat çekmektedir.

Araştırma grubumuzun önceki çalışmalarında 7 farklı Türk fındık çeşidinin 5 farklı dokusunda taksanların bulunduğu gösterilmiştir (Kutlutürk, 2019). Ayrıca fındık hücre süspansiyon kültürleri kurulmuş, metil jasmonat ve fenilalanin ile uyarılarak taksanların üretimi başarıyla artırılmıştır (Göktepe, 2020). Bu çalışmanın amacı ise elisitasyon stratejisini kullanarak *Corylus avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde 10-deasetil bakkatin III ve bakkatin III gibi paklitaksel öncülleri, paklitaksel ve paklitaksel türevi sefalomanninin üretimini incelemektir. 1 µM koronatin, 3 µM fenilalanin ve 50 mM metil-β-siklodekstrin hücre süspansiyon kültürlerine 17. günde ayrı ayrı ve birbiriyle kombinasyon halinde eklenmiş ve 30. günde kültürler toplanmıştır. Taksan metabolitlerinin analizi yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak yapılmıştır. Koronatin, fenilalanin ve metil-β-siklodekstrinin hedef biyoaktif bileşiklerin sentezi ve salgılanması üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Ayrıca *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde; yaş ağırlık, kuru ağırlık, hücre üremesi ve hücre canlılığı ölçümleri yapılarak biyokütle birikimi ve taksan metabolitlerinin üretimi arasındaki ilişkinin anlaşılmasına katkı sağlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. FINDIK BİTKİSİ

Fındık ağacı, antik çağdan günümüze kadar insan diyetinde kullanılan önemli bir bitkidir. Çin’de milattan önce (M.Ö.) 2838 yılından itibaren yetiştirildiği bilinmektedir. Fındık ağacından ilk kez Çin yazılı kaynaklarında bahsedilmiştir ve fındığın Tanrı’nın insanlara armağan ettiği meyvelerden birisi olduğu ifade edilmiştir. Uygur Destanı’nda ise fındığın Türk toplumundaki önemi şu şekilde vurgulanmıştır: “Tuğla ve Selenga ırmaklarının birleştiği yerde bir kayın ve fındık ağacı arasında bulunan bir dağ kabardı ve yarıldı. İçinden beş çocuk çıktı”. İbn-i Sina (930-1037), dünya tıp tarihinin en önemli eserlerinin başında gelen el-Kanun fi’-Tıbb adlı eserinde ise fındığın çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan bir ilaç olduğundan bahsetmektedir. Ülkemizde de Cumhuriyet döneminin başından itibaren değerli bir gelir kaynağı olarak görülen fındığın yetiştirilmesi, kalitesi ve ticareti ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır (T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, 2023a).

Fındık ağacı (*Corylus avellana* L.), Betulaceae ailesinden kapalı tohumlu ve iki çenekli bir bitkidir. Fındık ağacının taksonomik sınıflandırması Tablo 2.1’de verilmiştir. Fındık ağacında dişi (pistil) ve erkek (stamen) üreme organları aynı bitki üzerinde yer almaktadır. Polenleri rüzgarla tozlaşmaktadır. Kendi kendini tozlaştırdıktan sonra zigot üretmeyerek kendi kendine uyumsuzluk göstermektedir. Bu nedenle fındık ağaçlarında döllenmenin sağlanabilmesi için ana çeşit ile uyumsuzluk göstermeyen tozlayıcı bitkiler kullanılmaktadır. Fındık ağacı, kışın yaprak döken bir ağaçtır ve genellikle 8 metreye kadar büyüebilmektedir. Ayrıca olumsuz iklim koşullarına dayanıklı olduğundan 50-70 yıl yaşayabilmektedir. Türkiye’de çiçeklenme dönemleri Şubat-Nisan aylarında olurken fındık meyvelerinin olgunlaşması ve hasat edilmesi ise Ağustos-Eylül aylarında gerçekleşmektedir (Gallego ve diğ., 2017). Şekil 2.1’de fındık meyvesi ve zurufu gösterilmiştir.

Tablo 2.1: Fındık (*Corylus avellana* L.) taksonomik sınıflandırması.

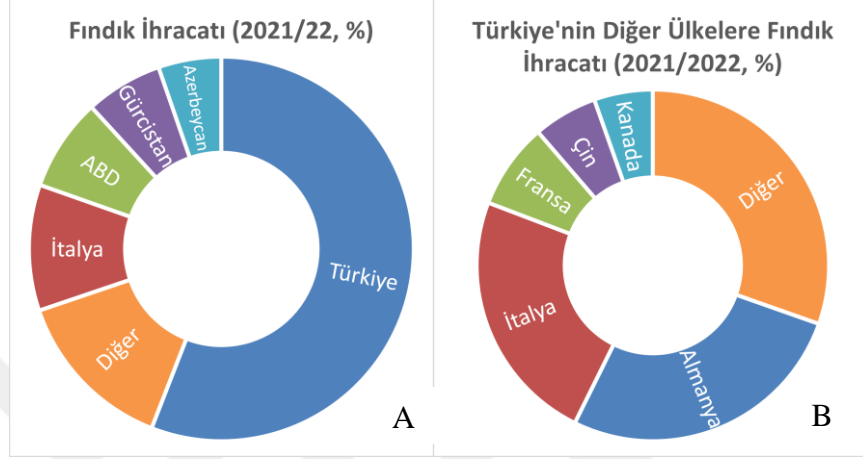
Alem	Plantae
Şube	Angiospermae
Sınıf	Magnoliopsida
Takım	Fagales
Aile	Betulaceae
Cins	Corylus
Tür	<i>Corylus avellana</i>

**Şekil 2.1:** Fındık meyvesi ve zurufu (Allegrini ve diğ., 2022).

Betulaceae ailesi, *Alnus*, *Betula*, *Carpinus*, *Corylus* and *Ostrya* gibi cinsleri içermektedir. *Corylus* cinsi, dünya üzerinde birçok bölgede yetişmektedir. *Corylus* cinsi 25 tür içermektedir ve bunlar arasında *C. americana* (ABD), *C. avellana* (Avrupa ve Batı Asya), *C. colurna* (Türkiye), *C. cornuta* (ABD), *C. maxima* (Güneydoğu Asya), *C. jacquemontii* (Hindistan), *C. chinensis* (Çin) and *C. ferox* (Tibet) örnek olarak gösterilmiştir (Holstein ve diğ., 2018). Gıda endüstrisinde önemli olan ve ekonomik olarak kültürü yapılan fındık türleri arasında *C. avellana* L. (Adi fındık), *C. colurna* L. (Türk fındığı) ve *C. maxima* Mill. (Lambert fındığı) yer almaktadır. *C. avellana*, yenilebilir fındıklarıyla bilinen ticari olarak en değerli türdür. *C. avellana*, ılıman iklim koşullarında yetişmektedir ve yağış oranı yüksek bölgelerde daha iyi büyümektedir. Bu nedenle genellikle Karadeniz kıyılarında, Güney Avrupa'da ve ABD'nin bazı eyaletlerinde bol miktarda bulunmaktadır (T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, 2023b).

Fındık, tarımsal istihdamı sağlamasının yanı sıra önemli ihracat ürünlerinden olması nedeniyle Türkiye ekonomisine çok büyük katkı sağlamaktadır. Ülkemizde 18 standart fındık çeşidi bulunmaktadır. Dünyada yaygın olarak yetiştirilen sert kabuklu meyveler arasında ceviz ve bademden sonra fındık gelmektedir. Türkiye, dünya fındık üretiminin yaklaşık %60'ını gerçekleştirerek bu alanda lider ülke konumundadır. Türkiye'de fındık yetiştiriciliği büyük oranda Karadeniz bölgesinde yapılmaktadır (Şekil 2.2). Dünyadaki başlıca diğer fındık üreticisi

ülkeler arasında İtalya, İspanya ve ABD gösterilmektedir. Türkiye 2021 yılında 684 bin tonluk üretim ile ilk sırada yer almaktadır. Bunu 12 bin ton ile İtalya ve 25 bin ton ile İspanya takip etmektedir. Fındık ihracatında ise yine Türkiye %55,9'lük oran ile 1. sırada yer almaktadır (T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, 2023b).



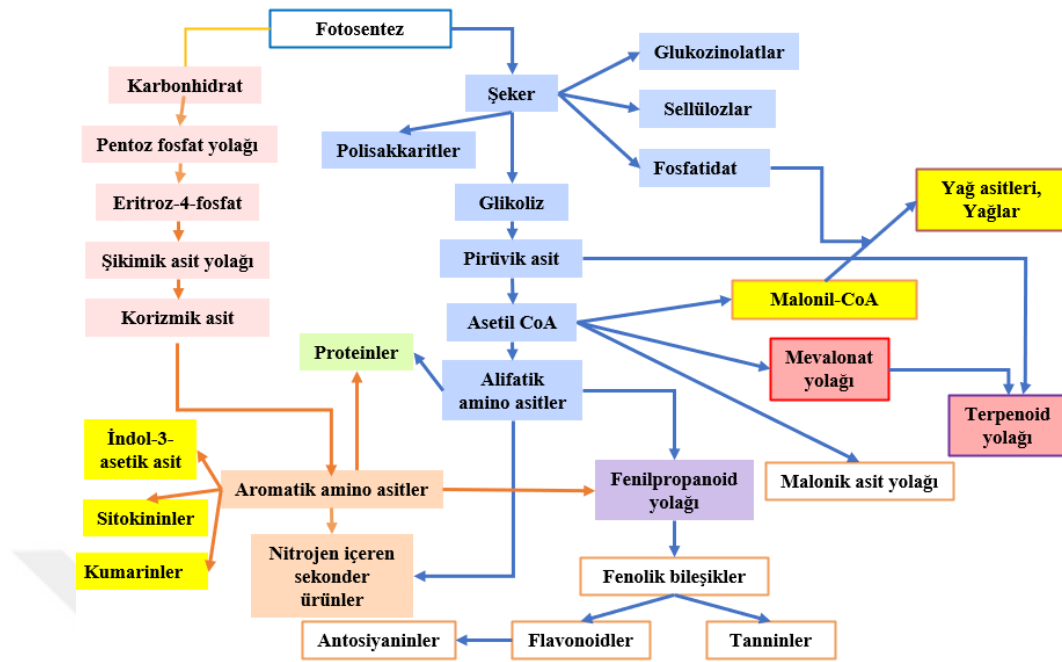
Şekil 2.2: Dünya fındık ihracatı (A) ve Türkiye'nin fındık ihraç ettiği ülkeler (B).

Fındık genellikle taze veya kavrulmuş olarak tüketilmekte ayrıca çoğunlukla şekerleme, çikolata, pasta ve benzeri ürünlerde işlenmiş olarak kullanılmaktadır. Yüksek besin içeriği ve eşsiz aroması nedeniyle gıda işleme endüstrisinde önemli bir ham maddedir. Buna ek olarak geleneksel İran tıbbında beyin küçülmesini ve hafıza kaybını önlemek için ilaç olarak kullanılmaktadır. Fındığın ekonomik yararları sürekli artmaya devam ettiğinden, dünya genelinde fındık ekim alanı artmaktadır. Bunun doğal bir sonucu olarak fındık yan ürün miktarı da önemli ölçüde artmaktadır. Bu yan ürünlerden tarım, gıda endüstrisi, boya maddesi ve biyokimyasal reaktiflerin üretiminde yararlanılmaktadır (Allegrini ve diğ., 2022).

Fındık ve yan ürünleri, fenolik bileşikler bakımından oldukça zengindir ve bu nedenle güçlü anti-oksidan özellikler ve çeşitli biyoaktif potansiyeller göstermektedir. Fındık ve yan ürünleri gıda, farmasötik, hayvan üretimi ve kozmetik endüstrisinde kullanılmaktadır. Ayrıca anti-tümöral, anti-mikrobiyal, anti-obezitik ve sinir hücrelerini koruyucu etkileri gösterilmiştir (Bottone ve diğ., 2019).

2.2. TERPENOİDLER

Bitkiler, dünya çapında gelişen sağlık sorunlarıyla mücadele edilmesinde ve hayati öneme sahip ilaçların üretilmesinde kullanılan değerli doğal kaynaklardır. Eski çağlardan beri insan ırkı, geleneksel bitkilerin iyileştirici özelliklerinden yararlanmaktadır. Bitkiler, çok sayıda biyoaktif bileşik sentezlemektedir. Sekonder metabolit olarak adlandırılan biyoaktif bileşikler, bitkinin büyüme ve gelişiminde doğrudan doğruya rol oynamamasına rağmen bitkilerin birbiriyle ve çevreleriyle etkileşiminde veya bitki savunma mekanizmasında işlev görmektedir. Sekonder metabolitler, bitki büyüme ve gelişiminde rol oynamamaktadır ve düşük miktarlarda üretilmektedir. Sekonder metabolitler kimyasal tarım ürünlerinin, tıbbi ürünlerin, tatlandırıcı, parfüm, gıda katkı maddeleri ve böcek ilaçlarının üretilmesinde kullanılmaktadır (Espinosa-Leal ve *diğ.*, 2018; Mohaddab ve *diğ.*, 2022). Bunların yanı sıra sekonder metabolitlerin COVID-19 pandemisi ile mücadelede etkili bir rol oynadığı gösterilmiştir (Chandran ve *diğ.*, 2020; Khan ve *diğ.*, 2021). Sekonder metabolitler bitkilerin herbivorlar ve mikroplar gibi zararlılarla mücadelesinde koruyucu bir rol oynarlar. Ayrıca allelopatik ajanlar için çekici kimyasallar üreterek bitki türleri arasındaki rekabeti etkilerler. Böylece tozlayıcıları ve tohum dağıtan hayvanları çekerler (Rodney ve *diğ.*, 2000). Son yıllarda yapılan çalışmalarla birlikte sekonder metabolitlerin tıbbi ürünler, kozmetikler ve biyopestisitler gibi çok değerli alanlarda kullanımı genişlemiştir. Bu nedenle sekonder metabolitler, bitkilerin ticari değerini ve önemini büyük oranda artırmıştır. Fitokimyasal çalışmalar bu değerli sekonder bileşikleri flavonoidler, fenoller, nitrojen bileşikleri ve terpenler gibi çeşitli gruplar altında tanımlanmıştır (Mohaddab ve *diğ.*, 2022). Şekil 2.3'te başlıca sekonder metabolit sınıflarının biyosentetik yollarını gösterilmiştir.



Şekil 2.3: Sekonder metabolitlerin başlıca biyosentetik yolları (Mohaddab ve diğ., 2022).

Sekonder metabolitler fenolikler, terpenoidler, alkaloidlerin içinde bulunduğu birçok sınıfa ayrılmışlardır. Terpenler, sekonder metabolitlerin en büyük ve çeşitli grubudur. Üstelik, bitkiler tarafından çeşitli moleküler süreçlerde kullanılan savunma mekanizmasının ürünleridir. Terpen terimi, 1866 yılında Dumas tarafından önerilmiştir ve çam ağacından elde edilen turpentin kökenlenmiştir. Şimdiye kadar yaklaşık 55 bin terpen ve terpen türevi tanımlanmıştır. Terpenler, hidrokarbon zincirleri veya karbosiklik iskeletleri içeren yapısal farklılıklara sahiptir. Ayrıca oksijenasyon, hidrojenasyon veya dehidrojenasyon gibi modifikasyonlara uğrayarak çeşitli terpenoidleri oluşturmaktadır. Terpenlerin yapı iskeleti, 5 karbonlu izopren bakiyelerinden (C_5H_8) oluşmaktadır. İzopentenil difosfat (IPP) ve onun izomeri dimetilallil difosfat (DMAPP) terpenlerin biyosentetik öncülleridir. Terpenoidler, mevalonat (MVA) ve 2-C-metil-(D)-eritritol-4-fosfat (MEP) yolağı aracılığıyla iki farklı şekilde sentezlenebilmektedir. MVA yolağı, çoğunlukla ökaryotik organizmaların sitoplazmasında bulunmaktadır. İlk olarak 2 molekül asetil CoA, 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) oluşturmak üzere katalizlenmektedir. Elde edilen HMG-CoA, MVA ve sonrasında izopentenil difosfat (IPP) üretmek için katalizlenmektedir. Daha sonra IPP ve onun izomeri dimetilallil difosfat (DMAPP) seskiterpenler, triterpenler ve steroid öncülleri oluşturmaktadır. MEP yolağı ise genellikle prokaryot ve bitkilerin plastidlerinde gerçekleşmektedir. MEP yolağı, bitkilerde monoterpenler, diterpenler ve tetraterpenleri üretmektedir (Wang ve diğ., 2019).

Terpenoidler, doğada yaygın olarak bulunan, ve çeşitli yapılara ve geniş bir çeşitliliğe sahip olan bileşiklerdir. Bazı terpenoidler, bitki büyümesi ve gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin, bir bitki hormonu olan giberellin bitki gelişimini düzenlemektedir. Karotenoidler, fotosentezde görev almaktadır. Birçok terpenoid ise bitkilerin çevre ile etkileşiminde rol oynamaktadır. Örneğin, fitoaleksinler olarak bitki savunma sisteminde işlev görmektedir. Ayrıca, mentol ve perillil alkol gibi birçok uçucu terpenoid baharatlar, tatlandırıcılar ve kozmetik ham maddeleri olarak kullanılmaktadır. Endüstriyel ham madde olarak kullanılan piretrin ve limonidler, pestisit olarak böcek ilaçlarında kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra farnesen ve bisabolen gibi seskiterpenlerin, pinen ve limonen gibi monoterpenlerin ise yakıt üretiminde kullanılabilecekleri rapor edilmiştir. (Mosquera ve diğ., 2021).

Son yıllarda özellikle tıbbi bitkilerde yapılan çalışmalarda terpenoidlerin giderek artan önemine dikkat çekilmiştir. Bu çalışmalarda terpenoidlerin; anti-tümör, anti-inflamatuvar, anti-bakteriyel, anti-viral, antimalarial ve anti-kolinesterazik gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir. Bununla beraber bazı terpenoidlerin insektisidal, immünomodülatör, antioksidan, yaşlanmayı önleyici ve sinir hücrelerini koruyucu özellikleri de bulunmaktadır. Bu nedenle, özellikle anti-kanser özelliklere sahip paklitaksel ve artemisin gibi terpenoidlerin biyolojik etkileri üzerine yapılan çalışmalar, ilaç taramasına ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır ve yeni ilaçların geliştirilmesini sağlamaktadır (Yang ve diğ., 2020).

2.3. PAKLİTAKSEL

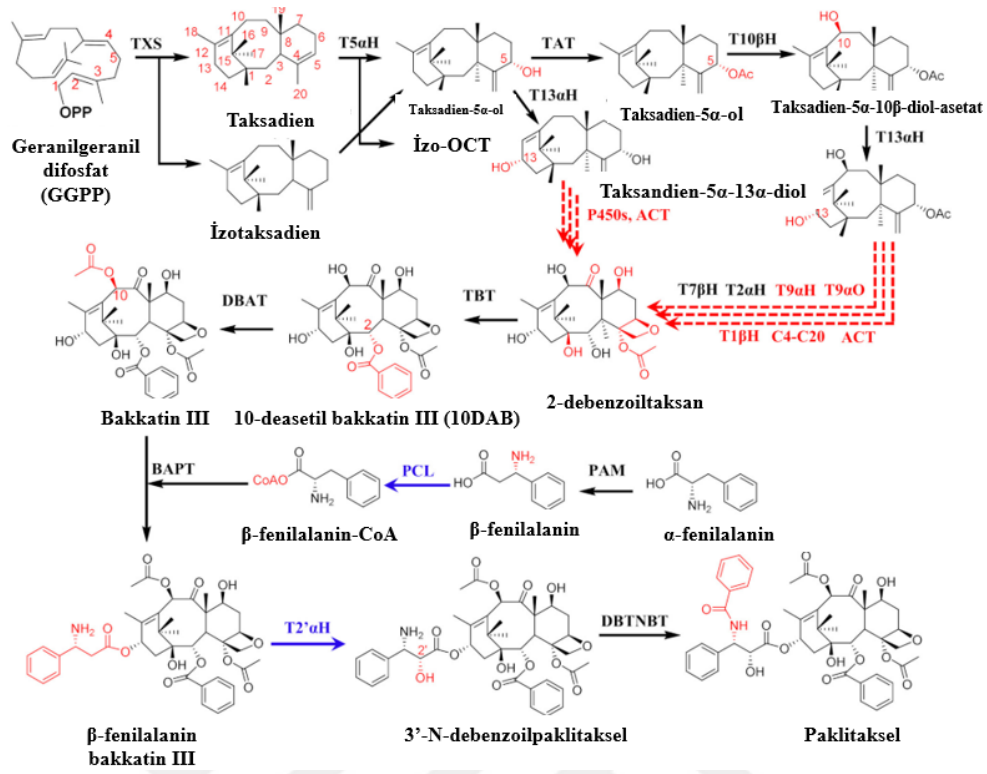
Paklitaksel, *Taxus* sp. tarafından ve daha az ölçüde Coniferales, *Cephalotaxus*, *Podocarpus gracilior* ve *C. avellana* tarafından üretilen diterpenoid bir sekonder metabolittir. Paklitaksel, ilk kez 1960'lı yıllarda ABD Ulusal Kanser Enstitüsü ve Tarım Bakanlığı tarafından bitkilerdeki anti-tümör ajanları tespit etmek için yapılan bir ilaç tarama programında, *Taxus brevifolia*'da potansiyel bir anti-kanser ilaç olarak keşfedilmiştir (Wani ve diğ., 1971). Paklitakselin yapısı 1971 yılında yayınlanmış ve klinik denemeler 1984 yılında başlamıştır (Walsh & Goodman, 2002). Klinik denemelerin başarıyla sonuçlanmasının ardından paklitaksele olan talep giderek artmıştır. Ancak paklitaksel üretimi için *T. brevifolia* ağaç kabuklarının kullanılması bu bitkinin önemli bir şekilde tahrip edilmesine neden olmuştur. Ayrıca *T. brevifolia*'dan paklitaksel üretme maliyeti, belirlenen bütçenin yaklaşık olarak 10

katını aşmıştır. Bu nedenle araştırmacılar, paklitaksel için kimyasal sentez yöntemi geliştirmeye yönelmişler ve 1994 yılının sonunda paklitakselin kimyasal sentez yoluyla üretimini gerçekleştirmişlerdir (Nicolaou ve *diğ.*, 1994). Ardından Bristol-Myers Squibb firması, paklitakseli Taxol® ticari markası altında piyasaya sürmüştür. Taxol®'ün üstün başarısı nedeniyle global ölçekteki satışı milyonlarca doları aşmıştır (Sofias ve *diğ.*, 2017). Ancak, Taxol® bazı yan etkilerinin gözlenmesinden sonra farklı paklitaksel formülasyonlarının geliştirilmesine yönelik çalışmalar hızlanmıştır (Gallego-Jara ve *diğ.*, 2020).

Taxol®, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından meme, yumurtalık ve akciğer kanseri ile Kaposi sarkomu tedavisinde onaylanmıştır. İlaç tedavisinde kanser türüne bağlı olsa da Taxol®'ün etki oranı yumurtalık kanserinde %30 ve metastatik meme kanserinde %56 olarak gösterilmiştir (Harshita ve *diğ.*, 2019). Yıllar geçtikçe Taxol® ve alternatif formülasyonlarda kullanılan paklitaksel; meme, yumurtalık, küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu, Kaposi sarkomu ve lösemi gibi farklı kanser tiplerini tedavi etmek için en çok kullanılan ajanlardan biri haline gelmiştir. Ayrıca Taxol®, diğer potansiyel ilaçların kanser tedavilerindeki terapötik etkilerini değerlendirmek için referans olarak da kullanılmaktadır. Bu nedenle Taxol®'e olan talep her geçen gün giderek artmaktadır (Dogra & Kumar, 2023).

2.3.1. Paklitaksel Biyosentezi

Taxus türlerinde paklitaksel, oldukça karmaşık biyosentez süreçlerinden geçerek üretilmektedir. Paklitaksel biyosentezi, 19 ayrı enzimatik reaksiyondan oluşmaktadır ve bunların 8'i P450 enzimi tarafından katalizlenen oksidasyon reaksiyonlarıdır (Şekil 2.4). Paklitakselin biyosentezindeki temel adımlardan biri, geranil geranil pirofosfatın (GGPP) siklizasyonudur. GGPP, taksadien sentaz (TXS) enzimi tarafından katalizlenerek taksadien ve onun türevi bileşikleri (taksanlar) üretmektedir. Taksan iskeleti oluşturulduktan sonra hidroksilasyon, açılasyon, epoksidasyon ve oksidasyon gibi birçok kimyasal modifikasyon gerçekleşmektedir (Kaspera ve *diğ.*, 2010). Ardından önce 10-deasetil bakkatin III ve daha sonra bakkatin III gibi işlevsel olarak önemli ara ürünler sentezlenmektedir. Bakkatin III'e β -fenilalaninden türevlenen bir yan zincirin bağlanmasıyla paklitaksel ve onun türevi sefalomannin üretilmektedir. Bugüne kadar taksan biyosentetik yolağındaki çoğu aşama aydınlatılmasına rağmen tanımlanmamış aday genlerin karakterize edilmesi için geniş kapsamlı çalışmalara hala ihtiyaç duyulmaktadır (Raeispour Shirazi ve *diğ.*, 2021).

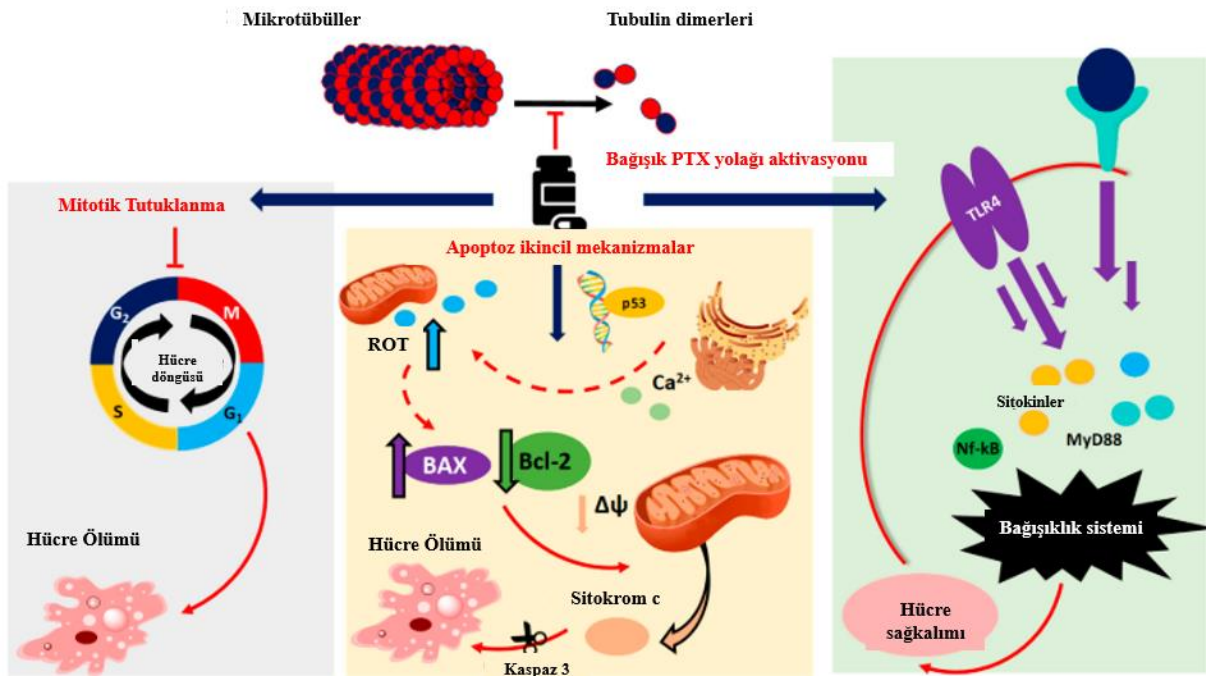


Şekil 2.4: Paklitaksel biyosentetik yolağı (Mutanda ve diğ., 2021).

2.3.2. Taksol®'ün Anti-tümöral Mekanizması

Kanser vücudun farklı dokularını etkileyen, kontrolsüz hücre üremesi görülen ve diğer vücut bölgelerine yayılma özelliği gösteren bir hastalıklar grubudur. 2023 yılında yayınlanan bir raporda sadece ABD'de yaklaşık 2 milyon yeni kanser tanısının konulduğu ve 600 bin kişinin kanser nedeniyle hayatını kaybettiği belirtilmiştir (Siegel ve diğ., 2023). Bu nedenle günümüzde bilim insanlarının en büyük ilgi alanlarından biri farklı kanser türlerine karşı etkili tedaviler sunabilmektir. 1998 yılında ABD Gıda ve İlaç Dairesi, Taksol®'ü potansiyel bir kanser ilacı olarak onaylamıştır ve Taksol® günümüzde en çok satılan kanser ilaçlarından biri haline gelmiştir. Taksol®, çoğu anti-tümör ilaçtan farklı olarak DNA veya RNA'yı hasara uğratmaya yönelik değil, hücre ölümünü uyarmak için tübülüne bağlanarak mikrotübüllerin parçalanmasını engelleyerek işlev görmektedir (Şekil 2.5). Bu nedenle Taksol®, mikrotübül hedefli ajanlar olarak adlandırılan ilaçlar arasında yer almaktadır. Mikrotübüller, birçok önemli hücresel süreçte rol oynayan tübülün heterodimerleridir. Taksol®, α/β tübülüne bağlanarak mikrotübüllerin depolimerleşmesini önlemektedir. Böylece hücre döngüsünü mitotik evrede tutuklayarak hücre ölümüne neden olmaktadır (Howat ve diğ., 2014).

Paklitakselin başlıca etki mekanizması, mitotik tutuklanma olsa da tümörlerde hücrel apoptoza metabolik olarak da neden olabileceği varsayılmaktadır (Ganguly ve diğ., 2010). Taksol®'ün hücrel apoptoza nasıl indüklediği tam olarak anlaşılammış olsa da çeşitli insan tümörlerinin ilerlemesiyle ilişkili olan transkripsiyon faktörü p53 aktivasyonu, ER stresine bağlı olarak gelişen ROT artışı, Ca^{2+} aşırı salınımı, anti-apoptotik protein B-hücre lösemisi 2 (Bcl-2) gen anlatımının azalması ve kaspaz-3 proteininin yarılanmasıyla ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Harshita ve diğ., 2019).



Şekil 2.5: Kanser hücrelerinde paklitakselin etki mekanizması (Gallego-Jara ve diğ., 2020).

2.3.3. Paklitaksel Tabanlı İlaçlar

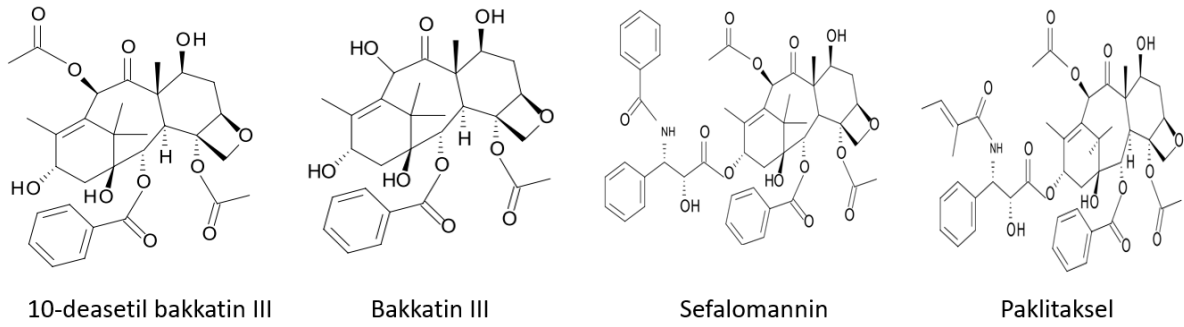
Paklitaksel, taksan halkası içeren bir diterpenoiddir ve karmaşık bir kimyasal yapıya sahiptir. Taksan halkasının yanı sıra C13 yan zinciri, oksetan halkası ve homokiral ester zinciri, paklitakselin anti-tümoral aktivitesini gösterebilmesi için oldukça önemlidir. Bununla birlikte Taksol®'ün C-10 hidroksil grubunun asetilasyonu anti-tümör aktivite için gerekli değildir. Bu nedenle araştırmacılar, bu pozisyondaki asetil grubu olmayan sentetik bir analog madde geliştirilmiştir. Doksetaksel® olarak adlandırılan bu sentetik analog, Taksol®'e göre daha yüksek bir anti-tümöral aktivite göstermiştir (Lyseng-Williamson ve diğ., 2005).

Taksol® ilaç teminini kısıtlayan temel problemlerden biri paklitakselin sudaki çözünürlüğünün düşük olmasıdır. Çözünürlük problemini aşmak için formülasyon aracı olarak çeşitli yüzey aktif

maddeler kullanılmıştır. Bununla birlikte yüzey aktif maddeler (özellikle Cremophor EL) hiperlipidemi, anormal lipoprotein oluşumu, eritrosit agregasyonu ve periferik nöropati ile ilişkilendirilmiştir (Gelderblom ve *diğ.*, 2001). Son yıllarda nano boyutlu malzemelerin kullanımı artmasıyla birlikte ilaç endüstrisinde de ilaçların taşınması ve hedeflenmesinde nanopartiküllerin uygulanması önem kazanmıştır. Taksol[®] piyasaya sürüldüğünden beri birçok farklı taşıyıcı, ilaç formülasyonunda kullanılmıştır (Sofias ve *diğ.*, 2017). Bunlar arasında albumin temelli nanopartiküller (Abraxane[®]), polimerik lipitik nanopartiküller (PICN[®]), polimerik miseller (Cynviloq[®], Nanoxel[®] ve Paclical[®]) ve lipozomlar (Lipusu[®]) gibi birçok paklitaksel tabanlı nanopartiküller geliştirilmiştir. Abraxane[®], bunlar arasında en başarılı olanıdır ve Taksol[®]'den daha iyi sonuç vermektedir (Dranitsaris ve *diğ.*, 2016). Paklitaksel bazlı nanopartiküllerin kullanılması, ilaç çözünürlüğünü artırmasının yanı sıra ilaç hedeflenmesini de daha efektif hale getirmiştir (Gallego-Jara ve *diğ.*, 2020).

2.3.4. Paklitakselin Üretimi

Taxol[®] ilacının güçlü antitümöral özelliklerinin keşfedilmesinden bu yana dünya genelinde bu ilaca talep katlanarak artmıştır. Taxol[®] ilacının üretimi, Taxus türlerinin kabuklarının tüketilmesine dayanmaktadır. Bu, 2 gram Taxol[®] ile tek bir hastayı tedavi etmek için 4 ağacın kesilmesi anlamına gelmektedir (Liu ve *diğ.*, 2016). Bu çevre dostu olmayan üretim metodu, Taxus türlerinin neslinin tükenme riskini ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle kimyasal sentez, Taxus olmayan bitki kaynaklarının araştırılması, endofitik mantar kültürleri, doğal ve heterolog konaklarda metabolik mühendislik gibi alternatif üretim yöntemlerinin geliştirilmesini zorunlu hale getirmiştir (Sabzehzari ve *diğ.*, 2020). 1990'lı yılların başlarından itibaren, kimyasal sentez ve 10-deasetil bakkatin III, bakkatin III ve sefalomannin gibi ara ürünlerden yarı-sentez yöntemleri geliştirilmiştir (Baloglu & Kingston, 1999). Ancak bu üretim yöntemleri, üretim verimini artırmasına rağmen oldukça komplekstir ve endüstriyel olarak uygulanabilir değildirler. Son 20 yılda daha ucuz ve daha sürdürülebilir, çevre-dostu sistemler geliştirmek için yapılan tüm çalışmalara rağmen Taxol[®] ilacının üretimi için Taxus ağaç kabuklarından ekstraksiyon yöntemi hala en sık kullanılan yöntemdir (Gallego-Jara ve *diğ.*, 2020). Şekil 2.6'da üretimi gerçekleştirilen paklitaksel ve ticari olarak önemli diğer taksanların yapıları gösterilmiştir.



Şekil 2.6: Paklitaksel ve ticari olarak önemli diğer taksanların yapısı (Gallego ve diğ., 2017).

Genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalar kullanan fermentasyon yöntemi, *Taxus* ağaçlarının kontrolsüz kesimini engellemek için paklitaksel üretiminde umut verici bir seçenektir. Mikrobiyal sistemlerde paklitaksel üretimi için henüz tam bir sentez yöntemi geliştirilemese de taksadienin başarıyla üretildiği çalışmalar vardır. *Escherichia coli*, *Sacharomyces cerevisiae* ve *Bacillus subtilis*, taksadien üretimi için öne çıkan mikroorganizmalardır. 2010 yılında Ajikumar ve arkadaşları, *E. coli*'de inhibitör bileşik olarak işlev gören indol bileşiğini kullanarak taksadien yolağını indüklemiş ve 1 g/L taksadien üretimini başarıyla gerçekleştirmiştir (Ajikumar et diğ., 2010). Nowrouzi ve arkadaşları, *S. cerevisiae*'de TXS genini genomu aktararak 129 mg/L taksadien üretmiştir (Nowrouzi ve diğ., 2020). Abdallah ve arkadaşları *B. subtilis*'te heterolog biyosentetik enzimleri kullanarak taksadien üretimini 17,8 mg/L'ye yükseltmiştir (Abdallah ve diğ., 2019). Araştırmacılar paklitakselin yapısına daha yakın taksanların üretimi konusunda ise *E. coli*'de heterolog P450 oksijenazları başarılı bir şekilde kullanarak deneysel paklitaksel üretiminde önemli aşamalar kaydetmişlerdir. Qing-Yang ve arkadaşları, *E. coli*'ye GGPPS, TXS, sitokrom P450 redüktaz ve taksadien-5 α -hidroksilaz enzimlerini aktararak taksadienin oksijenasyonu katalizlemişlerdir. Böylece paklitakselin önemli öncüllerinden biri olan taksadien-5 α -ol'ü 7 mg/L üretmeyi başarmışlardır (Wu ve diğ., 2022).

Bir diğer alternatif paklitaksel kaynağı endofitik mantarlardır. Endofitik mantarlar, bitkilerde hasara neden olmadan yaşayan organizmalardır. Bu endofitlerin birçoğu, konak bitkiye özgü olan sekonder metabolitler üretmektedir. Ancak endofitik mantar fizyolojisinin yeterince aydınlatılmamış olması ve birden fazla alt kültür sonrasında paklitaksel verimindeki azalma, endofitik mantarlardan paklitaksel üretimini kısıtlamaktadır. Bu bağlamda *Aspergillus flavipes* (185 μ g/L), *A. aculeatinus* (1,3 mg/L), *A. oryzae* (95 μ g/L), gibi endofitik mantarlardan paklitaksel üreten birçok çalışma bulunmaktadır. Kumar ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise *Aspergillus fumigatus*'da 1,6 g/L paklitaksel üretmiştir (Kumar ve diğ., 2019).

Ayrıca paklitaksel üreten yeni endofitik mantar kaynak arayışları ve verim iyileştirme çalışmaları devam etmektedir (El-sayed ve diğ., 2019; Qiao ve diğ., 2020; Mohammadi Ballakuti ve diğ., 2022).

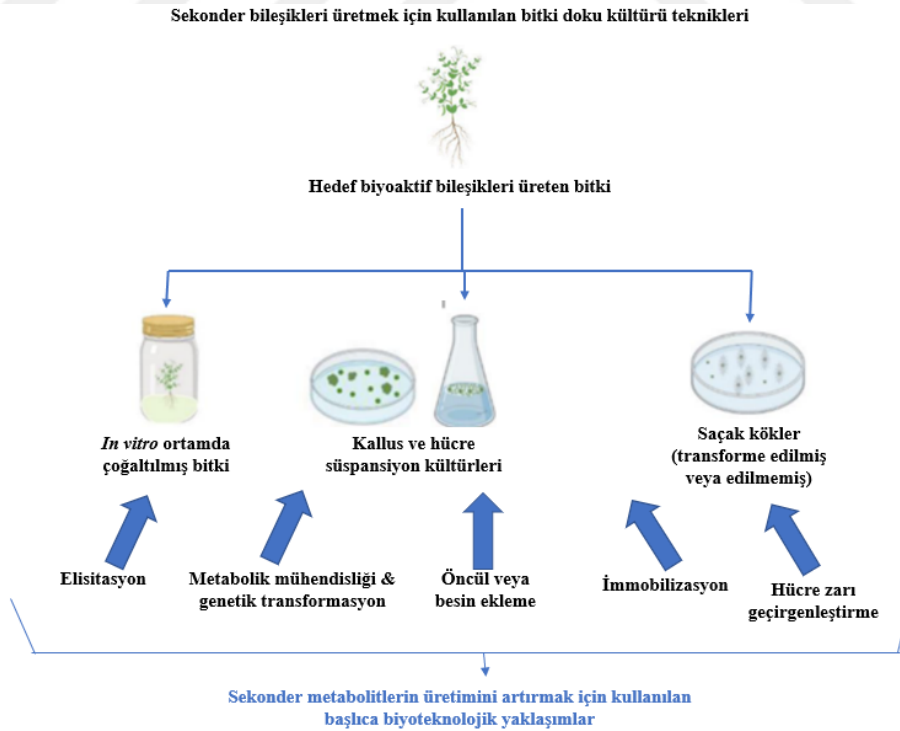
Son yıllarda *Taxus* ağaçlarının yanı sıra başka bir bitki kaynağının da paklitaksel ve türevlerini ürettiği gösterilmiştir. *Corylus* türleri, bu değerli fitokimyasalların üretimi için potansiyel bir kaynak olarak değerlendirilmiştir. Paklitaksel ilk kez Hoffman ve arkadaşları (1998) tarafından kapalı tohumlu bitki *Corylus mandshurica*'da keşfedilmiştir. *Corylus* türleri (yaygın bilinen ismiyle fındık) daha çok besinsel değeriyle incelenmekte iken, fındıkta paklitaksel ve türevlerinin keşfi, bu bitkinin kanser ve farmosötik endüstrisinde çeşitli etkilerinin incelenmesinin önünü açmıştır (Gallego ve diğ., 2017).

2.4. SEKONDER METABOLİTLERİN BİTKİLERDE ÜRETİMİ

Sekonder metabolitler, primer metabolitlerden farklıdır. Primer metabolitler, bitkinin büyüme ve gelişimde gereklidir. Ayrıca primer metabolitler, solunum ve fotosentez gibi önemli metabolik süreçlerde görev almaktadırlar. Primer metabolitlerin sentezi, 3 metabolik yolda gerçekleşmektedir: Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) yolağı, Heksoz monofosfat (HMP) yolağı ve Entner-Doudoroff yolağı (HMP). Sekonder metabolitler ise primer metabolitlerden türevlenmişlerdir (Hussain ve diğ., 2012). Sekonder metabolitler malonat/asetat yolağı veya şikimik asit yolağı tarafından sentezlenebilmektedir. Farmasötik endüstrinin büyük oranda tıbbi bitkilere ve onların ekstraksiyonuna bağlı olması nedeniyle tıbbi bitkiler, nesli tükenmekte riskiyle karşı karşıya kalmaktadırlar. Sekonder metabolit üretimi için bitkilerin zirai tarlalara ekilmesi ürün verimliliğinin düşük olması ve coğrafik, mevsimsel ve çevresel varyasyonlar nedeniyle ürün konsantrasyondaki kararsızlık gibi çeşitli zorlukları beraberinde getirmektedir. Ayrıca kompleks yapıları nedeniyle, sekonder metabolitlerin kimyasal olarak ve geleneksel metotlarla üretilmesi oldukça zordur. Bu nedenle sekonder metabolitlerin üretimi için *in vitro* metotların kullanılması, pazar talebini karşılamak için sürdürülebilir bir yol sunmaktadır. Bunun yanı sıra, bitki doku kültürü teknikleri fito-farmasötik endüstrisinde özellikle kitlesel üretim, gen kaynaklarının korunması ve biyolojik olarak aktif bileşiklerin üretiminde karşılaşılan zorlukların çözülmesinde etkili ve alternatif bir yöntemdir. *In vitro* koşullarda üretilen bitki materyalleri, sekonder metabolitlerin üretimi için değerli kaynaklardır, ayrıca biyokimyasal ve metabolik yolların kapsamlı bir şekilde incelenebilmesi için özel bir fırsat sunmaktadır. Bunların yanı sıra *in vitro* koşullarda üretilen bitki materyalleri, biyoaktif

bileşiklerin karakterizasyonunda kullanılmaktadır. Doku kültürlerinden ekstrakte edilmiş biyoaktif bileşikler, basit ekstraksiyon süreçleri ve pigmentlerin az miktarda bulunması nedeniyle kolaylıkla saflaştırılabilmektedir. Bu önemli gelişmeler nedeniyle bitki doku kültürü alanındaki araştırmalar, sekonder metabolitlerin endüstriyel kullanımı için öne çıkmaktadır (Fazili ve diğ., 2022).

Bitki hücre, doku ve organ kültürleri, yararlı sekonder metabolitleri üretmek için sürdürülebilir sistemler olmasına karşın bu sistemlerde çoğu zaman istenen biyoaktif bileşikler üretilmemektedir. Günümüzde sekonder bileşiklerin sentezi ve biyokütle birikimi için hücre hattı geliştirme, elisitasyon, kültür ortamı ve koşullarının optimizasyonu, besin ve öncüllerin eklenmesi, biyotransformasyon ve immobilizasyon metodları gibi farklı stratejiler geliştirilmiştir (Şekil 2.7). Bununla birlikte, bitki hücrelerini biyolojik fabrikalar olarak kullanarak ticari değeri yüksek sekonder metabolitlerin başarılı bir şekilde üretildiği örnek sayısı fazla değildir. Bunlar arasında en önemli örnekler olarak *Lithospermum erythrorhizon*'de berberin, *Coptis japonica*'de şikonin ve *Taxus* türlerinde paklitaksel gösterilmektedir (Changxing ve diğ., 2020; Rani & Vimolmangkang, 2022; Jeyasri ve diğ., 2023).



Şekil 2.7: Bitki hücre kültürü sistemlerinde sekonder metabolitlerin üretimini artırmak için kullanılan biyoteknolojik yaklaşımlar (Bouzroud ve diğ., 2023).

2.4.1. Hücre Süspansiyon Kültürleri

Hücre süspansiyon kültürleri sekonder metabolitlerin endüstriyel üretimi için doku ve organ kültürlerinden daha kolaydır. Bu metot, doğal biyoaktif ürünlerin üretimi için güvenilir bir kaynaktır. Hücre süspansiyon kültürlerinde hedeflenen metabolitlerin üretimi artırılmaktadır ancak belli bir süre sonra hücre süspansiyon kültürlerinin sentezleme kapasitesi, yetersiz besin veya genetik modifikasyona uğraması nedeniyle azalmaktadır. Bu yüzden yüksek verimli hücre hattının seçilmesi ve korunması, sekonder metabolit üretimi için çok önemlidir (Chattopadhyay ve diğ., 2002).

Hücre süspansiyon kültürlerinin kurulması için öncelikle uygun ortamda yetiştirilen ve seçilmiş ana bitkilerden kallus üretilmeli ve altkültürlenmelidir. Hücre süspansiyon kültürünün kurulması için kallusların kolayca ufalanabilen kısmı sıvı ortama aktarılır. Hücre süspansiyon kültürleri ışık, sıcaklık, çalkalama, havalanma ve diğer fizyolojik parametrelerce elverişli çevresel ortamda sürdürülmektedir. Çeşitli çalışmalarda süspansiyon kültürlerindeki hücrelerin ortam içeriğinden, kallus kalitesinden ve genetik varyasyondan yüksek oranda etkilendikleri gösterilmiştir (Mustafa ve diğ., 2011). Tablo 2.2’de çeşitli bitki türlerinde hücre süspansiyon kültürlerinin başarılı bir şekilde kurulduğu örnekler gösterilmiştir.

Tablo 2.2: Bitki hücre süspansiyon kültürlerinde başarıyla üretilen sekonder metabolitler.

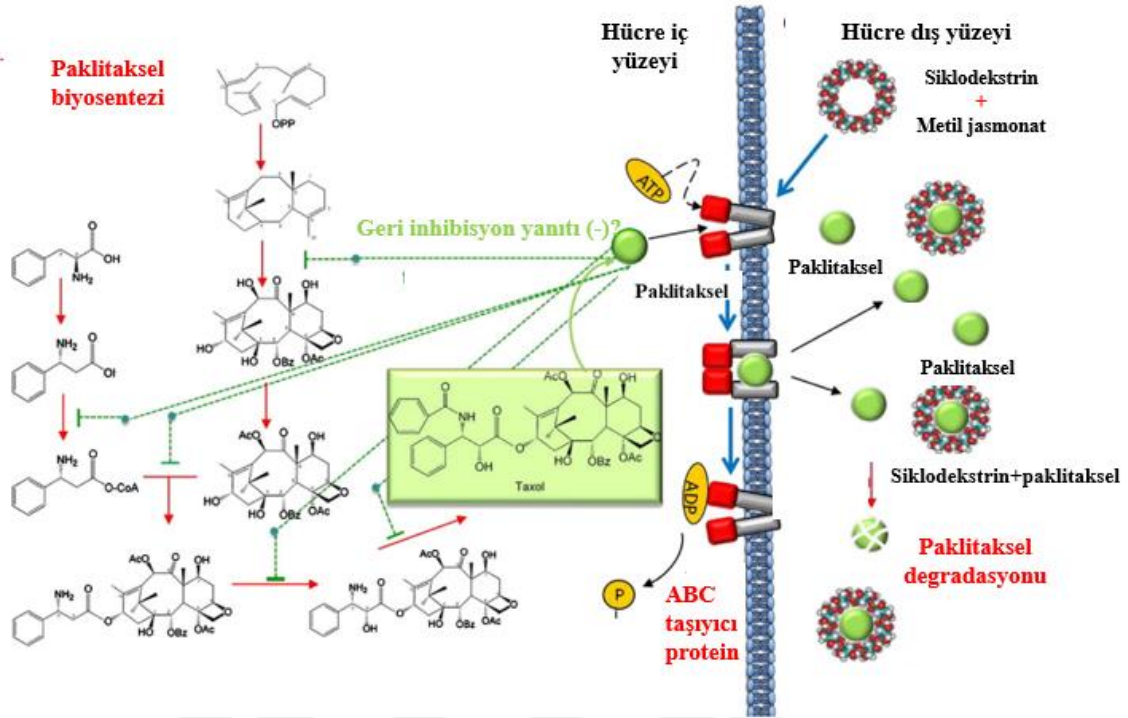
Bitki İsmi	Ürün	Referans
<i>Taxus baccata</i>	Paklitaksel	(Perez-Matas ve diğ., 2022)
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Şikonin	(Yazaki, 2017)
<i>Salvia officinalis</i>	Rosmarinik Asit	(Khojasteh ve diğ., 2020)
<i>Vitisi vinifera</i>	Resveratrol	(Süntar ve diğ., 2021)
<i>Panax ginseng</i>	Ginsenoid	(Hou ve diğ., 2021)

2.4.2. Paklitakselin Hücre Dışına Salgılanması

Sekonder metabolitlerin hücre kültürlerinde üretiminin artırılmasına yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Bununla beraber, hücre kültürlerinde sekonder metabolitlerin üretimini kısıtlayan faktörler bulunmaktadır. Bunlar arasında hücre hatları arasındaki verim farklılığı ve sekonder metabolit üretimindeki düşük verim örnek olarak gösterilmektedir. Bu nedenle araştırmacılar

biyosentetik yolların aydınlatılmasına ve manipülasyonuna yönelik çalışmalar yapmışlardır. Bununla birlikte bazı çalışmalarda hücre kültürlerindeki düşük metabolit verimi, hücrelerinin metabolit biriktirme kapasitesi ve hücre içinde metabolitlerin bozunması ile ilişkilendirilmiştir (Cusido ve diğ., 2014; Sabater-Jara ve diğ., 2014; Kashani ve diğ., 2018; Perez-Matas ve diğ., 2022).

Sekonder metabolitlerin hücre içinde depolanması ve hücre dışına salgılanması, bitki hücre kültürlerinde ürün verimini artırmak için aydınlatılması gereken mekanizmalardandır. Ancak, sekonder metabolitlerin hücre içinde, hücre ve doku arasında taşınma süreçleri oldukça karmaşıktır. Farklı sekonder metabolitlere özgü taşıma mekanizmalarına ek olarak, aynı sekonder metabolitin farklı türlerdeki salgılanma mekanizması yüksek derecede değişkenlik göstermektedir. *Taxus media* süspansiyon kültürlerinde paklitakselin hücre dışı ortama salgılanma oranı %10 iken, *T. chinensis*'de %50 ve *T. baccata*'da yaklaşık olarak %90'dır. Naill ve arkadaşları, *Taxus* türlerinde paklitakselin en azından bir kısmının hücre dışına taşınması için membran proteini veya hücre yüzey reseptörü gibi özel mekanizmaların bulunduğunu göstermiştir (Naill ve diğ., 2012). Paklitakselin hücre dışına salgı oranının artmasının, paklitaksel için geri inhibisyon mekanizmasının çalışmasını engellediği ve paklitaksel biyosentezini artırdığı belirtilmiştir. Ayrıca kültür ortamına paklitakselin salgılanması, ekstraksiyon süreçlerini kolaylaştırmaktadır ve maliyeti azaltmaktadır. Bu mekanizmaların aydınlatılması, paklitakselin hücre dışına salgılanmasını artıracak çeşitli stratejilerin kullanılmasını sağlamıştır. (Sabater-Jara ve diğ., 2014; Farhadi ve diğ., 2020). Şekil 2.8'de paklitakselin hücre içinde birikiminin ve hücre dışına transportunun mekanizması gösterilmektedir.



Şekil 2.8: Hücre içinde paklitaksel birikimi ve hücre dışına transportu (Cusido ve diğ., 2014).

2.4.3. Elisitasyon

Elisitör, spesifik bir bileşiğin biyosentezini başlatan veya indükleyen bir maddedir. Birçok geleneksel yaklaşım, sekonder metabolitlerin üretimini artırabilmektedir ancak elisitasyon en etkili metotlardan birisidir. Elisitörler sekonder metabolitlerin biyosentezini indüklemek veya artırmak için hücre süspansiyon kültürlerine çok küçük konsantrasyonlarda eklenmektedirler. Elisitörler yapılarına ve kökenlerine göre sınıflandırılmaktadırlar. Yapılarına göre elisitörler abiyotik ve biyotik olarak gruplandırılırken kökenlerine göre dış kaynaklı ve iç kaynaklı olarak ayrılmaktadırlar. Abiyotik elisitörler, biyolojik olmayan maddelerdir ve çoğunlukla inorganik bileşiklerin tuzları, bakır ve kadmiyum iyonları gibi fiziksel faktörler ve yüksek pH koşulları abiyotik elisitörler olarak değerlendirilmektedir. Biyolojik elisitörler ise biyolojik materyallerdir ve polisakkaritler (pektin, selüloz, kitin, glukanlar), glikoproteinler, G-protein ve hücre içi proteinleri kapsamaktadır. Dış kaynaklı elisitörler polisakkaritler, poliaminler ve yağ asitleri gibi hücre dışında oluşan bileşiklerdir. İç kaynaklı elisitörler ise hücre içinde üretilmektedir. Bunlara galakturonit veya β -glukozitler örnek olarak gösterilebilir (Guru ve diğ., 2022).

Bitki doku kültüründe elisitasyon uygulaması, kimyasal veya fiziksel stres faktörleri uygulanarak hücre süspansiyon kültürlerinde gerçekleştirilmektedir. Stres faktörleri normal

zamanda bitkiler tarafından üretilmeyen sekonder metabolitlerin üretimini uyarmaktadır. Elisitasyon uygulamasında, biyotik elisitörler (kitosan, çeşitli protein ekstraktları, patojenik mantarlar) ve abiyotik faktörler (ağır metal tuzları, yüksek ve düşük sıcaklık, pH, UV ışığı) kullanılmaktadır. Bitki doku kültüründe sekonder metabolitlerin miktarının elisitörler kullanılarak artırıldığı çalışmalar Tablo 2.3'te gösterilmiştir. Araştırmacılar, *in vitro* sistemlerde sekonder metabolitlerin üretiminin artırılması için çeşitli tiplerde elisitörler kullanmışlardır. Salehi ve arkadaşları ise *Corylus avellana*'dan elde edilen bir sekonder metabolit olan paklitaksel üretiminde *Chaetomium globosum* ve *Paraconiothyrium brasiliense* ekstraktlarının pozitif etkisini göstermişlerdir (Salehi ve diğ., 2019a). Escrich ve arkadaşları (2021), 1 µM koronatin ve 10 mg/L kalik[8]saren nanopartikülü *Taxus media*'da paklitaksel üretiminin uyarılması için kullanmışlardır. Koronatin ve kalik[8]saren birlikte kültürlerle eklendiğinde taksan üretimini kontrole kıyasla 15 kattan fazla artırarak en etkili uygulama olmuştur. Bununla birlikte elisitasyon, ilgili sekonder metabolitlerin üretiminin artırılmasında çok etkili bir metot olmasına rağmen elisitasyon bütün bitki savunma sistemini etkileyebildiğinden bazen istenmeyen sonuçlar üretebilmektedir. Bu nedenle sekonder metabolitlerin üretimini elisitasyon yoluyla artırmak için birçok faktörü dikkate almak gerekmektedir. Bunlar arasında hücre hattı, kültür koşulları, elisitör konsantrasyonu, elisitör ekleme zamanı ve maruz kalma süresi, ve farklı elisitörlerle etkileşimi sayılmaktadır (Gallego ve diğ., 2015b).

Tablo 2.3: Sekonder metabolit üretimini artırmak için kullanılan elisitörler.

Elisitör	Bitki İsmi	Ürün	Referans
Metil jasmonat	<i>Buddleja cordata</i>	Verbascoside	(Arano-Varela ve diğ., 2020)
Metil jasmonat	<i>Vitis vinifera</i>	t-resveratrol	(Almagro ve diğ., 2020)
Linolenik asit	<i>Taxus media</i>	Paklitaksel	(Hanano ve diğ., 2022)
Koronatin ve kalik[8]saren	<i>Taxus media</i>	Paklitaksel	(Escrich ve diğ., 2021)
Fungal hücre duvarı ve metil-β-siklodekstrin	<i>Corylus avellana</i>	Paklitaksel	(Farhadi ve diğ., 2020)
Endofitik fungal ekstrakt	<i>Corylus avellana</i>	Paklitaksel	(Salehi ve diğ., 2019a)

2.4.4. Koronatin

Koronatin, *Pseudomonas syringae*'nin çeşitli patovarları tarafından üretilen bir fitotoksindir. Kloroz (yetersiz klorofil üretimi), hipertrofi (aşırı büyüme), sekonder metabolit üretimi, proteinaz inhibitörlerinin birikimi, apoptotik hücre ölümü, etilen salınımını uyarmaktadır. Ayrıca bazı hastalıklarla ilişkili olarak ortaya çıkan yaşlanmayı hızlandırmaktadır (Bender ve diğ., 1999).

Koronatin, 12-okso-fitodienoik asit (OPDA) ve jasmonik asidin yapısal ve işlevsel bir analogudur. OPDA, jasmonik asit ve metil jasmonatın 18 karbonlu bir öncülüdür. Poliketid koronafasik asit (CFA) ve onun izolösin türevi koronamik asit (CMA)'dan oluşmaktadır (Greulich ve diğ., 1995). CFA, metil jasmonatı gibi jasmonik asit metabolik yolağını uyarır ve threonin, izolösin, serin gibi diğer aminoasitlerle etkileşime girer. CFA, koronatine fitotoksik özelliğini kazandıran kısımdır. İzolösin türevi CMA ise CFA toksisitesi artırmaktadır. Bu nedenle koronatinin, tıpkı jasmonik asit ve jasmonat türevleri gibi, bitki savunma yanıtının oluşmasında anahtar bir rol oynadığı gösterilmiştir (Geng ve diğ., 2014).

Koronatin, bitki büyüme regülasyonundaki potansiyel rolü ve jasmonat sinyal yolunu tetikleyen güçlü bir uyarıcı olması nedeniyle araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Hu ve arkadaşları bitki hücre kültürlerinde sekonder metabolit üretimini artırmak için koronatin kullanmışlardır. Koronatinin *Taxus chinensis*'te taksan biyosentezini jasmonik asitlere göre daha fazla artırdığı gösterilmiştir (Hu ve diğ., 2006). Bitki hücre kültürlerinde doğal ve sentetik jasmonik asitlerin sekonder metabolit üretimi üzerindeki etkisi yaygın bir şekilde çalışılmasına rağmen koronatinin sekonder metabolit biyosentezine etkisi hakkında çok az çalışma mevcuttur (Jeyasri ve diğ., 2023).

Tamogami ve Kodama, koronatinin çeltik yapraklarında flavonoid, sakuranetin ve momilakton A birikimini uyarabildiğini göstermişlerdir (Tamogami & Kodama, 2000). Ayrıca flavonoid üretiminde koronatinin jasmonik aside göre daha etkili olduğunu raporlamışlardır. Onrubia ve arkadaşları, (2013) *Taxus media* hücre süspansiyon kültürlerinde koronatin elisitörünü kullanarak taksan üretimini ve paklitaksel ile ilişkili genlerin anlatımını artırmıştır. Üstelik koronatinin total taksan miktarını metil jasmonattan 3 kattan fazla artırdığını belirtmiştir (Onrubia ve diğ., 2013). Benzer şekilde *C. avellana*'da da koronatinin paklitaksel biyosentezine etkisi incelenmiştir. Gallego ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları çalışmada hücre

süspansiyon kültürlerine koronatin ilavesinin taksan içeriğini kontrole göre 27 kat artırdığını tespit etmişlerdir. Koronatin, sekonder metabolitlerin üretimini başarıyla artırmasına rağmen hücre kültürleri üzerindeki negatif etkisi nedeniyle kültürlerin biyokütlesine zarar vermektedir (Onrubia ve diğ., 2013; Gallego ve diğ., 2015a). Bu nedenle son yıllardaki yapılan çalışmalarda taksan biyosentezini artırmanın yanı sıra koronatinin hücre kültürleri üzerindeki olumsuz etkisini azaltmaya yönelik stratejiler önem kazanmıştır.

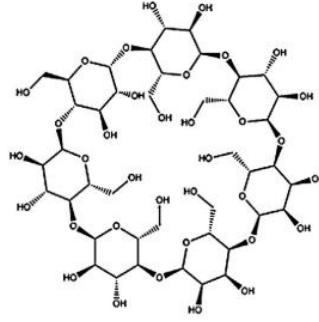
2.4.5. Fenilalanin

Bitki hücre kültürlerinde sekonder metabolit artırmak için kullanılan bir diğer yöntem ise öncül eklemesidir. Birçok çalışmada sekonder metabolitlerin biyosentezi, kültür ortamına öncül veya ara ürünler eklenerek artırılmıştır. Fenilalanin, paklitaksel yolağının yan zincirinin sentezlenmesinde rol oynayan bir amino asittir. Taxus hücre kültürlerinde fenilalanin ilavesinin paklitaksel içeriğini artırdığı gösterilmiştir. Bemani (2013) ve Rahpeyma (2015) yaptıkları çalışmalarda *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerine fenilalanin ekleyerek paklitaksel üretimini kontrole göre 4 kat artırmıştır. Benzer şekilde Türk fındık çeşidi Kalıncara hücre süspansiyon kültürlerinde de fenilalaninin paklitaksel üretimini uyardığı gösterilmiştir (Göktepe, 2020).

2.4.6. Metil- β -siklodekstrin

Siklodekstrinler, D-glikopiranoz bakiyelerinin α -(1,4)-glikozidik bağlarıyla bağlanması sonucu oluşan siklik oligosakkaritlerdir (Şekil 2.9). Siklodekstrinler; α -, β -, heksa-, hepta-, oktamiloz- olarak sınıflandırılmaktadır. Siklodekstrinler, siklodekstrinazlar veya glikoziltransferazlar gibi amilazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlardan sonra nişastadan elde edilmektedir. Bunun dışında fonksiyonel gruplarının modifikasyonu ile sentetik olarak da üretilmektedir. Siklodekstrinler yapılarında hidrofilik bir dış yüzey ve hidrofobik bir iç boşluk bulundurmaktadırlar. Hidrofilik özelliği hidroksil (-OH) iyonlarından gelirken siklodekstrinlerin iç boşluğunun hidrofobikliği hidrokarbon iskeletinden kaynaklanmaktadır. Bu özellikleri sayesinde siklodekstrinler birçok bileşik ile etkileşime girerek inklüzyon kompleksi oluşturmaktadırlar. Diğer taraftan siklodekstrinlerin suda ve organik çözücülerdeki çözünürlüklerinin düşük olması kullanımını kısıtlamaktadır. Bu nedenle siklodekstrinlerin inklüzyon kompleksi oluşturma yeteneklerini geliştirmeye veya sulu ve organik çözeltilerdeki çözünürlüklerini artırmaya yönelik çalışmalar önem kazanmıştır. Modifiye edilmiş

siklodekstrinler arasında 2-hidroksipropillenmiş ve metillenmiş β -siklodekstrinler, endüstriyel ölçekte üretilmektedir. Özellikle metil- β -siklodekstrinler, doğal β -siklodekstrinlere göre organik moleküllerle daha kararlı inklüzyon kompleksi oluşturmaktadır. Böylece, metil- β -siklodekstrinler, sulu çözeltilerde daha çözünür hale gelmektedir (Almagro & Pedreño, 2020).



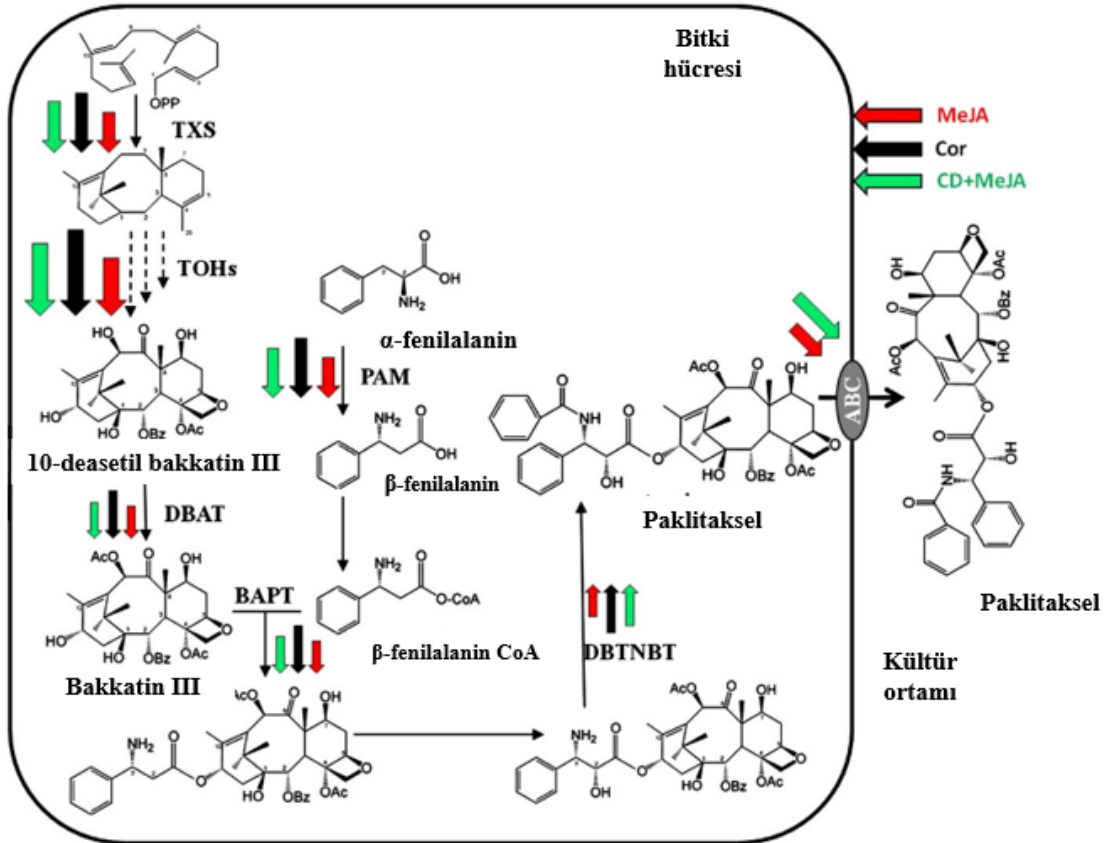
Şekil 2.9: β -Siklodekstrinlerin yapısı (Pinho ve diğ., 2014).

β -siklodekstrinler, değerli bileşiklerle kompleks oluşturabildiği için antitümör ve immün düzenleyici ilaçların taşınmasında kullanışlı olabileceği düşünülmüştür (Baek ve diğ., 2017; Charoenwongpaiboon ve diğ., 2022). Ayrıca β -siklodekstrinler, gıda paketlenmede ve gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Dobrzyńska-Mizera ve diğ., 2023) .

β -siklodekstrinlerin uygulama alanlarını genişleten bir başka özellik ise β -siklodekstrinlerin bitki hücre kültürlerinde biyoaktif bileşiklerin üretiminin artırmalarıdır. β -siklodekstrinler konakçı olarak rol oynayarak hücre kültürlerinde çeşitli biyoaktif bileşiklerin birikimini pozitif olarak etkilemektedir. Üstelik, β -siklodekstrinler hidrofobik bileşiklerin hücre membranından geçmesini kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle β -siklodekstrinlerin bitki hücre kültürlerinde elisitör olarak işlev görebileceği ve sekonder metabolitlerin biyosentezini artırabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle özellikle metil- β -siklodekstrinlerin bazı biyoaktif bileşiklerin üretimi üzerindeki etkisi incelenmiştir (Cardillo ve diğ., 2021).

β -siklodekstrinler, *Taxus* hücre süspansiyon kültürlerinde taksan üretimini artırmak için kullanılmıştır. Sabater-Jara ve arkadaşları (2014) *Taxus media* hücre kültürlerinde farklı siklodekstrinlerin (metil- β -siklodekstrin, hidroksipropil β -siklodekstrin, γ -siklodekstrin) taksan üretimine artırdığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca metil- β -siklodekstrinin diğerlerine göre daha efektif olduğunu ve metil jasmonat ile birlikte kültürlerle ilave edildiğinde taksan üretimini 140 mg/L'ye kadar çıkardığını belirtmişlerdir. İlginç bir şekilde metil- β -siklodekstrinin taksan üretimini artırmasına rağmen paklitaksel metabolik yolağındaki genlerin anlatımını

artırmamaktadır. Ancak metil- β -siklodekstrin, metil jasmonat ile birlikte uygulandığında ise genlerin anlatımında sinerjistik bir etkiye neden olmaktadır. Şekil 2.10'da metil jasmonat, koronatin ve metil- β -siklodekstrinin paklitaksel metabolik yolağındaki indüklediği genler gösterilmiştir. Benzer şekilde *T. media* ve *Taxus globosa* hücre kültür ortamına 50 mM metil- β -siklodekstrin ve 1 μ M koronatin eklendiğinde taksan biyosentezi önemli ölçüde artırılmıştır (Ramirez-Estrada ve diğ., 2015). Son yıllarda *C. avellana*'da yapılan bir çalışmada ise metil- β -siklodekstrinin fungal elisitörler ile beraber uygulandığında paklitaksel üretimini artırmasının yanı sıra fungal elisitörlerin hücre biyokütlesi üzerindeki negatif etkisini azalttığını göstermiştir (Farhadi ve diğ., 2020). Bununla birlikte *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde metil- β -siklodekstrinin taksanların biyosentezine ve hücre kültürlerinin üreme özelliklerine etkisi hala yeterince aydınlatılamamıştır.

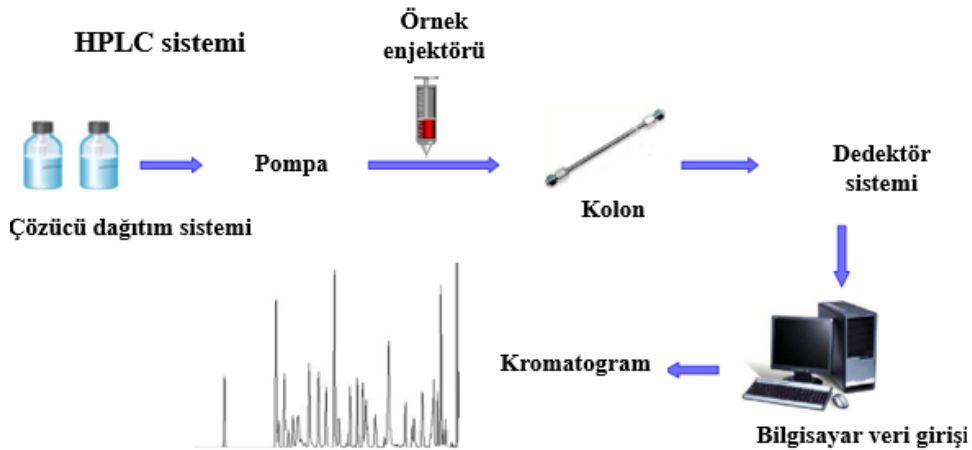


Şekil 2.10: *Taxus* hücre süspansiyon kültürlerinde elisitörlerin (Metil jasmonat, koronatin, siklodekstrin + metil jasmonat) paklitaksel biyosentezindeki indüklediği genler (Cusido ve diğ., 2014).

2.5. YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC)

Farmasötik, gıda ve kozmetik gibi birçok farklı alanlarda kimyasalların kullanılması, bu kimyasalların yapılarının niteliksel ve niceliksel olarak tanımlanması gerektirmektedir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), düşük moleküler ağırlıklı maddelerden yüksek moleküler ağırlıklı maddelere farklı özellikli bileşikler için kullanılan bir ayırma tekniğidir. Kromatografik ayırma, mobil fazda çözünen bir karışımın durgun faz olarak adlandırılan başka bir materyalden geçirilmesidir. Bu işlem sırasında mobil ve durgun faz birbirine karışmazlar. Bu durumda bir örneğin farklı bileşenleri durgun faz üzerinden mobil fazda taşınmasıdır. Analiz edilen numune, genellikle mobil ve durgun fazlar ile farklı etkileşim özelliği göstermektedir. Durağan faz sabit olduğundan durağan faz ile daha güçlü etkileşime sahip olan maddeler, durağan faz ile daha az etkileşime sahip olan maddelerden daha hızlı hareket etme eğiliminde olacaktır. Bu nedenle kromatografik ayırma, analitlerin fazlar ile etkileşimlerinin gücüne bağlıdır. Analitler ve fazlar arasındaki bu etkileşimler, analitin kolon içinden geçme süresini ve pik genişlemesini belirlemektedir. Sonuç olarak bileşikler kolondan geçerek ayrışır ancak dedektöre farklı zamanlarda ulaşmaktadırlar. Analitlerin dedektöre ulaşma süreleri kromatogramdan izlenmektedir (Lozano-Sánchez ve diğ., 2018).

HPLC sistemi çözücü dağıtım sistemi, örnek enjektörü, kolon, tespit sistemi ve bilgisayardan oluşmaktadır. Şekil 2.11’de HPLC sisteminin şematik diyagramı gösterilmektedir.



Şekil 2.11: HPLC sistemi (Lozano-Sánchez ve diğ., 2018).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. BİTKİ MATERYALİ

Bu tez çalışmasında Ordu'nun Fatsa ilçesinde (40°59'27.9"N 37°35'01.6" E) 2019 yılı Ağustos ayında hasat edilen Kalınkara çeşidine ait fındıklar kullanılmıştır. Fındıklar, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Ümit SERDAR'dan temin edilmiştir. Kalınkara fındıklar, yeşil zuruflarından ayrılarak güneşte kurutulmuştur. Kurutulan fındıklar, tez çalışması sürecinde buzdolabında +4 °C'de korunmuştur.

3.2. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ

Fındık hücre kültürleri için optimum koşulları sağlayan besiyerleri hazırlanmış ve steril edilmiş fındıklar bu besiyerlerine ekilerek önce kallus ve daha sonra hücre süspansiyon kültürleri kurulmuştur. Homojenize hücre süspansiyon kültürleri elisitasyon çalışmasında kullanılmıştır.

3.2.1. Besiyeri Hazırlanması

Fındık (*Corylus avellana* L. cv. Kalınkara) kallus ve hücre süspansiyon kültürleri için, Murashige ve Skoog (MS) besiyeri kullanılmıştır (Murashige & Skoog, 1962). 1 litre katı MS besiyeri hazırlamak için 4,4 gram MS tuzu (Sigma, 5519) ve 30 gram sukroz (Sigma, 84097) hassas terazide tartılmıştır. Vidalı kapaklı şişeye 600 mL distile su (dH₂O) konulduktan sonra üzerine tartılan MS tuzu ve sukroz dökülmüştür. Manyetik balık yardımıyla MS tuzu ve sukroz, manyetik karıştırıcıda dH₂O içerisinde çözdürülmüştür. Vidalı kapaklı şişe içerisine 300 mL dH₂O eklendikten sonra 5N sodyum hidroksit çözeltisi ilave edilerek besiyeri pH'sı 5,7-5,8 aralığında olacak şekilde ayarlanmıştır. Son hacim dH₂O ile 1 litreye tamamlanmıştır. Son olarak besiyeri çözeltilisine katılaştırıcı olarak 8 gram agar (Sigma, A1296) eklenmiştir ve vidalı kapaklı şişenin kapağı hafifçe kapatılmıştır. Agar eklenen besiyeri çözeltisi karıştırılmadan steril edilmek üzere 121 °C'de 1,2 atm basınçta 15 dakika boyunca otoklavlanmıştır (Nüve, OT 012). Steril edilmiş besiyeri otoklavdan çıkarıldıktan sonra elle tutulabilir sıcaklığa (50-60 °C) gelinceye kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Uygun sıcaklığa gelen besiyeri, laminar hava akışlı steril kabine (Telstar Bio II Advance, EN-12469) alınmıştır. Steril kabin içerisinde besiyerine 1 mg/L MS vitaminine (M3900) ek olarak, bitki büyüme düzenleyicileri 2 mg/L 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D, D7299) ve 0,2 mg/L 6-benzilamino pürin (BAP, B3274)

eklenmiştir. Daha sonra besiyeri karıştırılarak uygun hacimlerde (30 mL) steril plastik Petri kaplarına dökülmüştür ve soğuyup katılaşına kadar beklenmiştir. Besiyeri katılaştıktan sonra Petri kaplarının kapakları kapatılmış ve kontaminasyonu engelleyecek şekilde kapak çevresi parafilm (P7793) ile sarılmıştır. Hazırlanan katı besiyerleri kullanılana kadar +4 °C sıcaklıkta buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Yüzey Sterilizasyonu ve Tohum Ekimi

Kallus ve hücre süspansiyon kültürleri kurulması için fındıkların *in vitro* koşullarda doku kültürüne alınması gerekmektedir. Bunun ilk aşaması, yüzey sterilizasyonu ve tohum ekimidir. Fındıklar bir şişe içerisine alınarak yaklaşık 1 saat boyunca akan musluk suyunda yıkanmıştır. Yıkanan fındıklar, laminar hava akışlı kabin içerisinde steril bir fındık kıracağı yardımıyla kırılmış ve dış sert kabukları ayrılmıştır. Kabukları uzaklaştırılan fındıklar, önce %70'lik etil alkol içinde 30 saniye tutulmuştur. Daha sonra 30 dakika boyunca birkaç damla TWEEN® 20 (Sigma, P1379) içeren %3'lük ticari çamaşır suyunda (Domestos™) bekletilmiştir. 30 dakika sonra fındıklar, steril dH₂O ile 3 kez 5'er dakika durulanmıştır. Durulama işleminin ardından fındıklar, bu kez saf etil alkole birkaç saniye batırılıp çıkartılmıştır. Ardından yukarıda belirtildiği gibi tekrar durulama işlemi yapılmıştır. Yüzey sterilizasyonu tamamlanmış fındıklar, steril kurutma kağıtlarında bekletilmiş ve fazla su uzaklaştırılarak kurutulmuştur. Steril fındıkların dıştaki ince zarları, steril cam Petri kabı içerisinde steril bistüri ve çengelli pens yardımıyla sıyrılmıştır. İnce zarı soyulan steril fındıklar, endosperm kısımlarında çizikler oluşturarak yaklaşık 2-3 cm'lik parçalara ayrılmıştır. Parçalara ayrılmış steril fındıklar, bistüri ile kesilen bölgeleri besiyerine temas edecek şekilde Bölüm 3.2.1'de hazırlanan besiyeri içeren plastik Petri kaplarına ekilmiştir. Fındık ekimi yapılmış plastik Petri kapları parafilm ile sarıldıktan sonra bitki büyütme kabininde (Sanyo, MLR-352H) %70 nem, 25±1°C, 16 saat ışık/8 saat karanlık, 1400 lux koşullarında inkübe edilmiştir. Yüzey sterilizasyonu ve tohum ekimi için gerekli olan fındık kıracağı, beher, pens, cam Petri kabı ve kurutma kağıdı gibi malzemeler, pastör fırınında (WiseVen, WON-50) 180 °C'de 2 saat bekletilerek steril edilmiştir. Bu protokolün gerçekleştirilmesinde Gallego ve arkadaşları ile Göktepe tarafından yapılan çalışmalardan yararlanılmıştır (Gallego ve diğ., 2015a; Göktepe, 2020).

3.2.3. Kallus Kùltürlerinin Kurulması

Kallus kùltürlerinin kurulmasında Bölüm 3.2.1’de hazırlanan besiyerleri kullanılmıştır. Besiyeri içeriğinde bulunan 2 mg/L 2,4-D ve 0,2 mg/L BAP bitki büyüme düzenleyicileri, ekimi gerçekleştirilen fındıklardan kallus elde etmek amacıyla tercih edilmiştir. Yüksek verimli kallus elde etmek için uygun bitki büyüme düzenleyicileri ve bitki büyüme düzenleyicilerinin gerekli olan konsantrasyonları literatür taraması yapılarak belirlenmiştir (Rahpeyma ve diğ., 2017; Göktepe, 2020). Kallus elde etmek için 3 farklı eksplant belirlenmiştir: Embriyo, endosperm ve endospermli embriyo. Eksplantlar, 2 mg/L 2,4-D ve 0,2 mg/L BAP içeren katı besiyerlerine her Petri kabına 5 parça olacak şekilde ekilmiştir. Eksplantlar, besiyerlerine ekildikten 30 gün sonra kallus oluşturma frekansları Denklem 3.1’e göre belirlenmiştir.

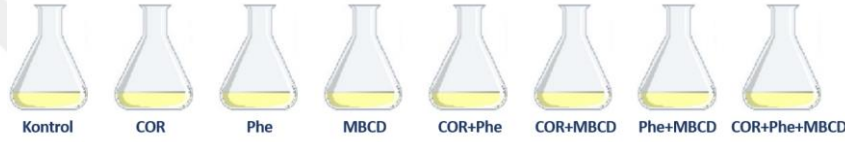
$$\% \text{ Kallus Frekans} = \frac{\text{Kallus Sayısı}}{\text{Eksplant Sayısı}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.2.4. Hücre Süspansiyon Kùltürlerinin Kurulması

Eksplantların ekiminden 30 gün sonra elde edilen kalluslardan hücre süspansiyon kùltürleri kurulmuştur. Hücre süspansiyon kùltürlerinde, Bölüm 3.2.1’ de anlatılan koşullarda hazırlanan katılaştırıcı olarak agar kullanılmadan hazırlanan sıvı besiyerleri kullanılmıştır. Sıvı besiyerleri, kallus kùltürleri gibi 2 mg/L 2,4-D ve 0,2 mg/L BAP bitki büyüme düzenleyicilerini içermektedir. Katı besiyerinde elde edilen kalluslardan canlılığı yüksek, kolay ufalanabilir ve şeffaf renkli olanlar canlılığı düşük ve beyaz renkli kalluslardan ayrılmıştır. Canlılığı yüksek kalluslar, hücre süspansiyon kùltürlerinin kurulması için seçilmiştir. Yaklaşık 3 gram ağırlığındaki kalluslar, steril bir cam Petri kabı içinde steril bir pens yardımıyla hafifçe ezilmiştir. Ardından ezilen kalluslar, 50 mL taze sıvı besiyeri içeren 250 mL’lik Erlen Mayerlere aktarılarak öncül hücre süspansiyon kùltürleri kurulmuştur. Hücre süspansiyon kùltürleri 120 rpm’de, 25 °C’de karanlıkta 30 gün boyunca çalkalayıcı inkübatörde (Labnet, 211DS) kùltürlenmiştir. 30 günün sonunda hücre süspansiyon kùltürleri, 500 mL’lik Erlen Mayerlere aktarılmış ve üzerlerine Erlen Mayer hacminin 5’te 1’ini tamamlayacak ölçüde taze sıvı besiyeri eklenmiştir. Böylece hücre süspansiyon kùltür hacmi 100 mL’ye çıkarılmıştır. Her altkùltürleme zamanında Erlen Mayerdeki kùltür daha büyük hacimli Erlen Mayerlere aktarılmış ve üzerine taze sıvı besiyeri eklenerek deney seti kurmaya yetecek ölçüde hücre süspansiyon kùltür hacmi elde edilmiştir. 6 ayın sonunda elisitasyon deneyi için uygun hacimde homojenize hücre süspansiyon kùltürleri elde edilmiştir.

3.3. ELİSİTASYON

Fındık hücre süspansiyon kültürlerinde taksan türevi sekonder metabolitlerin üretiminin artırılması için çeşitli elisitörler uygulanmıştır. 6 aylık homojenize kültürler, elisitasyon çalışması için kullanılmıştır. Elisitasyon uygulaması için homojenize kültürlerden 250 mL'lik Erlen Mayerlere 25 mL aktarılmıştır. Ardından 2 mg/L 2,4-D ve 0,2 mg/L BAP içeren 25 mL taze sıvı besiyeri, 25 mL kültür içeren Erlen Mayerlere dökülmüştür. Böylece 250 mL'lik Erlen Mayerlerde 50 mL kültür, elisitör uygulaması için hazır hale getirilmiştir ve bu kültürler, 120 rpm'de, 25 °C'de karanlıkta 30 gün boyunca çalkalayıcı inkübatörde (Labnet, 211DS) kültürlenmiştir. Elisitörler hücre süspansiyon kültürlerine ayrı ayrı, birbiriyle ikili ve üçlü kombinasyon yapılarak uygulanmıştır. Şekil 3.1'de elisitasyon uygulamaları gösterilmiştir.



Şekil 3.1: Elisitasyon uygulamaları (COR: koronatin, Phe: Fenilalanin, MBCD: Metil- β -siklodekstrin, COR+Phe: Koronatin + fenilalanin, COR+MBCD: Koronatin + metil- β -siklodekstrin, Phe+MBCD: Fenilalanin + metil- β -siklodekstrin, COR+Phe+MBCD: Koronatin + fenilalanin + metil- β -siklodekstrin).

3.3.1. Elisitörlerin Uygulanması

Elisitasyon uygulaması, logaritmik üreme fazının ortasına karşılık gelen 17. günde gerçekleştirilmiştir (Salehi ve diğ., 2017; Farhadi ve diğ., 2020; Göktepe, 2020). Elisitör madde olarak koronatin (Sigma, C8115), fenilalanin (Sigma, P1751) ve metil- β -siklodekstrin (Sigma, C4555) belirlenmiştir. Literatürdeki uygulamalar değerlendirilerek, koronatin elisitörünün konsantrasyonu 1 μ M, fenilalaninin konsantrasyonu 3 μ M ve metil- β -siklodekstrinin konsantrasyonu 50 mM olarak belirlenmiştir (Gallego ve diğ., 2015a; Rahpeyma ve diğ., 2015; Farhadi ve diğ., 2020). Elisitasyon uygulamasında koronatin, fenilalanin ve metil- β -siklodekstrin ayrı ayrı ve birbiriyle ikili ve üçlü kombinasyon halinde hücre süspansiyon kültürlerine ilave edilmiştir. Elisitör eklenmemiş kontrol hücre süspansiyon kültürlerine eşit hacimlerde dH₂O eklenmiştir.

3.3.2. Koronatin Uygulaması

Koronatin uygulaması için 100 μ M konsantrasyona sahip stok koronatin çözeltisi hazırlanmıştır. Koronatin stok solüsyonu, 0,2 mikron porlara sahip milipor filtreden (Millipore, SLMP25SS) geçirilerek steril edilmiştir. Elitasyon uygulaması 50 mL sıvı besiyeri içeren 250 mL'lik Erlen Mayerlerde gerçekleştirilmiştir. 50 mL sıvı besiyerinde 1 μ M koronatin bulunması için hücre süspansiyon kültürlerine steril ana stoktan 500 μ L koronatin çözeltisi eklenmiştir.

3.3.3. Fenilalanin Uygulaması

Fenilalanin uygulaması için 100 mM konsantrasyona sahip ana stok fenilalanin çözeltisi hazırlanmıştır. Fenilalanin ana stoğu, 0,2 mikron porlara sahip milipor filtreden (Millipore, SLMP25SS) geçirilerek steril edilmiştir. Steril ana stok, steril dH₂O ile 100 kat seyreltilerek 1 mM'lık bir ara stok elde edilmiştir. Elitasyon uygulaması 50 mL sıvı besiyeri içeren 250 mL'lik Erlen Mayerlerde gerçekleştirilmiştir. 50 mL sıvı besiyerinde 3 μ M fenilalanin bulunması için hücre süspansiyon kültürlerine ara stoktan 150 μ L fenilalanin çözeltisi eklenmiştir.

3.3.4. Metil- β -siklodekstrin Uygulaması

Metil- β -siklodekstrin uygulaması için 50 mM konsantrasyona sahip metil- β -siklodekstrin çözeltisi hazırlanmıştır. 1 M metil- β -siklodekstrin çözeltisi, 0,2 mikron porlara sahip milipor filtreden (Millipore, SLMP25SS) geçirilerek steril edilmiştir. Elitasyon uygulaması 50 mL sıvı besiyeri içeren 250 mL'lik Erlen Mayerlerde gerçekleştirilmiştir. 50 mL sıvı besiyerinde 50 mM metil- β -siklodekstrin bulunması için hücre süspansiyon kültürlerine 50 mM metil- β -siklodekstrin çözeltisinden 2,5 mL eklenmiştir.

3.4. BİYOKÜTLE BİRİKİMİ VE CANLILIK ÖLÇÜMÜ

Bölüm 3.3'te belirtilen elisitörlerin hücre süspansiyon kültürlerinde biyokütle birikimi ve hücre canlılığı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Elisitörlerin bu etkilerini değerlendirmek için yaş ağırlık, kuru ağırlık, hücre sayısı ve hücre canlılığı parametreleri kullanılmıştır. Hücre süspansiyon kültürlerinden 17. gün (elitisasyondan sonra 0. gün), 21. gün (elitisasyondan sonra 4. gün), 24. gün (elitisasyondan sonra 7. gün), 28. gün (elitisasyondan sonra 11. gün), 31. gün

(elisitasyondan sonra 14. gün) alınan örnekler ile biyokütle birikimi ve canlılık ölçümleri yapılmıştır. Hücre süspansiyon kültürlerinde yaş ağırlık ve kuru ağırlık değerlerinin ölçülmesi ile kültürdeki hücrelerin üreme ve fizyolojik durumları belirlenmiştir. Bütün parametrelerdeki ölçümler, aynı Erlen Mayer içindeki kültürlerden yukarıda belirtilen saatlerde alınan örneklerden yapılmıştır.

3.4.1. Yaş Ağırlık ve Kuru Ağırlık Ölçümü

Yaş ağırlık ölçümleri için 15 mL'lik Falcon tüplerinin boş olarak ağırlıkları ölçülmüştür. Ardından her elisitör uygulamasından 5 mL hücre süspansiyon kültürü boş Falcon tüplere aktarılmıştır. Falcon tüpler, 9500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj yapıldıktan sonra Falcon tüplerdeki süpernatant kısım atılmış ve yaş pelletin ağırlığı tartılmıştır. Bu değer, kültürün yaş ağırlığını vermektedir.

Kuru ağırlık ölçümü, yaş pelletler kullanılarak yapılmıştır. Yaş pellet içeren Falcon tüpler, 60 °C'de 48 saat kurumaya bırakılmıştır. 48 saat sonra Falcon tüpler, tartılarak kuru ağırlık hesaplanmıştır.

3.4.2. Hücre Üremesi ve Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Hücre üremesi ve hücre canlılığını belirlemek için hücre süspansiyonlarından santrifüj tüpüne 1 mL kültür alınmıştır. Santrifüj tüpü içerisindeki 1 mL kültür üzerine 2 µL %1'lik Evan's Blue boyası (Sigma, E2129) dökülmüştür ve santrifüj tüpü karıştırılmıştır. 10 dakika sonunda hazırlanan karışımdan 100 µL alınmış örnekler ışık mikroskobu (Leica, DM1000) altında Thoma lamında (Brand, BR718005) incelenmiştir. Evan's Blue boyasının boyama özellikleri dikkate alınarak mavi renge boyanan hücreler ölü, şeffaf renkli hücreler canlı olarak kabul edilmiştir. Thoma lamında ölü ve canlı hücreler sayılarak hücre süspansiyon kültürlerindeki hücre sayısı ve hücre canlılığı belirlenmiştir. %1'lik Evan's Blue boya solüsyonu 0,1 gram Evan's Blue boyasının 10 mL dH₂O içinde çözülmesi ile hazırlanmıştır. %1'lik Evan's Blue boya solüsyonu, 0,22 mikron por çaplı filtre (Millipore, SLMP25SS) kullanılarak steril edilmiştir.

Hücre sayısı, Denklem 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Hücre Sayısı/mL} = \text{Şeffaf Renkli Hücre Sayısı} \times \text{Sulandırma Faktörü} \times 10^4 \quad (3.2)$$

Yüzde hücre canlılığı, Denklem 3.3 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = \frac{\text{Şeffaf Renkli Hücre Sayısı}}{\text{Toplan Hücre Sayısı}} \times 100 \quad (3.3)$$

3.5. EKSTRAKSİYON

Elisitasyondan sonra kültürlenmenin 30. günün sonunda hücreler toplanmış ve HPLC analizi yapılabilmesi için ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır.

3.5.1. Hücre Süspansiyon Kültürlerinin Toplanması

250 mL'lik Erlen Mayerlerdeki hücre süspansiyon kültürleri 30. günün sonunda toplanmıştır. 30. günün sonunda hücre süspansiyon kültürlerinde yaklaşık olarak 40 mL kültür kalmıştır. Kültürler 2 adet 50 mL'lik Falkon tüplerine eşit hacimde aktarılmıştır. Her bir elisitör uygulamasında Falkon tüplerinden biri hücre içi taksan ekstraksiyonu yapılması için kullanılırken diğeri hücre dışı taksan ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Hücre içi ve hücre dışı taksanların ekstraksiyonu, Gallego ve arkadaşları tarafından geliştirilen metot kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Gallego ve diğ., 2015a).

3.5.2. Liyofilizasyon

Liyofilizasyon hücre içi taksanların ekstraksiyonu için gereklidir. Toplanan kültür örneklerinden hücre içi taksan ekstraksiyonu yapılması için 50 mL'lik Falkon tüplerindeki yaklaşık 20 mL kültür kullanılmıştır. Toplanan kültürler, -80 °C'de dondurulmuştur. Daha sonra dondurulan kültürler, -56 °C'de 48 saat boyunca liyofilizatör (LABCONCO, Freezone) kullanılarak kristalize edilmiştir. Liyofilizasyon sırasında, dondurulmuş kültür içeriğindeki su uçurularak kültürler kurutulmuştur. Liyofilize edilmiş örnekler, hücre içi taksanların ekstraksiyonu için kullanılmıştır.

3.5.3. Hücre İçi Taksanların Ekstraksiyonu

Liyofilize edilmiş örnekler, 200 mg tartılmış ve 1,5 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. 200 miligram liyofilize örnek içeren santrifüj tüplerine 4 mL % 90 metanol:su (v/v, Sigma, 34885) karışımı ilave edilmiştir. Santrifüj tüplerine cam bilyeler konularak hücreler, 1800 rpm'de 2 dakika süre boyunca mikro membran parçalama makinesinde (Sartorius, Mikro-Dismembrator S) parçalanmıştır. Ardından santrifüj tüpleri, 1500 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonunda süpernatant kısmı, metanol ekstraktı olarak yeni bir santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Santrifüj tüpünün içinde kalan pellet tekrar yukarıda belirtilen şekilde ekstrakte edilmiştir. Daha sonra metanol ekstraktlarına 32 mL n-heksan (Merck, 1.04374) ilave edilmiş ve birkaç saniye vortekslenmiştir. Metanol-heksan karışımı, 2500 x g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Üstteki sıvı faz, yeni bir santrifüj tüpüne aktarılmıştır ve 16 mL diklorometan (Merck, 1.04374) ile ikinci kez yıkanmıştır. Metanol içeren organik faz toplanmış ve evaporasyon cihazı (BÜCHI,R-200) ile metanol uçurulmuştur. Geriye kalan kalıntı, 4 mL metanolde çözdürülmüştür. Elde edilen metanol ekstraktı, daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere +4 °C'de saklanmıştır.

3.5.4. Hücre Dışı Taksanların Ekstraksiyonu

Hücre dışı taksanların analizi için hücre süspansiyon kültürü örnekleri 30. günün sonunda toplanmış ve liyofilizasyon işlemine tabi tutulmadan doğrudan ekstraksiyon edilmiştir. Yaklaşık 20 mL kültür, 50 mL'lik Falkon tüplere aktarılmıştır. Daha sonra kültürler, 15 dakika 9500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Her 4 mL kültür süpernatantı, 1 mL diklorometan ile yıkanmıştır ve Falkon tüpler ters çevrilerek 30 saniye karıştırılmıştır. Ultrasonikasyon cihazında (Ultraclear Industrial CO., 500 HT) 1 saat inkübe edildikten organik faz toplanmıştır. Evaporasyon ve yeniden metanol ile çözdürme işlemi Bölüm 3.5.3'te belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.6. HPLC

Elisitasyon uygulamalarının fındık hücre süspansiyon kültürlerinde taksanların üretimi üzerindeki etkisi HPLC cihazında (Shimadzu, Japan) kalitatif ve kantitatif olarak ölçülmüştür. HPLC sisteminde pompa (LC- 10AD VP), diyot grubu dedektör (SPD-M20A), kolon fırını (CTO-10AS), otomatik numune alma cihazı (SIL-20A) ve gaz giderme ünitesi (DGU-20A) bulunmaktadır.

Tablo 3.1: Taksanların analizinin gerçekleştirilmesi için kromatografik şartlar.

Kolon	NOVA Spher 100 Phenyl-Hexyl C18 (250 mm x 4.6 mm x 5 µm)
Akış Hızı	1,2 mL/dk
Dalga Boyu	228 nm
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
Kolon Sıcaklığı	35 °C
Enjeksiyon Süresi	28 dk
Akış Sistemi	Gradient akış
Mobil Faz A	dH2O + %0,5 orto-fosforik asit
Mobil Faz B	Metanol

Kromatografik analizlerin gerçekleştirildiği yöntem (zaman-mobil faz), Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2: Taksanların analizinin gerçekleştirildiği yöntem (B: metanol).

Zaman (dk)	Hacim (%B)
5	55
10	60
15	65
20	70
24	75
26	65
28	55
28	stop

HPLC cihazında analiz edilen bileşiklerin isimleri, numaralandırılmaları ve alıkonma zamanları Tablo 3.3’de gösterilmiştir.

Tablo 3.3: Taksan bileşikleri ve alıkonma zamanları.

Bileşik	Numara	Alıkonma Zamanı (dk)
10-deasetil bakkatin III	1	10.428
Bakkatin III	2	12.466
Sefalomannin	3	22.202
Paklitaksel	4	23.253

HPLC analizi, İstanbul Üniversitesi Biyoanalitik Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. HPLC cihazında hücre süspansiyon kültürlerindeki taksanların analiz edilebilmesi için 10-deasetil bakkatin III (10DAB, Sigma, D3676), bakkatin III (BACIII, Sigma, B8154), sefalomannin (CEPH, Sigma, C4991) ve paklitaksel (PTX, Sigma, C4991) bileşiklerinin standartları ticari olarak satın alınmıştır.

3.7. İSTATİKSEL ANALİZLER

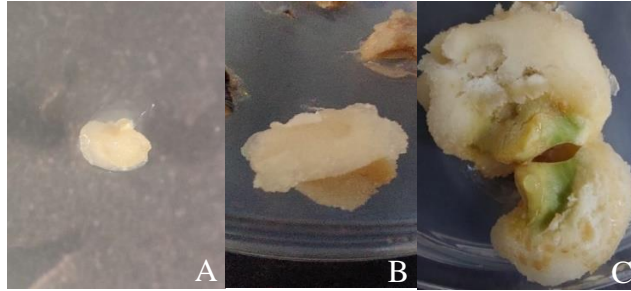
Elisitörlerin hücre süspansiyon kültürü üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için yapılan kuru ağırlık, yaş ağırlık, hücre sayısı ve hücre canlılığı ölçümleri 3 teknik tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Taksan metabolitlerinin HPLC cihazındaki analizi 3 teknik tekrarlı olarak yapılmıştır. Elisitörlerin hücre üremesi, hücre canlılığı ve taksanların üretimi üzerindeki etkisi, GraphPad Prism® 9.01 uygulamasında two-way ANOVA ve post-hoc olarak Tukey test analizleri ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, ortalama değer \pm standart hata olarak ifade edilmiştir. p değeri 0.05'ten küçük olan sonuçlar anlamlı olarak kabul edilmiştir. GraphPad Prism® 9.01 uygulaması, grafiklerin oluşturulmasında kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Bu tez çalışması kapsamında taksan üretimini artırmaya yönelik elisitasyon uygulaması için antikanser taksanları içeren bir Türk fındık çeşidi olan *Corylus avellana* cv. Kalınkara'da aktif bölünen kalluslar elde edilmiş ve bu kalluslardan hücre süspansiyon kültürleri kurulmuştur. Altı aylık homojenize hücre süspansiyon kültürlerine, logaritmik evrenin ortasına karşılık gelen kültürlemenin 17. gününde yapılan 1 μ M koronatin elisitörü, 3 μ M fenilalanin öncülü ve 50 mM metil- β -siklodekstrin nano-taşıyıcısının ayrı ayrı ve kombinasyon halindeki uygulamaların etkileri kültürlerin üreme özellikleri (biyokütle birikimi ve hücre canlılığı) ile taksan metabolitlerinin üretimi arasındaki ilişkinin anlaşılması için incelenmiştir.

4.1. KALLUS OLUŞTURMA FREKANSI

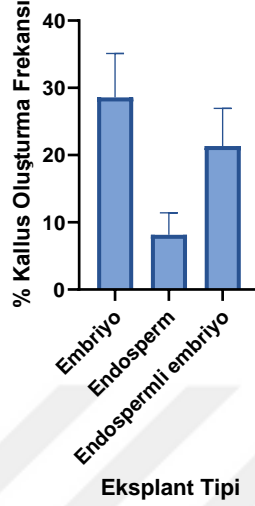
Kallus oluşturmak için eksplant kaynağı olarak kullanılan embriyo, endosperm ve endospermli embriyo, 2 mg/L 2,4-D ve 0,2 mg/L BAP içeren katı MS besiyerinde eksplantların tamamından 30. günün sonunda kallus elde edilmiştir. Her bir eksplant çeşidinden gelişen kalluslara ait örnekler Şekil 4.1'de, eksplant tipinin kallus oluşturma frekansına etkileri ise Şekil 4.2 de verilmiştir.



Şekil 4.1: *C. avellana* fındığının farklı dokularının (embriyo (A), endosperm (B) ve endospermli embriyo (C)) 2 mg/L 2,4-D ve 0,2 mg/L BAP içeren MS besiyerinde yetiştirilmesiyle elde edilen 30 günlük kallus görüntüleri.

Kallus oluşturma frekansı embriyo için %28,5, endosperm için %8,16 ve endospermli embriyo eksplantı için de %19,7 olarak belirlendi. Her ne kadar kallus gelişme frekansı embriyo eksplantlarında yüksek ve kallusların canlılık özellikleri istenen özellikte olsa da embriyo kaynaklı kallusların miktarı hücre süspansiyon kültürü kurmak için yeterli değildi. Diğer yandan, endosperm eksplantların kallus üretme frekansı ise oldukça düşük olarak bulunmuştur. Bununla birlikte endospermli embriyo eksplantı kökenli kallusların aktif bölünme özelliği bakımından embriyo ve endosperm kökenli kalluslardan belirgin derecede yüksek olduğu

belirlenmiştir. Bu nedenle, hücre süspansiyon kültürlerinin kurulmasında endospermli embriyo kökenli kalluslar kullanılmıştır.



Şekil 4.2: *C. avellana* eksplant tiplerinin 2 mg/L 2,4-D ve 0,2 mg/L BAP içeren MS besiyerinde ekiminden 30 gün sonra kallus oluşturma frekansına etkisi.

4.2. ELİSİTASYONUN BİYOKÜTLE BİRİKİMİ VE HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Koronatin, fenilalanin ve metil- β -siklodekstrin hücre süspansiyon kültürlerine ayrı ayrı ve birbiriyle kombinasyon halinde ilave edildikten sonra 2 hafta boyunca kültürler üzerindeki etkileri incelenmiştir.

4.2.1. Yaş Ağırlık

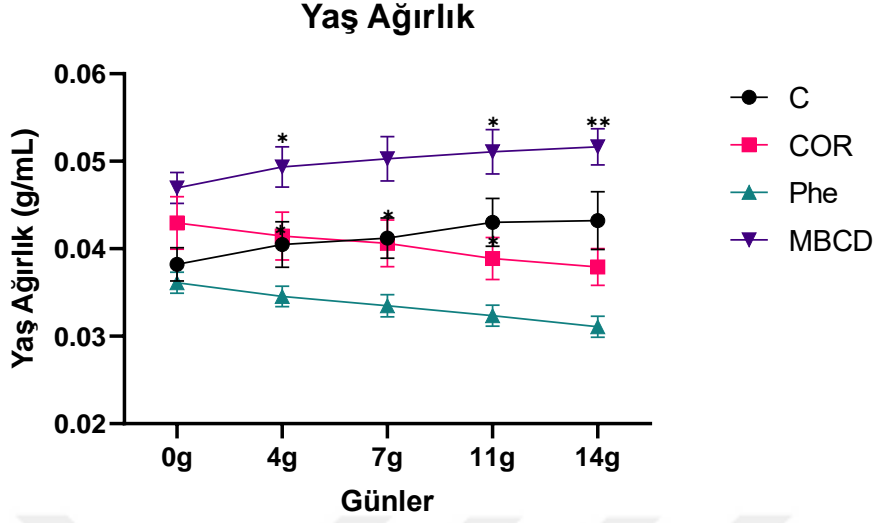
C. avellana hücre süspansiyon kültürlerinde elisitörler eklendikten sonra 0.günden 14.güne kadar kültürlerin yaş ağırlık değişimleri Tablo 4.1’de verilmiştir. Elisitörlerin ayrı ayrı ve birbirleriyle kombinasyonlar halinde hücre süspansiyon kültürlerine eklendiğinde yaş ağırlık üzerindeki etkileri sırasıyla Şekil 4.3 ve Şekil 4.4’te gösterilmiştir. Elisitasyon uygulanmamış hücre süspansiyon kültürleri ölçümlerin yapılmaya başlandığı 0. günden 14.güne kadar yaş ağırlık, %13,08 oranında artmıştır. 1 μ M koronatin ve 3 μ M fenilalanin eklenmiş hücre süspansiyon kültürlerinde ise yaş ağırlık sırasıyla %11,72 ve %14,13 oranında azalmıştır. Bununla birlikte, 50 mM metil- β -siklodekstrin eklenmiş hücre süspansiyon kültürlerinde deney sonunda yaş ağırlık, %9,31 oranında artmıştır (Şekil 4.3). Elisitörlerin birbirleriyle ikili ve üçlü kombinasyonlar halinde (Koronatin + fenilalanin, koronatin + metil- β -siklodekstrin, fenilalanin + metil- β -siklodekstrin ve koronatin + fenilalanin + metil- β -siklodekstrin) uygulanması ise yaş

ağırlıkta sırasıyla %11,72, %4,5, %5,81 ve %6,93 oranında azalmalara neden olmuştur (Şekil 4.4).

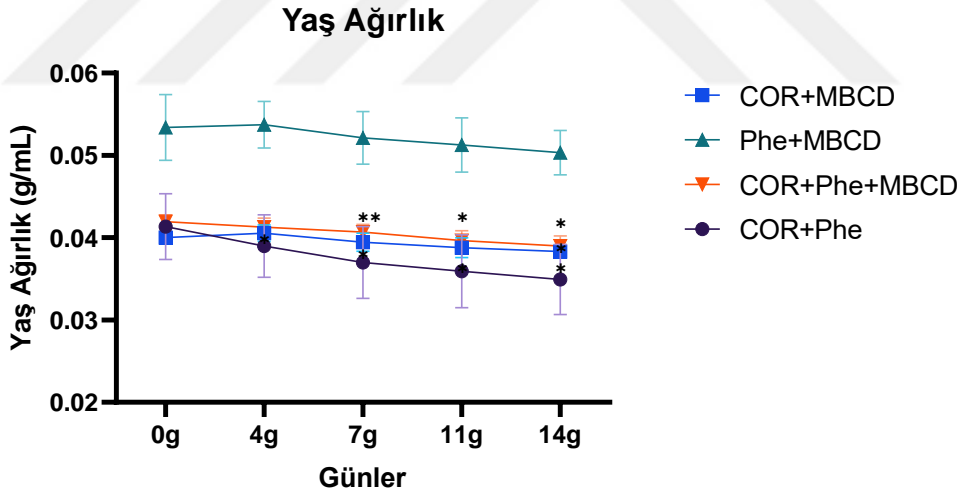
İstatiksel analizlere göre fenilalanin, fenilalanin + metil- β -siklodekstrin hariç bütün uygulamalarda 2 hafta sonundaki yaş ağırlık değişimleri anlamlı sonuçlar vermiştir.

Tablo 4.1: *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerine elisitörler eklendikten sonra 0. günden 14. güne kadar kültürlerin yaş ağırlık değişimleri (g/mL) (COR: 1 μ M koronatin; Phe: 3 μ M fenilalanin; MBCD: 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe: 1 μ M koronatin ve 3 μ M fenilalanin; COR + MBCD: 1 μ M koronatin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; Phe + MBCD: 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe+MBCD: 1 μ M koronatin, 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin).

Uygulamalar \ Günler	0.gün (g/mL)	4.gün (g/mL)	7.gün (g/mL)	11.gün (g/mL)	14.gün (g/mL)	Elisitasyon Sonunda Değişim (%)
Kontrol	0,0382	0,0404	0,0412	0,043	0,0432	+%13,08
COR	0,04293	0,04146	0,0406	0,0388	0,0379	-%11,72
Phe	0,0361	0,0345	0,0334	0,0323	0,031	-%14,13
MBCD	0,04693	0,049	0,0502	0,051	0,0513	+%9,91
COR + Phe	0,0413	0,039	0,037	0,0359	0,0349	-%11,72
COR + MBCD	0,04	0,0405	0,0394	0,0388	0,0382	-%4,5
Phe + MBCD	0,0534	0,0537	0,0521	0,0521	0,0503	-%5,81
COR+Phe+MBCD	0,0419	0,0412	0,0406	0,0396	0,039	-%6,93



Şekil 4.3: *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde 2 hafta boyunca elisitörlerin ayrı ayrı uygulandığında kültürlerin yaş ağırlığı üzerindeki etkileri (COR: 1 μ M koronatin; Phe: 3 μ M fenilalanin; MBCD: 50 mM metil- β -siklodekstrin). Veriler two-way ANOVA ve Tukey testi ile analiz edilmiştir. p değeri <0,05'ten küçük değerler anlamlı kabul edilmiştir (*: p<0,05, **: p<0,01).



Şekil 4.4: *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde 2 hafta boyunca elisitörlerin kombinasyon halinde uygulandığında kültürlerin yaş ağırlığı üzerindeki etkileri (COR + Phe: 1 μ M koronatin ve 3 μ M fenilalanin; COR + MBCD: 1 μ M koronatin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; Phe + MBCD: 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe +MBCD: 1 μ M koronatin, 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin). Veriler two-way ANOVA ve Tukey testi ile analiz edilmiştir. p değeri <0,05'ten küçük değerler anlamlı kabul edilmiştir (*: p<0,05, **: p<0,01).

4.2.2. Kuru Ağırlık

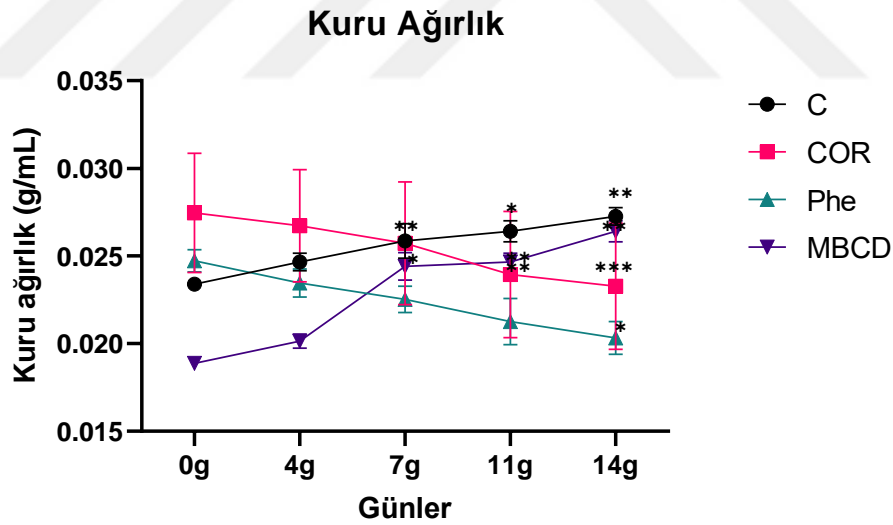
C. avellana hücre süspansiyon kültürlerinde elisitörler eklendikten sonra 2 hafta boyunca kültürlerin kuru ağırlık değişimleri Tablo 4.2’de verilmiştir. Elisitörlerin ayrı ayrı ve birbirleriyle kombinasyonlar halinde hücre süspansiyon kültürlerine eklendiğinde kültürlerin kuru ağırlığı üzerindeki etkileri Şekil 4.5 ve Şekil 4.6’da gösterilmiştir.

Elisitasyon uygulanmamış hücre süspansiyon kültürleri ölçümlerin yapılmaya başlandığı 0. günden 14.güne kadar kuru ağırlık, %16,23 oranında artmıştır. 1 μ M koronatin ve 3 μ M fenilalanin eklenmiş hücre süspansiyon kültürlerinde ise kuru ağırlık sırasıyla %5,48 ve %17,82 oranında azalmıştır (Şekil 4.5). Bununla birlikte, 50 mM metil- β -siklodekstrin eklenmiş hücre süspansiyon kültürlerinde deney sonunda kuru ağırlık, %40,42 oranında artmıştır. Elisitörlerin birbirleriyle ikili ve üçlü kombinasyonlar halinde (Koronatin+fenilalanin, koronatin+metil- β -siklodekstrin ve koronatin+fenilalanin+metil- β -siklodekstrin) uygulandığında ise kuru ağırlık sırasıyla %20,27, %6,57 ve %5,81 oranında azalmıştır. Ancak fenilalanin ve metil- β -siklodekstrin hücre süspansiyon kültürlerine beraber ilave edildiğinde ise kuru ağırlık kısmen (%0,65) artmıştır (Şekil 4.6).

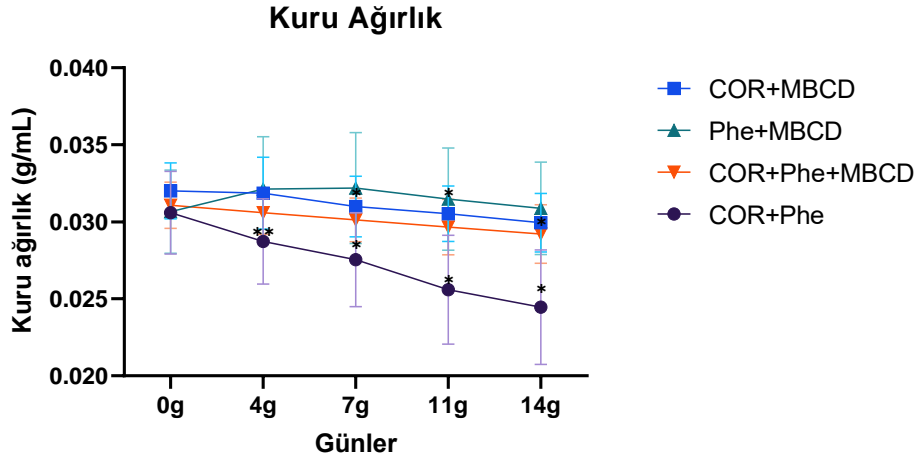
İstatiksel analizlere göre fenilalanin + metil- β -siklodekstrin ve koronatin + fenilalanin + metil- β -siklodekstrin hariç bütün uygulamalarda 2 hafta sonundaki kuru ağırlık değişimleri anlamlı sonuçlar vermiştir.

Tablo 4.2: *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerine elisitörler eklendikten sonra 0. günden 14. güne kadar kültürlerin kuru ağırlık değişimleri (g/mL) (COR: 1 μ M koronatin; Phe: 3 μ M fenilalanin; MBCD: 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe: 1 μ M koronatin ve 3 μ M fenilalanin; COR + MBCD: 1 μ M koronatin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; Phe + MBCD: 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe + MBCD: 1 μ M koronatin, 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin).

Günler Uygulamalar	0.gün (g/mL)	4.gün (g/mL)	7.gün (g/mL)	11.gün (g/mL)	14.gün (g/mL)	Elisitasyon Sonunda Değişim (%)
Kontrol	0,0234	0,0246	0,0258	0,0264	0,0272	+%16,23
COR	0,0274	0,0267	0,0257	0,0239	0,0259	-%5,43
Phe	0,0247	0,0234	0,0225	0,0212	0,0203	-%17,82
MBCD	0,0188	0,0201	0,0244	0,0246	0,0264	+%40,42
COR + Phe	0,0306	0,0287	0,0275	0,0256	0,0244	-%20,27
COR + MBCD	0,032	0,0318	0,031	0,0305	0,0299	-%6,57
Phe + MBCD	0,0306	0,0321	0,0318	0,0314	0,0308	-%5,8
COR + Phe + MBCD	0,031	0,0306	0,0301	0,0296	0,0292	+%0,65



Şekil 4.5: *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde 2 hafta boyunca elisitörlerin ayrı ayrı uygulandığında kültürlerin kuru ağırlığı üzerindeki etkileri (COR: 1 μ M koronatin; Phe: 3 μ M fenilalanin; MBCD: 50 mM metil- β -siklodekstrin). Veriler two-way ANOVA ve Tukey testi ile analiz edilmiştir. p değeri <0,05'ten küçük değerler anlamlı kabul edilmiştir (*: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001).



Şekil 4.6: *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde 2 hafta boyunca elisitörlerin kombinasyon halinde uygulandığında kültürlerin kuru ağırlığı üzerindeki etkileri (COR + Phe: 1 μ M koronatin ve 3 μ M fenilalanin; COR + MBCD: 1 μ M koronatin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; Phe + MBCD: 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe + MBCD: 1 μ M koronatin, 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin). Veriler ordinary two-way ANOVA ve Tukey testi ile analiz edilmiştir. p değeri <0,05'ten küçük değerler anlamlı kabul edilmiştir (*: p<0,05, **: p<0,01).

4.2.3. Hücre Üremesi

C. avellana hücre süspansiyon kültürlerinde elisitörler eklendikten sonra 2 hafta boyunca kültürlerin hücre üremesindeki değişimler Tablo 4.3'te verilmiştir. Elisitörlerin ayrı ayrı ve birbirleriyle kombinasyonlar halinde hücre süspansiyon kültürlerine eklendiğinde kültürlerin hücre üremesi üzerindeki etkisi Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'da gösterilmiştir.

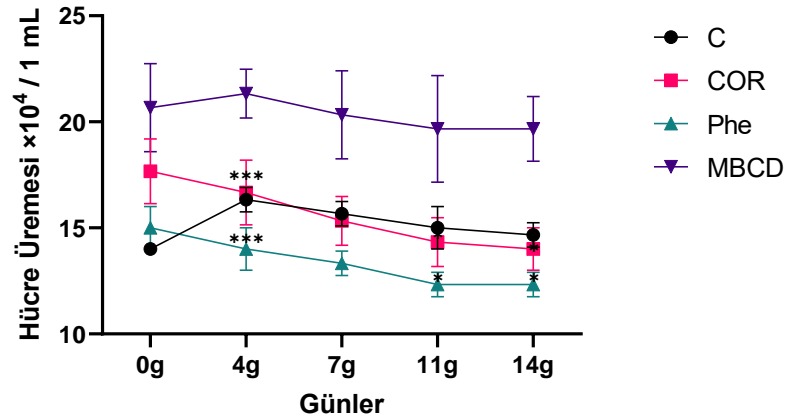
Elisitasyon uygulanmamış hücre süspansiyon kültürleri ölçümlerin yapılmaya başlandığı 0. günden 14.güne kadar hücre üremesi, %4,71 oranında artmıştır. 1 μ M koronatin, 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin eklenmiş hücre süspansiyon kültürlerinde ise hücre üremesi, sırasıyla %20,73, %17,80 ve %6,44 oranında azalmıştır (Şekil 4.7). Benzer şekilde, elisitörlerin birbirleriyle ikili ve üçlü kombinasyonlar halinde (Koronatin+fenilalanin, koronatin+metil- β -siklodekstrin, fenilalanin+metil- β -siklodekstrin ve koronatin+fenilalanin+metil- β -siklodekstrin) uygulandığında ise hücre üremesi sırasıyla %18,86, %17,31, %16,93 ve %17,85 oranında azalmıştır (Şekil 4.8).

İstatiksel analizlere göre kontrol, metil- β -siklodekstrin, fenilalanin + metil- β -siklodekstrin, koronatin + fenilalanin + metil- β -siklodekstrin hariç bütün uygulamalarda 2 hafta sonundaki yaş ağırlık değişimleri anlamlı sonuçlar vermiştir.

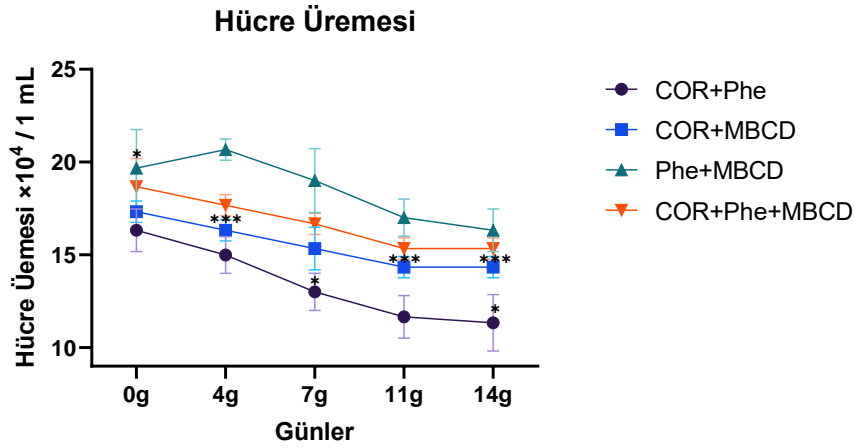
Tablo 4.3: *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerine elisitörler eklendikten sonra 0. günden 14. güne kadar kültürlerin hücre üremesi değişimleri ($\times 10^4$) (COR: 1 μ M koronatin; Phe: 3 μ M fenilalanin; MBCD: 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe: 1 μ M koronatin ve 3 μ M fenilalanin; COR + MBCD: 1 μ M koronatin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; Phe + MBCD: 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe + MBCD: 1 μ M koronatin, 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin).

Günler Uygulamalar	0.gün ($\times 10^4$)	4.gün ($\times 10^4$)	7.gün ($\times 10^4$)	11.gün ($\times 10^4$)	14.gün ($\times 10^4$)	Elisitasyon Sonunda Değişim (%)
Kontrol	14	16,33	15,66	15	14,66	+%4,71
COR	17,66	16,66	15,33	14,33	14	-20,73%
Phe	15	14	13,33	12,33	12,33	-17,80%
MBCD	20,66	21,33	20,33	19,66	19,33	-6,44%
COR + Phe	17,66	16,66	15,66	14,66	14,33	-18,86%
COR + MBCD	17,33	16,33	15,33	14,33	14,33	-17,31%
Phe + MBCD	19,66	20,66	19	17	16,33	-16,93%
COR + Phe + MBCD	18,66	17,66	16,66	15,33	15,33	-17,85%

Hücre Üremesi



Şekil 4.7: *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde 2 hafta boyunca elisitörlerin ayrı ayrı uygulandığında kültürlerin hücre üremesi üzerindeki etkileri (COR: 1 μ M koronatin; Phe: 3 μ M fenilalanin; MBCD: 50 mM metil- β -siklodekstrin). Veriler two-way ANOVA ve Tukey testi ile analiz edilmiştir. p değeri <0,05'ten küçük değerler anlamlı kabul edilmiştir (*: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001).



Şekil 4.8: *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde 2 hafta boyunca elisitörlerin kombinasyon halinde uygulandığında kültürlerin hücre üremesi üzerindeki etkileri (COR + Phe: 1 μ M koronatin ve 3 μ M fenilalanin; COR + MBCD: 1 μ M koronatin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; Phe + MBCD: 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe + MBCD: 1 μ M koronatin, 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin). Veriler two-way ANOVA ve Tukey testi ile analiz edilmiştir. p değeri <0,05'ten küçük değerler anlamlı kabul edilmiştir (*: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001).

4.2.4. Hücre Canlılığı

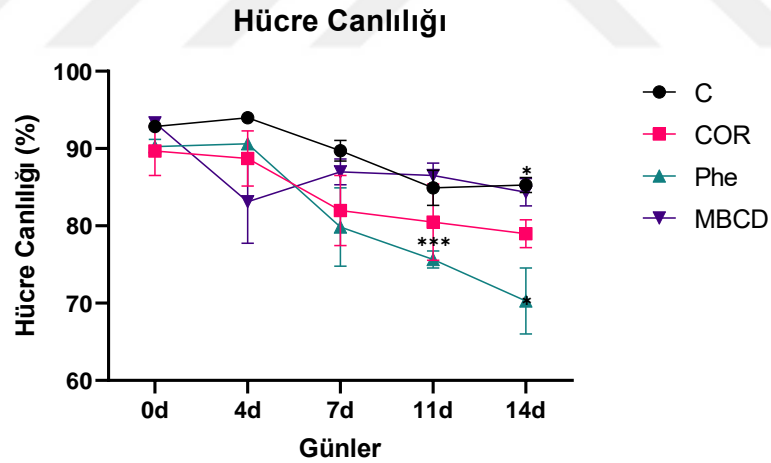
C. avellana hücre süspansiyon kültürlerinde elisitörler eklendikten sonra 2 hafta boyunca kültürlerin hücre canlılığındaki değişimler Tablo 4.4'te verilmiştir. Elisitörlerin ayrı ayrı ve birbirleriyle kombinasyonlar halinde hücre süspansiyon kültürlerine eklendiğinde kültürlerin hücre canlılığı üzerindeki etkisi Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Şekil 4.11'de ise hücre süspansiyon kültürlerinin mikroskop altındaki görüntüleri verilmiştir.

Elisitasyon uygulanmamış hücre süspansiyon kültürleri ölçümlerin yapılmaya başlandığı 0. günden 14.güne kadar hücre canlılığı, %8,18 oranında azalmıştır (Şekil 4.9). Elisitör uygulamalarında ise 1 μ M koronatin %11,12, 3 μ M fenilalanin %24,77, 50 mM metil- β -siklodekstrin %6,54 oranında hücre canlılığını azaltmıştır. Benzer şekilde koronatin+fenilalanin %14,74, koronatin+metil- β -siklodekstrin %9,14, fenilalanin+metil- β -siklodekstrin %1,16 ve koronatin+fenilalanin+metil- β -siklodekstrin uygulamaları ise %8,1 oranında hücre canlılığını azaltmıştır (Şekil 4.10).

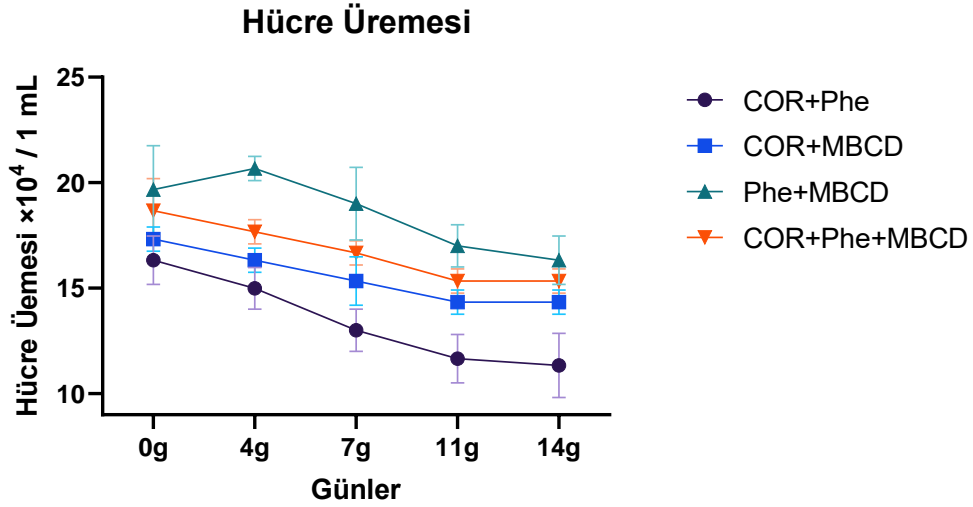
İstatiksel analizlere göre kontrol, fenilalanin ve metil- β -siklodekstrin 2 hafta sonundaki hücre canlılığı değişimleri anlamlı sonuçlar vermiştir.

Tablo 4.4: *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerine elisitörler eklendikten sonra 0. günden 14. güne kadar kültürlerin hücre canlılığı değişimleri (%) (COR: 1 μ M koronatin; Phe: 3 μ M fenilalanin; MBCD: 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe: 1 μ M koronatin ve 3 μ M fenilalanin; COR + MBCD: 1 μ M koronatin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; Phe + MBCD: 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe + MBCD: 1 μ M koronatin, 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin).

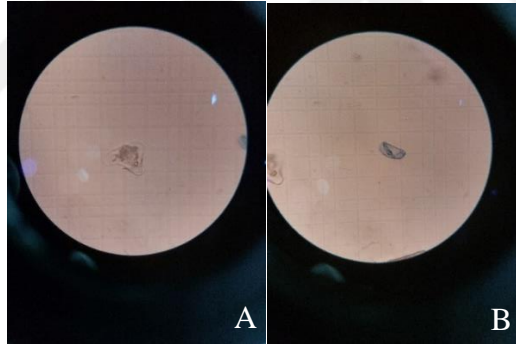
Günler Uygulamalar	0. gün (%)	4. gün (%)	7. gün (%)	11. gün (%)	14.gün (%)	Elisitasyon Sonunda Değişim (%)
Kontrol	92,85	93,98	89,72	84,90	85,26	-8,18%
COR	89,68	88,72	81,98	80,47	79,71	-11,12%
Phe	93,31	83,09	79,85	75,64	70,29	-24,77%
MBCD	90,25	90,6	86,98	86,53	84,35	-6,54%
COR + Phe	92,55	90,14	83,10	79,46	78,91	-14,74%
COR + MBCD	92,22	89,82	86,90	86,02	83,80	-9,14%
Phe + MBCD	85,43	83,90	86,3	85,18	84,44	-1,16%
COR + Phe + MBCD	92,35	87,22	86,41	84,97	75,64	-8,10%



Şekil 4.9: *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde 2 hafta boyunca elisitörlerin ayrı ayrı uygulandığında kültürlerin hücre canlılığı üzerindeki etkileri (COR: 1 μ M koronatin; Phe: 3 μ M fenilalanin; MBCD: 50 mM metil- β -siklodekstrin). Veriler two-way ANOVA ve Tukey testi ile analiz edilmiştir. p değeri <0,05'ten küçük değerler anlamlı kabul edilmiştir (*: <0,05, **: <0,01, ***: <0,001).



Şekil 4.10: *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde 2 hafta boyunca elisitörlerin kombinasyon halinde uygulandığında kültürlerin hücre canlılığı üzerindeki etkileri (COR + Phe: 1 μ M koronatin ve 3 μ M fenilalanin; COR + MBCD: 1 μ M koronatin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; Phe+MBCD: 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe + MBCD: 1 μ M koronatin, 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin). Veriler two-way ANOVA testi ile analiz edilmiştir. p değeri <0,05'ten küçük değerler anlamlı kabul edilmiştir (*: p<0,05).



Şekil 4.11: *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerindeki hücrelerin mikroskop altındaki görüntüleri (A: Canlı; B: Ölü).

4.3. ELİSİTASYONUN TAKSAN ÜRETİMİNE ETKİSİ

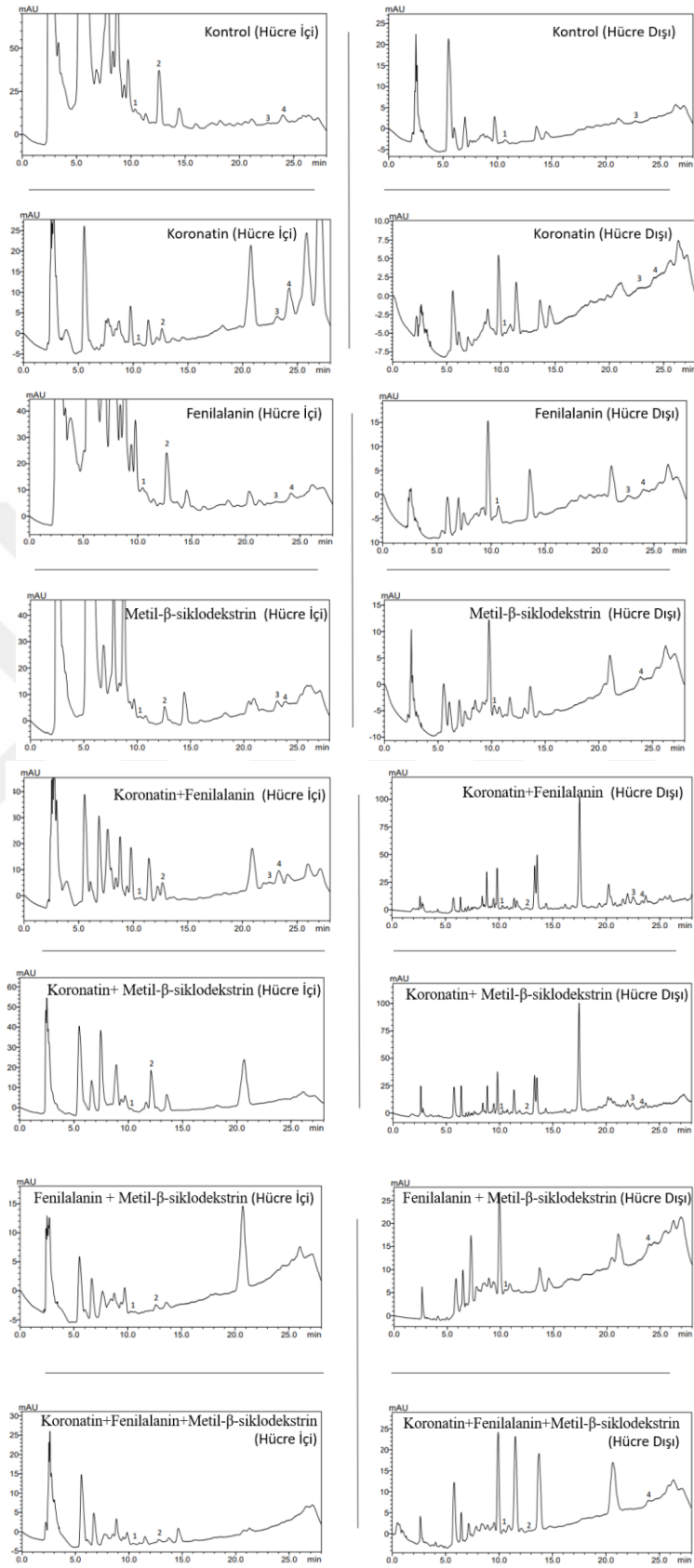
Koronatin, fenilalanin ve metil- β -siklodekstrin hücre süspansiyon kültürlerine ayrı ayrı ve birbiriyle kombinasyon halinde ilave edildikten 2 hafta sonra kültürlerde üretilen toksanlar üzerindeki etkisi incelenmiştir.

4.3.1. Elisitasyonun Hücre İçi Taksan Üretimine Etkisi

C. avellana hücre süspansiyon kültürlerinde elisitörlerin taksanların hücre içi üretimindeki değişimleri Tablo 4.5'te verilmiştir. Elisitörlerin ayrı ayrı ve birbirleriyle kombinasyonlar halinde hücre süspansiyon kültürlerinde taksanların hücre içi üretimine etkisi Şekil 4.12'de gösterilmiştir.

Elisitasyon uygulanmamış kontrol hücre süspansiyon kültürlerinde hücre içinde 10-deasetil bakkatin III 0,878 µg/mL, bakkatin III 36,424 µg/mL, sefalomannin 0,519 µg/mL, paklitaksel 16,812 µg/mL üretilmiştir. Hücre süspansiyon kültürlerine 1 µM koronatin eklendiğinde ise üretilen 10-deasetil bakkatin III (0,648 µg/mL) ve bakkatin III (3,126 µg/mL) miktarı azalırken, sefalomannin (1,747 µg/mL) ve paklitaksel (32,00 µg/mL) kontrole göre sırasıyla 3,36 ve 1,90 kat artmıştır. 3 µM fenilalanin uygulaması ise bakkatin III (24,143 µg/mL) ve paklitaksel (8,211 µg/mL) miktarını azaltırken 10-deasetil bakkatin III (3,188 µg/mL) sefalomannin miktarını artırmıştır (0,856 µg/mL). 50 mM metil-β-siklodekstrin uygulaması kontrole göre hücre içinde sadece sefalomannin üretimini (3,929 µg/mL), koronatin + fenilalanin ise paklitaksel üretimi (17,34 µg/mL) artmıştır. Elisitörlerin diğer ikili ve üçlü uygulamaları (koronatin + metil-β-siklodekstrin, fenilalanin + metil-β-siklodekstrin ve koronatin + fenilalanin + metil-β-siklodekstrin) ise kontrole göre hücre içinde 10-deasetil bakkatin III (0,208 µg/mL, 0,388 µg/mL ve 0,099 µg/mL) ve bakkatin III (18,893 µg/mL, 1,072 µg/mL ve 0,843 µg/mL) üretimini azaltmıştır. Bu uygulamalarda sefalomannin ve paklitaksel miktarı tespit edilememiştir.

Yapılan istatistiksel analizler, koronatin + fenilalanin hariç, bütün uygulamalarda hücre içinde üretilen taksan metabolitlerinin miktarlarındaki değişimlerin anlamlı olduğunu göstermiştir.

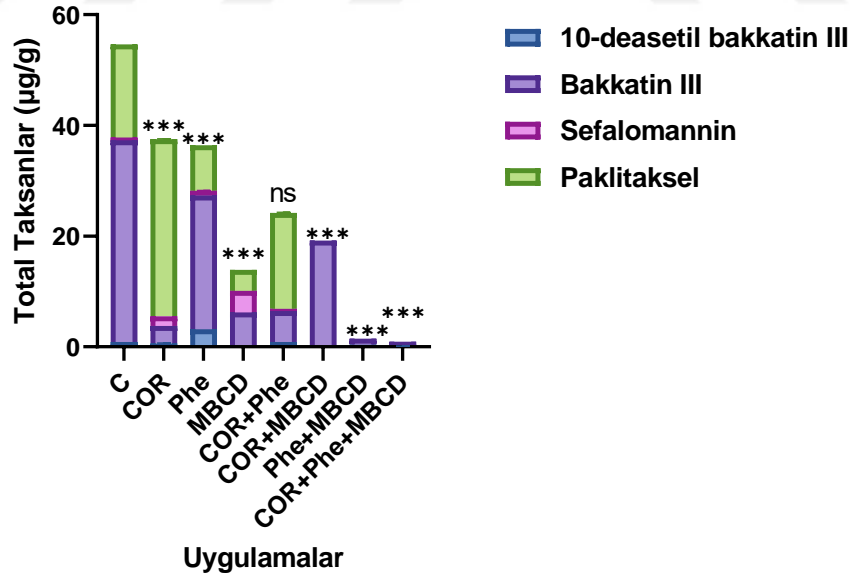


Şekil 4.12: *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde elisitörlerin taksanların hücre içi ve hücre dışı üretimi. (1: 10-deasetil bakkatin III, 2: bakkatin III, 3: sefalomannin, 4: paklitaksel)

Tablo 4.5: Elisitörlerin *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde taksanların hücre içindeki üretimine etkisi ($\mu\text{g/mL}$) (COR: 1 μM koronatin; Phe: 3 μM fenilalanin; MBCD: 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR+Phe: 1 μM koronatin ve 3 μM fenilalanin; COR + MBCD: 1 μM koronatin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; Phe + MBCD: 3 μM fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe + MBCD: 1 μM koronatin, 3 μM fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; TE: Tespit edilemedi).

Metabolitler Uygulamalar	10-deasetil bakkatin III ($\mu\text{g/mL}$)	Bakkatin III ($\mu\text{g/mL}$)	Sefalomannin ($\mu\text{g/mL}$)	Paklitaksel ($\mu\text{g/mL}$)
Kontrol	0,878 \pm 0,002	36,424 \pm 0,007	0,519 \pm 0,002	16,812 \pm 0,002
COR	0,648 \pm 0,011	3,126 \pm 0,005	1,747 \pm 0,006	32,00 \pm 0,009
Phe	3,188 \pm 0,006	24,143 \pm 0,021	0,865 \pm 0,009	8,211 \pm 0,012
MBCD	0,22 \pm 0,001	5,998 \pm 0,004	3,929 \pm 0,002	3,765 \pm 0,003
COR + Phe	0,857 \pm 0,007	5,595 \pm 0,009	0,402 \pm 0,001	17,34 \pm 0,07
COR + MBCD	0,208 \pm 0,002	18,983 \pm 0,007	TE	TE
Phe + MBCD	0,388 \pm 0,011	1,072 \pm 0,007	TE	TE
COR + Phe + MBCD	0,099 \pm 0,001	0,843 \pm 0,005	TE	TE

Hücre İçi



Şekil 4.13: *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde elisitörlerin ayrı ayrı ve birlikte uygulandığında hücre içi taksan üretimine etkileri (COR: 1 μM koronatin; Phe: 3 μM fenilalanin; MBCD: 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe: 1 μM koronatin ve 3 μM fenilalanin; COR + MBCD: 1 μM koronatin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; Phe + MBCD: 3 μM fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe + MBCD: 1 μM koronatin, 3 μM fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin). Veriler two-way ANOVA ve Tukey testi ile analiz edilmiştir. p değeri $<0,05$ 'ten küçük değerler anlamlı kabul edilmiştir (*: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$, ns: anlamlı değil).

4.3.2. Elisitasyonun Hücre Dışı Taksan Üretimine Etkisi

C. avellana hücre süspansiyon kültürlerinde elisitörlerin taksanların hücre dışı üretimindeki değişimleri Tablo 4.6'te verilmiştir. Elisitörlerin ayrı ayrı ve birbirleriyle kombinasyonlar halinde hücre süspansiyon kültürlerinde taksanların hücre dışı üretimine etkisi ise Şekil 4.13'te gösterilmiştir.

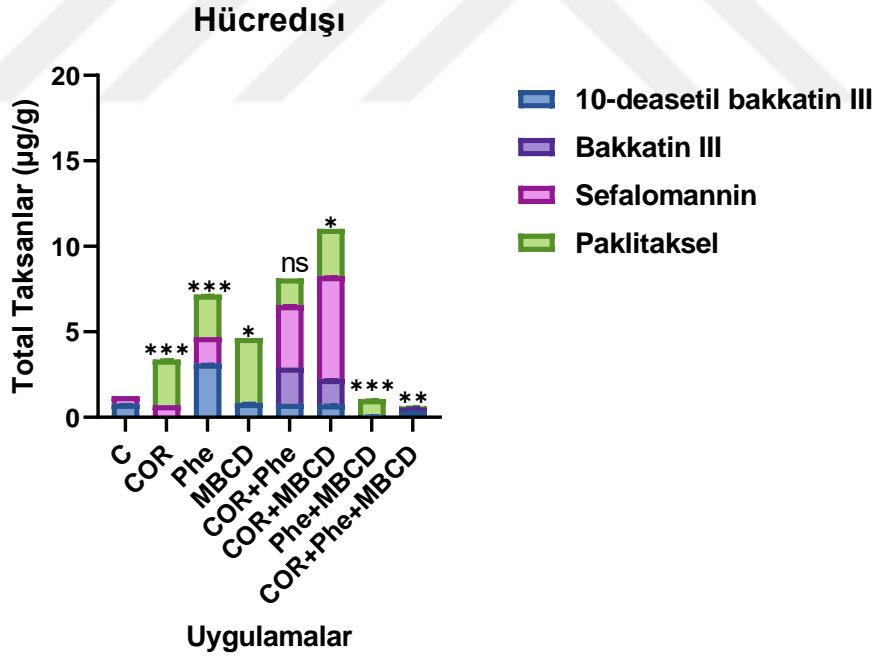
Elisitasyon yapılmamış kontrol hücre süspansiyon kültürlerinde hücre dışında üretilen 10-deasetil bakkatin III miktarı 0,790 µg/mL ve sefalomannin miktarı 0,455 µg/mL'dir. Bakkatin III ve paklitaksel ise tespit edilememiştir. Hücre süspansiyon kültürlerine 1 µM koronatin eklendiğinde, hücre dışında üretilen 10-deasetil bakkatin III ve bakkatin III miktarı azalırken, sefalomannin ve paklitaksel miktarı ise sırasıyla 0,667 µg/mL ve 2,667 µg/mL'a yükselmiştir. Fenilalanin ise hücre dışında üretilen 10-deasetil bakkatin III ve sefalomannin miktarını sırasıyla yaklaşık olarak 4 ve 3.5 kat artmıştır. Ayrıca 3 µM fenilalanin uygulamasında, 1 µM koronatin uygulaması ile benzer bir miktarda, paklitaksel (2,477 µg/mL) hücre dışına salgılanmıştır. Paklitakselin hücre dışına en fazla salgılandığı (3,793 µg/mL) uygulama ise 50 mM metil-β-siklodekstrin uygulamasıdır. Bu kültürlerde bakkatin III ve sefalomannin ise tespit edilememiştir (Şekil 4.13).

Koronatinin fenilalanin ve metil-β-siklodekstrin ile ikili uygulandığı kültürlerde hücre dışına salgılanan taksan miktarında dramatik bir biçimde artış gözlenmiştir. 1 µM koronatin + 3 µM fenilalanin ve 1 µM koronatin + 50 mM metil-β-siklodekstrin eklenmiş hücre süspansiyon kültürlerinde hücre dışı 10-deasetil bakkatin III miktarı (0,796 µg/mL, 0,753 µg/mL) kontrol ile benzerken, bakkatin miktarı ise 4,63 (2,109 µg/mL) ve 3,26 (1,482 µg/mL) kat artmıştır. Bu iki kültürdeki hücre dışında üretilen sefalomannin miktarı ise, 1 µM koronatin uygulamasına göre, sırasıyla yaklaşık olarak 5,5 (3,656 µg/mL) ve 10 (6,016 µg/mL) kat artmıştır. Ayrıca bu kültürlerde sırasıyla hücre dışına 1,569 µg/mL ve 2,771 µg/mL paklitaksel salgılanmıştır. 3 µM fenilalanin + 50 mM metil-β-siklodekstrin ile elisite edilmiş kültürlerde ise hücre dışı ortamda 10-deasetil bakkatin III (0,116 µg/mL) miktarı azalırken, paklitaksel (0,935 µg) miktarı artmıştır. Elisitörlerin üçlü kombinasyon halinde uygulandığında hücre dışına salgılanan taksan verimi negatif etkilenmiştir.

Yapılan istatistiksel analizler, koronatin + fenilalanin hariç, bütün uygulamalarda hücre dışında bulunan taksan metabolitlerinin miktarlarındaki değişimlerin anlamlı olduğunu göstermiştir.

Tablo 4.6: Elisitörlerin *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde taksanların hücre dışındaki üretimine etkileri ($\mu\text{g/mL}$) (COR: 1 μM koronatin; Phe: 3 μM fenilalanin; MBCD: 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe: 1 μM koronatin ve 3 μM fenilalanin; COR + MBCD: 1 μM koronatin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; Phe + MBCD: 3 μM fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe + MBCD: 1 μM koronatin, 3 μM fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin).

Metabolitler Uygulamalar	10-deasetil bakkatin III ($\mu\text{g/mL}$)	Bakkatin III ($\mu\text{g/mL}$)	Sefalomannin ($\mu\text{g/mL}$)	Paklitaksel ($\mu\text{g/mL}$)
Kontrol	0,790 \pm 0,009	TE	0,455 \pm 0,005	TE
COR	0,041 \pm 0,001	TE	0,667 \pm 0,002	2,667 \pm 0,031
Phe	3,139 \pm 0,007	TE	1,553 \pm 0,004	2,477 \pm 0,005
MBCD	0,850 \pm 0,001	TE	TE	3,793 \pm 0,003
COR + Phe	0,796 \pm 0,003	2,109 \pm 0,004	3,656 \pm 0,007	1,569 \pm 0,001
COR + MBCD	0,753 \pm 0,004	1,482 \pm 0,004	6,016 \pm 0,009	2,771 \pm 0,003
Phe + MBCD	0,116 \pm 0,005	TE	TE	0,935 \pm 0,006
COR + Phe + MBCD	0,326 \pm 0,018	0,234 \pm 0,010	TE	0,074 \pm 0,005



Şekil 4.14: *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde elisitörlerin ayrı ayrı ve birlikte uygulandığında hücre dışı taksan üretimine etkileri (COR: 1 μM koronatin; Phe: 3 μM fenilalanin; MBCD: 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe: 1 μM koronatin ve 3 μM fenilalanin; COR + MBCD: 1 μM koronatin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; Phe + MBCD: 3 μM fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe + MBCD: 1 μM koronatin, 3 μM fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin). Veriler two-way ANOVA ve Tukey testi ile analiz edilmiştir. p değeri $<0,05$ 'ten küçük değerler anlamlı kabul edilmiştir (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ns: anlamlı değil).

4.3.3 Elisitasyonun Taksanların Salgılanma Oranına Etkisi

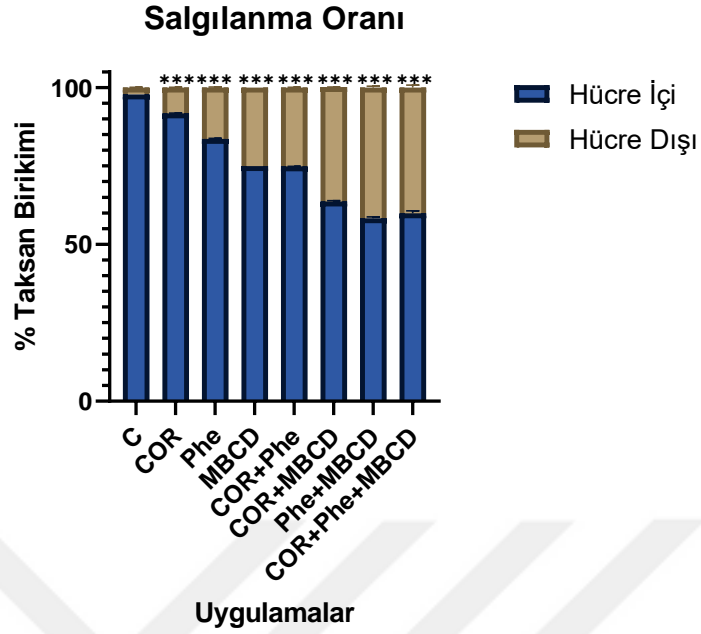
C. avellana hücre süspansiyon kültürlerinde elisitörlerin ayrı ayrı ve birbirleriyle kombinasyonlar halinde hücre içi ve dışında üretilen toplam taksan verimine etkileri Tablo 4.7’de ve hücre dışına salgılanma oranlarına etkileri ise Şekil 4.14’te gösterilmiştir.

Kontrol hücre süspansiyon kültürlerinde taksanların (10-deasetil bakkatin III, bakkatin III, sefalomannin ve paklitaksel) hücre içinde toplam üretim miktarı 54,636 µg/mL iken, bütün elisitasyon uygulamalarında bu değerler azalmıştır. Bununla birlikte hücre dışı toplam taksan miktarı ve taksanların salgılanma oranlarında ise elisitasyon uygulamaları ile birlikte artış görülmüştür (Şekil 4.14). Salgılanma oranlarının en yüksek olduğu koşullar sırasıyla fenilalanin+metil-β-siklodekstrin (%41,85), koronatin+fenilalanin+metil-β-siklodekstrin (%40,22) ve koronatin+metil-β-siklodekstrin (%36,45)’dir.

Yapılan istatistiksel analizler, taksanların hücre dışına salgılanma oranlarının bütün uygulamalarda anlamlı olduğunu göstermiştir.

Tablo 4.7: Elisitörlerin hücre süspansiyon kültürlerinde taksanların salgılanma oranına etkileri (µg/mL) (COR: 1 µM koronatin; Phe: 3 µM fenilalanin; MBCD: 50 mM metil-β-siklodekstrin; COR + Phe: 1 µM koronatin ve 3 µM fenilalanin; COR + MBCD: 1 µM koronatin ve 50 mM metil-β-siklodekstrin; Phe + MBCD: 3 µM fenilalanin ve 50 mM metil-β-siklodekstrin; COR + Phe + MBCD: 1 µM koronatin, 3 µM fenilalanin ve 50 mM metil-β-siklodekstrin).

Taksan Miktarı Uygulamalar	Hücre İçi (µg/mL)	Hücre Dışı (µg/mL)	Toplam (µg/mL)	Salgılanma Oranı (%)
Kontrol	54,636	1,245	55,881	%2,227
COR	37,53	3,375	40,905	%8,25
Phe	36,398	7,169	43,567	%16,455
MBCD	13,894	4,643	18,537	%25,04
COR + Phe	24,194	8,13	32,324	%25,15
COR + MBCD	19,191	11,022	30,213	36,48
Phe + MBCD	1,46	1,051	2,511	%41,85
COR + Phe + MBCD	0,942	0,634	1,576	%40,22



Şekil 4.15: *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde elisitörlerin ayrı ayrı ve birlikte uygulandığında taksanların hücre dışına salgılanma oranına etkileri (COR: 1 μ M koronatin; Phe: 3 μ M fenilalanin; MBCD: 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe: 1 μ M koronatin ve 3 μ M fenilalanin; COR + MBCD: 1 μ M koronatin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; Phe + MBCD: 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin; COR + Phe + MBCD: 1 μ M koronatin, 3 μ M fenilalanin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin). Veriler ordinary two-way ANOVA testi ve Tukey ile analiz edilmiştir. p değeri <0,05'ten küçük değerler anlamlı kabul edilmiştir (***: p<0,001).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitki hücre kültürleri, sekonder metabolitlerin üretimi için etkili, ucuz ve sürdürülebilir bir sistem sunmaktadır (Ramirez-Estrada ve diğ., 2016; Narayani & Srivastava, 2017; Halder ve diğ., 2019). Etkili bir anti-kanser bir bileşik olan paklitakselin üretimi, *Taxus* hücre kültürleri aracılığıyla başarıyla gerçekleştirilmektedir (Vidal-Limon ve diğ., 2018; Hanano ve diğ., 2022; Perez-Matas ve diğ., 2023). *C. avellana*'nın farklı dokularında paklitaksel ve türevlerinin keşfedilmesinden sonra bu bitkinin hücre kültürleri, *Taxus* türlerine alternatif olarak paklitaksel üretimi için odak noktası haline gelmiştir (Bemani ve diğ., 2013; Rahpeyma ve diğ., 2017; Salehi ve diğ., 2019; Farhadi ve diğ., 2020). *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde taksanların üretimi için metil jasmonat, koronatin, fenilalanin, salisilik asit, vanadil sülfat, ve fungal elisitörler gibi çok çeşitli elisitörler kullanılmıştır (Rezaei ve diğ., 2011; Gallego ve diğ., 2015; Rahpeyma ve diğ., 2017; Farhadi ve diğ., 2020;). Elisitörlerin kullanılmasının temel amacı, hücre süspansiyon kültürlerinde paklitaksel ve türevlerinin verimini artırmaktır. Bununla birlikte elisitör kullanımı taksan birikiminde etkili olsa da üretim artışı için hücre üremesinin de verimli olması gerekmektedir. Bu nedenle son yıllarda hem taksan biyosentezinin hem de hücre biyokütlesinin artırılmasına yönelik elisitasyon uygulamaları önem kazanmıştır (Farhadi ve diğ., 2020; Escrich ve diğ., 2021; Perez-Matas ve diğ., 2022). Diğer taraftan, hücre içinde üretilen sekonder metabolitlerin kültür ortamına salgılanması için yapılan çalışmalar, bu metabolitlerin verimli üretimi için öne çıkmıştır (Sabater-Jara ve diğ., 2014; Commault ve diğ., 2021; Fattahi ve diğ., 2021;). Sekonder metabolitlerin hücre dışına salgılanma oranı yükseldikçe geri inhibisyon mekanizmasının çalışmasının engellenmesi nedeniyle hücre içinde ilgili sekonder metabolitin biyosentezinin de arttığı gözlenmiştir (Kashani ve diğ., 2018; Farhadi ve diğ., 2020).

Bu tez çalışmasında paklitaksel ve türevlerini ürettiği gösterilen Türk fındık çeşitlerinden (Kutlutürk, 2019; Göktepe, 2020) *Corylus avellana* cv. Kalınkara'da aktif bölünen kalluslar elde edilmiş ve bu kalluslardan hücre süspansiyon kültürleri kurulmuştur. Altı aylık homojenize hücre süspansiyon kültürlerine, logaritmik evrenin ortasına karşılık gelen kültürlemenin 17. gününde yapılan 1 μ M koronatin elisitörü, 3 μ M fenilalanin öncülü ve 50 mM metil- β -siklodekstrin nano-taşıyıcısının ayrı ayrı ve kombinasyon halindeki uygulamaların etkileri kültürlerin üreme özellikleri (biyokütle birikimi ve hücre canlılığı) ile taksan metabolitlerinin üretimi arasındaki ilişkinin anlaşılması için incelenmiştir. Elisitörlerin arasından biyokütle

birikimini en çok artıran ve hücre canlılığı üzerindeki negatif etkisi en az olan koşul, 50 mM metil- β -siklodekstrin uygulamasıdır. Hücre süspansiyon kültürlerine 50 mM metil- β -siklodekstrinin eklendiğinde yaş ağırlık %9,31, kuru ağırlık %40,42 oranında artarken hücre üremesi %6,44 ve hücre canlılığı %6,54 oranında azalmıştır. Koronatin, fenilalanin ve koronatin + fenilalanin uygulamaları ise kültürlerin üreme özelliklerini (yaş ağırlık, kuru ağırlık, hücre üremesi) ve hücre canlılığını negatif etkilemiştir. Bununla birlikte metil- β -siklodekstrin, diğer elisitörlerle birlikte uygulandığında (koronatin + metil- β -siklodekstrin, fenilalanin + metil- β -siklodekstrin ve koronatin + fenilalanin + metil- β -siklodekstrin) elisitörlerin hücre süspansiyon kültürlerinin biyokütle birikimine ve hücre canlılığına verdikleri zararı nispeten azalttığı görülmüştür. Nitekim, Bemani ve diğ., (2013) tarafından *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde yapılan bir çalışmada fenilalanin ilavesinin hücrelerin kuru ağırlığını %30 oranında azalttığını belirtmiştir. Koronatin elisitörü ise hücre canlılığını %70, kuru ağırlığını %50 oranında azaltmıştır (Gallego ve diğ., 2015). Elisitörler hücre süspansiyon kültürlerinde biyokütle birikimi ve hücre canlılığını negatif etkilediğinden bu toksik etkiyi azaltacak stratejiler geliştirilmiştir. Farhadi ve diğ. (2020), *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerine metil- β -siklodekstrin ilave ederek fungal elisitörlerin toksik etkisini önemli ölçüde azaltmıştır. *Taxus* hücre süspansiyon kültürlerinde yapılan bir çalışmada da koronatinin negatif etkisinin kalik[8]saren tarafından kısıtlandığı gösterilmiştir (Escrich ve diğ., 2021).

Elisitasyon uygulamalarının temel amacı, hücre süspansiyon kültürlerindeki taksanların biosentezinin artırılmasıdır. Bu çalışmada, elisitasyon uygulanmamış kontrol hücre süspansiyon kültürlerinde hücre içinde 10-deasetil bakkatin III 0,878 $\mu\text{g/mL}$, bakkatin III 36,424 $\mu\text{g/mL}$, sefalomannin 0,519 $\mu\text{g/mL}$, paklitaksel 16,812 $\mu\text{g/mL}$ üretilmiştir. Kontrol kültürlerinde taksanların arasında en fazla bakkatin III'ün bulunması, semisentez ile üretimine en uygun olan metabolit olduğunu göstermiştir. Ayrıca kontrol kültürlerinde paklitaksel öncülleri olan 10-deasetil bakkatin III ve bakkatin III'ün miktarı, sefalomannin ve türevlerine göre çarpıcı bir şekilde yüksektir. Bu durum, süspansiyon kültürlerindeki hücrelerin son ürün oluşturmada metabolik olarak inaktif olduğunu göstermiştir. Ancak taksan metabolik yolağının uyarılması halinde özellikle öncül bakkatin III'ün paklitaksel ve sefalomannin gibi son ürünlerin sentezlenmesinde kullanılabileceğini göstermiştir. Bunu destekler biçimde, hücre süspansiyon kültürlerine 1 μM koronatin eklendiğinde hücre içinde üretilen 10-deasetil bakkatin III (0,648 $\mu\text{g/mL}$) ve bakkatin III (3,126 $\mu\text{g/mL}$) miktarı azalırken, sefalomannin (1,747 $\mu\text{g/mL}$) ve paklitaksel (32,00 $\mu\text{g/mL}$) kontrole göre sırasıyla 3,36 ve 1,90 kat artmıştır.

Benzer şekilde koronatin + fenilalanin ile uyarılmış kültürlerde 10-deasetil bakkatin III (0,857 $\mu\text{g/mL}$), bakkatin III (5,595 $\mu\text{g/mL}$) miktarı azalırken, paklitaksel (17,34 $\mu\text{g/mL}$) miktarı artmıştır. Koronatin + metil- β -siklodekstrin, fenilalanin + metil- β -siklodekstrin ve koronatin + fenilalanin + metil- β -siklodekstrin uygulamalarında ise hücre içinde sefalomannin ve paklitaksel tespit edilememiştir. Bu sonuçlar, metil- β -siklodekstrinin taksanları hücre dışı kültür ortamına salgıladığını göstermektedir. Ayrıca biyokütle birikimi ve hücre canlılığı ölçümleri ile birlikte değerlendirildiğinde, metil- β -siklodekstrinin hücre içi toksisiteyi azalttığı ve elisitörlerin biyokütleye zarar vermesini engellediği gösterilmiştir.

Koronatin + fenilalanin, koronatin + metil- β -siklodekstrin ve fenilalanin + metil- β -siklodekstrin uygulanmış hücre süspansiyon kültürlerinde hücre dışı kültür ortamında bulunan total taksan konsantrasyonlarının oranları sırasıyla %25,15, %36,48, %41,85 iken, bu oran kontrol hücre süspansiyon kültürlerinde ise ancak %2,227 olarak bulunmuştur. Koronatin + fenilalanin ve koronatin + metil- β -siklodekstrin birlikte uygulanmış hücre süspansiyon kültürleri, kontrole (1,245 $\mu\text{g/mL}$) göre taksanları sırasıyla 6,53 (8,13 $\mu\text{g/mL}$) ve 8,85 kat (11,022 $\mu\text{g/mL}$) daha fazla hücre dışı kültür ortamına salgılamıştır. Hücre dışı kültür ortamına taksanların yüksek oranda salgılanmasının nedeni, 50 mM metil- β -siklodekstrinin varlığıdır. Metil- β -siklodekstrin özellikle paklitaksel ve sefalomannin gibi taksanları yakalayarak inklüzyon kompleksi oluşturmaktadır (Cai ve diğ., 2012) Bitki hücre duvarı, genellikle metil- β -siklodekstrinin hücre içine geçmesi için oldukça kalın olmasına rağmen aktif bir şekilde büyüyen hücre süspansiyon kültürlerinde, primer hücre duvarının çok ince olması sebebiyle, metil- β -siklodekstrin hücre membranına ulaşabilmektedir (Chambat ve diğ., 1984). Şu ana kadar metil- β -siklodekstrinin bitki hücre membranından geçişini açıklayan bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak hayvan hücrelerinde gerçekleştirilen birçok çalışmada metil- β -siklodekstrinin paklitakseli de taşıyarak, hayvan hücrelerine girdiği gösterilmiştir (Haimhoffer ve diğ., 2019; Rusznyák ve diğ., 2022). Bunların yanı sıra koronatin ve metil- β -siklodekstrinin ikili uygulandığı *Taxus* hücre kültürlerinde üretici hücrelerden taksanların salgılanmasında metil- β -siklodekstrin varlığının taksanların biyosentezini ve salgılanmasını artırdığı gösterilmiştir (Perez-Matas ve diğ., 2022). 1 μM koronatin ve 50 mM metil- β -siklodekstrin birlikte uygulanmış *Corylus avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde yaş ağırlık, hücre sayısı ve hücre canlılığını içeren parametreler değerlendirildiğinde, biyokütle birikimi üzerindeki koronatin elisitörünün zararlı etkisi, metil- β -siklodekstrin uygulaması sayesinde azaltılmıştır. (Şekil 4.3-4.10). Biyokütle birikimi üzerindeki metil- β -siklodekstrinin olumlu etkisi, hücre

dışına paklitaksel ve sefalomannin yüksek miktarda salgılanması ile birlikte değerlendirildiğinde 50 mM metil- β -siklodekstrin uygulamasının *Corylus avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde salgılama için etkili bir strateji olduğu görülmüştür. Bununla birlikte koronatin + fenilalanin, uygulaması her ne kadar taksanların hücre dışına salgılanmasını ve paklitaksel üretimini artırsa da kültürlerin biyokütle birikimine ve hücre canlılığına zarar vermektedir. Fenilalanin + metil- β -siklodekstrin uygulamasının ise biyokütle birikimini ve hücre canlılığını artırmasına rağmen taksanların biyosentezinin artırılmasında yeterince efektif olmadığı gözlenmiştir.

Üretici hücrelerin sekonder metabolitleri hücre dışına salgılama kapasitesi bitki türleri, kültür koşulları ve hücre hatları arasında çeşitlilik göstermektedir. Örneğin *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde kültür ortamına fungal elisitörlerle birlikte 50 mM metil- β -siklodekstrin eklenmesi, üretilen paklitakselin %78,6'sının hücre dışı ortama salgılanmasını uyarmıştır ve kontrole göre paklitaksel üretimini yaklaşık 6 kat artırmıştır (Farhadi ve diğ., 2020). Bitki hücre kültürlerinde metil- β -siklodekstrin, gerçek bir elisitör olarak işlev görmemesine rağmen metil- β -siklodekstrinin biyoaktif bileşikleri hapsetme yeteneği, özellikle paklitaksel ve sefalomannin gibi taksanların biyosentezinin uyarılmasını sağlamaktadır (Sabater-Jara ve diğ., 2014; Ramirez-Estrada ve diğ., 2015). *T. baccata* hücre süspansiyon kültürlerinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. *T. baccata* hücre süspansiyon kültürlerinde elisitör uygulanmamış koşullarda taksanların %90'dan fazlası hücre içinde tespit edilmiştir. *T. baccata* hücre süspansiyon kültürlerine metil- β -siklodekstrin ve koronatin birlikte uygulandığında taksanların kültür ortamına yüksek oranda (yaklaşık %80) salgılanması indüklenmiştir (Perez-Matas ve diğ., 2022). Üretici hücrelerin taksanları hücre dışına salgılama oranındaki farklılıklar olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Sonuç olarak, kültür ortamına taksanların taşınması, etkili bir stretejidir. Üstelik, metil- β -siklodekstrin hücrede biriken taksanların zararlı etkilerini engellemektedir ve hücre dışına salgılanan paklitaksel miktarını artırmaktadır. Ayrıca özellikle paklitaksel ve sefalomannin gibi son ürünlerin hücre dışına salgılanması, ekstraksiyon ve analiz gibi süreçleri daha az zaman alıcı yapmakta ve kolaylaştırmaktadır.

Bir başka öne çıkan konu, hücre dışına salgılanan taksan metabolitlerinin tipidir. Şekil 4.13'te görüldüğü gibi paklitaksel ve paklitakselin doğal türevi sefalomannin, elisitasyondan 14 gün sonra hücre dışına salgılanan taksanların büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır. Benzer şekilde,

paklitaksele göre düşük sitotoksositeye sahip 10-deasetil bakkatin III ve bakkatin III gibi paklitaksel öncüllerinden farklı olarak daha yüksek sitotoksositeye sahip paklitaksel ve sefalomannin, *Taxus* türlerinde de üretici hücrelerden kültür ortamına daha fazla salgılanmıştır (Escrich ve diğ., 2021; Perez-Matas ve diğ., 2022). İlginç bir şekilde, *Taxus* hücre süspansiyon kültürlerinde paklitaksel için spesifik bir taşıma mekanizmasının varlığı gösterilmiştir (Naill ve diğ., 2012). Bu çalışmanın sonuçlarına göre *Corylus avellana*'da da paklitaksel için benzer bir taşıma proteininin bulunduğu düşünülmektedir. Buna rağmen taksanların hücre dışına taşınmasında metil- β -siklodekstrin ve taşıma proteininden başka özgün bir salgılama faktörü daha vardır: Yağ damlacıkları. Yağ damlacıkları, ökaryotik hücrelerde yaygın olarak bulunan önemli bir organeldir. Yağ damlacıkları, paklitaksel ve paklitaksel türevlerinin biyosentezinde ve hücrede taşınmasında rol oynamaktadır (Hanano ve diğ., 2022). Bu nedenle, *Corylus avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde taksanların birikimi ve salgılanmasında mekanizmaların aydınlatılmasında ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Fenilalanin uygulaması ise tek başına ve diğer elisitörler ile birlikte uygulandığında ise taksanların üretimi ve salgılanması bakımından önemli bir artış sağlamamıştır. Fenilalanin gibi öncüllerin kullanılmasında yeni stratejilere ihtiyaç vardır. Nitekim Syklowka-Baranek ve diğ., (2022) yaptığı bir çalışmada paklitaksel biyosentezini artırmak için yeni bir strateji geliştirmiştir. Syklowka-Baranek, fenilalanin gibi bir amino asit olan β -aminobütirik asidi elisitasyon gününden 1 hafta önce kültürlerle eklemiştir. Elisitasyon günü ise β -aminobütirik asidin inkübe edildiği kültürlerle metil-jasmonat elisitörünü ekleyerek paklitaksel biyosentezini artırmayı başarmıştır (Sykłowska-Baranek ve diğ., 2022). Buna göre hücre kültürlerinde taksan üretiminin farklılık göstermesi birçok faktöre bağlıdır. Bu faktörler arasında genetik varyasyon, hücre hattı, kültür koşulları, ve öncül ekleme süresi ve zamanı gösterilmektedir. Bu nedenle, *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde taksanların biyosentezinin ve salgılanmasının artırılması ve hücresel mekanizmaların daha iyi anlaşılması için ek ve ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak nano-taşıyıcı metil- β -siklodekstrinin hücre süspansiyon kültürlerine eklenmesi, üretici hücrelerden hücre dışı kültür ortamına paklitaksel ve sefalomanninin salgılanmasının uyarılması için etkili bir strateji olduğu gösterilmiştir. Koronatin + metil- β -siklodekstrin uygulaması, biyokütle birikimine daha az zarar veren ve biyolojik olarak sürdürülebilir sistemdir. Bu kültürlerde, özellikle paklitaksel ve sefalomanninin gibi taksanların hücre dışı

kültür ortamına daha fazla salgılanması, bu değerli anti-kanser bileşiklerin ekstrakte edilmesi ve saflaştırılması için gerekli olan süreçleri daha basit ve daha az zaman alıcı yapmıştır. Bu çalışmanın sonucunda, *C. avellana* cv. Kalınkara hücre süspansiyon kültürlerinde biyokütle birikimi ve taksan salgılanması üzerindeki koronatin ve metil- β -siklodekstrinin ikili uygulamasının sinerjistik etkisi ilk kez gösterilmiştir. Bununla birlikte *C. avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde taksanların biyosentezini daha fazla artırmak için kültür optimizasyon çalışmalarının yanı sıra gen anlatım analizleri ile paklitaksel metabolik yolağındaki hız sınırlayıcı enzimler belirlenmelidir. Bu çalışma, bitki hücre süspansiyon kültürlerinde biyokütle üretimine zarar vermeden sekonder metabolitlerin üretiminin artırılması için yapılacak araştırmalara katkı sağlayacaktır. Ayrıca paklitakselin *C. avellana*'da endüstriyel ölçekte sürdürülebilir üretimi için bir prototip sunmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abdallah, I. I., Pramastya, H., Van Merkerk, R., Sukrasno, & Quax, W. J. 2019, Metabolic engineering of bacillus subtilis toward taxadiene biosynthesis as the first committed step for taxol production, *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00218>
- Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KE, Wang Y, Simeon F, Leonard E, Mucha O, Phon TH, Pfeifer B, Stephanopoulos G. Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in Escherichia coli. *Science*. 2010 Oct 1;330(6000):70-4. doi: 10.1126/science.1191652. PMID: 20929806; PMCID: PMC3034138.
- Alfieri, M., Ambrosone, A., Vaccaro, M., De Tommasi, N., & Leone, A. 2022, Overcoming Metabolic Constraints in the MEP-Pathway Enrich Salvia sclarea Hairy Roots in Therapeutic Abietane Diterpenes, *Applied Sciences (Switzerland)*, 12(14). <https://doi.org/10.3390/app12147116>
- Allegrini, A., Salvaneschi, P., Schirone, B., Cianfaglione, K., & Michele, A. Di. 2022, Multipurpose plant species and circular economy: Corylus avellana L. as a study case, *Frontiers in Bioscience - Landmark*, 27(1), 1–20. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2701011>
- Almagro, L., De Gea-Abellán, A., Rodríguez-López, M. I., Núñez-Delicado, E., Gabaldón, J. A., & Pedreño, M. A. 2020, A smart strategy to improve t-resveratrol production in grapevine cells treated with cyclodextrin polymers coated with magnetic nanoparticles, *Polymers*, 12(4), 1–14. <https://doi.org/10.3390/POLYM12040991>
- Almagro, L., & Pedreño, M. Á. 2020, Use of cyclodextrins to improve the production of plant bioactive compounds, In *Phytochemistry Reviews* (Vol. 19, Issue 4, pp. 1061–1080). <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09704-6>
- Andi, S. A., Gholami, M., Ford, C. M., & Maskani, F. 2019, The effect of light, phenylalanine and methyl jasmonate, alone or in combination, on growth and secondary metabolism in cell suspension cultures of Vitis vinifera, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 199, 111625. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111625>
- Arano-Varela, H., Cruz-Sosa, F., Estrada-Zúñiga, M. E., & Fernández, F. J. 2020, Effects of phenylalanine and methyl jasmonate on verbascoside production in Buddleja cordata Kunth cell suspension cultures, In *South African Journal of Botany* (Vol. 135, pp. 41–49). <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.08.005>
- Baek, J. S., Choo, C. C., Tan, N. S., & Loo, S. C. J. 2017, Sustained-releasing hollow microparticles with dual-anticancer drugs elicit greater shrinkage of tumor spheroids, *Oncotarget*, 8(46), 80841–80852. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20591>
- Baloglu, E., & Kingston, D. G. I. 1999, A new semisynthesis of paclitaxel from Baccatin III, *Journal of Natural Products*, 62(7), 1068–1071. <https://doi.org/10.1021/np990040k>
- Bemani, E., Ghanati, F., Rezaei, A., & Jamshidi, M. 2013, Effect of phenylalanine on Taxol production and antioxidant activity of extracts of suspension-cultured hazel (Corylus

- avellana L.) cells, *Journal of Natural Medicines*, 67(3), 446–451. <https://doi.org/10.1007/s11418-012-0696-1>
- Bender, C. L., Alarcón-Chaidez, F., & Gross, D. C. 1999, *Pseudomonas syringae* Phytotoxins: Mode of Action, Regulation, and Biosynthesis by Peptide and Polyketide Synthetases, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2), 266–292. <https://doi.org/10.1128/mubr.63.2.266-292.1999>
- Bestoso, F., Ottaggio, L., Armirotti, A., Balbi, A., Damonte, G., Degan, P., Mazzei, M., Cavalli, F., Ledda, B., & Miele, M. 2006, In vitro cell cultures obtained from different explants of *Corylus avellana* produce Taxol and taxanes, *BMC Biotechnology*, 6, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-6-45>
- Beum, J. K., Gibson, D. M., & Shuler, M. L. 2005, Relationship of viability and apoptosis to taxol production in *Taxus* sp. suspension cultures elicited with methyl jasmonate, *Biotechnology Progress*, 21(3), 700–707. <https://doi.org/10.1021/bp050016z>
- Bottone, A., Cerulli, A., Durso, G., Masullo, M., Montoro, P., Napolitano, A., & Piacente, S. 2019, Plant Specialized Metabolites in Hazelnut (*Corylus avellana*) Kernel and Byproducts: An Update on Chemistry, Biological Activity, and Analytical Aspects, *Planta Medica*, 85(11–12), 840–855. <https://doi.org/10.1055/a-0947-5725>
- Bouzroud S, El Maaiden E, Sobeh M, Merghoub N, Boukcim H, Kouisni L, El Kharrassi Y. 2023, Biotechnological Approaches to Producing Natural Antioxidants: Anti-Ageing and Skin Longevity Prospects, *International Journal of Molecular Science*. Jan 11;24(2):1397. doi: 10.3390/ijms24021397. PMID: 36674916; PMCID: PMC9867058.
- Bru, R., Sellés, S., Casado-Vela, J., Belchí-Navarro, S., & Pedreño, M. A. 2006, Modified cyclodextrins are chemically defined glucan inducers of defense responses in grapevine cell cultures, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(1), 66–71. <https://doi.org/10.1021/jf051485j>
- Cai Z, Kastell A, Knorr D, Smetanska I. Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures. *Plant Cell Reports*. 2012 Mar;31(3):461-77. doi: 10.1007/s00299-011-1165-0. Epub 2011 Oct 11. PMID: 21987121.
- Cao, X., Xu, L., Wang, J., Dong, M., Xu, C., Kai, G., Wan, W., & Jiang, J. 2022, Endophytic fungus *Pseudodidymocyrtis lobariellae* KL27 promotes taxol biosynthesis and accumulation in *Taxus chinensis*, *BMC Plant Biology*, 22(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03396-6>
- Cardillo, A. B., Perassolo, M., Giulietti, A. M., & Rodriguez Talou, J. 2021, Cyclodextrins: a tool in plant cell and organ culture bioprocesses for the production of secondary metabolites, In *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (Vol. 146, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02045-y>
- Chambat G, Barnoud F, Joseleau JP. Structure of the Primary Cell Walls of Suspension-Cultured *Rosa glauca* Cells: I. Polysaccharides Associated with Cellulose. *Plant Physiology*. 1984 Mar;74(3):687-93. doi: 10.1104/pp.74.3.687. PMID: 16663482;

PMCID: PMC1066747.

- Chandran, H., Meena, M., Barupal, T., & Sharma, K. 2020, Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds, *Biotechnology Reports*, 26, e00450. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00450>
- Changxing, L., Galani, S., Hassan, F. ul, Rashid, Z., Naveed, M., Fang, D., Ashraf, A., Qi, W., Arif, A., Saeed, M., Chishti, A. A., & Jianhua, L. 2020. Biotechnological approaches to the production of plant-derived promising anticancer agents: An update and overview. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 132(September), 110918. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110918>
- Charoenwongpaiboon, T., Oo, A., Nasoontorn, S., Rungrotmongkol, T., Kanokmedhakul, S., & Mahalapbutr, P. 2022, Aurisin A Complexed with 2,6-Di-O-methyl- β -cyclodextrin Enhances Aqueous Solubility, Thermal Stability, and Antiproliferative Activity against Lung Cancer Cells, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17). <https://doi.org/10.3390/ijms23179776>
- Chattopadhyay, S., Farkya, S., Srivastava, A. K., & Bisaria, V. S. 2002, Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 7(3), 138–149. <https://doi.org/10.1007/BF02932911>
- Commault, A. S., Kuzhiumparambil, U., Herdean, A., Fabris, M., Jaramillo-Madrid, A. C., Abbriano, R. M., Ralph, P. J., & Pernice, M. 2021, Methyl jasmonate and methyl- β -cyclodextrin individually boost triterpenoid biosynthesis in *chlamydomonas reinhardtii* uvm4, In *Pharmaceuticals* (Vol. 14, Issue 2, pp. 1–12). <https://doi.org/10.3390/ph14020125>
- Cragg, G. M., Schepartz, S. A., Suffness, M., & Grever, M. R. 1993, The taxol supply crisis. New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents, *Journal of Natural Products*, 56(10), 1657–1668. <https://doi.org/10.1021/np50100a001>
- Croteau, R., Ketchum, R. E. B., Long, R. M., Kaspera, R., & Wildung, M. R. 2006, Taxol biosynthesis and molecular genetics, *Phytochemistry Reviews*, 5(1), 75–97. <https://doi.org/10.1007/s11101-005-3748-2>
- Cusido, R. M., Onrubia, M., Sabater-Jara, A. B., Moyano, E., Bonfill, M., Goossens, A., Angeles Pedreño, M., & Palazon, J. 2014, A rational approach to improving the biotechnological production of taxanes in plant cell cultures of *Taxus* spp., *Biotechnology Advances*, 32(6), 1157–1167. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.03.002>
- Dobrzyńska-Mizera, M., Knitter, M., Piss, M., Del Barone, C., Mallardo, S., Santagata, G., & Di Lorenzo, M. L. 2023, Thermal and Morphological Analysis of Linear Low-Density Polyethylene Composites Containing d-limonene/ β -cyclodextrin for Active Food Packaging, *Molecules*, 28(3). <https://doi.org/10.3390/molecules28031220>
- Dogra, A., & Kumar, J. 2023, Biosynthesis of anticancer phytochemical compounds and their chemistry, *Frontiers in Pharmacology*, 14(March), 1–23.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1136779>

- Dranitsaris, G., Yu, B., Wang, L., Sun, W., Zhou, Y., King, J., Kaura, S., Zhang, A., & Yuan, P. 2016, Abraxane® versus Taxol® for patients with advanced breast cancer: A prospective time and motion analysis from a Chinese health care perspective, *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 22(2), 205–211. <https://doi.org/10.1177/1078155214556008>
- El-sayed, A. S. A., Mohamed, N. Z., Safan, S., Yassin, M. A., & Shaban, L. 2019, Restoring the Taxol biosynthetic machinery of *Aspergillus terreus* by *Podocarpus gracilior* Pilger microbiome, with retrieving the ribosome biogenesis proteins of WD40 superfamily, *Scientific Reports*, November 2018, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47816-y>
- Escrich, A., Almagro, L., Moyano, E., Cusido, R. M., Bonfill, M., Hosseini, B., & Palazon, J. 2021, Improved biotechnological production of paclitaxel in *Taxus media* cell cultures by the combined action of coronatine and calix[8]arenes, In *Plant Physiology and Biochemistry* (Vol. 163, pp. 68–75). <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.03.047>
- Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., & García-Lara, S. 2018, In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds, *Planta*, 248(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>
- Expósito, O., Bonfill, M., Onrubia, M., Jané, A., Moyano, E., Cusidó, R. M., Palazón, J., & Piñol, M. T. 2009, Effect of taxol feeding on taxol and related taxane production in *Taxus baccata* suspension cultures, *New Biotechnology*, 25(4), 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2008.11.001>
- Exposito, O., Syklovska-Baranek, K., Moyano, E., Onrubia, M., Bonfill, M., Palazon, J., & Cusido, R. M. 2010, Metabolic responses of *Taxus media* transformed cell cultures to the addition of methyl jasmonate, *Biotechnology Progress*, 26(4), 1145–1153. <https://doi.org/10.1002/btpr.424>
- Farhadi, S., Moieni, A., Safaie, N., Sabet, M. S., & Salehi, M. 2021, Fungal Cell Wall and Methyl-β-Cyclodextrin Synergistically Enhance Paclitaxel Biosynthesis and Secretion in *Corylus avellana* Cell Suspension Culture, In *Scientific Reports* (Vol. 10, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62196-4>
- Fattahi, F., Shojaeiyan, A., Palazon, J., Moyano, E., & Torras-Claveria, L. 2021, Methyl-β-cyclodextrin and coronatine as new elicitors of tropane alkaloid biosynthesis in *Atropa acuminata* and *Atropa belladonna* hairy root cultures, In *Physiologia Plantarum* (Vol. 172, Issue 4). <https://doi.org/10.1111/ppl.13444>
- Fazili, M. A., Bashir, I., Ahmad, M., Yaqoob, U., & Geelani, S. N. 2022, In vitro strategies for the enhancement of secondary metabolite production in plants: a review, *Bulletin of the National Research Centre*. <https://doi.org/10.1186/s42269-022-00717-z>
- Fett-Neto, A.G., DiCosmo, F., R., W.F., & Sakata, K. 1992, Cell culture of *Taxus* as a source of the antineoplastic drug taxol and related taxane, *Nature Biotechnology*, 10, 667–674.
- Gallego-Jara, J., Lozano-Terol, G., Sola-Martínez, R. A., Cánovas-Díaz, M., & de Diego

- Puente, T. 2020, A Compressive Review about Taxol®: History and Future Challenges, *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(24), 1–24. <https://doi.org/10.3390/molecules25245986>
- Gallego, A., Imseng, N., Bonfill, M., Cusido, R. M., Palazon, J., Eibl, R., & Moyano, E. 2015a, Development of a hazel cell culture-based paclitaxel and baccatin III production process on a benchtop scale. *Journal of Biotechnology*, 195, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.12.023>
- Gallego, A., Bonfill, M., Cusido, R. M., Pastor, M., Palazon, J., & Moyano, E. 2015b, Assessing factors that affect the growth of *Corylus avellana* cell suspension cultures: a statistical approach, *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 51(5), 530–538. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9693-x>
- Gallego, A., Malik, S., Yousefzadi, M., Makhzoum, A., Tremouillaux-Guiller, J., & Bonfill, M. 2017, Taxol from *Corylus avellana*: paving the way for a new source of this anti-cancer drug, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 129(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1164-5>
- Ganguly, A., Yang, H., & Cabral, F. 2010, Paclitaxel-dependent cell lines reveal a novel drug activity, *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(11), 2914–2923. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0552>
- Gantait, S., & Mukherjee, E. 2021, Hairy root culture technology: applications, constraints and prospect, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(1), 35–53. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-11017-9>
- Gelderblom, H., J, V., K, N., A., S., & 11527683., E. J. C. 2001, Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation, *European Journal of Cancer*, 37, 1590–1598, doi: 10. 1016/s095.-8049(01)00171-x. P.
- Geng, X., Jin, L., Shimada, M., Kim, M. G., & Mackey, D. 2014, The phytotoxin coronatine is a multifunctional component of the virulence armament of *Pseudomonas syringae*, *Planta*, 240(6), 1149–1165. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2151-x>
- Göktepe, İ. 2020, ANTİKANSER TAKSANLARIN FINDIK (*Corylus avellana*) HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE BİYOTEKNOLOJİK ÜRETİMİ, *Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- Greulich, F., Yoshihara, T., & Ichihara, A. 1995, Coronatine, a Bacterial Phytotoxin, acts as a Stereospecific Analog of Jasmonate Type Signals in Tomato Cells and Potato Tissues, *Journal of Plant Physiology*, 147(3–4), 359–366. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)82168-1](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)82168-1)
- Guru, A., Dwivedi, P., Kaur, P., & Pandey, D. K. 2022, Exploring the role of elicitors in enhancing medicinal values of plants under in vitro condition, *South African Journal of Botany*, 149, 1029–1043. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.10.014>
- Haimhoffer, Á. ., Ruzsnyák, Á. ., Réti-Nagy, K. ., & Vasvári, G.; Váradi, J.; Vecsernyés, M.; Bácskay, I.; Fehér, P.; Ujhelyi, Z.; Fenyvesi, F. 2019, Cyclodextrins in Drug Delivery

- Systems and Their Effects on Biological Barriers, *Scientia Pharmaceutica*, 87(33).
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/scipharm87040033>
- Halder, M., Roychowdhury, D., & Jha, S. 2018, A critical review on biotechnological interventions for production and yield enhancement of secondary metabolites in hairy root cultures, *Hairy Roots: An Effective Tool of Plant Biotechnology*, 21–44.
https://doi.org/10.1007/978-981-13-2562-5_2
- Halder, M., Sarkar, S., & Jha, S. 2019, Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures, *Engineering in Life Sciences*, 19(12), 880–895. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900058>
- Hanano, A., Perez-Matas, E., Shaban, M., Cusido, R. M., & Murphy, D. J. 2022a, Characterization of lipid droplets from a *Taxus media* cell suspension and their potential involvement in trafficking and secretion of paclitaxel, In *Plant Cell Reports*.
<https://doi.org/10.1007/s00299-021-02823-0>
- Harshita, Barkat, M. A., Beg, S., Pottoo, F. H., & Ahmad, F. J. 2019, Nanopaclitaxel therapy: An evidence based review on the battle for next-generation formulation challenges, *Nanomedicine*, 14(10), 1323–1341. <https://doi.org/10.2217/nmm-2018-0313>
- Hoffman, A., Khan, W., Worapong, J., Strobel, G., Griffin, D., Arbogast, B., Barofsky, D., Ning, L., Zheng, P., & Daley, L. 1998, Bioprospecting for Taxol in Angiosperm Plant Extracts, *Spectroscopy*, 13(6), 22–32.
- Holstein, N., el Tamer, S. E., & Weigend, M. 2018, The nutty world of hazel names -A critical taxonomic checklist of the genus *Corylus* (Betulaceae), In *European Journal of Taxonomy* (Vol. 2018, Issue 409). <https://doi.org/10.5852/ejt.2018.409>
- Holton, R. A., Kim, H. B., Somoza, C., Liang, F., Biediger, R. J., Boatman, P. D., Shindo, M., Smith, C. C., Kim, S., Nadizadeh, H., Suzuki, Y., Tao, C., Vu, P., Tang, S., Zhang, P., Murthi, K. K., Gentile, L. N., & Liu, J. H. 1994, First total synthesis of taxol. 2. Completion of the C and D rings, *Journal of the American Chemical Society*, 116(4), 1599–1600. <https://doi.org/10.1021/ja00083a067>
- Hou, M., Wang, R., Zhao, S., & Wang, Z. 2021, Ginsenosides in *Panax* genus and their biosynthesis, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11(7), 1813–1834.
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.12.017>
- Howat, S., Park, B., Oh, I. S., Jin, Y. W., Lee, E. K., & Loake, G. J. 2014, Paclitaxel: Biosynthesis, production and future prospects, *New Biotechnology*, 31(3), 242–245.
<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.02.010>
- Hu, F., J. H., Y. X., X. Q., & JJ., Z. 2006, Responses of defense signals, biosynthetic gene transcription and taxoid biosynthesis to elicitation by a novel synthetic jasmonate in cell cultures of *Taxus chinensis*, *Biotechnology and Bioengineering*, 94(6):1064.
<https://doi.org/10.1002/bit>
- Hurtado-Gaitán, E., Sellés-Marchart, S., Hartwell, J., Martínez-Esteso, M. J., & Bru-Martínez, R. 2021, Down-regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase kinase in grapevine cell

- cultures and leaves is linked to enhanced resveratrol biosynthesis, In *Biomolecules* (Vol. 11, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/biom11111641>
- Hussain, M. S., Fareed, S., Ansari, S., Rahman, M. A., Ahmad, I. Z., & Saeed, M. 2012, Current approaches toward production of secondary plant metabolites, *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 4(1), 10–20. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.92725>
- Jeyasri, R., Muthuramalingam, P., Karthick, K., Shin, H., Choi, S. H., & Ramesh, M. 2023, Methyl jasmonate and salicylic acid as powerful elicitors for enhancing the production of secondary metabolites in medicinal plants: an updated review, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02485-8>
- Kashani, K., Jalali Javaran, M., Sabet, M. S., & Moieni, A. 2018, Identification of rate-limiting enzymes involved in paclitaxel biosynthesis pathway affected by coronatine and methyl- β -cyclodextrin in *Taxus baccata* L. cell suspension cultures, *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26(2), 129–142. <https://doi.org/10.1007/s40199-018-0217-1>
- Kashani, K., Sabet, M. S., Jalali Javaran, M., & Moieni, A. 2022, Bottleneck removal of paclitaxel biosynthetic pathway by overexpression of DBTNBT gene under methyl- β -cyclodextrin and coronatine elicitation in *Taxus baccata* L., In *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (Vol. 149, Issues 1–2, pp. 485–495). <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02279-4>
- Kaspera, R., R., C., PMC2901147., PMID:, P. R. 2006 J.-3):433-444., & 20622990. 2010, *Cytochrome P450 oxygenases of Taxol biosynthesis*, *Phytochemistry Reviews* 5(1), 1–23. <https://doi.org/Cytochrome P450 oxygenases of Taxol biosynthesis>.
- Khan, T., Khan, M. A., Karam, K., Ullah, N., Mashwani, Z. U. R., & Nadhman, A. 2021, Plant in vitro Culture Technologies; A Promise Into Factories of Secondary Metabolites Against COVID-19, *Frontiers in Plant Science*, 12(March). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.610194>
- Khojasteh, A., Mirjalili, M. H., Alcalde, M. A., Cusido, R. M., Eibl, R., & Palazon, J. 2020, Powerful plant antioxidants: A new biosustainable approach to the production of rosmarinic acid, *Antioxidants*, 9(12), 1–31. <https://doi.org/10.3390/antiox9121273>
- Kumar, P., Singh, B., Thakur, V., Thakur, A., Thakur, N., Pandey, D., & Chand, D. 2019, Hyper-production of taxol from *Aspergillus fumigatus*, an endophytic fungus isolated from *Taxus* sp. of the Northern Himalayan region, *Biotechnology Reports*, 24, e00395. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00395>
- Kutlutürk, G. Z. 2019, TÜRKİYE’DE YETİŞEN FINDIK (*Corylus avellana* L.) ÇEŞİTLERİNDE ANTİKANSER TAKSANLARIN ANALİZİ, *Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- Lange, B. M. 2017, Commercial-scale tissue culture for the production of plant natural products: Successes, failures and outlook, *Biotechnology of Natural Products*, 189–218. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67903-7_8
- Lijavetzky, D., Almagro, L., Belchi-Navarro, S., Martínez-Zapater, J. M., Bru, R., & Pedrão,

- M. A. 2008, Synergistic effect of methyljasmonate and cyclodextrin on stilbene biosynthesis pathway gene expression and resveratrol production in Monastrell grapevine cell cultures, *BMC Research Notes*, 1, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-1-132>
- Liu, W. C., Gong, T., & Zhu, P. 2016, Advances in exploring alternative Taxol sources, *Royal Society of Chemistry Advances*, 6(54), 48800–48809. <https://doi.org/10.1039/c6ra06640b>
- Lozano-Sánchez, J., Borrás-Linares, I., Sass-Kiss, A., & Segura-Carretero, A. 2018, Chromatographic Technique: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), In *Modern Techniques for Food Authentication*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814264-6.00013-x>
- Lyseng-Williamson KA, F. C. D. 2005, Docetaxel: a review of its use in metastatic breast cancer, *Drugs*, <https://doi.org/10.2165/11209660-000000000-00000>
- Malik, S., Cusidó, R. M., Mirjalili, M. H., Moyano, E., Palazón, J., & Bonfill, M. 2011, Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: A review, *Process Biochemistry*, 46(1), 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.09.004>
- McElroy, C., & Jennewein, S. 2017, Taxol® biosynthesis and production: From forests to fermenters, In *Biotechnology of Natural Products*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67903-7_7
- Miele, M., Mumot, A. M., Zappa, A., Romano, P., & Ottaggio, L. 2012, Hazel and other sources of paclitaxel and related compounds, *Phytochemistry Reviews*, 11(2–3), 211–225. <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9234-8>
- Mohaddab, M., Goumi, Y. El, Gallo, M., Montesano, D., Zengin, G., Bouyahya, A., & Fakiri, M. 2022, Biotechnology and In Vitro Culture as an Alternative System for Secondary Metabolite Production. 1–20, *Molecules*.
- Mohammadi Ballakuti, N., Ghanati, F., Zare-Maivan, H., Alipour, M., Moghaddam, M., & Abdolmaleki, P. 2022, Taxoid profile in endophytic fungi isolated from *Corylus avellana*, introduces potential source for the production of Taxol in semi-synthetic approaches, In *Scientific Reports* (Vol. 12, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13602-6>
- Mosquera, M. E. G., Jiménez, G., Taberero, V., Vinuesa-Vaca, J., García-Estrada, C., Kosalková, K., Sola-Landa, A., Monje, B., Acosta, C., Alonso, R., & Valera, M. Á. 2021, Terpenes and Terpenoids: Building Blocks to Produce Biopolymers, *Sustainable Chemistry*, 2(3), 467–492. <https://doi.org/10.3390/suschem2030026>
- Murashige, T., & Skoog, F. 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15, 474–497.
- Mustafa, N. R., De Winter, W., Van Iren, F., & Verpoorte, R. 2011, Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures, *Nature Protocols*, 6(6), 715–742. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.144>
- Mutanda, I., Li, J., Xu, F., & Wang, Y. 2021, Recent Advances in Metabolic Engineering, Protein Engineering, and Transcriptome-Guided Insights Toward Synthetic Production of

- Taxol, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9(February), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.632269>
- Naill, M. C., Kolewe, M. E., & Roberts, S. C. 2012, Paclitaxel uptake and transport in *Taxus* cell suspension cultures, *Biochemical Engineering Journal*, 63, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.01.006>
- Narayani, M., & Srivastava, S. 2017, Elicitation: a stimulation of stress in in vitro plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production, *Phytochemistry Reviews*, 16(6), 1227–1252. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9534-0>
- Navia-Osorio, A., Garden, H., Cusidó, R. M., Palazón, J., Alfermann, A. W., & Piñol, M. T. 2002, Production of paclitaxel and baccatin III in a 20-L airlift bioreactor by a cell suspension of *Taxus wallichiana*, *Planta Medica*, 68(4), 336–340. <https://doi.org/10.1055/s-2002-26739>
- Nicolaou, K. C., Yang, Z., Liu, J. J., Ueno, H., Nantermet, P. G., Guy, R. K., Claiborne, C. F., Renaud, J., Couladouros, E. A., Paulvannan, K., & Sorensen, E. J. 1994, Total synthesis of taxol, *Nature*, 367(6464), 630–634. <https://doi.org/10.1038/367630a0>
- Nowrouzi, B., Li, R. A., Walls, L. E., d'Espaux, L., Malcı, K., Liang, L., Jonguitud-Borrego, N., Lerma-Escalera, A. I., Morones-Ramirez, J. R., Keasling, J. D., & Rios-Solis, L. 2020, Enhanced production of taxadiene in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbial Cell Factories*, 19(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01458-2>
- Onrubia, M., Moyano, E., Bonfill, M., Cusidó, R. M., Goossens, A., & Palazón, J. 2013, Coronatine, a more powerful elicitor for inducing taxane biosynthesis in *Taxus media* cell cultures than methyl jasmonate, *Journal of Plant Physiology*, 170(2), 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.09.004>
- Ottaggio, L., Bestoso, F., Armirotti, A., Balbi, A., Damonte, G., Mazzei, M., Sancandi, M., & Miele, M. 2008, Taxanes from shells and leaves of *Corylus avellana*, *Journal of Natural Products*, 71(1), 58–60. <https://doi.org/10.1021/np0704046>
- Perez-Matas, E., Hanano, A., Moyano, E., Bonfill, M., Cusido, R. M., & Palazon, J. 2022, Insights into the control of taxane metabolism: Molecular, cellular, and metabolic changes induced by elicitation in *Taxus baccata* cell suspensions, *Frontiers in Plant Science*, 13(July), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.942433>
- Perez-Matas, E., Hidalgo-Martinez, D., Escrich, A., Alcalde, M. A., Moyano, E., Bonfill, M., & Palazon, J. 2023, Genetic approaches in improving biotechnological production of taxanes: An update, *Frontiers in Plant Science*, 14(January), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1100228>
- Pinho, E., Grootveld, M., Soares, G., & Henriques, M. 2014, Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds, *Carbohydrate Polymers*, 101(1), 121–135. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.078>
- Qiao, W., Tang, T., & Ling, F. 2020, Comparative transcriptome analysis of a taxol - producing endophytic fungus, *Aspergillus aculeatinus* Tax - 6 , and its mutant strain, *Scientific*

Reports, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67614-1>

- Raeispour Shirazi, M., Rahpeyma, S. A., Rashidi Monfared, S., Zolala, J., & Lohrasbi-Nejad, A. 2021, Identification and in-silico characterization of taxadien-5 α -ol-O-acetyltransferase (TDAT) gene in *Corylus avellana* L, *Plos One*, 16(8), e0256704. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256704>
- Rahpeyma, S. A., Moieni, A., & Jalali-Javaran, M. 2017, Enhancement of paclitaxel content in induced tetraploid *Corylus avellana* L. cell suspension culture with regulating the expression of genes in paclitaxel biosynthetic pathway, *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(10), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2531-5>
- Rahpeyma, S. A., Moieni, A., & Jalali Javaran, M. 2015, Paclitaxel production is enhanced in suspension-cultured hazel (*Corylus avellana* L.) cells by using a combination of sugar, precursor, and elicitor, *Engineering in Life Sciences*, 15(2), 234–242. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400115>
- Ramirez-Estrada, K., Osuna, L., Moyano, E., Bonfill, M., Tapia, N., Cusido, R. M., & Palazon, J. 2015, Changes in gene transcription and taxane production in elicited cell cultures of *Taxus* \times *media* and *Taxus globosa*, *Phytochemistry*, 117, 174–184. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.06.013>
- Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R. M., & Palazon, J. 2016, Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories, *Molecules*, 21(2). <https://doi.org/10.3390/molecules21020182>
- Rani, D., & Vimolmangkang, S. 2022, Trends in the biotechnological production of isoflavonoids in plant cell suspension cultures, In *Phytochemistry Reviews*. <https://doi.org/10.1007/s11101-022-09811-6>
- Rezaei, A., Ghanati, F., Behmanesh, M., & Mokhtari-Dizaji, M. 2011, Ultrasound-Potentiated Salicylic Acid-Induced Physiological Effects and Production of Taxol in Hazelnut (*Corylus Avellana* L.) Cell Culture, *Ultrasound in Medicine and Biology*, 37(11), 1938–1947. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2011.06.013>
- Rodney, C., M, T., N, K., Lewis G Natural products. In: Buchanan B, G. J., & nes WR (eds) Biochemistry and molecular biology of plants, pp 1253–348. 2000, *Natural products*. In: *Buchanan B, Gruissem Jones WR (eds) Biochemistry and molecular biology of plants*. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2023-1_33
- Rusznayák, Á., Palicskó, M., Malanga, M., Fenyvesi, É., L., S., & Váradí J, Bácskay I, Vecsernyés M, Réti-Nagy KS, Vasvári G, Haimhoffer Á, F. F. 2022, Cellular Effects of Cyclodextrins: Studies on HeLa Cells, *Molecules*, 28;27(5):1. <https://doi.org/doi:10.3390/molecules27051589>.
- Sabater-Jara, A. B., Onrubia, M., Moyano, E., Bonfill, M., Palazón, J., Pedreño, M. A., & Cusidó, R. M. 2014, Synergistic effect of cyclodextrins and methyl jasmonate on taxane production in *Taxus x media* cell cultures, *Plant Biotechnology Journal*, 12(8), 1075–1084. <https://doi.org/10.1111/pbi.12214>

- Sabzehzari, M., Zeinali, M., & Naghavi, M. R. 2020, Alternative sources and metabolic engineering of Taxol: Advances and future perspectives, *Biotechnology Advances*, 43(December 2019), 107569. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107569>
- Salehi, M., Moieni, A., & Safaie, N. 2017, A Novel Medium for Enhancing Callus Growth of Hazel (*Corylus avellana* L.), *Scientific Reports*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15703-z>
- Salehi, M., Moieni, A., Safaie, N., & Farhadi, S. 2019, Elicitors derived from endophytic fungi *Chaetomium globosum* and *Paraconiothyrium brasiliense* enhance paclitaxel production in *Corylus avellana* cell suspension culture, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 136(1), 161–171. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1503-9>
- Salehi, M., Moieni, A., Safaie, N., & Farhadi, S. 2020, Whole fungal elicitors boost paclitaxel biosynthesis induction in *Corylus avellana* cell culture, *PLoS ONE*, 15(7 July), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236191>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. 2023, Cancer statistics, 2023, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(1), 17–48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>
- Sofias, A. M., Dunne, M., Storm, G., & Allen, C. 2017, The battle of “nano” paclitaxel, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 122, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.02.003>
- Süntar, I., Çetinkaya, S., Haydaroğlu, Ü. S., & Habtemariam, S. 2021, Bioproduction process of natural products and biopharmaceuticals: Biotechnological aspects, *Biotechnology Advances*, 50(November 2020). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107768>
- Syklowska-Baranek, K., Sygitowicz, G., Maciejak-Jastrzębska, A., Pietrosiuk, A., & Szakiel, A. 2022, Application of Priming Strategy for Enhanced Paclitaxel, *Cells*, 11, 2062.
- Tamogami, S., & Kodama, O. 2000, Coronatine elicits phytoalexin production in rice leaves (*Oryza sativa* L.) in the same manner as jasmonic acid, *Phytochemistry*, 54(7), 689–694. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00190-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00190-4)
- T.C. Tarım Orman Bakanlığı, 2023a, Kaynak: <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/findik/Menu/35/Findik>, [Ziyaret Tarihi: 02.05.2023].
- T.C. Tarım Orman Bakanlığı, 2023b, Kaynak: <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/Menu/37/Urun-Raporlari>, [Ziyaret Tarihi:02.05.2023].
- Upadhyay, A. K., Singh, S., Chhipa, R. R., Vijayakumar, M. V., Ajay, A. K., & Bhat, M. K. 2006, Methyl- β -cyclodextrin enhances the susceptibility of human breast cancer cells to carboplatin and 5-fluorouracil: Involvement of Akt, NF- κ B and Bcl-2, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 216(2), 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.05.009>
- Uppalapati, S. R., Ayoubi, P., Weng, H., Palmer, D. A., Mitchell, R. E., Jones, W., & Bender, C. L. 2005, The phytotoxin coronatine and methyl jasmonate impact multiple phytohormone pathways in tomato, *Plant Journal*, 42(2), 201–217. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02366.x>

- Vidal-Limon, H. R., Almagro, L., Moyano, E., Palazon, J., Pedreño, M. A., & Cusido, R. M. 2018, Perfluorodecalins and hexenol as inducers of secondary metabolism in taxus media and vitis vinifera cell cultures, *Frontiers in Plant Science*, 9(March), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00335>
- Vidal-Limon, H., Sanchez-Muñoz, R., Khojasteh, A., Moyano, E., Cusido, R. M., & Palazon, J. 2016, Taxus Cell Cultures, an Effective Biotechnological Tool to Enhance and Gain New Biosynthetic Insights into Taxane Production, *Bioprocessing of Plant In Vitro Systems*, 1–23. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32004-5_5-1
- Walsh, V., & Goodman, J. 2002, From taxol to Taxol®: The changing identities and ownership of an anti-cancer drug, *Medical Anthropology: Cross Cultural Studies in Health and Illness*, 21(3–4), 307–336. <https://doi.org/10.1080/01459740214074>
- Wang, Q., Quan, S., & Xiao, H. 2019, Towards efficient terpenoid biosynthesis: manipulating IPP and DMAPP supply, *Bioresources and Bioprocessing*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0242-z>
- Wani, M. C., Harold, L. T., Monroe, E. W., Philip, C., & Andrew, T. M. 1971, Plant Antitumor Agents.VI.The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from Taxus brevifolia, *Journal of the American Chemical Society*, 93(9), 2325–2327. <https://doi.org/10.1021/ja00738a045>
- Wu, Q. Y., Huang, Z. Y., Wang, J. Y., Yu, H. L., & Xu, J. H. 2022, Construction of an Escherichia coli cell factory to synthesize taxadien-5 α -ol, the key precursor of anti-cancer drug paclitaxel, *Bioresources and Bioprocessing*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00569-5>
- Xiong, X., Gou, J., Liao, Q., Li, Y., Zhou, Q., Bi, G., Li, C., Du, R., Wang, X., Sun, T., Guo, L., Liang, H., Lu, P., Wu, Y., Zhang, Z., Ro, D. K., Shang, Y., Huang, S., & Yan, J. 2021, The Taxus genome provides insights into paclitaxel biosynthesis, *Nature Plants*, 7(8), 1026–1036. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00963-5>
- Yang, W., Chen, X., Li, Y., Guo, S., Wang, Z., & Yu, X. 2020, Advances in Pharmacological Activities of Terpenoids, *Natural Product Communications*, 15(3). <https://doi.org/10.1177/1934578X20903555>
- Yazaki, K. 2017, Lithospermum erythrorhizon cell cultures: Present and future aspects, *Plant Biotechnology*, 34(3), 131–142. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.17.0823a>
- Zamboni, A., Gatto, P., Cestaro, A., Pilati, S., Viola, R., Mattivi, F., Moser, C., & Velasco, R. 2009, Grapevine cell early activation of specific responses to DIMEB, a resveratrol elicitor, *BMC Genomics*, 10, 363. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-363>

EKLER



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Ahmet Doğan
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	02.09.2020

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı	Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik, Tezli Yüksek Lisans