

Editörler

Prof. Dr. Hasan AKGÜL
Doç. Dr. Aslı GİRAY

gece
kitaplığı

Biyoloji-Mikoloji- Moleküler Biyoloji ve Genetik Alanında Uluslararası Araştırmalar ve Değerlendirmeler

**Ekim
2025**

Genel Yayın Yönetmeni / Editor in Chief • Eda Altunel

Kapak & İç Tasarım / Cover & Interior Design • Gece Kitaplığı

Birinci Basım / First Edition • © Ekim 2025

ISBN • 978-625-388-766-7

© copyright

Bu kitabın yayın hakkı Gece Kitaplığı'na aittir.

Kaynak gösterilmeden alıntı yapılamaz, izin almadan hiçbir yolla çoğaltılamaz. The right to publish this book belongs to Gece Kitaplığı. Citation can not be shown without the source, reproduced in any way without permission.

Gece Kitaplığı / Gece Kitaplığı

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

Ümit Apt No: 22/A Çankaya/ANKARA

Telefon / Phone: 0312 384 80 40

web: www.gecekitapligi.com

e-mail: gecekitapligi@gmail.com

Baskı & Cilt / Printing & Volume

Sertifika / Certificate No: 42488

BİYOLOJİ-MİKOLOJİ-
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE
GENETİK ALANINDA
ULUSLARARASI
ARAŞTIRMALAR VE
DEĞERLENDİRMELER

EDİTÖRLER

PROF. DR. HASAN AKGÜL
DOÇ. DR. ASLI GİRAY

İÇİNDEKİLER

Bölüm 1

Apoptoz Mekanizmalarında İşlevsel Bir Protein: ALIX (ALG-2) ile Etkileşimli Protein X)

*Seda BEYAZ, Beyza Nur EKŞİ,
Hacer Beyza ÖZTÜRK—1*

Bölüm 2

Yeni Termozimlerin Keşfinde Metagenomik Yaklaşımların Kullanılması

Behiye TAŞER—21

Bölüm 3

Mantarların Alkoloidleri

*Handan ÇINAR YILMAZ, Handan Nazlı PINAR ARSLAN,
Mesut TAŞKIN—43*

Bölüm 4

MİTOKONDRIYAL DNA (mtDNA) ve NÜKLEER DNA (nDNA) MUTASYONLARI: HÜCRESEL VE KLİNİK ETKİLERİ

Seda BEYAZ—59

Bölüm 1

APOPTOZ MEKANİZMALARINDA İŞLEVSEL BİR PROTEİN: ALIX (ALG-2 İLE ETKİLEŞİMLİ PROTEİN X)

Seda BEYAZ¹, Beyza Nur EKŞİ²,

Hacer Beyza ÖZTÜRK³

1 (Dr. Öğr. Üyesi.); Fırat Üniversitesi, e-mail: sbeyaz@firat.edu.tr ORCID ID: 0000-0003-0436-8112

2 (M.Sc.); Fırat Üniversitesi, e-mail: byznureksi166@gmail.com ORCID ID: 0009-0007-7167-8926

3 (M.Sc.); Fırat Üniversitesi, e-mail: beyzzoztrk27@gmail.com ORCID ID: 0009-0005-2006-5746

1. GİRİŞ

Apoptoz, hücrelerin kontrollü ölüm mekanizması olarak doku dengesinin korunmasında, gelişimsel süreçlerde ve kanser gibi pek çok hastalığın oluşumunda kritik rol oynamaktadır. Bu süreç, başta kaspaz ailesi proteinleri ve çeşitli sinyal yolları tarafından sıkı bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Kaspazlar özellikle çekirdeğin yıkımında merkezi rol üstlenirse de, hücre ölümü yalnızca bu enzimlerin aktivasyonu ile sınırlı değildir. Kaspazların baskılanması birçok hücrede sağkalımı garanti etmemekte, yalnızca çekirdeğin parçalanmasını engelleyerek sitoplazmada otofajik yıkımı tetiklemektedir. Özellikle sinir sisteminde, glutamatın yol açtığı kalsiyum artışı otofaji ve endositozun artmasına, bunun sonucunda da endolizozomal etkinliğin yükselmesine neden olmaktadır. Bu durum, apoptozun hem kaspaza bağlı hem de kaspazdan bağımsız mekanizmalarla gerçekleşebildiğini göstermektedir (Sadoul, 2012).

Bu bağlamda, apoptoz ile ilişkili gen-2 (ALG-2) ve onun etkileşim ortağı ALIX, önemli düzenleyici adaylar arasında yer almaktadır. ALG-2, kalsiyum bağlayıcı bir protein olup ALIX ile etkileşimi kalsiyum varlığına bağlıdır. Bu etkileşim, ALIX'in hücre ölümünü artırıcı ya da engelleyici işlevlerini belirleyen kritik bir basamak olarak değerlendirilmektedir. ALIX'in aşırı üretiminin sinir hücrelerinde kaspaz aktivasyonu yoluyla hücre ölümünü başlattığı, buna karşılık C-terminal bölgesinin kaspaz aktivasyonunu engelleyerek hücre sağkalımını destekleyebildiği gösterilmiştir. ALIX yalnızca programlanmış hücre ölümünde değil; aynı zamanda endositoz, hücre dışı kesecik (eksozom) oluşumu, hücreler arası sinyal iletimi ve hücre iskeleti dinamikleri gibi çok yönlü biyolojik süreçlerde görev alan, evrimsel olarak korunmuş bir protein olarak bilinmektedir. Hücre içi zar yapılarının düzenlenmesinde ve vezikül taşınmasında rol alarak apoptotik cisimciklerin oluşumuna katkı sağlamaktadır. Literatürde yapılan çalışmalar ALIX/ALG-2 kompleksinin hem kaspaza bağlı hem de kaspazdan bağımsız hücre ölümü yollarında ortak bir düzenleyici basamakta görev aldığını göstermektedir. Bu nedenle ALIX, apoptoz ile endolizozomal trafik arasındaki bağlantıyı kuran çok yönlü bir protein olarak yalnızca hücre ölümü süreçlerinde değil aynı zamanda nörodejeneratif hastalıklar, viral enfeksiyonlar ve kanser gibi durumlarda da önemli bir biyolojik belirteç ve tedavi hedefi olma potansiyeline sahiptir (Chatellard-Causse vd., 2002; Sadoul, 2012; Sun vd., 2015).

2. ALIX'İN YAPISAL ÖZELLİKLERİ

2.1. ALIX'in Domen Yapısı

ALIX (Apoptoza Bağlı Gen-2 ile Etkileşen Protein X, AIP1; Programlanmış Hücre Ölümü 6 (PDCD6IP)), sitoplazmada yüksek düzeyde eksprese edilen ve çok sayıda hücresel sürecin düzenlenmesinde merkezi rol oynayan bir proteindir. ALIX, türler arasında yaygın olarak korunan 869 amino asit uzunluğunda olup özellikle prolin (% 32), tirozin ile glutamin gibi amino asitler açısından zengin bir sitoplazmik proteindir. Yapısal olarak ALIX, N-terminalde muz benzeri konformasyon sergileyen Bro1 alanı, ortada V şeklinde ligand bağlanma bölgesi ve C-terminalde prolin açısından zengin bölge (PRR) olmak üzere üç ana alandan oluşmaktadır. Bu üçlü alan yapısı, ökaryotik türler arasında evrimsel olarak korunmuştur ve ALIX'in çeşitli proteinlerle etkileşime girerek hücresel sinyal yollarını düzenleyen bir iskele proteini olarak işlev görmesini sağlamaktadır (Chatellard-Causse vd., 2002; Popov vd., 2009; Banuelos vd., 2012; Sadoul, 2012).

ALIX, endolizozomal trafiğin düzenlenmesinde merkezi rol oynayan ve evrimsel olarak korunan bir sitoplazmik proteindir. Mayada ALIX'in iki homologue tanımlanmıştır: Bunlardan biri, pH adaptasyonunda görev alan bir transkripsiyon faktörünün bir sistein proteaz aracılığıyla aktivasyonunda işlev görürken; diğeri ise çok veziküllü cisimler (MVB) olarak adlandırılan geç endosom ara maddelerinin biyolojik işlevlerini düzenlemektedir. Memeli hücre modellerinde, ALIX'in MVB'ler içindeki veziküllerin oluşumunu kontrol etmektedir. Ayrıca ALIX, hem kaspaz bağımlı hem de bağımsız hücre ölümünü modüle edebilmekte olup, bu düzenleme apoptoz bağlantılı gen-2 (ALG-2) proteini tarafından sıkı bir şekilde gerçekleştirilmektedir (Sadoul, 2012).

ALIX, Ca^{2+} bağlayıcı protein ALG-2 ile etkileşerek apoptozu düzenlemektedir. ALG-2 ekspresyonunun baskılanması hücreleri çeşitli uyarılara bağlı ölümden korurken, ALIX'in C-terminal bölgesinin aşırı ekspresyonu da benzer şekilde koruyucu etki göstermektedir. Bu etkileşim, ALIX'in apoptoz üzerindeki düzenleyici rolünde kritik bir mekanizma olarak işlev görmektedir. ALIX proteininin C-terminal bölgesi, prolin açısından zengin olup belirli proteinlerle etkileşime girerek hücre ölümü ve programlı hücre ölümünü (apoptozu) düzenleme yeteneğine sahiptir. Ayrıca ALIX, endofilinlerle etkileşim göstermekte ve böylece hücre zarının şekil ve organizasyonunun korunmasına katkıda bulunmaktadır. C-terminal bölgenin aşırı ekspresyonu, endoplazmik retikulum ve tübülo-veziküler yapıların birikmesine yol açmakta ve hücre içi vakuol ile vezikül oluşumunu artırmaktadır; endofilinlerle eşzamanlı ifade edil-

diğinde bu yapılar birkaç mikron boyutuna kadar genişleyebilmektedir. Bu bağlamda, ALIX hem apoptoz ve hücre ölümü süreçlerinde hem de endositoz ve sitoplazmik yapıların düzenlenmesinde merkezi bir adaptör protein olarak görev yapmaktadır (Chatellard-Causse vd., 2002; Sadoul, 2012).

2.1.1. Bro1 Domain

Bro1 domainleri, ilk kez maya (*Saccharomyces cerevisiae*) model organizmasında taşıma için gerekli endozomal ayırma kompleksi (ESCRT / Endosomal Sorting Complex Required for Transport) yolu proteini Bro1p üzerinde tanımlanmıştır. Bu domain, içbükey ve dolu bir yüzeye sahip bumerang veya muz şeklinde bir yapı sergilemekte ve yapısında üçlü tetratrikopeptit tekrar alanı (TPR / Tetratricopeptide Repeat) içermektedir (Kim vd., 2005; Zhai vd., 2011). Bro1 domaininin kristal yapısı, 367 amino asitten oluşan katlanmış bir çekirdeği ortaya koymaktadır. Bro1 ve homologları (memelilerde ALIX, maya Rim20, Rhophilin, HD-PTP) üzerinde çok sayıda yapı çözülmüş ve çözünür katlanmış proteinlerin ekspresyonu test edilmiştir. Bro1 kalıntılarının 1–387 arasındaki segmenti kristal kalitesinde çözülmüş ve 2,3 Å çözünürlükle çok dalga boyulu anormal dispersiyon (MAD / Multiwavelength Anomalous Dispersion) yöntemiyle belirlenmiştir. Yapının doğrulaması, doğal verilere dayalı çalışma R faktörü (0,224) ve serbest R faktörü (0,252, 1,95 Å) ile gerçekleştirilmiştir. 367'den sonraki kalıntılar düzensiz olduğu için görselleştirilmemiştir. Asimetrik birimde, gevşek ilişkili iki monomer bulunmakta olup, sınırlı etkileşimler çözeltide tek monomer varlığı ile uyumlu bulunmaktadır (Kim vd., 2005). ESCRT sistemi, genellikle vakuolar protein ayırma (Vps / Vacuolar Protein Sorting) faktörleri olarak bilinen dört temel protein kompleksinden, yani ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II ve ESCRT-III'ten oluşmaktadır. Bro1 domaini, ESCRT'ye bağlı çok veziküler gövde (MVB / Multivesicular Body) oluşumu gibi hücresel süreçleri düzenleyen geniş bir ökaryotik protein grubunda iskele görevi görmektedir. Domainin ESCRT-III alt birimlerine bağlanabilmesi, fonksiyonel etkinliği açısından kritik bir özellik taşımaktadır. Bro1 domaini taşıyan proteinler, ökaryotlar arasında korunmuş olup maya ve memeli hücrelerinde farklı hücresel süreçlerde çeşitli roller üstlenmektedir (Bañuelos vd., 2012; Hurley, 2015). Bro1 domaini eksikliği, mayada hücre canlılığında azalma ve hücre çoğalmasında düzensizliklere neden olmaktadır (Mehdi vd., 2023). N-terminal Bro1 domaini, memelilerde ALIX proteininin endozomlara lokalizasyonu için temel bir işlev sağlamaktadır. Bro1 domaini, endozomlarda yerleşmiş ve protein sıralamada doğrudan rol oynamayan çeşitli proteinlerde ortak bir yapısal element oluşturmaktadır. Örneğin; maya Rim20, Bro1 domaini içeren tek diğer proteindir ve Bro1

ve ALIX'te bulunan prolin açısından zengin C-terminal bölgeden yoksundur (Odorizzi, 2006). Bro1, genel amino asit permeazı Gap1'in deubikitinasyonunda önemli rol oynamaktadır ve karboksipeptidaz S'nin MVB yolu ile taşınması için gereklidir (Nikko vd., 2003; Kim vd., 2005). Maya Bro1, ubiquitin (Ub / Ubiquitin) reseptörü olarak işlev görmektedir ve ubiquitinlenmiş zar proteinlerinin intralümenal veziküller (ILV / Intralumenal Vesicles) içine yönlendirilmesini sağlayarak lizozom veya vakuolde parçalanmalarını kolaylaştırmaktadır (Pashkova vd., 2021).

Boysen ve Mitchell (2006), maya Bro1 ve memeli AIP1/ALIX gibi Bro1-domain proteinlerinin endozom metabolizmasında kritik rol oynayan proteinler olduğunu vurgulamışlardır. Bro1-domain, ESCRT kompleksinin bir alt birimi olan maya endozomal yüzey proteini Snf7/Vps32 ile etkileşime girmektedir. Ancak Bro1-domain proteini Rim20, doğrudan endozom fonksiyonuna katılmak yerine, transkripsiyon faktörü Rim101'in alkali pH ile indüklenen proteolitik aktivasyonu için gereklidir. Rim20-GFP'nin (Yeşil Floresan Protein / Green Fluorescent Protein) hücre içindeki dağılımı, çevresel pH'a bağlı olarak değişim göstermektedir. Asidik koşullarda sitoplazmada yaygın olarak bulunurken, alkali koşullarda belirgin noktasal odaklarda yoğunlaşmaktadır. Benzer şekilde, Bro1-GFP de odaklarda birikmekte, ancak asidik koşullarda daha fazla odak gözlemlenmektedir. Kolokalizasyon deneyleri, bazı Rim20-GFP odaklarının Bro1-RFP (Kırmızı Floresan Protein / Red Fluorescent Protein) odakları ile örtüşüğünü, bazı odakların ise bağımsız olduğunu ortaya koymuştur. Rim101 ayrımı için gerekli olan Rim8, Rim9, Rim21, Dfg16, Snf7, Vps20, Vps23 VE Vps25 genleri, Rim20-GFP odaklarının oluşumunu desteklemektedir. ESCRT kompleksleri ise, AAA-ATPase Vps4 (Çeşitli Hücrel Aktivitelere Bağlı ATPaz) eksikliği durumunda, endozom kaynaklı bölmelerde birikmektedir. Bu çalışmada, Rim20-GFP odaklarının harici pH, Rim101 yoluna özgü genler ve Snf7 dışındaki her bir ESCRT alt biriminden bağımsız olarak, Vps4 mutant arka planda da biriktiğini göstermişlerdir. Rim20-GFP odakları, Snf7-RFP ile birlikte perivakuolar bir bölgeyi işaret ederek endozomları temsil etmektedir. Bu bulgular, alkali büyüme koşullarının endozomal yüzeyde Rim20-Snf7 etkileşimini ve Rim101 ayrımını destekleyecek şekilde düzenleme yaptığı fikrini desteklemektedir. Sonuç olarak, Bro1-domain proteinlerinin aynı hücrede farklı mekanizmalarla düzenlenebilmesi, endozom metabolizmasının hücrel sinyalleme ile bütünleşebileceğini ortaya koymaktadır.

2.1.2. V Domain

ALIX'in V alanı, yaklaşık 320 amino asit uzunluğunda olup, üç sarmallı α -heliks demetlerinden oluşan ve "V" harfi şeklinde iki kola sahip bir yapıyı temsil etmektedir (Fisher vd., 2007; Kimura vd., 2015). Kristal yapısı, selenometiyonil proteini kullanılarak çok dalga boyulu anormal dispersiyon (MAD) yöntemiyle 2,9 Å çözünürlükte belirlenmiştir. Yapının tamamı α -helikslerden oluşmakta ve iki kol, birbirine yaklaşık 40° açıyla "V" harfi şeklinde düzenlenmiştir. Kısa kol, 75 Å uzunluğunda olup N-terminali içermektedir ve 6 α -heliks ile 150 amino asitten oluşurken, uzun kol 100 Å genişliğinde ve 5 α -heliks ile 194 amino asitten meydana gelmektedir. İki koldaki helikslerin topolojik düzenlenmesi karmaşık bir yapı sergilemektedir (Lee vd., 2007). V alanı, özellikle YP(X)nL (Tirozin-Prolin ile başlayan, arada değişken sayıda herhangi bir amino asit bulunan ve Lösin ile sonlanan bir dizi) motifine sahip viral ve hücrel proteinerle etkileşimi açısından kapsamlı olarak incelenmiştir. İnsan immün yetmezlik virüsü tip-1 (HIV-1), Ebola virüsü ve at enfeksiyöz anemi virüsü (EIAV / Equine Infectious Anemia Virus) gibi retrovirüslerde, V alanı viral proteinlerin YP(X)nL motifine bağlanarak virüs tomurcuklanmasında kritik bir rol oynamaktadır. V alanının ikinci kolunda bulunan hidrofobik cep, bu motif peptidine bağlanma bölgesi olarak işlev görmektedir (Kimura vd., 2015). Memeli hücrelerde yapılan çalışmalarda, epidermal büyüme faktörü (EGF / Epidermal Growth Factor) uyarımının, ALIX'in ubikitinlenmiş EGF reseptörü ile V alanı aracılığıyla etkileşimini başlattığı ve çok veziküllü cisim proteini-4 (CHMP4 / Charged Multivesicular Body Protein-4) ile Bro1 alanı üzerinden ilişkisini güçlendirdiği gösterilmiştir. Sürekli veya aralıklı EGF uyarımı altında, V alanı aracılığıyla ALIX dimerizasyonunun veya ALIX'in inhibisyonu, aktive edilmiş EGFR'nin çok veziküllü cisim (MVB) sınıflandırmasını önemli ölçüde engellemekte ve ekstrasellüler sinyalle düzenlenen kinaz 1/2 (ERK1/2 - Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2) sürekli aktivasyonunu teşvik etmektedir. Bu bulgular, ALIX'in memeli hücrelerinde ubikitinlenmiş membran reseptörlerinin MVB sınıflandırılmasında kritik bir rol oynadığını göstermektedir (Sun vd., 2015).

Kimura vd. (2015), maya Bro1 ve Rim20'nin Bro1 ve V alanlarının ortak yapıya sahip bir protein ailesini temsil ettiğini belirtmişlerdir. ALIX ve His alan proteini tirozin fosfataz (HD-PTP) gibi memeli Bro1 ailesi proteinleri, V alanları aracılığıyla hedef proteinlerdeki YP(X)nL motiflerine bağlanmaktadır. ALIX'te, V alanındaki hidrofobik oluğunda bulunan fenilalanin (Phe) kalıntısı, motif bağlanması için kritik öneme sahiptir. Memeli ve maya V alanları arasında genel dizi korunumunun düşük olmasına rağmen, maya Bro1'deki Phe kalıntısı, YP(X)nL motifine sahip hedef proteini Rfu1'e bağlanmak için gereklidir. Rim20'nin V alanı

da Rim101'in YPIKL (Tirozin-prolin ile başlayan izolösin ve lizin ile devam eden ve lösin ile sonlanan bir dizi) motifi ile etkileşerek proteolitik işlenmesini sağlamaktadır. Özellikle kritik Phe kalıntısının veya Rim101 motif mutasyonunun bu süreci bozduğu belirtilmiştir. Bu bulgular doğrultusunda, V alanları ile YP(X)nL motifine sahip proteinler arasındaki etkileşimler, mayadan memeli hücrelerine kadar korunmuş olup, her V alanının hedef proteinlere özgüllüğü, bağlanma yüzeyindeki henüz tanımlanmamış faktörler tarafından belirlenmektedir. ALIX'in V alanı, hem viral proteinlerin tomurcuklanmasında hem de memeli hücrelerinde ubiquitinlenmiş membran reseptörlerinin endozomal sınıflandırılmasında merkezi bir rol oynamaktadır.

2.1.3. Prolin Zengini Bölge (PRD / Proline-Rich Domain)

C-terminal prolin açısından zengin bölge (PRD / Proline-Rich Domain) yapısal olarak düzensizdir ve hakkında çok fazla bilgi bulunmaktadır. PRD'ler ökaryotik proteinlerdeki en yaygın modüller arasında olup, yapısal özelliklerinin, *in vitro* ifadelerinin elde edilmesini zorlaştıran düzensizlikleri nedeniyle tanımlanması oldukça zordur (Qiu vd., 2022). PRD modülleri, büyük membran komplekslerinin veya aktin sitoskeletonunun parçaları olan çeşitli hücresel bileşenler için bağlanma yerleri bulunmaktadır. Bunlar için örnek verilecek olursa, F-aktin, ALG-2, ESCRTI bileşeni TSG101 (tümör duyarlılığı geni 101), orta gövde proteini CEP55 (55 kDa'lık sentrozomal protein), endositotik adaptör protein CIN85 (85 kDa'lık Cbl ile etkileşen protein, SETA) ve endositotik protein endofiline bağlandığı ortaya koyulmaktadır (Qiu vd., 2022). PRD'deki TSG101, endofilin, CIN85 ve CMS bağlanma bölgelerinin tamamı isteğe bağlı iken, PRD'nin C-ucunun zorunlu olduğu ve ALIX'in virüs tomurcuklanmasındaki işlevi için henüz tanımlanmamış bir kofaktörle etkileşime girebileceği öne sürülmektedir (Usami vd., 2007). PRD, ALIX'i otoinhibisyonlu bir durumda tutarak işlevini düzenlemede görevlidir (Pires vd., 2009).

Kansakar vd. (2021), WAVE3 proteininin, hücre şekli ve hareketini düzenleyen aktin sitoskeletonunu yeniden şekillendiren bir protein olduğunu göstermişlerdir. WAVE3'ün PRD bölgesi, özellikle meme kanserinde kanser kök hücreleri (CSC) nişinin korunmasında kritik bir rol oynamaktadır. PRD, CSC'ye özgü nükleer transkripsiyon faktörü YB1'in nükleusa taşınmasını kontrol etmekte ve CSC belirteçlerinin ekspresyonunu desteklemektedir. Ayrıca PRD, EMT (epitel-mezenkimal geçiş) sürecinin WAVE3 aracılığıyla aktivasyonunu yönlendirmektedir. Bununla birlikte, PRD'nin fosforilasyonunun kaybı, YB1'in nükleer aktivasyonunu engelleyerek CSC belirteçlerinin ekspresyonunu azaltmakta ve EMT'nin WAVE3 aracılı aktivasyonunu inhibe etmektedir. Bu bulgular, WAVE3 ve PRD'nin, WAVE düzenleyici kompleks (WRC) aracılığıyla aktin sitoskeletonunu yeniden şekillendirme işlevinden bağımsız olarak,

meme kanserinde hücre invazyonu ve metastaz kaskadının düzenlenmesinde yeni ve kritik bir role sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Yu vd. (2023), kalsiyum ve fosfolipit bağlayıcı bir protein olan insan anneksin A7, plazma membran onarımını, kalsiyum homeostazını, apoptozu ve tümör ilerlemesini yönettiğini bildirmişlerdir. A7, işlevsel özgüllüğünü belirleyen bir N-terminal PRD; 180 kalıntı, ~%24 prolin açısından zengin alan içermektedir. Mikroskopi ve boya bağlama deneyleri kullanarak, rekombinant A7 ve izole edilmiş PRD'sinin kendiliğinden küresel kondensatlara faz ayrıldığını ve daha sonra β -tabaka açısından zengin fibrillere dönüştüğünü göstermişlerdir. A7-PRD'nin fibrilizasyonunun, kimyasal kinetik tarafından belirlendiği gibi, birincil nükleasyon ve fibril katalizli ikincil nükleasyon süreçleri yoluyla ilerleme sağladığı ve bunun amiloid birleşimi için mekanik bir temel sağladığını belirtmişlerdir. Ayrıca, önemli fizyolojik ve patolojik etkileri olan kümeler oluşturmaya yatkın bir ökaryotik PRD alt sınıfını doğruladığını ve vurguladığını saptamışlardır.

Rayala vd. (2014), insan fosfolipit scramblaz 1 (hPLSCR1) proteinini tip II integral membran proteini olarak tanımlamış ve bu proteinin fosfolipitlerin Ca^{2+} bağımlı olarak çift yönlü karıştırılmasını sağladığını belirtmişlerdir. hPLSCR1 proteininin N-terminal ucunda yer alan PRD, proteinin belirli bir işlevini yerine getirmesi için kritik öneme sahiptir. hPLSCR1'in homologue olan hPLSCR2, PRD'ye sahip olmadığından scramblaz aktivitesi göstermemektedir. Araştırmacılar, hPLSCR2'nin aktivitesiz olmasının nedeninin PRD eksikliği olduğunu düşünmüşlerdir. Bunu test etmek için hPLSCR1'in PRD'si hPLSCR2'ye eklenmiş (PRD-hPLSCR2) ve scramblaz aktivitesinin geri gelip gelmediği incelenmişlerdir. Fonksiyonel deneyler, PRD eklenen hPLSCR2'nin karıştırma aktivitesini kazandığını; buna karşılık hPLSCR1'den PRD silindiğinde (Δ PRD-hPLSCR1) aktivitenin kaybolduğunu göstermiştir. Bu bulgular, PRD'nin protein işlevi için hayati öneme sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Araştırmacılar ayrıca, PRD'nin eklenmesi veya silinmesinin etkilerini çeşitli spektroskopik yöntemlerle karakterize etmişlerdir. Elde edilen sonuçlar, hPLSCR1 ve PRD-hPLSCR2'nin Ca^{2+} bağımlı olarak kümeleşme ve fosfolipit karıştırma aktivitesi gösterdiğini, hPLSCR2 ve Δ PRD-hPLSCR1'in ise hem kümeleşme hem de aktivite göstermediğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, scramblazların protein kümeleşmesi yoluyla Ca^{2+} bağımlı karıştırma aktivitesi gerçekleştirdiğini desteklemektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda; Fosfolipit scramblazlar (PLSCR) tarafından gerçekleştirilen fosfolipit karıştırmanın olası mekanizmasını açıklamakta ve PRD'nin hem protein işlevi hem de hücrel lokalizasyon için önemini göstermektedir.

3. ALIX'İN HÜCRESEL FONKSİYONLARI

Programlanmış Ölüm Ligandı-1 (Programmed Death-Ligand-1, PD-L1), immün sistemi baskılayan bir transmembran proteindir ve tümör hücrelerinin bağışıklık sisteminden kaçışında kritik bir rol üstlenmektedir. PD-L1'in hücre içi taşınması ve hücre dışına salınımı, endozomal ve lizozomal yollar üzerinden gerçekleşmekte olup, MVB ve ekzosomlar bu süreçte görev alan temel ara yapılar olarak bilinmektedir. Hücresel membranların içe doğru tomurcuklanması, kargo proteinlerinin ayrıştırılması ve vezikül oluşumu gibi süreçler, ESCRT olarak adlandırılan çok bileşenli bir protein kompleksi tarafından düzenlenmektedir. ESCRT sistemi; ESCRT-0, -I, -II ve -III olmak üzere dört ardışık kompleksten oluşmakta ve bu komplekslerin koordine şekilde çalışması, hem proteinlerin degradasyona yönlendirilmesi hem de ekzosomal yüklerin seçilmesi açısından yaşamsal öneme sahiptir. ALIX, ESCRT-III kompleksi ile doğrudan etkileşime giren ve endozomal tomurcuklanma sürecine katkıda bulunan aksesuar bir proteindir. ALIX, hem endozomal kargo seçici mekanizmalarda görev almakta hem de membran dinamiği ve vezikül oluşumu süreçlerinde aracılık işlevi görmektedir. ALIX'in bu işlevi, özellikle tümör hücrelerinde bağışıklık kontrol noktası proteinleriyle olan etkileşimi bağlamında dikkat çekicidir (Monypenny vd., 2018). Bazal benzeri meme kanseri (BLBC) hücrelerinde yapılan yüksek içerikli kısa girişimli RNA (siRNA) taramaları, ALIX'in, EGFR aktivitesinin ve PD-L1 yüzey ekspresyonunun düzenlenmesinde kilit bir düzenleyici olduğunu ortaya koymuştur. ALIX'in yokluğu, EGFR'nin uyarı sonrası daha uzun süre aktif kalmasına neden olurken, aynı zamanda PD-L1'in MVB'ler aracılığıyla taşınmasında aksamalara yol açmaktadır. Bu durum, PD-L1'in ekzosomal salınımının azalmasına ve yüzeyde yeniden birikmesine neden olmaktadır. Hücre yüzeyinde artan PD-L1 düzeyleri ise, tümör hücrelerinin sitotoksik T lenfositlere karşı daha dirençli hale gelmesine ve bağışıklık sisteminin baskılanmasına neden olmaktadır. ALIX aracılığıyla düzenlenen bu mekanizmalar, yalnızca hücre içi sinyal iletiminde değil, aynı zamanda hücre dışı immün mikroçevrenin şekillendirilmesinde de kritik rol oynamaktadır. Nitekim, ALIX kaybı hem hücre-özerk proliferatif sinyallerin artmasına yol açmakta hem de bağışıklık sistemine karşı geliştirilen hücre-özerk olmayan savunma mekanizmalarının aktivasyonuna zemin hazırlamaktadır. Bu yönüyle ALIX, EGFR ve PD-L1 gibi kanser biyolojisinde merkezi öneme sahip iki farklı yolak arasında bir bağlantı noktası işlevi görmektedir (Monypenny vd., 2018). Bu bağlamda, ALIX'in ESCRT sistemi içerisindeki düzenleyici rolü, MVB üzerinden gerçekleşen protein taşınımı ve ekzosomal salınım mekanizmaları ile birleştğinde, hem tümör hücresi dinamiklerini hem de immün yanıtı şekillendiren çok katmanlı bir kontrol düzeneği oluşturmaktadır.

Bu özellikleriyle ALIX, özellikle BLBC gibi bağıışıklık kaçışıyla karakterize edilen agresif kanser türlerinde, potansiyel bir tanısal ve terapötik hedef olarak değerlendirilebilecek önemli bir moleküler düzenleyici konumundadır (Monypenny vd., 2018).

ALIX, endozomal yolların düzenlenmesinde merkezi bir adaptör protein olarak işlev görmekte ve MVB oluşumunda kritik bir rol üstlenmektedir. ALIX, ESCRT sisteminin önemli bileşenlerinden TSG101 ve CHMP4b ile etkileşime girerek endozomal ayırma komplekslerinin doğru çalışmasına katkı sağlamaktadır. Ayrıca membran şekillenmesi ve vezikül tomurcuklanmasında görev alan endofilinlerle olan bağlanması sayesinde, MVB içindeki veziküllerin oluşumu ve taşınmasında aktif rol oynamaktadır. Bu çok yönlü işlevleri ile ALIX, hem multiveziküler cisimlerin biyogenezi ve fonksiyonunda hem de endozomal yolakla bağlantılı programlanmış hücre ölümü (apoptoz) mekanizmalarında kritik bir düzenleyici olarak öne çıkmaktadır. Dolayısıyla ALIX, endolizozomal sistem ile apoptozis arasında moleküler bir köprü işlevi görerek hücre içi taşıma süreçleri ile hücre kaderi belirleyici sinyalleri arasında önemli bir bağlantı sağlamaktadır (Mahul-Mellier vd., 2006). ESCRT sistemi, hücre içi membran trafiği ve membran onarımı süreçlerinde merkezi bir role sahiptir. Özellikle MVB oluşumunda ESCRT kompleksleri, iç membran invajinasyonu (membran katlanması ve çukurlaşması) ve vezikül oluşumunu düzenleyerek, membran proteinlerinin hedeflenmesini sağlamaktadır. ESCRT-III alt birimleri, membran kesilmesini gerçekleştirerek, MVB içindeki intralümenal veziküllerin (ILV) oluşumunu mümkün kılmaktadır. Bu süreç, membran bütünlüğünün korunması ve hücre içi sinyal iletiminde kritik öneme sahiptir (Yang vd., 2022).

ALIX proteini, ESCRT yolunda işlev gören önemli bir adaptör molekülüdür ve özellikle ESCRT-III ile etkileşerek MVB biyogenezinde görev almaktadır. ALIX, ESCRT-III bileşenleri ile bağlantı kurarak membran şekillendirilmesi ve vezikül oluşum süreçlerini düzenlemektedir. Ayrıca, ALIX membran hasarlarının onarımında ve proteinlerin endozomal ayırımı ile lizozomal yola yönlendirilmesinde de önemli bir düzenleyicidir. MVB'ler, hücre içinde biyomoleküllerin paketlenip taşındığı ve gerek lizozomal degradasyon gerekse ekzosom salınımı için merkez noktasıdır. ESCRT ve ALIX'in koordineli çalışması, MVB'lerin oluşumunda ve fonksiyonunda kritik bir mekanizma olarak işlev görmektedir. ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II ve ESCRT-III komplekslerinin yanı sıra ALIX ve Vps4A proteini, hasarlı lizozomların tamirinde ve lizofajinin başlamasında görev almaktadır. Bu durum, özellikle hücrel stres ve hasar durumlarında membran bütünlüğünün korunması açısından hayati önem taşımaktadır. ESCRT sistemi ve ALIX aracılığıyla düzenlenen MVB biyogenezi, tümör gelişimi ve ilaç direnci gibi klinik açıdan kritik süreçlerde

de önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, ESCRT ve ALIX hedeflenerek MVB fonksiyonlarının modülasyonu, kanser ve diğer hastalıklarda yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için umut vadeden bir alan olarak araştırılmaktadır (Yang vd., 2022).

4. LİTERATÜRDE ALIX PROTEİNİNİN HÜCRESEL FONKSİYONLARI ÜZERİNE GÜNCEL ÇALIŞMALAR

Larios vd. (2020), endozomal intraluminal veziküllerin (ILV'ler), yalnızca hücre içi proteinlerin lizozomal bölgelere taşınarak parçalanmasında değil, aynı zamanda bu veziküllerin ekzosom olarak salgılanmaları yoluyla hücreler arası iletişimin düzenlenmesinde de önemli roller üstlendiklerini göstermiştir. Yaptıkları çalışmada, ILV oluşumunun ESCRT-0, -I, -II ve -III olmak üzere dört temel ESCRT kompleksinin koordineli işleyişine bağlı olduğunu ortaya koymuşlardır. Özellikle ESCRT-III kompleksinin, membran deformasyonu ve fisyon gibi süreçlerde doğrudan görev aldığını vurgulamışlardır. Bu bulgular, ILV'lerin yalnızca hücrel atıkların bertarafında değil, aynı zamanda hücreler arası bilgi aktarımında da aktif bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu bağlamda araştırmacılar, ESCRT ile ilişkili bir protein olan ALIX'in, LBPA (lizobisfosfatidik asit) içeren geç endozomal membranlara yönelerek ESCRT-III alt birimlerini bu membran bölgelerine çektiğini ve söz konusu etkileşimin diğer ESCRT komplekslerinin varlığına ihtiyaç duymaksızın gerçekleştiğini göstermişlerdir. Ayrıca bu etkileşimin, *in vitro* koşullarda destekli çift katmanlı membran sistemlerinde yeniden üretilebildiği de deneysel olarak doğrulanmıştır. Elde edilen bulgular, ALIX'in ESCRT-III ile birlikte işlev gördüğü bu alternatif yolağın, tetraspaninlerin (CD9, CD63 ve CD81 gibi) ekzosomal yola ayrılmasını ve hedef hücrelere iletilmesini düzenleyici bir mekanizma sunduğunu göstermektedir. Böylece ALIX proteininin, klasik ESCRT yoluna ek olarak ILV oluşumunda tamamlayıcı ve seçici bir rol üstlendiği; bu yol aracılığıyla belirli proteinlerin, özellikle de hücrel iletişimde görev alan ekzosomal bileşenlerin, spesifik olarak yönlendirilmesinde görev yaptığı sonucuna ulaşılmıştır. ALIX'in bu özgül işlevi, yalnızca ESCRT-III alt birimlerinin geç endozomal membranlara taşınmasını sağlamakla kalmamakta, aynı zamanda bu süreç aracılığıyla ekzosomal kargo seçiminde belirleyici bir rol oynamaktadır. Özellikle tetraspanin ailesine ait membran proteinlerinin ekzosomlara seçici olarak yönlendirilmesi, ALIX ve ESCRT-III etkileşiminin varlığıyla doğrudan ilişkilendirilmiştir. Bu durum, ALIX'in hem ILV oluşumunun erken evrelerinde membran dinamiklerini kontrol eden bir faktör olduğunu, hem de hücre dışına salınan ekzosomların protein içeriğini şekillendiren önemli bir düzenleyici olarak işlev gördüğünü düşündürmektedir. Dolayısıyla, ALIX aracılı bu alternatif yolak, yalnızca hücre içi veziküler trafik açısından değil, aynı zamanda ekzosomal iletişimin biyolojik seçiciliği

bakımından da dikkate değerdir. Bu bağlamda yapılan bulgular, ALIX-ESCRT-III etkileşim ağının hücreler arası sinyalleşme, bağışıklık yanıtı, tümör progresyonu ve çeşitli hastalık süreçlerinde potansiyel bir hedef olabileceğine işaret etmektedir.

Sun vd. (2015), modüler adaptör protein ALIX'in, aktive olmuş EGFR'nin ESCRT aracılığıyla MVB'lerde ayrılmasında kritik rol oynadığını belirtmişlerdir. Ayrıca, ALIX'in yapısı içinde ESCRT işlevini geçici olarak engelleyebilen bir oto-inhibisyon mekanizması bulunduğu tespit etmişlerdir. Bu oto-inhibisyonun düzenlenmesinde ise, kalmodulin süper ailesine ait kalsiyum bağlayıcı protein ALG-2 önemli rol oynamaktadır. Kalmodulinin biyolojik işlevlerinden esinlenilerek yapılan deneylerde, ALG-2'nin aktive olmuş EGFR'nin MVB ayrımında ALIX'in işlevselliğini düzenlediği saptanmıştır. Bulgular, kalsiyum bağımlı ALG-2'nin ALIX ile etkileşiminin, ALIX'in molekül içi oto-inhibisyonunu tamamen ortadan kaldırdığını ve ALIX'in ESCRT-III bileşeni CHMP4 ile bağlanmasını ve membranla ilişkisini güçlendirdiğini göstermişlerdir. Ayrıca, EGFR aktivasyonunun ALIX-ALG-2 etkileşimini artırdığı ve bunun ALIX'in membranla ilişkisini güçlendirdiği tespit etmişlerdir. İşlevsel incelemelerde, ALG-2 tarafından ALIX aktivasyonunun engellenmesinin, ALIX-CHMP4 etkileşiminin inhibisyonu kadar etkin bir şekilde aktive EGFR'nin MVB ayrışmasını engellediği belirlemişlerdir. Bununla birlikte, ALG-2 kaynaklı ALIX aktivasyonunun engellenmesinin, sitokinetik absisyon veya EIAV tomurcuklanması üzerinde etkisi olmadığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, kalsiyum bağımlı ALG-2 ve ALIX etkileşiminin, ubiquitinlenmiş membran reseptörlerinin MVB yoluyla ayrışmasını destekleyen işlevsel ALIX formunun oluşmasında özel bir rol üstlendiğini ortaya koymuşlardır. Valcz vd. (2016), eksosomların adenoma-karsinom dizisinde epitel hücreler ile mikroçevre arasındaki biyolojik molekül taşınmasında kritik roller oynadıklarını göstermişlerdir. Sağlıklı, adenom ve kolorektal karsinom hastalarından alınan örneklerde yaptıkları analizlerde, çoğu eksosom ilişkili genin ekspresyonunun adenom-karsinom dizisi boyunca belirgin şekilde arttığını bulmuşlardır (PGK1, PKM, ANXA5, ENO1, HSP90AB1, MSN). Buna karşın, multivesiküler cisim ve eksosom oluşumunda görevli ALIX proteininin hem mRNA hem de protein düzeyinde anlamlı şekilde azaldığını ve protein dağılımının difüz sitoplazmadan granüler MVB benzeri yapıya geçtiğini saptamışlardır. Bu ALIX pozitif partiküllerin tümör yuvalarında ve tümör-stroma sınırında gözlemlendiğini, ayrıca tümör mikroçevresindeki stromal ve kanser hücrelerinde de bulunduğunu belirtmişlerdir. Çalışmaları, eksosom ilişkili markerların anormal ekspresyonunu ve ALIX'in adenom-karsinom dizisinde MVB benzeri yapıya dönüşümünü ortaya koyarak, bu partiküllerin tümör büyümesi, metastaz ve tedavi yanıtında

epitel–stroma etkileşimlerini düzenleyebileceğini göstermiştir. Yang vd. (2021), pankreas kanserinin erken evrede belirti vermemesi ve erken tanı oranının düşük olması nedeniyle kötü prognoza sahip olduğunu göstermişlerdir. Çalışmalarında, pankreas kanseri ile birlikte iyi diferansiye pankreatik nöroendokrin tümör, pankreas kistik lezyonlar ve kronik pankreatit gibi diğer pankreas hastalıklarından ve sağlıklı bireylerden alınan plazma eksosomlarının proteomik profillerini incelemişlerdir. İzobarik etiketler kullanarak yaptıkları protein analizi ve biyoinformatik değerlendirmeler sonucunda, eksosomal ALIX proteininin pankreas kanseri için potansiyel bir biyobelirteç olduğunu belirtmişlerdir ve bunu daha büyük bir hasta kohortunda doğrulamışlardır. ALIX proteinini, pankreas kanseri hastalarında diğer pankreas hastalıklarına ve sağlıklı bireylere göre anlamlı şekilde yükselmiş ve tümör evresi ile metastaz varlığı ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca, eksosomal ALIX ile serum CA19-9 kombinasyonunun, hem erken ve ileri evre pankreas kanserini ayırt etmede hem de pankreas kanseri ile diğer pankreas hastalıklarını ayırt etmede tek başına ALIX veya CA19-9'dan daha yüksek tanısal değerler sergilediğini göstermişlerdir (AUC sırasıyla 0.872 ve 0.910). Sonuç olarak, çalışmalarında plazma kaynaklı eksosom proteinlerinin pankreas kanserinin klinik tanısında invazif olmayan güvenilir biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini ve özellikle eksosomal ALIX ile CA19-9 kombinasyonunun erken ve ileri evre ayrımında yüksek potansiyele sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Sun vd. (2021) alzheimer hastalığı (AD) için yeni ve güvenilir bir biyobelirteç arayışında ALIX proteininin potansiyel rolünü incelemişlerdir. Çalışmada, AD hastalarının hem beyin dokularında hem de serum örneklerinde ALIX düzeylerinin sağlıklı bireylere kıyasla belirgin şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. Araştırmacılar, ALIX düzeyleri ile bilişsel gerileme arasında güçlü bir pozitif korelasyon ($r = 0.80$, $p < 0.001$) ve ALIX ile serum A β 40 düzeyleri arasında ise anlamlı bir negatif korelasyon ($r = -0.60$, $p < 0.001$) olduğunu bildirmişlerdir. ROC analizi sonuçları, serum ALIX'in AD tanısında yüksek tanısal değer taşıdığını göstermiştir. Eğri altında kalan alan (AUC) 0.80 olarak saptanmış, optimal kesim noktası 199.5 pg/ml olarak belirlenmiş ve bu değer ile %76 duyarlılık, %71 özgüllük ve %74 genel doğruluk elde edilmiştir. Ayrıca ALIX düzeyleri, AD hastalarında vasküler demans (VaD) hastalarına kıyasla anlamlı derecede düşük bulunmuşlar ve AD ile VaD'yi ayırt etmede AUC değeri 0.777 olarak rapor etmişlerdir. Çalışmada ayrıca, farklı AD hayvan modellerinde memantin tedavisinin ALIX düzeylerindeki azalmayı kısmen geri çevirdiği tespit etmişlerdir. Bu bulgular, serum ALIX'in hem AD tanısı hem de AD ile VaD'nin ayırt edilmesinde yeni ve non-invaziv bir biyobelirteç olabileceğini ortaya koymaktadır. Laporte vd. (2017), ALIX

eksik farelerde beynin tüm incelenen bölgelerinde belirgin hacim azalması gözlemlenmiştir ve yetişkin korteksin normal katmanlaşmaya sahip olmasına rağmen boy ve kalınlık açısından küçüldüğünü göstermişlerdir. Bu bulgular, ALIX'in beyin katmanlaşmasını doğrudan etkilemediğini, ancak organ boyutu ve hacmini düzenlemede merkezi bir rol oynadığını vurgulamışlardır. Embriyonik dönemde (E11.5–E12.5) progenitör hücrelerdeki geçici apoptoz yüzey genişlemesini sınırlandırırken, doğum sonrası korteksin radyal genişlemesi ALIX aracılığıyla nörit büyümesinin desteklenmesine bağlıdır. Bu durum, ALIX'in hem progenitör hücrelerin hayatta kalmasını hem de nörit büyümesini destekleyerek beyin boyutunu düzenlemede kritik olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, ALIX'in beyin gelişiminde kritik bir rol oynayan ve klatrin-bağımsız endositozu düzenleyen bir protein olduğunu ortaya koymuşlardır. Chen vd. (2025), klasik domuz ateşi virüsünün (CSFV) küresel domuz endüstrisinde önemli ekonomik kayıplara yol açtığını, ancak viral tomurcuklanmayı düzenleyen mekanizmaların yeterince aydınlatılmadığını belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışmada, endosomal ayırma kompleksi (ESCRT) ile ilişkili bir protein olan ALIX'in, ESCRT-III ile birlikte CSFV tomurcuklanmasında kritik bir rol oynadığını göstermişlerdir. Genomik dizi analizleri, virüsün E2 proteinindeki YPXnL geç alan motifinin ALIX ile etkileştiğini ortaya koymuşlardır. İmmünopresipitasyon ve delesyon deneyleri ile ALIX'in Bro1 alanı aracılığıyla bu motifle bağlanarak viral partikülleri tanıdığı vurgulanmıştır. Ayrıca immünoelektron ve transmisyon elektron mikroskobu ile, enfeksiyon sırasında ALIX'in COPII vezikülleri, endosomlar ve golgi aygıtı çevresinde biriktiği ve bu birikimin CSFV tomurcuklanmasını kolaylaştırdığı göstermişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, CHMP2B, CHMP4B, CHMP7 ve VPS4A gibi ESCRT-III alt birimlerinin ALIX ile etkileşerek viral tomurcuklanmayı hızlandığını bildirmişlerdir. Özellikle, Kif4A tarafından aktive edilen Rab8'in, ALIX ile etkileşerek ALIX içeren vezikülleri mikrotübüller boyunca sitozole yönlendirdiğini ve bunun da CSFV partiküllerinin salınımına katkıda bulunduğunu ortaya koymuşlardır. Sonuç olarak, Chen ve arkadaşları (2025), ALIX'in E2 proteinini özgül olarak tanıyarak ESCRT-III ve Rab8'in toplanmasını düzenlediğini, golgi'den sitozole doğru veziküler tomurcuklanmayı kolaylaştırdığını ve Kif4A aracılığıyla plazma membranına taşınan virüs yüklü veziküllerin salınımını sağladığını göstermişlerdir. Bu çalışma, CSFV tomurcuklanma sürecinin ilk kapsamlı açıklamasını sunmakta ve yeni antiviral tedavi hedeflerinin geliştirilmesi açısından önemli bir katkı sağlamaktadır.

Li vd. (2025), tris(1,3-dikloro-2-propil) fosfatın (TDCPP) lizozomal membran tamirinde kritik rol oynayan ALG-2/ALIX aracılı ESCRT-III katılımını baskılayarak bu süreci bozduğunu ortaya koymuşlardır.

Araştırmacılar, bu baskılamanın sonucunda hücrel atıkların uzaklaştırılmasında ve membran bütünlüğünün korunmasında aksaklıklar meydana geldiğini ve bunun da nörotoksositeye katkı sağladığını bildirmişlerdir. Böylece, TDCPP'nin nörotoksik etkilerinin yalnızca genel hücrel stres mekanizmalarıyla değil, aynı zamanda spesifik olarak lizozomal membran tamir süreçlerini hedef alarak ortaya çıktığını koymuşlardır. Munshi, vd. (2007). ALIX proteininin 364-716 bölgesi (ALIX 364-716) aşırı ifade edilerek, hem vahşi tip (WT) hem de ALIX bağlanma yeri mutant HIV-1'in salınımı ve Gag işlenmesi üzerindeki etkisi incelenmişlerdir. ALIX 364-716 ifadesi WT HIV-1'in salınımını ve Gag işlenmesini önemli ölçüde engellemiş, ALIX bağlanma yeri mutant virüste bu etkiyi büyük ölçüde azalttığını tespit etmişlerdir. ALIX 364-716 WT virüste morfolojik kusura neden olurken, mutant parçacıklarda kusur gözlenmemiştir. İzotermal titrasyon kalorimetrisi, yüzey plazmon rezonans ve diğer teknikler kullanılarak ALIX 364-716'nın viral geç alanlara bağlanması kantitatif olarak değerlendirilmiş ve mutasyonların bağlanma üzerindeki etkilerini belirlemişlerdir. Sonuç olarak, ALIX 364-716, HIV-1 virüs salınımını ve Gag protein işlenmesini inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır. Pan vd. (2008), ALIX'in (ALG-2 ile etkileşen protein X) endosomal sıralama ve aktin sitoskeleton oluşumunda rol oynayan sitoplazmik bir adaptör protein olduğunu ve fibroblast morfolojisinin korunması için gerekli olduğunu ortaya koymuşlardır. Çalışmalarında, ALIX'in *Entamoeba histolytica* adhesinine dizi benzerliği göstermesi ve salgılandığının gözlemlenmesi nedeniyle, hücre dışı ALIX'in fibroblast morfolojisini etkileyip etkilemediğini araştırmışlardır. Araştırmacılar, salgılanan ALIX'in ölümsüzleştirilmemiş WI38 fibroblastlarının substratına biriktiğini göstermişlerdir. Hücre dışı ALIX'e bağlanan antikolların, WI38 hücrelerinde fibronektin ve vitronektin üzerinde yapışmayı ve yayılmayı geciktirdiği bildirilmiştir. Ayrıca, WI38 hücrelerinde ALIX'in baskılanmasının, hücre yayılmasını ve fibronektin oluşumunu azalttığı ve bu etkinin rekombinant ALIX'in substrata kaplanmasıyla kısmen telafi edildiği vurgulanmıştır. Ölümsüzleştirilmiş NIH/3T3 fibroblastlarının substrat üzerine daha az ALIX biriktirdiği ve alfa5beta1-integrin fonksiyonlarında kusurlar sergilediği belirtilmiştir. Bununla birlikte, NIH/3T3 hücreleri için substrata kaplanan rekombinant ALIX'in, alfa5beta1-integrin aracılı hücre adezyonlarını ve fibronektin matris oluşumunu desteklediği ve bu etkinin ALIX'in 605-709 aminoasit bölgesine bağlı olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, Pan ve arkadaşları (2008), ALIX'in yalnızca hücre içi- değil, hücre dışı bir alt popülasyonunun da bulunduğunu ve bu hücre dışı ALIX'in integrin aracılı hücre adezyonlarını ve fibronektin matris oluşumunu düzenlediğini açıkça koymuşlardır.

Laporte vd. (2022), sinaptik vezikül geri kazanımında klatrin-bağımsız bir yol olan aktiviteye bağlı bulk endositozun (ADBE) düzenlenmesinde ALIX'in kritik rol oynadığını göstermişlerdir. Araştırmalarında, ALIX'in nöronlarda eksprese edildiğini ve epileptik nöbetler sırasında sinapslarda yoğunlaştığını ortaya koymuşlardır. Kültürlenmiş nöronlarla yaptıkları deneylerde, ALIX'in yüksek frekanslı stimülasyon koşullarında presinapslara rekrite olduğunu ve burada endofilin-A ile etkileşerek ADBE'nin gerçekleşmesi için gerekli olduğunu göstermişlerdir. Bu sürecin, kalsiyum bağlayıcı protein ALG-2 ile etkileşime bağlı olduğu da belirtilmiştir. Nitekim, ALIX knockout (ko) nöronlarda bu etkileşimin bozulması sonucunda ADBE'nin gerçekleşmediği ortaya koymuşlardır. Bunun yanı sıra, ALIX eksik hippocampuslarda presinaptik bölmelelerde ince yapısal kusurlar bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu morfolojik değişikliklerin, elektrofizyolojik analizlerde saptanan sinaptik aktivite ve plastisite bozukluklarıyla uyumlu olduğu vurgulanmışlardır. Ayrıca, ön beyinde ALIX eksikliği bulunan farelerin, kainat ile indüklenen status epileptikus sırasında daha az nöbet geçirdiği ve epileptiform aktivitenin daha sınırlı yayıldığı belirtilmiştir. Sonuç olarak, araştırmacılar ALIX yokluğunda ADBE'nin bozulmasının, fizyolojik veya patolojik tekrarlayan stimülasyonlar sırasında sinaptik geri kazanımın yetersiz kalmasına ve sinaptik plastisitenin olumsuz etkilenmesine yol açtığını göstermişlerdir. Bu bulgular, ALIX'in nöronal klatrin-bağımsız endositozda vazgeçilmez bir düzenleyici olduğunu açıkça ortaya koymuşlardır.

5. SONUÇ

Literatür taramaları ve güncel veriler, ALIX'in hücre içi süreçlerde kritik bir düzenleyici olarak işlev gördüğünü ortaya koymaktadır. ALIX, Bro1, V ve prolin açısından zengin C-terminal domainleri sayesinde hem endozomal ve ekzosomal trafiği hem de apoptozu düzenleyebilmektedir. Özellikle ALIX'in ALG-2 ile etkileşimi, kalsiyum bağımlı mekanizmalar aracılığıyla hem kaspaz bağımlı hem de bağımsız apoptoz yollarını kontrol ederek hücre kaderinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. ALIX'in ESCRT kompleksleriyle uyumlu çalışması, MVB oluşumu, membran şekillenmesi ve kargo proteinlerin doğru yönlendirilmesi açısından hayati öneme sahiptir. Bu süreçler, özellikle tümör hücrelerinde PD-L1 ve EGFR gibi kritik proteinlerin taşınması ve ekzosomal salınımını etkileyerek hem hücre içi proliferasyonu hem de bağışıklık tepkilerini şekillendirmektedir. ALIX, hücrel homeostazın sürdürülmesi, programlanmış hücre ölümü mekanizmalarının düzenlenmesi ve endolizozomal trafik ile hücre kaderi sinyalleri arasındaki koordinasyonun sağlanmasında merkezi bir rol üstlenmektedir. Bu çok yönlü fonksiyonu, ALIX'i nörodejeneratif hastalıklar, viral enfeksiyonlar ve kanser gibi durumlar için potansiyel bir biyobelirteç ve terapötik hedef olarak öne

çıkarmaktadır. Sonuç olarak bu çalışma, ALIX'in moleküler düzeydeki işlevlerini ayrıntılı biçimde ortaya koyarak, hem temel hücre biyolojisi hem de hastalık modelleri için kritik bir kaynak sunmaktadır. ALIX'in kargo protein taşınmasındaki ve hücresel adaptif yanıtlarındaki rolünün açıklanması, olası terapötik müdahaleler ve biyobelirteç geliştirme stratejileri için doğrudan kanıt sağlamaktadır. Böylece ALIX'in düzenleyici mekanizmalarının anlaşılması, kanser, nörodejeneratif bozukluklar ve viral enfeksiyonlarda hücresel süreçleri hedefleyen yeni yaklaşımların geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

- Banuelos, C., García-Rivera, G., Lopez-Reyes, I., Mendoza, L., González-Robles, A., Herranz, S., Vincent, O., Orozco, E. (2012). EhADH112 Is a Bro1 Domain-Containing Protein Involved in the *Entamoeba histolytica* Multivesicular Bodies Pathway, *BioMed Research International*, 2012(1), 657942.
- Boysen, J.H, Mitchell, A.P. (2006). Control of Bro1-Domain Protein Rim20 Localization by External pH, ESCRT Machinery, and the *Saccharomyces cerevisiae* Rim101 Pathway, *Molecular Biology of the Cell*. 17(3), 1344-1353.
- Chatellard-Causse, C., Blot, B., Cristina, N., Torch, S., Missotten, M., Sadoul, R. (2002). ALIX (ALG-2-interacting protein X), a protein involved in apoptosis, binds to endophilins and induces cytoplasmic vacuolization. *Journal of Biological Chemistry*, 277(32), 29108-29115.
- Chen, J., Yang, H., Wan, M., Cheng, Y., Bai, J., Li, Y., Chen, J., Zhao, B., Gao, F., & Zhou, B. (2025). Classical swine fever virus recruits ALIX and ESCRT-III to facilitate viral budding. *mBio*, 16(4), e02618-24.
- Fisher, R.D., Chung, H.Y., Zhai, Q., Robinson, H., Sundquist, W.I., Hill, C.P. (2007). Structural and Biochemical Studies of ALIX/AIP1 and Its Role in Retrovirus Budding, *Cell*, 128(5), 841-852.
- Hurley, J.H. (2015). ESCRT s are everywhere. *The EMBO Journal*, 34(19), 2398-2407.
- Kansakar, U., Wang, W., Markovic, V., Sossey-Alaoui, K. (2021). Erratum for: Phosphorylation of the Proline-Rich Domain of WAVE3 Drives Its Oncogenic Activity in Breast Cancer, *Scientific reports*, 11(1), 3868-3882.
- Kim, J., Sitaraman, S., Hierro, A., Beach, B.M., Odorizzi, G., Hurley, J.H. (2005). Structural Basis for Endosomal Targeting by the Bro1 Domain, *Developmental Cell*, 8(6), 937-947.
- Kimura, Y., Tanigawa, M., Kawawaki, J., Takagi, K., Mizushima, T., Maeda, T., Tanaka, K. (2015). Conserved Mode of Interaction between Yeast Bro1 Family V Domains and YP (X) n L Motif-Containing Target Proteins, *Eukaryotic Cell*, 14(10), 976-982.
- Laporte, M.H., Chatellard, C., Vauchez, V., Hemming, F.J., Deloulme, J.C., Vossier, F., Blot, B., Fraboulet, S., Sadoul, R. (2017). ALIX is required during development for normal growth of the mouse brain. *Scientific Reports*, 7(1), 44767.
- Laporte, M.H., Chi, K. I., Caudal, L.C., Zhao, N., Schwarz, Y., Rolland, M., Martinez-Hernandez, J., Martineau, M., Chatellard, C., Denarier, E., Mercier, V., Lemaître, F., Blot, B., Moutaux, E., Cazorla, M., Perrais, D., Lanté, F., Bruns, D., Fraboulet, S., Hemming, F. J., Kirchhoff, F., Sadoul, R. (2022). ALIX is required for activity-dependent bulk endocytosis at brain synapses. *PLoS Biology*, 20(6), e3001659.
- Larios, J., Mercier, V., Roux, A., Gruenberg, J. (2020). ALIX- and ESCRT-III-dependent sorting of tetraspanins to exosomes. *Journal of Cell Biology*,

219(3), e201904113.

- Lee, S., Joshi, A., Nagashima, K., Freed, E.O., Hurley, J.H. (2007). Structural basis for viral late-domain binding to ALIX, *Nature Structural and Molecular Biology*, 14(3), 194-199.
- Li, T., Zhang, Y., Ding, X., Liu, L., Ma, R., Qin, W., Yan, C., Wang, C., Zhang, J., Keerman, M., & Niu, Q. (2025). TDCPP disrupts ALG-2/ALIX-mediated ESCRT-III recruitment: Implications for lysosomal membrane repair and neurotoxicity. *Environmental Pollution*, 379, 126535.
- Mahul-Mellier, A.L., Hemming, F.J., Blot, B., Fraboulet, S., Sadoul, R. (2006). ALIX, making a link between apoptosis-linked gene-2, the endosomal sorting complexes required for transport, and neuronal death *in vivo*. *Journal of Neuroscience*, 26(2), 542–549.
- Mehdi, S.M.M., Szczesniak, M.W., Ludwików, A. (2023). The Brol-Like Domain-Containing Protein, AtBrol, Modulates Growth and Abiotic Stress Responses in Arabidopsis, *Frontiers in Plant Science*, 14, 1157435.
- Monypenny, J., Milewicz, H., Flores-Borja, F., Weitsman, G., Cheung, A., Chowdhury, R., Burgoyne, T., Arulappu, A., Lawler, K., Barber, P. R., Vicencio, J. M., Keppler, M., Wulaningsih, W., Davidson, S. M., Fraternali, F., Woodman, N., Turmaine, M., Gillett, C., Franz, D., Quezada, S. A., Futter, C. E., Von Kriegsheim, A., Kolch, W., Vojnovic, B., Carlton, J. G., and Ng, T. (2018). ALIX regulates tumor-mediated immunosuppression by controlling EGFR activity and PD-L1 presentation. *Cell Reports*, 24(3), 630–641.
- Munshi, U.M., Kim, J., Nagashima, K., Hurley, J.H., Freed, E. O. (2007). An ALIX fragment potently inhibits HIV-1 budding: characterization of binding to retroviral YPX_L late domains. *Journal of Biological Chemistry*, 282(6), 3847-3855.
- Nikko, E., Marini, A.M., André, B. (2003). Permease Recycling and Ubiquitination Status Reveal a Particular Role for Brol in the Multivesicular Body Pathway, *Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 50732-50743.
- Odorizzi, G. (2006). The Multiple Personalities of ALIX, *Journal of Cell Science*, 119(15), 3025-3032.
- Pan, S., Wang, R., Zhou, X., Corvera, J., Kloc, M., Sifers, R., Gallick, G. E., Lin, S.-H., & Kuang, J. (2008). Extracellular Alix regulates integrin-mediated cell adhesions and extracellular matrix assembly. *The EMBO Journal*, 27(15), 2077-2090.
- Pashkova, N., Yu, L., Schnicker, N.J., Tseng, C.C., Gakhar, L., Katzmann, D.J., Piper, R.C. (2021). Interactions of Ubiquitin and CHMP5 with the V Domain of HD-PTP Reveals Role for Regulation of Vps4 ATPase, *Molecular Biology of the Cell*, 32(22), ar42 (1-16).
- Pires, R., Hartlieb, B., Signor, L., Schoehn, G., Lata, S., Roessle, M., Moriscot, C., Popov, S., Hinz, A., Jamin, M., Boyer, V., Sadoul, R., Forest, E., Svergun, D.I., Göttinger, H.G. Weissenhorn, W. (2009). A Crescent-Shaped ALIX Dimer Targets ESCRT-III CHMP4 Filaments, *Structure*, 17(6), 843-856.
- Popov, S., Popova, E., Inoue, M., Göttinger, H.G. (2009). Divergent Brol

Domains Share the Capacity to Bind Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid and to Enhance Virus-Like Particle Production, *Journal of Virology*, 83(14), 7185-7193.

- Qiu, X., Campos, Y., van de Vlekkert, D., Gomero, E., Tanwar, A. C., Kalathur, R., Weesner, J. A., Bongiovanni, A., Demmers, J., d'Azzo, A. (2022). Distinct Functions of Dimeric and Monomeric Scaffold Protein ALIX in Regulating F-Actin Assembly and Loading of Exosomal Cargo, *Journal of Biological Chemistry*, 298(10), 102425-102439.
- Rayala, S., Francis, V.G., Sivagnanam, U., Gummadi, S.N. (2014). N-Terminal Proline-Rich Domain Is Required for Scrambling Activity of Human Phospholipid Scramblases, *The Journal of Biological Chemistry*, 289(19), 13206-13218.
- Sadoul, R. (2006). Do ALIX and ALG-2 really control endosomes for better or for worse?. *Biology of the Cell*, 98(1), 69-77.
- Sun, S., Zhou, X., Corvera, J., Gallick, G. E., Lin, S. H., Kuang, J. (2015). ALG-2 activates the MVB sorting function of ALIX through relieving its intramolecular interaction. *Cell Discovery*, 1, 15018-15037.
- Sun, S., Zhou, X., Zhang, W., Gallick, G.E., Kuang, J. (2015). Unravelling the Pivotal Role of ALIX in MVB Sorting and Silencing of the Activated EGFR, *Biochemical Journal*, 466(3), 475-487.
- Sun, Y., Hua, J., Chen, G., Li, J., Yang, J., Gao, H. (2021). ALIX: a candidate serum biomarker of alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13, 669612.
- Usami, Y., Popov, S., Göttlinger, H.G. (2007). Potent Rescue of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Late Domain Mutants by ALIX/AIP1 Depends on Its CHMP4 Binding Site, *Journal of Virology*, 81(12), 6614-6622.
- Valcz, Gábor, Galamb, Orsolya, Krenács, Tibor, Spisák, Sándor, Kalmár, Alexandra, Patai, Árpád V., Wichmann, Barna, Dede, Kristóf, Tulassay, Zsolt, Molnár, Béla. (2016). Exosomes in colorectal carcinoma formation: ALIX under the magnifying glass. *Modern Pathology*, 29(8), 928-938.
- Yang, Jie, Zhang, Yixuan, Gao, Xin, Yuan, Yue, Zhao, Jing, Zhou, Siqi, Wang, Hui, Wang, Lei, Xu, Guifang, Li, Xihan, Wang, Pin, Zou, Xiaoping, Zhu, Dongming, Lv, Ying, Zhang, Shu. (2021). Plasma-derived exosomal ALIX as a novel biomarker for diagnosis and classification of pancreatic cancer. *Frontiers in Oncology*, 11, 628346.
- Yang, Y., Wang, M., Zhang, Y.Y., Zhao, S.Z., Gu, S. (2022). The endosomal sorting complex required for transport repairs the membrane to delay cell death. *Frontiers in Oncology*, 12, 1007446.
- Yu, C., Nelson, S.L., Meisl, G., Ghirlando, R., Deshmukh, L. (2023). Phase Separation and Fibrillization of Human Annexin A7 Are Mediated by Its Proline-Rich Domain, *Biochemistry*, 62(21), 3036-3040.
- Zhai, Q., Landesman, M.B., Robinson, H., Sundquist, W.I., Hill, C.P. (2011). Structure of the Brol Domain Protein BROX and Functional Analyses of the ALIX Brol Domain in HIV-1 Budding, *PLoS One*, 6(12), e27466.

Bölüm 2

YENİ TERMOZİMLERİN KEŞFİNDE METAGENOMİK YAKLAŞIMLARIN KULLANILMASI

Behiye TAŞER¹

¹ Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Ağrı, Türkiye ORCID:0000-0002-7936-432X, btaser@agri.edu.tr

1. GİRİŞ

Birçok mikroorganizma metabolit üretimi yoluyla endüstriyel teknolojinin gelişmesine fayda sağlamaktadır (Jansson ve Hofmockel, 2018). Enzimler, endüstriyel süreçlerde oldukça fazla kullanılan mikrobiyal metabolitlerdir. Biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran biyolojik katalizörler olan enzimler; deterjan, kağıt, tekstil gibi birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır (Robinson, 2015). Mikroorganizmalar Dünya üzerindeki tüm ekosisteme hakim canlılardır. Karasal ve okyanusal biyokütle; bakteri, mantar, arke ve protistleri içeren mikrobiyal toplulukları içermektedir. Dünya genelindeki bu mikrobiyal çeşitliliğin sadece %1'i laboratuvarla kültürlenebilirken kültürü yapılamayan diğer yüzde ise sonsuz bir inovasyon kaynağı olarak görülmektedir (Alves ve ark., 2018; Ghosh ve ark., 2019).

Jeotermal alanlar, hidrotermal bacalar gibi yüksek sıcaklıkta yaşamaya adapte olmuş mikroorganizmaların protein kararlılığı, enzim kinetiği gibi fizyolojik özellikleri ideal seviyelere ulaşmıştır. Bu habitatlarda kültüre dayalı yöntemlerle izole edilemeyen mikrobiyal kaynaklar yeni termozimlerin keşfi için umut vaat etmektedir (Shu ve Huang, 2022; Dal Bello ve Abreu, 2024). Kültüre dayalı yöntemlerin dezavantajı son yıllarda metagenomik yaklaşımlarla giderilmiştir. Metagenomik çalışmalar, DNA'nın laboratuvarla kültürlenme süreci olmadan direkt çevresel kaynaktan izole edilmesiyle gerçekleştirilir. Giderek artan sayıda gerçekleştirilen metagenomik çalışmalar sayesinde jeotermal kaynaklar, hipersalin ortamlar gibi ekstrem habitatlardaki bakteriyel çeşitlilik aydınlatılmaktadır (Prayogo ve ark., 2020). Tanımlanan yeni mikrobiyal toplulukların, doğadaki enzimler hakkında yeni keşifleri ortaya çıkarması beklenmektedir. DNA izolasyonu ile başlayan deneysel adımlar, metagenomik kütüphane ve biyoinformatik analizi ile sonlanır ve taranan gen dizileri ile yeni enzimlerin ya da biyoteknoloji için değerli olabilecek genlerin keşfi ortaya çıkartılır (Prayogo ve ark., 2020).

2. TERMAL ORTAMLARIN MİKROBİYOLOJİK ÖNEMİ

Sıcak su kaynakları, hidrotermal bacalar, buzullar, hipersalin habitatlar gibi ekstrem ortamlar dünya geneline yayılmıştır (Rothschild ve Mancinelli, 2001; Schmid ve ark., 2020). Fizikokimyasal koşullar açısından zorlu olan bu habitatlar yaşamın her üç domainine ait çeşitli mikroorganizmalar için ekolojik nişler sağlamaktadır. Çevresel streslere karşı hayatta kalabilmek için farklı adaptasyonlara sahip olacak şekilde evrimleşen bu organizmalar, yaşamın fiziksel ve jeokimyasal sınırlarını belirlemenin yanı sıra jeokimyasal ve biyolojik süreçler arasındaki sıkı bağlantı nedeniyle de mikrobiyal ekoloji, evrim ve çevresel adaptasyon çalışmaları

için ilgi odağı olmuşlardır (Denef ve ark., 2010; Inskeep ve ark., 2013; Oren, 2015).

Dünya'da çok çeşitli jeotermal kaynaklar bulunmaktadır. Örneğin, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Yellowstone Milli Parkı'nda, 40-92°C sıcaklık aralığına sahip 14.000'den fazla jeotermal yapı bulunmaktadır (Inskeep ve ark., 2013). Coğrafi olarak dünyanın en önemli jeotermal kaynakları üzerinde yer alan ve 40°C'den fazla sıcaklığa sahip 133 termal su kaynağı bulunduran Türkiye ise dünyanın en zengin sıcak su kaynaklarına sahip ülkelerden biridir (Akkaya ve Kivanc, 2009; Baltacı ve ark., 2017). Bu ortamlarda yaşayan mikroorganizmalar üzerine yapılan çalışmalar, ekstrem ortamların mikrobiyolojisine öncülük etmekte ve termofilinin tarihsel keşfine ışık tutmaktadır (Brock, 1967).

Sıcaklık, mikrobiyal gelişimi önemli ölçüde etkileyen fiziksel parametrelerden biridir ve bu nedenle her mikroorganizma hayatta kalabilmek için farklı sıcaklık aralıklarını tercih eder. Bu sıcaklık aralıklarına göre mikroorganizmalar psikrofilik, mezofilik ve termofilik ve şeklinde sınıflandırılmışlardır (Kristjonsson ve Stetter, 1991). Termofilik mikroorganizmalar ise kendi içerisinde; 45°C'de hayatta kalabilen ılımlı termofilikler, 70-80°C'de hayatta kalabilen ekstrem termofilikler ve 80°C'de optimum gelişim gösterebilen hipertermofilikler şeklinde üçe ayrılmaktadır. (Charlier ve Droogmans, 2005; Sar ve ark., 2013). Jeotermal alanlar, termofilik organizmaların temel yaşam alanlarını oluşturmaktadır (Mohammad ve ark., 2017). Termal habitatlarda yapılan çalışmalara göre bakterilerin büyük bir kısmının ılımlı sıcaklıklarda (50-70°C), Arkelerin ise yüksek sıcaklıklarda (75-95°C) canlılıklarını devam ettirdiğini görülmektedir (Li ve ark., 2015).

Termal kaynaklarda sıcaklık yükseldikçe ekosistemindeki mikrobiyal çeşitlilik genellikle düşmektedir. Yüksek sıcaklığın baskın olduğu jeotermal ekosistemlerde *Aquificae*, *Thermotogae*, *Firmicutes* gibi bakteri filumları; *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota* ve *Thaumarchaeota* gibi arkeal gruplar önemli rol oynamaktadır (Hedlund ve ark., 2015; Jiang ve ark., 2010). Bu habitatlarda yaşayan organizmalar; yüksek sıcaklık, yüksek tuzluluk, asidik ve alkali pH değerleri ve radyasyon gibi ekstrem şartlara karşı adaptasyon geliştirmişlerdir (Mirete ve ark., 2016). Yapılan araştırmalar, termofiliklerin ekstrem ortamlarda hayatta kalabilmek için evrimleştiğini ve bu evrimsel mekanizmalar neticesinde özellikle protein yapılarını ve enzim aktivitelerini optimize etmek üzerine olduğunu ortaya koymuştur. Bu canlılarda görülen yapısal adaptasyonların temelini, diğer organizmalarda bulunmayan belli özelliklere sahip farklı makromoleküller oluşturmaktadır ve bu moleküller endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalar için değerli biyomolekül kaynaklarıdır (Şekil. 1) (Arbab

ve ark., 2022).



Şekil 1. Termofilik mikroorganizmaların keşfi ve uygulamaları (Gallo ve ark., 2024)

Zar lipidlerinin kararlılığı, termofiliklerin yüksek sıcaklıkta yaşamını sürdürebilmesini sağlamaktadır (Koga, 2012). Mezofilik organizmalara kıyasla termofillerin hücre zarları doymuş yağ asidi açısından daha zengindir. Yağ asidi, hücre için hidrofobik ortam oluşturarak yüksek sıcaklıklarda daha sert zar yapısı ile hücrenin canlılığını korumasını sağlar (Herbert ve Sharp, 1992). Daha yüksek sıcaklıklarda yaşayan hipertermofiliklerin büyük bir yüzdesini arkeler oluşturmaktadır ve bu organizmaların hücre zarı bakterilerden farklı olarak eterle bağlı lipidler bulunmaktadır. Hücre zarındaki bu özel oluşum arke zarlarının çok daha yüksek ısıya karşı dayanıklı olmasını sağlamaktadır (De Rosa ve ark., 1994).

Ayrıca, bu organizmaların “şaperon” adı verilen özelleşmiş proteinleri sayesinde denatüre olmuş proteinlerin doğru konformasyonda tekrar katlanması sağlanarak işlevsel hale getirilir (Everly ve Alberto, 2000). DNA açısından termofillerin kazandığı adaptasyonlardan biri de DNA’larında pozitif süper sarmal oluşturan ters DNA giraz’a sahip olmalarıdır (Lopez,

1999). Bu enzim sayesinde termofilik DNA'larının erime sıcaklığı yükseltilerek organizmanın yüksek sıcaklıkta canlılığına devam edebilmesi sağlanır (Kumar ve Nussinov, 2001). Ayrıca, termofilik bakterilerin ribozom RNA (rRNA) ve taşıyıcı RNA (tRNA) molekülleri mezofilik bakteriler ile kıyaslandığında yüksek G+C içeriğine sahip olduğu görülmüştür. GC baz çifti arasında bulunan üçlü hidrojen bağları sayesinde çift sarmallı bölgede artan G+C içeriği RNA'ların termostabilitesini artırmaktadır (Mehta ve ark., 2016; Paz ve ark., 2004). Termal ortamlarda hayatta kalan mikroorganizmaların geçirdiği en önemli adaptasyonlar zorlu şartlar altında katalitik olarak aktif kalabilen enzimatik aktiviteleridir. Termofiliklerin en büyük avantajlarından biri birçok endüstriyel alanda kullanım için uygun ve sıcaklığa dayanıklı bol miktarda enzim barındırmalarıdır (Saxena ve ark., 2015; Mirete ve ark., 2016). Dirençli enzimler barındıran termofiliklerin enzimleri mezofilik konakçılara transforme edilerek kısa sürede ve fazla miktarda katalitik etkinliği yüksek enzimler üretilmektedir (Zeldes ve ark., 2015).

3. TERMOZİMLER

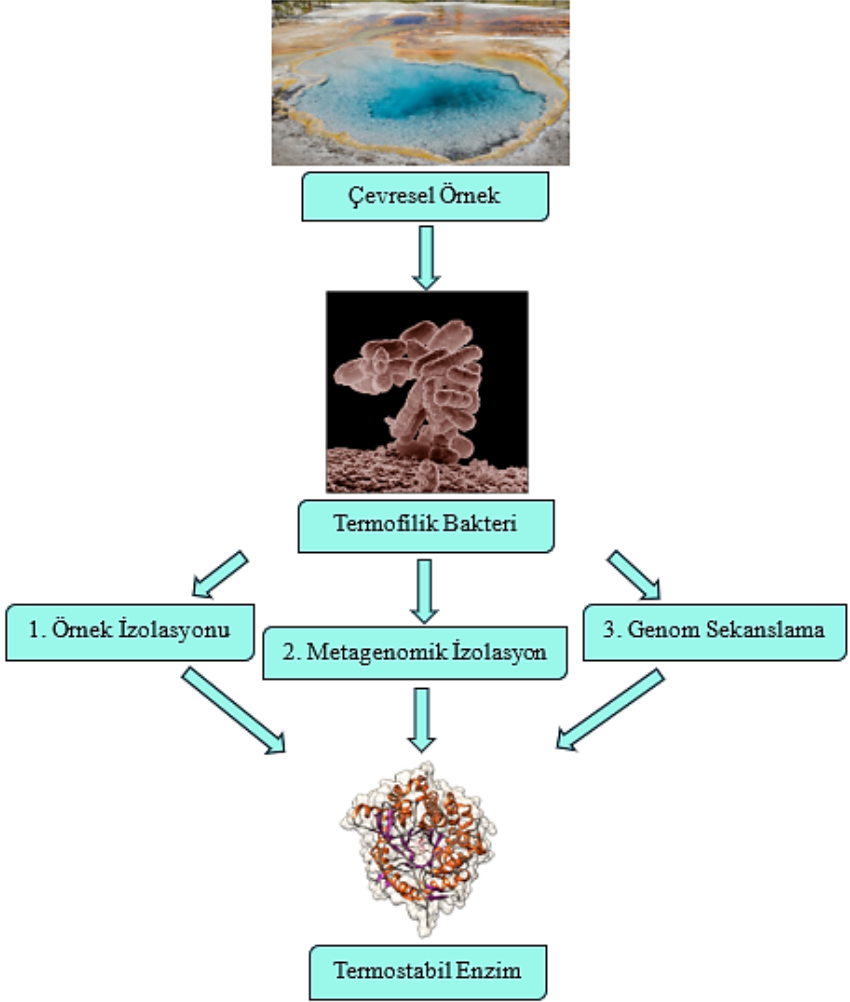
Enzimler substrat spesifikliği ve yüksek katalitik aktivite özelliklerine sahip biyokatalizörlerdir. Reaksiyon özgüllükleri sonucu daha az yan ürün oluşturmaları, kullanımlarının çevre dostu olması ve ürünlerinden daha kolay ayrılmaları gibi nedenlerden dolayı enzimler endüstriyel alanda aranan moleküllerdir (Kumar ve ark., 2019). Ortam fizyolojisinin enzim aktivitelerini etkilemesi ve sert fiziksel parametreler altında çalışan endüstriyel prosesler sırasında inaktive olmaları nedeniyle enzimlerin kullanımları sınırlanmaktadır. Bu sınırlamaların üstesinden gelebilmek için zorlu çalışma şartlarına dayanabilen enzimlerin arayışı içerisine girilmiştir. Özellikle yüksek sıcaklık gerektiren prosesler için ekstrem sıcaklık şartlarında gelişebilen mikroorganizmalardan enzimler izole edilmiş ve yüksek sıcaklıkta aktivitesini büyük oranda koruyabilen enzimler keşfedilmiştir (Gomes ve Steiner, 2004; Kumar ve ark., 2019).

Termofilik ve hipertermofilik organizmalardan elde edilen termozimler, 60-125°C'de aktivitesini koruyabilen ve yüksek sıcaklıklarda geri dönüşümsüz inaktivasyona dayanıklı enzimlerdir (Grogan, 1991). Termotabil enzimler, izole edildikleri termofilik mikroorganizmaların gelişim gösterdiği optimum sıcaklık değerlerinden bile daha yüksek sıcaklıklarda aktivitelerini koruyabilmektedir (Saboto ve ark., 1999). Bu enzimler mezofilik proteinlere kıyasla denatüranlara ve yüksek substrat konsantrasyonlarına karşı dayanıklılık ve ısıl işlem prosesleri ile dekontaminasyona uygunluk gibi çeşitli avantajlar sayesinde biyoteknolojik uygulamalar için daha fazla önemli hale gelmişlerdir (Grogan, 1991). Termozimlerin sahip olduğu kararlılığın anlaşılması için dizi hizalama, kristal yapı kar-

şılaştırmaları ve aminoasit içeriği analizi gibi farklı yönlerden araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre bu termozimler, mezofilik ve psikrofilik enzim homologları ile karşılaştırıldıklarında benzer yapılara sahip oldukları görülmüştür.

Termozimler sadece sıcaklık şartlarına değil aynı zamanda yüksek basınç, düşük pH ve yüksek tuz konsantrasyonu gibi zorlu koşullarda da aktivite ve stabilitesini koruyabilmektedir (Atomi, 2005). Bazıları organik çözücülere, deterjanlara ve denatüre edici ajanlara karşı da dirençlidir (Fan ve ark., 2011). Termofilik proteinlerin üç boyutlu yapılarındaki merkezi konumda Glutamat, Arjinin ve Lizin aminoasitlerinin miktarı fazladır ve bu nedenle termofilik mikroorganizmaların proteinleri ısıya karşı direnç göstermektedir (Aro ve ark., 2001; Egorova ve Antranikian, 2005). Termozimler; deterjan, kağıt, biyoyakıt, gıda gibi endüstriyel proseslerde ve Taq polimeraz enziminde olduğu gibi genetik ve protein mühendisliği çalışmalarını kapsayan biyoteknoloji alanında fazlaca kullanılmaktadır (DeCastro ve ark., 2016).

Son yıllarda, termostabil enzimlerin elde edilmesinde farklı stratejiler kullanılmıştır (Şekil 2). En fazla kullanılan strateji, termal ortamlarda hipertermofilik ve termofilik mikroorganizmaların taranması, laboratuvar kültürlerinin yapılarak enzimin üretilmesi ve saflaştırılmasıdır. Ancak bu yöntemler oldukça zahmetli ve karmaşık prosesler içermektedir, ayrıca enzim aktivitesi de nispeten düşüktür (Liu ve ark., 2019; Wu ve ark., 2021). Bazı termostabil enzimler hala termofilik mikroorganizmalardan izole edilerek geri kazanılsa bile metagenomik yaklaşımlar, yeni termozimlerin keşfinde önemli bir teknoloji haline gelerek endüstri, biyoteknoloji ve ilaç sanayi için umut vaat eden yeni mikrobiyal kaynakların keşfine ışık tutmaktadır (Shi ve ark., 2013; Fuciños ve ark., 2014). Yeni termozimlerin keşfi için metagenomik taramanın iki farklı stratejik yaklaşımı mevcuttur. Bunlardan ilki dizi tabanlı yaklaşım, diğeri ise fonksiyon tabanlı yaklaşımdır. Dizi tabanlı yaklaşım, tüm metagenomun dizi analizi yapılarak ya da metagenom içerisinde yer alan spesifik bir bölgenin önceden bilinen dizi bilgisi kullanılarak çoğaltılıp analiz edilmesi prensibine dayanır. Fonksiyon tabanlı yaklaşım ise genom kütüphanelerine benzer şekilde metagenom kütüphaneleri oluşturularak hedef fenotip açısından taranması prensibine dayanır (DeCastro ve ark., 2016).



Şekil 2. Termofilik mikroorganizmaların termal ortamlardan izole edilmesiyle termostabil enzimleri elde etmek için kullanılan yöntemlerin iş akış şeması

4. METAGENOMİK YAKLAŞIMLARIN TANIMI, GELİŞİMİ VE UYGULAMA TEKNİKLERİ

İlk kez, 1998 yılında Handelsman ve ark. (1998) tarafından, çevresel örneklerden doğrudan genetik materyalin elde edilerek incelenmesi olarak tanımlanan “metagenomik” kavramı, dizilenen nükleotit aracılığıyla çevresel örneklerin mikrobiyal çeşitliliğini ortaya koymaktadır. İlk metagenomik çalışma Sanger teknolojisi ile başlamış ardından 1991’de Schmidt ve ark. (1991) tarafından deniz planktonlarından izole edilen DNA ile ilk metagenomik kütüphane oluşturulmuştur. Birkaç yıl sonra Healy ve ark. (1995) tarafından selülaz kodlayan genlerin taranması için kütüphane oluşturmuştur. 2000 yılında ise Rondon ve ark. (2000) tarafından topraktan izole edilen DNA aracılığıyla Bakteri Yapay Kromozomları oluşturulmuş ve “metagenomik kütüphane” kavramı öne sürülmüştür. Giderek artan çalışmalar sonucu metagenomik yaklaşımların genetik bilgilere ulaşmada en uygun yol olduğu ortaya koyulmuştur.

Mikroorganizmaların geleneksel kültüre dayalı yöntemler ile incelenmesi ve taranması sonucu mikrobiyal çeşitliliğin %99’luk kısmı gözden kaçmaktadır. Mikroorganizmalara ait DNA’nın doğrudan doğal ortamından izole edilmesi ve taranması kültürden bağımsız bir şekilde metagenomik yaklaşımlar ile gerçekleştirilmektedir (Handelsman ve ark., 1998). Metagenomik analizler, mikroorganizmadan direkt DNA izolasyonu ve tür tayininin yapılması (Hardwick ve ark., 2018; Koutsoumanis 2019; Gökem ve ark., 2021), genetik çeşitliliğin ve popülasyon yapısının ortaya koyulması ve bu canlıların ekolojik rollerinin anlaşılmasını sağlamak ve böylece mikrobiyal popülasyonların aydınlatılamayan %99’luk kısmına ışık tutulmaktadır (Handelsman ve ark., 1998; Carola ve Rolf 2011). Metagenomik, özellikle topraktaki mikrobiyal çeşitliliğin incelenmesinde oldukça işlevsel bir yöntemdir. Bir gram topraktaki mikrobiyal çeşitliliğin bu zamana kadar kültüre dayalı yöntemle ortaya koyulan mikroorganizma çeşitliliğinden çok daha fazla olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, mikrobiyal yükün fazlaca olduğu toprak örneklerinin metagenomik stratejilerle taranmasıyla çeşitliliğin ortaya koyulması, bu çeşitliliğin ekolojiye katkısı ve çevresel faktörlerdeki değişikliklerin organizma çeşitliliğini nasıl etkilediği incelenilmektedir (Thomas ve ark., 2012).

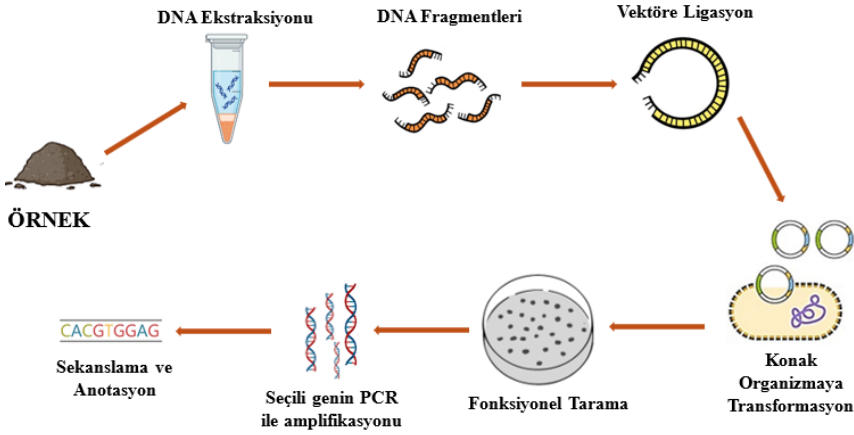
Uzun yıllar boyunca mikroorganizmalar endüstriyel uygulamalar için gerekli olan çok sayıda biyomolekülün birincil üreticileri olarak kullanılmıştır. Yeni nesil dizileme yöntemlerinin ortaya çıkışıyla mikrobiyal analizler üzerine yapılan çalışmaların sayısı ivme kazanmıştır ve metagenomik çalışmalar mikrobiyal tanımlamada devrim yaratmıştır. Günümüzde metagenomik araştırmalar, deniz habitatları, kaplıcalar, asit ma-

denleri, atık su arıtma tesisleri, insan ve hayvan bağırsakları gibi çeşitli çevresel alanları kapsamaktadır (De Bruijn, 2011).

Metagenomik yaklaşımlar iki farklı yönden ele alınmaktadır. Bunlar; fonksiyon bazlı ve dizi bazlı yaklaşımlar şeklinde ayrılmaktadır. Fonksiyonel metagenomik olarak da adlandırılan fonksiyon temelli yaklaşım genellikle tarama yoluyla tespit edilebilen ve belli bir aktivite gösterebilen proteinleri bulmayı hedeflemektedir. Dizi temelli yaklaşımda ise metagenom içerisinde bulunan dizilerin tanımlanması ve bu dizilerin biyoinformatik araçlar ile yorumlanmasını hedeflemektedir (DeCastro ve ark., 2016).

4.1. Fonksiyon bazlı Metagenomik Yaklaşım

Fonksiyona dayalı metagenomik, hedef bölgede bulunan mikrobiyal topluluğun gen ve gen ürünlerinin aktivitelerine bağlı olarak genetik potansiyellerini ve fonksiyonel yeteneklerini incelemek için kullanılan yaklaşımdır (Rondon ve ark., 2000). Bu stratejiye göre öncelikle mikrobiyal topluluğu barındıran çevresel örnekten DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilir. Enzim aracılığıyla küçük fragmentlere ayrılan DNA plazmid gibi küçük vektörlerle, kozmidler ya da bakteri yapay kromozomu gibi büyük vektörlerle birleştirilir. Plazmid vektörlere DNA parçası entegre etmek diğer vektörlere göre daha kolaydır, ancak daha küçük DNA fragmentleri entegre edilebildiği için çok sayıda klon kütüphanesinin oluşmasına neden olacağından tarama sürecini uzatmaktadır. Yüksek kapasiteli vektörlerin kullanılması ise DNA üzerindeki gen ve operonların eksiksiz bir şekilde klonlanma olasılığını artırır (Tütüncü ve ark., 2017). Uygun vektöre aktarılan Metagenomik DNA, transformasyon yolu ile bakteri veya maya gibi uygun konak organizmaya klonlanır. Klonlanan DNA fragmentleri konak organizmada ifade edilir ve böylece metagenomik DNA'daki genlerin aktivitelerine bağlı olarak fonksiyon taraması yapılır (Şekil 3). Fonksiyonel tarama işlemi; proteaz, amilaz, selüloz gibi belli enzimatik aktiviteleri, antibiyotik direnç genleri ya da araştırılmak istenen işlevsel özellikleri tespit etmek için tasarlanmıştır. Hedef fonksiyonel özellikleri ifade eden pozitif klonlar karakterizasyon için seçilir. Antibiyotik direnç veya ağır metal direnci açısından incelenmek için test ortamına ilgili ajanların eklenmesi gerekir ve sadece pozitif klonlar bu spesifik şartlar altında gelişim gösterebilir (Moore ve ark., 2011).



Şekil 3. *Fonksiyon bazlı metagenomik analizin şematik iş akışı*

Fonksiyona dayalı metagenomik, biyoteknolojik uygulamalar için kullanılabilecek gen ve gen ürünlerini belirlemek için güçlü bir yaklaşımdır. Bu strateji, özellikle biyoremediyasyon, ilaç geliştirme ve biyoyakıt üretimi gibi çok çeşitli endüstriyel alanlarda kullanım potansiyeli taşıyan yeni enzimlerin keşfi için oldukça önemlidir.

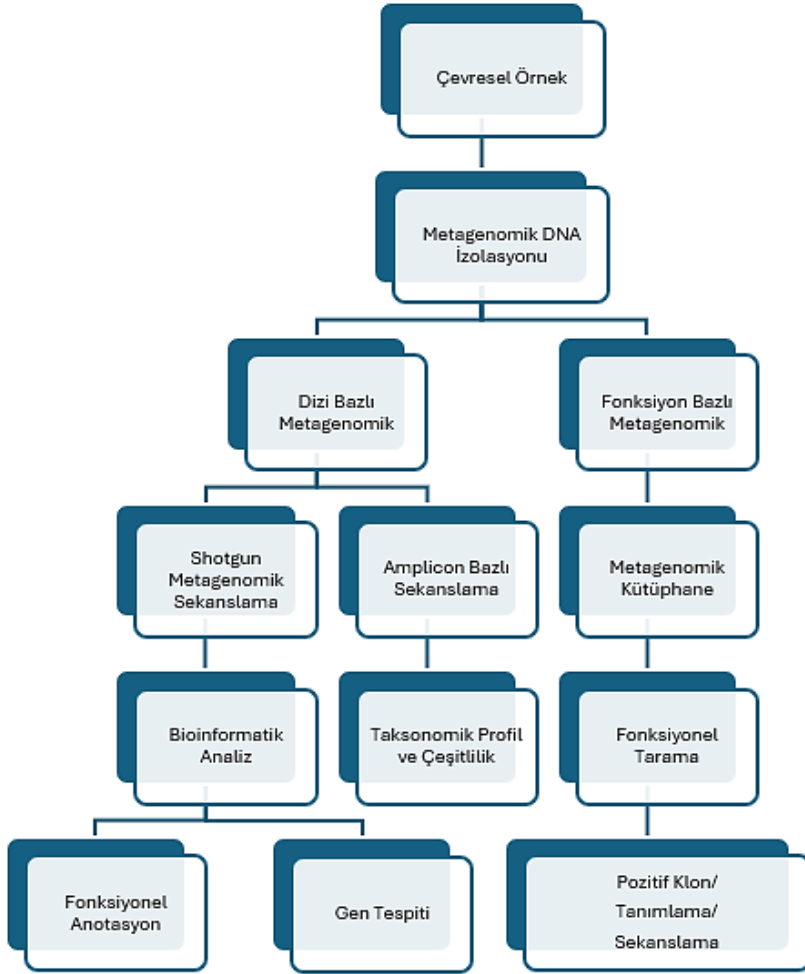
4.2. Dizi Bazlı Metagenomik Yaklaşım

Bu yaklaşımda, fonksiyon bazlı metagenomik aksine araştırmacılar dizi bilgisinden yararlanarak çevresel örnekten elde edilen DNA'daki hedef genleri belirler. Bu doğrultuda metagenomik DNA, gen tanımlama ve mikrobiyal genom birleştirme işlemleri için sekanslanır. Bunun için iki farklı strateji kullanılabilir. Bunlar, tüm genom dizilemesi veya spesifik dizilerin PCR amplifikasyonu ile birleştirilmiş gen hedefli metagenom dizilemesi şeklindedir (Şekil 4) (Tütüncü ve ark. 2017).

Amplikon tabanlı dizileme stratejisinde, çevresel örneklerden izole edilen DNA molekülünden 16S rRNA gibi belirli bir gen bölgesi PCR işlemiyle çoğaltılarak sekanslanır. 16S rRNA gibi evrensel olarak korunmuş bölgeler bakterilerin tür tanımlanması için kullanılan gen bölgeleridir. Böylece, herhangi bir çevresel örneğe ait mikrobiyal çeşitlilik kültüre bağımlı yöntemler kullanılmadan daha basit ve daha kısa sürede aydınlatılabilir. Ayrıca, amplikon stratejisi ile korunmuş bölgelerin varlığı kullanılarak çevresel örneklerden yeni enzimler tanımlanabilmektedir. Bunun için öncelikle aynı sınıftaki enzimleri kodlayan genler veri tabanlarından alınarak hizalanır ve ardından korunmuş bölgeleri hedef alan dejenere primerler dizayn edilir (Izard ve Rivera, 2014; Aktepe ve Çakır 2023).

Tüm metagenom dizilemesi, çevresel örneklerde bulunan mikrobiyal topluluğa ait DNA'nın analizi için kullanılan güçlü bir tekniktir. Belirli genleri hedef alan yaklaşımların aksine tüm metagenom dizileme mikrobiyal toplulukta bulunan tüm genomların kapsamlı analizini sağlar (Thomas ve ark., 2012). Çevresel örnekten ekstrakte edilen DNA küçük parçalara ayrılarak Illumina, PacBio veya Oxford Nanopore yüksek verimli dizileme yöntemleri ile sekanslanır. Bu dizilemenin gerçekleştirilebilmesi için öncelikle DNA fragmentlerinin uçlarına adaptörler yerleştirilir. Hazırlanan DNA kütüphanesi, milyonlarca kısa ya da uzun dizi okumaları yapabilen yeni nesil dizileme (NGS) teknolojileri kullanılarak dizilenir. İlerleyen teknoloji ile birlikte geliştirilen NGS sayesinde çok daha uzun DNA dizileri hızlı ve güvenilir şekilde okunabilmektedir (Izard ve Rivera, 2014; Escobar-Zepeda ve ark., 2015).

Tüm genom dizileme, hem mikrobiyotanın analizini hem de bu mikrobiyotanın fonksiyonel açıdan kullanılabilirliğini belirler. Bu strateji, mikroorganizmaların tür düzeyinde daha ayrıntılı taksonomik sınıflandırılmasının yanı sıra tanımlanmamış genlerinin de aydınlatılmasını sağlar (Calle, 2019). Ancak bu yöntemin kendi içerisinde çok fazla deneysel ve hesaplamalı basamaklar içermesi araştırmacılar için dezavantaj olarak görülmektedir (Choudhari ve ark., 2022). Deneysel işlemlerde; tecrübe, biyoinformatik analiz ve karmaşık işlem süreçleri içerisinde sonuçların yorumlanması gibi sınırlandırmalar bulunmaktadır (Brown ve ark., 2019; Ye ve ark., 2019).



Şekil 4. Çevresel örneklerden gerçekleştirilen metagenomik analizlerin iş akışı

Mikrobiyal çalışmalar için kültürlenemeyen mikroorganizmaların neden olduğu sınırlandırmayı ortadan kaldırarak dünyanın her yerine hakim olan mikrobiyal çeşitliliğin aydınlatılmasına farklı bir boyut kazandıran metagenomik analizler, mevcut çalışmada fonksiyon tabanlı ve dizi tabanlı şeklinde ikiye ayrılarak incelenmiştir. Bu ayrım metagenomik analizlerin temel mantığını anlamlandırmak için yapılmıştır. Bu stratejiler birbirinden çok uzak yaklaşımlar değil aksine keskin sınırlarla ayrılamayacak kadar birbirini tamamlayıcı stratejilerdir.

5. JEOTERMAL ALANLARDAKİ METAGENOMİK ÇALIŞMALARIN GÜNCEL DURUMU VE YENİ ENZİMLERİN KEŞFİ

Metagenomik çalışmalar, kültürden bağımsız analizler sunarak özellikle ekstrem habitatlardaki mikrobiyal çeşitliliği görünür kılmaktadır. Bu nedenle, son yıllarda metagenomik analizler ile jeotermal alanlarda gerçekleştirilen çalışmaların sayısı giderek artmaktadır. Bu çalışmalar hem yüksek sıcaklığın hakim olduğu ekosistemlerin çeşitliliğini ortaya koyduğu hem de bu ekstrem ortamlarda yüksek adaptasyona maruz kalmış enzimlerin keşfine imkan sağladığı için önemli ve kıymetlidir.

Bharwad ve ark. (2023) tarafından yapılan çalışmada, Tuwa kaplıcası (Gujarat, Hindistan) toprağından elde edilen metagenomik DNA dizisi, biyoinformatik olarak endüstriyel açıdan önemli termostabil enzimlerin genleri açısından taranmıştır. Elde edilen bulgulara göre daha önce tanımlanmamış olan bir amilaz geni tespit edilmiştir. Bu gen çoğaltılıp klonlanarak *Escherichia coli* BL21 suşunda ekspere edilmiştir. Enzimin mikrobiyal üretimi ardından kromatografik teknikler ile saflaştırılarak in vitro da karakterize edilmiştir. rm- α -amilazının 60°C ve pH 6,0'da optimum aktivite gösterdiği ve 70-80°C'ye kadar da aktivitesini koruduğu görülmüştür. Ayrıca, enzimin 0,1 mM Co²⁺ ve diğer ağır metallerin varlığında yüksek seviyede aktivite gösterdiği, nişastanın dışında agar, ksilan, pektin, aljinat ve selülozu da hidrolize ettiği ortaya koyulmuştur. rm- α -amilazının farklı substratlara olan ilgisi, yüksek sıcaklığa ve ağır metal iyonlarına karşı dayanıklılığı sayesinde çeşitli endüstriyel biyoteknolojik uygulamalarda kullanım potansiyelinin yüksek olduğu vurgulanmıştır.

Chauhan ve ark. (2023) tarafından yapılan çalışmada, Hindistan'nın farklı bölgelerindeki jeotermal kaynaklardan dizi ve fonksiyona dayalı metagenomik analizler gerçekleştirilmiştir. Metagenomik DNA, dejenerat primer bazlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılarak karbonhidrat parçalayan enzimler (amilaz, selülaz, ksilanaz, amilopullulanaz) açısından taranmıştır. Odisha'daki jeotermal kaynaktan elde edilen DNA örneği 1503 baz çifti uzunluğunda amilaz geni *E. coli*'ye transfer edilerek klonlanmıştır. Sekans ve biyoinformatik analizlere göre amilaz geninin *Bacillus licheniformis* amilazına %98 benzerlik gösterdiği ancak enzimin yapısal modellemesinde katalitik katlanma gerçekleştirdiği ve endüstriyel uygulamalar için uygun termostabil enzim olabileceği ortaya koyulmuştur. Ayrıca, Tapovan, Manikaran, Chawalpani termal kaynaklardan alınan örneklerden selülaz, ksilanaz, amilopullulanaz ve bakteriyel hormon taşıyıcı Auxin Efflux Carrier (AEC) proteini genleri de belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, jeotermal kaynakların özellikle endüstriyel açıdan önemli yeni enzimlerin keşfi açısından zengin kaynaklar olabileceği ortaya koyulmuştur.

Bir başka çalışmada, Japonya'daki sıcak su kaynaklarından alınan sediman örnekleri ile shotgun metagenomik analiz yapılarak yeni selüloz genleri taranmıştır. Sonuçlara göre, metagenomik yaklaşımlar ile belirlenen ve *E. coli*'de eksprese edilen HmCel6A ve varyantı HmCel6A-3SNP adlı hiper-termostabil selobiyohidrolaz (CBH) tespit edilmiştir. Bu enzimler, yeni bir glikozid hidrolaz (GH6) ailesi olarak sınıflandırılmıştır. HmCel6A-3SNP'nin optimum sıcaklığı 95°C iken HmCel6A'nın optimum sıcaklığı 75°C'dir. Yapı-Fonksiyon çalışmalarına göre HmCel6A-3SNP'nin kristal yapısında yer alan hidrofobik etkileşimler, metal iyonu bağlanmaları ve disülfid köprüleri ile açıklanmaktadır. Bu çalışma, metagenomik yaklaşımların yeni biyokatalizörlerin keşfinde ve hiper-termostabil enzimlerin eldesinde kullanılabilecek önemli teknikler olduğunu göstermektedir (Takeda ve ark., 2022).

Kaushal ve ark. (2021) tarafından yapılan çalışmada, Hindistan-Chat-tisgarh'da bulunan sıcaklığı 98°C olan termal su örneğinin metagenomik analizi gerçekleştirilmiştir. Metagenomik tarama sonucu β -glukozidaz kodlayan yeni bir gen olan bgl_M (GH1 ailesi) tanımlanmıştır. Karşılaştırmalı protein dizisi ve homoloji yapı analizine göre bgl_M geni GH1 ailesi içerisinde yer alan bir β -glukozidaz olarak belirlenmiştir. Bu gen *E. coli*'de eksprese edilerek BglM proteini saflaştırılmıştır. Karakterize edilen enzimin pH 5,0-7,0 arasında ve 40-70°C sıcaklıklarında katalitik aktivite gösterdiği, 40 saat süreyle 50°C sıcaklığa maruz kalan enzimin sadece %20 aktivite kaybederek yüksek termostabil özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, şelatlayıcıların, denatüre edici ajanların, metal iyonlarının ve yüzey aktif maddelerin varlığında enzim aktivitesinin olumsuz etkilenmediği gözlenmiştir. Böylece yeni keşfedilen termostabil β -glukozidaz enziminin termal kararlılığının yanı sıra kimyasal ajanlara karşı da biyolojik aktivitesini koruduğu belirlenmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada, dünya genelinde 58 farklı jeotermal kaynaktan alınan örnekler lignoselüloz parçalayıcı enzim potansiyeli açısından incelenmiştir. 71 metagenomik veri seti, taksonomik çeşitlilik ve karbonhidrat aktif enzim (CAZyme) kodlama potansiyeli açısından analiz edilmiştir. 19 farklı glikozid hidroliz ailesine ait genler bulunmuştur. Bu genlerin özellikle selüloz ve hemiselüloz yıkımı için oldukça önemli olduğu vurgulanmıştır. İncelenen kaplıcalardaki taksonomik profillemeye sonucu mikrobiyal gelişim sıcaklık ve pH değerlerine göre değişkenlik göstermiş ve özellikle *Aquificae* ve *Crenarchaeota* yüksek sıcaklık ve asidik pH'da baskın olarak gelişim göstermiştir. Bu çalışma, biyokütle parçalama için yeni termozimlerin keşfinde jeotermal kaynakların geniş mikrobiyal potansiyel barındırdığını ortaya koymuş ve biyoyakıt üretiminde kullanılabilecek yüksek sıcaklık ve ekstrem pH değerlerinde katalitik aktivitesini koruyabilecek enzimler için temel oluşturmuştur

(Reichart ve ark., (2021).

Mora-González ve ark. (2021) tarafından yapılan çalışmada, Meksika'nın 50-90°C arası sıcaklığa sahip Los Humeros volkanik jeotermal sahasındaki bakteri çeşitliliği metagenomik 16S rRNA gen analizi ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, çalışmada tüm genom shotgun yaklaşımı ile lipolitik enzim genlerinin varlığı araştırılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre toprak örneklerinde yüksek çeşitlilik tespit edilirken en yaygın filumlar *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* ve *Acidobacteria* şeklindedir. Lipolitik enzimlerle ilişkili 165 gen bulunmuştur. Bu enzimler içerisinde karboksilesterazlar ve fosfolipazlar C en yaygın olanlarıdır. Belirlenen 165 lipolitik genin %45'i daha önce karakterize edilmemiş yeni lipolitik enzim genleridir.

Hindistan'daki Taptapani kaplıcasında yapılan bir çalışmada, sediman örneğinden metagenomic DNA elde edilerek kültürden bağımsız bir kütüphane oluşturulmuş ve klonlar lipaz açısından taranmıştır. Bu kütüphanede yaklaşık 13.000 klon taranmış ancak sadece 7'sinde lipaz aktivite tespit edilmiştir. Lip479 şeklinde kodlanan klon en yüksek lipaz aktiviteyi göstermiş ve ileri karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Lip479 klonu, pH 8,0 ve 65°C sıcaklıkta optimum düzeyde aktivite göstermiştir. Rekombinant Lip479, organik çözücüler, metanol, DMF, DMSO, aseton ve diklorometan içerisinde aktivitesini büyük orvea korumuştur ve Fe^{3+} hariç K^+ , Mn^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} ve Ca^{2+} varlığında aktivitesi artmıştır. Elde edilen bulgular, Lip479 lipazının çeşitli biyodizel üretimi, deterjan ve kimya endüstrisi gibi alanlar için kullanım potansiyeline sahip biyokatalizör olabileceğini göstermiştir (Sahoo ve ark., 2020).

Bir diğer çalışmada, Kaklık Mağarası (Denizli, Türkiye) sıcak su kaynağının mikrobiyal çeşitliliğini belirlemek amacıyla 16S rRNA amplikon dizileme tekniği kullanılmıştır. Belirlenen taksonomik birimler içerisinde 25 bakteri şubesi, 3 arke şubesi bulunmaktadır. Bakteriyel çeşitlilik profillerine genellikle *Epsilonproteobacteria* ve *Gammaproteobacteria*'nın hakim olduğu tespit edilmiştir. Kaklık Mağarası mikrobiyal çeşitliliğini ilk kez ortaya koyan bu çalışma, sülfürlü bir mağara olarak benzersiz bir ekosistem sergileyerek karbonat ve kükürt açısından zengin, yüksek sıcaklık ve oksijensiz koşullar altında gelişim gösteren mikroorganizmaların metagenomik tekniklerle aydınlatılması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu ekstrem çevresel şartlar altında var olan mikrobiyal çeşitlilik yeni enzimlerin ve fonksiyonel genlerin keşfi için zemin hazırlamaktadır (Gulecal-Pektas ve Temel 2017).

6. SONUÇ

Bu bölümde, kültürlenemeyen mikrobiyal çeşitliliğin aydınlatılmasında önemli bir yer tutan metagenomik çalışmalar hakkında bilgi verilmiştir. Ekstrem habitatlarda yaşayan canlıların hayatta kalabilmek için geçirdiği adaptasyonlardan en önemlisi de enzimlerin çevresel şartlara karşı gösterdiği uyumdur. Endüstriyel alanlarda ve biyoteknolojik uygulamalarda ihtiyaç duyulan zorlu şartlarda aktivitesini koruyabilen enzim arayışı yıllardır devam etmektedir. Proseslerde uygulanması gereken yüksek sıcaklık, asidik ya da bazik pH veya organik çözücü varlığın gibi durumlarda enzimatik aktivitenin korunabilmesi için Ekstremofilik enzimlere (Ekstremozimler) ilgi giderek artmaktadır.

Enzimler, kimyasal katalizörlere kıyasla substrat spesifikliğı ve düşük enerji gereksinimi nedeniyle daha çok tercih edilmekte ve her geçen yıl küresel enzim pazarı büyümeye devam etmektedir. Özellikle termozimler endüstriyel proseslerde aktivitelerini daha iyi koruyabildiğinden maliyeti ve süreyi ciddi anlamda azaltmaktadır. Yüksek sıcaklıkta yaşama uyum sağlamış termofilik ve hipertermofilik organizmaların enzimleri de yüksek sıcaklığa dayanıklılık gösterdiğinden termostabil enzimler olarak gruplandırılmaktadır. Bu enzimler sadece sıcaklığa karşı değil, aynı zamanda metal iyonlarına, pH değişimlerine, deterjanlara ve organik çözücülere karşı da aktivitesini koruyabilmektedir.

Jeotermal alanlar termozimlerin tespiti için son derece uygun ortamlardır. Ancak tüm mikroorganizmalar kültürlenemediğinden bu noktadaki sınırlamalar metagenomik çalışmalarla aşılabilmektedir. Termal ortamlardan alınan örnekler ile doğrudan metagenomik DNA izole edilerek dizi ve fonksiyon bazlı analizlerle enzimatik genlere ulaşılabilir. Tespit edilen enzimatik genler *E. coli* gibi uygun konakçıda ekspere edilerek kültür sınırlamaları tamamen aşılabılır. Bu şekilde üretilen enzimler; endüstriyel alanlarda, biyoteknolojik, ilaç ve kimya proseslerinde kullanım potansiyeli araştırılabilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, termal kaynaklardan elde edilen termozimlerin mezofilik muadillerine kıyasla dirençli ve birçok alanda kullanım için de uygun olduklarını ispatlamıştır. Enzimlere olan ihtiyaç giderek artmakta olduğundan ilerleyen zamanlarda metagenomik analizlerle termozimlerin keşfi alanında daha çok çalışmaların yapılabileceğı ön görülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akkaya SE, and Kivanc M (2009). Thermophilic Bacteria; Methods of isolation and identification of Gram negative *Bacilli* in hot springs. Electronic Microbiology Journal TR 07(1), 01-23.
- Aktepe Y, and Çakır İ (2023). Metagenomic approaches in food microbiology. GIDA (2023) 48(6), 1230-1243 doi: 10.15237/ gida.GD23101
- Alves L, de F Westmann CA, Lovate GL, de Siqueira GMV, Borelli TC and Guazzaroni ME (2018). Metagenomic approaches for understanding new concepts in microbial science. Heng H, editor. Int. J. Genomics. 2018, 1-15. doi:10.1155/2018/2312987
- Arbab S, Ullah H, Khan MI, Khattak MN, Zhang J, Li K and Hassan IU (2022). Diversity and distribution of thermophilic microorganisms and their applications in biotechnology. Journal of basic microbiology, 62(2), 95-108.
- Aro N, Saloheimo A, Ilmén M and Penttilä M (2001). ACEII, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. J Biol Chem.276(26), 24309-14.
- Atomi H (2005). Recent progress towards the application of hyperthermophiles and their enzymes. Current opinion in chemical biology, 9(2), 166-173.
- Baltacı MO, Genc B, Arslan S, Adiguzel G and Adiguzel A (2017). Isolation and characterization of thermophilic bacteria from geothermal areas in Turkey and preliminary research on biotechnologically important enzyme production. Geomicrobiology journal, 34(1), 53-62.
- Bharwad K, Shekh S, Singh NK, Patel A and Joshi C (2023). Heterologous expression and biochemical characterization of novel multifunctional thermostable α -amylase from hot-spring metagenome. International Journal of Biological Macromolecules, 242, 124810.
- Brock TD (1967). Life at high temperatures. Science 158, 1012-1019.
- Brown E, Dessai U, McGarry S and Gerner-Smid P (2019). Use of Whole-Genome Sequencing for Food Safety and Public Health in the United States. Foodborne Pathogens And Disease 16(7), 441-450.
- Calle ML (2019). Statistical Analysis of Metagenomics Data Genomics & Informatics; 17(1), 1-9.
- Carola S and Rolf D (2011). Achievements and new knowledge unraveled by metagenomic approaches. Appl Microbiol Biotechnol 85, 265-276.
- Charlier D and Droogmans L (2005). Microbial life at high temperature, the challenges, the strategies. Cell Mol Life Sci. 62, 24-84.
- Chauhan G, Kumar V, Arya M, Kumari A, Srivastava A, Khanna P and Sharma M (2023). Mining of thermostable alpha-amylase gene from geothermal springs using a metagenomics approach. J Pure Appl Microbiol, 17(1), 362-370.
- Choudhari JK, Choubey J, Verma MK, Chatterjee T and Sahariah BP (2022). Metagenomics: the boon for microbial world knowledge and current

- challenges, Bioinformatic methods and Applications, Dev Bukhsh Singh, Raiesh Kumar Pathak (ed.) 159-175.
- Dal Bello M and Abreu CI (2024). Temperature structuring of microbial communities on a global scale. *Current Opinion in Microbiology*, 82, 102558.
- De Bruijn FJ (2011). *Handbook of molecular microbial ecology I: metagenomics and complementary approaches* (Vol. 1). John Wiley & Sons.
- De Rosa M, Morana A, Riccio A, Gambacorta A, Trincone A, Incani O (1994). Lipids of the archaea: a new tool for bioelectronics. *Biosens. Bioelectr.* 9, 669-675.
- DeCastro ME, Rodriguez-Belmonte E, Gonzalez-Siso MI (2016). Metagenomics of thermophiles with a focus on discovery of novel thermozymes. *Front. Microbiol.* 7, 1521.
- Denef VJ, Mueller RS and Banfield JF (2010). AMD biofilms: using model communities to study microbial evolution and ecological complexity in nature. *ISME J.* 4, 599-610.
- Egorova K and Antranikian G (2005). Industrial relevance of thermophilic Archaea. *Curr Opin Microbiol.* 8(6), 649-55.
- Escobar-Zepeda A, Vera-Ponce de León A and Sanchez-Flores A (2015). The road to metagenomics: From microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. *Frontiers in Genetics*, 6.
- Everly C and Alberto J (2000). Stressors, stress and survival: overview. *Front. Biosci.* 5, 780-786.
- Fan X, Liu X, Wang K, Wang S, Huang R and Liu Y (2011). Highly soluble expression and molecular characterization of an organic solvent-stable and thermotolerant lipase originating from the metagenome. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 72, 319-325.
- Fuciños P, Atanes E, López-López O, Solaroli M, Cerdán ME, González-Siso MI, Pastrana L, Rúa ML (2014). Cloning, expression, purification and characterization of an oligomeric His-tagged thermophilic esterase from *Thermus thermophilus* HB27. *49(6)*, 927-935.
- Gallo G, Imbimbo P and Aulitto M (2024). The undeniable potential of thermophiles in industrial processes. *International journal of molecular sciences*, 25(14), 7685.
- Ghosh A, Mehta A and Khan AM (2019). "Metagenomic analysis and its applications," in *Encyclopedia of bioinformatics and computational biology*. Editors S. Ranganathan, M. Gribskov, K. Nakai, and C. Schönbach, Oxford, UK: Academic Press, 184-193.
- Gomes J and Steiner W (2004). The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technol. Biotechnol.* 42, 223-235.
- Görkem Z, Cerit ZG, Baloglu MC and Yılmaz R (2021). Beyaz Peynir Mikrobiyotasında Kültüromik ve Shotgun Metagenomik Teknolojilerin Değerlendirilmesi. *GIDA*, 46(3) 566-582.
- Grogan DW (1991). Evidence that beta-galactosidase of *sulfolobussolfataricus* is

- only one of several activities of a thermostable β -D-glucosidase. *Appl Environ Microbiol.* 57(6), 1644-9.
- Gulecal-Pektas Y and Temel M (2017). A Window to the subsurface: Microbial diversity in hot springs of a sulfidic cave (Kaklık, Turkey). *Geomicrobiology Journal*, 34(4), 374-384.
- Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J and Goodman RM (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. *Chemistry and Biology*, 5(10).
- Hardwick SA, Chen WY, Wong T (2018). Synthetic microbe communities provide internal reference standards for metagenome sequencing and analysis. *Nature Communacation* 9, 1-11.
- Healy FG, Ray RM, Aldrich HC, Wilkie AC, Ingram LO, Shanmugam KT (1995). Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in a thermophilic, anaerobic digester maintained on lignocellulose, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(4), 667-674.
- Hedlund BP, Reysenbach AL, Huang L, Ong JC, Liu Z, Dodsworth JA, Ahmed R, Williams AJ, Briggs BR, Liu Y, Hou W and Dong H (2015). Isolation of diverse members of the Aquificales from geothermal springs in Tengchong, China. *Front Microbiol*, 6, 157.
- Herbert R and Sharp R (1992). *Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles*. Chapman and Hall, NY.
- Inskeep WP, Jay ZJ, Tringe SG, Herrgård MJ and Rusch DB (2013). The YNP metagenome project: environmental parameters responsible for microbial distribution in the Yellowstone geothermal ecosystem. *Front. Microbiol.* 4, 67.
- Izard J and Rivera M (Eds.). (2014). *Metagenomics for microbiology*. Academic Press.
- Jansson JK and Hofmockel KS (2018). The soil microbiome from metagenomics to metaphenomics. *Current opinion in microbiology*, 43, 162-168.
- Jiang H, Huang Q, Dong H, Wang P, Wang F, Li W, Zhang C (2010). RNA-based investigation of ammonia-oxidizing archaea in hot springs of Yunnan Province, China. *Appl Environ Microbiol* 76, 4538-4541.
- Kaushal G, Rai AK and Singh SP (2021). A novel β -glucosidase from a hot-spring metagenome shows elevated thermal stability and tolerance to glucose and ethanol. *Enzyme and Microbial Technology*, 145, 109764.
- Koga Y (2012). Thermal adaptation of the archaeal and bacterial lipid membranes. *Archaea*, 2012:789652.
- Koutsoumanis K, Allende A, Alvarez-Ordóñez A, Bolton D, Bover-Cid S and Herman L (2019). Whole genome sequencing and metagenomics for outbreak investigation, source attribution and risk assessment of food-borne microorganisms. *Efsa Journal*, 17(12), e05898.
- Kristjonsson JK and Stetter KO (1991). *Thermophilic Bacteria* (Ed: Kristjonsson JK) CRC Pres. Inc. London, 1-13.
- Kumar S, Dangi AK, Shukla P, Baishya D and Khare SK (2019). *Thermozymes*:

adaptive strategies and tools for their biotechnological applications. *Bioresource Technology*, 278, 372-382.

Kumar S and Nussinov R (2001). How do thermophilic proteins deal with heat? A review. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1216-1233.

Li D, Liu CM, Luo R, Sadakane K and Lam TW (2015). MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics* 31, 1674-1676.

Liu Y, Huang L, Shan M, Sang J, Li Y, Jia L, Wang N, Wang S, Shao S, Liu F and Lu F (2019). Enhancing the activity and thermostability of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase by directed evolution and molecular dynamics simulation. *Biochemical Engineering Journal* 151, 107333.

Lopez G (1999). DNA supercoiling and temperature adaptation: a clue to early diversification of life. *J. Mol. Evol.* 46, 439-452.

Mehta R, Singhal P, Singh H, Damle D and Sharma AK (2016). Insight into thermophiles and their wide-spectrum applications. *Biotech*, 6, 81.

Mirete S, Morgante V, Gonzalez-Pastor JE (2016). Functional metagenomics of extreme environments. *Curr Opin Biotechnol*, 38, 143-9.

Mohammad BT, Al Daghistani HI, Jaouani A, Abdel-Latif S, Kennes C (2017). Isolation and characterization of thermophilic bacteria from Jordanian hot springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* isolates as potential producers of thermostable enzymes. *Int J Microbiol*, 6943952.

Moore AM, Munck C, Sommer MO and Dantas G (2011). Functional metagenomic investigations of the human intestinal microbiota. *Frontiers in microbiology*, 2, 188.

Mora-González PC, Espinosa-Luna G, Ramírez-Higuera A, Peña-Montes C, Valerio-Alfaro G, Sánchez-Flores A, Quintana-Castro R, Sánchez-Oterod M and Oliart-Ros RM (2021). Metagenomic approach to bacterial diversity and lipolytic enzymes' genes from a steam soil of Los Humeros geothermal field (Puebla, México). *Geomicrobiology Journal*, 38(4), 304-314.

Oren A (2015). Halophilic microbial communities and their environments. *Curr. Opin. Microbiol.* 33, 119-124.

Paz A, Mester D, Baca I, Nevo E and Korol A (2004). Adaptive role of increased frequency of polypurine tracts in mRNA sequences of thermophilic prokaryotes. *PNAS*. 101, 2951-6

Prayogo FA, Budiharjo A, Kusumaningrum HP, Wijanarka W, Supriyadi A and Nurhayati N (2020). Metagenomic applications in exploration and development of novel enzymes from nature: A review. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 18 (1), 39.

Robinson PK (2015). *Enzymes: Principles and biotechnological applications*. Essays Biochem. 59, 1.

Rondon MR, August PR, Bettermann AD, Brady SF, Grossman TH, Liles MR, Loiacono KA, Lynch BA, MacNeil IA, Minor C, Tiong CL, Gilman M, Osburne MS, Clardy J, Handelsman J and Goodman RM (2000). Cloning

- the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms, *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2541–2547.
- Rothschild LJ and Mancinelli RL (2001). Life in extreme environments. *Nature* 409, 1092-1101
- Saboto D, Nucci R, Rossi M, Gryczynski I, Gryczynski Z, Lakowicz J (1999). The β -glycosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*: enzyme activity and conformational dynamics at temperatures above 100°C. *Biophys. Chem.* 81, 23-31.
- Sahoo RK, Das A, Sahoo K, Sahu A and Subudhi E (2020). Characterization of novel metagenomic–derived lipase from Indian hot spring. *International Microbiology*, 23(2), 233-240.
- Sar P, Kazy SK, Paul D and Sarkar A (2013). Metal bioremediation by thermophilic microorganisms. In: Satyanarayana T, Kawarabayasi Y, Littlechild J, editors. *Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology*. Dordrecht: Springer. p. 171-201
- Saxena R, Chaudhary N, Dhakan DB and Sharma VK (2015). Draft genome sequence of *Gulbenkiania mobilis* strain MBI, a sulfur-metabolizing thermophile isolated from a hot spring in Central India. *Genome Announc.* 3:e01295-15.
- Schmid AK, Allers T and DiRuggiero J (2020). Snapshot: microbial extremophiles. *Cell* 180, 818-818.
- Schmidt TM, DeLong EF, Pace NR (1991). Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *Journal of bacteriology*, 173(14), 4371-4378.
- Shi H, Zhang Y, Li X, Huang Y, Wang L, Wang Y, Ding H and Wang FA (2013). novel highly thermostable xylanase stimulated by Ca^{2+} from *Thermotoga thermarum*: cloning, expression and characterization. *Biotechnol Biofuels* 6, 26.
- Shu WS and Huang LN (2022). Microbial diversity in extreme environments. *Nature Reviews Microbiology*, 20(4), 219-235.
- Takeda M, Baba S, Okuma J, Hirose Y, Nishimura A, Takata M, Oda K, Shibata D, Kumasaka T and Kondo Y (2022). Metagenomic mining and structure-function studies of a hyper-thermostable cellobiohydrolase from hot spring sediment. *Communications biology*, 5(1), 247.
- Thomas T, Gilbert J and Meyer F (2012). Metagenomics - A guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and Experimentation*, 2(1).
- Tütüncü HE, Karaguler NG, Oztug M, Balci NC and Tuter M (2017). Function Based Metagenomics Approach for Obtaining Lipase from Acid Mine Drainage Site. *International Journal Series in Engineering Science (IJSES)* (ISSN: 2455-3328), 1-20.
- Wu H, Chen Q, Zhang W and Mu W (2021). Overview of strategies for developing high thermostability industrial enzymes: Discovery, mechanism, modification and challenges, *Critical Reviews in Food Science and*

Nutrition.

- Ye SH, Siddle KJ, Park DJ and Sabet PC (2019). Benchmarking Metagenomics Tools for Taxonomic Classification. *Cell* 178, 779-794.
- Zeldes BM, Keller MW, Loder AJ, Straub CT, Adams MWW and Kelly RM (2015). Extremely thermophilic microorganisms as metabolic engineering platforms for production of fuels and industrial chemicals. *Front Microbiol.* 6, 1209.

Bölüm 3

MANTARLARIN ALKOLOİDLERİ

*Handan ÇINAR YILMAZ¹, Handan Nazlı Pınar ARSLAN²,
Mesut TAŞKIN³*

1 Bingöl Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler Bölümü, Bingöl. IORCID:0000-0001-7215-7822, hyilmaz@bingol.edu.tr

2 Bingöl Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler Bölümü, Bingöl. ORCID: 0000-0002-3951-4418, nparslan@bingol.edu.tr

3 Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum.3ORCID: 0000-0002-9350-9628, mesut.taskin@atauni.edu.tr

1. Giriş

Mantarlar, klorofil içermeyen ve absorpsiyon yoluyla beslenen organizmalardır. Doğada mineral ve madde dönüşümlerinin sağlanmasında kritik rol oynayan bu organizmalar, orman ekosistemleriyle simbiyotik ilişkiler kurarak yaşamaktadır. Mantarlar, topraktaki çeşitli mineralleri bünyelerinde biriktirme kapasitesine sahip olup, bu minerallerin depolanması ekosistem dengesi açısından önemli bir işlevi yerine getirir. Ayrıca, yaşamsal habitatları doğrultusunda, beslenme stratejilerine bağlı olarak farklı sekonder metabolitler üretme potansiyeline sahiptirler. Bu metabolitler, mantarların çevresel streslere karşı direnç kazanmalarını ve diğer organizmalarla olan etkileşimlerini düzenlemelerini sağlayabilir.

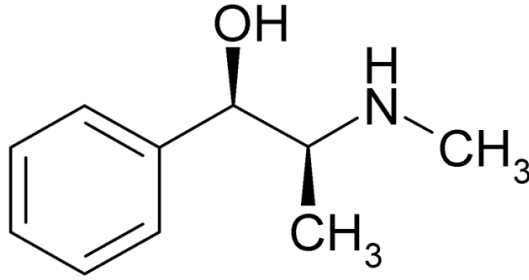
Mantarların yapısına bakıldığında, su, mineral, fibril, protein, yağ ve karbonhidrat gibi bileşenleri bol miktarda bulundurduğu belirlenmiştir. Erişkin bir mantar %80-95 oranında su içerirken, geneline bakıldığında %40'ın üzerinde karbonhidrat, %20-40 oranında değişen protein ve polisakkarit türevlerini içermektedirler. Yapılarında değişik aminoasitler bulundurmakta ve en yüksek seviyelerde çıkanlardan bazıları glutamin, asparajin ve metihyonindir. Makrofunguslarda doymuş ve doymamış yağ asitleri bakımından da zengin içeriklere ve yüksek seviyelerde doymuş yağ asitlerinden Linoleik, Oleik ve Palmitik asitlere sahiptir. Bunların yanı sıra insan metabolizması için gerekli olan tiamin, riboflavin vb. gibi çeşitli vitaminler, biyolojik aktiviteye sahip tür bazlı etken maddeleride bulunmaktadır. Bu maddeler günümüz dünyasında birçok alanda kullanılmakta olup, popülerliği giderek artmaktadır. Yapılan çalışmalar doğrultusunda, anti-tümör, anti-kanser, antienflamatuar, antioksidan, antimikrobiyal, antiviral, immunostimulan gibi birçok biyolojik aktivite mantarlar ve içerdikleri etken madde ile lektinler, lanostanoitler ve diğer terpenoitler, steroller, fenolik bileşikler ve alkaloitler taşıdıkları bilinmektedir (Öztürk ve ark., 2015; Sullivan ve ark., 2006; Şöhretoğlu ve Huang 2018; Üstün, 2011; Wasser, 2011). Ayrıca mantarlardan elde edilen sekonder metabolitlerden ve bileşiklerden yeni farmasötik ürünler ve ilaçların üretilmesi için öncül bileşikler olarak kullanılmaya başlanmıştır (Homer ve Sperry, 2017).

Mantarlar hem besin kaynağı hem de geleneksel tedavide antik çağlardan beri tekin bir madde olarak kullanılmaktadır. Asya, Endonezya, Çin vb. kültürlerinde birçok mantar türünün tıbbi kullanımlarına ait kaynaklar bulunmakla birlikte milattan önce Çin'de yazılan "Materia Medica" adlı kaynakta birçok mantar türünün tıbbi kullanımları anlatılmaktadır (Wachtel-Galor, 2011). Günümüzde mantar bileşikleri ve ekstratlarıyla yapılan çalışmalar popülerlik kazanmakta fakat mantar alkaloitleri ile ilgili çok çalışma bulunmamaktadır. Mantarlar bileşikleri

ve sekonder metabolitleri yaygın kullanıma sahip olmasına karşın fazla dikkat çekilmeyen farklı seviyelerde ve farklı biyolojik aktivitelere sahip mantar alkoloitleride bulunmaktadır. Bu açıdan çalışmamız, mantar alkoloitleri hakkında bilgi vermek ve işleyişlerini kısaca tanımlamak için iyi bir kaynak oluşturacağı şekilde oluşturulmuştur.

2. Alkoloitler

Alkoloitler, aminoasitlerden şekillenen, genellikle halkalı yapısında bir veya daha fazla sayıda azot atomu bulunduran, değişik seviyelerde bazik özellikte olan, çok az miktarlarda dahi kuvvetli fizyolojik ve farmakodinamik özellikle gösteren bileşiklerdir. Doğada genellikle tuz halinde bulunan bu maddelere alkoloit adı verilirken, aminoasitlerden türevlenmeyenlere pseudoalkoloit, azot atomu ayrı şekilde bulunanlara ise protoalkoloit adı verilir. Alkoloitler genellikle Angiospermelerde bulunmakla birlikte, mantarlarda, Pteridophyta'da ve bakterilerde de bulunabilmektedirler (Dewick, 2002; Heinrich ve ark., 2012). En yaygın olarak görülen alkoloitler, morfin, striknin, kinin, efedrin ve nikotindir.



Resim 1: Genel alkoloit formülü

1.1. Alkoloidlerin Sınıflandırılması

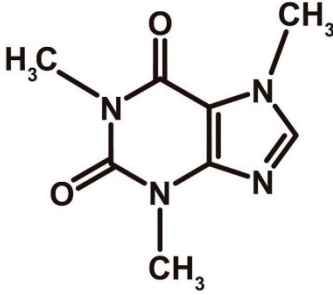
Alkoloidler normal koşullarında ve doğal kaynaklarda primer, sekonder, tersiyer ve nadiren kuaterner amonyum hidratları halinde bulunabilirler. Molekülünde oksijen atomu bulundurmayanlar genellikle sıvı ve uçucu olup, su buharıyla taşınabilen ve esansiyel kokulara sahiptirler (Örn: Konin, Nikotin, Spartein). Oksijen bulunduranlar ise genellikle katı halde ve kristalize bileşikler halindedirler (Örn: Kinin, Kafein, Morfin vb.).

Alkoloidler, etken maddelerinin sonuna -ine ya da -ina takıları getirilerek isimlendirilmeleri yapılır. Bazı özel durumlarda ise kimyasal ve fizyolojik etken durumlarına bağlı olarak veya otörlerine bağlı isimlendirilmelerde yapılabilmektedir. Örneğin; Emetin; kusturucu ya da Pelletierin; Pelletier vb. şeklinde isim alabilirler. Yapılarında bulunan farklılıklardan

dolayı şekil ve orjinelerine göre alkaloidler 3 ana gruba ayrılmışlardır.

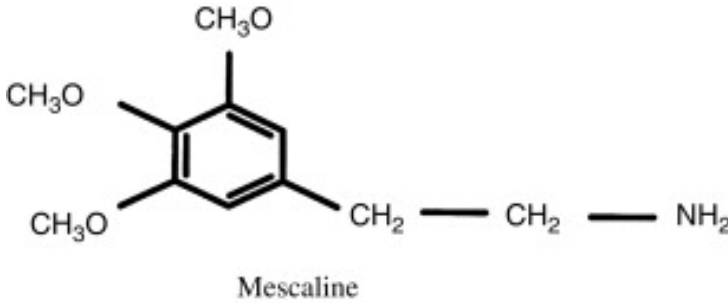
2.1.1. Gerçek Alkaloidler

Aminoasitlerden türevlenerek, heterosiklik halkalarını bir azotla ortaklaşa kullanırlar.



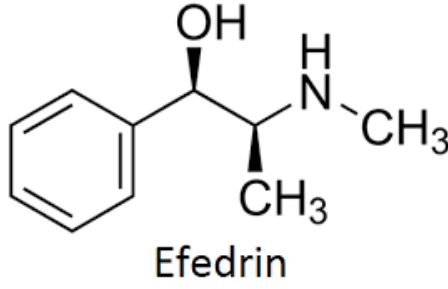
2.1.2. Protoalkaloidler

Gerçek alkaloidlerden farklı olarak, heterosiklik halkanın bir parçası değildirler. Bu tipler, L-Trozin ve L-Triptofan'lerden oluşmaktadır. Çeşit sayısı olarak en küçük grup olmakla birlikte, yapısal olarak basit ve halkasal yapıdadırlar. Hordenin, meskalin ve yhombin gibi bilindik örnekleri mevcuttur.

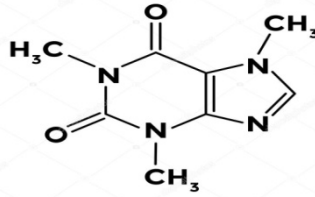


2.1.3. Yalancı alkaloidler

Gerçek ve protoalkaloidlerden farklı olarak tamamen temel karbon iskeletine sahip ve öncül (prekürsör) veya postkürsör olan öncül aminoasitlerden oluşmaktadır. Yapılarındaki azot atomu, yapılarına daha sonraki aşamalarda yerleşir. Kapsaisin, efedrin, kafein ve teobromin en bilindik örnekleridir.

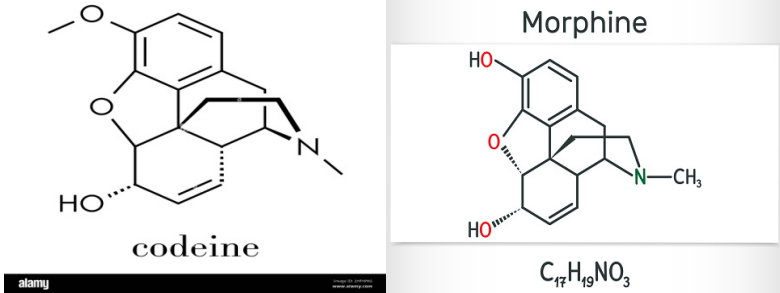


CAFFEINE



2.1.4. Alkol alkaloidleri

Morfin alt grubunun alkaloidleri olarak bilinirler, genellikle bitkisel kökenli olup, morfin, kodein, neopin, tebain ve oripavin gibi bilindik türleri vardır. Bitki sınıfındaki Papaver türlerinde bulunurlar.



1.2. Mantar Alkaloidler ve Aktiviteleri

Mantarlardan değişik birçok alkaloid elde edilmektedir. Sahip oldukları bileşikler, mineraller haricinde alkaloidler de farklı biyolojik aktivitelere sahiptirler.

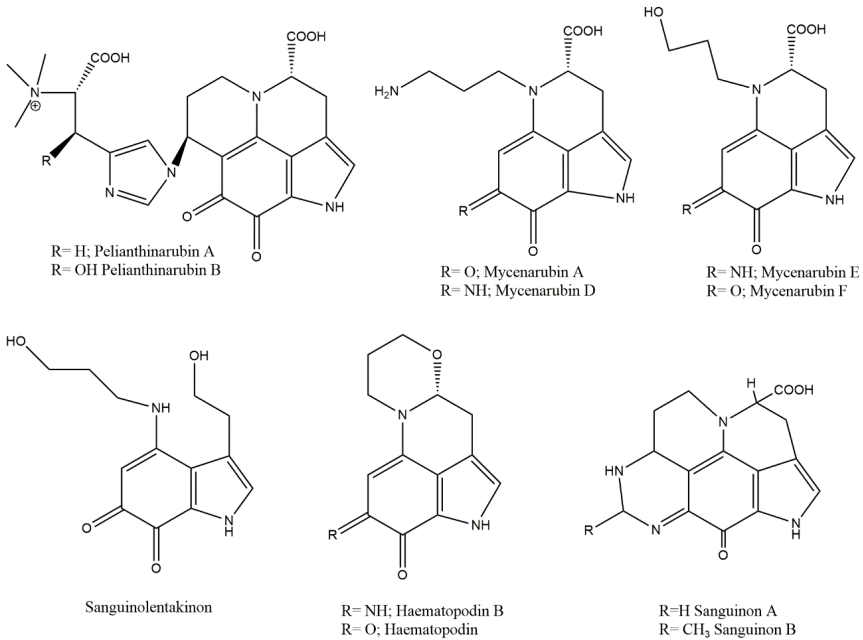
1.2.1. Pirolokinolin alkaloidler ve aktiviteleri

Pirolokinolin, deniz canlılarda yaygın bulunurken karasal canlılarda çok görülmemektedir. Çalışmaların farklı gelişmesiyle mantarlarda da bu iskelete sahip bileşiklerin bulunduğu tespit edilmiştir. Basidiomycota

sınıfına dahil olan *Mycena* cinsinin bazı türlerinde bu bileşiğe rastlanılmıştır. Bu türler; *Mycena rosea* (Bull.), *M. sanguinolenta* (Alb. & Schw.: Fr.) Kummer, *M. haematopus* (Pers.: Fr.) P. Kumm., *M. pelianthia* (Fr.) Quel. (Antunes ve ark., 2005; Peters ve Spiteller, 2007a; b; Peters ve ark., 2008; Pulte ve ark., 2016).

Bu alkoloidlerin yapısal renkleri bulunmakla birlikte, *Mycena* türlerinin yapısal renklerinin oluşmasında kullanılır. Bu mantar cinsinden elde edilen bileşik, deniz kaynaklarından elde edilen bileşiklerden farklı olarak, C-4'de bir karboksil grubuna sahiptir ve bu grup L-triptofan, S-adenosilmetionin ve histidinden meydana gelen biyosentez olaylarının güçlü bir şekilde meydana gelmesini sağlamaktadır (Peters ve Spiteller, 2007a; Peters ve ark., 2008).

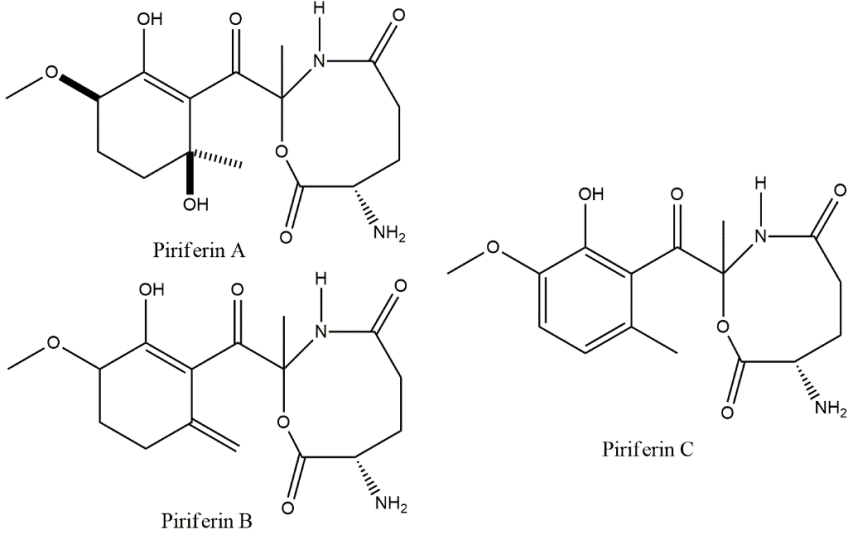
M. rosea'dan elde edilen mycenarubin B, doğadan ilk defa elde edilen dimerik yapıda piroloizokinolin alkoloidi olması nedeniyle önemlidir (Peters ve Spitellers, 2007a). *M. haematopus* türünden elde edilen mycenarubin D,E,F ve haematopodin B bileşikler kırmızı renkli, *M. sanguinolenta* türünden elde edilen sanguinon A ve B mavi renklidir (Peters ve Spiteller, 2007b; Peters ve ark., 2008; Pulte ve ark., 2016). Bu türle ilgili yapılan çalışmalardan pelianthinarubin A ve B ile mycenarubin A adlı yeni alkoloidler elde edilip, *Escherichia coli*, *Bacillus brevis*, *Bacillus subtilis*, *Cladosporium cucumerinum* ve bir herbisit olan *Lepidium sativum*'a karşı etki gösterdikleri belirlenmiştir (Fendoğlu ve ark., 2018; Peters ve Spiteller, 2007a; Pulte ve ark., 2016).



Resim 2: *Mycena* sp. Türlerinden elde edilen alkoloidler

1.2.2. Priferin A-C ve aktiviteleri

Tricholomataceae familyasından *Pseudobaespora* türleri çok yaygın olmamakla birlikte nemli bölgelerde yaşayan bir tür olup, KOH kimyasıyla tepkimesinde yeşilimsi mavi renk vermesini sağlayan önemli alkaloidler içerir. Piriferin A, B ve C alkaloidi *P. pyrifer* türünden izole edilmekte olup düşük düzeylerde asetilkolinesteraz inhibisyonu yapabildikleri tespit edilmiştir (Quang ve ark., 2008).

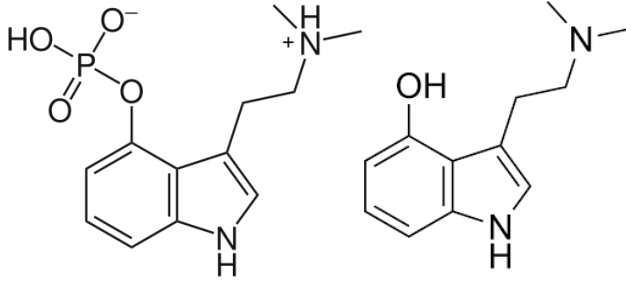


Resim 3: *Pseudobaespora* türlerindeki Piriferin alkaloidleri

1.2.3. Psilosibin ve Psilosin ve aktiviteleri

Psilosibin ve psilosinler mantarlardan en çok bilinen ve çalışılmış alkaloidler arasında yer almaktadır. Bu alkaloidler halüsinojenik mantar olarak bilinen belirli cinsler tarafından sentezlenirler. *Psilocybe*, *Gymnophyllus*, *Inocybe*, *Panaeolus*, *Conocybe*, *Pluteus* gibi cinsler bu alkaloidleri yoğun miktarda üretebilen cinsler arasında olup, *Psilocybe* cinsi türlerinde mantarın kuru ağırlığı bakımından en yoğun etken maddeye sahip olduğu belirtilmiştir (Tyls ve ark., 2014). Psilosibin ilk olarak 1958’de *Psilocybe mexicana* türünden elde edilmiş ve 1959’da da Albert Hoffman tarafından sentezlenmiştir. Halüsinojenik mantarların kullanımı yüzyıllara dayanmaktadır ve Meksika yerli halkı tarafından iyileştirici olarak kullanıldığına dair bilgiler bulunmuştur (Carod-Artal, 2015; Hoffman, 2005). Psilosibin sentezlenmesiyle 1960 yıllarında psikoterapide yatıştırıcı olarak kullanılmaya başlanmış ve 1970 yıllarında ilaç haline getirilme çalışmaları yapılmıştır (Nichols, 2004). Çağın değişen ihtiyaçlarından

ötürü bu alkoloide bakış açısı değişmiş yeniden popülerliği artmıştır, 1990 yıllardan itibaren psilosibin ve halüsinojenik alkaloidlerle ilgi deneysel çalışmalarda artış göstermiştir. Günümüzde, psilosibin geliştirilmiş hali daha güvenilir, orta seviyede etki seviyeli ve oral uygulamalarda iyi absorpsiyon özelliklerinden dolayı çalışma odağı halindedir (Hellwig ve ark., 1999; Jones ve ark., 2006).



Resim 4: Psilosibin ve Psilosin alkaloidleri

Yapılan çalışmalarda psilosibin yapısının, intestinal mukozada alkalik fosfataz ve nonspesifik esteraz enzimleriyle defosforillenmiş psilosin haine gelebildiği tespit edilmiştir. Psilosibin, triptamin ya da indolamin karakterine benzer yapıda nörotransmitter serotonine benzer özellikler gösterdiği bulunmuştur. Bu şekilde serotonin reseptörleriyle karşılaştığı durumda kolaylıkla çözünüp halüsinojenik etki gösterdiği düşünülmüştür (Nichols, 2004). Psilosibin güçlü bir madde durumunda olup, güçlü terapötik etkiye sahiptir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda çeşitli psiyatrik ve nörolojik hastalıklar için düşük doz ve analiz takipleriyle hastalıklara karşı iyileştirici etkilerinden yararlanılmaktadır. Diğer bir literatür çalışmasında ise psilosibin ile yapılan klinik çalışmada, kanserle ilgili depresyon ve alkolizm durumlarında da bu maddeden yararlanabildiği tespit edilmiştir (Fendoğlu ve ark., 2018; Grob ve ark., 2011; Griffiths ve ark., 2016; Ross ve ark., 2016; Bogenschutz ve ark., 2016; Bogenschuts ve Ross, 2017).

1.2.4. Erinaserin ve aktiviteleri

Hericium erinaceus (Bull.: Fr.) Pers tür eksterinden elde edilen bileşenlerin hipoglisemik, antikanser, antienflamatuvar ve antidepresan gibi biyolojik etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu tür günümüz dünyasında bilinen yenilebilir mantar türlerindendir (Wang ve ark., 2015). Ayrıca türle yapılan çalışmalarda elde edilen terpenik bileşiklerin, nöral koruyucu, antidepresan, antienflamatuvar etkide, polisakkaritlerinin ise antikanser ve immunstimülan etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Khan ve ark., 2013). *H. erinaceus* türünde Erinaserin 1-8 olarak adlandırılan yeni alkaloidler bulunmuş, bu alkaloidler sınıflandırılmalarıyla

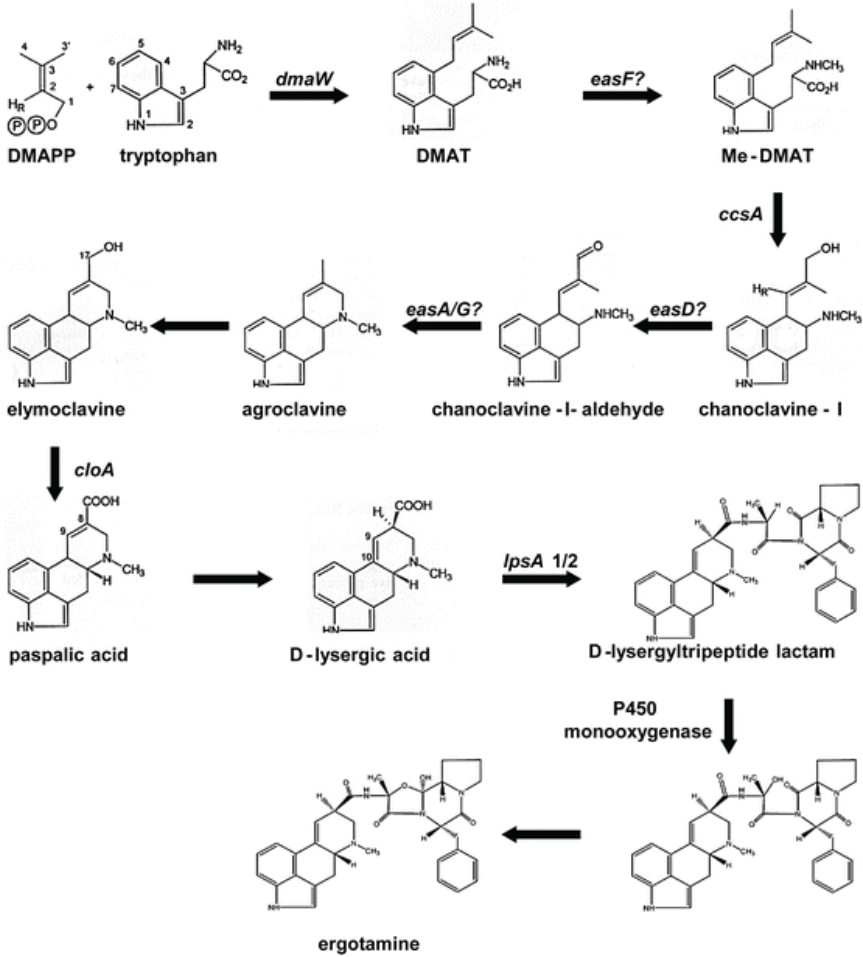
birlikte insan kronik miyoloid lösemi hastalığına karşı farklı etkinlikte inhibe edici ve önleyici etkiler gösterdikleri bulunmuştur (Wang ve ark., 2015).

1.2.5. Ekinulin ve aktiviteleri

Ekulin etken maddesi Güney Amerika'da yetişen *Lentinus strigellus* Berk türünün farklı kültürlerinden elde edilmektedir (Barros- Fihlo, 2012). Bu madde diketopiperazin yapısında triptofan türevi bir alkaloid olup, *Mycobacterium tuberculosis* türüne karşı etkili ve HeLa hücreleri üzerinde de sitotoksik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Kanokmedhakul ve ark., 2002; Slack ve ark., 2019).

1.2.6. Ergot alkaloidi ve aktiviteleri

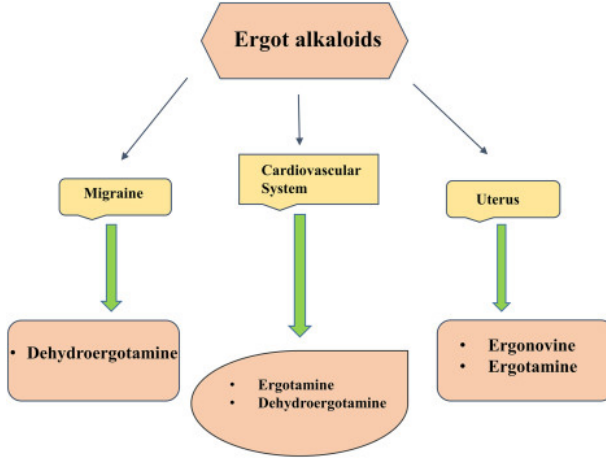
Ergot, çavdarmahmuzu olarak tanınan, tahıllarda hastalık oluşturan bitki paraziti bir mikromantar olarak yetişmektedir. Ergot, insanlar arasında ölümle sonuçlanabilecek ergotizm hastalığına sebep oluşturmaktadır. Antik çağlardan beri farklı kültürler tarafından tanımlanması yapılmış, birçok farklı amaçlarla kullanılmışlardır. Çin halkı tıbbi amaçlarla kullanıldığını ifade ederken, Romalılar hastalıklı tahıl olarak anılmış, zaman içerisinde Fransa ve Almanya başta olmak üzere Hollanda, İrlanda, İtalya, İngiltere, Rusya ve Amerika gibi birçok farklı ülkede ergotlu tahılların tüketiminden dolayı insanlar ergotizm hastalığına yakalanıp büyük çaplı ölümler bildirilmiştir. Zamanla çalışmalar doğrultusunda 1920 yılında ilk olarak Stoll ergotamin yapısını analiz etmiş, 1954'te ise Kornfeld total sentezini yaparak antik zamanların tıbbi kaynaklarına dayanarak kullanılabilme olasılığını artırmıştır (Marasos ve Nelson, 1987; Özkaya, 2000; Pohland ve Wood, 1987; Von Rosenburg ve Altenkirk, 1974).



Resim 6: Ergot alkaloid sınıfları ve türevleri

Ergot antik çağlardan beri farklı hastalıklar üzerinde genellikle ise doğumlarda kanamayı durdurucu olarak kullanılıp, damar daraltıcı etkisinin bulunduğu düşünülmektedir. Ergot alkaloidlerinin etki mekanizmaları, bileşiklerin sahip oldukları noradrenerjik, dopaminerjik ve serotoninerjik reseptörler üzerindeki kısmi agonist ve antoagonist etkilerinden olduğu bildirilmektedir. Bu madde ayrıca epinefrin etkisini inhibe edici özelliğinin de bulunduğu bildirilmektedir. Yapılan çalışmalarla ergot alkaloidlerinin düz kasları uyarma ve aktiveleştirme etkisinin bulunduğu bilinmesine rağmen tam olarak çalışma mekanizması açıklanamamıştır. Ayrıca intracranial arterleri daraltarak migren hastalığı için yapılan çalışmalrda etkili olabildiği tespit edilmiştir. Fakat periferik, mezenterik ve koroner arterlerdeki kan debilerinin azalacağından lokal iskemi görülebilme riskinin de bulunabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu al-

koloidlerin, nörohormonal ve santral etkilerinin de bulunabileceği tespit edilmiştir (Özkaya, 2000; Von Rensburg ve Altenkirk, 1974).



Resim 7: Ergot alkaloidlerinin biyolojik işlevleri

Resim 8: Ergot alkaloidleri sınıflandırılması

3. SONUÇ

Bu çalışma, alkaloidlerin kimyasal yapıları, sınıflandırılmaları, biyolojik aktiviteleri ve farmakolojik etkileri üzerine kapsamlı bir inceleme sunmaktadır. Alkaloidler, doğada özellikle bitkilerde, mantarlarda ve bazı mikroorganizmalarda bulunan, azot içeren heterosiklik bileşiklerdir. Bu bileşikler, amino asitlerden türeyen gerçek alkaloidler, protoalkaloidler ve yalancı alkaloidler olarak sınıflandırılmaktadır. Her bir grup, kendine özgü kimyasal yapıları ve biyolojik etkileri ile karakterize edilmiştir.

Mantarlardan elde edilen alkaloidler, özellikle psilosibin, ergot alkaloidleri ve pirolokinolin alkaloidleri gibi bileşikler, güçlü farmakolojik ve terapötik potansiyelleri ile dikkat çekmektedir. Psilosibin, halüsinojenik etkileriyle bilinmekle birlikte, son yıllarda psikiyatrik ve nörolojik hastalıkların tedavisinde umut vaat eden bir bileşik olarak yeniden değerlendirilmektedir. Ergot alkaloidleri ise tarihsel olarak tıbbi kullanımlarıyla bilinmekte ve günümüzde migren tedavisinde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu bileşiklerin potansiyel toksik etkileri de göz ardı edilmemelidir.

Çalışmada ayrıca, mantar kaynaklı alkaloidlerin antimikrobiyal, anti-kanser, antiinflamatuvar ve nöroprotektif etkileri gibi çeşitli biyolojik aktiviteleri de incelenmiştir. Özellikle Mycena ve Pseudobaeospora türlerin-

den elde edilen alkaloidler, yapısal çeşitlilikleri ve biyolojik aktiviteleri ile dikkat çekmektedir. Bu bileşikler, gelecekte yeni ilaç keşifleri için önemli bir kaynak olabilir.

Sonuç olarak, alkaloidler, doğal ürünlerin farmakolojik potansiyelini anlamak ve yeni terapötik ajanlar geliştirmek açısından büyük bir öneme sahiptir. Ancak, bu bileşiklerin kimyasal yapılarının karmaşıklığı, biyolojik etkilerinin çeşitliliği ve potansiyel toksisiteleri, daha fazla araştırma ve klinik çalışma gerektirmektedir. Bu çalışma, alkaloidlerin biyolojik ve farmakolojik özelliklerine dair mevcut bilgileri derleyerek, bu alanda gelecekte yapılacak araştırmalara ışık tutmaktadır.

4. KAYNAKLAR

- Antunes, E. M., Copp, B.R., Davies-Coleman, M.T., Samaai, T., (2005) Pyrroloiminoquinone and related metabolites from marine sponges, *Nat. Prod. Rep.*, 22(1): 62-72.
- Barros-Fihlo, B.A., de Oliveira, M.C., Mafezoli, J.; Barbosa, F.G., Rodrigues-Filho, E., (2012) Secondary metabolite production by the basidiomycete, *Lentinus strigellus*, under different culture conditions, *Nat. Prod. Commun.*, 7(6): 771-773.
- Bogenschutz, M.P., Forcehimes, A.A., Pommy, J.A., Wilcox, C.E., Barbosa, P.C., Strassman, R.J., (2015) Psilocybin-assisted treatment for alcohol dependence: a proof-of-concept study, *J Psychopharmacol*, 29(3): 289-299.
- Bogenschutz M.P., Ross S., (2017) Therapeutic Applications of Classic Hallucinogens, *Curr Top Behav Neurosci*, doi: 10.1007/7854_2016_464.
- Carod-Artal, F.J., (2015) Hallucinogenic drugs in pre-Columbian Mesoamerican cultures, *Neurologia*, 30(1): 42-9.
- Dewick, P.M., (2002) *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, John Wiley & Sons Ltd., West Sussex.
- Fendoğlu, B., Kuruüzüm-Uz, A., Şöhretoğlu, D. (2018) Mantarlardan Elde Edilen Alkoloitler, *The Journal of Fungus*, 9(2): 117-125.
- Griffiths, R.R., Johnson, M.W., Carducci, M.A., Umbricht, A., Richards, W.A., Richards, B.D., Cosimano, M.P., Klinedinst, M.A., (2016) Psilocybin produces substantial and sustained decreases in depression and anxiety in patients with life-threatening cancer: A randomized double-blind trial, *J. Psychopharmacol*, 30(12): 1181-1197.
- Grob, C.S., Danforth, A.L., Chopra, G.S., Hagerty, M., McKay, C.R., Halberstadt, A.L., Greer, G.R., (2011) Pilot study of psilocybin treatment for anxiety in patients with advanced-stage cancer, *Arch Gen Psychiatry*, 68(1): 71-78.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E., (2012) *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*, Second Ed., Elsevier, Livingstone.
- Hellwig, V., Dasenbrock, J., Klostermeyer, D., Kroiß, S., Sindlinger, T., Spiteller, P., Steffan, B., Steglich, W., Engler-Loehr, M., Semar, S., Anke, T., (1999) New benzodioxepin type strobilurins from basidiomycetes. Structural revision and determination of the absolute configuration of strobilurin D and related β -methoxyacrylate antibiotics, *Tetrahedron*, 55(33): 10101-10118.
- Hofmann, A., (2005) *Multidisciplinary Association for Psychedelic Studies (MAPS). LSD: My Problem Child*. The Beckley Foundation Press, Oxford.
- Homer, J.A. ve Sperry, J., (2017) Mushroom-Derived Indole Alkaloids, *Journal of Natural Products*, 80(7): 2178-2187.
- Khan, M.A., Tania, M., Liu, R., Rahman, M.M., (2013) *Herichium erinaceus*: an edible mushroom with medicinal values, *J. Complement. Integr. Med.*, 10(1). doi: 10.1515/jcim-2013-0001.

- Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., Phonkerd, N., Soytong, K., Kongsaree, P., Suksamrarn, A., (2002) Antimycobacterial anthraquinone-chromanone compound and diketopiperazine alkaloid from the fungus *Chaetomium globosum* KMITL-N0802, *Planta Med.*, 68(9): 834-836.
- Marasas, W.F.O., Nelson, P.E. (1987) *Ergotism*, 22-24, In: Mycotoxicology Introduction to the Mycology, Plant Pathology, Chemistry, Toxicology and Pathology of Naturally Occuring Mycotoxicoses in Animals and Man, WFO Marasas and Nelson, The Pennsylvania State University Press, University Park, P.A.
- Nichols, D.E., (2004) Hallucinogens, *Pharmacol. Ther.*, 101(2):131-181.
- Özkaya, B., (2000) Ergot (*Claviceps purpurea* (Fr.) Tul.): Toksik Metabolitleri, Gelişme Koşulları, Kontrolü ve Prosesin Ergot alkaloidleri üzerine etkisi, *Gıda*, 25(3): 219-225.
- Öztürk, M., Tel-Cayan, G., Muhammad, A., Terzioğlu, P., Duru, M.E., (2015) Mushrooms: A Source Of Exciting Bioactive Compounds, *Studies in Natural Products Chemistry*, 45(10): 363-457.
- Peters, S., Spiteller, P., (2007a) Mycenarubins A and B, red pyrroloquinoline alkaloids from the mushroom *Mycena rosea*., *J. Nat. Prod.*, 2007(10): 1571-1576.
- Peters, S., Spiteller, P., (2007b) Sanguinones A and B, blue pyrroloquinoline alkaloids from the fruiting bodies of the mushroom *Mycena sanguinolenta*, *J. Nat. Prod.*, 70(8): 1274-7.
- Peters, S., Jaeger, R.J.R., Spiteller P., (2008) Red pyrroloquinoline alkaloids from the mushroom *Mycena haematopus*, *Eur. J.Org.Chem.*, 2007(2): 319-23.
- Pulte, A., Wagner, S., Kogler, H., Spiteller, P., (2016) Pelianthinarubins A and B, Red Pyrroloquinoline Alkaloids from the Fruiting Bodies of the Mushroom *Mycena pelianthina*, *Journal of Natural Products*, 79(4): 873-8.
- Pohland, A.E., Wood, G.E. (1987) *Occurrence of Mycotoxins in Food*, P: 57-64 In: Mycotoxins in Food, Academic Press, Harcourt Bruce Jovanic Publishers, London.
- Quang, D.N., Spiteller, P., Porzel, A., Schmidt, J., Geissler, T., Arnold, N., Wessjohann, L., (2008) Alkaloids from the mushroom *Pseudobaeospora pyrifera*, pyriferrines A-C, *Journal of Natural Products*, 71(9): 1620-2.
- Ross, S., Bossis, A., Guss, J., Agin-Liebes, G., Malone, T., Cohen, B., Mennenga, S.E., Belser, A., Kalliontzi, K., Babb, J., Su, Z., Corby, P., Schmidt, B.L., (2016) Rapid and sustained symptom reduction following psilocybin treatment for anxiety and depression in patients with life-threatening cancer: a randomized controlled trial, *J Psychopharmacol.*, 30(12): 1165-1180.
- Slack, G.J., Puniani, E., Frisvad, J.C., Samson, R.A., Miller, J.D., (2009) Secondary metabolites from *Eurotium* species, *Aspergillus calidoustus* and *A. insuetus* common in Canadian homes with a review of their chemistry and biological activities, *Mycol. Res.*, 113(4): 480-490.
- Sullivan, R., Smith, J.E., Rowan, N.J., (2006) Medicinal Mushrooms and Cancer

Therapy translating a traditional practice into Western medicine, *Perspect. Biol. Med.*, 49(2): 159-170.

Şöhretoğlu, D., Huang, S., (2018) Ganoderma lucidum Polysaccharides as An Anti-cancer Agent., *Anticancer Agents Med Chem.*, 18(5): 667-674.

Tylš, F., Páleníček, T., Horáček, J., (2014) Psilocybin-summary of knowledge and new perspectives, *Eur. Neuropsychopharmacol*, 24(3): 342-56.

Van Rensburg, S.J., Altenkirk, B., (1954) *Claviceps purpurea-Ergotism*, P:69-96, In: *Mycotoxins* Ed. By: I.F.H. Purchase Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.

Wang, K., Bao, L., Ma, Ke., Liu, N., Huang, Y., Ren, J., Wang, W., Liu H., (2015) Eight new alkaloids with PTP1B and α -glucosidase inhibitory activities from the medicinal mushroom *Herichium erinaceus*, *Tetrahedron*, 71(51): 9557-9563.

Wasser, P. S., (2011) Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms, *Appl Microbiol Biotechnol*, 89(5): 1323-1332.

Wachtel-Galor, S., Yuen, J., Buswell, J.A., Benzie, I.F.F., (2011) *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*, CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton.

Bölüm 4

MİTOKONDRIYAL DNA (mtDNA) ve NÜKLEER DNA (nDNA) MUTASYONLARI: HÜCRESEL VE KLİNİK ETKİLERİ

Seda BEYAZ¹

1. GİRİŞ

Mitokondriler, memeli hücrelerinde enerji metabolizmasının merkezi organelleri olarak işlev görmekte olup, çift zarlı yapıları aracılığıyla oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) mekanizmasıyla hücresel adenosin trifosfatın (ATP) yaklaşık %90'ı üretilmekte ve mitokondriyal membran potansiyeli korunmaktadır. Bu metabolik ve enerji üretim süreçleri, çoğunluğu nükleer genom tarafından kodlanan ve mitokondriye taşınan binlerce proteinin koordineli etkileşimi ile yürütülmektedir. Mitokondriler ayrıca trikarboksilik asit döngüsü (TCA), yağ asitlerinin β -oksidasyonu, kalsiyum homeostazisini, hücresel sinyal transdüksiyonu yollarının düzenlenmesinde merkezi bir rol üstlenmekte ve içsel apoptoz ile hücre döngüsünün kontrolüne doğrudan katkıda bulunmaktadır (Yan vd., 2019). Mitokondriler, bitkiler hariç, ökaryotik hücrelerde kendi genomuna sahip tek organel olarak tanımlanmaktadır. Mitokondriler, nükleer DNA'dan bağımsız olarak kendi genomlarını (mitokondriyal DNA, mtDNA) taşımakta olup, mtDNA oksidatif fosforilasyonda görev alan 13 peptidi kodlamakta ve hücresel enerji üretiminde temel bir işlev sağlamaktadır. Mitokondriyal DNA (mtDNA), nükleer DNA (nDNA)'dan yapısal olarak belirgin biçimde farklılık göstermekte ve çoğu hayvanda çift sarmallı, kapalı dairesel bir konfigürasyon sergilemektedir. Bu özelliği, bakteriyel kromozomlarla belirli bir paralellik göstermektedir. mtDNA, ağır (H) ve hafif (L) zincir olmak üzere iki ayrı zincir içermektedir. İnsan mtDNA'sı yaklaşık 16.569 baz çiftinden oluşmakta olup, 13 polipeptit, iki ribozomal RNA (rRNA) ve 22 transfer RNA (tRNA) içeren toplam 37 gen kodlamaktadır. ND6 polipeptidi ve sekiz tRNA L zincirinde kodlanmakta iken, geri kalan 12 polipeptit, iki rRNA ve 14 tRNA H zinciri tarafından belirlenmektedir. Ayrıca, mtDNA, replikasyon ve transkripsiyonun büyük kısmını düzenleyen kodlamayan bir bölge olan D-döngüsünü de içermektedir. Sentezlenen 13 polipeptit, oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) sistemine ait I, III, IV ve V komplekslerinin alt birimlerini oluşturarak mitokondriyal enerji üretiminde kritik bir rol üstlenmektedir. Mitokondriyal rRNA ve tRNA'lar ise bu polipeptitlerin biyosentezinde temel bileşenler olarak işlev görmektedir (Yang vd., 2019). İnsan mitokondriyal DNA'sı, nükleer genom ile karşılaştırıldığında çok kopyalı, yüksek derecede kompakt ve intronsuz bir yapıya sahiptir. Mitokondriyal transkripsiyon faktörü A (TFAM), mtDNA ile etkileşime girerek nükleoid komplekslerinin oluşumunu yönlendirmekte ve bu etkileşim, DNA'nın yapısal stabilitesini etkilerken replikasyon, transkripsiyon ve degradasyon mekanizmalarının koordinasyonuna katkıda bulunmaktadır. Ayrıca, mtDNA metillenmemiş veya düşük metillenmiş CpG adacıkları açısından belirgin bir zenginlik göstermektedir (Giordano vd., 2025). mtDNA, matriks içerisinde bir veya birden fazla kopya halinde bulunmakta ve bakteriyel kromozomlara

benzer bir organizasyon göstermektedir. Prohibitinler, TFAM, ATAD3 ve POLG gibi proteinler tarafından paketlenerek nükleoid adı verilen mtDNA-protein komplekslerini oluşturmaktadır. Bu komplekslerde yer alan mitokondriyal transkripsiyon faktörü TFAM, hem mtDNA transkripsiyonunun düzenlenmesinde hem de nükleoidlerin dağılım ve organizasyonunda merkezi bir rol üstlenmektedir. mtDNA'nın mitokondri ağı boyunca etkin dağılımının bozulması, çeşitli patolojik durumlarla ilişkilendirilmektedir. Histon proteinlerinden yoksun olan mtDNA, sınırlı onarım kapasitesi nedeniyle oksidatif stres ve diğer hücresel hasarlara karşı yüksek duyarlılık göstermekte ve bu hasarlar mtDNA mutasyonlarına yol açabilmektedir. Hasarlı mitokondriler mitofaji mekanizmaları aracılığıyla elimine edilmekte olup, süreç büyük ölçüde PINK1-Parkin sinyal yoluyla yürütülmektedir. Ayrıca mtDNA maternal kalıtımla nesilden nesile aktarılmakta, paternal mtDNA ise döllenme sırasında ortadan kaldırılmaktadır. Bu süreçte mitofaji ve endonükleaz G kritik rol oynamaktadır. Güncel araştırmalar, mtDNA'daki düşük düzeyde hasar birikimi ve mtDNA kopya sayısındaki azalmaların yalnızca yaşlanma ile değil, aynı zamanda nörodejeneratif hastalıklar, diyabet ve diğer yaşa bağlı patolojilerle de ilişkili olduğunu göstermektedir. Onarılabılır oksidatif lezyonlar, yaşa bağlı hastalık yükünü hafifletmeye yönelik potansiyel terapötik hedefler arasında yer almaktadır. Bu nedenle, mtDNA'nın hücre içi dağılımı, selektif eliminasyonu ve onarım mekanizmalarının detaylı incelenmesi, mitokondriyal disfonksiyonun patofizyolojideki rolünün anlaşılması açısından kritik öneme sahiptir (Yan vd., 2019; Sharma ve Sampath, 2019).

2. MİTOKONDRİYAL DNA (mtDNA) MUTASYONLARI

Mitokondriler, anne hattı boyunca kalıtılan kendilerine özgü bir DNA molekülüne sahiptir. Mitokondriyal genom yaklaşık 16,5 kilobaz uzunluğunda, dairesel yapıda ve negatif süper sarmallı çift zincirli DNA moleküllerinden oluşmaktadır. Bu genom toplamda 37 gen içermektedir: 12S ve 16S rRNA'lar, 22 tRNA ve 13 protein kodlayan genler. Bu 13 protein, oksidatif fosforilasyon sisteminin temel yapısal bileşenlerini oluşturmaktadır. Bunlar Kompleks I'in 7, Kompleks IV'ün 3, Kompleks V'in 2 ve Kompleks III'ün 1 alt birimini kapsamaktadır. Buna karşılık, nükleer DNA yaklaşık 1500 mitokondriyal proteini kodlamaktadır. Bu proteinler arasında Kompleks II'nin dört alt birimi, mitokondriyal DNA polimeraz γ , mitokondriyal RNA polimeraz bileşenleri, mitokondriyal transkripsiyon faktörü, ribozomal proteinler, uzama faktörleri ve çeşitli metabolik enzimler bulunmaktadır. Böylece, mitokondriyal fonksiyonların sürdürülebilmesi için nükleer ve mitokondriyal genomlar arasında sıkı bir koordinasyon ve karşılıklı etkileşim sağlanmaktadır (Wallace vd., 2005; Druzhyna vd., 2008; Zapico ve Ubelaker, 2013). Mitokondrilerin,

hem temel biyolojik araştırmalar hem de klinik uygulamalar açısından önemli terapötik hedefler olduğunu son yıllarda yapılan çalışmalar neticesinde ortaya koyulmuştur. Bakteriyel kökenli endosimbiontlar olarak kabul edilen mitokondriler, kendi genomuna (mtDNA) sahip olup enerji üretimi, lipid metabolizması, kalsiyum homeostazi ve apoptozun düzenlenmesi gibi hayati hücresel süreçlerde merkezi rol oynamaktadır. Mitokondriyal disfonksiyon, birincil (kalıtsal) veya ikincil (edinsel) nedenlerle ortaya çıkabilmektedir. Kalıtsal mitokondriyal bozukluklar; MELAS, CPEO ve Leigh sendromu gibi hastalıkların temelinde yer alırken, ikincil mitokondriyal işlev bozukluğu kalp yetmezliği, nörodejeneratif hastalıklar ve metabolik sendrom gibi yaygın klinik tablolarla ilişkilidir. Bu disfonksiyon genellikle oksidatif stresin artışı, ATP retiminde azalma, kalsiyum dengesinin bozulması ve proteostatik mekanizmaların aksaması gibi biyokimyasal değişimlerle karakterizedir (Tablo 1). Mitokondriyi hedef alan tedavi yaklaşımları giderek çeşitlenmekte ve terapötik potansiyeli yüksek bir araştırma alanı oluşturmaktadır. Egzersiz protokolleriyle PGC-1 α ekspresyonunun artırılması, NAD biyosentezinin desteklenmesi (rneğin nikotinamid ribozid takviyesiyle) ve mitokondriye özgü antioksidanların (MitoQ, Koenzim Q10, N-asetil sistein) kullanımı bu stratejiler arasında yer almaktadır. Ayrıca, gen düzenleme teknikleri ve mitokondri nakli gibi yenilikçi yaklaşımlar da kalıtsal mitokondriyal defektlerin tedavisinde umut vaat etmektedir. Son dönemde yapılan araştırmalar, mitokondrilerin hücreler arasında yatay transfer yoluyla işlevsel bileşenlerini aktarabildiğini ortaya koymuştur. Bu mekanizma, hasar görmüş hücrelerde metabolik işlevin yeniden kazanılmasına katkı sağlayarak mitokondri transplantasyonunun terapötik değerini desteklemektedir. Genel olarak, mitokondriyal biyolojiye ilişkin güncel ilerlemeler, enerji metabolizması ve hücresel sinyal yollarının daha iyi anlaşılmasına olanak sağlamış olup bu durum ise hastalıkların patofizyolojisinin açıklığa kavuşmasına ve yeni tedavi hedeflerinin tanımlanmasına katkı sağlamıştır. Bu kapsamda, mitokondriyal işlev bozukluğunu hedefleyen farmakolojik, genetik ve hücresel tedavi stratejileri, çeşitli hastalıkların klinik yönetiminde geleceğin umut verici yaklaşımları arasında yer almaktadır (Murphy ve Hartley, 2018; Mailloux vd., 2023; Zong vd., 2024).

2.1. Yeniden Düzenleme Mutasyonları

Mitokondriyal DNA'daki (mtDNA) yeniden düzenleme mutasyonları, kalıtsal veya spontane olarak ortaya çıkmaktadır. Kalıtsal yeniden düzenleme mutasyonları genellikle diyabet ve işitme kaybı gibi genetik sendromlarla ilişkilidir. Spontan yeniden düzenlemeler ise çoğunlukla büyük delesyonlar şeklinde görülmekte ve heteroplazmik bir yapı sergilemektedir. Bu delesyonlar sıklıkla bir tRNA geninin kaybına neden olmaktadır. Böylece 13 mitokondriyal proteinin tamamının translasyonu

aksamaktadır. Sonuç olarak, mitokondriyal protein sentezi bozulmakta ve enerji metabolizması ciddi şekilde etkilenmektedir. Bu tür mutasyonlar, ilerleyici dış oftalmopleji (PEO), Kearns-Sayre sendromu (KSS) ve Pearson sendromu (PS) gibi klinik tabloların ortaya çıkmasında rol oynamaktadır. Özellikle, bu hastalıkların yaklaşık üçte birinde 4977 baz çifti uzunluğunda tipik bir delesyonun bulunduğu bildirilmiştir (Zapico ve Ubelaker, 2013).

2.2. tRNA ve rRNA Genlerini Etkileyen Nokta Mutasyonları

Mitokondriyal hastalıklar, hücrelerin enerji üretiminden sorumlu mitokondrilerdeki bozukluklardan kaynaklanan genetik bir grup hastalıktır. Bu bozukluklar, hem nDNA hem de mtDNA'daki mutasyonlarla ilişkilidir. Özellikle hücresel enerji üretiminde aksamalara yol açmaktadır. Hastalıklar, etkilenen organlara, yaşa ve bireyler arasındaki farklılıklara bağlı olarak çeşitli belirtiler göstermektedir. Bu grup içinde en bilinenlerinden biri MELAS sendromudur. Bu durum, inme benzeri ataklar, laktik asidoz ve nöbetlerle kendini göstermektedir. Ancak MELAS, yalnızca bu üç ana belirtiyi sınırlı kalmamaktadır. Hastalarda migren, kalp kası hastalıkları, iletim bozuklukları, depresyon ve diyabet gibi farklı organları etkileyen belirtiler de ortaya çıkmaktadır. Bu çok yönlü klinik tablo, mitokondriyal hastalıkların vücuttaki sistemleri ne kadar geniş kapsamda etkileyebildiğini göstermektedir (Barros vd., 2024). Mitokondriyal genler içerisinde tRNA genleri, patolojik mutasyonlara en sık maruz kalan bölgeler olarak öne çıkmaktadır. Bu mutasyonlar genellikle belirgin fenotipik sendromlarla ilişkilidir. Örneğin, tRNA genindeki A3243G geçiş mutasyonu, mitokondriyal ensefalopati, laktik asidoz ve felç benzeri ataklarla karakterize MELAS sendromunun başlıca nedeni olmaktadır. Benzer şekilde, tRNA geninde meydana gelen A8344G mutasyonu, miyoklonik epilepsi ve düzensiz kırmızı liflerle tanımlanan MERRF sendromu ile ilişkilendirilmektedir. Düzensiz kırmızı liflerin varlığı, iskelet kasında mitokondriyal fonksiyon bozukluğunu gösteren önemli histolojik bulgular arasında yer almaktadır (Zapico ve Ubelaker, 2013).

2.3. Protein Kodlayan Genlerde Nokta Mutasyonları

mtDNA'da yer alan protein kodlayıcı genlerdeki nokta mutasyonlar, çeşitli mitokondriyal hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. T8993G/C ve T9176G/C mutasyonları, ATP sentazın alt birimlerinden biri olan ATP6 geninde lösün kalıntısının arginin veya prolin ile yer değiştirmesine yol açmaktadır. Mutant mtDNA oranı %70'in üzerinde olduğunda, nörojenik kas güçsüzlüğü, ataksi ve retinitis pigmentosa ile karakterize NARP sendromu gelişmektedir. Ayrıca, ND4, ND1 ve ND6 genlerindeki G11778A, G3460A ve T14884C mutasyonları, kompleks I'in

alt birimlerinde yapısal bozulmalara neden olarak Leber kalıtsal optik nöropatisi (LHON) ve Leigh sendromu gibi hastalıkların oluşumuna neden olmaktadır (Zapico ve Ubelaker, 2013).

Tablo 1. Mitokondriyal DNA (mtDNA) Mutasyonlarına Dayalı Sınıflandırmalar ile Genetik Değişiklikler (Zapico ve Ubelaker, 2013)

TİP	ALT TÜR	MUTASYON	HASTALIK
Mitokondriyal DNA (mtDNA) Mutasyonları	Yeniden Düzenleme Mutasyonları	4977	İlerleyici Dış Oftalmopleji (PEO)
			Kearns-Sayre Sendromu (KSS)
			Pearson Sendromu (PS)
	Nokta Mutasyonları tRNA veya rRNA	A3243G	Mitokondriyal Ensefalopati, Laktik Asidoz ve Felç Benzeri Ataklar (MELAS)
		A8344G	Miyoklonus Epilepsisi ve Pürüzlü Kırmızı Lifler (MERRF)
	Nokta Mutasyon Proteinleri	T8993G	Nörojenik Kas Güçsüzlüğü, Ataksi ve Retinitis Pigmentosa (NARP)
		G11778A	Leber Kalıtsal Optik Nöropati (LHON)
		G3460A	Leigh Sendromu
		T14484C	Leigh Sendromu

3. NÜKLEER DNA (nDNA) MUTASYONLARI

Mitokondriyal hastalıklar, yapısal mitokondriyal proteinleri veya mitokondriyal fonksiyonda görev alan proteinleri kodlayan nükleer DNA (nDNA) ve mitokondriyal DNA (mtDNA) genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanan ve oksidatif fosforilasyondaki bozukluklarla karakterize edilen genetik hastalıklar grubudur. Bu hastalıklar, kalıtsal metabolik bozukluklar arasında en yaygın olanları ve kalıtsal nörolojik hastalıkların önde gelen formları arasında yer almaktadır. Mitokondriyal hastalıkların tanısında en önemli faktörlerden biri, hastalarda görülen belirgin klinik çeşitlilik ve fenotipik heterojenliktir (Tablo 2). Bu durum tanı sürecini geciktirmektedir. Bununla birlikte, son yıllarda mitokondriyal hastalıkların moleküler temelleri ve genetik etyolojileri konusunda-

ki bilgi birikiminde önemli ilerlemeler sağlanmıştır. Özellikle yeni nesil dizileme (NGS) teknolojileri, nDNA'daki mutasyonlardan kaynaklanan mitokondriyal hastalıkların tanısında çarpıcı gelişmeler getirmiş ve bazı durumlarda tanı oranlarını % 20'nin altından % 60'ın üzerine çıkan bir artışa yol açmıştır (Gorman vd., 2016).

Yaklaşık 1.500'den fazla nükleer gen, oksidatif fosforilasyon başta olmak üzere mitokondrinin enerji üretimi ve düzenleyici süreçlerinde görev yapan proteinlerin sentezinden sorumludur. Bu genlerdeki mutasyonların, otozomal dominant, otozomal resesif veya X'e bağlı kalıtım desensleriyle mitokondriyal hastalıklara yol açtığı belirlenmiştir. nDNA mutasyonları, mtDNA bakımını, çevirisini ve mitokondriyal homeostaziyi etkilemekte, mtDNA kopya sayısında azalma, çoklu delesyonlar veya mitokondriyal proteinlerin işlev bozukluklarına neden olmaktadır. Ayrıca bu mutasyonlar, apoptoz, mitokondriyal şaperonlar ve metabolizma gibi temel mitokondriyal süreçleri de bozmaktadır. Sonuç olarak, nDNA mutasyonları, mtDNA ile ilişkili mitokondriyal bozukluklarla benzer klinik sendromlara yol açmaktadır. Mitokondriyal işlev bozukluğuna neden olan spesifik nükleer genler, işlevlerine göre iki ana kategoriye ayrılmaktadır. Birinci grup, "modifiye edici genler" olarak adlandırılmakta olup, mitokondriyal gen mutasyonları ile birlikte ortaya çıktığında fenotipik belirtilerin şiddetini veya görünümünü değiştirmektedir. İkinci grup ise, "patojenik genler" olarak tanımlanmakta ve doğrudan mitokondriyal hastalıkların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Bu ilerlemeler, hastaların titiz klinik ve biyokimyasal karakterizasyonu ile mümkün olmuştur. Genetik tanı koymak, mitokondriyal hastalığı olan bireylere üreme seçenekleri sunma açısından kritik öneme sahiptir. Ancak yalnızca anneden kalıtılan patojenik mtDNA mutasyonları taşıyan kadınlar için bu süreç daha karmaşık hale gelmektedir. Son yıllarda geliştirilen *in vitro* fertilizasyon (IVF) yöntemleri ve özellikle mitokondri bağışığı gibi yenilikçi yaklaşımlar, mitokondriyal hastalıkların anneden çocuğa geçişinin önlenmesinde umut vadeden bir seçenek olarak öne çıkmaktadır (Luo vd., 2013; Gorman vd., 2016).

3. 1. Replikasyon Proteinlerindeki Kusurlar

Otozomal dominant progresif dış oftalmopleji (adPEO), göz kasları, iskelet kası, beyin ve kalp gibi yüksek enerji gerektiren dokularda çok sayıda büyük mtDNA delesyonu ile karakterize bir bozukluktur. Bu hastalık genellikle mtDNA replikasyonunda görev alan nükleer genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. POLG1 geninde meydana gelen değişiklikler, kromozom 15'e bağlı adPEO alt tipinin temel nedenidir. En sık mutasyon noktalarından biri 955. amino asit pozisyonudur. Kromozom 10 üzerinde yer alan Twinkle genindeki mutasyonlar da DNA helikaz

aktivitesinin bozulmasına yol açarak benzer bir klinik tablo oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra, ANT1 geninde 114. pozisyonda bulunan alanın kalıntısının prolinle yer değiştirmesi, kromozom 4'e bağlı adPEO formunun oluşmasına neden olmaktadır (Zapico ve Ubelaker, 2013).

3.2. Timidin Kinaz 2 (TK2) ve Deoksiguanozin Kinaz (dGK) Mutasyonları

Dengeli deoksinükleozid trifosfat (dNTP) havuzlarının dengesi, nükleer ve mitokondriyal genomların bütünlüğünün korunması açısından, DNA replikasyonu ve onarım süreçleri için temel bir gerekliliktir. Hücrelerde dNTP'ler iki yolla üretilmektedir: De novo sentez ve kurtarma yolları. De novo sentez sitozolde gerçekleşir ve başlıca düzenleyici enzimler ribonükleotid redüktaz (RNR) ile timidilat sentazdır (TS). Kurtarma yolu ise hem sitozolde (TK1 ve dCK) hem de mitokondride (TK2 ve dGK) çalışmaktadır. Mitokondriyal dNTP havuzları, mitokondrinin çift zarı nedeniyle sitozolik dNTP'lerden ayrılmaktadır. Postmitotik dokularda TK2 ve dGK enzimleri ile NMPK ve NDPK'ler dNTP üretimini sağlamaktadır. Çoğalan hücrelerde ise mitokondriyal dNTP'ler çoğunlukla sitozolden sağlanmaktadır. TK2 ve dGK genlerinde meydana gelen mutasyonlar, mitokondriyal DNA tükenme sendromu (MDS) ile ilişkilidir. Bu enzimler, dNTP sentezinde rol oynayarak mtDNA replikasyonu için gerekli nükleotid havuzunu sağlamaktadır. Genetik bozukluklar sonucu bu enzimlerin aktivitesinin azalması, özellikle karaciğer gibi metabolik açıdan aktif dokularda mtDNA miktarının ciddi biçimde düşmesine yol açmakta ve sonuç olarak dokuya özgü mtDNA tükenmesi ve enerji üretiminde yetersizlikler meydana gelmektedir. Dengesiz mitokondriyal dNTP seviyeleri, mtDNA tükenmesine veya delesyonlarına yol açmakta ve ciddi mitokondriyal hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. mtDNA tükenme sendromları, sadece TK2, dGK, p53R2 ve TP gibi dNTP sentez enzimlerindeki veya mtDNA polimeraz ve twinkle helikaz gibi replikasyon enzimlerindeki eksikliklerden değil, aynı zamanda SUCLA2, SUCLG1, ABAT ve MPV17 gibi metabolik yollardaki enzim eksikliklerinden de kaynaklanmaktadır. Bu durum, dNTP sentezinin hücre ve organizma düzeyinde ne kadar kritik olduğunu göstermektedir (Zapico ve Ubelaker, 2013; Wang, 2016).

3.3. Timidin Fosforilaz (TP) Mutasyonları

Timidin fosforilaz (TP) genindeki mutasyonlar, mitokondriyal nörogastrointestinal ensefalomiyopati (MNGIE) ile güçlü bir biçimde ilişkilendirilmiştir. Bu hastalarda kas dokusunda mitokondriyal DNA (mtDNA) tükenmesi veya çoklu delesyonların saptanması sık görülen bir

bulgudur. TP enzimi doğrudan mitokondride lokalize olmamakla birlikte, timidinin fosforiboz ve timine dönüşümünü katalize eden temel enzimlerden biridir. Genetik mutasyonlara bağlı o

arak enzim aktivitesinin azalması, timidin birikimine yol açmaktadır. Bu birikim mitokondriyal DNA bütünlüğünün bozulmasına ve hastalığın patogenezinin ilerlemesine neden olmaktadır. TP eksikliği veya fonksiyonel yetersizliği sonucu ortaya çıkan aşırı timidin düzeyleri, mitokondriyal nükleozit ve nükleotid havuzlarının dengesini bozarak mtDNA replikasyon ve onarım süreçlerinde ciddi aksamalara yol açmaktadır (Shah vd., 2022).

Tablo 2.Nükleer DNA (nDNA) Mutasyonlarına Dayalı Sınıflandırmalar ile Genetik Değişiklikler (Zapico ve Ubelaker, 2013)

TİP	ALT TÜR	MUTASYON	HASTALIK
Nükleer DNA (nDNA) Mutasyonları	Replikasyon Mutasyonları Proteinleri	POLG1	Kromozom 15'e Bağlı Otozomal Dominant Progresif Harici Oftalmopleji (adPEO)
		Twinkle	Kromozom 10'a Bağlı adPEO
		ANT1	Kromozom 4'e Bağlı adPEO
	Timidin Kinaz 2 (TK2) ve Deoksiguanozin Kinaz'daki (dGK) Mutasyonlar	TK2	mtDNA Tükenme Sendromu (MDS)
		dGK	mtDNA Tükenme Sendromu (MDS)
	Timidin Fosforilaz (TP) Mutasyonları	TP	Mitokondriyal Nörogastrointestinal Ensefalomiyopati (MNGIE)

4. MUTASYONLARIN MOLEKÜLER ETKİLERİ

4.1. Mitokondriyal Disfonksiyon, Oksidatif Stres ve Metabolik Sendromun Moleküler Mekanizmaları

Mitokondriler, hücrelerde enerji metabolizması, serbest radikal ve kalsiyum homeostazisinin düzenlenmesi, hücre sağkalımı ve ölümü gibi çeşitli biyolojik süreçlerden sorumlu olan ve besinleri metabolize ederek adenosin trifosfat (ATP) üreten temel organeller olarak görev yapmaktadır. Bu organellerin başlıca işlevi, Krebs döngüsü aracılığıyla metabolitlerin oksidasyonu ve yağ asitlerinin β -oksidasyonu ile eşzamanlı olarak oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) yoluyla ATP sentezlemektir. ATP üretimindeki bu temel rolünün yanı sıra, mitokondriler hücrede reaktif oksijen türlerinin (ROS) de önemli bir kaynağı olarak işlev görmektedir (Prasun, 2020). ATP, elektron taşıma zinciri (ETC) boyunca yüksek enerjili elektronların aşamalı olarak oksijene aktarılması ile sentezlenmektedir. Ancak bu süreçte, yüksek enerjili elektronların küçük bir kısmı zincirden kaçarak doğrudan oksijen ile tepkimeye girmekte ve süperoksit radikallerinin oluşmasına yol açmaktadır (Murphy, 2009). Süperoksit radikalleri daha sonra enzimatik veya spontane yollarla hidrojen peroksit dönüşmektedir. Hidrojen peroksit ise Fenton reaksiyonu aracılığıyla son derece reaktif hidroksil radikallerine dönüşerek hücre zarları, proteinler, enzimler ve DNA üzerinde ciddi hasarlara neden olmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 2015). Mitokondriler, bu zararlı etkileri sınırlamak amacıyla güçlü bir antioksidan savunma sistemine sahiptir. Bu sistemde süperoksit dismutaz (SOD) enzimi, süperoksit radikallerini hidrojen peroksit dönüştürürken; oluşan hidrojen peroksit, indirgenmiş glutatyon (GSH) varlığında glutatyon peroksidaz (GPx) enzimi tarafından suya indirgenmektedir. Böylece hidroksil radikali oluşumu en aza indirgenmekte ve hücre içi denge korunmaktadır. Bu antioksidan mekanizma, mitokondride oluşan ROS'un büyük bir kısmını etkili şekilde temizlemekte ve peroksizom gibi diğer hücresel bölgelerde üretilen ROS'un uzaklaştırılmasında da önemli bir rol oynamaktadır (Bahattı vd., 2017; Prasun, 2020). Mitokondriyal işlev bozukluğu durumunda ROS üretimi artmakta ve bu durum hücresel antioksidan savunma kapasitesini aşarak oksidatif strese yol açmaktadır. Oksidatif stres, lipid, protein ve DNA üzerinde hasara neden olarak hücre fonksiyonlarını ve canlılığını olumsuz etkilemektedir. Bununla birlikte, ROS yalnızca zararlı moleküller değil, aynı zamanda hücre içi sinyal iletiminde görev alan düzenleyici bileşenler olarak işlev görmektedir. Mitokondriler, bu sinyalleşme süreçlerinde ROS düzeylerinin fizyolojik sınırlar içinde tutulmasında kilit rol oynamaktadır. Ancak süperoksit ve hidrojen peroksit düzeylerindeki artış, hücre içi sinyalleşmeyi değiştirerek lipid sentezi ve depolanmasında artışa neden olan metabolik yeniden programlamayı tetiklemektedir. Bu durum, oksidatif stresin yanı sıra metabolik bozuklukların, özellikle metabolik

sendromun (MetS) gelişimine de neden olmaktadır. Yaşlanma ve çeşitli metabolik bozukluklar, mitokondriyal işlevde bozulmalarla karakterize edilmektedir. Bu bozulmalar, ROS üretiminin artışı, OXPHOS aktivitesinin ve ATP üretiminin azalması ile birlikte oksidatif kapasite ve antioksidan savunmanın zayıflaması ile ilişkilendirilmektedir. Mitokondriyal biyogenezde yaşa bağlı azalma, mitokondriyal fisyon ve füzyon süreçlerindeki değişiklikler ve işlevsiz mitokondrilerin ortadan kaldırılmasını sağlayan mitofajinin inhibisyonu, bu işlev bozukluklarının temel mekanizmalarını oluşturmaktadır. ROS üretiminin aşırı seviyelere ulaşması, yaşlanma, kanser, yaşa bağlı metabolik bozukluklar ve nörodejeneratif hastalıklar gibi patofizyolojik süreçlerin patogeneğinde kritik bir rol oynamaktadır. Mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres, metabolik sendromun oluşumunda merkezi bir rol üstlenmekte ve bu nedenle yaşa bağlı metabolik ve nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde önemli bir etkiye sahip olmaktadır (James vd., 2012; Ray vd., 2012; Bahatti vd., 2017; Prasun, 2020).

4.2. Mitokondriyal Disfonksiyonda Apoptoz, Mitofaji ve Hücreyel İnflamasyon

Mitokondriler, hücre ölümü sırasında aktive olan pro-inflamatuar yolların temel düzenleyicileri olarak işlev görmektedir. Hücre ölümü sırasında mitokondriyal dış zar geçirgenleşmesi (MOMP) meydana gelmekte ve geçirgenleşmiş mitokondriler, mitokondriyal kaynaklı hasarla ilişkili moleküler desenlerin (DAMP'ler) salınımını tetiklemektedir. Bu DAMP'ler arasında mtDNA, kardiyolipin, N-formil peptitler (NFP'ler), ROS, adenosin trifosfat (ATP) ve süksinat yer almaktadır. NFP'ler, formil modifiye metionin içerdikleri için konak fagositler tarafından tanınabilmekte ve kemotaktik etkiler göstermektedir. mtDNA, Toll benzeri reseptör 9 (TLR9) ve cGAS-STING yolları aracılığıyla bağışıklık yanıtını aktive etmektedir. Kardiyolipin, mitofajiyi ve NLRP3 inflamazom aktivasyonunu indüklemekte; MOMP sırasında sitozole salınan sitokrom-c ve SMAC, apoptozom oluşumunu tetikleyerek kaspaz-9, -3 ve -7 aktivasyonuna yol açmaktadır. Apoptoz, pro- ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri tarafından düzenlenmekte olup, BAX ve BAK aktivasyonu MOMP'yi indüklemektedir. Ölüm reseptörleri aracılığıyla başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8) ve efektör kaspazlar (kaspaz-3 ve -7) apoptotik hücre ölümünü tetiklemektedir. Apoptotik hücrelerin eferositozu, DAMP'lerin salınımını engelleyerek immün sessiz bir mikroçevreyi korumaktadır. Kaspazlar ayrıca, MOMP sonrası NF- κ B ve Tip-I İnterferon yanıtlarını keserek pro-inflamatuar yolların aktivasyonunu kontrol etmektedir. DAMP'lerin kaspazlar tarafından kesilmesi, inflamatuvar sitokin üretimini sınırlamakta ve immünojenik protein üretimini engellemektedir. Mitokondriler ve bakteriler arasındaki morfolojik ve moleküler paralellikler,

mitokondriyal inflamasyonun evrimsel kökenini açıklamaktadır. mtDNA ve bakteriyel DNA'nın benzerliği, hücresel bağışıklık sinyal yollarının aktive edilmesine yol açmaktadır. Ayrıca, mitokondriyal metabolitler ve ROS, inflamasyonun indüksiyonunda ve apoptotik hücre ölümünün immünogenitesinde kritik rol oynamaktadır. Mitokondriyal kaynaklı inflamasyon, hücre ölümü sırasında pro-inflamatuar sinyallerin ortaya çıkmasını sağlayarak hem apoptoz hem de mitofaji süreçlerini etkilemektedir (Vringer ve Tait, 2023).

5. MİTOKONDRIYAL MUTASYONLARA BAĞLI HASTALIKLAR

5.1 Multisistem Hastalıklar

Mitokondriyal ensefalomiyopati, laktik asidoz ve inme benzeri ataklar (MELAS) sendromu, mitokondriyal metabolizmadaki bozukluklardan kaynaklanan prototipik bir mitokondriyal hastalık olarak tanımlanmaktadır. Klinik olarak MELAS, baş ağrısı, epileptik nöbetler, inme benzeri ataklar, hiperlaktik asidoz ve migren benzeri bulantı ve kusma gibi semptomlarla karakterizedir. Biyokimyasal olarak, hastalarda mitokondriyal kompleks I ve kompleks IV aktiviteleri düşüktür. Bu durum ATP üretimini azaltarak özellikle enerjiye bağımlı kas ve sinir dokularında bazı semptomlara neden olmaktadır. Genetik açıdan, en yaygın mutasyon m.3243A>G olarak bilinmektedir. Bu mutasyonu taşıyanlarda hipertansiyon riski yüksektir. Tanı biyokimyasal testler, nörogörüntüleme ve genetik analizle konulmaktadır. Mitokondriyal hastalıklar, kalıtsal nörolojik bozukluklar arasında en sık görülen gruplardan biri olarak kabul edilmektedir. Mitokondriyal DNA (mtDNA) mutasyonlarının minimum prevalansı 5,000'de 1 olarak bildirilmiştir. MELAS ile ilişkili m.3243A>G mutasyonu, 100,000 kişide minimum 3,5 yaygınlık oranına sahip olan en sık patojenik mtDNA nokta mutasyonudur. Ayrıca, MELAS, oksidatif fosforilasyonla ilişkili mitokondriyal solunum zinciri kompleksi alt birimlerine kodlayan diğer mtDNA genlerindeki mutasyonlarla da ilişkilendirilmektedir (Tetsuka vd., 2021; Alves vd., 2023).

Miyoklonik epilepsi ve kırmızı lifli miyopati (MERRF) sendromu, mtDNA veya nadiren nükleer genlerdeki varyantlardan kaynaklanan nadir, multisistemik bir mitokondriyal hastalık olarak tanımlanmaktadır. Klasik MERRF fenotipi, yaygın epilepsi, miyoklonus, ataksi ve düzensiz kırmızı lifli miyopati gibi dört kanonik özellik ile karakterizedir. Bunun ötesinde, MERRF artı fenotipi migren, bilişsel bozukluklar, demans, inme benzeri ataklar, optik atrofi, polinöropati, diyabet, kardiyomiyopati ve diğer sistemik bulguların eşlik ettiği daha geniş bir klinik spektrumunu kapsamaktadır. MERRF bazı vakalarda MELAS, Leigh sendromu, LHON veya ilerleyici dış oftalmopleji gibi diğer mitokondriyal sendromlarla fe-

notipik örtüşme göstermektedir. Genetik açıdan heterojen olan MERRF vakalarının yaklaşık %80'i, MT-TK genindeki m.8344A>G mutasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Diğer nadir mutasyonlar arasında m.8356T>C, m.8363G>A, m.3243A>G, m.3255G>A, m.3291T>C ve MTRNR1/2'deki varyantlar yer almaktadır. Hastalığın başlangıç yaşı ortalama 45 olup, görülme sıklığı 1:100.000'den azdır. MERRF ve MERRF plus hastalarında epilepsi, özellikle miyoklonik epilepsi formunda ortaya çıkan ve ilerleyici nöbetlerle karakterize edilen başlıca klinik bulgudur. Bu durum hem motor hem de bilişsel işlevlerin zamanla bozulmasına yol açmaktadır. Spesifik veya etkili bir tedavi mevcut olmamakla birlikte yönetim esas olarak semptomatik önlemler ile sınırlıdır (Finsterer, 2025).

Leber kalıtsal optik nöropatisi (LHON) mtDNA'daki patojenik mutasyonlarla ilişkilendirilen ve retinal ganglion hücrelerinin (RGC) seçici kaybına yol açan bir mitokondriyal optik nöropati olarak tanımlanmaktadır. Hastalık sıklıkla 15–35 yaşları arasında ortaya çıkmakta ve subakut, ağrısız, merkezi görme kaybı ile karakterize olmaktadır. Başlangıçta tek göz etkilenmekle birlikte, çoğu vakada ikinci göz haftalar veya aylar içerisinde tutulmaktadır. LHON ile ilişkili en yaygın mutasyonlar MT-ND4'te m.11778G>A, MT-ND1'de m.3460G>A ve MT-ND6'da m.14484T>C pozisyonlarında gözlenmektedir. Fundoskopik değerlendirmede optik disk temporal kadranda solukluk, peripapiller sinir lifi şişmesi ve mikroanjyopatik değişiklikler saptanmaktadır (Carelli vd., 2023).

Leigh sendromu, pediatrik mitokondriyal hastalıklar arasında en sık görülen formdur; hafif etkilenmiş vakalar ise yetişkinliğe kadar yaşamlarını sürdürmektedir. Leigh sendromlu hastalarda, özellikle metabolik stres dönemlerinde (örneğin enfeksiyonlar sırasında) subakut beyin sapı disfonksiyonu gelişmektedir. Klinik olarak bu sendrom oftalmopleji, ataksi, disfaji, dizartri, santral hipoventilasyon, hipersomnolans ve otonomik instabilite ile karakterize olmaktadır. Beyin sapı sendromu, daha önce Leigh sendromu tanısı konmamış yetişkinlerde, MT-ATP6 patojenik varyantları ile ilişkili nöropati ve ataksi ile de ortaya çıkmaktadır. Metabolik kriz sonrası bazı hastalarda beyin sapı fonksiyonlarında kısmi iyileşme gözlenmektedir (Ng vd., 2021).

5.2. Organ Spesifik Bozukluklar

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH), kalp yetmezliği, miyokard hipertrofi, ateroskleroz ve aort diseksiyonu gibi yaygın bozuklukları içermekte olup, dünya genelinde yüksek ölüm oranlarına yol açan ciddi sağlık sorunları arasında yer almaktadır. Mitokondriyal disfonksiyon, KVH'lerin patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır. Mitokondriler, hücrelerin enerji üretim merkezleri olarak ATP sağlamakta ve oksidatif fosforilas-

yon (OXPHOS) yoluyla hücre metabolizmasını düzenlemektedir. Mitokondriyal DNA (mtDNA) mutasyonları, nükleer genom bozuklukları, bozulmuş mitofaji ve ROS artışı mitokondriyal disfonksiyona yol açmakta, bu durum ATP üretimini azaltmakta, ROS seviyelerini artırmakta, OXPHOS kapasitesini düşürmekte ve enerji metabolizmasını bozmakta, böylece KVH riskini yükseltmektedir (Liu vd., 2022).

Mitokondriyal mekanizmalar KVH gelişiminde kritik rol oynamaktadır. mtDNA mutasyonları mitokondriyal homeostaziye bozmakta ve oksidatif stresi artırmakta, mitofaji işlevsiz mitokondrilerin ortadan kaldırılmasını sağlamaktadır. Ancak aşırı veya yetersiz mitofaji patolojik durumlara yol açmaktadır. OXPHOS bozukluğu, kardiyak miyositlerin yüksek enerji ihtiyacını karşılayamamakta ve kalp yetmezliği gibi durumları tetiklemektedir. Artmış ROS ise hücre hasarına ve KVH ilerlemesine katkıda bulunmakta, patogenezi daha da şiddetlendirmektedir. Potansiyel tedavi stratejileri arasında mtDNA'nın düzeltilmesi veya değiştirilmesi, mitofajinin artırılması, OXPHOS kapasitesinin iyileştirilmesi (NAD⁺, nikotinamid ribozidi, nikotinamid mononükleotidi veya nano-ilaç salınımı ile takviye) ve ROS'un azaltılması (Koenzim Q10 ve diğer antioksidanlar) yer almakta, ancak mevcut tedavi yaklaşımları hâlâ tamamen güvenli ve etkili klinik uygulamalara ulaşamamaktadır. Bununla birlikte, mitokondriyal disfonksiyon perspektifi KVH'lerin tedavisinde umut vadeden yeni stratejiler sunmaktadır (Liu vd., 2022).

mtDNA mutasyonları, diyabetin oluşması ve gelişmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Diyabet, genellikle uzun süreli yüksek kan şekeri ile karakterize edilen metabolik bir bozukluk olarak kabul edilmektedir. Tip-1 diyabette (T1D), bağışıklık sistemi pankreastaki β hücrelerine saldırmakta ve sitokinler ile otoimmün yanıtlar bu süreçte önemli rol oynamaktadır. Mitokondri, β hücrelerinde enerji üretimi ve insülin salgılanması için kritik öneme sahiptir. mtDNA mutasyonları, bu hücrelerde oksidatif stresin artmasına ve ATP üretiminin azalmasına yol açarak insülin salgısını bozmaktadır. Tip-2 diyabette (T2D), insülin direnci ve kronik düşük dereceli inflamasyon ön planda olmakta ve obezite ile inflamasyon birbirine bağlı olarak T2D gelişimini etkilemektedir. mtDNA mutasyonları, pankreas β hücrelerinin enerji üretimini etkileyerek insülin biyosentezinin azalmasına ve hücre apoptozunun artmasına neden olmaktadır. Anneden geçen diyabet sendromu (MIDD), mtDNA'daki m.A3243G mutasyonu ile ilişkilendirilmekte ve bu mutasyon, tRNA-Leu genini etkileyerek mitokondriyal protein sentezini bozmakta ve enerji üretiminde bozulmaya yol açmaktadır. MIDD genellikle insülin direnci ile ilişkili olmamakla birlikte patoloji, β hücrelerinin glikoza yanıt verememesine bağlı olarak gelişmektedir. Mitokondriyal işlev bozukluğu, ROS üretimini artırarak kronik inflamasyonu tetiklemekte ve bu

mekanizma, diyabetin farklı türlerinde ortak bir yolak olarak rol oynamaktadır. mtDNA'daki mutasyonların etkileri, heteroplazmi seviyesine ve dokuya özgü farklılıklara bağlı olarak değişmektedir. Son çalışmalar, diyabetle ilişkili mtDNA mutasyonlarının tespiti ve patojenik etkilerinin anlaşılması için ileri dizileme yöntemlerinin kullanılmasının önemini göstermektedir. mtDNA mutasyonları diyabette hem β hücrelerinin işlev bozukluğunu hem de kronik inflamasyonu artırarak hastalığın gelişimine neden olmaktadır (Dabravolski vd., 2021).

Nörodejeneratif hastalıklar (NDD'ler), merkezi sinir sisteminde belirli nöron gruplarının ve bu nöronlara bağlı işlevlerin yavaş ve ilerleyici bir şekilde kaybolmasıyla karakterize edilen bozukluklar olarak tanımlanmaktadır. Bu hastalıklar kalıtsal olabileceği gibi, rastlantısal biçimde de ortaya çıkmaktadır. Klinik özelliklerine göre demans, parkinsonizm ve motor nöron hastalıkları olmak üzere üç ana grupta sınıflandırılmaktadır. İnsan yaşam süresinin uzamasıyla birlikte bu hastalıkların görülme sıklığı da artış göstermektedir. Nöronların yüksek enerji gereksinimi ve yaşlanma süreciyle birlikte mtDNA'da biriken oksidatif hasar, mitokondrilerin nörodejeneratif hastalıklardaki rolüne dikkatleri çekmektedir. mtDNA, histon korumasından yoksun olması ve oksijenin yoğun kullanımı nedeniyle ROS neden olduğu oksidatif hasara karşı savunmasız kalmaktadır. Bu durum, mtDNA'da mutasyonların oluşmasına yol açmakta, mitokondriyal fonksiyonların bozulmasına ve kendini besleyen bir döngünün gelişmesine neden olmaktadır. Zamanla bu mutasyonlar hücrelerde birikerek biyokimyasal ve metabolik kusurların ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Alzheimer hastalığı (AD) ve Parkinson hastalığı (PD) gibi nörodejeneratif hastalıklarda bu tür kusurlu hücrelerin oranının arttığı ortaya koyulmuştur. Bu durum, somatik mtDNA mutasyonlarının nörodejenerasyon sürecinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Mitokondriyal bölünme sonrasında mitofaji mekanizmasıyla bazı hasarlı DNA'lar ortadan kaldırılabilenekte, ancak bir kısmı hücre içinde veya dışında birikerek inflamatuvar süreçleri tetiklemektedir (Shang vd., 2023).

5.3. Yaşlanma ve Kronik Hastalıklardaki Rolü

Mitokondriler, hücrel enerji metabolizmasının merkezinde yer alan ve kendi genetik materyalini taşıyan organellerdir. mtDNA, yaşlanma süreciyle yakından ilişkili bir moleküler bileşen olarak dikkat çekmektedir. Yaşlanma ile birlikte mtDNA'da meydana gelen mutasyonların birikmesi, mitokondriyal fonksiyonların bozulmasına, enerji üretiminde azalmaya ve hücrel düzeyde işlev kaybına yol açmaktadır. Geleneksel mitokondriyal serbest radikal teorisi, yaşlanmanın temel nedeninin ROS tarafından oluşturulan oksidatif hasar olduğunu öne sürmektedir. Ancak son zamanlarda yapılan araştırmalar, mtDNA mutasyonlarının esas

olarak oksidatif stres kaynaklı değil, DNA replikasyonu sırasında ortaya çıkan hatalardan kaynaklandığını göstermektedir. Bu mutasyonların zamanla klonal olarak genişlemesi, hücre ve doku düzeyinde mitokondriyal işlev bozukluğuna neden olmaktadır. Ayrıca, ROS'un yalnızca zararlı bir yan ürün değil, belirli düzeylerde hücresel sinyal mekanizmalarını düzenleyen önemli bir düzenleyici molekül olduğu anlaşılmaktadır. Sonuç olarak, mtDNA mutasyonlarının birikimi, mitokondriyal disfonksiyonun artışı ve kök hücre yenilenme kapasitesinin azalmasıyla birlikte yaşlanma sürecinin temel biyolojik mekanizmalarından birini oluşturmaktadır (Pinto ve Moraes, 2015).

Yaşlanma ile birlikte mitokondriyal fonksiyonlarda belirgin bir azalma meydana gelmektedir. Yaşlı memeli dokularında mitokondri sayısının azalması ve morfolojik olarak yuvarlaklaşmış, düzensiz mitokondrilerin görülmesi bu süreci yansıtmaktadır. Fare, sıçan ve insan karaciğerinde yaşla birlikte mitokondri sayısı, mtDNA kopya sayısı ve mitokondriyal protein düzeyleri anlamlı biçimde azalmaktadır. Buna paralel olarak, yaşlı hayvanlarda solunum zinciri (RC) kapasitesi gençlere kıyasla yaklaşık % 40 oranında azalmaktadır. Kompleks I ve IV aktiviteleri azalırken, kompleks II, III ve V büyük ölçüde sabit kalmaktadır. RC fonksiyonundaki bu farklılıkların mtDNA ekspresyonundaki azalma, mtDNA mutasyon birikimi veya hücre kompozisyonundaki değişikliklerle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, hormon seviyelerindeki azalma, insülin direnci ve fiziksel aktivite düşüklüğü gibi faktörler de mitokondriyal işlev kaybına neden olmaktadır. Somatik mtDNA mutasyonları yaşla birlikte artmaktadır. Merkezi sinir sistemi, iskelet kası ve karaciğer dokularında mtDNA delesyonları ve nokta mutasyonları birikmektedir. Bu mutasyonlar, ROS'un neden olduğu DNA hasarı veya mtDNA replikasyonu sırasında meydana gelen hatalar sonucu ortaya çıkmaktadır. Hücrelerde hem normal hem de mutasyona uğramış mtDNA bulunmakta ve mutasyon oranı belirli bir eşiği aştığında solunum zinciri işlevi bozulmaktadır. mtDNA'nın hücre bölünmesi sırasında rastgele dağılması, hücreler arasında mutasyon oranlarının farklılaşmasına ve mozaik RC eksikliklerinin gelişmesine neden olmaktadır. Sonuç olarak, yaşlanma mitokondriyal yapı ve işlevin kademeli olarak bozulması, mtDNA mutasyonlarının birikimi ve oksidatif fosforilasyon kapasitesinin azalmasıyla karakterize edilmektedir. Bu değişiklikler, enerji metabolizmasında azalma, artan hücresel stres ve yaşlanma fenotiplerinin ortaya çıkışı ile ilişkilendirilmektedir (Bratic ve Larsson, 2013).

6. MİTOKONDRIYAL HASTALIKLARDA TEDAVİ YAKLAŞIMLARI

Mitokondriyal hastalıkların fenotipik çeşitliliği, tedavi hedeflerinin hastaya özgü olarak belirlenmesini zorunlu kılmaktadır. Tedavinin temel amaçları arasında semptomların hafifletilmesi, hastalığın ilerleyişinin önlenmesi ve akut metabolik krizlerin etkin yönetimi yer almaktadır. Bu kapsamda, aminoasitlerden arginin, sitrülün ve taurin akut metabolik atakların önlenmesinde etkin şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca, görme bozuklukları için lutein ve nörodavranışsal ile hepatopatik belirtiler üzerinde fayda sağlayan N-asetilsistein önerilmektedir. Mitokondriyal hastalıklarda kullanılan başlıca takviyeler arasında B vitamin kompleksi, güçlü antioksidanlar (E vitamini, alfa-lipoik asit) ve mitokondriyal elektron taşıma zincirinin önemli bir bileşeni olan koenzim Q10 (özellikle biyoyararlanımı yüksek olan ubikinol formu) yer almaktadır. Dozaj ve potansiyel advers etkiler, hastanın genetik ve klinik özellikleri dikkate alınarak titizlikle optimize edilmelidir. Örneğin, ACAD9 eksikliğinde riboflavin, MELAS sendromunda arginin, CoQ10 eksikliğinde ubikinol ve biyotin-tiamin duyarlı hastalıklarda biyotin ile tiamin takviyesi spesifik olarak önerilen yaklaşımlar arasındadır. Ayrıca, folinik asit ve biyotin gibi vitaminler, belirli genetik mutasyonlara sahip hastalar için önemli tedavi bileşenleri olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, bu tedavi yaklaşımlarının etkinliğine ilişkin randomize kontrollü çalışmalar sınırlı olup, çoğunlukla gözlemsel verilere dayanmaktadır. Bu durum, hastaların yakından izlenmesi, düzenli laboratuvar kontrolleri ve bireyselleştirilmiş tedavi protokollerinin geliştirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Böylece, hastaya özgü tedavi stratejileri ile mitokondriyal hastalıkların yönetiminde daha etkin sonuçlar elde edilmesi hedeflenmektedir (Parikh vd., 2009; Barcelos vd., 2020).

Mitokondriyal hastalıklarda oksidatif stresin azaltılması için farklı mekanizmalara sahip antioksidanlar kullanılmaktadır. Yaygın olarak tercih edilen antioksidanlar arasında E vitamini, alfa-lipoik asit ve özellikle biyoyararlanımı yüksek olan ubikinol (CoQ10'un indirgenmiş formu) yer almaktadır. E vitamini serbest radikalleri temizleyerek hücre zarlarını korurken, alfa-lipoik asit mitokondriyal enzim aktivitesini desteklemektedir. Ubikinol, mitokondriyal solunum zincirinde önemli rol oynamaktadır. Özellikle doz ayarlamasında lökosit CoQ10 düzeylerinin takibi oldukça önemlidir. C vitamini mitokondriyal hastalıklarda etkili bulunmazken, N-asetilsistein beyin glutatyon seviyelerini artırarak tedavi potansiyeli göstermektedir. Glutatyon seviyelerinin izlenmesi, N-asetilsistein dozunun bireyselleştirilmesinde klinik açıdan önemlidir. Mitokondriyal hastalıkların tedavisinde L-arginin, nitrik oksit üretimini artırarak metabolik felçlerin önlenmesinde ve MELAS ile Leigh sendro-

mu gibi hastalıklarda klinik fayda sağlamaktadır. L-sitrülin, L-argininin öncüsü olarak benzer etkiler gösterirken, L-kreatin egzersiz intoleransı ve kas yorgunluğuna karşı enerji depolayıcı olarak kullanılmaktadır. L-karnitin ise uzun süreli kullanımda ateroskleroz riski nedeniyle artık rutin tercih edilmemektedir. Pirüvat ve taurin, mitokondriyal hastalıklarda yapılan denemelerde umut vaat etmekle birlikte, özellikle taurinin MELAS'ta metabolik felci azaltmada Japonya'da onay aldığı bilinmektedir (Fujii vd., 2014; Hirano vd., 2018; Barcelos vd., 2020).

7. SONUÇ

Mitokondriler, hücrel enerji metabolizmasının merkezinde yer alan ve oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) mekanizması aracılığıyla adenozin trifosfat (ATP) üretiminde temel rol üstlenen dinamik organellerdir. mtDNA, yüksek mutasyon oranı ve sınırlı onarım kapasitesi nedeniyle genetik bütünlüğünü kolaylıkla kaybedebilmekte; bu durum, mitokondriyal fonksiyonların bozulmasına ve hücrel enerji dengesinin sarsılmasına neden olmaktadır. mtDNA'da meydana gelen mutasyonlar, elektron taşıma zinciri komplekslerinde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere yol açarak ROS birikimini artırmaktadır. Buna bağlı olarak oksidatif stresin şiddetlenmesi ve hücrel hasarın ilerlemesi gözlenmektedir. Mitokondriyal disfonksiyon, enerji üretiminde azalma, membran potansiyelinin kaybı, kalsiyum homeostazinin bozulması ve apoptotik sinyal yollarının aktivasyonu gibi bir dizi moleküler süreçle ilişkilidir. Özellikle nükleer ve mitokondriyal genomlar arasındaki genetik ve metabolik koordinasyonun bozulması, bu disfonksiyonların nörodejeneratif, metabolik ve neoplastik hastalıkların patogeneğinde merkezi bir role sahip olmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak, mitokondriyal genomun stabilitesinin korunması, oksidatif stresin dengelenmesi ve mitokondriyal biyogenez süreçlerinin düzenlenmesi, hücrel homeostazinin sürdürülmesi açısından hayati önem taşımaktadır. Bu nedenle, mitokondriye özgü genetik ve biyokimyasal mekanizmaların ayrıntılı biçimde aydınlatılması, mitokondriyal kökenli hastalıkların erken tanı, önleme ve tedavisinde yenilikçi terapötik stratejilerin geliştirilmesine güçlü bir bilimsel temel oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

- Alves, C.A.P.F., Zandifar, A., Peterson, J.T., Tara, S.Z., Ganetzky, R., Viane, A.N., Andronikou, S., Falk, M.J., Vossough, A., Goldstein, A.C. (2023). MELAS: phenotype classification into classic-versus-atypical presentations. *American Journal of Neuroradiology*, 44(5), 602-610.
- Barcelos, I., Shadiack, E., Ganetzky, R.D., Falk, M.J. (2020). Mitochondrial medicine therapies: rationale, evidence, and dosing guidelines. *Current Opinion in Pediatrics*, 32(6), 707-718.
- Barros, C. D., Coutinho, A., Tengan, C. H. (2024). Arginine supplementation in MELAS syndrome: what do we know about the mechanisms?. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(7), 3629-3641.
- Bhatti, J.S., Bhatti, G.K., Reddy, P.H. (2017). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders—A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1863(5), 1066-1077.
- Bratic, A., Larsson, N.G. (2013). The role of mitochondria in aging. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(3), 951-957.
- Carelli, V., La Morgia, C., Yu-Wai-Man, P. (2023). Mitochondrial optic neuropathies. *Handbook of Clinical Neurology*, 194, 23-42.
- Dabravolski, S.A., Orekhova, V.A., Baig, M.S., Bezsonov, E.E., Starodubova, A.V., Popkova, T.V., Orekhov, A.N. (2021). The role of mitochondrial mutations and chronic inflammation in diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6733-6747.
- Druzhyna, N.M., Wilson, G.L., LeDoux, S.P. (2008). Mitochondrial DNA repair in aging and disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, 129(7-8), 383-390.
- Finsterer, J. (2025). A Review of the Advances in the Medical Management of Epilepsy Associated With Myoclonic Epilepsy With Ragged-Red Fibers (MERRF) Syndrome. *Cureus*, 17(4), e82875.
- Fujii, T., Nozaki, F., Saito, K., Hayashi, A., Nishigaki, Y., Murayama, K., Tanaka, M., Koga, Y., Hiejima, I., Kumada, T. (2014). Efficacy of pyruvate therapy in patients with mitochondrial disease: A semi-quantitative clinical evaluation study. *Molecular Genetics and Metabolism*, 112(2), 133-138.
- Giordano, L., Ware, S. A., Lagranha, C. J., Kaufman, B.A. (2025). Mitochondrial DNA signals driving immune responses: Why, How, Where?. *Cell Communication and Signaling*, 23(1), 192-234.
- Gorman, G.S., Chinnery, P.F., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., Suomalainen, A., Thorburn, D.R., Zeviani, M., Turnbull, D. M. (2016). Mitochondrial diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), 1-22.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine* (5th ed.). Oxford University Press, Oxford.
- Hirano, M., Emmanuele, V., Quinzii, C.M. (2018). Emerging therapies for mitochondrial diseases. *Essays in Biochemistry*, 62(3), 467-481.

- James, A.M., Collins, Y., Logan, A., & Murphy, M. P. (2012). Mitochondrial oxidative stress and the metabolic syndrome. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(9), 429-434.
- Liu, Y., Huang, Y., Xu, C., An, P., Luo, Y., Jiao, L., Luo, J., Li, Y. (2022). Mitochondrial dysfunction and therapeutic perspectives in cardiovascular diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 16053-16069.
- Luo, L.F., Hou, C.C., Yang, W.X. (2013). Nuclear factors: roles related to mitochondrial deafness. *Gene*, 520(2), 79-89.
- Mailloux, R.J., Treberg, J., Grayson, C., Agellon, L.B., Sies, H. (2023). Mitochondrial function and phenotype are defined by bioenergetics. *Nature Metabolism*, 5(10), 1641-1641.
- Murphy, M.P. (2009).** *How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochemical Journal*, **417(1)**, 1–13.
- Murphy, M.P., Hartley, R.C. (2018). Mitochondria as a therapeutic target for common pathologies. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(12), 865-886.
- Ng, Y.S., Bindoff, L.A., Gorman, G.S., Klopstock, T., Kornblum, C., Mancuso, M., McFarland, R., Sue, C. M., Suomalainen, A., Taylor, R.W., Thorburn, D.R., Turnbull, D.M. (2021). Mitochondrial disease in adults: Recent advances and future promise. *The Lancet Neurology*, 20(7), 573-584.
- Parikh, S., Saneto, R., Falk, M.J., Anselm, I., Cohen, B.H., Haas, R., Mitochondrial Medicine Society. (2009). A modern approach to the treatment of mitochondrial disease. *Current Treatment Options in Neurology*, 11(6), 414-430.
- Pinto, M., Moraes, C.T. (2015). Mechanisms linking mtDNA damage and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 85, 250-258.
- Prasun, P. (2020). Mitochondrial dysfunction in metabolic syndrome. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1866(10), 165838.
- Ray, P.D., Huang, B.W., Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24(5), 981-990.
- Shah, S.A.Y., Shakeel, H.A., Hassan, W.U. (2022). Rare pathogenic mutation in the thymidine phosphorylase gene (TYMP) causing mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyelopathy. *BMJ Neurology Open*, 4(2), e000287.
- Shang, D., Huang, M., Wang, B., Yan, X., Wu, Z., Zhang, X. (2023). mtDNA maintenance and alterations in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Current Neuropharmacology*, 21(3), 578-598.
- Sharma, P., Sampath, H. (2019). Mitochondrial DNA integrity: Role in health and disease. *Cells*, 8(2), 100-121.
- Tetsuka, S., Ogawa, T., Hashimoto, R., Kato, H. (2021). Clinical features, pathogenesis, and management of stroke-like episodes due to MELAS. *Metabolic Brain Disease*, 36(8), 2181-2193.
- Vringer, E., Tait, S. W. (2023). Mitochondria and cell death-associated

- inflammation. *Cell Death & Differentiation*, 30(2), 304-312.
- Wallace, D.C. (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annual Review of Genetics*, 39(1), 359-407.
- Wang, L. (2016). Mitochondrial purine and pyrimidine metabolism and beyond. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 35(10-12), 578-594.
- Yan, C., Duanmu, X., Zeng, L., Liu, B., Song, Z. (2019). Mitochondrial DNA: distribution, mutations, and elimination. *Cells*, 8(4), 379-394.
- Yang, X., Zhang, R., Nakahira, K., Gu, Z. (2019). Mitochondrial DNA mutation, diseases, and nutrient-regulated mitophagy. *Annual Review of Nutrition*, 39(1), 201-226.
- Zapico, S.C., Ubelaker, D.H. (2013). mtDNA mutations and their role in aging, diseases and forensic sciences. *Aging and Disease*, 4(6), 364-380.
- Zong, Y., Li, H., Liao, P., Chen, L., Pan, Y., Zheng, Y., Zhang, C., Liu, D., Zheng, M., Gao, J. (2024). Mitochondrial dysfunction: mechanisms and advances in therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 124-153.

