MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİKTE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR: GENOM MÜHENDİSLİĞİ, BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOBELİRTEÇLER

Editör:
İDRİS ARSLAN



BİDGE yayınları

BİDGE Yayınları

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİKTE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR: GENOM MÜHENDİSLİĞİ, BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOBELİRTEÇLER

Editör: İDRİS ARSLAN

ISBN: 978-625-5474-99-5

1. Baskı
Sayfa Düzeni: Gözde YÜCEL
Yayınlama Tarihi: 2026-10-25
BİDGE Yayınları

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

Sertifika No: 71374
Yayın hakları © BİDGE Yayınları
www.bidgeyayinlari.com.tr - bidgeyayinlari@gmail.com
Krc Bilişim Ticaret ve Organizasyon Ltd. Şti.
Güzeltepe Mahallesi Abidin Daver Sokak Sefer Apartmanı No: 7/9 Çankaya / Ankara

İÇİNDEKİLER

ÜRETKEN YAPAY ZEKA (GENERATIVE AI) İLE ÇOKLU İLAÇ DİRENÇLİ PATOJENLERE KARŞI YENİ NESİL ANTİMİKROBİYAL PEPTİD KEŞFİ VE OPTİMİZASYONU .. 1

AYŞE NUR PEKTAŞ

SENTETİK BİYOLOJİ VE GENOM MÜHENDİSLİĞİNDE GELİŞMELER: MİKROBİYAL GENOM TASARIMI, PROGRAMLANABİLİR HÜCRE VE GEN REGÜLASYONU .27

AYŞE NUR PEKTAŞ

MICRORNAS (MIRNAS) AS BIOMARKERS: CURRENT PERSPECTIVES AND APPLICATIONS 59

AHMET AKÇAY

BÖLÜM 1

ÜRETKEN YAPAY ZEKA (GENERATIVE AI) İLE ÇOKLU İLAÇ DİRENÇLİ PATOJENLERE KARŞI YENİ NESİL ANTİMİKROBİYAL PEPTİD KEŞFİ VE OPTİMİZASYONU

AYŞE NUR PEKTAŞ[1]

Giriş

Üretken yapay zeka, antimikrobiyal peptid (AMP) keşfini yıllar süren tarama döngülerinden haftalar süren tasarım-doğrulama döngülerine indirmiş; difüzyon modelleri, protein dil modelleri ve pekiştirmeli öğrenme temelli mimariler ile 2024-2026 yılları arasında çoklu ilaç dirençli patojenlere karşı deneysel olarak doğrulanmış, düşük toksisiteye sahip peptid adayları üretilmesini sağlamıştır. Bu bölüm, bu üç mimari akımı tek bir metodolojik çerçevede karşılaştırma ve üretken yapay zeka ile elde edilen bulguları derlemek amacıyla hazırlanmıştır.

1. Direnç Krizinin Ölçeği ve Peptid Alternatifi

Antimikrobiyal direnç (AMR), 2021 yılında dünya genelinde 4,71 milyon ölümle ilişkilendirilmiş, bunların 1,14 milyonu

[1]Dr. Öğr. Gör., Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, CÜTAM, Orcid: 0000-0001-5621-2844

doğrudan dirence atfedilmiştir (GBD, 2024). Bu sistematik analiz, 2050 yılında doğrudan dirence atfedilebilecek ölüm sayısının 1,91 milyona, ilişkili ölüm sayısının ise 8,22 milyona ulaşabileceğini öngörmektedir (GBD, 2024). Karbapenem dirençli Gram-negatif bakterilere atfedilen ölümler 1990'da 127.000 iken 2021'de 216.000'e çıkmıştır. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2024 tarihli Bakteriyel Öncelikli Patojenler Listesi, bu tablonun araştırma ve geliştirme önceliklerine nasıl yansıtılması gerektiğini tanımlar (https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461).

Sorunun büyüklüğüne karşın klinikteki gelişmeler çok azdır. Yeni antibiyotik sınıflarının keşfi 1960'lardan bu yana büyük ölçüde durmuş, mevcut geliştirme çabalarının önemli bir kısmı bilinen iskeletlerin türevlerine yoğunlaşmıştır (Lewis, 2020). Bu boşluk, doğal savunma moleküllerine yönelik ilgiyi yeniden canlandırmıştır.

Antimikrobiyal peptidler (AMP'ler), konak savunma sisteminin evrimsel olarak korunmuş bileşenleridir ve tek bir moleküler hedef yerine membran bütünlüğü, hücre içi süreçler ve immünomodülasyon üzerinden çok noktalı etki gösterirler (Hancock & Sahl, 2006; Mookherjee ver ark., 2020). Bu çok mekanizmalı etki, klasik antibiyotiklere kıyasla direnç gelişimini yavaşlatan temel özelliktir (Lazzaro ver ark., 2020; Magana ver ark., 2020). Ancak AMP'lerin terapötik kullanımı üç darboğazla sınırlanmıştır: memeli hücrelerine karşı sitotoksisite ve hemoliz, serum ve proteaz ortamında hızlı bozunma, ve sentez maliyeti (Fjell ver ark., 2011; Mookherjee ver ark., 2020).

Bu bölümün konusu, üretken yapay zekanın (generative AI) bu üç darboğazı aynı anda ele alabilen tasarım stratejilerini karşılaştırmalı sunulmasıdır. 2024-2026 arasında yayımlanan çalışmalar, difüzyon modelleri, büyük dil modeli temelli çerçeveler ve derin madencilik yaklaşımları üzerinden, *in vitro* ve *in vivo* olarak doğrulanmış, çoklu ilaç dirençli patojenlere etkili peptid adayları üretmiştir. Bölüm, bu literatürü yöntem mimarisi, hedef patojen ve

optimizasyon amacı eksenlerinde sistematize etmeyi amaçlamaktadır.

2. Antimikrobiyal Peptidlerin Biyolojik Temeli ve Tasarım Kısıtları

AMP tasarımını zorlaştıran kısım, aktiviteyi belirleyen özelliklerin aynı anda toksisiteyi de belirlemesidir. Tipik bir katyonik AMP 8-50 aminoasit uzunluğunda, net pozitif yüklü ve amfipatik yapıdadır (Hancock & Sahl, 2006). Net yük, negatif yüklü bakteriyel membran yüzeyiyle (lipopolisakkarit, lipoteikoik asit, fosfatidilgliserol) elektrostatik etkileşimi sağlar; hidrofobik yüzey ise lipid çift tabakasına gömülmeyi mümkün kılar (Mookherjee ver ark., 2020; Zasloff, 2002).

Ancak sorun, hidrofobisite arttıkça antibakteriyel etkinlik genellikle artar, ancak aynı parametre memeli eritrosit membranına karşı hemolitik aktiviteyi de artırmasıdır (Capecchi ver ark., 2021; Fjell ver ark., 2011). Benzer biçimde, kısa ve yüksek yüklü diziler sentez açısından cazip olsa da serumda albümin bağlanması ve proteolitik bozunma nedeniyle aktivitelerini kaybederler(Mahlapuu ver ark., 2016). Dolayısıyla AMP tasarımı, tek amaçlı bir arama problemi değil, en az üç boyutlu bir Pareto optimizasyonu problemidir: etkinlik, seçicilik ve stabilite.

Klasik hesaplamalı yaklaşımlar bu problemi iki aşamaya bölerek ele almıştır. Birinci aşamada sınıflandırıcılar bir dizinin AMP olup olmadığını tahmin eder; ikinci aşamada regresyon modelleri minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerini kestirir (Veltri ver ark., 2018; Wan, Wong, ver ark., 2024). Bu modüler hat, aşamalar arası yanlılık birikimi ve arama uzayının yalnızca mevcut veri tabanlarındaki dizilere benzeyen bölgeleriyle sınırlı kalma riskini taşır (Huang ver ark., 2023).

Üretken modellerin getirdiği kavramsal değişim, arama uzayını taramak yerine onu modellemektir. Doğal peptid dizilerinin dağılımını öğrenen bir model, bu dağılımdan daha önce hiçbir organizmada gözlenmemiş ancak fiziksel olarak tutarlı diziler örnekleyebilir. Teorik dizi uzayının büyüklüğü (20 aminoasit üzerinden $20^{\wedge n}$) bu yaklaşımı zorunlu kılar: 20 rezidülük peptidler için bile uzay $10^{\wedge 26}$ mertebesindedir ve deneysel tarama ile erişilemez (Santos-Júnior ver ark., 2024; Wan, Wong, ver ark., 2024).

3. Üretken Yapay Zeka Mimarilerinin Karşılaştırmalı Haritası

AMP üretiminde kullanılan mimariler beş ana aileye ayrılır. Aşağıdaki tablo, her ailenin çalışmasını, üretim mekanizmasını ve karakteristik kısıtlarını özetlemektedir.

Mimari ailesi	Örnek çalışma	Üretim mekanizması	Karakteristik kısıtlar
Varyasyonel otokodlayıcı (VAE / cVAE)	HydrAMP (Szymczak ver ark., 2023); PepVAE (Dean ver ark., 2021); PepCVAE (Das ver ark., 2018); CLaSS (Das ver ark., 2021)	Sürekli latent uzayda kodlama-çözme; koşullu varyantlarda özellik ayrıştırma	Latent uzayda bulanıklaşma; üretilen dizilerin eğitim dağılımına aşırı yakınlığı
Üretken çekişmeli ağ (GAN)	AMPGAN v2 (Van Oort ver ark., 2021); PepGAN (Tucs ver ark., 2020)	Üretici-ayırt edici çekişmesi, koşul değişkenleriyle yönlendirme	Mod çöküşü; ayrık dizi uzayında eğitim kararsızlığı
Otoregresif dil modeli / LLM	AMP-Designer (J. Wang ver ark., 2025); deepAMP (Li ver ark., 2024); AmpGPT2 (Clemens ver ark., 2026); ProteoGPT-AMPGenix (Y. Wang ver ark., 2025)	Soldan sağa token üretimi; ön eğitim + ince ayar / istem ayarı	Veri ölçeğine bağımlılık; çok amaçlı kısıtların doğrudan dayatılamaması
Difüzyon modeli	ARCADIAMP (Markakis ver ark., 2026); AMP-Diffusion (M. D. T. Torres ver ark., 2025); Diff-AMP (R. Wang ver ark., 2024); TG-CDDPM (Cao ver ark., 2024)	Gürültü ekleme-giderme; ayrık (D3PM) veya latent uzayda	Örnekleme maliyeti; ayrık veri için gürültü şemasının tasarımı
Pekiştirmeli öğrenme / evrimsel arama	APEXGO (Torres ver ark., 2024); genetik algoritma-ML melezleri (Boone ver ark., 2021); sanal evrim (B. Wang ver ark., 2025)	Ödül fonksiyonuyla yönlendirilmiş yinelemeli iyileştirme	Ödül modelinin yanlılığı; çeşitliliğin daralması

Bu ailelerin sınırları pratikte geçişkendir. ARCADIAMP, ayrık difüzyon üreticisini ESM2 tabanlı iki aşamalı bir sınıflandırıcıyla birleştirir ve yinelemeli öğrenme döngüsü kurar (Markakis ver ark., 2026). AMP-Diffusion, difüzyonu doğrudan ESM-2-650M gömü uzayında uygular; yani difüzyon ve protein dil modeli aynı hatta yer alır (M. D. T. Torres ver ark., 2025). AMPGenix hattı ise ön eğitimli bir protein LLM'ini birden fazla uzmanlaşmış alt modele ayırarak madencilik ve üretimi tek çerçevede birleştirir (Y. Wang ver ark., 2025).

Bu yakınsamanın teknik arka planı, protein dil modellerinin ve difüzyon formalizminin ayrı ayrı olgunlaşmasıdır. Denoising diffusion probabilistic models çerçevesi (Ho ver ark., 2020) görüntüden ayrık dizilere taşınmış; ESM-2 gibi evrimsel ölçekli dil modelleri (Lin ver ark., 2023) dizi gömülerini üretken modellere aktarılabilir hale getirmiştir. Protein yapısı tarafında AlphaFold2 (Jumper ver ark., 2021) ve RFdiffusion (Watson ver ark., 2023) ile gelişen difüzyon tabanlı tasarım kültürü, peptid alanına doğrudan aktarılmıştır (M. D. T. Torres ver ark., 2025).

4. Difüzyon Tabanlı Düşük Toksisiteli Peptid Keşfi

Difüzyon modelleri, veriye kademeli gürültü ekleyen ileri süreci ve bu gürültüyü geri çözen öğrenilmiş bir ters süreci tanımlar (Ho ver ark., 2020). Peptid dizileri ayrık olduğu için bu formalizm iki farklı şekilde: aminoasit tokenleri üzerinde doğrudan çalışan ayrık difüzyon ve sürekli gömü uzayında çalışan latent difüzyon şeklinde uyarlanmıştır.

4.1 Ayrık difüzyon ve yinelemeli öğrenme: ARCADIAMP

ARCADIAMP, ayrık gürültü giderici difüzyon olasılık modelini (D3PM) yinelemeli öğrenme ile birleştiren ve ESM2 tabanlı iki aşamalı bir antibakteriyel aktivite sınıflandırıcısıyla eşleyen bir

üretim ve sanal tarama platformudur (Markakis ver ark., 2026). Platformun ayırt edici tasarım kararı, etkinliği tek başına değil, yüksek terapötik indeksi (etkinlik ile düşük toksisitenin birlikte optimizasyonu) hedef alan bir amaç fonksiyonu kurmasıdır (Markakis ver ark., 2026).

Sonuçlar şu şekilde raporlanmıştır: 1.000.000 üretilen diziden aktivite ve yenilik filtrelerini geçen 76 aday belirlenmiş, bunlardan 10 tanesi sentezlenmiş ve 8 tanesi deneysel testte MİK ≤ 32 μg/mL değerine ulaşmıştır. Öncü peptid Arcinin, ESKAPE patojenlerine karşı 8-32 μg/mL MİK aralığı, insan eritrositlerinde LC50 > 512 μg/mL hemolitik profil ve %50 sığır serumunda dört ESKAPE türü için korunan 32 μg/mL MİK değeri göstermiştir. Peptid ayrıca fare yara modelinde enfeksiyonu yok etmiştir (Markakis ver ark., 2026).

Bu çalışmanın metodolojik açıdan dikkat çeken tarafı, modelin ön eğitimli ağırlıklardan ince ayar yerine rastgele başlatılmış ağırlıklardan eğitilmiş olmasıdır; gerekçe, antibakteriyel aktiviteyi önceliklendirmektir. Bu tercih, protein dil modeli ön eğitiminin her zaman avantaj sağlamadığına dair önemli bir karşı örnek oluşturmaktadır.

4.2 Latent difüzyon ve protein dil modelleri: AMP-Diffusion

AMP-Diffusion, ESM-2-650M gömü uzayında Gaussian gürültü uygulayan bir latent difüzyon modelidir; önceden tanımlanmış motif veya yapısal önsel gerektirmeden biyolojik olarak anlamlı diziler üretir (M. D. T. Torres ver ark., 2025). Üretim hattında 50.000 dizi rastgele Gaussian gürültüden örneklenmiş ve süzülmüştür; seçilen peptidler çoklu ilaç dirençli suşlar dahil geniş spektrumlu antibakteriyel aktivite ve düşük sitotoksisite göstermiştir. Üretilen dizilerin doğallığı ProGen2 gibi protein dil modelleriyle değerlendirilmiştir (M. D. T. Torres ver ark., 2025).

Modelin yazarlarca kabul edilen sınırı, koşullu yönlendirme mekanizmasından yoksun, koşulsuz bir difüzyon modeli olmasıdır; gelecek sürümler için maskelenmiş ayrık difüzyon (MDLM) ve ayrık gürültü giderici posterior tahmin (DDPP) mimarileri yazarlar tarafından önerilmektedir.

4.3 Koşullu ve çok modlu difüzyon varyantları

Koşullu difüzyon, üretimi belirli bir hedefe veya özelliğe yönlendirmeyi amaçlar. Diff-AMP, üretim, tanımlama, tahmin ve optimizasyonu tek çerçevede toplayan bir hat önerir (R. Wang ver ark., 2024). TG-CDDPM, metin yönlendirmeli koşullu gürültü giderici difüzyon ile üretimi doğal dil tanımlamalarına bağlar (Cao ver ark., 2024). Prot-Diff, protein dil modeli ile difüzyonu modüler biçimde birleştirir (X. F. Wang ver ark., 2024). AMPGen, evrimsel bilgiyi koruyan difüzyon temelli bir de novo tasarım modeli sunar (Jin ver ark., 2025).

Bu varyantların ortak yönelimi, koşulsuz üretimin iki bilinen sorununu çözmektir. Bunlar, sentezi zor dizilerin üretilmesi ve deneysel doğrulama maliyetinin yükselmesi (Li ver ark., 2024). Toksisiteyi doğrudan örnekleme sürecine dahil eden yaklaşımlar da ortaya çıkmıştır; toksisite-itici yönlendirme (toxicity-repulsive drifting) ile antijen koşullu ayrık peptid üretimi bu yöndeki güncel örneklerdendir (Fujiwara ver ark., 2026). Benzer biçimde, pekiştirmeli öğrenme ile hizalanmış difüzyon modelleri, antimikrobiyal aktivite ve toksisite kısıtlarını eşzamanlı sağlayan adaylara yönlendirme yaparken çeşitliliği korumayı hedefler (Sheng ver ark., 2026).

5. Büyük Dil Modelleri ve Temel Modeller

Protein dizilerinin doğal dile benzer istatistiksel yapı taşıması, transformer mimarisinin (Ashish, 2017) peptid tasarımına

aktarılmasını mümkün kılmıştır. Bu ailede dört çalışma, farklı tasarım felsefelerini temsil eder.

5.1 Ön eğitimli protein LLM'lerinden ardışık hat: AMPGenix / ProteoGPT

Ön eğitimli bir protein büyük dil modeli olan ProteoGPT, birden fazla uzmanlaşmış alt-LLM'e dönüştürülerek ardışık bir keşif hattı oluşturulmuştur (Y. Wang ver ark., 2025). Bu hat, yüz milyonlarca peptid dizisinde hızlı tarama yaparken hem güçlü antimikrobiyal aktiviteyi hem de düşük sitotoksisite riskini gözetir. Transfer öğrenme yoluyla LLM'lere alana özgü bilgi kazandırılmış, böylece AMP madenciliği ve üretimi tek metodolojik çerçevede birleştirilmiştir (Y. Wang ver ark., 2025).

Deneysel bulgular klinik açıdan önemlidir: hem madencilikle bulunan hem de üretilen AMP'ler, yoğun bakım kökenli karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii* (CRAB) ve metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarında in vitro direnç gelişimine karşı azalmış duyarlılık göstermiştir (Y. Wang ver ark., 2025). Fare uyluk enfeksiyonu modellerinde klinik antibiyotiklerle karşılaştırılabilir veya üstün terapötik etkinlik sağlanmış; organ hasarı ve bağırsak mikrobiyotasında bozulma gözlenmemiştir. Etki mekanizması sitoplazmik membran bozulması ve membran depolarizasyonu olarak tanımlanmıştır (Y. Wang ver ark., 2025).

5.2 İstem ayarı ve hız: AMP-Designer

AMP-Designer, AMP-GPT temel modeli üzerine istem ayarı (prompt tuning) uygulayan bir LLM yaklaşımıdır (J. Wang ver ark., 2025). 11 gün içinde Gram-negatif bakterilere karşı geniş spektrumlu 18 AMP'nin de novo tasarımı gerçekleştirilmiş; in vitro doğrulamada %94,4 başarı oranı raporlanmıştır. Tasarımdan doğrulamaya kadar tüm süreç 48 günde tamamlanmıştır. İki öncü aday minimal hemotoksisite, insan plazmasında stabilite ve düşük

direnç indükleme potansiyeli göstermiş; fare akciğer enfeksiyonu deneylerinde bakteri yükünü anlamlı ölçüde azaltmıştır. Model ayrıca sınırlı veriyle suşa özgü tasarım yapabilmiş, *Propionibacterium acnes* karşısında 2,0 µg/mL MİK değerinde bir aday üretmiştir(J. Wang ver ark., 2025).

Bu çalışmanın literatüre kattığı temel gösterge zaman ölçeğidir: geleneksel AMP keşif döngüleri yıllarla ölçülürken, temel model üzerine kurulu bir hat aynı işi haftalar içinde tamamlamıştır.

5.3 Kısıtlı üretim ve optimizasyon: deepAMP

deepAMP, koşulsuz üretimin sentez güçlüğü ve yüksek deneysel maliyet gibi dezavantajlarını aşmayı hedefleyen, peptid dili temelli bir derin üretken çerçevedir. Model üç bileşene ayrılmıştır: genel peptid üreteci (deepAMP-general), antimikrobiyal peptid optimizasyon modülü (deepAMP-AOM) ve penetratin optimizasyon modülü (deepAMP-POM). Aday peptidler, dirençli bakterilere karşı hem in vitro hem de fare yara modelinde doğrulanmıştır (Li ver ark., 2024).

5.4 GPT tabanlı üretim ve tahmin: AmpGPT2

İlaca dirençli enfeksiyonlara yönelik AMP tahmin ve optimizasyonunu ele alan çalışmada AmpGPT2, ürettiği dizilerin %95,41'inin AMP Scanner tarafından AMP olarak öngörüldüğü, mevcut modellere göre belirgin bir iyileşme raporlamıştır (Clemens ver ark., 2026). Deneysel doğrulamada test edilen beş peptidden biri, dermaseptin ailesi AMP'lerle yapısal özellikler paylaşan bir dizi, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa* karşısında konsantrasyona bağlı anlamlı antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Clemens ver ark., 2026).

Bu dört çalışmanın karşılaştırmalı okuması, LLM ailesinin güçlü yanının ölçek ve hız, zayıf yanının ise çok amaçlı kısıtların doğrudan dayatılamaması olduğunu gösterir. Otoregresif üretim, toksisite gibi

bir kısıtı örnekleme sırasında değil, ancak sonraki filtreleme aşamasında uygulayabilir; difüzyon ailesinin koşullu yönlendirme mekanizmaları bu noktada yapısal bir avantaj sunmaktadır (Fujiwara ver ark., 2026; Markakis ver ark., 2026).

6. Farklı Patojen Hedefleri

Üretken modellerin hedef patojen seçimi, büyük ölçüde WHO öncelikli patojen listesi ve ESKAPE grubu tarafından belirlenmektedir.

6.1 Karbapenem dirençli Gram-negatifler

Karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii*, WHO listesinin en üst sırasında yer alır ve üretken YZ çalışmalarının en sık hedefidir. AMPGenix hattı, yoğun bakım kökenli CRAB izolatlarında direnç gelişimine karşı azalmış duyarlılık göstermiştir (Y. Wang ver ark., 2025). ARCADIAMP'in öncü peptidi Arcinin, ESKAPE patojenlerine karşı 8-32 μg/mL aralığında etkinlik sergilemiştir (Markakis ver ark., 2026).

Açıklanabilir derin öğrenme ve sanal evrim temelli bir çalışma, düşük bollukta insan oral bakterilerinde kodlanan peptidleri modele vererek 32 peptidi güçlü AMP'lere dönüştürmüş; sentezlenen en etkili altı peptid karbapenem dirençli *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *A. baumannii* ile vankomisin dirençli *Enterococcus faecium* karşısında aktivite göstermiştir (B. Wang ver ark., 2025). Bu çalışma, üretken yaklaşımların yalnızca de novo tasarımla sınırlı olmadığını, mevcut doğal dizilerin yönlendirilmiş optimizasyonunun da eşdeğer bir strateji olduğunu göstermektedir.

Küçük moleküller tarafında da benzer bir eğilim vardır: derin öğrenme rehberliğinde *A. baumannii* hedefli abaucin bulunmuş (Liu ver ark., 2023), açıklanabilir derin öğrenme ile yeni bir yapısal antibiyotik sınıfı tanımlanmıştır (Wong ver ark., 2024). Bu

çalışmalar, Stokes ve arkadaşlarının halicin keşfiyle başlattığı hattın devamıdır (Stokes ver ark., 2020).

6.2 Gram-pozitif ve çoklu dirençli suşlar

MRSA ve vankomisin dirençli enterokoklar, üretken hatların ikinci ana hedef grubudur. Gram-pozitif hedeflemede kalın peptidoglikan tabakası nedeniyle etki mekanizması Gram-negatiflerden farklılaşır; membran depolarizasyonu baskın mekanizma olarak raporlanmaktadır (Y. Wang ver ark., 2025).

6.3 Suşa özgü ve dar spektrumlu tasarım

Geniş spektrumlu etkinlik her zaman istenen özellik değildir; mikrobiyota korunumu açısından dar spektrumlu ajanlar tercih edilebilir. AMP-Designer'ın *P. acnes* karşısında 2,0 µg/mL MİK değerinde aday üretmesi, sınırlı veriyle suşa özgü tasarımın mümkün olduğunu göstermektedir. AMPGAN v2'nin koşul değişkenleriyle hedef mikroorganizma ve etki mekanizmasına göre üretim yapması da bu yönelimin erken bir örneğidir (Van Oort ver ark., 2021).

6.4 Bakteri dışı hedefler

Alan hızla bakteri dışına genişlemektedir. Antifungal aktivitesi antibakteriyel aktivitesinden güçlü olan dizilerin ayrı bir eğitim kümesi olarak ele alınması, çok etiketli sınıflandırma yaklaşımının yerleştiğini gösterir. Antiviral peptid üretiminde GAN tabanlı yaklaşımlar denenmiş (Surana ver ark., 2021), hücre içi enfeksiyonlara yönelik çok modlu antibiyotik tasarımı derin öğrenme ile ele alınmıştır (Cesaro ver ark., 2024).

6.5 Yeni dizi kaynakları olarak biyolojik uzaylar

Hedef patojen çeşitliliğine paralel olarak kaynak dizi uzayları da genişlemiştir. Küresel mikrobiyomda makine öğrenmesiyle yapılan tarama, 63.410 metagenom ve 87.920 prokaryotik genom üzerinden 863.498 tekrarsız peptid içeren AMPSphere kataloğunu üretmiş; test

edilen 100 peptidden 79'u aktif çıkmış, bunların 63'ü patojenleri hedeflemiştir (Santos-Júnior ver ark., 2024). Soyu tükenmiş organizmaların proteomlarının taranması (moleküler de-extinction) APEX modeliyle 10.311.899 şifreli peptid arasından geniş spektrumlu aktivite öngörülen 37.176 dizi belirlemiş, bunların 11.035'i yaşayan organizmalarda bulunmamıştır (Maasch ver ark., 2023; Wan, Torres, ver ark., 2024). İnsan proteomu (Torres ver ark., 2022), insan bağırsak mikrobiyomu (Ma ver ark., 2022), arkeal proteom (Marcelo D. T. Torres ver ark., 2025) ve küresel venom kaynakları (Guan ver ark., 2025) benzer biçimde taranmıştır.

7. Çok Amaçlı Optimizasyon: Toksisite, Hemoliz ve Serum Stabilitesi

Mevcut yaklaşımların çoğu yalnızca antimikrobiyal aktiviteyi optimize eder; bu da yüksek toksisite veya zayıf farmakokinetik nedeniyle terapötik kullanıma uygun olmayan güçlü adaylar üretilmesiyle sonuçlanır (Markakis ver ark., 2026). Bu tespit, 2024 sonrası literatürün en belirgin ortak temasıdır.

7.1 Terapötik indeksin doğrudan amaç fonksiyonuna alınması

ARCADIAMP, keşfi bir YZ destekli yinelemeli optimizasyon problemi olarak çerçeveleyerek aktivite, toksisite ve etkinliği tek hatta bağlar. Bu yaklaşımın raporlanan çıktısı, etkinlik ve güvenliğin birlikte sağlandığı bir peptid profilidir: Arcinin için LC50 > 512 µg/mL hemolitik eşik ile 8-32 µg/mL MİK aralığının birlikte elde edilmesi (Markakis ver ark., 2026).

7.2 Serum stabilitesi

Serum stabilitesi, AMP'lerin klinik başarısızlığının en yaygın nedenlerinden biridir ancak hesaplamalı hatların çoğunda değerlendirilmez. ARCADIAMP'in %50 sığır serumunda dört ESKAPE türü için 32 µg/mL MİK değerini koruduğunu raporlaması ve AMP-Designer adaylarının insan plazmasında stabilite

göstermesi, bu parametrenin tasarım hattına dahil edilmeye başlandığını göstermektedir.

7.3 Pareto temelli ve çok ayırt edicili yaklaşımlar

Çok amaçlı optimizasyonu mimari düzeyde ele alan çalışmalar artmaktadır. HMAMP, minimum inhibitör konsantrasyon ve hemoliz gibi farklı nitelikleri optimize etmek için üreticiyi birden fazla ayırt ediciye karşı eğitir (L. Wang ver ark., 2025). MoFormer, Pareto temelli geri bildirim kullanan koşullu bir transformer ile çok amaçlı tasarımı ele alır (L. Wang ver ark., 2024). Hemolitik olmayan AMP tasarımına odaklanan makine öğrenmesi çalışmaları, seçiciliğin ayrı bir öğrenme hedefi olarak ele alınabileceğini göstermiştir (Capecchi ver ark., 2021).

7.4 Toksisite tahmin araçları

Üretken hatların filtre katmanında kullanılan toksisite tahmin araçları ayrı bir alt literatür oluşturur. ToxinPred 3.0 peptid toksisitesi tahmininde güncel referanslardan biridir (Rathore ver ark., 2024); yapı farkındalıklı derin öğrenme modelleri ve birleşik terapötik peptid özellik tahmin platformları bu araç setini genişletmektedir (Zhang ver ark., 2026).

Buradaki metodolojik uyarı şudur: toksisite tahmin modelleri, eğitim verilerindeki hemoliz ölçüm koşullarının standartlaşmamış olması nedeniyle kendileri de yanlılık taşıyabilir. Dolayısıyla *in silico* düşük toksisite öngörüsü, deneysel hemoliz ve sitotoksisite testinin yerine geçmez.

8. Veri Kaynakları, Veri Tabanları ve Değerlendirme Sorunları

8.1 Birincil veri tabanları

AMP modellerinin tamamı sınırlı sayıda küratörlü veri tabanına dayanır. **APD3**, araştırma ve eğitim amaçlı yaygın kullanılan referanslardandır (Wang ver ark., 2016). **DRAMP**, klinik

translasyona odaklanan açık erişimli bir depodur ve 4.0 sürümüne ulaşmıştır (Ma ver ark., 2025). **DBAASP v3**, antimikrobiyal ve sitotoksik aktivite ile yapı verisini birlikte sunar (Pirtskhalava ver ark., 2021). **CAMPR4**, doğal ve sentetik AMP'leri kapsar (Gawde ver ark., 2023).

Bu veri tabanlarının ortak sınırı ölçektir. Deneysel AMP verisi, doğal dil işlemede kullanılan veri kümelerine kıyasla oldukça mütevazıdır. Bu nedenle transfer öğrenme, ön eğitim ve veri artırma teknikleri, üretken AMP hatlarının vazgeçilmez bileşenleri haline gelmiştir.

8.2 Ölçüm standardizasyonu eksikliği

AMP ve antibiyotik veri kümelerinde eksik olan kritik bir unsur, veri kümeleri oluşturulurken deneysel standardizasyonun bulunmamasıdır. Bu durum YZ modelleri için eğitim kümesi hazırlarken kritik bir gereksinimdir. Farklı laboratuvarlarda farklı besiyeri, inokülum yoğunluğu ve okuma yöntemleriyle elde edilmiş MİK değerlerinin tek bir etiket uzayında birleştirilmesi, modelin öğrendiği sinyalin bir kısmının biyolojik değil metodolojik olması sonucunu doğurur.

8.3 Benchmark yanlılığı

AMP tahmininde kullanılan kıyaslama kümeleri, negatif veri seçimi nedeniyle yanlıdır (Sidorczuk ver ark., 2022). Negatif örnekler genellikle rastgele protein parçalarından türetildiği için, sınıflandırıcılar AMP'liği değil, basitçe yüksek net yük ve hidrofobisite gibi yüzeysel özellikleri öğrenebilir. Makine öğrenmesi temelli AMP tahmin yöntemlerinin kapsamlı değerlendirmeleri, raporlanan performansların bağımsız kümelerde belirgin biçimde düştüğünü göstermektedir (Xu ver ark., 2021).

Bu durumun üretken modeller açısından sonucu ciddidir: üretilen bir milyon dizinin filtrelenmesinde kullanılan sınıflandırıcı yanlıysa, hattın tamamı yanlı bir dizi alt kümesine yönlendirilir.

ARCADIAMP'in dizi-yenilik taramasını ayrı bir filtre olarak konumlandırması ve AMPGenix'in birden fazla bağımsız tahminleyiciyle karşılaştırmalı değerlendirme yapması bu riske karşı geliştirilmiş pratiklerdir.

8.4 Değerlendirme metriklerinin uyumsuzluğu

Üretken modellerin karşılaştırılmasında kullanılan metrikler (öngörülen aktif oranı, çeşitlilik, yenilik, sözde-şaşkınlık) doğrudan deneysel başarı oranıyla ilişkilendirilemez. AMPGenix çalışmasında beş koşulsuz üretim modelinin (HydrAMP, Basic, PepCVAE, AMP-GAN, AMP-LM) karşılaştırmalı değerlendirmeye alınması, alanın standart bir kıyaslama protokolüne doğru ilerlediğini, ancak henüz uzlaşılmış bir protokolün bulunmadığını göstermektedir. Çok etiketli AMP sınıflandırması için standartlaştırılmış kıyaslama girişimleri bu boşluğu doldurmayı hedeflemektedir.

9. Hesaplamadan Deneye: Doğrulama Hattı ve Translasyonel Darboğazlar

Üretken YZ çalışmalarının güvenilirliği, *in silico* çıktının deneysel olarak nasıl daraltıldığına bağlıdır. Literatürdeki ortak hat beş aşamadan oluşur.

1. **Toplu üretim.** Model yüz binlerce ya da milyonlarca dizi örnekler. ARCADIAMP'de bu sayı 1.000.000, AMP-Diffusion'da 50.000'dir.
2. **Sıralı filtreleme.** Aktivite sınıflandırıcısı, toksisite tahminleyicisi ve dizi-yenilik taraması ardışık uygulanır. ARCADIAMP'de bu filtreler 1.000.000 diziyi 76 adaya indirmiştir.
3. **Sentez için seçim.** Katı faz peptid sentezi maliyeti nedeniyle genellikle 5-20 aday sentezlenir; ARCADIAMP'de 10, AMP-Designer'da 20 aday (ikisi üç sentez denemesinden sonra başarısız).

4. ***İn vitro* doğrulama.** MİK tayini, hemoliz, sitotoksisite ve serum stabilitesi. Raporlanan isabet oranları yüksektir: ARCADIAMP'de 10 adayın 8'i MİK ≤ 32 µg/mL; AMP-Designer'da %94,4; AMPSphere'de test edilen 100 peptidden 79'u aktif.
5. ***İn vivo* doğrulama.** Fare yara modeli, uyluk enfeksiyonu modeli, akciğer enfeksiyonu modeli ve deri apse modeli kullanılan başlıca modellerdir.

Bu hattın raporlanan isabet oranlarını yorumlarken iki uyarı gereklidir. Birincisi, yayımlanan çalışmalar başarılı hatları raporlar; yayın yanlılığı nedeniyle alanın gerçek ortalama isabet oranı bilinmemektedir. İkincisi, isabet oranı paydası sentezlenen aday sayısıdır, üretilen dizi sayısı değildir; yani %94 başarı oranı, filtreleme katmanlarının ne kadar seçici olduğuna dair bir ifadedir, üretecin kendi kalitesine dair değildir.

Translasyonel darboğazlar *in vivo* aşamanın ötesinde yoğunlaşır. Peptid ilaçlarında üretim maliyeti, oral biyoyararlanım eksikliği, immünojenisite ve konak proteazlarına duyarlılık klinik geçişi sınırlayan başlıca faktörlerdir. Bu nedenle mevcut aday peptidlerin çoğu topikal veya lokal uygulama senaryolarında değerlendirilmektedir. Doğal olmayan aminoasitler, siklizasyon ve D-formlu rezidüler bu darboğazları aşmaya yönelik kimyasal stratejilerdir ve üretken modellerin bu genişletilmiş kimyasal uzayı kapsaması alanın açık problemlerinden biridir (Duffy ver ark., 2011).

10. Sınırlılıklar ve Gelecek Yönelimleri

10.1 Yöntemsel sınırlılıklar

Alanın dört yapısal sınırlılığı öne çıkar. Birincisi veri ölçeğidir, deneysel AMP kayıtları doğal dil veri kümelerine kıyasla küçük kalır. İkincisi etiket gürültüsüdür ve ölçüm standardizasyonunun bulunmamasından kaynaklanır. Üçüncü sınırlılık ise negatif veri

yanlılığıdır ve sınıflandırıcıların yüzeysel fizikokimyasal özellikleri öğrenmesine yol açar. Dördüncü olarak karşılaştırılabilirlik eksikliği ise mimariler arası performans iddialarını doğrulanamaz kılar.

Ön eğitim stratejisi konusunda literatürde birleşik bir uygulama bulunmamaktadır. AMP-Diffusion difüzyonu ESM-2 gömü uzayında uygularken, ARCADIAMP modeli ön eğitimli ağırlıklardan ince ayar yerine rastgele başlatılmış ağırlıklardan eğitmiş ve gerekçe olarak antibakteriyel aktivitenin önceliklendirilmesini göstermiştir. Bu iki tercihin karşılaştırmalı performansı henüz ortak bir protokolle sınanmamıştır.

10.2 Direnç gelişimi ve ekolojik riskler

AMP'lerin direnç gelişimine daha az yatkın olduğu varsayımı mutlak değildir. Konak savunma peptidlerine karşı bakteriyel direnç mekanizmaları (proteaz salgılanması, membran yükünün modifikasyonu, efluks) bilinmektedir. Üretken modellerin doğal konak savunma peptidlerine yapısal olarak yakın diziler üretmesi, teorik olarak konak bağışıklığına karşı çapraz direnç seçilimi riskini taşır. ARCADIAMP'in dizi-yenilik taramasını bir filtre olarak kurması, bu riske karşı kısmi bir önlem olarak okunabilir; ancak konu deneysel olarak yeterince incelenmemiştir.

10.3 Biyogüvenlik ve çift kullanım

Üretken biyomoleküler tasarım araçlarının çift kullanım potansiyeli, alanın giderek daha fazla tartışılan boyutudur. Toksisiteyi minimize etmek üzere eğitilmiş bir modelin amaç fonksiyonunun işareti değiştirildiğinde ters yönde çalışabilmesi, model paylaşım politikalarının ve erişim kontrollerinin bölümün kapsamı dışında kalsa da açıkça ele alınması gereken bir konudur.

10.4 Gelecek yönelimleri

Şu an için dört yönelim öne çıkmaktadır. Birincisi, koşullu ve yönlendirilmiş üretim: maskelenmiş ayrık difüzyon ve ayrık gürültü giderici posterior tahmin gibi mimarilerin AMP alanına taşınması, ve sınıflandırıcısız yönlendirme ile toksisite-itici örnekleme stratejileridir. İkincisi, ajan temelli ve kapalı döngü keşif: model, sentez ve test aşamalarının otomasyonla bağlanarak insan müdahalesi olmadan yinelemeli optimizasyon yapılmasıdır. Üçüncüsü ise kanonik olmayan kimyasal uzaya genişleme: doğal olmayan aminoasitler ve siklik peptidler içeren sanal kütüphanelerin üretken modellerle taranması.

Dördüncü ve muhtemelen en belirleyici yönelim, gelecekteki patojenlere karşı öngörücü tasarımdır; henüz ortaya çıkmamış suşlara karşı antibiyotik öngörme ve üretme girişimleri bu yönde erken örneklerdir (Leng ver ark., 2025).

Sonuç

Üretken yapay zeka, AMP keşfinde niceliksel değil niteliksel bir değişim yaratmıştır. Bu değişimin adı "tarama probleminden tasarım problemine geçiş"tir. 2024-2026 arasındaki üç önemli çalışma bu geçişin farklı yüzlerini gösterir.

- Difüzyon temelli ARCADIAMP, terapötik indeksi doğrudan amaç fonksiyonuna alarak etkinlik ile düşük toksisitenin birlikte optimize edilebileceğini deneysel olarak göstermiştir (Markakis ver ark., 2026).
- LLM temelli AMPGenix hattı, madencilik ve üretimi tek çerçevede birleştirerek çoklu ilaç dirençli klinik izolatlarda *in vivo* etkinlik sağlamıştır (Y. Wang ver ark., 2025).
- AmpGPT2 çalışması, üretken tahmin ve optimizasyonun ilaca dirençli enfeksiyonlara yönelik uygulanabilirliğini göstermiştir (Clemens ver ark., 2026).

Bu üç hat farklı mimariler kullanmakla birlikte, amaç fonksiyonlarının kapsamı bakımından benzer bir yönelim göstermektedir. Ve bu üç çalışma da yalnızca antimikrobiyal aktiviteyi optimize eden yaklaşımların toksisite veya farmakokinetik nedeniyle terapötik kullanıma uygun olmayan adaylar üretebildiğini raporlamaktadır. Toksisite, seçicilik ve stabilitenin tasarım sürecine dahil edilmesi, incelenen çalışmaların ortak metodolojik eğilimidir.

Literatürde sıkça dile getirilen açık sorunlar ise veri kalitesi ve değerlendirme standardizasyonu başlıkları altında toplanmaktadır. Standartlaştırılmış MİK ölçüm protokollerinin, negatif veri seçimine ilişkin uzlaşının ve ortak kıyaslama çerçevelerinin bulunmaması, farklı üretken modellerin raporlanan performanslarının karşılaştırılmasını güçleştiren etkenler olarak tanımlanmaktadır.

Kaynaklar

Ashish, V. (2017). Attention is all you need. Advances in neural information processing systems.

Boone, K., Wisdom, C., Camarda, K., Spencer, P., & Tamerler, C. (2021). Combining genetic algorithm with machine learning strategies for designing potent antimicrobial peptides. BMC Bioinformatics, 22(1), 239. https://doi.org/10.1186/s12859-021-04156-x

Cao, J., Zhang, J., Yu, Q., Ji, J., Li, J., He, S., & Zhu, Z. (2024). TG-CDDPM: text-guided antimicrobial peptides generation based on conditional denoising diffusion probabilistic model. Brief Bioinform, 26(1). https://doi.org/10.1093/bib/bbae644

Capecchi, A., Cai, X., Personne, H., Köhler, T., van Delden, C., & Reymond, J. L. (2021). Machine learning designs non-hemolytic antimicrobial peptides. Chem Sci, 12(26), 9221-9232. https://doi.org/10.1039/d1sc01713f

Cesaro, A., Wan, F., Torres, M. D. T., & de la Fuente-Nunez, C. (2024). Design of multimodal antibiotics against intracellular infections using deep learning. bioRxiv, 2024.2012.2020.629780. https://doi.org/10.1101/2024.12.20.629780

Clemens, S., Löchel, H. F., Häußer, N., Wannemacher, F., Bertrams, W., Schmeck, B., & Heider, D. (2026). Harnessing generative AI for predicting and optimizing antimicrobial peptides against drug-resistant infections. npj

Antimicrobials and Resistance, 4(1), 42. https://doi.org/10.1038/s44259-026-00218-3

Das, P., Sercu, T., Wadhawan, K., Padhi, I., Gehrmann, S., Cipcigan, F., Chenthamarakshan, V., Strobelt, H., Dos Santos, C., Chen, P. Y., Yang, Y. Y., Tan, J. P. K., Hedrick, J., Crain, J., & Mojsilovic, A. (2021). Accelerated antimicrobial discovery via deep generative models and molecular dynamics simulations. Nat Biomed Eng, 5(6), 613-623. https://doi.org/10.1038/s41551-021-00689-x

Das, P., Wadhawan, K., Chang, O., Sercu, T., Dos Santos, C., Riemer, M., Padhi, I., Chenthamarakshan, V., & Mojsilovic, A. (2018). PepCVAE: Semi-Supervised Targeted Design of Antimicrobial Peptide Sequences. https://doi.org/10.48550/arXiv.1810.07743

Dean, S. N., Alvarez, J. A. E., Zabetakis, D., Walper, S. A., & Malanoski, A. P. (2021). PepVAE: Variational Autoencoder Framework for Antimicrobial Peptide Generation and Activity Prediction [Original Research]. Frontiers in Microbiology, Volume 12 - 2021. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.725727

Duffy, F., Verniere, M., Devocelle, M., Bernard, E., Shields, D., & Chubb, A. (2011). CycloPs: Generating Virtual Libraries of Cyclized and Constrained Peptides Including Nonnatural Amino Acids. Journal of chemical information and modeling, 51, 829-836. https://doi.org/10.1021/ci100431r

Fjell, C. D., Hiss, J. A., Hancock, R. E., & Schneider, G. (2011). Designing antimicrobial peptides: form follows function. Nat Rev Drug Discov, 11(1), 37-51. https://doi.org/10.1038/nrd3591

Fujiwara, T., Shindo, H., Madhawa, K., Choong, J., & Ozawa, K. (2026). Pepti-drift: Toxicity-Repulsive Drifting for Antigen-Conditioned Discrete Peptide Generation. https://doi.org/10.48550/arXiv.2606.27824

Gawde, U., Chakraborty, S., Waghu, F. H., Barai, R. S., Khanderkar, A., Indraguru, R., Shirsat, T., & Idicula-Thomas, S. (2023). CAMPR4: a database of natural and synthetic antimicrobial peptides. Nucleic Acids Res, 51(D1), D377-d383. https://doi.org/10.1093/nar/gkac933

GBD. (2024). Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990-2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. Lancet, 404(10459), 1199-1226. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(24)01867-1

Guan, C., Torres, M. D. T., Li, S., & de la Fuente-Nunez, C. (2025). Computational exploration of global venoms for antimicrobial discovery with Venomics artificial intelligence. Nature Communications, 16(1), 6446. https://doi.org/10.1038/s41467-025-60051-6

Hancock, R. E., & Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. Nat Biotechnol, 24(12), 1551-1557. https://doi.org/10.1038/nbt1267

Ho, J., Jain, A., & Abbeel, P. (2020). Denoising diffusion probabilistic models. Advances in neural information processing systems, 33, 6840-6851.

Huang, J., Xu, Y., Xue, Y., Huang, Y., Li, X., Chen, X., Xu, Y., Zhang, D., Zhang, P., Zhao, J., & Ji, J. (2023). Identification of potent antimicrobial peptides via a machine-learning pipeline that mines the entire space of peptide sequences. Nat Biomed Eng, 7(6), 797-810. https://doi.org/10.1038/s41551-022-00991-2

Jin, S., Zeng, Z., Xiong, X., Huang, B., Tang, L., Wang, H., Ma, X., Tang, X., Shao, G., Huang, X., & Lin, F. (2025). AMPGen: an evolutionary information-reserved and diffusion-driven generative model for de novo design of antimicrobial peptides. Communications Biology, 8(1), 839. https://doi.org/10.1038/s42003-025-08282-7

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., . . . Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature, 596(7873), 583-589. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2

Lazzaro, B. P., Zasloff, M., & Rolff, J. (2020). Antimicrobial peptides: Application informed by evolution. Science, 368(6490). https://doi.org/10.1126/science.aau5480

Leng, T., Wan, F., Torres, M., & de la Fuente, C. (2025). Predicting and generating antibiotics against future pathogens with ApexOracle. https://doi.org/10.48550/arXiv.2507.07862

Lewis, K. (2020). The Science of Antibiotic Discovery. Cell, 181(1), 29-45. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.056

Li, T., Ren, X., Luo, X., Wang, Z., Li, Z., Luo, X., Shen, J., Li, Y., Yuan, D., Nussinov, R., Zeng, X., Shi, J., & Cheng, F. (2024). A Foundation Model Identifies Broad-Spectrum Antimicrobial Peptides against Drug-Resistant Bacterial Infection. Nat Commun, 15(1), 7538. https://doi.org/10.1038/s41467-024-51933-2

Lin, Z., Akin, H., Rao, R., Hie, B., Zhu, Z., Lu, W., Smetanin, N., Verkuil, R., Kabeli, O., Shmueli, Y., dos Santos Costa, A., Fazel-Zarandi, M., Sercu, T., Candido, S., & Rives, A. (2023). Evolutionary-scale prediction of atomic-level protein structure with a language model. Science, 379(6637), 1123-1130. https://doi.org/doi:10.1126/science.ade2574

Liu, G., Catacutan, D. B., Rathod, K., Swanson, K., Jin, W., Mohammed, J. C., Chiappino-Pepe, A., Syed, S. A., Fragis, M., Rachwalski, K., Magolan, J., Surette, M. G., Coombes, B. K., Jaakkola, T., Barzilay, R., Collins, J. J., & Stokes, J. M. (2023). Deep learning-guided discovery of an antibiotic targeting Acinetobacter baumannii. Nat Chem Biol, 19(11), 1342-1350. https://doi.org/10.1038/s41589-023-01349-8

Ma, T., Liu, Y., Yu, B., Sun, X., Yao, H., Hao, C., Li, J., Nawaz, M., Jiang, X., Lao, X., & Zheng, H. (2025). DRAMP 4.0: an open-access data repository dedicated to the clinical translation of antimicrobial peptides. Nucleic Acids Res, 53(D1), D403-d410. https://doi.org/10.1093/nar/gkae1046

Ma, Y., Guo, Z., Xia, B., Zhang, Y., Liu, X., Yu, Y., Tang, N., Tong, X., Wang, M., Ye, X., Feng, J., Chen, Y., & Wang, J. (2022). Identification of antimicrobial peptides from the human gut microbiome using deep learning. Nat Biotechnol, 40(6), 921-931. https://doi.org/10.1038/s41587-022-01226-0

Maasch, J., Torres, M. D. T., Melo, M. C. R., & de la Fuente-Nunez, C. (2023). Molecular de-extinction of ancient antimicrobial peptides enabled by machine learning. Cell Host Microbe, 31(8), 1260-1274.e1266. https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.07.001

Magana, M., Pushpanathan, M., Santos, A. L., Leanse, L., Fernandez, M., Ioannidis, A., Giulianotti, M. A., Apidianakis, Y., Bradfute, S., Ferguson, A. L., Cherkasov, A., Seleem, M. N., Pinilla, C., de la Fuente-Nunez, C., Lazaridis, T., Dai, T., Houghten, R. A., Hancock, R. E. W., & Tegos, G. P. (2020). The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. Lancet Infect Dis, 20(9), e216-e230. https://doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30327-3

Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents [Review]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, Volume 6 - 2016. https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194

Markakis, K., Kim, S., Tan, C.-E., & Tagkopoulos, I. (2026). Discovery of potent low-toxicity antimicrobial peptides through diffusion modeling. Nature Communications, 17(1), 8396. https://doi.org/10.1038/s41467-026-75030-8

Mookherjee, N., Anderson, M. A., Haagsman, H. P., & Davidson, D. J. (2020). Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. Nat Rev Drug Discov, 19(5), 311-332. https://doi.org/10.1038/s41573-019-0058-8

Pirtskhalava, M., Amstrong, A. A., Grigolava, M., Chubinidze, M., Alimbarashvili, E., Vishnepolsky, B., Gabrielian, A., Rosenthal, A., Hurt, D. E., & Tartakovsky, M. (2021). DBAASP v3: database of antimicrobial/cytotoxic activity

and structure of peptides as a resource for development of new therapeutics. Nucleic Acids Res, 49(D1), D288-d297. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa991

Rathore, A. S., Choudhury, S., Arora, A., Tijare, P., & Raghava, G. P. S. (2024). ToxinPred 3.0: An improved method for predicting the toxicity of peptides. Comput Biol Med, 179, 108926. https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2024.108926

Santos-Júnior, C. D., Torres, M. D. T., Duan, Y., Rodríguez Del Río, Á., Schmidt, T. S. B., Chong, H., Fullam, A., Kuhn, M., Zhu, C., Houseman, A., Somborski, J., Vines, A., Zhao, X. M., Bork, P., Huerta-Cepas, J., de la Fuente-Nunez, C., & Coelho, L. P. (2024). Discovery of antimicrobial peptides in the global microbiome with machine learning. Cell, 187(14), 3761-3778.e3716. https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.05.013

Sheng, F., Noaeen, M., & Shakeri, Z. (2026). ProDCARL: Reinforcement Learning-Aligned Diffusion Models for De Novo Antimicrobial Peptide Design. https://doi.org/10.48550/arXiv.2602.00157

Sidorczuk, K., Gagat, P., Pietluch, F., Kała, J., Rafacz, D., Bąkała, L., Słowik, J., Kolenda, R., Rödiger, S., Fingerhut, L., Cooke, I. R., Mackiewicz, P., & Burdukiewicz, M. (2022). Benchmarks in antimicrobial peptide prediction are biased due to the selection of negative data. Brief Bioinform, 23(5). https://doi.org/10.1093/bib/bbac343

Stokes, J. M., Yang, K., Swanson, K., Jin, W., Cubillos-Ruiz, A., Donghia, N. M., MacNair, C. R., French, S., Carfrae, L. A., Bloom-Ackermann, Z., Tran, V. M., Chiappino-Pepe, A., Badran, A. H., Andrews, I. W., Chory, E. J., Church, G. M., Brown, E. D., Jaakkola, T. S., Barzilay, R., & Collins, J. J. (2020). A Deep Learning Approach to Antibiotic Discovery. Cell, 180(4), 688-702.e613. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.021

Surana, S., Arora, P., Singh, D., Lele, D., & Valadi, J. (2021). PandoraGAN: Generating antiviral peptides using Generative Adversarial Network. https://doi.org/10.1101/2021.02.15.431193

Szymczak, P., Możejko, M., Grzegorzek, T., Jurczak, R., Bauer, M., Neubauer, D., Sikora, K., Michalski, M., Sroka, J., Setny, P., Kamysz, W., & Szczurek, E. (2023). Discovering highly potent antimicrobial peptides with deep generative model HydrAMP. Nat Commun, 14(1), 1453. https://doi.org/10.1038/s41467-023-36994-z

Torres, M. D. T., Chen, T., Wan, F., Chatterjee, P., & de la Fuente-Nunez, C. (2025). Generative latent diffusion language modeling yields anti-infective synthetic peptides. bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2025.01.31.636003

Torres, M. D. T., Melo, M. C. R., Flowers, L., Crescenzi, O., Notomista, E., & de la Fuente-Nunez, C. (2022). Mining for encrypted peptide antibiotics in the human proteome. Nat Biomed Eng, 6(1), 67-75. https://doi.org/10.1038/s41551-021-00801-1

Torres, M. D. T., Wan, F., & de la Fuente-Nunez, C. (2025). Deep learning reveals antibiotics in the archaeal proteome. Nature Microbiology, 10(9), 2153-2167. https://doi.org/10.1038/s41564-025-02061-0

Torres, M. D. T., Zeng, Y., Wan, F., Maus, N., Gardner, J., & de la Fuente-Nunez, C. (2024). A generative artificial intelligence approach for antibiotic optimization. bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2024.11.27.625757

Tucs, A., Tran, D. P., Yumoto, A., Ito, Y., Uzawa, T., & Tsuda, K. (2020). Generating Ampicillin-Level Antimicrobial Peptides with Activity-Aware Generative Adversarial Networks. ACS Omega, 5(36), 22847-22851. https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02088

Van Oort, C. M., Ferrell, J. B., Remington, J. M., Wshah, S., & Li, J. (2021). AMPGAN v2: Machine Learning-Guided Design of Antimicrobial Peptides. J Chem Inf Model, 61(5), 2198-2207. https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c01441

Veltri, D., Kamath, U., & Shehu, A. (2018). Deep learning improves antimicrobial peptide recognition. Bioinformatics, 34(16), 2740-2747. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty179

Wan, F., Torres, M. D. T., Peng, J., & de la Fuente-Nunez, C. (2024). Deep-learning-enabled antibiotic discovery through molecular de-extinction. Nat Biomed Eng, 8(7), 854-871. https://doi.org/10.1038/s41551-024-01201-x

Wan, F., Wong, F., Collins, J. J., & de la Fuente-Nunez, C. (2024). Machine learning for antimicrobial peptide identification and design. Nat Rev Bioeng, 2(5), 392-407. https://doi.org/10.1038/s44222-024-00152-x

Wang, B., Lin, P., Zhong, Y., Tan, X., Shen, Y., Huang, Y., Jin, K., Zhang, Y., Zhan, Y., Shen, D., Wang, M., Yu, Z., & Wu, Y. (2025). Explainable deep learning and virtual evolution identifies antimicrobial peptides with activity against multidrug-resistant human pathogens. Nat Microbiol, 10(2), 332-347. https://doi.org/10.1038/s41564-024-01907-3

Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2016). APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. Nucleic Acids Res, 44(D1), D1087-1093. https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278

Wang, J., Feng, J., Kang, Y., Pan, P., Ge, J., Wang, Y., Wang, M., Wu, Z., Zhang, X., Yu, J., Zhang, X., Wang, T., Wen, L., Yan, G., Deng, Y., Shi, H., Hsieh, C. Y., Jiang, Z., & Hou, T. (2025). Discovery of antimicrobial peptides with

notable antibacterial potency by an LLM-based foundation model. Sci Adv, 11(10), eads8932. https://doi.org/10.1126/sciadv.ads8932

Wang, L., Fu, X., Yang, J., Zhang, X., Ye, X., Sakurai, T., Zeng, X., & Liu, Y. (2024). MOFormer: Multi-Objective Antimicrobial Peptide Generation through Conditional Transformer with Multi-Fusion Descriptors. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4990322/v1

Wang, L., Liu, Y., Fu, X., Ye, X., Shi, J., Yen, G. G., Zou, Q., Zeng, X., & Cao, D. (2025). HMAMP: Designing Highly Potent Antimicrobial Peptides Using a Hypervolume-Driven Multiobjective Deep Generative Model. J Med Chem, 68(8), 8346-8360. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.4c03073

Wang, R., Wang, T., Zhuo, L., Wei, J., Fu, X., Zou, Q., & Yao, X. (2024). Diff-AMP: tailored designed antimicrobial peptide framework with all-in-one generation, identification, prediction and optimization. Brief Bioinform, 25(2). https://doi.org/10.1093/bib/bbae078

Wang, X. F., Tang, J. Y., Sun, J., Dorje, S., Sun, T. Q., Peng, B., Ji, X. W., Li, Z., Zhang, X. E., & Wang, D. B. (2024). ProT-Diff: A Modularized and Efficient Strategy for De Novo Generation of Antimicrobial Peptide Sequences by Integrating Protein Language and Diffusion Models. Adv Sci (Weinh), 11(43), e2406305. https://doi.org/10.1002/advs.202406305

Wang, Y., Zhao, L., Li, Z., Xi, Y., Pan, Y., Zhao, G., & Zhang, L. (2025). A generative artificial intelligence approach for the discovery of antimicrobial peptides against multidrug-resistant bacteria. Nat Microbiol, 10(11), 2997-3012. https://doi.org/10.1038/s41564-025-02114-4

Watson, J. L., Juergens, D., Bennett, N. R., Trippe, B. L., Yim, J., Eisenach, H. E., Ahern, W., Borst, A. J., Ragotte, R. J., Milles, L. F., Wicky, B. I. M., Hanikel, N., Pellock, S. J., Courbet, A., Sheffler, W., Wang, J., Venkatesh, P., Sappington, I., Torres, S. V., . . . Baker, D. (2023). De novo design of protein structure and function with RFdiffusion. Nature, 620(7976), 1089-1100. https://doi.org/10.1038/s41586-023-06415-8

Wong, F., Zheng, E. J., Valeri, J. A., Donghia, N. M., Anahtar, M. N., Omori, S., Li, A., Cubillos-Ruiz, A., Krishnan, A., Jin, W., Manson, A. L., Friedrichs, J., Helbig, R., Hajian, B., Fiejtek, D. K., Wagner, F. F., Soutter, H. H., Earl, A. M., Stokes, J. M., . . . Collins, J. J. (2024). Discovery of a structural class of antibiotics with explainable deep learning. Nature, 626(7997), 177-185. https://doi.org/10.1038/s41586-023-06887-8

Xu, J., Li, F., Leier, A., Xiang, D., Shen, H. H., Marquez Lago, T. T., Li, J., Yu, D. J., & Song, J. (2021). Comprehensive assessment of machine learning-

based methods for predicting antimicrobial peptides. Brief Bioinform, 22(5). https://doi.org/10.1093/bib/bbab083

Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature, 415(6870), 389-395. https://doi.org/10.1038/415389a

Zhang, Y., Tang, S., Chen, T., Mahood, E., Vincoff, S., & Chatterjee, P. (2026). PeptiVerse: A unified platform for therapeutic peptide property prediction. Nature Communications, 17(1), 6819. https://doi.org/10.1038/s41467-026-74167-w

BÖLÜM 2

SENTETİK BİYOLOJİ VE GENOM MÜHENDİSLİĞİNDE GELİŞMELER: MİKROBİYAL GENOM TASARIMI, PROGRAMLANABİLİR HÜCRE VE GEN REGÜLASYONU

AYŞE NUR PEKTAŞ[1]

Giriş

Sentetik biyoloji 2024-2026 aralığında genom ölçeğinde yazma kapasitesine ulaşmıştır: 57 kodonlu bir *Escherichia coli* genomu kimyasal olarak sentezlenmiş, ilk sentetik ökaryot genomu (Sc2.0) tamamlanmış, köprü RNA gibi birleşik yeniden düzenleme mekanizmaları tanımlanmış ve genom dil modelleri deneysel olarak canlı bakteriyofaj genomları üretmiştir. Bu bölüm söz konusu literatürü mikrobiyal genom tasarımı, programlanabilir hücre mimarileri ve gen regülasyonunun mühendislik düzeyinde denetimi ekseninde tek bir metodolojik çerçevede ele almakta, alanın öngörülebilirlik, standardizasyon ve biyogüvenlik darboğazlarını tartışmaktadır.

[1]Dr. Öğr. Gör., Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, CÜTAM, Orcid: 0000-0001-5621-2844

Okuma Biyolojisinden Yazma Biyolojisine

Moleküler biyolojinin son yirmi yılı, dizileme maliyetinin düşmesiyle tanımlanan bir okuma dönemiydi. Sentetik biyolojinin iddiası ise biyolojik sistemlerin betimlenmekle kalmayıp tasarlanabileceğidir. Bu iddianın ilk somut kanıtı, 2010'da kimyasal olarak sentezlenmiş bir *Mycoplasma mycoides* genomunun alıcı hücreye aktarılarak bölünebilir bir organizma üretilmesidir (Gibson ve ark., 2010). 2016'da aynı grup, genomu 531 kb ve 473 gene indirgenmiş JCVI-syn3.0 ile laboratuvar koşullarında çoğalabilen en küçük genomu oluşturmuştur (Hutchison ve ark., 2016).

Bu iki çalışma alanın kurucu sorularını da ortaya çıkarmıştır. Bunlardan birincisi ölçek sorusudur: bir genomu ne kadar büyük ve ne kadar farklı tasarlayabiliriz? İkincisi ise bilgi sorusudur. JCVI-syn3.0'ın 473 geninden 149'unun biyolojik işlevi tanımlanamamıştı (Hutchison ve ark., 2016). Bu dönemde yaşamın asgari bileşen listesi yazılabilmiş, ancak tümüyle açıklanamamıştır.

Ölçek sorusunda 2024-2026 aralığında belirgin bir eşik aşılmıştır. Kodon sıkıştırma hattı, 61 kodonlu Syn61'den (Fredens ve ark., 2019) 57 kodonlu Syn57'ye ilerlemiş ve 4 Mb'lık bir bakteri genomunda 100.000'den fazla kodon değişikliği tek organizmada birleştirilmiştir (Robertson ve ark., 2025). Ökaryot tarafında Sc2.0 konsorsiyumu, 16 sentetik kromozom ve doğada bulunmayan bir tRNA neokromozomundan oluşan sentetik maya genomunun son kromozomunu tamamlamıştır (Goold ve ark., 2025; Richardson ve ark., 2017; Zhao ve ark., 2023). Araç tarafında IS110 ailesi köprü RNA'ları ekleme, çıkarma ve ters çevirme işlemlerini tek bir programlanabilir mekanizmada toplamıştır (Durrant ve ark., 2024; Hiraizumi ve ark., 2024). Tasarım tarafında ise genom dil modelleri bütün bir bakteriyofaj genomunu sıfırdan üretmiş ve bu diziler deneysel olarak canlı virüs vermiştir (Brixi ve ark., 2026; King ve ark., 2026).

Bu bölüm literatürü üç eksende ele almaktadır: (i) mikrobiyal genom tasarımı, yani indirgeme, yeniden kodlama ve *de novo* sentez; (ii) programlanabilir hücre, yani genetik devreler, mantıksal denetim ve sentetik hücre mimarileri; (iii) gen regülasyonunun programlanması, yani transkripsiyonel, epigenetik ve RNA düzeyindeki denetim katmanları. Bölüm boyunca tekrar eden metodolojik soru şudur: tasarımın öngörülebilirliği hangi noktada kırılmakta ve bu kırılma nasıl ölçülmektedir?

Minimal Genom ve Tasarım Problemleri

Genom tasarımının teorik çerçevesini, "temel gen" (essential gene) kavramının sanıldığından daha kaygan olması belirler. JCVI-syn3.0, üç tasarım-sentez-test döngüsünün sonunda 531 kb genom ve 473 gen ile, doğada kendi başına çoğalabilen herhangi bir hücreden daha küçük bir genoma ulaşmıştır (Hutchison ve ark., 2016). Ancak bu genomun 149 geni, yoğun incelemeye karşın herhangi bir biyolojik işleve atanamamıştır; yaşam için gerekli genlerin yaklaşık üçte biri işlevsel olarak karanlıkta kalmıştır. JCVI ekibi sonraki yıllarda bu genlerin önemli bir kısmına işlev atadığını bildirmiştir, ancak süreç tamamlanmamıştır.

Belirsizliğin metodolojik kaynağı, temel olmanın koşula bağlı bir özellik olmasıdır. Transpozon mutagenezi ile "gerekli değil" olarak etiketlenen bir gen, zengin besiyerinde gereksizken başka bir koşulda vazgeçilmez olabilir. JCVI hattı bu nedenle ikili değil üçlü bir sınıflandırma kullanmıştır: temel, yarı-temel (hızlı büyüme için gerekli) ve gereksiz genler (Hutchison ve ark., 2016). Tek gen taramalarının yapısal kör noktası ise sentetik ölümcüllüktür, yani aynı işlevi ayrı ayrı karşılayan iki genin birlikte silinememesidir.

Minimal hücrenin kullanılabilir bir şasiye dönüşmesi, indirgemenin kısmen geri alınmasıyla mümkün olmuştur. JCVI-syn3A ve JCVI-syn3B suşları syn3.0'a 19 gereksiz gen eklenerek elde edilmiş, bu ekleme normal hücre bölünmesini ve yabanıl tip morfolojisini geri

getirmiştir (Pelletier ve ark., 2021). JCVI-syn3B ayrıca Cre rekombinaz aracılı gen eklemeyi kolaylaştıran ikili loxP iniş alanı taşır. Çalışmanın yan ürünü olarak, bölünme için gerekli olduğu gösterilen genlerden beşinin işlevinin daha önce hiç bilinmediği ortaya çıkmıştır (Pelletier ve ark., 2021).

Minimal genom aynı zamanda bütün hücre modellemesinin referans sistemi haline gelmiştir. Minimal hücrenin akı dengesi (flux balance) ve kinetik tüm hücre modelleri, genomdan fenotipe giden hesaplamalı bağlantının sınanabildiği ilk örnekler arasındadır (Breuer ve ark., 2019; Thornburg ve ark., 2022). Öte yandan indirgenmiş genom evrimsel kapasiteyi ortadan kaldırmamakta, laboratuvar evrimi altında minimal hücre uygunluk kaybını telafi edebilmektedir (Moger-Reischer ve ark., 2023). Tasarlanmış bir genom, tasarımcının öngörmediği yönlerde değişebilir. Bölümün ilerleyen kısmında ele alınacak evrimsel kararsızlık sorunu buradan doğmaktadır.

Mikrobiyal indirgeme çalışmaları *Mycoplasma* ile sınırlı değildir. *E. coli* MDS42 gibi azaltılmış genomlu suşlar, hareketli genetik öğelerin ve kriptik profajların çıkarılmasıyla daha kararlı ve daha öngörülebilir konaklar sağlamış (Pósfai ve ark., 2006), MDS42 sonraki yeniden kodlama çalışmalarında başlangıç genomu olarak kullanılmıştır (Robertson ve ark., 2025). Buradaki genel ilke şudur: indirgeme kendi başına bir amaç değil, öngörülebilirliği artırma ve genomda tasarım için yer açma stratejisidir.

Genom Mühendisliği Araçlarının Karşılaştırmalı Haritası

Genom tasarımında kullanılan araçlar, yaptıkları düzenlemenin ölçeğine ve mekanizmasına göre altı alt yönteme ayrılır. Aşağıdaki tablo her yöntemin örnek çalışmasını, mekanizmasını, tipik düzenleme ölçeğini ve karakteristik problemlerini özetlemektedir.

Tablo 1. Genom mühendisliği araçları

Yöntem	Örnek çalışma	Mekanizma	Tipik ölçek	Dezavantajları
Recombineering / MAGE	MAGE (Wang ve ark., 2009); λ-Red recombineering	Tek zincirli oligonükleotidlerin replikasyon çatalına eşlenmesi, döngüsel yinelemeyle kombinatoryal çeşitlilik	Nokta mutasyonundan birkaç yüz bç'ye kadar, çok bölgeli eşzamanlı	Konak bağımlılığı; istenmeyen off-target mutasyon yükü
CRISPR-Cas nükleaz	Cas9 temelli düzenleme (Jinek ve ark., 2012)	RNA güdümlü çift zincir kırığı ve konak onarım yolakları	Nakavt, küçük ekleme/silme	Çift zincir kırığına bağlı onarım sonucunun öngörülemezliği; bakteride NHEJ eksikliği nedeniyle ölümcül seçilim baskısı
Baz düzenleme	Sitozin ve adenin baz düzenleyiciler (Komor ve ark., 2016)	Katalitik olarak etkisizleştirilmiş Cas ve deaminaz birleşimi; kırıksız nokta değişimi	Tek bazdan birkaç baza kadar	Yalnızca belirli geçiş mutasyonları; yan pencere (bystander) düzenlemesi
Prime editing ve türevleri	Prime editing (Anzalone ve ark., 2019); PASTE / ikiz prime editing (Anzalone ve ark., 2022)	Ters transkriptaz ile şablonlu yazım; entegraz eşlenmesiyle büyük kaset ekleme	Nokta değişiminden ~10 kb'a	Verim düşüklüğü; pegRNA tasarımının ampirik kalması
Transpozon ve rekombinaz temelli yerleştirme	CRISPR ilişkili transpozonlar (Klompe ve ark., 2019; Strecker ve ark., 2019); IS110 köprü RNA'ları (Durrant ve ark., 2024; Hiraizumi ve ark., 2024)	Hedefe güdümlü transpozisyon ya da çift özgüllüklü RNA ile köprülenen bölge-özgül rekombinasyon	Birkaç kb'lık kasetler; ekleme, çıkarma, ters çevirme	Hedef dışı yerleşim oranı; ökaryot bağlamında verim ve özgüllüğün optimizasyonu
Genom parçası değişimi	REXER / uREXER (Wang ve ark., 2016);	CRISPR-Cas9 ile genomik bölgenin kesilip sentetik DNA ile tek	100 kb mertebesinde parçalar	Sentez ve montaj maliyeti; her adımda uygunluk

Yöntem	Örnek çalışma	Mekanizma	Tipik ölçek	Dezavantajları
	sentetik genom montajı (Robertson ve ark., 2025)	adımda değiştirilmesi		kaybının birikmesi

Bu yöntemlerin sınırları pratikte geçişkendir ve son yıllardaki eğilim birleştirme yönündedir. Köprü RNA sistemi bu eğilimin en açık örneğidir. IS110 köprüleri hareketli genetik öğelerin kodladığı yapısal kodlamayan RNA, biri hedef DNA'ya biri donör DNA'ya eşlenen iki programlanabilir ilmek taşır; ekleme, çıkarma ve ters çevirme böylece tek mekanizmada toplanır (Durrant ve ark., 2024). Kriyo-elektron mikroskobu çalışmaları, çift özgüllüklü RNA'nın rekombinaz üzerinde hedef ve donör özgüllüğünü nasıl kurduğunu üç ayrı reaksiyon evresinde göstermiştir (Hiraizumi ve ark., 2024). Rekombinaz her iki DNA zincirini kesik parçaları serbest bırakmadan birleştirdiği için konak onarım yolaklarına bağımlılık ortadan kalkmaktadır (Durrant ve ark., 2024).

Aynı birleşme eğilimi genom ölçeğinde de görülür. Syn57'nin inşasında kullanılan uREXER, CRISPR-Cas9 ile λ-Red rekombinasyonunu tek adımda birleştirerek genomik DNA'yı sentetik DNA ile değiştirmekte ve 100 kb'lık parçaların yinelemeli olarak genoma yerleştirilmesini sağlamaktadır (Robertson ve ark., 2025; Wang ve ark., 2016). Üç ayrı araç ailesi, yani nükleaz, recombineering ve kimyasal sentez, tek bir hatta çalışmaktadır.

Sentetik Genom Yazımı: Yeniden Kodlama ve *De Novo* Sentez

Genom yazımı iki amaca hizmet eder: birincisi genomu daha kararlı ve daha öngörülebilir hale getirmek, ikincisi de genetik kodun kendisini değiştirerek doğada bulunmayan kimyaya yer açmak. 2024-2026 literatürünün en belirgin sonuçları ikinci amaç etrafında toplanmıştır.

- **Kodon sıkıştırma: Syn61'den Syn57'ye**

Standart genetik kod 64 kodon kullanır, oysa 20 aminoasit ve bir durdurma sinyali için 21 anlam yeterlidir. Bu fazlalık, kodonların yeniden atanabileceği bir tasarım alanı açar. Sentetik genom hattı söz konusu alanı aşamalı olarak daraltmıştır. 2019'da Syn61, serin kodonları TCG ve TCA ile durdurma kodonu TAG'ın eşanlamlılarıyla değiştirilmesi yoluyla 18.214 kodon değişikliği taşıyan, 61 kodon kullanan bir *E. coli* üretmiştir (Fredens ve ark., 2019). Serbestleşen kodonlar daha sonra kanonik olmayan aminoasitlere atanmış ve bu suşların viral enfeksiyona dirençli hale gelebildiği gösterilmiştir (Robertson ve ark., 2025).

Syn57, aynı stratejinin bugüne kadarki en uç uygulamasıdır. Dört serin kodonu, iki alanin kodonu ve bir durdurma kodonu genom genelinde eşanlamlılarıyla değiştirilmiş, 4 Mb'lık genomda 101.000'den fazla kodon değişikliği yapılmıştır (Robertson ve ark., 2025). Tasarım MDS42 genomu üzerine kurulmuş ve her biri yaklaşık 100 kb olan 38 parçaya bölünmüştür. Parçalar uREXER ile tek tek genoma aktarılmış, sorunlu bölgeler her adımda haritalanıp düzeltilmiş, yarı-sentetik suşlar bakteriyel çiftleşme yoluyla yakınsak biçimde tek bir tümüyle sentetik suşta birleştirilmiştir (Robertson ve ark., 2025).

Çalışmanın iki bulgusu metodolojik tartışmayı doğrudan ilgilendirir. Uygunluk bedeli ciddi ama ölümcül değildir: birincisi Syn57 yabanıl tipten belirgin biçimde yavaş büyümekte, buna karşın laboratuvar karakterizasyonuna izin verecek düzeyde çoğalmaktadır. İkinci bulgu, serbestleşen yedi kodonun kanonik olmayan aminoasitlere atanmasıyla sentetik polimer ve makrosiklik bileşik üretimine alan açılmasıdır (Robertson ve ark., 2025). Bu hat, Church grubunun genomun yaklaşık üçte ikisinde 57 kodonlu tasarımı sınadığı çalışmanın (Ostrov ve ark., 2016) ve TAG kodonunun genom genelinde silinmesiyle başlayan daha erken çalışmaların (Lajoie ve ark., 2013) devamıdır.

- **Sentetik ökaryot genomu: Sc2.0**

Sc2.0, *Saccharomyces cerevisiae*'nin 16 kromozomunun tümünü yeniden tasarlayıp kimyasal olarak sentezlemeyi amaçlayan uluslararası bir konsorsiyum çalışmasıdır. Tasarım ilkeleri 2017'de yayımlanmıştır: genom yaklaşık %8 küçültülmüş, tekrar öğeleri ve intronlar çıkarılmış, üç durdurma kodonundan ikisi tek bir kodona indirgenmiş, tRNA genleri doğada bulunmayan ayrı bir neokromozoma taşınmış ve her gen loxPsym bölgeleriyle çevrelenerek SCRaMbLE adı verilen indüklenebilir yeniden düzenleme sistemi kurulmuştur (Dymond ve ark., 2011; Richardson ve ark., 2017).

SCRaMbLE tasarımın en özgün bileşenidir. Cre rekombinazın indüklenmesiyle genom kendi üzerinde silme, çoğaltma ve ters çevirme işlemleri yapar ve kombinatoryal bir çeşitlilik havuzu üretir (Dymond ve ark., 2011). Sc2.0 bu haliyle sabit bir tasarım olmaktan çok, yönlendirilmiş evrim için programlanmış bir şasidir.

2023'te birden fazla sentetik kromozomun tek suşta birleştirilmesi ve ortaya çıkan büyüme kusurlarının ayıklanması raporlanmış (Zhao ve ark., 2023), Ocak 2025'te 903 kb'lık synXVI kromozomunun inşası ve yinelemeli yeniden tasarımıyla projenin son kromozomu tamamlanmıştır (Goold ve ark., 2025). Konsorsiyumun on yıllık deneyimi 2025 sonunda yöntemsel bir sentez makalesinde derlenmiştir (Erpf ve ark., 2025).

Sc2.0'ın açık sorusu uygunluktur. Sentetik kromozomlar tek tek işlevsel olsa da tümünün tek hücrede birleştirilmesiyle elde edilecek suşun yabanıl tip büyüme hızına ulaşıp ulaşmayacağı henüz gösterilmemiştir. Birleştirme sırasında ortaya çıkan kusurların CRISPR temelli hata ayıklama protokolleriyle düzeltilmesi standart bir adım haline gelmiştir (Goold ve ark., 2025; Zhao ve ark., 2023).

- **Genetik güvenlik duvarı olarak yeniden kodlama**

Yeniden kodlamanın üçüncü işlevi biyolojik yalıtımdır. Genetik kodu değiştirilmiş bir organizmada viral genomlar doğru çevrilemez; buna karşılık organizmanın genleri de yabanıl tip hücrelerde işlevsiz kalır. Bu çift yönlü yalıtım hem viral enfeksiyona direnç hem de yatay gen aktarımına karşı bariyer sağlar (Nyerges ve ark., 2023; Robertson ve ark., 2021). Kodon atamalarının takas edildiği tasarımlar, viral enfeksiyonu ve gen aktarımını aynı anda engelleyen bir çerçeve olarak önerilmiştir (Nyerges ve ark., 2023). Syn57'de serbestleşen kodon sayısının artması, bu güvenlik duvarının daha sıkı kurulmasına imkân tanımaktadır (Robertson ve ark., 2025).

Stratejinin sınırı kaçak çeviri (mistranslation) ve baskılayıcı tRNA mutasyonlarıdır. Yeterince uzun süreli seçilim altında organizmanın kaybettiği kodon okuma kapasitesini kısmen geri kazanması teorik olarak mümkündür. Yalıtımın dayanıklılığı, uzun süreli evrim deneyleriyle sınanması gereken bir parametredir.

Programlanabilir Hücre: Devreler, Mantık ve Sentetik Şasi

Genom yazımı bir donanım sorunuysa, programlanabilir hücre yazılım sorunudur. Alanın kurucu iki çalışması 2000 yılında aynı sayıda yayımlanmıştır: baskılayıcıların halka biçiminde bağlandığı salınımlı devre (repressilator) (Elowitz & Leibler, 2000) ve iki karşılıklı baskılayıcıdan oluşan genetik anahtar (Gardner ve ark., 2000). Bu iki devre, hücresel davranışın elektronik devre benzetmesiyle tasarlanabileceği iddiasının deneysel temelini kurmuştur.

- **Devre tasarımının otomasyonu**

İlk devreler elle tasarlanmıştı; ölçeklenme sorunu tasarım otomasyonunu zorunlu kılmıştır. Cello, Verilog benzeri bir donanım tanımlama dilinde yazılan mantıksal spesifikasyonu, karakterize edilmiş parçalardan oluşan bir kütüphaneden derleyerek *E. coli* için

DNA dizisi üreten bir derleyicidir (Nielsen ve ark., 2016). Yaklaşımda belirleyici olan, parçaların transfer fonksiyonlarının ölçülmüş olması ve derleyicinin bu ölçümleri kullanarak sinyal uyumsuzluklarını önceden hesaplamasıdır (Nielsen ve ark., 2016). Sonraki sürümler parça kütüphanesini ve konak yelpazesini genişletmiştir (Jones ve ark., 2022).

Cello'nun açığa çıkardığı temel problem, devre karmaşıklığı arttıkça başarı oranının düşmesidir. Nedenleri parçalar arası çapraz konuşma (crosstalk), konak üzerindeki metabolik yük ve bağlam bağımlılığıdır; son terim, aynı promotörün farklı dizi bağlamlarında farklı davranmasını anlatır (Brophy & Voigt, 2014). Bu problemler öngörülebilirlik sorununun devre düzeyindeki görünümüdür.

- **Memeli hücrelerinde mantıksal denetim**

Mikrobiyal devre tasarımının memeli hücrelerine aktarılması, hücresel terapinin güvenlik profilini değiştirmiştir. synNotch reseptörleri, doğal Notch reseptörünün proteolitik anahtarlama mekanizmasını kullanarak isteğe bağlı bir dış sinyali isteğe bağlı bir transkripsiyonel çıktıya bağlar; hücre böylece tasarlanmış bir girdi-çıktı ilişkisi kazanır (Morsut ve ark., 2016). Bu mimari T hücrelerine kombinatoryal antijen tanıma yeteneği kazandırmış, tek bir antijen yerine antijen örüntüsüne yanıt veren, yani mantıksal VE kapısı gibi davranan tümör tanıma devrelerinin kurulmasını sağlamıştır (Roybal ve ark., 2016).

Buradaki tasarım mantığı, antimikrobiyal peptid tasarımındaki çok amaçlı optimizasyonla aynıdır: tek bir parametreyi, yani etkinliği en üst düzeye çıkarmak yerine etkinlik ile seçiciliği birlikte optimize etmek. Hücresel terapide seçicilik, sağlıklı dokuda aynı antijeni taşıyan hücrelerin korunması anlamına gelir.

- **Aşağıdan yukarıya sentetik hücre**

Genom indirgeme, yaşayan bir hücreyi sadeleştirerek minimal şasiye ulaşır; aşağıdan yukarıya (bottom-up) yaklaşım ise cansız bileşenlerden hücre benzeri sistemler kurar. Bu hattın modülleri uzun süredir ayrı ayrı gösterilmiştir: fosfolipid vezikülleri, hücresiz transkripsiyon-translasyon sistemleri, DNA replikasyonu ve bölünme mekanizmaları şeklinde ve burada darboğaz modüllerin entegrasyonundadır.

2026'da yayımlanan bir çalışma bu entegrasyonda somut bir adım atmıştır. Altı protein kodlayan sentetik bir genom hem DNA replikasyon makinesini hem de fosfolipid biyosentez yolağını kodlayacak biçimde tasarlanmış ve vezikül içinde kendi kendini kopyalayan bir sistem kurulmuştur (Restrepo Sierra ve ark., 2026). Çalışmanın bulgusu, DNA replikasyonu ile lipid sentezi arasındaki dengenin genetik etkenlerce güçlü biçimde denetlendiğidir.

Alanın örgütlenme düzeyi de değişmektedir. 2026'da açıklanan on yıllık yol haritası iki aşama tanımlar: birinci aşamada en az 200 genlik minimal genom taşıyan ve proteinlerinin %90'ından fazlasını hücresiz sistemle üreten bir "proto-hücre", ikinci aşamada ribozomunu kendi genomundan yenileyebilen ve en az on ardışık büyüme-bölünme döngüsünü tamamlayabilen bir "oto-hücre" yapmaktır . Yol haritasının saptadığı dört sorun, yani metabolik süreklilik, ribozom özerkliği, modüler tasarım kuralları ve uzamsal-zamansal eşgüdüm, aşağıdan yukarıya yaklaşımın açık problemlerinin şu andaki en derli toplu ifadesidir (https://english.siat.ac.cn/news/sr/202605/t20260527_1159970.html).

- **Tek hücreden konsorsiyuma**

Tek bir hücreye yüklenen devre karmaşıklığı metabolik yükü hızla artırır. Buna karşı geliştirilen strateji, işlevin birden fazla suş arasında bölüştürülmesidir: her suş devrenin bir modülünü taşır, suşlar arası iletişim küçük moleküllerle kurulur (Brenner ve ark.,

2008). Tanımlı sosyal etkileşimlerle tasarlanan konsorsiyumlar, tek suşla elde edilemeyen kararlı davranışlar üretebilmektedir (Kong ve ark., 2018). Konsorsiyum tasarımının da kendi sınırlamaları vardır: suş oranlarının zaman içinde kayması ve rekabet üstünlüğü olan bir üyenin diğerlerini baskılaması, uzun süreli kararlılığı sınırlar.

Gen Regülasyonunun Programlanması

Genomu yeniden yazmak, hücre davranışını denetlemenin en maliyetli yoludur. Çoğu uygulamada gereken, dizinin değişmesi değil ifadenin ayarlanmasıdır. Regülasyon mühendisliği bu nedenle genom mühendisliğinden ayrı ve ondan daha hızlı ilerleyen bir koldur. Üç denetim katmanı birbirinden kalıcılık, tersinirlik ve çözünürlük açısından ayrılır.

- **Transkripsiyonel denetim: CRISPRi ve CRISPRa**

Katalitik olarak etkisizleştirilmiş Cas9'un (dCas9) bir promotör bölgesine yönlendirilmesi, RNA polimerazın ilerlemesini sterik olarak engelleyerek diziyi değiştirmeden ifadeyi bastırır; bu yaklaşım CRISPR interferansı (CRISPRi) olarak adlandırılır (Qi ve ark., 2013). dCas9'a aktivatör ya da baskılayıcı efektör alanlar eklenmesiyle aynı platform iki yönlü çalışır hale gelmiş, genom ölçeğinde baskılama ve aktivasyon taramaları mümkün olmuştur (Gilbert ve ark., 2014). RNA iskeleleri kullanılarak tek bir dCas9 havuzunun farklı hedeflerde farklı efektörler taşıması, yani çok yönlü transkripsiyonel programlar kurulması da gösterilmiştir (Zalatan ve ark., 2015).

CRISPRi'nin mikrobiyal genom tasarımındaki özel değeri, temel genlerin incelenebilmesidir. Silinemeyen bir gen CRISPRi ile kademeli olarak baskılanabilir; "temel/gereksiz" ikili sınıflandırması böylece sürekli bir doz-yanıt ilişkisine dönüşür. Bu durum daha önce tartışılan temel gen belirsizliğine doğrudan bir yöntemsel yanıttır.

- **Epigenetik denetim ve klinik translasyon**

Transkripsiyonel baskılamanın sınırı geçiciliğidir: efektör ortadan kalktığında ifade geri döner. Epigenom düzenleme bu sınırı aşar. dCas9'a DNA metiltransferaz ve histon modifiye edici alanlar eklenerek kurulan sistemler, hedef bölgeye kalıcı baskılayıcı işaretler bırakır ve efektörün kendisi ortadan kalktıktan sonra da sürebilen bir "transkripsiyonel bellek" oluşturur (Nuñez ve ark., 2021). Dizide kesik açılmadığı için genotoksisite riski kesme temelli düzenlemeye kıyasla daha düşüktür ve işaretler prensipte geri alınabilir.

Bu yaklaşım 2025-2026 aralığında kliniğe taşınmıştır. Kronik hepatit B'de iyileşmenin önündeki temel engel, hücre çekirdeğinde kalıcı olan kovalent kapalı dairesel DNA'dır (cccDNA) ve mevcut tedavilerin çoğu bu rezervuarı doğrudan susturmaz. TUNE-401 adlı epigenetik susturucu, lipid nanopartikül ile iletilen bir epigenom düzenleme yapısı kullanarak bu rezervuarı hedeflemiş; faz 1b/2a çalışmasında HBsAg, pgRNA, HBeAg ve HBcrAg dahil tüm HBV biyobelirteçlerinde doza bağlı ve kalıcı baskılanma raporlanmıştır. Çalışma, insanlarda doğrudan epigenetik susturmanın ilk klinik kanıtı olarak sunulmuştur (https://tunetx.com/wp-content/uploads/2026/05/TUNE-401-EASL2026_4Web-vr2.pdf).

Konunun genel çerçevesi açısından burada belirleyici olan, mikrobiyal sentetik biyolojide geliştirilen bir denetim mimarisinin, yani dCas9 ile efektör birleşiminin klinik bir ürüne dönüşmesidir. Aynı mimarinin kalıcılık süresi, hedef dışı metilasyon profili ve uzun dönem güvenliği henüz açık sorulardır.

- **RNA düzeyinde denetim**

Üçüncü katman denetimi DNA'dan RNA'ya taşır. Doğal riboswitchler, mRNA'nın 5' uçlarındaki yapısal elemanların küçük moleküllerle etkileşime girerek çeviriyi ya da transkripsiyonun sonlanmasını denetlemesi ilkesine dayanır (Winkler & Breaker, 2005). Toehold anahtarları ise aynı ilkeyi tümüyle tasarlanmış

dizilerle yeniden kurar: hedef RNA'nın varlığı, ribozom bağlanma bölgesini açan bir yapısal değişimi tetikler ve neredeyse herhangi bir RNA dizisi bir çeviri anahtarına dönüştürülebilir (Green ve ark., 2014).

Bu katmanın pratik üstünlüğü hızı ve hücresiz ortamda çalışabilmesidir. Kağıt üzerine kurutulmuş hücresiz genetik ağlar, saha koşullarında düşük maliyetli viral tanı araçlarına dönüştürülmüş ve Zika virüsü tespitinde gösterilmiştir (Pardee ve ark., 2016). Sentetik biyoloji burada canlı bir organizma gerektirmeden bir denetim programı yürütmekte, bu durum da biyogüvenlik açısından avantajlı bir mimari sunmaktadır.

- **Katmanların karşılaştırmalı değerlendirmesi**

Üç katman birbirinin alternatifi değil, farklı tasarım gereksinimlerinin yanıtıdır. Transkripsiyonel denetim hızlı ve tersinirdir, ancak sürekli efektör ifadesi gerektirir ve metabolik yük yaratır. Epigenetik denetim tek seferlik uygulamayla kalıcılık sağlar, karşılığında tersinirliğin denetimi ve hedef dışı işaretlerin ölçümü zorlaşır. RNA düzeyinde denetim en kısa yanıt süresine ve en düşük genomik riske sahiptir, dinamik aralığı ve kararlılığı ise daha sınırlıdır. İleri tasarımlar pratikte bu katmanları birleştirmektedir; kalıcı bir epigenetik durumun RNA düzeyinde bir sensörle tetiklenmesi bunun örneğidir.

Yapay Zeka Destekli Tasarım: Genom Dil Modelleri

Sentetik biyolojinin tarihsel darboğazı tasarım değil, tasarım-test döngüsünün yavaşlığıdır. Üretken modeller bu döngüye iki noktadan girmektedir: birincisi aday dizileri üretmek ve ikincisi ise hangi adayın sentezlenmeye değer olduğunu öngörmektir.

- **Protein ölçeğinden genom ölçeğine**

Protein tasarımında üretken modeller olgunlaşmış durumdadır. Yapı tahmini ve difüzyon temelli *de novo* tasarım,

işlevsel proteinlerin deneysel doğrulama öncesinde daraltılmasını mümkün kılmış (Abramson ve ark., 2024; Jumper ve ark., 2021; Watson ve ark., 2023), protein dil modelleri dizi uzayını örneklenebilir hale getirmiştir (Madani ve ark., 2023). Ancak protein bir parçadır, genom bir sistemdir. Gen sırası, düzenleyici elemanların yerleşimi, paketleme sinyalleri ve genler arası etkileşimler parça parça optimize edilerek elde edilemez.

Genom dil modelleri bu boşluğu hedefler. Evo, moleküler ölçekten genom ölçeğine kadar dizi modelleme ve tasarımı tek mimaride ele alan ilk örneklerden biridir ve milyonlarca prokaryot ve faj genomu üzerinde eğitilmiştir (Nguyen ve ark., 2024). Evo 2, eğitim verisini yaşamın tüm alanlarına genişleterek yaklaşık 9,3 trilyon nükleotide ve 128.000 civarında organizmaya çıkmıştır (Brixi ve ark., 2026). Modelin belirleyici teknik özelliği uzun bağlam kapasitesidir: 5,4 kb'lık bir faj genomu modelin bağlam penceresine bütün olarak sığar, dolayısıyla gen sırası ve düzenleyici yerleşim eşzamanlı olarak modellenir (King ve ark., 2026).

- **Üretken genom tasarımının deneysel doğrulanması**

Alanın kritik eşiği, üretilen dizilerin canlı sistemlerde işlev görüp görmediğidir. 2026'da yayımlanan çalışmada Evo 1 ve Evo 2, ΦX174 litik fajı tasarım şablonu alınarak bütün genom dizileri üretmek üzere kullanılmış, yaklaşık 300 tasarım kimyasal olarak sentezlenmiş ve 16 canlı faj elde edilmiştir. Üretilen fajlardan birinin kapsidinde evrimsel olarak uzak bir DNA paketleme proteini kullandığı kriyo-elektron mikroskobuyla gösterilmiş, birden fazla faj büyüme rekabetinde ve liziz kinetiğinde yabanıl tip ΦX174'ten yüksek uygunluk sergilemiştir. Üretilen fajlardan oluşan bir kokteyl, üç E. coli suşunda ΦX174 direncini hızla aşmıştır (King ve ark., 2026).

Bu sonucun iki okuması vardır. İyimser okuma, genom ölçeğinde üretken tasarımın artık kavramsal değil deneysel bir gerçeklik

olduğudur. Temkinli okuma ise ölçeğin hâlâ çok küçük olduğudur: ΦX174 bilinen en küçük ve sentezi en kolay genomlardan biridir, bir bakteri genomu ise üç mertebe daha büyüktür. Nitekim Evo 2 ile üretilen bakteri genomu taslaklarının kritik bileşenlerden yoksun olduğu ve sentezlenmeleri halinde işlev görmelerinin beklenmediği belirtilmiştir.

- **Düzenleyici dizi tasarımı**

Üretken modellerin daha yakın vadeli ve daha az tartışmalı uygulaması, tam genom değil düzenleyici eleman tasarımıdır. Promotör, güçlendirici ve 5'/3' çevrilmeyen bölgelerin model temelli tasarımı, ifade düzeyinin hedeflenen bir değere ayarlanmasını mümkün kılar; büyük ölçekli dizi-aktivite verileriyle eğitilen modeller doğal dizilerde bulunmayan ifade profilleri üretebilmektedir (Vaishnav ve ark., 2022). Bu durum sinyal uyumsuzluğu sorununun doğrudan çözümüne hizmet eder: derleyicinin ihtiyaç duyduğu transfer fonksiyonuna sahip bir parça, kütüphaneden seçilmek yerine tasarlanabilir hale gelir.

- **Yöntemsel uyarılar**

Genom dil modellerinin değerlendirilmesinde üç sorun öne çıkar. Birincisi başarı oranının paydasıdır: 302 tasarımdan 16 canlı faj, yaklaşık %5'lik bir isabet oranı demektir ve bu oran sentezlenen aday sayısına göre hesaplanmıştır, üretilen dizi sayısına göre değil. İkincisi şablon bağımlılığıdır. Tasarımlar ΦX174 temel alınarak ve doğal dizinin başından kısa bir başlatıcı parça verilerek üretilmiştir; şablonsuz üretimin başarı oranı bilinmemektedir. Üçüncüsü değerlendirme metriklerinin uyumsuzluğudur: dizi yeniliği, sözde-şaşkınlık ve öngörülen işlev gibi hesaplamalı ölçütlerin deneysel canlılıkla ilişkisi kurulmuş değildir. Bu uyarılar, bir önceki bölümde antimikrobiyal peptid üretken modelleri için yapılan değerlendirmeyle birebir örtüşmektedir.

Öngörülebilirlik, Ölçüm ve Standardizasyon Sorunları

Sentetik biyolojinin mühendislik iddiası, parçaların birleştirildiğinde öngörülebilir davranmasına dayanır. Pratikte bu varsayım dört noktada kırılır ve söz konusu kırılmalar alanın en kalıcı metodolojik sorunlarıdır.

- **Bağlam bağımlılığı**

Karakterize edilmiş bir promotörün aktivitesi, yanına yerleştirildiği diziye, plazmid kopya sayısına, konak suşa ve büyüme fazına göre değişir (Cardinale & Arkin, 2012). Bir parçanın transfer fonksiyonu, parçanın değil parça-bağlam çiftinin özelliğidir. Elektronik devre benzetmesinin en zayıf noktası da budur: bir direncin değeri devredeki konumuna göre değişmez, bir promotörünki değişir.

Parça kütüphaneleri bu nedenle ancak sınırlı ölçüde yeniden kullanılabilir. Cello gibi tasarım otomasyonu araçlarının karakterizasyonu belirli bir konak ve belirli bir büyüme koşulu için yapması (Nielsen ve ark., 2016), kısıtın kabul edilmiş halidir; tasarımın başka bir konağa taşınması yeniden karakterizasyon gerektirir.

- **Metabolik yük**

Heterolog ifade, konağın ribozom, tRNA ve enerji havuzunu tüketir. Bu yük yalnızca büyüme hızını düşürmekle kalmaz, devre içindeki modüller arasında dolaylı bir bağlanma da yaratır: aynı konakta ifade edilen iki bağımsız modül, kaynak rekabeti üzerinden birbirini etkiler. Hücresel kapasitenin niceliklendirilmesi ve düşük yüklü tasarımların seçilmesi, bu etkiyi azaltmanın standart yolu haline gelmiştir (Ceroni ve ark., 2015).

Yük sorunu, 5.4'te tartışılan konsorsiyum stratejisinin de gerekçesidir; devreyi birden fazla suşa bölüştürmek tek hücredeki kaynak rekabetini azaltır. Minimal genom yaklaşımı aynı hedefe

farklı yoldan yürür: gereksiz işlevleri kaldırarak kaynakları tasarlanan işleve ayırmak (Hutchison ve ark., 2016).

- **Evrimsel kararsızlık**

Tasarlanmış bir devre konak için çoğu zaman bir yüktür, dolayısıyla devreyi bozan mutasyonlar seçilim avantajı sağlar. Yeterince uzun kültürlerde devre işlevini kaybeder. Mühendislik ürünü ile yaşayan konak arasındaki bu temel çıkar çatışması yalnızca daha iyi tasarımla çözülemez (Sleight ve ark., 2010).

Geliştirilen karşı stratejiler üç başlıkta toplanır: devrenin konağın hayatta kalmasına bağlanması (bağımlılık mimarileri); mutasyon oranını düşüren konak tasarımları, yani hareketli genetik öğelerin ve hata yatkın yolakların çıkarılması (Pósfai ve ark., 2006; Renda ve ark., 2014); tekrar dizilerin azaltılmasıyla rekombinasyon kaynaklı kayıpların önlenmesi. Sc2.0 tasarımında tekrar öğelerinin çıkarılması ve tRNA genlerinin ayrı bir neokromozomda toplanması, aynı mantığın ökaryot genom ölçeğindeki uygulamasıdır (Richardson ve ark., 2017).

- **Ölçüm standardizasyonu ve veri uyumsuzluğu**

Alanın en az ilerleme kaydettiği başlık ölçümdür. Promotör aktivitesi, floresan sinyali veya hücre sayısı gibi temel büyüklükler farklı laboratuvarlarda farklı birimlerde ve farklı kalibrasyonlarla raporlanır. Laboratuvarlar arası karşılaştırma çalışmaları, aynı yapı için elde edilen değerlerin mertebe farkları gösterebildiğini ortaya koymuştur. Referans standartlara dayalı göreli ölçüm protokolleri sorunu kısmen hafifletir (Renda ve ark., 2014).

Tasarım bilgisinin paylaşımı için geliştirilen Sentetik Biyoloji Açık Dili (SBOL) gibi standartlar, parça ve devre tanımlarının makine tarafından okunabilir biçimde değiş tokuş edilmesini amaçlar (Renda ve ark., 2014). Bu standartların benimsenmesi ise kısmi kalmıştır.

Tablonun üretken modeller açısından sonucu doğrudandır. Genom dil modelleri ve devre tasarım otomasyonu, eğitildikleri dizi-aktivite verisinin kalitesiyle sınırlıdır; ölçüm standardizasyonu olmadan bir araya getirilen veri kümelerinde modelin öğrendiği sinyalin bir kısmı biyolojik değil, laboratuvar kaynaklıdır. Bu durum antimikrobiyal peptid veri tabanları için saptanan sorunun sentetik biyolojideki tam karşılığıdır.

Uygulama Alanları ve Translasyonel Darboğazlar

- **Biyoüretim**

Sentetik biyolojinin ticari olarak en olgun kolu metabolik mühendisliktir. Artemisinin öncüsü artemisinik asidin mayada üretilmesi, uzun bir heterolog yolağın yeniden kurulabileceğini gösteren erken ve belirleyici örnektir (Paddon ve ark., 2013; Ro ve ark., 2006). Aynı yaklaşımın daha karmaşık bir uygulaması, opioid öncüllerinin mayada şekerden başlanarak sentezlenmesidir; bu çalışma yirmiden fazla enzimatik adımın tek konakta birleştirilebildiğini göstermiştir (Galanie ve ark., 2015).

Genom tasarımının bu alandaki katkısı doğrudandır. İndirgenmiş genomlu konaklar, kaynakları hedef yolağa ayırarak verimi artırır; yeniden kodlanmış konaklar ise faj kontaminasyonuna dirençli fermentasyon sağlayabilir. Endüstriyel fermentasyonda faj kaynaklı parti kayıpları ciddi bir maliyet kalemi olduğundan, genetik güvenlik duvarının ticari gerekçesi akademik gerekçesinden bağımsızdır.

Alanın kalıcı darboğazı ölçeklendirmedir. Laboratuvar ölçeğinde elde edilen verimlerin endüstriyel fermentörlerde korunması, karışım heterojenliği, oksijen transferi ve uzun fermentasyonlarda evrimsel kararsızlık nedeniyle güvenilir biçimde sağlanamaz (Nielsen & Keasling, 2016).

- **Klinik uygulamalar: mühendislik ürünü canlı biyoterapötikler**

Mühendislik ürünü bakteriler, hastalığa özgü bir biyokimyasal sinyali algılayıp yanıt üretecek biçimde tasarlanabilir: zararlı bir metaboliti tüketmek, eksik bir enzimi sağlamak ya da yerel olarak bir immün uyarıcı salgılamak şeklinde olabilir. Yaklaşımın geleneksel biyolojiklere göre iki kavramsal üstünlüğü vardır: katalitik çalışma, yani tek bir hücrenin pek çok döngü gerçekleştirmesi ve çevresel sinyale göre dinamik yanıt (Charbonneau ve ark., 2020).

Tasarım ilkeleri de buna göre şekillenmiştir; çoğalmayan, kolonize olmayan ve gastrointestinal temizlenmeyle geri alınabilir suşlar düzenleyici kabul açısından tercih edilir. Alanın translasyonel bilançosu yine de temkinli okunmalıdır. Mühendislik ürünü suşlarla yürütülen faz 1 ve faz 2 çalışmalarının sayısı artmakla birlikte, canlı biyoterapötiklerin ruhsatlandırma süreci henüz olgunlaşmamış ve metabolik hastalık programlarının bir kısmı klinik etkinlik eşiğini aşamamıştır (Charbonneau ve ark., 2020).

Darboğazlar üç başlıkta toplanır. Birincisi doz-etki ilişkisinin belirsizliğidir: canlı bir organizmanın bağırsakta ne kadar süre, hangi yoğunlukta ve hangi aktivite düzeyinde kalacağı klasik farmakokinetik çerçeveye oturmaz. İkincisi üretim ve kalite denetimidir; canlı hücrelerin iyi üretim uygulamaları altında standart biçimde üretilmesi, modifikasyonların zaman içindeki kararlılığının kanıtlanmasını gerektirir. Üçüncüsü, bağışıklığı baskılanmış hastalarda canlı organizma uygulamasının güvenlik profilidir.

- **Tarım ve çevre**

Üçüncü uygulama kümesi açık ortamda çalışmayı gerektirir ve bu nedenle en yüksek biyogüvenlik eşiğine sahiptir. Biyosensör olarak tasarlanmış mikroorganizmalar kirleticilerin saptanmasında, mühendislik ürünü toprak bakterileri ise azot fiksasyonunun artırılmasında kullanılmaktadır (Mandell ve ark., 2015). Açık ortam uygulamalarında belirleyici kısıt etkinlik değil kontrol

edilebilirliktir: salınan bir organizmanın yayılımının, yatay gen aktarımının ve evrimsel kaderinin öngörülmesi gerekir. Bu durum biyokapsülleme stratejilerinin en doğrudan uygulama gerekçesidir.

- **Faj terapisi ve üretken tasarımın kesişimi**

Üretken genom tasarımının en yakın vadeli uygulaması faj terapisidir. Yapay zeka ile tasarlanan faj kokteylinin üç *E. coli* suşunda yabanıl tip faja karşı gelişmiş direnci hızla aşması, direnç yönetiminde tasarım hızının bir avantaja dönüşebileceğini göstermektedir. Bu avantaj doğal fajların tek tek izole edilip karakterize edilmesi yerine, direnç profiline göre yeni faj tasarlanmasını içerir. Bu işlem antimikrobiyal peptid tasarımıyla aynı stratejik mantığı taşır, yani direnç gelişimine tasarım döngüsünün hızıyla yanıt vermek demektir.

Biyogüvenlik, Biyokapsülleme ve Çift Kullanım

Genom yazma kapasitesinin artması, biyogüvenlik tartışmasını teorik bir ek başlık olmaktan çıkarıp tasarımın bir bileşeni haline getirmiştir. Bu bölümde üç katman ayırt edilmektedir: moleküler kapsülleme, teknolojik erişim denetimi ve araştırma gündeminin kendisine ilişkin kararlar.

- **Moleküler biyokapsülleme**

En oturmuş strateji sentetik oksotrofidir. Bu işlem organizmanın temel bir proteininin, doğada bulunmayan bir aminoasit olmadan katlanamayacak biçimde yeniden tasarlanmasıdır. Organizma bu durumda yalnızca o aminoasidin sağlandığı ortamda yaşayabilir (Mandell ve ark., 2015). Yeniden kodlanmış organizmalarda aynı bağımlılık, serbestleşen kodonların sentetik aminoasitlere atanmasıyla kurulabilir. Bildirilen kaçış frekansları, klasik oksotrofilere kıyasla mertebe olarak daha düşüktür (Rovner ve ark., 2015).

Yeniden kodlamanın ikinci biyogüvenlik işlevi, çift yönlü genetik yalıtımdır. Değiştirilmiş kodla yazılan genler yabanıl tip hücrelerde doğru çevrilemez, dolayısıyla yatay gen aktarımı işlevsiz kalır. Syn57'de serbestleşen kodon sayısının artması bu bariyerin daha sıkı kurulmasını sağlar.

Her iki stratejinin ortak sınırı evrimsel kaçıştır. Yeterince büyük popülasyonlarda ve yeterince uzun sürede, baskılayıcı tRNA mutasyonları ya da alternatif metabolik yollar aracılığıyla bağımlılığın aşılması teorik olarak mümkündür. Kapsülleme bu nedenle tek bir mekanizmaya değil, birbirinden bağımsız birden fazla katmana dayandırılmalıdır.

- **Ayna yaşam tartışması**

2024 sonunda yayımlanan ve 38 araştırmacının imzasını taşıyan değerlendirme, sentetik biyolojinin gündemine doğrudan müdahale eden ilk geniş katılımlı çalışma olmuştur. Bilinen tüm yaşam homokiraldir; tüm moleküllerinin ayna görüntüsü ile kurulmuş bir bakteri, bilinen yaşamdan radikal bir kopuş anlamına gelir (Adamala ve ark., 2024). Yazarlar, böyle bir organizmanın doğal yırtıcıları, faj baskısı ve bağışıklık tanıma mekanizmaları karşısında etkisiz kalabileceğini, dolayısıyla ekolojik olarak istilacı bir tür gibi davranabileceğini savunmaktadır (Adamala ve ark., 2024).

Değerlendirmenin iki özelliği metodolojik açıdan dikkat çekicidir. Birincisi zamanlamasıdır: ayna bakterisi üretme kapasitesinin en az on yıl uzakta olduğu belirtilmekte ve bu süre, risklerin gerçekleşmeden değerlendirilmesi için bir fırsat olarak sunulmaktadır. İkincisi önerinin kapsamıdır. Yazarlar ayna moleküllerine ilişkin araştırmanın sürmesini savunurken, ayna organizmaların mühendislik ürünü kapsülleme önlemleriyle bile olsa üretilmemesini önermektedir. Kapsülleme burada yeterli bir güvence sayılmamaktadır.

Bu tartışma, burada anlatılan konunun genel çerçevesi açısından önemli bir ayrımı açığa çıkarır. Teknik olarak mümkün olanın kapsamı ile yapılması önerilen işin kapsamı aynı şey değildir ve ikincisinin belirlenmesi teknik bir karar değildir.

- **Erişim denetimi ve üretken modeller**

Üçüncü katman, kapasitenin kimlere açık olduğudur. DNA sentezi hizmetlerinde dizi taraması, kaygı verici dizilerin sipariş aşamasında saptanmasını hedefleyen en yaygın denetim mekanizmasıdır; ancak katılım büyük ölçüde gönüllülük esasına dayanır ve taramanın kapsamı tanımlı patojen dizilerle sınırlıdır (https://ibbis.bio/about/).

Üretken modeller bu mekanizmayı iki yönden zorlar. Birincisi, model tarafından üretilen diziler doğal dizilere referansla taranan filtrelerden kaçabilir; dizi benzerliğine dayalı tarama, işlevi koruyup diziyi değiştiren tasarımlar karşısında zayıftır. İkincisi, amaç fonksiyonunun işareti değiştirilebilir: toksisiteyi en aza indirmek üzere eğitilmiş bir model ters yönde çalıştırılabilir. Bu ikinci sorun bir önceki bölümde antimikrobiyal peptid tasarımı için de saptanmıştı ve genom ölçeğinde daha ağır sonuçlar doğurur.

Bununla birlikte mevcut kapasitenin abartılmaması gerektiğine ilişkin değerlendirmeler de vardır. Üretken genom tasarımının gösterildiği sistem bilinen en küçük ve sentezi en kolay genomlardan biridir ve mevcut patojenlerin değiştirilmesi, sıfırdan tasarıma kıyasla hâlâ çok daha kolay bir yoldur. (https://www.nationalacademies.org/projects/DELS-BLS-24-04/updates).

Sonuç

Sentetik biyoloji, 2024-2026 aralığında genom ölçeğinde yazma kapasitesini deneysel olarak kanıtlamıştır. Syn57, 4 Mb'lık bir bakteri genomunda 100.000'den fazla kodon değişikliğinin tek

organizmada birleştirilebileceğini ve yaşamın 57 kodonlu bir kodla işleyebileceğini göstermiştir. Sc2.0, 16 sentetik kromozom ve doğada bulunmayan bir tRNA neokromozomuyla ilk sentetik ökaryot genomunun tasarım ve inşa aşamasını tamamlamıştır. Üretken genom modelleri, bütün bir faj genomunu sıfırdan yazarak canlı ve yabanıl tipten daha uygun virüsler üretmiştir.

Bu üç hat farklı yöntemler kullanmakla birlikte ortak bir metodolojik yönelim sergiler. Hiçbiri tek bir parametreyi optimize etmemekte, tasarım işlevsellik ile uygunluk, denetlenebilirlik ile esneklik arasındaki ödünleşimler üzerinden yürütülmektedir. Syn57'nin uygunluk bedeli, Sc2.0'ın birleştirme sonrası hata ayıklama ihtiyacı ve üretken faj tasarımının yaklaşık %5'lik isabet oranı bu ödünleşimlerin niceliksel göstergeleridir.

Regülasyon tarafında, mikrobiyal sentetik biyolojide geliştirilen denetim mimarileri klinik ürünlere dönüşmeye başlamıştır. dCas9 temelli epigenetik susturmanın kronik hepatit B'de faz 1b/2a verisiyle insanlarda gösterilmesi, transkripsiyonel denetim araçlarının laboratuvar dışına çıkabildiğinin en somut örneğidir.

Alanın açık sorunları üç başlıkta toplanmaktadır. Birincisi işlev bilgisidir: minimal bir genomda yaşam için gerekli genlerin önemli bir kısmının işlevi hâlâ bilinmemektedir. İkincisi öngörülebilirliktir; bağlam bağımlılığı, metabolik yük ve evrimsel kararsızlık, tasarımın mühendislik standartlarına ulaşmasını engelleyen yapısal etkenlerdir. Üçüncüsü standardizasyondur: ölçüm protokollerinin ve veri formatlarının uyumsuzluğu hem laboratuvarlar arası karşılaştırmayı hem de üretken modellerin eğitim verisinin kalitesini sınırlamaktadır.

Ayna yaşam değerlendirmesi, teknik olarak erişilebilir hale gelen bir kapasitenin, kapsülleme önlemleriyle bile olsa gerçekleştirilmemesini öneren ilk geniş katılımlı girişimdir. Genom yazma kapasitesinin artmasıyla birlikte alanın gündemini belirleyen

soru, yalnızca neyin yapılabileceği değil hangi tasarımların hiç denenmemesi gerektiğidir.

Kaynaklar

Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., Ronneberger, O., Willmore, L., Ballard, A. J., Bambrick, J., Bodenstein, S. W., Evans, D. A., Hung, C. C., O'Neill, M., Reiman, D., Tunyasuvunakool, K., Wu, Z., Žemgulytė, A., Arvaniti, E., . . . Jumper, J. M. (2024). Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. Nature, 630(8016), 493-500. https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w

Adamala, K. P., Agashe, D., Belkaid, Y., Bittencourt, D. M. d. C., Cai, Y., Chang, M. W., Chen, I. A., Church, G. M., Cooper, V. S., Davis, M. M., Devaraj, N. K., Endy, D., Esvelt, K. M., Glass, J. I., Hand, T. W., Inglesby, T. V., Isaacs, F. J., James, W. G., Jones, J. D. G., . . . Zuber, M. T. (2024). Confronting risks of mirror life. Science, 386(6728), 1351-1353. https://doi.org/10.1126/science.ads9158

Anzalone, A. V., Gao, X. D., Podracky, C. J., Nelson, A. T., Koblan, L. W., Raguram, A., Levy, J. M., Mercer, J. A. M., & Liu, D. R. (2022). Programmable deletion, replacement, integration and inversion of large DNA sequences with twin prime editing. Nat Biotechnol, 40(5), 731-740. https://doi.org/10.1038/s41587-021-01133-w

Anzalone, A. V., Randolph, P. B., Davis, J. R., Sousa, A. A., Koblan, L. W., Levy, J. M., Chen, P. J., Wilson, C., Newby, G. A., Raguram, A., & Liu, D. R. (2019). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. Nature, 576(7785), 149-157. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4

Brenner, K., You, L., & Arnold, F. H. (2008). Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. Trends Biotechnol, 26(9), 483-489. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.05.004

Breuer, M., Earnest, E. E., Merryman, C., Wise, K. S., Sun, L., Lynott, M. R., Hutchison, C. A., Smith, H. O., Lapek, J. D., Gonzalez, D. J., de Crécy-Lagard, V., Haas, D., Hanson, A. D., Labhsetwar, P., Glass, J. I., & Luthey-Schulten, Z. (2019). Essential metabolism for a minimal cell. Elife, 8. https://doi.org/10.7554/eLife.36842

Brixi, G., Durrant, M. G., Ku, J., Naghipourfar, M., Poli, M., Sun, G., Brockman, G., Chang, D., Fanton, A., Gonzalez, G. A., King, S. H., Li, D. B., Merchant, A. T., Nguyen, E., Ricci-Tam, C., Romero, D. W., Schmok, J. C., Taghibakhshi, A., Vorontsov, A., . . . Hie, B. L. (2026). Genome modelling and

design across all domains of life with Evo 2. Nature, 652(8112), 1349-1361. https://doi.org/10.1038/s41586-026-10176-5

Brophy, J. A. N., & Voigt, C. A. (2014). Principles of genetic circuit design. Nature Methods, 11(5), 508-520. https://doi.org/10.1038/nmeth.2926

Cardinale, S., & Arkin, A. P. (2012). Contextualizing context for synthetic biology--identifying causes of failure of synthetic biological systems. Biotechnol J, 7(7), 856-866. https://doi.org/10.1002/biot.201200085

Ceroni, F., Algar, R., Stan, G. B., & Ellis, T. (2015). Quantifying cellular capacity identifies gene expression designs with reduced burden. Nat Methods, 12(5), 415-418. https://doi.org/10.1038/nmeth.3339

Charbonneau, M. R., Isabella, V. M., Li, N., & Kurtz, C. B. (2020). Developing a new class of engineered live bacterial therapeutics to treat human diseases. Nature Communications, 11(1), 1738. https://doi.org/10.1038/s41467-020-15508-1

Durrant, M. G., Perry, N. T., Pai, J. J., Jangid, A. R., Athukoralage, J. S., Hiraizumi, M., McSpedon, J. P., Pawluk, A., Nishimasu, H., Konermann, S., & Hsu, P. D. (2024). Bridge RNAs direct programmable recombination of target and donor DNA. Nature, 630(8018), 984-993. https://doi.org/10.1038/s41586-024-07552-4

Dymond, J. S., Richardson, S. M., Coombes, C. E., Babatz, T., Muller, H., Annaluru, N., Blake, W. J., Schwerzmann, J. W., Dai, J., Lindstrom, D. L., Boeke, A. C., Gottschling, D. E., Chandrasegaran, S., Bader, J. S., & Boeke, J. D. (2011). Synthetic chromosome arms function in yeast and generate phenotypic diversity by design. Nature, 477(7365), 471-476. https://doi.org/10.1038/nature10403

Elowitz, M. B., & Leibler, S. (2000). A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. Nature, 403(6767), 335-338. https://doi.org/10.1038/35002125

Erpf, P. E., Meier, F., Walker, R. S. K., Goold, H. D., Boeke, J. D., Paulsen, I. T., & Pretorius, I. S. (2025). Building synthetic chromosomes one yeast at a time: insights from Sc2.0. Nature Biotechnology, 43(12), 1911-1918. https://doi.org/10.1038/s41587-025-02913-4

Fredens, J., Wang, K., de la Torre, D., Funke, L. F. H., Robertson, W. E., Christova, Y., Chia, T., Schmied, W. H., Dunkelmann, D. L., Beránek, V., Uttamapinant, C., Llamazares, A. G., Elliott, T. S., & Chin, J. W. (2019). Total synthesis of Escherichia coli with a recoded genome. Nature, 569(7757), 514-518. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1192-5

Galanie, S., Thodey, K., Trenchard, I. J., Filsinger Interrante, M., & Smolke, C. D. (2015). Complete biosynthesis of opioids in yeast. Science, 349(6252), 1095-1100. https://doi.org/10.1126/science.aac9373

Gardner, T. S., Cantor, C. R., & Collins, J. J. (2000). Construction of a genetic toggle switch in Escherichia coli. Nature, 403(6767), 339-342. https://doi.org/10.1038/35002131

Gibson, D. G., Glass, J. I., Lartigue, C., Noskov, V. N., Chuang, R. Y., Algire, M. A., Benders, G. A., Montague, M. G., Ma, L., Moodie, M. M., Merryman, C., Vashee, S., Krishnakumar, R., Assad-Garcia, N., Andrews-Pfannkoch, C., Denisova, E. A., Young, L., Qi, Z. Q., Segall-Shapiro, T. H., . . . Venter, J. C. (2010). Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. Science, 329(5987), 52-56. https://doi.org/10.1126/science.1190719

Gilbert, Luke A., Horlbeck, Max A., Adamson, B., Villalta, Jacqueline E., Chen, Y., Whitehead, Evan H., Guimaraes, C., Panning, B., Ploegh, Hidde L., Bassik, Michael C., Qi, Lei S., Kampmann, M., & Weissman, Jonathan S. (2014). Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. Cell, 159(3), 647-661. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.029

Goold, H. D., Kroukamp, H., Erpf, P. E., Zhao, Y., Kelso, P., Calame, J., Timmins, J. J. B., Wightman, E. L. I., Peng, K., Carpenter, A. C., Llorente, B., Hawthorne, C., Clay, S., van Wyk, N., Daniel, E. L., Harrison, F., Meier, F., Willows, R. D., Cai, Y., . . . Pretorius, I. S. (2025). Construction and iterative redesign of synXVI a 903 kb synthetic Saccharomyces cerevisiae chromosome. Nature Communications, 16(1), 841. https://doi.org/10.1038/s41467-024-55318-3

Green, A. A., Silver, P. A., Collins, J. J., & Yin, P. (2014). Toehold switches: de-novo-designed regulators of gene expression. Cell, 159(4), 925-939. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.002

Hiraizumi, M., Perry, N. T., Durrant, M. G., Soma, T., Nagahata, N., Okazaki, S., Athukoralage, J. S., Isayama, Y., Pai, J. J., Pawluk, A., Konermann, S., Yamashita, K., Hsu, P. D., & Nishimasu, H. (2024). Structural mechanism of bridge RNA-guided recombination. Nature, 630(8018), 994-1002. https://doi.org/10.1038/s41586-024-07570-2

Hutchison, C. A., 3rd, Chuang, R. Y., Noskov, V. N., Assad-Garcia, N., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Gill, J., Kannan, K., Karas, B. J., Ma, L., Pelletier, J. F., Qi, Z. Q., Richter, R. A., Strychalski, E. A., Sun, L., Suzuki, Y., Tsvetanova, B., Wise, K. S., Smith, H. O., . . . Venter, J. C. (2016). Design and synthesis of a

minimal bacterial genome. Science, 351(6280), aad6253. https://doi.org/10.1126/science.aad6253

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science, 337(6096), 816-821. https://doi.org/10.1126/science.1225829

Jones, T. S., Oliveira, S. M. D., Myers, C. J., Voigt, C. A., & Densmore, D. (2022). Genetic circuit design automation with Cello 2.0. Nat Protoc, 17(4), 1097-1113. https://doi.org/10.1038/s41596-021-00675-2

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., . . . Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature, 596(7873), 583-589. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2

King, S. H., Driscoll, C. L., Li, D. B., Guo, D., Merchant, A. T., Brixi, G., Wilkinson, M. E., & Hie, B. L. (2026). Generative design of bacteriophages with genome language models. Science, 393(6811), eaec2657. https://doi.org/doi:10.1126/science.aec2657

Klompe, S. E., Vo, P. L. H., Halpin-Healy, T. S., & Sternberg, S. H. (2019). Transposon-encoded CRISPR-Cas systems direct RNA-guided DNA integration. Nature, 571(7764), 219-225. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1323-z

Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A., & Liu, D. R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. Nature, 533(7603), 420-424. https://doi.org/10.1038/nature17946

Kong, W., Meldgin, D. R., Collins, J. J., & Lu, T. (2018). Designing microbial consortia with defined social interactions. Nat Chem Biol, 14(8), 821-829. https://doi.org/10.1038/s41589-018-0091-7

Lajoie, M. J., Rovner, A. J., Goodman, D. B., Aerni, H. R., Haimovich, A. D., Kuznetsov, G., Mercer, J. A., Wang, H. H., Carr, P. A., Mosberg, J. A., Rohland, N., Schultz, P. G., Jacobson, J. M., Rinehart, J., Church, G. M., & Isaacs, F. J. (2013). Genomically recoded organisms expand biological functions. Science, 342(6156), 357-360. https://doi.org/10.1126/science.1241459

Madani, A., Krause, B., Greene, E. R., Subramanian, S., Mohr, B. P., Holton, J. M., Olmos, J. L., Jr., Xiong, C., Sun, Z. Z., Socher, R., Fraser, J. S., & Naik, N. (2023). Large language models generate functional protein sequences

across diverse families. Nat Biotechnol, 41(8), 1099-1106. https://doi.org/10.1038/s41587-022-01618-2

Mandell, D. J., Lajoie, M. J., Mee, M. T., Takeuchi, R., Kuznetsov, G., Norville, J. E., Gregg, C. J., Stoddard, B. L., & Church, G. M. (2015). Biocontainment of genetically modified organisms by synthetic protein design. Nature, 518(7537), 55-60. https://doi.org/10.1038/nature14121

Moger-Reischer, R. Z., Glass, J. I., Wise, K. S., Sun, L., Bittencourt, D. M. C., Lehmkuhl, B. K., Schoolmaster, D. R., Jr., Lynch, M., & Lennon, J. T. (2023). Evolution of a minimal cell. Nature, 620(7972), 122-127. https://doi.org/10.1038/s41586-023-06288-x

Morsut, L., Roybal, K. T., Xiong, X., Gordley, R. M., Coyle, S. M., Thomson, M., & Lim, W. A. (2016). Engineering Customized Cell Sensing and Response Behaviors Using Synthetic Notch Receptors. Cell, 164(4), 780-791. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.012

Nguyen, E., Poli, M., Durrant, M. G., Kang, B., Katrekar, D., Li, D. B., Bartie, L. J., Thomas, A. W., King, S. H., Brixi, G., Sullivan, J., Ng, M. Y., Lewis, A., Lou, A., Ermon, S., Baccus, S. A., Hernandez-Boussard, T., Ré, C., Hsu, P. D., & Hie, B. L. (2024). Sequence modeling and design from molecular to genome scale with Evo. Science, 386(6723), eado9336. https://doi.org/doi:10.1126/science.ado9336

Nielsen, A. A., Der, B. S., Shin, J., Vaidyanathan, P., Paralanov, V., Strychalski, E. A., Ross, D., Densmore, D., & Voigt, C. A. (2016). Genetic circuit design automation. Science, 352(6281), aac7341. https://doi.org/10.1126/science.aac7341

Nielsen, J., & Keasling, J. D. (2016). Engineering Cellular Metabolism. Cell, 164(6), 1185-1197. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.004

Nuñez, J. K., Chen, J., Pommier, G. C., Cogan, J. Z., Replogle, J. M., Adriaens, C., Ramadoss, G. N., Shi, Q., Hung, K. L., Samelson, A. J., Pogson, A. N., Kim, J. Y. S., Chung, A., Leonetti, M. D., Chang, H. Y., Kampmann, M., Bernstein, B. E., Hovestadt, V., Gilbert, L. A., & Weissman, J. S. (2021). Genome-wide programmable transcriptional memory by CRISPR-based epigenome editing. Cell, 184(9), 2503-2519.e2517. https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.025

Nyerges, A., Vinke, S., Flynn, R., Owen, S. V., Rand, E. A., Budnik, B., Keen, E., Narasimhan, K., Marchand, J. A., Baas-Thomas, M., Liu, M., Chen, K., Chiappino-Pepe, A., Hu, F., Baym, M., & Church, G. M. (2023). A swapped genetic code prevents viral infections and gene transfer. Nature, 615(7953), 720-727. https://doi.org/10.1038/s41586-023-05824-z

Ostrov, N., Landon, M., Guell, M., Kuznetsov, G., Teramoto, J., Cervantes, N., Zhou, M., Singh, K., Napolitano, M. G., Moosburner, M., Shrock, E., Pruitt, B. W., Conway, N., Goodman, D. B., Gardner, C. L., Tyree, G., Gonzales, A., Wanner, B. L., Norville, J. E., . . . Church, G. M. (2016). Design, synthesis, and testing toward a 57-codon genome. Science, 353(6301), 819-822. https://doi.org/10.1126/science.aaf3639

Paddon, C. J., Westfall, P. J., Pitera, D. J., Benjamin, K., Fisher, K., McPhee, D., Leavell, M. D., Tai, A., Main, A., Eng, D., Polichuk, D. R., Teoh, K. H., Reed, D. W., Treynor, T., Lenihan, J., Fleck, M., Bajad, S., Dang, G., Dengrove, D., . . . Newman, J. D. (2013). High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. Nature, 496(7446), 528-532. https://doi.org/10.1038/nature12051

Pardee, K., Green, A. A., Takahashi, M. K., Braff, D., Lambert, G., Lee, J. W., Ferrante, T., Ma, D., Donghia, N., Fan, M., Daringer, N. M., Bosch, I., Dudley, D. M., O'Connor, D. H., Gehrke, L., & Collins, J. J. (2016). Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components. Cell, 165(5), 1255-1266. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.059

Pelletier, J. F., Sun, L., Wise, K. S., Assad-Garcia, N., Karas, B. J., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Mershin, A., Gershenfeld, N., Chuang, R. Y., Glass, J. I., & Strychalski, E. A. (2021). Genetic requirements for cell division in a genomically minimal cell. Cell, 184(9), 2430-2440.e2416. https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.008

Pósfai, G., Plunkett, G., 3rd, Fehér, T., Frisch, D., Keil, G. M., Umenhoffer, K., Kolisnychenko, V., Stahl, B., Sharma, S. S., de Arruda, M., Burland, V., Harcum, S. W., & Blattner, F. R. (2006). Emergent properties of reduced-genome Escherichia coli. Science, 312(5776), 1044-1046. https://doi.org/10.1126/science.1126439

Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P., & Lim, W. A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. Cell, 152(5), 1173-1183. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022

Renda, B. A., Hammerling, M. J., & Barrick, J. E. (2014). Engineering reduced evolutionary potential for synthetic biology. Mol Biosyst, 10(7), 1668-1678. https://doi.org/10.1039/c3mb70606k

Restrepo Sierra, A. M., Ramirez Gomez, F., van Tongeren, M., Sierra Heras, L., & Danelon, C. (2026). A synthetic cell with integrated DNA self-replication and lipid biosynthesis. Nat Commun, 17(1). https://doi.org/10.1038/s41467-026-69531-9

Richardson, S. M., Mitchell, L. A., Stracquadanio, G., Yang, K., Dymond, J. S., DiCarlo, J. E., Lee, D., Huang, C. L. V., Chandrasegaran, S., Cai, Y., Boeke, J. D., & Bader, J. S. (2017). Design of a synthetic yeast genome. Science, 355(6329), 1040-1044. https://doi.org/doi:10.1126/science.aaf4557

Ro, D. K., Paradise, E. M., Ouellet, M., Fisher, K. J., Newman, K. L., Ndungu, J. M., Ho, K. A., Eachus, R. A., Ham, T. S., Kirby, J., Chang, M. C., Withers, S. T., Shiba, Y., Sarpong, R., & Keasling, J. D. (2006). Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. Nature, 440(7086), 940-943. https://doi.org/10.1038/nature04640

Robertson, W. E., Funke, L. F. H., de la Torre, D., Fredens, J., Elliott, T. S., Spinck, M., Christova, Y., Cervettini, D., Böge, F. L., Liu, K. C., Buse, S., Maslen, S., Salmond, G. P. C., & Chin, J. W. (2021). Sense codon reassignment enables viral resistance and encoded polymer synthesis. Science, 372(6546), 1057-1062. https://doi.org/10.1126/science.abg3029

Robertson, W. E., Rehm, F. B. H., Spinck, M., Schumann, R. L., Tian, R., Liu, W., Gu, Y., Kleefeldt, A. A., Day, C. F., Liu, K. C., Christova, Y., Zürcher, J. F., Böge, F. L., Birnbaum, J., van Bijsterveldt, L., & Chin, J. W. (2025). Escherichia coli with a 57-codon genetic code. Science, 390(6771), eady4368. https://doi.org/10.1126/science.ady4368

Rovner, A. J., Haimovich, A. D., Katz, S. R., Li, Z., Grome, M. W., Gassaway, B. M., Amiram, M., Patel, J. R., Gallagher, R. R., Rinehart, J., & Isaacs, F. J. (2015). Recoded organisms engineered to depend on synthetic amino acids. Nature, 518(7537), 89-93. https://doi.org/10.1038/nature14095

Roybal, K. T., Rupp, L. J., Morsut, L., Walker, W. J., McNally, K. A., Park, J. S., & Lim, W. A. (2016). Precision Tumor Recognition by T Cells With Combinatorial Antigen-Sensing Circuits. Cell, 164(4), 770-779. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.011

Sleight, S. C., Bartley, B. A., Lieviant, J. A., & Sauro, H. M. (2010). Designing and engineering evolutionary robust genetic circuits. Journal of Biological Engineering, 4(1), 12. https://doi.org/10.1186/1754-1611-4-12

Strecker, J., Ladha, A., Gardner, Z., Schmid-Burgk, J. L., Makarova, K. S., Koonin, E. V., & Zhang, F. (2019). RNA-guided DNA insertion with CRISPR-associated transposases. Science, 365(6448), 48-53. https://doi.org/10.1126/science.aax9181

Thornburg, Z. R., Bianchi, D. M., Brier, T. A., Gilbert, B. R., Earnest, E. E., Melo, M. C. R., Safronova, N., Sáenz, J. P., Cook, A. T., Wise, K. S., Hutchison, C. A., 3rd, Smith, H. O., Glass, J. I., & Luthey-Schulten, Z. (2022). Fundamental

behaviors emerge from simulations of a living minimal cell. Cell, 185(2), 345-360.e328. https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.025

Vaishnav, E. D., de Boer, C. G., Molinet, J., Yassour, M., Fan, L., Adiconis, X., Thompson, D. A., Levin, J. Z., Cubillos, F. A., & Regev, A. (2022). The evolution, evolvability and engineering of gene regulatory DNA. Nature, 603(7901), 455-463. https://doi.org/10.1038/s41586-022-04506-6

Wang, H. H., Isaacs, F. J., Carr, P. A., Sun, Z. Z., Xu, G., Forest, C. R., & Church, G. M. (2009). Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. Nature, 460(7257), 894-898. https://doi.org/10.1038/nature08187

Wang, K., Fredens, J., Brunner, S. F., Kim, S. H., Chia, T., & Chin, J. W. (2016). Defining synonymous codon compression schemes by genome recoding. Nature, 539(7627), 59-64. https://doi.org/10.1038/nature20124

Watson, J. L., Juergens, D., Bennett, N. R., Trippe, B. L., Yim, J., Eisenach, H. E., Ahern, W., Borst, A. J., Ragotte, R. J., Milles, L. F., Wicky, B. I. M., Hanikel, N., Pellock, S. J., Courbet, A., Sheffler, W., Wang, J., Venkatesh, P., Sappington, I., Torres, S. V., . . . Baker, D. (2023). De novo design of protein structure and function with RFdiffusion. Nature, 620(7976), 1089-1100. https://doi.org/10.1038/s41586-023-06415-8

Winkler, W. C., & Breaker, R. R. (2005). Regulation of bacterial gene expression by riboswitches. Annu Rev Microbiol, 59, 487-517. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.030804.121336

Zalatan, J. G., Lee, M. E., Almeida, R., Gilbert, L. A., Whitehead, E. H., La Russa, M., Tsai, J. C., Weissman, J. S., Dueber, J. E., Qi, L. S., & Lim, W. A. (2015). Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds. Cell, 160(1-2), 339-350. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.052

Zhao, Y., Coelho, C., Hughes, A. L., Lazar-Stefanita, L., Yang, S., Brooks, A. N., Walker, R. S. K., Zhang, W., Lauer, S., Hernandez, C., Cai, J., Mitchell, L. A., Agmon, N., Shen, Y., Sall, J., Fanfani, V., Jalan, A., Rivera, J., Liang, F. X., . . . Boeke, J. D. (2023). Debugging and consolidating multiple synthetic chromosomes reveals combinatorial genetic interactions. Cell, 186(24), 5220-5236.e5216. https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.09.025

BÖLÜM 3

MICRORNAs (miRNAs) AS BIOMARKERS: CURRENT PERSPECTIVES AND APPLICATIONS

AHMET AKÇAY[1]

Introduction

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs, generally about 20–24 nucleotides in length, that regulate gene expression mainly at the post-transcriptional level. Mature miRNAs guide Argonaute-containing silencing complexes toward target messenger RNAs (mRNAs), where they promote translational repression, mRNA destabilization or, less commonly in animals, endonucleolytic cleavage. Because miRNAs participate in regulatory networks controlling development, differentiation, metabolism, immune responses and cellular homeostasis, alterations in their expression can accompany both normal physiological transitions and pathological processes (Condrat et al., 2020; Kim et al., 2025).

These biological characteristics have encouraged the investigation of miRNAs as molecular biomarkers. Their usefulness is supported by several features, including relatively high stability,

[1] Lecturer, PhD, Mardin Artuklu University, Central Research Laboratory Application and Research Center, Orcid: 0000-0002-9836-4165

sequence-specific detectability, regulated expression across tissues and physiological states, and their presence in a wide range of biological samples. Unlike many longer RNA molecules, extracellular miRNAs can remain detectable despite exposure to RNase-rich environments. This stability, together with their association with specific cellular and disease-related processes, makes them suitable candidates for measuring changes that may not be readily captured by conventional biochemical markers alone (Condrat et al., 2020; Huber et al., 2023).

A substantial proportion of biomarker research has focused on circulating and extracellular miRNAs. These molecules are found in plasma and serum, but also in urine, saliva, cerebrospinal fluid, milk and other secretions. Extracellular miRNAs do not constitute a single homogeneous population. Some are enclosed within extracellular vesicles (EVs), whereas others circulate in association with Argonaute proteins, lipoproteins or other macromolecular complexes. These carriers contribute to protection from extracellular degradation and help explain why miRNAs can be recovered from biological fluids in measurable quantities. The accessibility of such samples provides a basis for minimally invasive and liquid-biopsy approaches in which molecular information can be obtained without direct tissue sampling (Huber et al., 2023; Mestry et al., 2023).

The potential applications of miRNA biomarkers are broad. Differences in miRNA abundance between biological states may support diagnostic applications, while associations with disease progression or outcome may provide prognostic information. miRNAs have also been investigated as predictive biomarkers of treatment response and as monitoring biomarkers measured repeatedly during therapy or disease follow-up. Although much of the early literature focused on cancer, similar approaches have been applied to cardiovascular, metabolic, inflammatory, neurological and reproductive conditions. In many cases, combinations of several

miRNAs are being evaluated rather than relying on a single marker, since individual miRNAs may participate in multiple pathways and may not provide sufficient specificity when considered alone (Condrat et al., 2020; Huber et al., 2023).

Despite these advantages, methodological variability remains one of the main barriers to reproducible miRNA biomarker development. Sample type, collection procedure, processing delay, storage temperature, haemolysis, platelet contamination and repeated freeze–thaw cycles can influence measured circulating miRNA concentrations. RNA isolation methods also differ in recovery efficiency, while normalization remains challenging because there is no universally accepted endogenous reference suitable for all biofluids and experimental conditions. Differences among RT-qPCR, microarray, digital PCR and small-RNA sequencing platforms may further contribute to variation between studies. For this reason, rigorous pre-analytical control, transparent reporting and appropriate normalization are essential when evaluating candidate circulating miRNAs (Mestry et al., 2023; Zendjabil, 2024).

The same properties that have generated interest in human biomarker research are increasingly relevant to veterinary medicine. miRNAs are highly conserved across mammalian species and can be measured in several biological matrices obtained from livestock. Circulating and tissue-associated miRNAs have been studied in relation to inflammation, infection, metabolic and environmental stress, production traits and animal welfare. In livestock systems, minimally invasive sampling is particularly attractive because repeated tissue collection is often impractical and may itself influence physiological measurements. Consequently, blood, milk and other accessible biological materials are being investigated as sources of miRNA-based information on animal health and physiological status (Miretti et al., 2020).

Animal reproduction represents a particularly relevant application area. Pregnancy establishment involves coordinated changes in maternal tissues, the conceptus and the reproductive tract, and miRNA expression has therefore been examined as a possible indicator of early reproductive events. In cattle, circulating miRNA profiles and EV-associated miRNAs have been evaluated for early pregnancy diagnosis; for example, Ninomiya et al. (2024) reported pregnancy-associated differences in circulating miRNAs, including miR-126-3p, while also examining miRNAs associated with blood EV fractions. Such findings support continued investigation of miRNAs as reproductive biomarkers, although differences in sampling time, population size and analytical methodology still limit direct comparison among studies (Miretti et al., 2020; Ninomiya et al., 2024).

Beyond blood-based approaches, reproductive-tract secretions may provide molecular information more closely related to the local uterine and cervical environment. Cervico-vaginal mucus (CVM) can be obtained with limited invasiveness and contains biological material that can be evaluated using molecular methods. Previous work has investigated pregnancy-associated miRNA expression in bovine CVM, together with methodological aspects of CVM sampling, nucleic-acid isolation and RNA quality for sequencing-based analyses (Akçay, 2026). Although these conference findings should be regarded as preliminary and require validation in larger independent populations, they provide a rationale for considering CVM and other reproductive secretions as alternative sample types in livestock miRNA biomarker research.

Biogenesis and Biological Functions of miRNAs

The biological activity of miRNAs depends on a tightly regulated sequence of processing events that determines which mature molecules are produced, in what abundance, and in which cellular context they become functional. Most animal miRNAs are generated through the canonical pathway, beginning with transcription of miRNA genes into primary miRNA transcripts (pri-miRNAs). These transcripts typically contain imperfect stem-loop structures that are recognized by the nuclear Microprocessor machinery. Although the overall pathway is well established, recent work has shown that miRNA production is not a simple constitutive process; sequence context, RNA structure, auxiliary proteins and precursor architecture can influence processing efficiency at several stages (Kim et al., 2025; Shang et al., 2023).

The first major processing step occurs in the nucleus, where the RNase III enzyme DROSHA acts together with its essential partner DGCR8. The Microprocessor identifies structural features within pri-miRNA hairpins and cleaves them to generate precursor miRNAs (pre-miRNAs). Processing accuracy is important because variation in the cleavage position can alter the sequence of the resulting mature miRNA and consequently its target repertoire. Structural studies have shown that recognition is influenced by both the architecture of the hairpin and sequence motifs surrounding the processing site. Recent cryo-electron microscopy analyses of human pri-let-7 substrates further demonstrated that the Microprocessor can adopt different conformations to accommodate structurally diverse pri-miRNAs, while accessory factors such as SRSF3 can contribute to cleavage fidelity (Garg et al., 2024; Komatsu et al., 2023).

Following nuclear processing, pre-miRNAs are exported to the cytoplasm, where DICER performs the second RNase III-mediated cleavage step. DICER recognizes the precursor hairpin and removes the terminal loop to generate a short RNA duplex containing the sequences that can give rise to mature miRNAs.

Structural and functional analyses of mammalian DICER have demonstrated that precursor recognition and cleavage involve coordinated conformational changes within the enzyme and interactions with associated proteins such as TARBP2. These mechanisms contribute to substrate selectivity and processing fidelity, helping distinguish productive miRNA precursors from other double-stranded RNA structures present within the cell (Jouravleva & Zamore, 2025; Zapletal et al., 2022).

The resulting duplex usually contains a strand derived from each arm of the precursor hairpin, commonly designated as the 5p and 3p products. One strand is preferentially retained as the guide strand and loaded into an Argonaute (AGO) protein, whereas the opposite strand is often less abundant or degraded. This preference, however, is not absolute. Both arms can generate functional miRNAs, and the dominant strand may vary according to tissue type, developmental stage or physiological condition. Such “arm switching” adds another source of biological variation and may change the set of genes regulated from the same precursor locus. Differences in processing position can also generate closely related sequence variants, often termed isomiRs, which may exhibit altered stability or target recognition properties (Bofill-De Ros & Vang Ørom, 2024; Shang et al., 2023).

Once loaded onto AGO, the mature miRNA forms the core of the miRNA-induced silencing complex and directs the complex towards target RNAs. In animals, recognition frequently depends on complementarity between the 5′ region of the miRNA—particularly the seed region—and sequences within the target transcript, often in the 3′ untranslated region. Target recognition is nevertheless more complex than a simple seed-match model. Binding-site accessibility, pairing outside the seed region, the number and spacing of target sites, RNA modifications, intracellular localization and the abundance of both miRNA and target transcript can influence the

strength and outcome of an interaction. Recent analyses therefore describe miRNA targeting as a context-dependent regulatory system rather than a fixed one-miRNA–one-target relationship (Diener et al., 2024; Komatsu et al., 2023).

The most common consequence of miRNA binding in animal cells is reduced expression of the target gene through translational repression and accelerated mRNA destabilization. Deadenylation and decapping pathways frequently contribute to this effect. Extensive complementarity can also permit AGO-mediated endonucleolytic cleavage, although direct slicing is considerably less common in typical mammalian miRNA regulation. Argonaute proteins therefore function not only as carriers of the guide RNA but also as central determinants of target recognition and silencing outcome (Diener et al., 2024; Nakanishi, 2024). Because a single miRNA can influence many transcripts and a single transcript can be regulated by multiple miRNAs, these interactions generate regulatory networks rather than isolated linear pathways.

miRNA abundance is itself subject to active regulation after maturation. Mature miRNAs can differ substantially in half-life, and their stability may be altered by terminal nucleotide addition, trimming, changes in AGO association and interactions with specific target RNAs. One particularly important mechanism is target-directed miRNA degradation (TDMD), in which extensive interaction with specialized target RNAs promotes degradation of the bound miRNA rather than repression of the target. The ZSWIM8 ubiquitin-ligase pathway has emerged as a major mediator of this process in animals. Experimental work in mice has shown that disruption of ZSWIM8-dependent TDMD alters the abundance of numerous miRNAs and can produce developmental abnormalities, demonstrating that controlled miRNA turnover has physiological consequences rather than representing only a biochemical

phenomenon (Bofill-De Ros & Vang Ørom, 2024; Han & Mendell, 2023; Jones et al., 2023).

Through these combined mechanisms, miRNAs contribute to the regulation of development, differentiation, proliferation, apoptosis, metabolism, immune responses and adaptation to physiological or environmental change. Their effects often arise from modest regulation of multiple components within the same pathway rather than complete suppression of a single gene. Moreover, the mature miRNA profile measured in a tissue or biological fluid reflects several layers of regulation, including transcription, precursor processing, strand selection, target engagement and turnover. This dynamic regulation is directly relevant to biomarker research: differences in miRNA abundance can represent integrated changes in cellular state, but they must be interpreted in the context of the biological and molecular mechanisms that generate those differences (Jouravleva & Zamore, 2025; Kim et al., 2025; Shang et al., 2023).

Circulating and Extracellular miRNAs

The identification of miRNAs outside cells substantially broadened their relevance as biomarker candidates. Extracellular miRNAs can be detected in plasma, serum, cerebrospinal fluid, urine, saliva, milk, semen and other biological fluids, despite the presence of extracellular ribonucleases that would rapidly degrade unprotected RNA. Their persistence is explained in part by association with protective molecular carriers. Importantly, extracellular miRNAs do not represent a single molecular population; they may be enclosed within extracellular vesicles (EVs) or occur in non-vesicular complexes with Argonaute proteins and other macromolecules (Geekiyanage et al., 2020; Petrova et al., 2024).

Studies of human plasma have shown that a substantial fraction of extracellular miRNAs is associated with Argonaute-containing ribonucleoprotein complexes rather than membrane-bound vesicles. These complexes can protect miRNAs from degradation and may retain properties related to miRNA–target recognition. Consequently, the detection of a miRNA in plasma or serum should not automatically be interpreted as evidence that it originates from EVs. The relative distribution between vesicular and non-vesicular compartments can vary according to the individual miRNA, sample type and analytical procedure used to separate extracellular particles (Geekiyanage et al., 2020; Petrova et al., 2024).

EVs themselves constitute a heterogeneous group of membrane-delimited particles released by cells into the extracellular environment. Current recommendations from the International Society for Extracellular Vesicles emphasize the use of operational terminology, such as small EVs or large EVs, when a specific biogenesis pathway has not been experimentally demonstrated. The term “exosome” should therefore be used cautiously rather than as a general synonym for every small extracellular particle. EV preparations may also contain non-vesicular extracellular particles, lipoproteins and protein–RNA complexes, making appropriate separation and characterization essential when interpreting EV-associated miRNA data (Welsh et al., 2024).

The miRNA composition of EVs is not necessarily a passive reflection of the intracellular miRNA pool. Selective sorting mechanisms can influence whether particular miRNAs are retained within cells or released through small EVs. Garcia-Martin et al. (2022) demonstrated that specific sequence motifs within miRNAs can promote either cellular retention or extracellular release and identified RNA-binding proteins involved in this sorting process (Garcia-Martin et al., 2022). Such findings support the concept that

EV-associated miRNA profiles can contain information about regulated cellular responses rather than representing only nonspecific leakage from cells. At the same time, selective packaging means that EV-miRNA abundance cannot always be used as a direct surrogate for intracellular expression.

Cellular origin is another important consideration in biomarker interpretation. EV populations released from different cell types can exhibit distinct miRNA profiles, creating an opportunity to recover information related to the tissue or cellular compartment from which they originate. In endothelial cell models, for example, extracellular vesicle miRNA patterns have been shown to retain differences associated with blood vascular and lymphatic endothelial origins (Pultar et al., 2024). This principle contributes to the interest in EV-based liquid biopsy, in which molecular cargo isolated from an accessible biological fluid may provide indirect information about processes occurring in tissues that are difficult to sample directly.

The biological relevance of EV-associated miRNAs extends beyond their potential value as passive biomarkers. EVs can interact with recipient cells and deliver molecular cargo, including RNA. Experimental studies support regulated miRNA release and uptake under defined conditions, providing a potential mechanism for intercellular communication. Nevertheless, the functional significance of this process should be interpreted cautiously. The presence of an miRNA in an EV preparation does not by itself demonstrate that sufficient quantities are delivered to recipient cells to produce a measurable regulatory effect. EV-miRNA studies should therefore distinguish between detection of molecular cargo and experimental evidence of functional transfer (Garcia-Martin et al., 2022; Welsh et al., 2024).

Pre-analytical handling has a substantial influence on circulating EV and miRNA measurements. Residual platelets and other blood cells can contribute both RNA and newly released

vesicles after sample collection. Procedures designed to obtain platelet-free or platelet-poor plasma can therefore alter the apparent composition of extracellular RNA and EV populations. Experimental comparison of blood-processing procedures has demonstrated that sample preparation affects the suitability of plasma for downstream miRNA and EV analysis, highlighting the need to control centrifugation and residual cellular material before molecular profiling (Leong et al., 2024).

The blood collection system itself can also influence the measured extracellular profile. Tran et al. (2024) compared serum and plasma collected using different anticoagulants and found differences in EV abundance, platelet-associated characteristics and miRNA measurements. These observations illustrate that variation introduced before RNA extraction can be sufficiently large to alter the resulting biomarker profile. For longitudinal studies or comparisons among independent populations, consistency in blood collection, processing time, centrifugation and storage is therefore essential (Tran et al., 2024; Welsh et al., 2024).

Isolation methodology provides another major source of variation. Differential ultracentrifugation, size-exclusion chromatography, polymer-based precipitation, filtration and affinity-based approaches differ in recovery efficiency, purity and the types of extracellular particles that are enriched. None of these procedures should be assumed to yield an entirely homogeneous EV population. Co-isolation of lipoproteins, proteins and non-vesicular RNA can influence downstream miRNA measurements, while different enrichment methods may recover different subsets of EVs. For this reason, MISEV2023 recommends detailed reporting of sample preparation, separation and EV characterization rather than defining preparations solely according to the isolation method used (Welsh et al., 2024).

Recent experimental data further illustrate the difficulty of assigning miRNAs exclusively to the interior of vesicles. Petrova et al. (2024), studying several miRNAs in plasma EV preparations, detected substantial amounts of miRNA associated with the external surface of vesicles in addition to intravesicular molecules (Petrova et al., 2024). Such findings indicate that EV-associated RNA measurements may include multiple topological populations unless appropriate nuclease and membrane-protection experiments are performed. This distinction is especially important in biomarker studies, in which total EV-associated miRNA abundance may be informative even when the exact molecular localization has not been established.

Taken together, circulating miRNAs comprise a complex mixture of vesicular and non-vesicular populations whose composition is shaped by cellular release, extracellular transport and sample processing. Their relative stability and availability in minimally invasive biological samples provide a strong basis for biomarker investigation, but interpretation depends on knowing what molecular compartment has actually been measured. Studies of circulating and EV-associated miRNAs therefore require careful distinction between total extracellular RNA, EV-enriched RNA and defined EV subpopulations, together with standardized pre-analytical procedures and transparent characterization of the isolated material (Tran et al., 2024; Welsh et al., 2024).

*Table 1. Major characteristics of miRNAs relevant to biomarker applications**

Aspect	Relevance for biomarker use	Main consideration
Biological regulation	miRNA expression reflects changes in cellular and physiological states	Individual miRNAs may participate in multiple pathways and are not always disease-specific
Stability	Association with AGO proteins, lipoproteins or EVs can protect extracellular miRNAs from degradation	Stability can still be affected by collection, processing, storage and freeze–thaw conditions
Biofluid availability	miRNAs can be detected in plasma, serum, urine, saliva, milk, cerebrospinal fluid and reproductive secretions	Different biological matrices cannot be considered analytically equivalent
Minimally invasive sampling	Accessible samples allow repeated and longitudinal measurements	Cellular contamination, haemolysis and sampling procedure may substantially alter profiles
Sensitive detection	RT-qPCR, digital PCR, microarrays and small-RNA sequencing permit targeted or broad profiling	Platform-specific biases and differences in analytical sensitivity can affect reproducibility
Extracellular vesicles	EV-associated miRNAs may provide information related to cellular origin and intercellular signalling	EV isolation methods differ in yield, purity and particle populations recovered
Multi-miRNA signatures	Combining several miRNAs may improve classification compared with a single marker	Large panels increase statistical complexity and the risk of overfitting
Veterinary applications	Blood, milk and reproductive samples can support repeated assessment of livestock health and reproduction	Breed, diet, reproductive stage, environment and management conditions may influence expression

*Prepared by the author based on (Kim et al., 2025; Mestry et al., 2023; Miretti et al., 2020; Welsh et al., 2024; Zendjabil, 2024).

Clinical Applications of miRNA Biomarkers

The clinical value of a biomarker depends on the question it is intended to answer. Diagnostic biomarkers are used to detect or confirm a disease or to distinguish clinically relevant disease subtypes, whereas prognostic biomarkers provide information about the probability of a future clinical event or disease course. Predictive biomarkers address a different question by identifying individuals who are more likely to experience a favorable or unfavorable effect from a particular intervention. Monitoring biomarkers are measured repeatedly to assess changes in disease status or response over time. These distinctions are important in miRNA research because an association with disease does not automatically establish diagnostic, prognostic or predictive utility (FDA-NIH, Working Group, 2025).

Diagnostic applications remain among the most extensively investigated uses of circulating miRNAs. Their expression can change in response to tissue injury, inflammation and disease-associated alterations in cellular activity, allowing molecular differences to be detected in accessible samples. In cardiovascular medicine, Ren et al. (2024) identified a nine-miRNA plasma signature that differentiated stable coronary artery disease, acute ST-elevation myocardial infarction and post-intervention states, illustrating how multi-miRNA profiles may provide greater discrimination than isolated markers (Ren et al., 2024). Diagnostic associations have also been reported outside cardiovascular disease. In patients with sepsis, Zhang et al. (2022) identified increased circulating hsa-let-7d-3p and subsequently evaluated its discriminatory performance against non-septic controls (Zhang et al., 2022).

The diagnostic value of miRNAs is not limited to separating affected individuals from healthy controls. Molecular profiles may also help identify biologically distinct subgroups within the same clinical diagnosis. In a prospective analysis of individuals with

recent-onset type 1 diabetes, Sebastiani et al. (2024) identified a group of circulating miRNAs from the chromosome 14q32 region that separated patients into two reproducible clusters associated with different glycaemic control and immunological characteristics (Sebastiani et al., 2024). Such findings illustrate a potential role for miRNA signatures in molecular stratification, where the objective is not simply to detect disease but to identify clinically meaningful heterogeneity within it.

Prognostic biomarkers are evaluated after disease is already established and are intended to estimate subsequent risk or outcome. Nopp et al. (2023), for example, examined circulating miRNAs in patients with atrial fibrillation and found that miR-411-5p was associated with cardiovascular death and major adverse cardiovascular events in sequential discovery and validation analyses (Nopp et al., 2023). A similar principle has been explored in acute neurological injury. In a prospective cohort including ischemic stroke, traumatic brain injury and aneurysmal subarachnoid haemorrhage, Sajanti et al. (2024) identified a combination of circulating miRNAs associated with three-month functional outcome (Sajanti et al., 2024). These studies demonstrate that the information carried by miRNA profiles may extend beyond disease identification to estimation of future clinical trajectories.

Predictive biomarkers are particularly relevant to precision medicine because they aim to identify patients who are more likely to benefit from a specific treatment. In metastatic colorectal cancer, Hedayat et al. (2024) used serial liquid biopsies from a prospective phase II trial and an independent validation cohort to identify circulating miR-652-3p as a candidate marker of clinical benefit from regorafenib (Hedayat et al., 2024). Functional experiments further linked this miRNA to mechanisms of treatment resistance. Predictive applications are not restricted to oncology. Yen et al. (2024) evaluated miRNAs in tears, blood and aqueous humour from

patients with neovascular age-related macular degeneration and reported that a combination of tear miRNAs discriminated responders to anti-VEGF therapy from non-responders (Yen et al., 2024).

Repeated measurement creates a further application: treatment and disease monitoring. Because circulating miRNAs can be sampled serially, changes within an individual can be compared across time rather than relying entirely on between-person differences. Mohamed Mansoor et al. (2024) measured serum miRNAs before and during pembrolizumab treatment in patients with lung cancer and observed treatment-associated changes in multiple circulating miRNAs, together with associations between selected miRNAs and clinical outcome (Mohamed Mansoor et al., 2024). Longitudinal approaches are attractive because they may capture dynamic biological responses, although their interpretation requires analytical variation to remain substantially smaller than the biological change being followed.

The use of multiple miRNAs rather than single candidates is increasingly relevant across diagnostic, prognostic and predictive applications. Individual miRNAs frequently participate in several biological pathways and may be expressed by more than one tissue, which can limit disease specificity. Combining molecular features may improve discrimination by representing several components of the underlying biological response. Ren et al. (2024), for example, used machine-learning approaches to derive a multi-miRNA signature for myocardial infarction classification, while Hedayat et al. (2024) combined molecular profiling with independent clinical validation and mechanistic investigation (Hedayat et al., 2024; Ren et al., 2024). Such approaches illustrate the transition from individual candidate markers toward multicomponent biomarker models.

Improved model performance, however, does not by itself establish clinical usefulness. Candidate signatures selected from large molecular datasets are susceptible to overfitting, particularly when the number of measured miRNAs greatly exceeds the number of subjects. Discovery and validation populations therefore need to be separated, and performance should be examined in cohorts representative of the intended clinical setting. Analytical validation is equally important: a biomarker must first be measured reliably before its relationship with a clinical outcome can be meaningfully evaluated. These principles are emphasized in the FDA-NIH BEST framework and in evidence-based recommendations for circulating miRNA biomarker assays (FDA-NIH, Working Group, 2025; Greytak et al., 2024).

Despite the expanding number of clinical studies, most miRNA candidates remain at the research or validation stage rather than being routinely incorporated into clinical decision-making. This gap reflects not only technical variability but also differences in study populations, disease definitions, sampling time and intended clinical use. Stronger evidence is obtained when a candidate is reproduced in independent cohorts, retains value after adjustment for established clinical variables and provides information beyond existing diagnostic or prognostic tools. The development of miRNA biomarkers should therefore be viewed as a progression from biological association to analytical validation, independent clinical validation and demonstration of added clinical value.

The same framework is applicable beyond human medicine. Diagnostic classification, prognosis, prediction of treatment response and longitudinal monitoring are equally relevant in veterinary species, although the biological samples, practical constraints and economic considerations may differ. This creates a logical basis for extending miRNA biomarker approaches to livestock health and reproduction, where accessible molecular

samples may be particularly valuable for repeated assessment of physiological status.

miRNA Biomarkers in Veterinary Medicine and Animal Reproduction

MicroRNAs have become increasingly relevant in veterinary medicine because many of the biological processes they regulate are conserved across mammalian species. Their presence in blood, milk, reproductive fluids and other accessible matrices makes them attractive candidates for monitoring animal health, physiological status and production-related traits. In livestock, circulating miRNAs have been investigated in association with inflammation, infectious disease, metabolic disorders, environmental stress, welfare and reproductive performance. Their stability in biological fluids and the possibility of repeated sampling are particularly useful in herd-based systems, where invasive tissue collection is often impractical (Jaglan et al., 2024; Miretti et al., 2020).

The potential applications of miRNA biomarkers in farm animals extend beyond disease diagnosis. Changes in miRNA expression have also been associated with nutrition, heat stress, endocrine regulation and reproductive performance. This broad biological sensitivity can be advantageous when the objective is to monitor physiological adaptation, but it also means that miRNA profiles should be interpreted in relation to age, breed, nutritional status, reproductive stage and environmental conditions. Recent livestock-focused reviews therefore emphasize that miRNAs may serve as indicators of both health and physiological stress rather than highly specific markers of a single condition (Ali et al., 2025; Miretti et al., 2020).

Reproduction is one of the veterinary fields in which miRNA regulation has received particular attention. miRNAs participate in

oocyte maturation, follicular development, fertilization, early embryonic development, implantation and maternal–conceptus communication. EV-associated miRNAs provide an additional mechanism through which reproductive tissues, gametes and embryos may exchange molecular signals. Reviews of mammalian reproduction describe EV-encapsulated miRNAs as components of intercellular communication across several reproductive stages and as potential indicators of reproductive status (Jaglan et al., 2024; Xie et al., 2023).

In cattle, the search for molecular indicators of early pregnancy has been motivated partly by the economic importance of shortening the interval between insemination and reliable pregnancy diagnosis. Circulating miRNAs have been evaluated as potential markers because they can be measured before conventional pregnancy confirmation in some experimental settings. Ninomiya et al. (2024) examined several circulating miRNAs after artificial insemination and reported lower plasma miR-126-3p levels in pregnant cows compared with non-pregnant animals at Day 21. Their study also showed that only a fraction of the measured circulating miRNAs was associated with extracellular vesicles, reinforcing the distinction between total plasma miRNA and EV-associated miRNA populations (Ninomiya et al., 2024).

More recent studies have expanded this approach using broader profiling methods. Ji et al. (2024) performed RNA sequencing of serum exosomal miRNAs at Days 0, 14 and 21 of pregnancy and identified 20 differentially expressed miRNAs across the comparisons (Ji et al., 2024). Predicted targets were enriched in pathways related to early pregnancy, including VEGF, NF-κB and MAPK signalling. Although such pathway analyses are exploratory and require biological validation, they demonstrate that exosomal miRNA profiles change during the early pregnancy period and may

contain information related to embryo implantation and maternal recognition of pregnancy.

The role of miRNAs in bovine reproduction is not limited to maternal blood. Conceptus-derived EVs can interact directly with the endometrium during the peri-implantation period. De Bem et al. (2024) showed that bovine conceptus-derived EVs contained miRNAs capable of modifying the molecular response of endometrial cells and that differences in EV cargo were associated with conceptus developmental origin (De Bem et al., 2024). These findings support a biological basis for using reproductive tract-derived miRNAs as markers, because the molecules detected in reproductive tissues and secretions may reflect ongoing embryo–maternal communication more directly than peripheral blood measurements.

miRNA profiles may also provide information about fertility status rather than pregnancy alone. Abeysinghe et al. (2025) compared plasma small extracellular vesicle miRNAs between high- and low-fertility dairy cows and identified several differentially expressed candidates (Abeysinghe et al., 2025). In an independent validation group, miR-181b-2-3p was more abundant in low-fertility animals. The study illustrates the potential use of circulating sEV-derived miRNAs as early indicators of subfertility, although the relatively small study populations and limited external validation indicate that such markers remain experimental rather than ready for routine herd application.

The same concept is relevant to male fertility. Studies in bulls have identified differences in sperm and seminal-plasma miRNAs between animals with different fertility phenotypes, suggesting that miRNA signatures may complement conventional semen evaluation. However, a systematic review of bull fertility studies found considerable variation among reported candidate miRNAs and analytical methods, indicating that reproducible markers have not

yet been fully established (de Souza et al., 2024). This highlights a general issue in veterinary miRNA research: biologically plausible candidates are relatively easy to identify, whereas validation across breeds, herds and laboratories remains more difficult.

Alternative reproductive samples may offer additional advantages. Cervico-vaginal mucus (CVM), uterine fluid and other reproductive secretions are positioned close to tissues involved in pregnancy establishment and may therefore contain molecular signals associated with local reproductive changes. CVM is particularly attractive because it can be collected with limited invasiveness and allows repeated sampling without the need for surgical or tissue-based procedures. Preliminary studies from our research group have investigated bovine CVM as a source of pregnancy-associated miRNAs, followed by methodological work on CVM sampling, nucleic-acid isolation and RNA quality for sequencing applications (Akçay, 2026).

These studies should be interpreted as exploratory rather than definitive evidence of a validated pregnancy test. Nevertheless, they support the broader idea that reproductive tract secretions can be considered alongside blood-derived samples in veterinary biomarker research. The integration of circulating miRNAs, EV-associated miRNAs and locally derived reproductive samples may ultimately provide a more complete picture of reproductive status than any single biological matrix. For cattle, the main challenges remain the same as in human miRNA biomarker research: standardized sampling, appropriate normalization, adequate biological replication and independent validation across populations.

Current Limitations and Future Perspectives

Despite the growing number of studies investigating miRNAs as biomarkers, several technical and biological limitations continue to restrict their broader application. One of the most

important problems is the lack of complete standardization across the pre-analytical, analytical and post-analytical stages. Sample collection, processing time, storage conditions, freeze–thaw cycles, haemolysis and residual blood cells can influence measured miRNA concentrations. Differences in RNA extraction protocols and assay platforms may further contribute to variability between laboratories, making direct comparison among studies difficult (Greytak et al., 2024; Zendjabil, 2024).

Normalization remains another persistent challenge. Unlike conventional mRNA expression analysis, no single reference miRNA can be assumed to remain stable across all tissues, biofluids, species and physiological conditions. Endogenous reference miRNAs, global mean normalization and synthetic spike-in controls are all used, but each approach addresses different sources of variation. The choice of normalization method can therefore substantially influence the final interpretation of expression differences. For circulating miRNA studies, methodological consistency and transparent reporting are at least as important as the analytical sensitivity of the detection platform itself (Greytak et al., 2024; Mestry et al., 2023).

Extracellular vesicle-associated miRNAs introduce additional complexity. EV isolation procedures differ considerably in yield, purity and the populations of particles recovered, while lipoproteins, protein complexes and non-vesicular RNA may be co-isolated. Current EV guidelines therefore emphasize careful description of sample preparation, separation and characterization rather than assuming that all isolated extracellular particles represent a homogeneous exosome population. This issue is particularly important when comparing EV-miRNA studies performed using different laboratories or biological matrices (Welsh et al., 2024).

Biological variability is equally important. miRNA expression can be affected by age, sex, nutritional status,

inflammatory state, medication, environmental exposure and other physiological factors. In livestock, breed, production system, reproductive stage, diet and environmental stress may add further sources of variation. Consequently, a candidate identified in one herd or breed may not necessarily perform equally well in another. Recent reviews of livestock miRNA research therefore emphasize the need for larger populations, well-defined phenotypes and validation across independent groups before individual miRNAs can be considered reliable biomarkers (Ali et al., 2025; Jaglan et al., 2024).

Another limitation is the frequent reliance on relatively small discovery cohorts. High-throughput sequencing and array-based approaches can generate measurements for hundreds of miRNAs from a limited number of samples, increasing the risk of false-positive associations and statistical overfitting. Candidate biomarkers should therefore be validated using independent populations and, where possible, alternative analytical platforms such as RT-qPCR or digital PCR. This is particularly relevant in veterinary research, where sample size, herd structure and breed composition may strongly influence apparent associations (Jaglan et al., 2024; Winter et al., 2022).

Future developments are likely to move away from reliance on single miRNAs toward integrated molecular signatures. Combining several miRNAs with clinical, biochemical or production-related variables may provide more robust classification than individual markers alone. Machine-learning approaches are increasingly being used to analyse high-dimensional miRNA datasets and identify combinations of features associated with biological or clinical outcomes. These methods may improve biomarker discovery, but they do not eliminate the need for independent validation and can themselves introduce overfitting when sample sizes are limited (Daniel Thomas et al., 2024; de Gonzalo-Calvo et al., 2024).

For veterinary applications, the most practical future direction may be the combination of molecular sensitivity with easily collected biological samples. Blood, milk, saliva and reproductive secretions can support repeated sampling and may be more suitable for routine herd monitoring than invasive tissue collection. In cattle reproduction, locally derived samples such as uterine fluids and cervico-vaginal mucus may offer complementary information to circulating biomarkers because they are closer to the reproductive tract. However, the usefulness of these matrices will depend on reproducible sampling protocols, appropriate normalization and validation across animals, breeds and management systems (Akçay, 2026; Jaglan et al., 2024; Winter et al., 2022).

Overall, miRNA biomarkers are best regarded as a developing molecular tool rather than a fully standardized diagnostic platform. Their biological relevance and accessibility support continued research in both human and veterinary medicine, but successful translation will depend less on identifying ever larger numbers of candidate miRNAs and more on improving reproducibility, standardization and independent validation.

Conclusion

MicroRNAs represent an important class of post-transcriptional regulators whose expression reflects multiple layers of cellular and physiological control. Their relative stability, sequence-specific detection and presence in tissues, circulating compartments and extracellular vesicles have provided a strong biological basis for their investigation as diagnostic, prognostic, predictive and monitoring biomarkers. At the same time, miRNA profiles should not be interpreted as simple one-to-one indicators of individual biological processes, because their abundance is

influenced by transcription, processing, cellular origin, extracellular transport and interactions with target RNAs (Kim et al., 2025; Shang et al., 2023).

Considerable progress has been made in the detection and characterization of circulating and EV-associated miRNAs, but translation into routine applications remains limited by methodological variability and insufficient standardization. Differences in sample collection, processing, RNA isolation, normalization and analytical platforms can substantially affect the measured profile, while biological heterogeneity further complicates comparison among populations. Greater consistency in experimental design, transparent reporting and independent validation will therefore be essential if miRNA biomarkers are to move beyond exploratory association studies (Mestry et al., 2023; Welsh et al., 2024).

These considerations are equally relevant to veterinary medicine. In livestock, miRNAs offer opportunities to investigate health, stress, fertility and reproductive status using biological samples that can be collected repeatedly with relatively limited invasiveness. In cattle, circulating miRNAs, EV-associated miRNAs and reproductive-tract samples have all been explored in relation to pregnancy and fertility (Miretti et al., 2020; Ninomiya et al., 2024). Cervico-vaginal mucus may provide an additional source of molecular information because of its accessibility and its close relationship with the reproductive tract, although further validation is required before such approaches can be considered suitable for routine reproductive management (Akçay, 2026). Overall, the future value of miRNA biomarkers will depend less on identifying increasing numbers of candidate molecules and more on establishing reproducible signatures that can be reliably measured and validated in the populations for which they are intended.

References

Abeysinghe, P., Turner, N., Flay, H., Meier, S., Cuttle, L., & Mitchell, M. (2025). MicroRNA (miRNA) in Plasma Small Extracellular Vesicles (sEV) as Potential Early Indicators of Dairy Cow Subfertility. *Journal of Extracellular Biology*, *4*. https://doi.org/10.1002/jex2.70084

Akçay, A. (2026). *İneklerin Serviko-Vajinal Mukus (Svm)'unda Gebelikle İlişkili miRNA'ların Araştırılması* (p. 168). Council of Higher Education National Thesis Center. https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezlerim.jsp?sira=1

Ali, M. E., Al-Saeed, F. A., Ahmed, A. E., Gao, M., Wang, W., Lv, H., Hua, G.-H., Yang, L., & Abdelrahman, M. (2025). MicroRNA as Biomarkers for Physiological and Stress Processing in the Livestock. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, *60* *4*, e70034. https://api.semanticscholar.org/CorpusID:277464210

Bofill-De Ros, X., & Vang Ørom, U. A. (2024). Recent progress in miRNA biogenesis and decay. *RNA Biology*, *21*(1), 1–8. https://doi.org/10.1080/15476286.2023.2288741

Condrat, C. E., Thompson, D. C., Barbu, M. G., Bugnar, O. L., Boboc, A., Cretoiu, D., Suciu, N., Cretoiu, S. M., & Voinea, S. C. (2020). miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. In *Cells* (Vol. 9, Issue 2, p. 276). https://doi.org/10.3390/cells9020276

Daniel Thomas, S., Vijayakumar, K., John, L., Krishnan, D., Rehman, N., Revikumar, A., Kandel Codi, J. A., Prasad, T. S. K., S S, V., & Raju, R. (2024). Machine Learning Strategies in MicroRNA Research: Bridging Genome to Phenome. *Omics : A Journal of Integrative Biology*, *28*(5), 213–233. https://doi.org/10.1089/omi.2024.0047

De Bem, T. H. C., Bridi, A., Tinning, H., Sampaio, R. V., Malo-Estepa, I., Wang, D., Vasconcelos, E. J. R., Nociti, R. P., de Ávila, A. C. F. C. M., Rodrigues Sangalli, J., Motta, I. G.,

Arantes Ataíde, G. J., da Silva, J. C. B., Fumie Watanabe, Y., Gonella-Diaza, A., da Silveira, J. C., Pugliesi, G., Vieira Meirelles, F., & Forde, N. (2024). Biosensor capability of the endometrium is mediated in part, by altered miRNA cargo from conceptus-derived extracellular vesicles. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *38*(10), e23639. https://doi.org/10.1096/fj.202302423RR

de Gonzalo-Calvo, D., Karaduzovic-Hadziabdic, K., Dalgaard, L. T., Dieterich, C., Perez-Pons, M., Hatzigeorgiou, A., Devaux, Y., & Kararigas, G. (2024). Machine learning for catalysing the integration of noncoding RNA in research and clinical practice. *EBioMedicine*, *106*, 105247. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2024.105247

de Souza, L. P., Domingues, W. B., Blödorn, E. B., da Silva Nunes, L., Ortiz, H. G., Komninou, E. R., & Campos, V. F. (2024). Expression of sperm microRNAs related to bull fertility: A systematic review. *Research in Veterinary Science*, *166*, 105077. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2023.105077

Diener, C., Keller, A., & Meese, E. (2024). The miRNA–target interactions: An underestimated intricacy. *Nucleic Acids Research*, *52*(4), 1544–1557. https://doi.org/10.1093/nar/gkad1142

FDA-NIH, Working Group, B. (2025). *FDA-NIH Biomarker Working Group*. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK338449/

Garcia-Martin, R., Wang, G., Brandão, B. B., Zanotto, T. M., Shah, S., Kumar Patel, S., Schilling, B., & Kahn, C. R. (2022). MicroRNA sequence codes for small extracellular vesicle release and cellular retention. *Nature*, *601*(7893), 446–451. https://doi.org/10.1038/s41586-021-04234-3

Garg, A., Shang, R., Cvetanovic, T., Lai, E. C., & Joshua-Tor, L. (2024). The structural landscape of Microprocessor-mediated

processing of pri-let-7 miRNAs. *Molecular Cell*, *84*(21), 4175-4190.e6. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2024.09.008

Geekiyanage, H., Rayatpisheh, S., Wohlschlegel, J. A., Brown, R. J., & Ambros, V. (2020). Extracellular microRNAs in human circulation are associated with miRISC complexes that are accessible to anti-AGO2 antibody and can bind target mimic oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(39), 24213–24223. https://doi.org/10.1073/pnas.2008323117

Greytak, S. R., Engel, K. B., Hoon, D. S. B., Elias, K. M., Lockwood, C. M., Guan, P., & Moore, H. M. (2024). Evidence-based procedures to improve the reliability of circulating miRNA biomarker assays. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *62*(1), 60–66. https://doi.org/10.1515/cclm-2023-0131

Han, J., & Mendell, J. T. (2023). MicroRNA turnover: a tale of tailing, trimming, and targets. *Trends in Biochemical Sciences*, *48*(1), 26–39. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2022.06.005

Hedayat, S., Cascione, L., Cunningham, D., Schirripa, M., Lampis, A., Hahne, J. C., Tunariu, N., Hong, S. P., Marchetti, S., Khan, K., Fontana, E., Angerilli, V., Delrieux, M., Nava Rodrigues, D., Procaccio, L., Rao, S., Watkins, D., Starling, N., Chau, I., … Valeri, N. (2024). Circulating microRNA Analysis in a Prospective Co-clinical Trial Identifies MIR652-3p as a Response Biomarker and Driver of Regorafenib Resistance Mechanisms in Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *30*(10), 2140–2159. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-23-2748

Huber, J., Longaker, M. T., & Quarto, N. (2023). Circulating and extracellular vesicle-derived microRNAs as biomarkers in bone-related diseases. *Frontiers in Endocrinology*, *Volume 14*. https://www.frontiersin.org/journals/endocrinology/articles/10.3389/fendo.2023.1168898

Jaglan, K., Dhaka, S. S., Magotra, A., Patil, C. S., & Ghanghas, A. (2024). Exploring MicroRNA biogenesis, applications and bioinformatics analysis in livestock: A comprehensive review. *Reproduction in Domestic Animals*, *59*(1), e14529. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/rda.14529

Ji, Z., Bao, B., Wang, Y., Wang, Z., Yang, Y., Xu, J., Wang, X., & Luoreng, Z. (2024). RNA Sequencing Reveals the Involvement of Serum Exosomal miRNAs in Early Pregnancy in Cattle. In *Animals* (Vol. 14, Issue 17, p. 2600). https://doi.org/10.3390/ani14172600

Jones, B. T., Han, J., Zhang, H., Hammer, R. E., Evers, B. M., Rakheja, D., Acharya, A., & Mendell, J. T. (2023). Target-directed microRNA degradation regulates developmental microRNA expression and embryonic growth in mammals. *Genes & Development*, *37*(13–14), 661–674. https://doi.org/10.1101/gad.350906.123

Jouravleva, K., & Zamore, P. D. (2025). A guide to the biogenesis and functions of endogenous small non-coding RNAs in animals. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *26*(5), 347–370. https://doi.org/10.1038/s41580-024-00818-9

Kim, H., Lee, Y.-Y., & Kim, V. N. (2025). The biogenesis and regulation of animal microRNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *26*(4), 276–296. https://doi.org/10.1038/s41580-024-00805-0

Komatsu, S., Kitai, H., & Suzuki, H. I. (2023). Network Regulation of microRNA Biogenesis and Target Interaction. In *Cells* (Vol. 12, Issue 2, p. 306). https://doi.org/10.3390/cells12020306

Leong, S. Y., Lok, W. W., Goh, K. Y., Ong, H. B., Tay, H. M., Su, C., Kong, F., Upadya, M., Wang, W., Radnaa, E., Menon, R., Dao, M., Dalan, R., Suresh, S., Lim, D. W.-T., & Hou, H. W. (2024). High-Throughput Microfluidic Extraction of Platelet-free Plasma for MicroRNA and Extracellular Vesicle Analysis. *ACS Nano*, *18*(8), 6623–6637. https://doi.org/10.1021/acsnano.3c12862

Mestry, C., Ashavaid, T. F., & Shah, S. A. (2023). Key methodological challenges in detecting circulating miRNAs in different biofluids. *Annals of Clinical Biochemistry*, *60*(1), 14–26. https://doi.org/10.1177/00045632221129778

Miretti, S., Lecchi, C., Ceciliani, F., & Baratta, M. (2020). MicroRNAs as Biomarkers for Animal Health and Welfare in Livestock. *Frontiers in Veterinary Science*, *7*, 578193. https://doi.org/10.3389/fvets.2020.578193

Mohamed Mansoor, M. A., Zhu, X., Ashiqueali, S. A., Alam, M. T., Winiarska, H., Pazdrowski, P., Kaminski, F., Copik, A., Masternak, M. M., & Kuznar-Kaminska, B. (2024). Circulating microRNAs as a Prognostic Tool to Determine Treatment Efficacy in Lung Cancer Patients Undergoing Pembrolizumab PD-1 Blockade Immunotherapy. In *Cancers* (Vol. 16, Issue 24, p. 4202). https://doi.org/10.3390/cancers16244202

Nakanishi, K. (2024). When Argonaute takes out the ribonuclease sword. *Journal of Biological Chemistry*, *300*(1), 105499. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105499

Ninomiya, C., Yoshino, H., Ishiguro-Oonuma, T., Iga, K., Kanazawa, T., Takahashi, T., & Kizaki, K. (2024). Potential of Circulating miRNA Biomarkers and Exosomes for Early Pregnancy Diagnoses in Cattle. In *Animals* (Vol. 14, Issue 11). https://doi.org/10.3390/ani14111592

Nopp, S., van der Bent, M. L., Kraemmer, D., Königsbrügge, O., Wojta, J., Pabinger, I., Ay, C., & Nossent, A. Y. (2023). Circulatory miR-411-5p as a Novel Prognostic Biomarker for Major Adverse Cardiovascular Events in Patients with Atrial Fibrillation. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 4, p. 3861). https://doi.org/10.3390/ijms24043861

Petrova, T., Kalinina, O., Aquino, A., Grigoryev, E., Dubashynskaya, N. V, Zubkova, K., Kostareva, A., & Golovkin, A. (2024). Topographic Distribution of miRNAs (miR-30a, miR-223, miR-let-7a, miR-let-7f, miR-451, and

miR-486) in the Plasma Extracellular Vesicles. *Non-Coding RNA*, *10*(1). https://doi.org/10.3390/ncrna10010015

Pultar, M., Oesterreicher, J., Hartmann, J., Weigl, M., Diendorfer, A., Schimek, K., Schädl, B., Heuser, T., Brandstetter, M., Grillari, J., Sykacek, P., Hackl, M., & Holnthoner, W. (2024). Analysis of extracellular vesicle microRNA profiles reveals distinct blood and lymphatic endothelial cell origins. *Journal of Extracellular Biology*, *3*(1), e134. https://doi.org/10.1002/jex2.134

Ren, X., Zhou, R., Ronan, G., Ozcebe, S. G., Ji, J., Senapati, S., March, K. L., Handberg, E., Anderson, D., Pepine, C. J., Chang, H.-C., Liu, F., & Zorlutuna, P. (2024). Towards real-time myocardial infarction diagnosis: a convergence of machine learning and ion-exchange membrane technologies leveraging miRNA signatures. *Lab on a Chip*, *24*(23), 5203–5214. https://doi.org/10.1039/d4lc00640b

Sajanti, A., Li, Y., Hellström, S., Cao, Y., Girard, R., Umemori, J., Frantzén, J., Koskimäki, F., Lyne, S. B., Falter, J., Rantamäki, T., Takala, R., Posti, J. P., Roine, S., Kolehmainen, S., Srinath, A., Jänkälä, M., Puolitaival, J., Rahi, M., … Koskimäki, J. (2024). Brain plasticity and neuroinflammatory protein biomarkers with circulating MicroRNAs as predictors of acute brain injury outcome - A prospective cohort study. *Journal of the Neurological Sciences*, *464*, 123169. https://doi.org/10.1016/j.jns.2024.123169

Sebastiani, G., Grieco, G. E., Bruttini, M., Auddino, S., Mori, A., Toniolli, M., Fignani, D., Licata, G., Aiello, E., Nigi, L., Formichi, C., Fernandez-Tajes, J., Pugliese, A., Evans-Molina, C., Overbergh, L., Tree, T., Peakman, M., Mathieu, C., & Dotta, F. (2024). A set of circulating microRNAs belonging to the 14q32 chromosome locus identifies two subgroups of individuals with recent-onset type 1 diabetes. *Cell Reports. Medicine*, *5*(6), 101591. https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2024.101591

Shang, R., Lee, S., Senavirathne, G., & Lai, E. C. (2023).

microRNAs in action: biogenesis, function and regulation. *Nature Reviews Genetics*, *24*(12), 816–833. https://doi.org/10.1038/s41576-023-00611-y

Tran, V., Oliveira-Jr, G. P. de, Chidester, S., Lu, S., Pleet, M. L., Ivanov, A. R., Tigges, J., Yang, M., Jacobson, S., Gonçalves, M. C. B., Schmaier, A. A., Jones, J., & Ghiran, I. C. (2024). Choice of blood collection methods influences extracellular vesicles counts and miRNA profiling. *Journal of Extracellular Biology*, *3*(10), e70008. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jex2.70008

Welsh, J. A., Goberdhan, D. C. I., O'Driscoll, L., Buzas, E. I., Blenkiron, C., Bussolati, B., Cai, H., Di Vizio, D., Driedonks, T. A. P., Erdbrügger, U., Falcon-Perez, J. M., Fu, Q.-L., Hill, A. F., Lenassi, M., Lim, S. K., Mahoney, M. G., Mohanty, S., Möller, A., Nieuwland, R., … Witwer, K. W. (2024). Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *Journal of Extracellular Vesicles*, *13*(2), e12404. https://doi.org/10.1002/jev2.12404

Winter, E., Cisilotto, J., Silva, A. H., Rosolen, D., Fabichak, A. P., Rode, M. P., & Creczynski-Pasa, T. B. (2022). MicroRNAs: Potential biomarkers for reproduction, diagnosis, prognosis, and therapeutic in domestic animals. *Research in Veterinary Science*, *142*, 117–132. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.12.004

Xie, Y., Wu, C., Chen, W., Wu, Z., Cai, G., & Hong, L. (2023). Extracellular vesicles-encapsulated microRNA in mammalian reproduction: A review. *Theriogenology*, *196*, 174–185. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.11.022

Yen, C.-Y., Chiu, C.-M., & Fang, I.-M. (2024). MicroRNA expression profiling in tears and blood as predictive biomarkers for anti-VEGF treatment response in wet age-related macular degeneration. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie*, *262*(9), 2875–2884. https://doi.org/10.1007/s00417-024-06478-x

Zapletal, D., Taborska, E., Pasulka, J., Malik, R., Kubicek, K., Zanova, M., Much, C., Sebesta, M., Buccheri, V., Horvat, F., Jenickova, I., Prochazkova, M., Prochazka, J., Pinkas, M., Novacek, J., Joseph, D. F., Sedlacek, R., Bernecky, C., O'Carroll, D., … Svoboda, P. (2022). Structural and functional basis of mammalian microRNA biogenesis by Dicer. *Molecular Cell*, *82*(21), 4064-4079.e13. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.10.010

Zendjabil, M. (2024). Preanalytical, analytical and postanalytical considerations in circulating microRNAs measurement. In *Biochemia Medica* (Vol. 34, Issue 2). https://doi.org/10.11613/BM.2024.020501

Zhang, Z., Luo, H., Li, C., & Liang, Z. (2022). Evidence for the circulating microRNA hsa-let-7d-3p as a potential new biomarker for sepsis in human subjects. *European Journal of Medical Research*, *27*(1), 137. https://doi.org/10.1186/s40001-022-00763-3


BİDGE