

# Farmasötik ve Biyoteknolojik Uygulamalar İçin Enzim Teknolojileri

Editör  
Dr. Ersin KARATAŞ



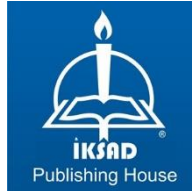
# Farmasötik ve Biyoteknolojik Uygulamalar İçin Enzim Teknolojileri

## EDİTÖR

❖ Ersin KARATAŞ

## YAZARLAR

- ❖ Ahmet KATI
- ❖ Arzu ÖZTÜRK KESEBİR
- ❖ Derya İlke GÜNGÖR
- ❖ Erva RAKICI
- ❖ Feyza BURUL
- ❖ Gamze BALCI
- ❖ Hacer KAYA ÇAKIR
- ❖ Hanife ARDAHANLI
- ❖ Huri DEMİRCİ
- ❖ Mehmet KARADAYI
- ❖ Mustafa TANKUŞ
- ❖ Nilgün POYRAZ
- ❖ Onur EROĞLU
- ❖ Pelinsu ALBEY
- ❖ Selma SEZEN
- ❖ Sena Nur BAŞARAN
- ❖ Ülkü Zeynep ÜREYEN ESERTAŞ
- ❖ Yusuf GÜLŞAHİN



Copyright © 2024 by iksad publishing house  
All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, distributed or  
transmitted in any form or by  
any means, including photocopying, recording or other electronic or mechanical  
methods, without the prior written permission of the publisher, except in the case of  
brief quotations embodied in critical reviews and certain other noncommercial uses  
permitted by copyright law. Institution of Economic Development and Social  
Researches Publications®

(The Licence Number of Publicator: 2014/31220)

TÜRKİYE TR: +90 342 606 06 75

USA: +1 631 685 0 853

E mail: [iksadyayinevi@gmail.com](mailto:iksadyayinevi@gmail.com)

[www.iksadyayinevi.com](http://www.iksadyayinevi.com)

It is responsibility of the author to abide by the publishing ethics rules.

Iksad Publications – 2024©

**ISBN: 978-625-378-065-4**

Cover Design: Ersin KARATAŞ

December / 2024

Ankara / Türkiye

Size = 16x24 cm

## **İÇİNDEKİLER**

**ÖNSÖZ**.....1

### **BÖLÜM 1**

#### **HASTALIK TEDAVİLERİNDE HEDEF ENZİM OLARAK TANIMLANAN BAZI ENZİMLERİN AFİNİTE KOLON KROMATOĞRAFİSİ UYGULAMALARI**

Dr. Öğr. Üyesi Arzu Öztürk KESEBİR.....3

### **BÖLÜM 2**

#### **ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ MEKANİZMALARI VE BAKTERİYAL ENZİMLER**

Öğr. Gör. Dr. Erva RAKICI.....21

### **BÖLÜM 3**

#### **MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE HİSTONDEASETİLİZ ENZİMLERİNİN KULLANIMI**

Dr. Öğr. Üyesi Hacer KAYA ÇAKIR

Doç. Dr. Onur EROĞLU.....43

### **BÖLÜM 4**

#### **ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARLA İLİŞKİLİ MEKANİZMALAR**

Öğr. Gör. Dr. Hanife ARDAHANLI.....59

### **BÖLÜM 5**

#### **BİYOTEKNOLOJİDE YÜKSEK VERİMLİ TARAMA TEKNOLOJİLERİ**

Doç. Dr. Huri DEMİRCİ.....71

### **BÖLÜM 6**

#### **LABORATUVARDAN ENDÜSTRİYE: BİYOFARMASÖTİK ENDÜSTRİSİNDE ENZİM ÜRETİMİ**

Mustafa TANKUŞ

Gamze BALCI

Derya İlke GÜNGÖR

Pelinsu ALBEY

Ahmet KATI.....93

## **BÖLÜM 7**

### **MİKROBİYAL ENZİMLERİN TERAPÖTİK AJANLAR OLARAK UYGULAMALARI**

Dr. Öğr. Üyesi Nilgün POYRAZ.....115

## **BÖLÜM 8**

### **SAĞLIK ALANINDA NANOZİM TEKNOLOJİLERİ**

Dr. Öğr. Üyesi Selma SEZEN

Arş. Gör. Feyza BURUL

Bilim Uzmanı Yusuf GÜLŞAHİN

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KARADAYI.....137

## **BÖLÜM 9**

### **ENDÜSTRİYEL BİYOTEKNOLOJİDE KULLANILAN ANAHTAR ENZİMLER: LAKTAZ, LİPAZ, A-AMİLAZ VE GLUKOZ İZOMERAZIN UYGULAMALARI VE İLERİ ARAŞTIRMALARI**

Arş. Gör. Sena Nur BAŞARAN.....153

## **BÖLÜM 10**

### **FAJ ENZİMLERİ VE UYGULAMA ALANLARI**

Dr. Öğr. Üyesi Ülkü Zeynep ÜREYEN ESERTAŞ.....169

## ÖNSÖZ

Enzim teknolojileri, biyoteknoloji ve farmasötik alanlarında devrim niteliğinde uygulamalara ilham vermiştir. Bu alan, yaşam bilimlerinden endüstriyel süreçlere kadar geniş bir yelpazede yenilikçi çözümler sunarak modern bilimin ön saflarında yer almıştır. Enzimlerin eşsiz katalitik özellikleri, onları ilaç geliştirme, teşhis, tedavi ve çevresel sürdürülebilirlik gibi kritik alanlarda vazgeçilmez kılmaktadır.

Bu kitap, enzimlerin terapötik uygulamalardan endüstriyel üretim süreçlerine kadar geniş bir yelpazede nasıl kullanıldığını ele almaktadır. Her bölüm, alanında uzman yazarlar tarafından hazırlanarak, enzim teknolojilerinin bilimsel ve uygulamalı boyutlarını kapsamaktadır.

Kitapta, yüksek afiniteli kromatografik teknikler, antimikrobiyal direnç mekanizmaları, hastalıkların tedavisinde kullanılan enzimleri, biyoteknolojik tarama teknolojileri ve nanozim uygulamaları gibi konular hakkında yapılmış son çalışmaları detaylı bir şekilde ele alınmıştır. Ayrıca, biyofarmasötik üretiminde enzim kullanımının endüstriyel boyutları da incelenmektedir.

Kitabın hazırlanmasında emeği geçen tüm yazarlara ve bilim dünyasına katkıda bulunan meslektaşlarıma teşekkür ederim. Bu çalışmanın, bilim insanları, öğrenciler ve sektör profesyonelleri için değerli bir kaynak olacağına inanıyorum.

Editör

Dr. Öğr. Üyesi Ersin KARATAŞ  
Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi  
Patnos Meslek Yüksekokulu  
Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü  
hdersin@gmail.com  
Orcid ID: 0000-0001-6848-7618



## **BÖLÜM 1**

### **HASTALIK TEDAVİLERİNDE HEDEF ENZİM OLARAK TANIMLANAN BAZI ENZİMLERİN AFİNİTE KOLON KROMATOĞRAFİSİ UYGULAMALARI**

Dr. Öğr. Üyesi Arzu Öztürk KESEBİR<sup>1</sup>

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.14564937>

---

<sup>1</sup> Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Patnos Meslek Yüksekokulu, Mülkiyet Koruma ve Güvenlik Bölümü Ağrı, Türkiye. aozturkkesebir@agri.edu.tr, Orcid ID: 0000-0003-2603-7509





## GİRİŞ

Hastalıkların tedavisinde hedeflenen enzimler genellikle kan, organ gibi içeriği son derece zengin canlı dokulardan elde edilmektedir. Tek bir proteinin bu tür karmaşık bir matristen saf olarak elde edilmesi, genellikle birden fazla saflaştırma basamağını gerektirir. Bu süreç oldukça uzun, zahmetli ve maliyetlidir. Ancak, saflaştırılmak istenen proteinin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin detaylı bir şekilde analiz edilmesi, karmaşık karışımlardan tek bir basamakta protein saflaştırılmasını mümkün kılabilir. Bu tür yöntemler genellikle spesifik proteinlere özgüdür; dolayısıyla farklı proteinler için farklı özelliklere sahip kolonların tasarlanması gerekir. (Hedhammar vd. 2013)

Bu bölümde ele alınan afinit kromatografisi, proteinlerin saflaştırılmasında moleküler tanımayaya dayalı bir yöntem olarak tanımlanabilir. Bu yöntemde proteinlerin çözünürlüğü, yükü, pH değeri veya büyüklüğü gibi fiziksel özellikler yerine biyolojik fonksiyonları dikkate alınır (Wilchek ve Chaiken 2000; Zou vd. 2001). Bu biyolojik fonksiyonlar; immünoafinite, biyoafinite, DNA bağlanması, boronat veya lektin afinitesi, metal iyonlarına afinite ve hatta biyomimetik afinite gibi farklı kategorilere ayrılabilir (Hage 2006).

Afinit kromatografisi, yüksek seçicilik özelliği sayesinde genellikle hızlı ve tek bir basamakta yüksek saflıkta protein elde edilmesine olanak tanır. Ayrıca, bu yöntemler genellikle kolay uygulanabilir olduğu için önemli avantajlar sunar (Wilchek ve Chaiken 2000). Ancak, bu yöntemde kullanılan kolon materyali diğer saflaştırma yöntemlerine kıyasla oldukça pahalıdır. Bu sebeple, saflaştırma işlemleri genellikle küçük kolonlarda gerçekleştirilir ve elde edilen enzim miktarı sınırlı kalır. Dolayısıyla, yüksek miktarlarda enzim üretimi için afinite kromatografisi ideal bir yöntem değildir (Doonan ve Cutler 2004).

Afinit kromatografisinde matris adı verilen, suda çözünmeyen destek materyalleri kullanılır. Matrislere immobilize edilmiş halde bulunan ligand adı verilen yapılar bağlanır. Ligandlar, hedeflenen proteine özel ilgi (afinite) gösterir. Yani proteinin gelip bağlanabileceği uçlara sahiptir. Ligandlar seçilirken hedeflenen proteinlere spesifik olarak bağlanması istenirken, bu bağlanmanın geri dönüşümlü olması da esastır. Geri dönüşümsüz bir bağlanma söz konusu ise, proteini kolondan elüe edemeyiz, dolayısıyla yöntem başarısız olur (Wilchek ve Chaiken 2000; Kumpalume ve Ghose 2003).

Protein ile ligand arasında Van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler ya da hidrofobik etkileşimler gibi zayıf etkileşimler olabilir. Fakat kovalent bağ ya da iyonik bağ gibi güçlü etkileşimler olmamalıdır. Çünkü proteinin kolondan elüsyonu, ya kolondaki ligand ile yarışabilen başka bir ligand kullanılarak ya da kolonun pH/polarite gibi değerlerini değiştiren bir elüsyon çözeltisi ile yapılabilir (Anonymous 2002). Elüsyon çözeltisinin amacı proteini kolondan sökmek olsa da bu işlem esnasında proteinin yapısının bozulmaması ve denatüre edilmemesi gerekmektedir (Ostrove 1990).

Afinite kromatografisindeki en önemli unsurların başında uygun ligandın seçilmesi gelmektedir. Ligandlar biyolojik kökenli olabildiği gibi, sentetik yapılar da olabilirler. Eğer ligand yakın özellikli birkaç bileşiğe ya da sadece tek bir bileşiğe bağlanıyorsa monospesifik; birbiriyle ilişkili bir grup bileşiğe bağlanıyorsa grup spesifik ligand olarak adlandırılırlar (Hage 1999; Hage ve Clarke 2004). Tablo 1’de afinite kromatografisinde kullanılan bazı ligand çeşitleri görülebilir.

**Tablo 1.** Afinite kolon kromatografisinde kullanılan ligandlar ve hedef bileşikleri.

<b>Ligand</b>	<b>Hedef Bileşik</b>
<b>Monospesifik (yüksek spesifik) ligand</b>	
Antikor	Virüs, ilaç, peptit, hormon, protein.
Enzim inhibitörü/kofaktörü	Enzim
Nükleik asit (NA)	DNA ya da RNA’ya bağlanan proteinler/ tamamlayıcı NA zincirleri
<b>Grup (genel) ligand</b>	
Lektin	Karbohidrat grupları
A/G proteinleri	Fc parçaları, aktif antikorlar
Borolat	Glikoprotein, kateşol, polisakkarit
Sentetik boyalar	Dehidrogenaz/kinaz grubu enzimleri
Metal şelatları	Metal bağlayıcı proteinler

Afinite kolon kromatografisinde önemli bir eleman da matrislerdir. Bu yapıların bozulmayan, kimyasallara karşı dayanıklı, inert, sert (rijit), hidrofilik özellikte ve mümkünse büyük gözenekli olması istenir (Hage ve Clarke 2004). Uygulanacak yöntemle göre destek materyali seçilmelidir. Düşük performanslı afinite kromatografisi yapılacak ise çok sert yapıda olmayan gözenekleri büyük jeller kullanılabilir, bunlar selüloz, agaroz veya dekstran gibi yapılar olabilir. Eğer yüksek performanslı afinite kromatografisi yapılacak ise ortamın

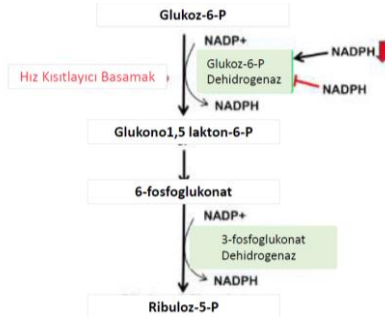
basıncına ve hareketli fazın (çözeltilerin) geçme hızına dayanıklı bir jel tercih edilmelidir. Sentetik polimerlerden ya da silikadan yapılan küçük yapı ve sert jeller uygun olacaktır (Hage 1999). Mekanik dayanımı yüksek ve akış hızına dayanıklı, yüksek poroziteye sahip boncuk şekilli agaroz jeller yüksek performanslı afinite uygulamalarında sıklıkla tercih edilmektedir. Bu jeller türevlendirilebilirler, dolayısıyla farklı amaçlar için de kullanılabilirler (Rosenberg 2005).

Ligandlar, matrislere biyospesifik absorpsiyon, kovalent bağlanma, hapsedme ya da moleküler baskılama yöntemleri kullanılarak bağlanabilirler. İyi bir saflaştırma için ligand ile matrisin birbirine iyi tutunmuş olması ve bu bağlanma sonucunda ligandın özelliklerini kaybetmemesi gerekmektedir (Hage 2006). Ligandın matrise immobilize edilme işlemi 2 basamakta gerçekleştirilir. Önce matris bu işlem için aktif hale getirilir daha sonra ligand bağlanır (Hage ve Clarke 2004). Bu işlemde genelde ligand üzerindeki primer amin, aldehit, sülfhidril, karboksilik asit ya da hidroksil gruplarından yararlanır (Hage ve Clarke 2004; Rosenberg 2005). Ligandın boyutunun çok küçük olması ya da matrise bağlanma bölgesinin yüzeyden uzak olması durumlarında ligand ile matris arasına uzantı kolu ismi verilen yapılar bağlanır, bu yapıların görevi ligandı hedef molekülün ulaşabileceği şekilde yerleştirmektir (Konak vd. 2014).

### **NADPH/NADP<sup>+</sup> ile Alakalı Bazı Enzimlerin Afinite Kolon Kromatografisi Uygulamaları**

NADP<sup>+</sup>/NADPH dönüşümü denilince pentoz fosfat yolunun (PFY) oksidatif reaksiyonları akla gelmektedir. PFY hem beyin hücrelerinin hem de eritrositlerin temel enerji kaynağı glukoz molekülünün oksidasyonunu sağlayan tek oksidatif yoldur (Thomas ve Gilham 1983).

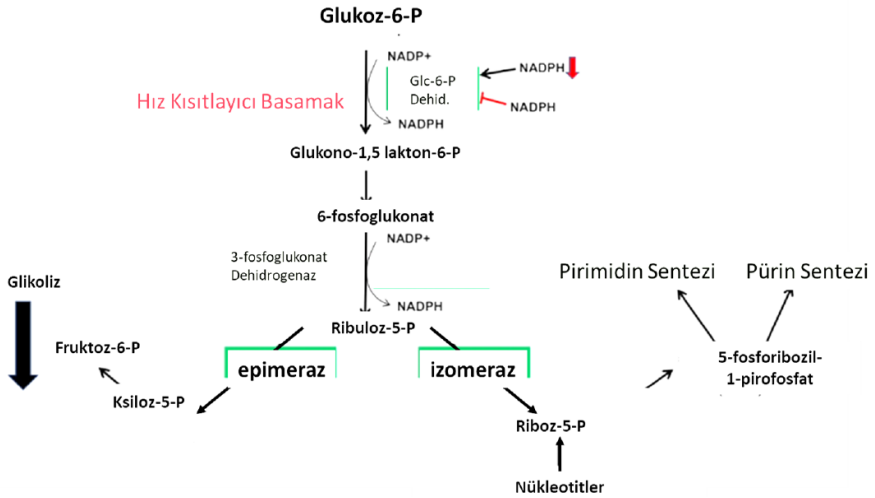
PFY tamamen farklı işlevleri olan iki farklı yoldan meydana gelir. İlk evre oksidatif yoldur, bu yoldaki reaksiyonlar geri dönüşümsüzdür, glukoz 6- fosfat (G6P), pentoz fosfat ve CO<sub>2</sub>'ye çevrilir ve NADP<sup>+</sup> da NADPH'a indirgenir. İlk evre oksidatif evre olarak da adlandırılır.



Şekil 1. Pentoz fosfat yolu oksidatif reaksiyonları (İşgör, Ankara Üniversitesi).

İkinci evrede oksidatif olmayan, geri dönüşümlü reaksiyonlar sonucunda pentoz fosfatlar glikolitik ara ürünlere dönüştürülür. Bu iki metabolik yoldaki reaksiyonların hem hızları hem de yönleri, reaksiyonların ürettiği ara ürünlerin ya da ürünlerin hücre döngüsündeki önemine ve ihtiyaç miktarına bağlı olarak değişir.

Bunların dışında PFY sonucunda nükleik asit sentezi için gerekli olan riboz-5-fosfat, aromatik yapıdaki amino asit ve bazı vitaminlerin sentezinde gerekli olan eritroz-4-fosfat ve bakteri hücre duvarları için gerekli olan sedoheptuloz-7-fosfat gibi çeşitli karbohidrat yapısındaki ürünler sentezlenir. NADPH, PFY'de indirgeyici güç görevi gören, kimyasal enerjiyi taşıma formudur.



Şekil 2. Pentoz fosfat yolu oksidatif olmayan reaksiyonları (İşgör, Ankara Üniversitesi).

Çoğalma hızı yüksek olan tümör hücrelerinin PFY hızı da yüksek olmaktadır. Bu da tedavi planlamasında, ilaç hedef enzimi olarak PFY enzimlerinin önemini göstermektedir.

**Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD)**, PFY'nin oksidatif reaksiyonlarının ilk basamak enzimidir. NADP<sup>+</sup>, G6PD'nin koenzimidir. Glukoz 6 fosfatı, geri dönüşümsüz olarak 6-fosfoglukonata dönüştürür. Bu basamak, PFY'nin düzenleyici basamağıdır. Vücutta bu enzimin varlığı, *Plasmodium falciparum* enfeksiyonuna karşı insan eritrosit hücrelerini korumaktadır (Barrett 1997).

G6PD eksikliği, oksidan maddelerin detoksifikasyonunun durması ya da azalmasına neden olduğu için bir anemi çeşidi olan hemolitik anemiye sebep olmaktadır. X kromozomunda 400'ün üzerinde farklı mutasyonlar sonucunda meydana gelen bu anomali dünya üzerinde en sık görülen enzim eksikliği anomalilerindedir. İnsan ömrünün kısaltan bu genetik bozukluk, kadın taşıyıcılarda *Plasmodium falciparum* sıtmaya karşı bağışıklık geliştirilmesine sebep olmaktadır.

G6PD'nin az üretilmesi ya da üretilmemesi, NADPH'ın da yeterince üretilmemesi anlamına gelmektedir. NADPH, redükte glutatyon havuzunun sürdürülebilir olması için elzemdir. Redükte glutatyon azalır, hücrelerde peroksitler ve serbest radikaller detoksifiye edilemez. Sonuçta reaktif oksijen türlerinde (ROS) aşırı artma meydana gelir.

Glutatyon, protein yapısındaki sülfhidril gruplarının redükte kalmasında da rol oynamaktadır. Bu proteinler arasında kanda oksijen taşınmasında görevli hemoglobin de vardır. Sülfhidril grupları redükte edilemezse oksidasyona uğrar ve proteinler denatüre olur. Denatüre proteinler kanda çözünemeyen yapılar oluşturur, eritrositlere tutunurlar. Bu tutunma sonucundaki reaksiyonlar eritrositlerin deforme olmasına ve dolaşımdan uzaklaştırılmalarına neden olur. G6PD eksikliğinin en ağır seyrettiği hücreler eritrositlerdir. Eritrositlerde NADPH üreten tek yol PFY'dir. Diğer hücrelerde glutatyonu indirgenmiş halde tutabilmek için alternatif yollardan NADPH sağlayabilmektedirler.

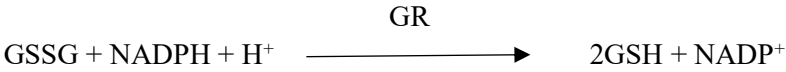
**6-Fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD)**, PFY'nin ikinci basamağını katalizleyen enzimidir. Bu basamakta D-ribuloz 5-fosfat, CO<sub>2</sub>, NADPH+H<sup>+</sup> oluşur.

Eritrositlerdeki 6PGD'nin, hücreleri malaryaya karşı koruduğu bulunmuştur (Bayoumi vd. 1986). 6PGD eksikliği hücrelerde 6-fosfoglukonat

birikmesine, glukoz metabolizmasının ve fosfoglukoz izomerazın tamamen durmasına neden olmakta, toksik etki göstermektedir. Bu nedenle kemoterapilerde hedef enzim olarak görev almaktadırlar.

**Glutasyon redüktaz (GR)**, hücrenin GSH/GSSG oranının korunmasını sağlayan reaksiyonu kataliz etmektedir. GSH/GSSG oranının eritrosit hücrelerinde 500/1 olması istenir. Oran düşerse eritrositler hemoliz olur (Keha ve Küfrevioğlu 2012). GSH glutasyonun indirgenmiş halidir, serbest radikalleri bertaraf eder, GSSG ise bu zararlı maddeleri hücreden uzaklaştırdıktan sonra antioksidan özelliği kalmamış haldeki glutasyon formudur.

GSH, detoksifikasyonda, peroksitlerin ve ilaçların hücrelerden uzaklaştırılmasında önemli rol oynar. Karaciğer mikrozomlarındaki sitokrom P-450 sistemi, bu reaksiyonların yüksek miktarda yapıldığı yerdir. Oksijene yeterli elektronun aktarılmadığı durumlarda süperoksit radikali ( $O_2^-$ ) veya peroksit ( $H_2O_2$ ) meydana gelir.

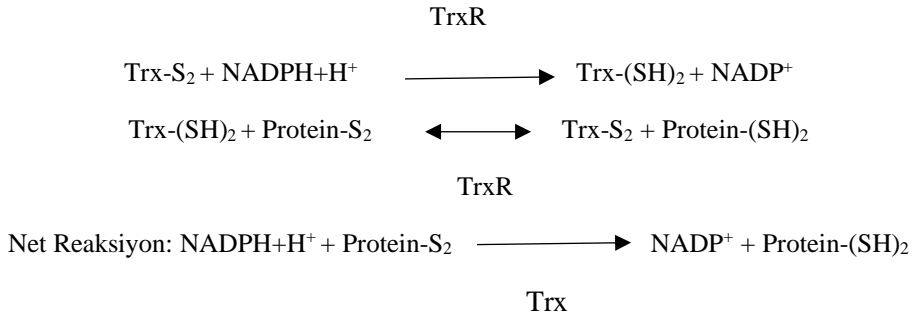


GR'nin bu reaksiyonunda kullandığı NADPH büyük oranda pentoz fosfat yolundan ve eritrositlerde bulunmayan  $NADP^+$ 'ya bağımlı çalışan malat dehidrogenazdan gelmektedir.

GR, kanser ve karaciğer hastalıklarının tespitinde, riboflavin yetersizliğinin tedavisinde ve bazı genetik hastalıkların teşhisinde kullanılmaktadır.

**Tiyoredoksin redüktaz (TrxR)**, sitoplazmada TrxR1, mitokondride TrxR2 ve testis hücrelerine spesifik olan tiyoredoksin glutasyon redüktaz formu (TrxR3 ya da TGR) olmak üzere memeli canlılarda 3 farklı izoenzimi bulunmaktadır. NADPH/ $NADP^+$  ile ilişkili diğer enzimler gibi TrxR'de hücrelerdeki redoks reaksiyonları ve oksidatif stresin zararlarının giderilmesi ile ilişkilidir. Enzimin aktivitesi, G6PD reaksiyonlarından üretilen NADPH ile düzenlenmektedir (Tufan 2019).

TrxR yapısında 2 adet sistein bulunur ve bu sisteinler geri dönüşümlü olarak oksitlenmeye ve indirgenmeye uğrarlar. İndirgenmiş TrxR [ $Trx-(SH)_2$ ], disülfid içeren oksitlenmiş proteinleri indirger; oksitlenmiş TrxR [ $Trx-(SS)$ ] ise NADPH kullanılan bir metabolik yol ile yeniden döngüye kazandırılır.



Diğerlerinden farklı olarak selenyum metabolizması ile de ilişkilidir. TrxR1 izoform selenoenzim olarak adlandırılmaktadır. Fakat kanser hücre hatlarında aşırı miktarda eksprese olmaktadır, bu da murin tümörlerini indüklemektedir (Tufan 2019).

TrxR'nin esnek C-terminalinde selenosistein içeren bir selenoenzim içermesi, kataliz reaksiyonu esnasında enzime çok kolay ulaşılmasını sağlar. Elektrofilik özelliği olan çok sayıda bileşik hem seçici hem de geri dönüşümsüz olarak TrxR'nin aktif bölgesinde modifikasyonlara yol açarlar.

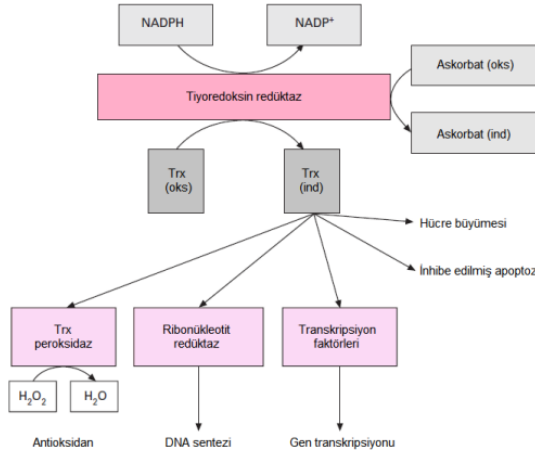
Kemoterapiye cevap vermeyen, direnç gösteren hücrelerde TrxR'nin çok yüksek miktarlarda bulunduğu tespit edilmiş, bu nedenle enzim apoptotik direnç ile ilişkilendirilmiştir (Tufan 2019).

Tiyoredoksin/tiyoredoksin redüktaz sistemi, kanserli hücrelerde aşırı eksprese olarak ribonükleotid redüktazın reaksiyonlarına fazlaca elektron sağlar. Bunun sonucunda mutasyona uğramış deoksiribonükleotid proteinlerin sayısı artar, dokuların büyüme hızı kontrolü kaybedilir ve kanser tedavisine direnç oluşur. Pankreas, akciğer, servikal, kolorektal ve hepatik kanserleri gibi kanserlerde TrxR'nin arttığı çalışmalarla doğrulanmıştır (Powis vd. 1998, Kakolyris vd. 2001, Welsh vd. 2002).

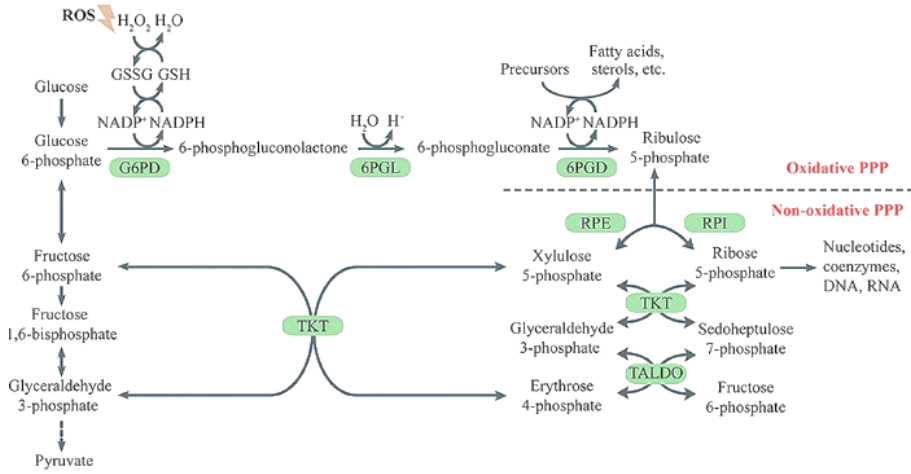
Enzimin eksikliği, bahsi geçen kanser türlerinde klinik sonuçların daha iyi olduğunu göstermiştir. Bu da TrxR'yi kanser ilaç tasarımlarında hedef haline getirmektedir.

Bazı durumlarda hücredeki TrxR miktarı değişmese bile aktivitesinin arttığı da rapor edilmiştir.





**Şekil 3.** İnsan metabolizmasında TrxR'nin etki ettiği reaksiyonlar (Mustacich ve Povis 2000)



**Şekil 4.** Pentoz fosfat yolu, glikolizin ilk adımından sonra dallanır, glikolitik ve glukoneojenik yolda fruktoz 6-fosfat ve gliseralehit 3-fosfata geri döner. PFY, biyosentez ve redoks düzenlemesi için R5P ve NADPH üretir (Gev vd. 2020).

**Afinite kromatografisi uygulaması;** bahsi geçen bu 3 enzimde biyokimyasal özellikleri nedeniyle aynı afinite kolonundan saflaştırılmaktadır. NADP<sup>+</sup> yapısal analogunun immobilize edildiği 2'5' ADP Sepharose 4B reçinesi, esas olarak kofaktör olarak NADP<sup>+</sup> gerektiren enzimlerin saflaştırılmasında kullanılır. Jel, üzerinde immobilize edilmiş bir NADP<sup>+</sup> yapısal analogudur. Bu kofaktörü gerektiren enzimleri bağlar ve immobilize eder.

2'5' ADP Sepharose 4B, NADP<sup>+</sup> bağımlı dehidrogenazlarla güçlü bir şekilde etkileşime girer. NAD<sup>+</sup> veya NADP<sup>+</sup> gradyanlarıyla seçici elüsyon, bu jel kullanılarak dehidrogenaz izoenzimlerinin kompleks karışımlarının çözülmesine izin vermiştir.

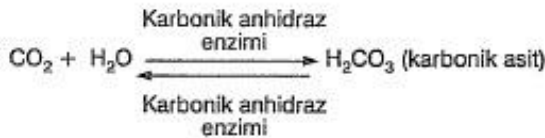
2', 5'-ADP Sepharose 4B jeli, kuru halde ticari olarak satılmakta, saf su ile yıkanarak şişirilmekte, su trompuyla havası alınarak kolona paketlenmektedir. Oldukça pratik bir uygulama ile hazır halde gelen kolon, uygun tamponlarla dengelendikten sonra kullanıma hazırdır.

Canlı dokunun hemolizati hazırlandıktan sonra kolona uygulanması esnasında NADP<sup>+</sup>/NADPH ile ilgili enzimler kolona tutunmakta, diğer moleküller yıkama tamponu ile kolondan uzaklaştırılmaktadırlar. Aynı kolona bağlı bu dört enzimin elüsyonları farklı tampon içerikleri ile yapılmaktadır. Yani tek bir kolon uygulaması ile dört farklı enzimin elüsyonu gerçekleştirilebilir.

### **Karbonik Anhidraz İzofomları ve Afinite Kromatografisi Uygulamaları**

Karbonik anhidrazlar (KA), vücutta pH ve sıvı dengesinin düzenlenmesinde rol oynarlar (Agarwal vd. 2019). KA'ların aktif merkezinde genellikle +2 yüklü bir metal iyonu bulunur, genellikle bu metal Zn<sup>+2</sup>'dir. Fakat farklı canlılarda Cd<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup>, Fe<sup>+2</sup> ve Mn<sup>+2</sup>'de olabilmektedir (Kupriyanova vd. 2017). İnsanlardaki KA'ların aktif bölgelerinde 3 adet histidinin yanı sıra bir hidroksit iyonuna bağlı Zn<sup>+2</sup> bulunur. İnsanlardaki KA grubu "α" olarak tanımlanır (Clare ve Supuran 2006). α-KA'nın 16 tane izoformu vardır, bunlar hücrelerin farklı yerlerinde bulunurlar (Guler vd. 2016).

KA'ların yapısındaki farklı aminoasitlere rağmen tümü aynı reaksiyonu katalizlemede görev alırlar. Bu reaksiyon aşağıda verilen karbondioksit ile bikarbonat moleküllerinin birbirine dönüştürüldüğü reaksiyondur.



KA'lar insan vücudunda önemli fizyolojik etkilere sahiptirler. Göz aköz suyunun salgılanmasında ortam pH'sının korunmasında rol oynamaktadır. KA

inhibisyonu bikarbonat iyonunun üretilmemesi anlamına gelmekte, bu da göz içindeki basıncın düşmesine neden olmaktadır (Agarwal vd. 2019).

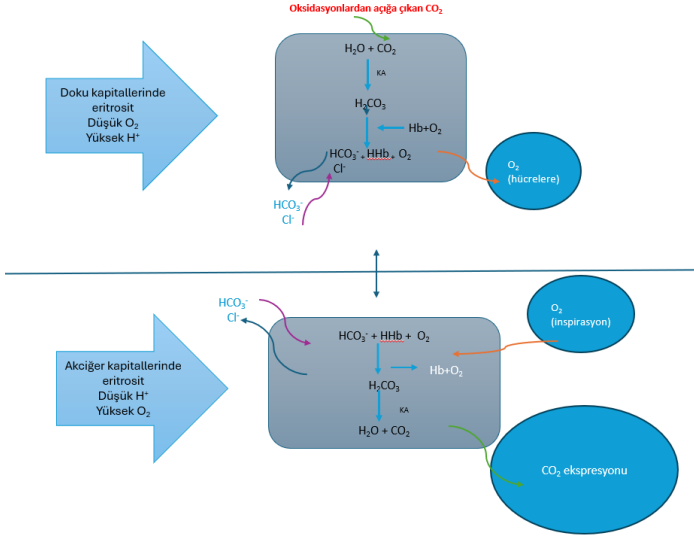
Aynı zamanda KA'lar sinir sistemi üzerinde de etkilidirler. Beyin oligodendrositlerinde ve glial hücrelerinde bulunurlar. Beyin omurilik sıvısı üretiminde görev alan koroid pleksusa katkı sağlar. KA aktif ise hafıza ile alakalı yapılarda bikarbonat miktarı çok hızlı artış gösterir. Sinaptik reseptör kanallarındaki bikarbonat konsantrasyonunu da artırdığı için sinir sinyallerinin iletilmesinde de rol oynar (Agarwal vd. 2019).

Kandan kaslara CO<sub>2</sub> taşınmasında da KA görevlidir. CO<sub>2</sub> kanda üç farklı formda taşınır, bunlar çözülmüş CO<sub>2</sub>, bikarbonat ve karbonat formlarıdır. Hücrelerde çeşitli reaksiyonlar sonucunda üretilen CO<sub>2</sub> kanda eritrositlerde KA aracılığı ile bikarbonata, akciğere ulaşan eritrositlerde tekrar H<sub>2</sub>O ve CO<sub>2</sub>'ye dönüştürülür. Buradan ventilasyon ile atılır (Agarwal vd. 2019).

Böbreklerin birçok seviyesinde KA üretilmektedir. Dokular pH değişiklikleri sonucunda kolay hasar görebilir, bu bölgelerdeki kanamalara karşı asit-baz dengesinde KA'lar görev yapar. Aynı şekilde kemik doku gibi sert dokularda bikarbonatın rezorpsiyonunda ve amonyum iyonunun çıkışı gibi fizyolojik dengelerin düzenlenmesinde KA'lar etkilidir (Agarwal vd. 2019).

KA-I vücut dokularında çok yaygındır, retina ve beyinde ödemlere neden olmaktadır (Gao vd. 2007). KA-II'de çeşitli dokularda yaygın olarak bulunur, böbrek dokusunda bozukluklara, epilepsiye, gözlerde glokoma, çeşitli dokularda ödeme ve yüksek irtifa hastalığına neden olmaktadır (Supuran 2008). KA-III oksidatif stres ile ilişkilendirilmektedir, romatoid artrit ve myastenia gravis gibi enflamatuvar hastalıklarına neden olmaktadır (Du vd. 2009). KA-IV ise göz ve göz içi basıncı ile ilişkilendirilmektedir. Retinitis pigmentosa hastalıkları, inme ve glokoma neden olmaktadır (Datta vd. 2009). KA-VA ve KA-VB, obezite ve obezite kaynaklı hastalıklarla ilişkilendirilmektedir (De ve Supuran 2007). KA-VI, salgı bezlerinde eksprese edilir. Burun, tükürük, gözyaşı, dil tat alma ve meme bezlerinde bulunur. Bu izoformun inhibisyonu tat almada bozukluklara neden olmaktadır. Ağız içi pH düzenlenmesinde rol oynar (Hassan vd. 2013). KA-VII boyun ve omurilik sıvısı üretiminde rol oynar, epilepsi tedavisinde ilaç hedef enzimi olarak tanımlanır (De Simone vd. 2009). KA-IX, vücuda yayılan bir tür böbrek kanseri hastalarında çok yüksek miktarda eksprese edilir. Görevi, idrarın asidik seviyesini ayarlamaktır. Hipoksik tümör teşhisinde KA-IX enzimi ölçülür. Bu tür tümörlerin metastazına da etki eder. Bu nedenlerle hipoksik tümör tedavisinde bilinen

hedef enzimdir (De Simone ve Supuran 2010). KA-XIII üreme ile ilgili doku ve organlarında, ince bağırsakta, timusta, dalakta, kolonda ve prostatta yaygındır. Gebeliğin engellenmesi için geliştirilen, hormonların kullanıldığı ilaçlarda hedeflenmektedir (Lehtonen vd. 2004; Kaya vd. 2023).



Şekil 4. Eritrositlerde KA reaksiyonları (Tusdata Biyokimya 2025)

### Sepharose-4B-L-Tirozin-Sülfanilamid Afinite Kromatografisi

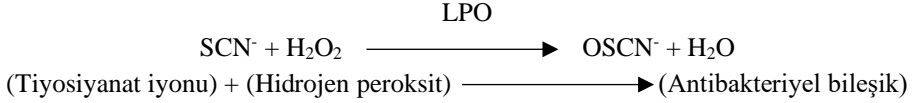
KA izoenzimleri için CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksi ticari olarak satılmaktadır. Katı halde bu matrikse, uzantı kolu görevi gören L-tirozin bağlanmaktadır. Soğuk ve yüksek alkali bir çözelti (pH 10) ile yıkanan jel üzerine, aynı tamponda çözülmüş L-tirozin eklenerek 4°C'de, önce manyetik karıştırıcı ile 2 saat karıştırılır, daha sonra 16 saat bekletilir. Bu süre sonunda L-tirozinlerin kolona bağlanmış olması beklenir. Bağlanmayan L-tirozinler, kolonun saf su ile yıkanması yolu ile uzaklaştırılır. pH 8,8 olan bir tampon içinde kolon materyali bekletilir.

Diğer taraftan 0 °C'deki HCl çözeltisi içinde sülfanilamid çözülür. Yine 0 °C'deki NaNO<sub>2</sub> çözeltisi ile yavaşça karıştırılır. Yaklaşık 10 dakika sonunda sülfanilamidin diazonyum tuzu elde edilmiş olur. Bu çözelti oda sıcaklığında kolon materyali üzerine damla damla çok yavaş bir şekilde eklenir. Bu esnada en düşük devirde manyetik karıştırıcı kullanılmalıdır. Kolon materyali ile sülfanilamid çözeltisi karıştırıldıktan sonra NaOH kullanılarak ortam pH'sı 9,5'a ayarlanır. Turuncumsu bir renk elde edilmelidir. Bundan sonraki

adımlarda kolona tutunmayan maddeler yıkanarak uzaklaştırılır ve uygun tamponlar ile kolon paketlenir.

Kolonun dengelenmesi ve saflaştırma işlemi için hazırlanması bittikten sonra homojenat kolona uygulanır. Tek seferde farklı elüsyon çözeltileri ile farklı KA izoenzimleri elüe edilebilir (Göksu vd. 2014).

## Laktopeksidaz



LPS'nin güçlendirilmesinin terapötik uygulamalar göstereceği düşünülmektedir. Ayrıca bu sistem elemanları gıda ya da kozmetik gibi ürünlere eklenebilir. LPO, DNA'da değişikliğe sebep olmaz, hatta belli şartlar altında antioksidan sisteme katkıda bulunur (Kaya vd. 2019).

Yenidoğan sağlığında, kimyasalların vücuda girmesi durumunda LPO'nun nasıl etkileneceği araştırılmalıdır. Bu nedenle bazı ilaç etken maddelerinin LPO üzerinde ne kadar etkili olduğu araştırılmıştır. (Şişecioğlu vd. 2011; Köksal 2019; Özyürek vd. 2020; Gerni vd. 2024). Ayrıca LPS'nin, dişlerde çürüme ve plak oluşumuna karşı etkili olduğu rapor edilen çalışmalar yapılmıştır. İçeriğinde LPS bulunan diş macunlarının, çocuklarda ağızda oluşan karyonejik bakterilerin büyümesini engellediği bulunmuş. Bazı gastrik patojen türlerin inhibisyonunda da LPS'nin etkisi gösterilmiş. Ayrıca kistik fibröz hastaları için nefes yolunda oluşabilen bakterilere karşı da yine LPS kullanılmıştır (Sujata vd. 2013).

LPO'da KA izomerleri gibi Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolonu kullanılarak saflaştırılmaktadır. Kolon hazırlama ve paketleme işlemleri aynı şekildedir. LPO'ya özel pH ortamı dengeleme ve yıkama tamponları ile sağlanır ve yine LPO için hazırlanan elüsyon tamponu ile elüe edilir.

## Glutasyon S-Transferaz ve Afinite Kromatografisi Uygulamaları

Glutasyon S-transferazlar (GST), elektrofilik özellik gösteren bileşikler ile glutasyonun reaksiyonunu katalizlerler. İnsan metabolizmasında tüm organlarda bulunurlar. Üç izoenzimi vardır ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\pi$ ).  $\alpha$  ve  $\pi$  izomeri insan böbrek hücrelerinde bulunur. GST $\alpha$ , böbrekte proksimal tübül hücre yapılarında bulunurken (Sundberg vd. 1994), GST $\pi$  izomeri ise distal tübül

hücrelerinde ve toplayıcı kanallarda bulunur (Bruning vd. 1999). Sağlıklı bireylerde idrarda GST izomerlerine rastlanmamalıdır, bu nedenle idrarda GST tespit edilmesi böbrek hücrelerinde hasara işaret eder.  $\alpha$  ve  $\pi$  izomerleri kimyasallar, ilaçlar ya da anestezi maddelerinin neden olduğu nefrotoksisitenin ve akut transplant reddinin en erken göstergeleridir. İnfrarenal aortik anevrizma tedavisi gören hastaların idrarında GST/ kreatinin oranı da değişmektedir. Erken doğan bebeklerin idrarlarında GST $\pi$  miktarının yüksek olduğu da görülmüştür. İdrardaki bu iki izomerin aktivitesi uzun süre stabil kalmaktadır, bu nedenle bekletilmiş örneklerde de tayini kolaylıkla yapılabilmektedir (Uslu 2005).

GST'ler ayrıca hücreleri kansere ve hasara karşı detoksifiye edici özellikleri vardır (Taslimi vd. 2020; Turkan vd. 2021). Ksenobiyotik ya da endojen yapıdaki birçok bileşik hücre dışı boşluklara oksitlenerek atılır. Atıldıklarında anyonik gruplara dönüştürülürler. Bu anyonik yapılar sülfatlar, glutatyon ya da glukuronat olabilir (Güller vd. 2020; Naldan vd. 2020).

Ayrıca vücuda alınan ilaç ya da kimyasalların sitotoksik etkisini, glutatyona konjugasyon yolu ile azaltılmasında yine GST'lerin rolü vardır (Ceylan vd. 2019). Ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda da görev alırlar, bu nedenlerle kanser ilacı tasarımı ve keşfinde hem GST hem de GSH hedef olmaktadır (Aksoy 2019).

Çeşitli tümör türlerinde GST'lerin aşırı eksprese edilmesi, multipl skleroz, nörodejeneratif hastalıklar ve astımın tedavisinde de hedef enzim olarak tanımlanmışlardır (Türkeş vd. 2021).

### **Glutatyon-Sefaroz Afinite Kromatografisi**

GST'nin afinite jel uygulamasında glutatyon-sefaroze jeli kullanılır. Katı halde satılan jel materyali buzdolabında saf su ile şişirilir, bu işlem bir gece boyunca sürer. Süre sonunda su trompuyla havası alınan jel, önce saf su ile daha sonra dengeleme tamponu ile yıkanır ve saflaştırma işlemine hazır hale getirilir.

GST'nin elüsyonu 5-10 mM aralığında hazırlanmış GSH çözeltisi ile yapılır. Genelde 1'er mM farkla hazırlanmış 5 farklı çözelti kullanılır. Eğer imkân varsa gradiyent mikseri ile de elüsyon yapılabilir. Gradyent mikseri iki farklı çözeltiyi birbirine gradiyentli olarak karıştıran ve kolona gönderen bir cihazdır. GSH ile tampon çözeltinin gradiyentli karışması için kullanılabilir (Şekil 6).



**Şekil 5.** Gradyent mikseri (Carloerba)

## KAYNAKÇA

- Agarwal T, Singla RK, Garg A. 2019. Carbonic anhydrases and their physiological roles. International Conference on Multidisciplinary Sciences 5th Edition, Duluth, USA.
- Aksoy M., Karaman M, Güller P, Güller U, Küfrevioğlu Oİ. 2019. Curr. Enzyme Inhib., 15, 197–205.
- Bailon P, Ehrlich GK, Fung WJ, Berthold W. 2013. Humana Press, pp. 1-6, New Jersey into the function, ligand binding and inhibition . Int J Biochem Mol Biol. 2013; 4(3): 108–128. Published online.
- Barrett, M P. 1997. The pentose phosphate pathway and parasitic protozoa. Parasitol Today.13(1):11-6.
- Bruning T, Sundberg AGM, Birner G. 1999. Glutathione alpha as a marker of tubular damage after trichloroethylene exposure. Arch Toxicol; 73: 246-254.
- Carloth. <https://www.carloth.com/com/en/gel-blot-handling/gradient-mixer/p/n858.1> gradient mikseri
- Ceylan H, Demir Y, Beydemir Ş. 2019. Protein Pept. Lett., 26, 364–370.
- Clare BW, Supuran CT. 2006. A perspective on quantitative structureactivity relationships and carbonic anhydrase inhibitors. Expert Opin Drug Metab Toxicol., 2:113-137
- Datta R, Waheed A, Bonapace G, Shah GN, Sly WS. 2009. Pathogenesis of retinitis pigmentosa associated with apoptosis- inducing mutations in carbonic anhydrase IV. Proc Natl Acad Sci U S A. 106:3437-3442.
- De Simone G, Scozzafava A, Supuran CT. 2009. Which carbonic anhydrases are targeted by the antiepileptic sulfonamides and sulfamates? Chem Biol Drug Des.74:317-321
- De Simone G, Supuran CT. 2007. Antiobesity carbonic anhydrase inhibitors. Curr Top Med Chem.7:879-884
- De Simone G, Supuran CT. 2010. Carbonic anhydrase IX: biochemical and crystallographic characterization of a novel antitumor target. Biochim Biophys Acta. 1804:404-409.
- Doonan S, Cutler P. 2004. General Strategies. In: Protein Purification Protocols, P. Cutler (Editor), Humana Press, pp. 1-13, New Jersey
- Du AL, Ren HM, Lu CZ, Tu JL, Xu CF, Sun YA. 2009. Carbonic anhydrase III is insufficient in muscles of myasthenia gravis patients. Autoimmunity.42:209-215.
- Gao BB, Clermont A, Rook S, et al. 2007. Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. Nat Med.13:181-188.
- Ge T, Yang J, Zhou S, Wang Y, Li Y, Tong X. 2020. The Role of the Pentose Phosphate Pathway in Diabetes and Cancer. Front. Endocrinol. 11:365. doi: 10.3389/fendo.2020.00365
- Gerni S, Cansu Öztürk, Namık Kılınç, Hasan Özdemir, Ö. İrfan Küfrevioğlu. 2024. Unveiling the Suppressing Potential of Phenolic Compounds on Bovine Milk Lactoperoxidase. ChemistrySelect, 9, e202304844. doi.org/10.1002/slct.2023048
- Göksu S, Naderi A, Akbaba Y, Kalın P, Akıncioğlu A, Gülçin İ, Durdagi S, Salmas RE. 2014. Carbonic anhydrase inhibitory properties of novel benzylsulfamides



- using molecular modeling and experimental studies. *Bioorg Chem.* 56:75-82. doi: 10.1016/j.bioorg.2014.07.009. Epub 2014 Aug 1. PMID: 25159522.
- Guler OO, Capasso C, Supuran CT. 2016. A Magnificent Enzyme Superfamily: Carbonic Anhydrases, Their Purification and Characterization. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.*, 31(5): 689-694.
- Güller U, Önalın Ş, Arabacı M, Karataş B, Yaşar M, Küfrevioğlu Öİ. 2020. *Fish Physiol. Biochem.*, 46, 2169–2180.
- Hage DS, Clarke W. 2004. Affinity Chromatography: An Overview. In: *Encyclopedia of Chromatography*, J. Cazes (Editor), Marcel Dekker, pp. 40-43, New York
- Hage, DS, 1999. Affinity Chromatography: A Review of Clinical Applications. *Clinical Chemistry*, 45, 593-615.
- Hassan M, Shajee I, Waheed B, Ahmad A, Sly WS. 2013. Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 21(6), 1570-1582.
- Hedhammar M, Karlström AE, Hober S. 2013. Chromatographic methods for protein purification. [http://www.biotech.kth.se/courses/gru/courselist/BB2040\\_ENG/ChromMethods.pdf](http://www.biotech.kth.se/courses/gru/courselist/BB2040_ENG/ChromMethods.pdf)
- İŞGÖR GY/Ankara Üniversitesi/ link: <http://80.251.40.59/ankara.edu.tr/isgor/index.htm>
- Kakolyris S, Giatromanolaki A, Koukourakis M, Powis G, Souglakos J, Divridis E., et al, 2001. Thioredoxin expression is associated with lymph node status and prognosis in early operable nonsmall cell lung cancer, *Clin Cancer Res.*, 7:3087-91.
- Kaya B, Metin S, & Korkmaz R, Şimşek E. 2023. Carbonic Anhydrase Inhibitors and Their Pharmacological Applications. In: Karaman, E. (ed.), *International Research in Health Sciences-II*. Özgür Publications. DOI: <https://doi.org/10.58830/ozgur.pub74.c368>
- Kaya E, Oktay Başeğmez Hİ, Baydemir Peşint G. 2019. Laktoperoksidaz enzimini inhibe eden maddelerin belirlenmesi için yapılan bazı çalışmaların incelenmesi ve enzimin uygulama alanlarının örneklendirilmesi. *Artıbilim: Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi* 2(2), 1-8
- Keha EE. Küfrevioğlu Öİ. 2021. *Biyokimya, Aktif yayınları, Erzurum.*
- Konak Üİ, Turhan İ, Certel M. 2014. Proteinlerin Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması. *Akademik Gıda* 12(2) 79-87.
- Korkmaz İN. 2022. In Vitro Inhibition Effects of 2-Amino Thiazole Derivatives on Lactoperoxidase Enzyme Activity. *Cumhuriyet Sci. J.*, 43(1) 33-37 DOI: <https://doi.org/10.17776/csj.1017247>
- Köksal Z. 2019. Inhibition Effects of Selected Thiophene-2-Sulfonamides on Lactoperoxidase. *Drug and Chemical Toxicology*, In Press. DOI: 10.1080/01480545.2019.1600532.
- Kumpalume P, Ghose S. 2003. Chromatography: The High-Resolution Technique for Protein Separation. In: *Isolation and Purification of Proteins*, R. Hatti-Kaul and B. Mattiasson (Editors), Marcel Dekker, pp. 29-56, New York.
- Kupriyanova E, Pronina N, LOS D. 2017. Carbonic anhydrase-A universal enzyme of the carbon-based life. *Photosynthetica*, 55.1: 3-19.
- Lehtonen J, Shen B, Vihinen M, et al. 2004. Characterization of CA XIII, a novel member of the carbonic anhydrase isozyme family. *J Biol Chem.*279:2719-2727

- Mustacich D, Powis G. 2000. Thioredoxine Reductase Review article, *Biochem J.* 346: 1-8.
- Naldan M, Işık M, Demir Y, Duran HE, Beydemir Ş, Kara D, Tunç A. 2020. *Turkish J. Sci. Health*, 1, 9–19.
- Ostrove S. 1990. Affinity Chromatography: General Methods. In: *Methods in Enzymology*, J.N. Abelson and M.I. Simon (Editors), Academic Press, pp. 357-371, New York.
- Özyürek İ, Kalın R, Özdemir H. 2020. D-Penisilamin, D-Penisilamin disülfid ve N-Asetil-D-penisilamin'in Laktoperoksidaz Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkileri. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 10(2), 1146-1153. <https://doi.org/10.21597/jist.669441>
- Powis G, Kirkpatrick DL, Angulo M, Baker A. 1998. Thioredoxin redox control of cell growth and death and the effects of inhibitors, *Chem-Biol Interact*, 111-112: 23-34.
- Rosenberg, IM. 2005. Affinity Chromatography. In: *Protein Analysis and Purification (Benchtop Techniques)*, Birkhäuser, pp. 363-381, Basel.
- Sharma S, Singh AK, Kaushik S, Sinha M, Singh RP, Sharma P, Sirohi H, Kaur P, Singh TP. 2013. Lactoperoxidase: structural insights into the function, ligand binding and inhibition. *Int J Biochem Mol Biol.* 13;4(3):108-28. PMID: 24049667; PMCID: PMC3776144.
- Sundberg AGM, Appelkuist EL, Backman L, Dallner G. 1994. Urinary p class glutathione transferase-pi as an indicator of tubular damage in the human kidney. *Nephron*; 67: 308-316.
- Supuran CT. 2008. Diuretics: from classical carbonic anhydrase inhibitors to novel applications of the sulfonamides. *Curr Pharm Des.*14:641-648
- Şişecioglu M, Uğuz MT, Çankaya M, Özdemir H, Gülçin İ. 2011. Effects of Ceftazidime Pentahydrate, Prednisolone, Amikacin Sulfate, Ceftriaxone Sodium and Teicoplanin on Bovine Milk Lactoperoxidase Activity. *International Journal of Pharmacology*, 7: 79-83.
- Taslimi P, Işık M, Türkan F, Durgun M, Türkeş C, Gülçin İ, Beydemir Ş. 2020. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 39, 5449–5460.
- Thomas JH, Gilham B. 1983. *Wills' Biochemical Basis of Medicine* Wright, London. 297-302.
- Tufan A. 2019. Schiff Bazı Altın Komplekslerinin TrxR Enzim İnhibitör Rolünün Araştırılması. *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.*
- Türkan F, Calimli MH, Kanberoğlu GS, Karaman M. J. 2021. *Biomol. Struct. Dyn.*, 39, 3277–3284.
- Türkeş C, Kesebir AÖ, Demir Y, Küfrevioğlu Öİ, Beydemir Ş. 2021. Calcium Channel Blockers: The Effect of Glutathione S-Transferase Enzyme Activity and Molecular Docking Studies. *ChemistrySelect*, 6(40), 11137-11143.
- Uslu S. 2005. Clinical Significance of Enzymuria and Microproteinuria. *Türk Klinik Biyokimya Derg;* 3(3): 125-141
- Welsh SJ, Bellamy WT, Briehl MM, Powis G. The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 2002 Sep 1;62(17):5089-95. PMID: 12208766.

- Wilchek, Chaiken I. 2000. An Overview of Affinity Chromatography. In: Affinity Chromatography Wilchek, M., Chaiken -Methods and Protocols,
- Zou H, Luo Q, Zhou D. 2001. Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 49: 199-240.

## **BÖLÜM 2**

### **ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ MEKANİZMALARI VE BAKTERİYAL ENZİMLER**

Öğr. Gör. Dr. Erva RAKICI<sup>1</sup>

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.14564949>

---

<sup>1</sup> Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, Rize, Türkiye. [erva.esmer@erdogan.edu.tr](mailto:erva.esmer@erdogan.edu.tr), Orcid ID: 0000-0002-4464-4882



## GİRİŞ

Mikrobiyoloji, “antibiyotik” terimini Fransızcadan almıştır, “antibiose” kelimesi 19. yüzyılın sonlarında canlı organizmaların özellikle de mikroorganizmalar üzerinde zararlı etkileri olan maddelerini tanımlamak için kullanılmıştır (Laskin vd. 2002). Daha sonra, antibiyotikleri mikroorganizmalar tarafından üretilen ve diğer mikroorganizmaların büyümesini engelleme ve ölümüne neden olma kapasitesine sahip kimyasal bileşikler olarak tanımlamışlardır (Kaur Sodhi and Singh, 2022). Bir antibiyotiğin hedefi bakteriler olsa da bazı antibiyotikler mantarlara ve protozoanlara karşı da etkilidir, ancak antibiyotiklerin virüsler üzerinde nadiren etkisi vardır (WHO, 2024). Antibiyotikler, insan sağlığı, tarım, hayvancılık ve balık çiftliklerini kapsayan çeşitli sektörlerde büyümeyi destekleyici, proflaktik ve terapötik ajanlar olarak uygulanarak yaygın bir uygulama alanı bulmuştur.

Antibiyotikler tıpta en başarılı tedavi şekillerinden birini temsil etmektedir. Fakat antibiyotiklerin etkinliği, onlara dirençli bakterilerin sayısının giderek artması sebebiyle tehlikeye girmektedir. Yüksek morbidite ve mortalite oranlarının ve artan tedavi maliyetleri nedeniyle de antibiyotik direnci, küresel halk sağlığını tehdit eden en önemli unsurlardan biri olarak kabul edilmektedir. Sorunun büyüklüğü son zamanlarda birçok ulusal ve uluslararası kuruluşu halk sağlığını korumak için harekete geçirmiştir (Lin vd. 2015). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), küresel antibiyotik direnci salgınının sağlık alanında yüzyıllık ilerleme ve sürdürülebilir kalkınma hedeflerine ulaşılması için önemli bir tehdit oluşturduğu uyarısında bulunmuştur (Sarkar vd. 2021). Mevcut tahminlere göre, çeyrek yüzyıl içinde bakterilerin neredeyse %100'ünün tıpta kullanılan çoğu antibiyotiğe karşı dirençli olması öngörülmektedir (Naghavi vd. 2024).

Antimikrobiyal ilaçlar, doğal ve sentetik bileşiklerin 16 sınıfını içeren en büyük farmasötik ilaç grubunu temsil eder. Antibiyotik sentezi doğada 2 milyar yıldan fazla bir süredir mevcuttur. Bu süre boyunca bakteriler, antibiyotiklerin toksik etkilerine karşı direnç mekanizmaları geliştirmektedir. Direnç, bir antibiyotiğin yapısıyla ilgisi olmayan adaptif bir süreç olarak ortaya çıkabilir veya antibiyotiklerin etkisi altındaki mikroorganizmaların dirençli bakteri suşlarının seçilmesi sonucu gelişebilir (Holmes vd. 2016). Direncin, hastanın bakteriyi inhibe etmek veya öldürmek için gerekli antibiyotik konsantrasyonuna ulaşamadığı durumlarda ortaya çıkması daha olasıdır. Mikroorganizmalar bir antibiyotiğe karşı doğal olarak dirençli olabilir ya da

maruz kaldıktan sonra direnç kazanabilir. Direnç gelişimi, gen mutasyonları veya direnç genlerinin doğrudan aktarımı yoluyla gerçekleşebilir; direnç genlerini aktarımı plazmidler gibi hareketli genetik elementler üzerinde gerçekleşebilir, konjugasyon yoluyla aktarılabilir veya transformasyon yoluyla çıplak DNA'nın doğrudan aktarımı ya da transdüksiyon adı verilen benzer DNA'nın bakteriyofajlar yoluyla aktarımı yoluyla aktarılabilir (Halawa vd. 2023).

Antimikrobiyallerin direnç mekanizmalarını anlayabilmek için öncelikle etki mekanizmalarını bilmek gerekir. Antimikrobiyaller, etki mekanizmalarına göre şu şekilde gruplara ayrılabilir: 1) hücre duvarı sentezini inhibe edenler, 2) hücre membranını depolarize edenler, 3) protein sentezini inhibe edenler, 4) nükleik asit sentezini inhibe edenler ve 5) bakterilerdeki metabolik yolları inhibe eden antibiyotiklerdir.

### **1) Hücre Duvarı Sentezini İnhibe Eden Ajanlar**

Hücre duvarının organik sentezi ve yapısı bakteriler ve mantarlar arasında farklıdır, hücre duvarı her iki mikrobun iç ozmotik basıncındaki değişiklikleri sınırlamaya yardımcı olur. Hücre duvarı memeli hücrelerinde bulunmadığından, bu yapı konak dokusu üzerindeki etkiyi en aza indiren önemli bir antimikrobiyal hedefdir (Levinson, 2016).

#### **a) Beta-Laktam İçeren Antimikrobiyaller**

Beta-laktam antibiyotikler kimyasal yapılarında beta-laktam halkası bulunan antibiyotiklerdir. Bu gruba penisilin türevleri, sefalosporinler ve sefamisinler, monobaktamlar, karbapenemler ve karbapenemler dahildir. Çoğu beta-laktam antibiyotik, bakteriyel organizmada hücre duvarı biyosentezini inhibe ederek çalışır ve en yaygın kullanılan antibiyotik grubudur.

Beta-laktam grubu antibiyotikler bakterisidal etki gösterir, bakterinin peptidoglikan tabakasının sentezini inhibe eder. Peptidoglikan sentezinin son aşaması olan transpeptidasyon aşamasında, penisilin bağlayıcı proteinler (PBP) daha kolay bir şekilde gerçekleşmesini sağlar. PBP'lerin antibiyotiklere karşı afinitesi ve sayısı bir bakteriden diğerine farklılık gösterebilir. Beta-laktam grubu antibiyotikler peptidoglikan tabakasının NAM/NAG-peptit alt birimlerindeki aminoasit kalıntıları olan D-alanil-D-alaninin yapısal bir analogudur. Bu benzerlik PBP'lerin aktif bölgesine (Ser403) bağlanmalarını sağlar, bu oluşan peptidoglikan tabakasının çapraz bağlanmasına

(transpeptidasyon) engel olarak duvar sentezini bozar. Peptidoglikan sentezini inaktive edilmesi, hücrenin lizisine yol açarak daha yüksek iç ozmotik basınç yaratır (Fisher vd. 2005).

### **b) Vankomisin**

Vankomisin glikopeptid sınıfında bir antibiyotiktir. Bakterilerde hücre duvarı sentezini önleyerek etki gösterir. Penisilinlerle etki mekanizmasındaki temel fark, her birinin bağlanma bölgesidir. Beta-laktam antibiyotikler, etkilerini gösterebilmek için PBP'lere bağlanır. Vankomisin ise, peptidoglikan hücre duvarının bir aminoasit dizisi olan asil-D-ala-D-ala kısmına bağlanır. Bu bağlanmayla, farklı etki mekanizması gerçekleşir.

Vankomisin peptidoglikan duvarının çapraz bağlarının oluşmasını engellemek için büyük boyutunu kullanır. Bu çapraz bağlantılar hücre duvarını güçlü tutmak için önemlidir ve bu bağlantı olmadığı takdirde hücre duvarı oluşumu doğru bir şekilde gerçekleşmez. Hücre duvarının doğru şekilde oluşmadığını tespit eden bakteri tarafından daha fazla peptidoglikan üretilerek onarım gerçekleşir. Bu durum sonucunda aşırı peptidoglikan üretilir ve peptidoglikanı parçalayan yıkıcı enzimler aktif hale gelir ve geri bildirim döngüsü aktifleşir. Bu yıkıcı enzimler daha sonra hücre duvarı yıkımına neden olabilir (Scheffers ve Pinho, 2005). Bakteri hücresi bölünme sırasında hücre duvarı olmaması nedeniyle sıvı olarak şişer ve patlar, hücre ölümü gerçekleşir. Vankomisin de penisilin grubu antibiyotikleri gibi bakterisidal etkili bir antibiyotiktir. Vankomisin büyük boyutu ve pozitif yükünden dolayı, Gram-negatif bakterileri lipit çift tabakasını aşamaz bakteri hücrelerine giremez, bu sebeple Gram-negatiflere etkisizdir. Gram-pozitif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarda kullanılmaktadır. Vankomisinin boyutu oral kullanımını da kısıtlar, sistemik bir enfeksiyon için uygulanacak olan miktar gastrointestinal sistemden kana geçemez (Kohanski vd. 2010).

### **c) Basitrasin ve Sikloserin**

Basitrasin, bakteriyel peptidoglikan hücre duvar inşasında rol oynayan bir molekül olan C55 izoprenil pirofosfat ve Gram-pozitiflerin peptidoglikan tabasının büyümesinde görevli baktoprenol pirofosfatın defosforilasyonunu engeller, bu moleküllerin ikisi de peptidoglikan alt birimlerinin sitoplazmadan hücre duvarına taşınmasını sağlar (Stone ve Strominger, 1971). Basitrasin dar spektrumlu bir antibiyotiktir, Gram-pozitifler üzerinde etkilidir. Sikloserin ise, hücre içinde D-alanil-D alanin sentezini inhibe eder.



Sikloserin bakterilerde hücre duvarı sentezini inhibe eden bir antimikrobiyal ajandır. D-alaninin siklik bir analogudur, peptidoglikan sentezinde alanin rasemaz (Alr) ve D-alanin:D-alanin ligaz (Ddl) enzimlerine karşı etkilidir. Bu enzimlerin inhibisyonu D-alanin kalıntılarının oluşmamasına neden olur ve böylece peptidoglikan sentezi inhibe olur (Prosser ve Carvalho, 2013). Tüberkülozu tedavi etmek için kullanılan bir antibiyotiktir. Oral yolla kullanılır.

## 2. Hücre Membranını Depolarize Eden Ajanlar

Daptomisin *Streptomyces roseosporus* tarafından üretilen, yapısı 13 üyeli amino asit siklik lipopeptiddir. Bu antibiyotik Gram-pozitif bakterilerin duvarında bol miktarda bulunan lipoteikoik asidin içinde transmembran kanallar oluşturur, bakteri membranının sentezini bloke eder. Bu kanallar potasyum ve magnezyum gibi hücre içi iyonların ATP'nin sızmasına ve makromoleküllerin sentezinin engellenmesine yol açar (Cha vd. 2003). Gram-pozitif koklara karşı hızlı bakterisidal aktiviteye sahip, yüksek molekül ağırlıklı siklik bir lipopeptid olan daptomisin, komplike deri ve deri yapısı enfeksiyonlarının tedavisinde ve *S. aureus*'un neden olduğu bakteriyemi tedavisi için onaylanmıştır (Silverman vd. 2005).

Polimiksin B ve E (kolistin) Gram-negatif bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılır. Bakteriyel hücre zarını parçalayarak etki gösterir. Polimiksinler duyarlı olan bakterilerin hücre duvarına bağlanır ve dış ve iç membranların  $K^+$  ve  $Na^+$  iyonlarına karşı geçirgenliğini değiştirir. Hücrenin ozmotik bariyeri kaybolur ve bakteriler lizis yoluyla öldürülür. İnsanlarda enfeksiyonların tedavisi için polimiksin kullanımının artması ile, çoğunlukla LPS'nin lipid A bileşeninde bakteriyel modifikasyonlara sahip dirençli suşlar ortaya çıkmıştır. Çin'den gelen MDR *E. coli* 'de, hayvanlardan elde edilen izolatlarda, *mcr-1* genine sahip olan plazmid aracılı direnç tanımlanmıştır. Diğer direnç mekanizmaları arasında LPS'nin tamamen kaybı ve eflüks pompası mekanizmaları yer almaktadır (Jane vd. 2021).

## 3. Mikrobiyal Protein Sentezi Yoluyla Etki Eden Ajanlar

### a) Aminoglikozidler

Aminoglikozidler, Gram-pozitif aktinomisetlerden elde edilen yarı sentetik ya da doğal olarak üretilebilen geniş spektrumlu bakterisidal bir antibiyotik sınıfıdır. Aminoglikozidler, 30S ribozomun 16S ribozomal RNA'sındaki A bölgesine yüksek afinite ile bağlanır, protein sentezini inhibe

eder. Aminoglikozid sınıfı üyeleri A bölgesi üzerindeki farklı bölgeler için farklı özgülüklere sahiptir, hepsi konformasyonunu değiştirir. Bu etkileşim sonrasında, aminoaçil transfer RNA'sının iletilmesinde kodon yanlış okumasına neden olarak yanlış translasyona neden olur. Bu da hataya eğilimli protein sentezine yol açarak yanlış amino asitlerin bir polipeptit halinde bir araya gelmesine ve daha sonra serbest kalarak hücre zarına ve başka yerlere zarar vermesine yol açar. Bazı aminoglikozidler protein sentezindeki uzamayı bloke ederek veya doğrudan başlatmayı engelleyerek de etkileyebilir. Bağlanma mekanizması ve bunu izleyen aşağı yönlü etkiler kimyasal yapıya göre değişir, ancak tüm aminoglikozidler hızlı bakterisidal etki gösterir. Streptomisin artık birçok ülkede yaygın olarak kullanılmasa da, özellikle tüberküloz, bubonik veba ve bruselloza karşı klinik kullanım için keşfedilen ilk aminoglikozid olması nedeniyle tarihsel bir öneme sahiptir. Diğer aminoglikozidler çeşitli Gram-negatif çubuklara karşı kullanılır. Aminoglikozidler GI kanalda zayıf emildikleri için genellikle oral yolla verilmez (Krause vd. 2016).

### **b) Tetrasiklinler**

Tetrasiklinler, aminoglikozidler gibi, 30S ribozomal alt üniteye bağlanır, mikrobiyal protein sentezini inhibe eder. Bakteriyostatik etki gösteren antibiyotiklerdir. Tetrasiklinlerin bakteriyel başlatma kompleksinin A bölgesi, 30S ribozomal alt birimine geri dönüşümsüz olarak bağlanmak yerine, transfer RNA'nın (tRNA) alıcı bölgeye bağlanmasını geri dönüşümlü olarak inhibe ederek polipeptit büyümesini engeller. Ayrıca kalsiyum ve demiri de şelatlar ve bu nedenle kalsiyum ve demir takviyesi formlarıyla aynı anda alınmamalıdır. Kalsiyum şelasyonu yoluyla dişlerde renk değişikliğine yol açması nedeniyle bebeklerde ve hamilelikte kullanılması uygun değildir (Chopra ve Roberts, 2001). Tigesiklinler olarak adlandırılan daha yeni bir antibiyotik sınıfı yapısal olarak tetrasiklinlere benzer ve ayrıca 30S ribozomal alt ünitesine bağlanır. Klinik olarak tigesiklin, komplike karın içi enfeksiyonları ve deri/yumuşak doku enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılır ve özellikle MRSA'ya karşı etkilidir (Zhanel vd. 2006).

### **c) Kloramfenikol**

İlk kez *Streptomyces venezuelae* türü bakterilerin metabolizma ürünü olarak elde edilen, günümüzde yapay yollarla oluşturulur, geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Kloramfenikol, 50S ribozomal alt birimine bağlanarak protein

sentezini inhibe ederek ve doğrudan bakteriyel protein oluşumunu önleyerek çalışır. 50S ribozomal alt birimini de hedef alan diğer antibiyotiklerden farklı olarak, kloramfenikol transfer RNA'nın 50S ribozomu üzerindeki A bölgesine bağlanmasını engeller (Bethesda, 2017). Oküler enfeksiyonlardan sorumlu birçok bakteriye karşı bakteriyostatiktir, menenjitte neden olan *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* ve *Streptococcus pneumoniae* mikroplarına karşı yüksek konsantrasyondan kullanıldığında bakterisidal aktivite gösterir (Le vd. 2019).

#### **d) Makrolidler ve Klindamisin**

Makrolidler homojen yapıdadır, ana yapılarında makrosiklik lakton halkası ve buna eklenmiş olan şekerlerden oluşmaktadır. İçerdikleri lakton halkası sayısına göre sınıflandırılırlar. Bakterilerde RNA bağımlı protein sentezini geri dönüşümlü olarak inhibe ederek bakteriyostatik etki ederler. Bu etkinliklerini 70S ribozomun 50S alt birimine bağlanıp aynı yere t-RNA molekülünün bağlanmasına ve peptid zincirinin uzamasına engel olurlar. Makrolidler lökositler içinde aktif olarak yoğunlaşır ve bu nedenle enfeksiyon bölgesine taşınırlar (Tenson vd. 2003).

Klindamisin, bir dizi bakteriyel enfeksiyonun tedavisinde kullanılan bir linkozamid antibiyotik ilacıdır. Birincil olarak bakteriyostatik etkiye sahiptir, yüksek konsantrasyonlarda bakterisidal olabilir. Makrolidlere benzer şekilde ribozomal translokasyonu inhibe ederek bakteriyel bir protein sentezi inhibitörüdür. Bunu, bakteriyel 50S ribozom alt biriminin rRNA'sına bağlanarak ve diğerlerinin yanı sıra oksazolidinon, plöromutilin ve makrolid antibiyotiklerinin bağlanma bölgeleriyle örtüşerek yapar, bu bağlanma geri dönüşümlüdür (Spizek ve Rezanka, 2004).

#### **e) Oksazolidinonlar**

Oksazolidinonlar, 50S ribozomal alt birime bağlanarak hem bakteriyel hem de arkeal protein sentezini inhibe eder; bu etki mekanizması diğer protein sentez inhibitörlerinininkinden farklıdır çünkü çok erken bir aşamada gerçekleşir. Oksazolidinonlar, gelen aminoasit tRNA'nın aminoasit kısmının bağlanmasına ve/veya konumlandırılmasına müdahale ederek peptidil transferaz merkezindeki (PTC) A-bölge cebiyle etkileşime girer. Sonuç olarak, bu antibiyotikler ribozomal-fMet-tRNA başlatma kompleksinin oluşumunu, peptidil-tRNA'nın A bölgesinden P bölgesine taşınmasını ve dolayısıyla mRNA translasyonunu önler (Bialvaei vd. 2016). Oksazolidinonlar, son 30

yılda çok sayıda ilaç şirketi tarafından geliştirilen sentetik bir antimikrobiyal sınıftır. Linezolid, MRSA, VRE, ÇİD pnömokoklar ve ÇİD mikobakteriler dahil olmak üzere Gram-pozitif organizmaların neden olduğu ciddi enfeksiyonları tedavi etmek için yeni yüzyılın başlarında klinik kullanıma sunulan oksazolidinonların ilk üyesidir (Shaw ve Barbachyn, 2011).

#### **4) Nükleik Asit Sentezi Yoluyla Etki Eden Ajanlar**

##### **a) Florokinolonlar**

Kinolon antibiyotikler, 4-kinolon maddesiyle ilişkili bisiklik bir çekirdek yapıyı paylaşan geniş spektrumlu bakteriyosidallerin büyük bir grubunu oluşturur. Kullanımda olan kinolon antibiyotiklerin neredeyse tamamı, kimyasal yapılarında bir flor atomu içeren ve hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif bakterilere karşı etkili olan florokinolonlardır. Dünya çapında en yaygın kullanılan antibiyotiklerden biri olan siprofloksasin buna bir örnektir (Anderson ve Macgowan, 2003). Florokinolonlar bakterilerde DNA giraz ve DNA topoizomerazı inhibe eden bakterisidal ilaçlardır. Bakteriye DNA'nın çözülmesini ve çoğalmasını önleyerek DNA replikasyonuna müdahale eder. Spesifik olarak, nükleaz aktivitesini etkilenmeden bırakırken, süper sarmallığı sağlamak için DNA'yı kesen tip II topoizomerazların, DNA girazın ve topoizomeraz IV'ün ligaz aktivitesini inhibe ederler (Andriole, 2005).

##### **b) Rifamisinler**

Rifamisinler ilk olarak 1957 yılında keşfedilen ve tüberküloz (TB) tedavisinde kullanımlarıyla bilinen bir antibiyotik sınıfıdır, *Amycolatopsis rifamycinica* bakterisi tarafından doğal olarak ya da yapay olarak sentezlenen bir gruptur (Adams vd. 2021). Rifamisinler bakteriyel RNA polimerazın beta alt birimine seçici olarak bağlanarak onu RNA sentezinde inaktif hale getirir. Rifamisinlerin seçiciliği, benzer memeli enzimi için çok zayıf bir afiniteye sahip olmalarına bağlıdır (Campbell vd. 2001).

#### **5) Metabolik Yolu İnhibe Eden Ajanlar**

##### **a) Sülfonamidler ve Trimetoprim**

Sülfonamidler, sitozin haricindeki tüm azotlu bazların nükleik asit sentezi için gerekli olan tetrahidrofolik asidin erken bir öncüsü olan p-aminobenzoik asidi (PABA) rekabetçi bir şekilde inhibe eder (Henry, 1943). Sülfonamidler PABA'yı inhibe ederek dihidropteroat sentezi inaktif hale getirir.

Bu nedenle sülfonamidler bakteriyostatiktir ve bakterilerin büyümesini ve çoğalmasını engeller, ancak onları öldürmez. Nükleik asitler hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda mevcuttur, fakat memeli hücreleri PABA içeren öncü enzimlere sahip değildir ve nükleik asit sentezi için metabolik gereksinimlerini karşılamak için eksojen folik aside ihtiyaçları vardır. İnsanlar, bakterilerin aksine, folatı (B<sub>9</sub> vitamini) diyet yoluyla dışarıdan alırlar. Böylece sülfonamidlerin memeli hücrelerini hedeflemesini sınırlamış olur. Sülfonamidler genellikle trimetoprim ile kullanılır (Cudmore vd. 2014). Trimetoprim de benzer şekilde tetrahidrofolik asit üretimini engeller, ancak mekanizması farklıdır, yolaktaki daha sonraki bir enzimi yani dihidrofolat redüktazın inhibisyonunu ile gerçekleşir. Bakteriyel DNA ve RNA oluşumunu önleyerek ve bakteriyel hücre ölümüne yol açarak çalışır. Böylece, sülfonamid ve trimetoprim sinerjik olarak etki eder. Trimetoprim kullanımının bir dezavantajı, folik asit sentezini inhibe ettiğinden, kemik iliği baskılanmasına sebep olarak megaloblastik anemiye yol açmasıdır (Henry, 1943). Trimetoprim ilk olarak 1962 yılında kullanılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü'nün Temel İlaçlar Listesi'nde yer almaktadır (WHO, 2021). Trimetoprime karşı direnç hızla artmaktadır, yine de birçok ülkede hala birinci basamak antibiyotiktir.

## ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ

Antibiyotik direnci, bakteriler ilaçların kendilerine karşı kullandığı mekanizmalardan kurtulma yeteneğine sahip olduklarında veya geliştirdiklerinde ortaya çıkar. Antibiyotiğe dirençli patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi genellikle daha zordur ve nüksederek önemli morbidite ve mortaliteye neden olabilir. Küresel olarak yılda yaklaşık 700.000 ölümün antimikrobiyal dirençten kaynaklandığı ve bu sayının 2050 yılına kadar yılda 10 milyona çıkabileceği tahmin edilmektedir (O'Neill, 2014). Bakteriler tarafından sergilenen antibiyotik direnci içsel, edinsel veya adaptif olabilir (Lee, 2019).

- **Doğal Direnç:** Bakterinin doğal özellikleri nedeniyle ortaya çıkan direnç olarak tanımlanır. Gram-negatif bakterilerin dış zarın az geçirgen olması nedeniyle glikopeptidlere direnci örnek verilebilir.
- **Kazanılmış direnç:** Daha önce duyarlı olan bir bakterinin ya bir mutasyon ya da dış bir kaynaktan yeni genetik materyal kazanımı (yatay gen transferi) yoluyla bir direnç mekanizması edinmesi

durumunda ortaya çıkan direnç olarak tanımlanmaktadır (Munita ve Arias, 2016).

- **Adaptif direnç:** Belirli bir çevresel sinyal (stres, büyüme durumu) tarafından indüklenen bir veya daha fazla antibiyotiğe karşı direnç olarak tanımlanır. Doğal ve kazanılmış direncin aksine, adaptif direnç geçicidir. Bakterilerin antibiyotik mücadelesine daha hızlı yanıt vermesini sağlar, indükleyici sinyal ortadan kalktığında genellikle eski haline geri döner (Lee, 2019).

Antibiyotiklere karşı direnç farklı yollarla meydana gelebilir; antibiyotik yıkımı veya modifikasyonu, hedef değişiklikleri (hedef değiştirme, hedef bölge mutasyonları, hedef bölge enzimatik değişiklikleri, hedef bölge koruması, hedefin aşırı üretimi veya hedefin ortadan kaldırılması) ve azalmış geçirgenlik ve/veya artmış akış nedeniyle azalmış antibiyotik birikimi sonucu oluşabilir. Bir diğer yol olarak, antibiyotik direnci bakteri hücresinin global adaptasyonunun bir sonucu oluşabilir.

## **ANTİBİYOTİK DİRENÇ MEKANİZMALARI**

### **1. Bakteriler Hücrelerinde Antibiyotik Birikimini Önlenmesi**

#### **1.1 İlaçların Bakteri Hücrelerine Girişini Sınırlandırılması**

Gram-negatif bakterilerin dış membranlarında porin kanalları bulunur. Bu kanallar, yalnızca Beta-laktamlar ve kinolonlar gibi belirli antibiyotiklerin bakteri hücrelerine girmesine izin veren kapı bekçileri görevi görür. Bu nedenle, bakteriyel porinlerin sayısının azalması, bu antibiyotiklerin hücreye girişini engelleyerek bu ilaçlara karşı direncin artmasına yol açabilir (Darby vd. 2023).

#### **1.2. Antibiyotiklerin Bakteri Hücrelerini Hızlı Terk Etmesi**

Bakterilerin sitoplazmik membranında bulunan efluks pompaları ile, bakteri hücrelerindeki solüt dengesinin korunmasında çok önemli bir rol oynamaktadır. Ancak bu pompalar, ilaçları amaçlanan hedeflerine ulaşmadan daha önce bakteri hücrelerinden uzaklaştırırsa antibiyotik direncine neden olabilir. Polimiksin dışındaki birçok antibiyotiğe karşı dirençte efluks pompalarının etkisi olduğu bulunmuştur (Fernandez-Billon vd. 2023). Efluks sistemlerinin altında yatan mekanizmaların aydınlatılması, antibiyotik direnciyle mücadelede yeni stratejiler sağlayabilir.

## **2. Bakteriler Antibiyotiklerin Hedef Molekülünü Değiştirmesi**

Antibiyotikler belirli molekülleri hedef almak üzere tasarlanmıştır, ancak en ufak bir değişiklik bile bağlanmalarını engelleyerek antibiyotik direncinin ortaya çıkmasına neden olabilir.

### **2.1. Ribozomal 30S veya 50S Alt Birimlerindeki Modifikasyonlar**

Bakterilerin protein üretimini etkileyen ilaçlara karşı direnç geliştirebilmesinin bir yolu da ribozomal 30S veya 50S alt birimlerini değiştirmektir. Bu tür direnç aminoglikozidler, tetrasiklin, makrolidler, kloramfenikol, linkozamidler ve streptogramin gibi antibiyotiklerde görülmektedir (Fernandez-Billon vd. 2023).

### **2.2. Penisilin Bağlayıcı Proteindeki (PBP) Değişiklikler**

Penisilin bağlayıcı proteinler (PBP'ler), bakteriyel hücre duvarlarının biyosentezi sırasında peptidoglikan öncüllerinin çapraz bağlanmasında hayati bir rol oynayan transpeptidazlar olarak bilinen enzimlerdir. Bu enzimler beta-laktam antibiyotiklerin birincil hedefleridir, yapılarındaki veya işlevlerindeki herhangi bir değişiklik bu ilaçlara karşı bakteriyel dirence yol açabilir (Kaur Sodhi ve Singh, 2022).

### **2.3. DNA Giraz Ve Topoizomeraz Enzimlerindeki Değişiklikler**

DNA giraz ve topoizomeraz enzimlerinin DNA replikasyonunda çok önemli rolü vardır. Kinolon antibiyotikleri özellikle bu iki enzimi hedef alır, bu nedenle bu enzimlerin yapılarındaki modifikasyonlar kinolonlara karşı bakteriyel dirence yol açabilir (Fabrega vd. 2009).

### **2.4. D-Alanil-D-Alanin'deki Değişiklikler**

Peptidoglikan öncülleri, hücre duvarı oluşumunda çok önemli bir rol oynayan D-alanil-D-alanin olarak bilinen bir dipeptit kalıntısı içerir. Bu D-alanil-D-alanin kalıntısında meydana gelen değişiklikler, onu hedef alan antibiyotiklere karşı bakteriyel dirence yol açmaktadır (Dzidic vd. 2008).

## 2.5. Ribozomun Korunması

Tetrasiklin antibiyotikleri ribozomal 30S alt birimini hedef almaktadır, ancak ribozom bu antibiyotiklerin etkisine karşı koyabilecek savunma mekanizmalarına sahiptir (Kang ve Park, 2015).

## 2.6. Rifampisin Antibiyotiğine Direnç Kazandıran RNA Polimeraz Enziminde Değişiklik

Rifampisin, bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan bir antibiyotiktir. DNA bağımlı RNA polimeraz enziminin beta-alt birimine bağlanarak, bakterilerdeki RNA sentez sürecini inhibe eder. RNA polimerazın beta-alt birimini kodlayan *rpoB* genindeki mutasyonlar, RNA polimeraz enziminin antibiyotiğin RNA sentezini inhibe etme kabiliyetini azaltmasına neden olur, böylece rifampisine direnç kazanılmış olur (Patel vd. 2023).

## 3. Bakteriyel Enzimler

Bakteriyel enzimlerin direnç gelişimindeki rolü oldukça çok yönlüdür ve birkaç temel mekanizmayı içerir. Hücre duvarı biyosentezinde yer alan enzimlerin yanı sıra nükleik asitlerin ve metabolitlerin sentezi, antibiyotikler için doğrudan bir hedef görevi görür. Direnç mekanizması bu enzimlerdeki yapısal değişikliklerle ilişkilidir. Diğer bir mekanizma ise antibiyotiklerden etkilenen yapısal unsurların enzimatik modifikasyonu ile ilişkilidir. Büyük bir enzim grubu, antibiyotiklerin yapısını değiştirerek veya yok ederek onları etkisiz hale getirir (Wright, 2005).

Antibiyotik yapısının tahrip edilmesi veya değiştirilmesi, enzimlerin yer aldığı en yaygın direnç mekanizmalarından biridir. Katalizledikleri reaksiyonların türüne bağlı olarak, bu direnç mekanizmasında yer alan enzimler hidrolazlar, transferazlar ve oksidoredüktazlar olarak alt bölümlere ayrılır.

### 3. 1. Hidrolazlar

Beta-laktamları ve mikrolitleri yok eden beta-laktamaz ve makrolid esterazlar, antibiyotik hidrolizini katalize eden en yaygın enzimlerdir. Aynı mekanizma fosfomisin ve kloramfenikole karşı dirençten de sorumludur (Wright, 2005).



### **3.1.1. Beta-laktamazlar**

Tüm beta-laktam antibiyotiklerin ortak yapısal unsuru olan beta-laktam halkasındaki amid bağımlı hidrolize eder. Şu anda 2.000'den fazla üyeden oluşan bir enzim süper ailesi oluştururlar. Amino asit dizilerinin homolojisine göre, dört moleküler sınıfa ayrılır. A, C ve D sınıfı enzimler serin hidrolazlar, B sınıfı enzimler ise metalloenzimlerdir (Egorov vd. 2018).

Beta-laktamazların evrimi iki ana mekanizma ile gerçekleşmektedir: 1) bilinen enzimlerin genlerinde yeni mutasyonların ortaya çıkması ve yeni bir yapıya sahip enzimlerin ortaya çıkması. 2) beta-laktamazların yüksek mutasyon oranı ve genlerinin mobil genetik elementler üzerindeki lokalizasyonu, küresel bir tehdit oluşturan dirençli bakterilerin hızla yayılmasına katkıda bulunur. Aynı anda sekiz beta-laktamaz geni taşıyabilen bakteriler tespit edilmiştir. En yaygın sınıf A beta-laktamazlar: CTX-M, TEM, SHV ve KPC laktamazlardır (Bush ve Bradford, 2016).

Aktif bölgedeki anahtar mutasyonlar enzimin etkinliğini artırır ve ikinci ila dördüncü nesil sefalosporinlerin büyük moleküllerini hidrolize edebilmesini sağlar. Bu formlar genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (ESBL'ler) olarak bilinir (Grigorenko vd. 2018).

Sınıf C beta-laktamazlar sefalosporinleri etkin bir şekilde hidrolize eder. Başlangıçta, bu sınıf kromozomal genler tarafından kodlanan ve indüklenebilir tipte bir ekspresyona sahip enzimler tarafından temsil edilse de, daha sonra, hareketli elementler üzerinde bulunan genler tarafından kodlanan enzimler keşfedilmiştir. D sınıfı beta-laktamazlar OXA tipi beta-laktamazları içerir ve serin beta-laktamazlar arasında yapısal olarak en çeşitli enzimlerdir. Moleküler sınıf B, heterojen bir metallo-beta-laktamaz (MBL) ailesidir. Aktif bölgelerinde bir veya iki çinko iyonu içerirler, monobaktamlar hariç neredeyse tüm beta-laktam antibiyotikleri hidrolize ederler ve şelatlama ajanları tarafından inhibe edilirler. Yeni MBL varyantlarının (NDM tipi karbapenemazlar) ortaya çıkması ve bunların serin beta-laktamazlarla birlikte eksprese edilmesi, tüm beta-laktam antibiyotiklere dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Nordmann vd. 2012).

### **3.1.2. Makrolit esterazlar**

Eritromisin, azitromisin gibi 14 ve 15 üyeli makrolidlere karşı direnç, lakton halkasının hidrolizini katalize eden esterazların üretiminden kaynaklanır. 16-üyeli makrolidler bu enzimlerin substratları değildir. Eritromisin esterazlar EreA ve EreB en büyük klinik öneme sahiptir. EreA daha sınırlı bir substrat özgüllük profiline sahiptir. Azitromisin ve telitromisini hidrolize etmez. Aktivitesi şelatlama ajanları tarafından inhibe edilen metal bağımlı bir enzimdir. EreB, telitromisin hariç neredeyse tüm 14 ve 15 üyeli makrolidlere direnç kazandırır. Bu esterazları kodlayan genler plazmidler üzerinde yerleşmiştir ve genellikle diğer antibiyotik direnç genleriyle ilişki içerisinde (Dinos, 2017).

### **3.2. Transferazlar**

Çeşitli kimyasal gruplara kovalent bağlayarak AMD moleküllerini modifiye eden transferazlar, enzimlerin geniş bir süper ailesini temsil eder (Wright, 2005). Substrat özgüllüğü, modifikasyon türü ve etki mekanizması açısından farklılık gösteren gruplara ayrılmaktadır.

#### **3.2.1. Aminoglikozid Modifiye Edici Enzimler**

Aminoglikozid antibiyotiklerin enzimatik modifikasyonu, aminoglikozid modifiye edici enzimler (AME'ler) tarafından uygulanan en yaygın direnç mekanizmasıdır. Birkaç yüz farklı AME bilinmektedir; neredeyse her enzim, benzersiz substrat özgüllüğüne sahip olan ve aminoglikozidleri belirli pozisyonlarda modifiye eden birkaç izoenzimle temsil edilir. AME genler hareketli genetik elementlerde yerleşmiştir; bu nedenle hızla yayılır (Ramirez ve Tolmasky, 2010).

Reaksiyon tipine göre üç AME ailesi ayırt edilir: N-asetiltransferazlar (AAC), O-fosfotransferazlar (ANT) ve O-adeniltransferazlar (ANT). AAC enzimleri asetil-CoA'yı bir kofaktör olarak kullanır; ATP veya GTP, APH ve ANT için fosfat grupları ve adenin donörü olarak görev yapar. AAC enzimleri en yaygın ve klinik açıdan en önemli enzimlerdir; aminoglikozidleri (1, 3, 2' veya 6') pozisyonlardan birinde asetilleyen 48 AAC varyantı izole edilmiştir (Zhou vd. 2021). Aynı anda birkaç pozisyonda aminoglikozidleri asetilleyebilen benzersiz Eis enzimi de bilinmektedir.

### 3.2.2. Kloramfenikol Modifiye Eden Enzimler

Kloramfenikol asetiltransferazların (CAT) üretimi, kloramfenikole karşı bakteriyel direncin ana mekanizmasıdır. Bu enzimler, asetil-CoA'nın asetil grubunun kloramfenikol veya sentetik analoglarının (tiyamfenikol, azidamfenikol) 3-hidroksil grubuna eklenmesini katalizleyerek antibiyotik molekülünün ribozomlara bağlanmasını önler.

CAT'ler florofenikolü inaktive etmez, çünkü molekülündeki 3-hidroksil grubu bir flor atomu ile yer değiştirmiştir. Farklı türlerdeki CAT'lerin amino asit dizileri arasındaki homoloji %10'u geçmez. CAT genleri kromozomlar üzerinde bulunabilir, daha tipik olarak diğer direnç genleriyle birlikte transpozonların bileşenleri olarak plazmidler üzerinde bulunurlar (Egorov vd. 2018). CAT genlerinin ekspresyonu kloramfenikol tarafından indüklenir. Asetilasyona ek olarak, kloramfenikolün inaktivasyonu O-fosforilasyon ile sağlanabilir. Bu antibiyotik direnci mekanizması, bir kloramfenikol üreticisi olan *S. venezuelae* için tanımlanmıştır (Schwarz vd. 2004).

### 3.2.3. Makrolid Fosfotransferazlar (MPH'ler) Enzimleri

2'-OH grubuna bir fosfat grubu ekleyerek makrolidlerin yapısını değiştirir. Fosfat grubu nükleozit trifosfatlar, en tipik olarak da GTP tarafından sağlanır. Şimdiye kadar bu gruptan yedi farklı enzim tanımlanmıştır. MPHA tercihen 14 ve 15 üyeli makrolidlerin fosforilasyonunu katalize ederken, MPHB 14 ve 16 üyeli makrolidleri modifiye eder. MPH'yi kodlayan genler, makrolidlere ve diğer antibiyotik sınıflarına karşı direnci kodlayan diğer genleri içeren hareketli genetik elementler üzerinde bulunur.

Makrolid fosfotransferazları kodlayan genlerin ekspresyonu indüklenebilir (mphA) ya da konstitütif (mphB)'dir (Miklasińska-Majdanik, 2021). Makrolid glikoziltransferazlar, makrolid halkasının 2'-OH grubunu glikozilleyerek makrolidleri inaktive eder, kofaktör olarak UDP glukoz kullanır. Streptogramin asetiltransferazlar, bağlanmamış bir hidroksil grubunun asetilasyonu yoluyla sadece streptogramin A'yı inaktive eder; etki mekanizmaları CAT'inkine benzer (Wright, 2005). Bu enzimleri kodlayan genler, stafilokoklar ve enterokoklar dahil olmak üzere birçok Gram-pozitif patojende tanımlanmıştır.

### 3.2.4. Fosfomisin Modifiye Edici Enzimler

FosA, FosB ve FosX epoksidazların yanı sıra FomA ve FomB kinazlar fosfomisini inaktive eden metaloenzimlerdir. Epoksidazlar, çeşitli substratlar ekleyerek fosfomisinin epoksi grubunu (oksiran halkası) açar. FosA, glutatyonun yanı sıra  $Mn^{2+}$  ve  $K^+$  metal iyonlarını kofaktör olarak kullanan glutatyon-S-transferazdır. Bacillithiol veya L-Cys, FosB'deki tiyol grubunun kaynağı olarak işlev görür; ayrıca bu enzimler kofaktör olarak  $Mg^{2+}$  kullanır (Castaneda-García vd. 2013). FosX enzimi  $Mn^{2+}$  bağımlı bir hidrolazdır. *P. aeruginosa*'daki FosA ve *S. aureus*'taki FosB kromozomal genler tarafından kodlanırken, bu enzimleri kodlayan genlerin çoğu plazmid üzerinde yerleşmiştir. FomA ve FomB kinazlar, ATP ve  $Mg^{2+}$  iyonlarını kofaktör olarak kullanarak fosfomisin molekülüne bir veya iki fosfat grubu ekler (Silver, 2011). Bu enzimler fosfomisin üreticisi *S. wedriensis*'ten izole edilmiştir.

### 3.2.5. Rifamisin Modifiye Edici Enzimler

Birkaç enzim grubu, bir antibiyotik molekülünün RNA polimerazın beta-alt birimine bağlanmasında rol oynayan anahtar grup olan hidroksil grubunu modifiye ederek rifamisinleri inaktive eder. Arr grubuna ait  $NAD^+$  bağımlı enzimler ADP-ribozilasyonu, RPH kinazlar fosforilasyonu ve glikoziltransferazlar glikozilasyonu katalize eder (Surette vd. 2021).

### 3.3. Monooksijenazlar

Flavin bağımlı monooksijenaz TetX, geniş spektrumlu antibiyotik tigesiklin de dahil olmak üzere tüm tetrasiklinlere direnç kazandırır. TetX, varlığında tetrasiklinlerin monohidroksilasyonunu katalize eder. NADPH,  $O_2$  ve  $Mg^{2+}$  'nin molekül içi siklizasyonuna ve molekülün ayrışmasına yol açar. Flavine bağımlı monooksijenazlar Rox, 2. pozisyonundaki naftil grubunu oksitleyerek rifamisinleri inaktive eder, bu da halka açılmasına ve antibiyotik molekülünün lineer haline gelmesine neden olur (Volkers vd. 2011).

## **KAYNAKÇA**

- Adams, R. A., G. Leon, N. M. Miller, S. P. Reyes, C. H. Thantrong, A. M. Thokkadam, A. S. Lemma, D. M. Sivaloganathan, X. Wan and M. P. Brynildsen (2021). "Rifamycin antibiotics and the mechanisms of their failure." *J Antibiot (Tokyo)* 74(11): 786-798.
- Andersson, M.I, MacGowan, A.P. (2003). Development of the quinolones. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 51.
- Andriole, V. T. (2005). "The quinolones: past, present, and future." *Clin Infect Dis* 41 Suppl 2: S113-119.
- Bethesda, (2017). Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; Chloramphenicol.
- Bush, K. and P. A. Bradford (2016). "beta-Lactams and beta-Lactamase Inhibitors: An Overview." *Cold Spring Harb Perspect Med* 6(8).
- Campbell, E. A., N. Korzheva, A. Mustaev, K. Murakami, S. Nair, A. Goldfarb and S. A. Darst (2001). "Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase." *Cell* 104(6): 901-912.
- Castañeda-García, A., J. Blázquez and A. Rodríguez-Rojas (2013). "Molecular Mechanisms and Clinical Impact of Acquired and Intrinsic Fosfomycin Resistance." 2(2): 217-236.
- Cha, R., R. G. Grucz, Jr. and M. J. Rybak (2003). "Daptomycin dose-effect relationship against resistant gram-positive organisms." *Antimicrob Agents Chemother* 47(5): 1598-1603.
- Chopra, I. and M. Roberts (2001). "Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance." *Microbiol Mol Biol Rev* 65(2): 232-260 ; second page, table of contents.
- Cudmore, J., M. Seftel, J. Sisler and R. Zarychanski (2014). "Methotrexate and trimethoprim-famethoxazole: toxicity from this combination continues to occur." *Can Fam Physician* 60(1): 53-56.
- Darby, E. M., E. Trampari, P. Siasat, M. S. Gaya, I. Alav, M. A. Webber and J. M. A. Blair (2023). "Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited." *Nat Rev Microbiol* 21(5): 280-295.
- Dinos, G. P. (2017). "The macrolide antibiotic renaissance." *Br J Pharmacol* 174(18): 2967-2983.
- Dzidic, S., Suskovic, J., and Kos, B. (2008). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technol. Biotechnol.* 46 (1), 11–21.
- Egorov, A. M., M. M. Ulyashova and M. Y. Rubtsova (2018). "Bacterial Enzymes and Antibiotic Resistance." *Acta Naturae* 10(4): 33-48.
- Fàbrega, A., S. Madurga, E. Giralt and J. Vila (2009). "Mechanism of action of and resistance to quinolones." 2(1): 40-61.
- Fernandez-Billon, M., A. E. Llambias-Cabot, E. Jordana-Lluch, A. Oliver and M. D. Macia (2023). "Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." *Biofilm* 5: 100129.
- Fisher, J. F., S. O. Meroueh and S. Mobashery (2005). "Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity." *Chem Rev* 105(2): 395-424.

- Grigorenko, V. G., M. Y. Rubtsova, I. V. Uporov, I. V. Ishtubaev, I. P. Andreeva, D. S. Shcherbinin, A. V. Veselovsky and A. M. Egorov (2018). "Bacterial TEM-Type Serine Beta-Lactamases: Structure and Analysis of Mutations." *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry* 12(2): 87-95.
- Halawa, E. M., M. Fadel, M. W. Al-Rabia, A. Behairy, N. A. Nouh, M. Abdo, R. Olga, L. Fericean, A. M. Atwa, M. El-Nablaway and A. Abdeen (2023). "Antibiotic action and resistance: updated review of mechanisms, spread, influencing factors, and alternative approaches for combating resistance." *Front Pharmacol* 14: 1305294.
- Henry, R. J. (1943). "The Mode of Action of Sulfonamides." *Bacteriol Rev* 7(4): 175-262.
- Holmes, A. H., L. S. P. Moore, A. Sundsfjord, M. Steinbakk, S. Regmi, A. Karkey, P. J. Guerin and L. J. V. Piddock (2016). "Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance." *Lancet (London, England)* 387(10014): 176-187.
- Jane E. Sykes, Mark G. (2021). Papich, in *Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat (Fifth Edition)*.
- Kang, H.-K. and Y. Park (2015). "Glycopeptide Antibiotics: Structure and Mechanisms of Action." *jbv* 45(2): 67-78.
- Kaur Sodhi, K. and C. K. Singh (2022). "Recent development in the sustainable remediation of antibiotics: A review." 3-4: 100008.
- Kohanski, M. A., D. J. Dwyer and J. J. Collins (2010). "How antibiotics kill bacteria: from targets to networks." *Nature Reviews Microbiology* 8(6): 423-435.
- Krause, K. M., A. W. Serio, T. R. Kane and L. E. Connolly (2016). "Aminoglycosides: An Overview." *Cold Spring Harb Perspect Med* 6(6).
- Laskin, A. I., Bennett, J. W., and Gadd, G. M. (2002). *Adv. Appl. Microbiol.* 51.
- Lee, J.-H. (2019). "Perspectives towards antibiotic resistance: from molecules to population." *Journal of Microbiology* 57(3): 181-184.
- Le, T., Bhushan, V., Sochat ,M., Chavda, Y., Zureick, A., Kalani, M., Kallianos, K. (2018) *First Aid for USMLE STEP*. McGraw-Hill Education.
- Levinson ,W.E. (2016). *Review of Medical Microbiology and Immunology*.14th ed. McGraw Hill Education.
- Lin, J., K. Nishino, M. C. Roberts, M. Tolmasky, R. I. Aminov and L. Zhang (2015). "Mechanisms of antibiotic resistance." 6.
- Miklasińska-Majdanik, M. (2021). "Mechanisms of Resistance to Macrolide Antibiotics among *Staphylococcus aureus*." 10(11): 1406.
- Munita, J. M. and C. A. Arias (2016). "Mechanisms of Antibiotic Resistance." 4(2): 10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015.
- Nordmann, P., M. Gniadkowski, C. G. Giske, L. Poirel, N. Woodford, V. Miriagou and C. European Network on (2012). "Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae." *Clin Microbiol Infect* 18(5): 432-438.
- O'Neill, J., (2014). Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Rev Antimicrob Resis* 20:1-16.
- Patel, Y., V. Soni, K. Y. Rhee and J. D. Helmann (2023). "Mutations in *rpoB* That Confer Rifampicin Resistance Can Alter Levels of Peptidoglycan Precursors and Affect beta-Lactam Susceptibility." *mBio* 14(2): e0316822.

- Prosser, G. A. and L. P. S. de Carvalho (2013). "Kinetic mechanism and inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* d-alanine:d-alanine ligase by the antibiotic d-cycloserine." 280(4): 1150-1166.
- Ramirez, M. S. and M. E. Tolmasky (2010). "Aminoglycoside modifying enzymes." *Drug Resist Updat* 13(6): 151-171.
- Scheffers, D. J. and M. G. Pinho (2005). "Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies." *Microbiol Mol Biol Rev* 69(4): 585-607.
- Sarkar, R., Kaushik, P. B., Champak, D., Palash, J. S., and Dutta, S. (2021). Bacteriophage therapy to combat antibiotic resistance: a brief review. *Pharma Innovation J.* 10 (5), 389–394.
- Schwarz, S., C. Kehrenberg, B. Doublet and A. Cloeckaert (2004). "Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol." *FEMS Microbiology Reviews* 28(5): 519-542.
- Shaw, K. J. and M. R. Barbachyn (2011). "The oxazolidinones: past, present, and future." *Ann N Y Acad Sci* 1241: 48-70.
- Silver, L. L. (2011). "Challenges of Antibacterial Discovery." 24(1): 71-109.
- Silverman, J. A., L. I. Mortin, A. D. Vanpraagh, T. Li and J. Alder (2005). "Inhibition of daptomycin by pulmonary surfactant: in vitro modeling and clinical impact." *J Infect Dis* 191(12): 2149-2152.
- Spížek, J., Režanka, T. (2004). Lincomycin, clindamycin and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 64 (4): 455–64.
- Stone, K. J. and J. L. Strominger (1971). "Mechanism of Action of Bacitracin: Complexation with Metal Ion and C55-Isoprenyl Pyrophosphate." 68(12): 3223-3227.
- Surette, M. D., P. Spanogiannopoulos and G. D. Wright (2021). "The Enzymes of the Rifamycin Antibiotic Resistome." *Acc Chem Res* 54(9): 2065-2075.
- Tenson, T., M. Lovmar and M. Ehrenberg (2003). "The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome." *J Mol Biol* 330(5): 1005-1014.
- Volkers, G., Palm, G.J., Weiss, M.S., Wright, G.D., Hinrichs, W. (2011). Structural basis for a new tetracycline resistance mechanism relying on the TetX monooxygenase. *FEBS Lett.* 585 (7): 1061–6.
- World Health Organization (WHO). (2024). Better use of vaccines could reduce antibiotic use by 2.5 billion doses annually, says WHO". Retrieved 11 October 2024.
- World Health Organization (2021). World Health Organization model list of essential medicines: 22nd list (2021). Geneva: World Health Organization.
- Wright, G. D. (2005). "Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification." *Adv Drug Deliv Rev* 57(10): 1451-1470.
- Zahedi Bialvaei, A., M. Rahbar, M. Yousefi, M. Asgharzadeh and H. Samadi Kafil (2016). "Linezolid: a promising option in the treatment of Gram-positives." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72(2): 354-364.
- Zhanel, G. G., J. A. Karlowsky, E. Rubinstein and D. J. Hoban (2006). "Tigecycline: a novel glycylcycline antibiotic." *Expert Rev Anti Infect Ther* 4(1): 9-25.
- Zhou, K., J. Liang, X. Dong, P. Zhang, C. Feng, W. Shi, M. Gao, Q. Li, X. Zhang, J. Lu, X. Lin, K. Li, H. Zhang, M. Zhu and Q. Bao (2021). "Identification and Characterization of a Novel Chromosomal Aminoglycoside 2'-N-

Acetyltransferase, AAC(2)-If, From an Isolate of a Novel *Providencia* Species, *Providencia wenzhouensis* R33." *Front Microbiol* 12: 711037.





## **BÖLÜM 3**

### **MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE HİSTONDEASETİLİZ ENZİMLERİNİN KULLANIMI**

Dr. Öğr. Üyesi Hacer KAYA ÇAKIR<sup>1</sup>, Doç. Dr. Onur EROĞLU<sup>1</sup>

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.14564967>

---

<sup>1</sup> Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Bilecik, Türkiye. [hacer.kaya@bilecik.edu.tr](mailto:hacer.kaya@bilecik.edu.tr), Orcid ID: 0000-0003-2490-9473, [onur.eroglu@bilecik.edu.tr](mailto:onur.eroglu@bilecik.edu.tr), 0000-0002-3451-8540



## GİRİŞ

Heterojen bir hastalık olan meme kanseri, dünya çapında kadınlar arasında en sık teşhis edilen kanser olmakla birlikte kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır (Huang, Zhang vd. 2019). Günümüzde kanser tedavi yöntemleri çok çeşitli olmakla birlikte son yıllarda potansiyel bir tedavi seçeneği olarak epigenetik modifikasyonlar karşımıza çıkmaktadır.

DNA dizisinde değişiklik olmaksızın kromatin yapısının post-translasyonel modifikasyonu yoluyla gen ifadesinin düzenlenmesini ifade eden epigenetik değişiklikler, kanser ve nörolojik bozukluklar da dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynamaktadır (Woo 2016). Epigenetik mekanizmalar DNA metilasyonu, küçük kodlamayan RNA'lar ve histon modifikasyonları şeklinde üç ana mekanizmaya ayrılmaktadır. Asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon ve ubikitinasyon dahil olmak üzere histon proteinlerinde yapılan modifikasyonlar, histon-DNA etkileşimlerini ve ilgili genin transkripsiyon faktörlerine erişilebilirliğini değiştirmektedir. Histon proteinlerinde yapılan bu değişiklikler gen transkripsiyonunu aktive edebilmekte veya baskılayabilmektedir. Epigenetik modifikasyonlardan biri olan asetilasyon, kromatin ve gen ifadesi için önemli bir düzenleyici mekanizmadır. Histon asetiltransferaz (HATs) ve Histon deasetilazlar (HDACs) enzim ailesinin karşıt eylemleriyle gen ifadeleri düzenlenmektedir (Sterner ve Berger 2000).

HAT'lar tarafından histon asetilasyonu, transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını kolaylaştırmak için kromatin yapısını açar ve ardından gen transkripsiyonu gerçekleşebilmektedir. HDAC'lar tarafından sıkılaştırarak kapalı bir kromatin yapısına ve gen transkripsiyonunun engellenmesine neden olmaktadır (Chiu, Yeh vd. 2016). Histon asetilasyon/deasetilasyon durumundaki dengesizlik kanser gelişiminde önemli bir rol oynadığından, HDAC'ların tümörlerdeki anormal asetilasyon durumlarını tersine çevirmeyi amaçlayan terapötik müdahaleler kanser tedavisinde umut verici hedefler olarak son birkaç yıldır araştırılmaktadır. Histon deasetilaz inhibitörleri (HDACi), histon ve histon olmayan birkaç proteini hedef alarak hücrel asetilasyon profilini koruyabilir ve meme kanseri gelişiminden sorumlu birkaç proteinin işlevini tersine çevirebilir (Marks, Richon vd. 2000). Klinik öncesi ve klinik veriler, HDACi'nin farklı meme kanseri tiplerinde farklı antikanser mekanizmaları ortaya çıkarabileceğini göstermektedir.

## 1. Histon Modifikasyonları

Yaklaşık 2m uzunluğundaki DNA histon adı verilen proteinlerin yardımıyla çekirdeğin içinde paketlenmiş ve kromatin adı verilen bir DNA-protein kompleksi oluşturmaktadır. Kromatinin temel birimi nükleozom olarak adlandırılır ve nükleozomlar H2A, H2B, H3 ve H4 olmak üzere dört çekirdek histonunun iki setinden oluşmaktadır. (Pathak, Singh vd. 2018).

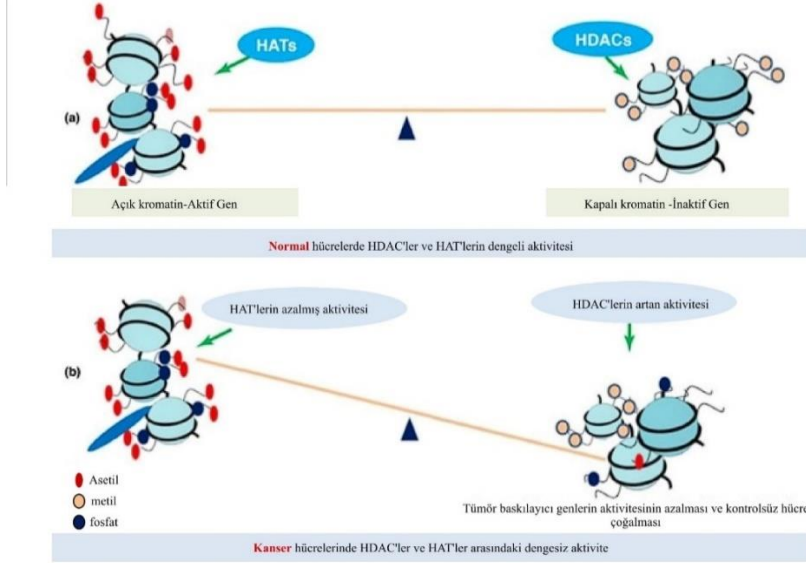
Histon H1, bir kromozom oluşturmak için nükleozomları birbirine bağlar (Annunziato 2008). Bu yapı in-vivo olarak birçok enzimatik modifikasyona uğrayarak çeşitli genetik değişkenliklere yol açmaktadır (Turner 2000). Histonlar, asetilasyon, fosforilasyon, lizin metilasyonu, arginin metilasyonu, deaminasyon, ADP ribozilasyonu, prolin izomerizasyonu,  $\beta$ -N-asetilglukozamin, ubikilasyon ve sumoyilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlara (PTM'ler) tabi olan çıkıntılı bir kuyruğa sahiptir (Bannister ve Kouzarides 2011).

Histon modifikasyonu kromatin yapısını düzenler; yeniden şekillenmeyi kolaylaştırır ve replikasyon, onarım, rekombinasyon gibi DNA süreçlerini etkilemektedir (Keck ve Pemberton 2012).

## 2. Histon Asetilasyon Mekanizması

Histonlar arginin ve lizin bakımından zengin proteinlerdir. Ökaryotik hücrelerde beş ana histon tipi (H1 veya H5, H2A, H2B, H3 ve H4) tanımlanmıştır. H2A, H2B, H3 ve H4 histonları histon oktamerinin oluşumunda rol oynayan çekirdek histonlar olarak kabul edilirken, H1 veya H5 histonları bağlayıcı histonlar olarak tanımlanmaktadır. Genetik materyalin daha yoğun bir biçimde etkili bir şekilde paketlenmesi, DNA'nın ökaryotik çekirdeğe sığması için bir ön koşuldur. Bu DNA yapısal organizasyonu, dört çekirdek histon proteini H2A, H2B, H3 ve H4'ün her birinin iki özdeş kopyasını içeren pozitif yüklü bir histon oktamer olan nükleozom tarafından sağlanır (Peterson ve Laniel 2004). Negatif yüklü DNA ipliklerinin histonların etrafına sarılmasıyla, aminoterminal kuyruklarının lizin kalıntıları üzerindeki asetilasyon seviyeleri düşük kalır ve bazal transkripsiyon faktörlerinin birleşmesi engellenir. Böylelikle genetik ifadeyi kolaylaştıracak ön başlatma kompleksi oluşmayabilir (Felsenfeld 1992). Transkripsiyon ancak negatif yüklü DNA için histon afinitesini değiştiren histonların NH<sub>2</sub>-terminal kuyruklarının asetilasyon, metilasyon, sumoilasyon, ubikilasyon veya fosforilasyon yoluyla

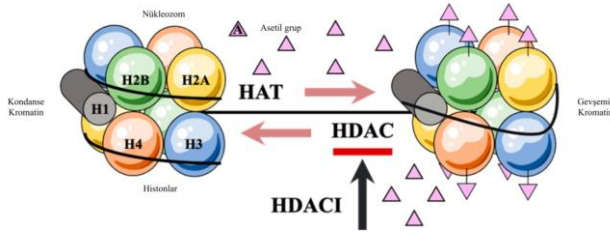
post-translasyonel asetilasyonlarından sonra gerçekleşmektedir (Kouzarides 2007), (Garpmpis, Damaskos vd. 2022).



**Şekil 1.** Normal ve kanser hücrelerinde histon asetiltransferazların (HAT'lar) ve histon deasetilazların (HDAC'lar) karşıt etkileri. (a) Dengeli HAT/HDAC aktivitesi normal hücre fonksiyonunu sağlar. (b) HAT'ların ve HDAC'ların hareketindeki denge bozukluğu birçok kanser türünde görülür (Ediriweera, Tennekoon vd. 2019 yayınından alınmış ve türkçeleştirilmiştir).

Histon asetiltransferazların (HAT'lar) ve HDAC'ların karşıt eylemleriyle düzenlenen, histonların en kapsamlı şekilde incelenen posttranslasyonel kovalent modifikasyonlarından biridir. Histon asetilasyonu, HAT'lar gen transkripsiyonu ile ilişkili lizin kalıntılarının asetilasyonuna aracılık ederken, HDAC'lar asetil grubunu pozitif yüklü histon lizin kalıntılarında çıkararak negatif yüklü DNA'nın nükleozom proteinlerine bağlanmasını sağlar (McKenna ve O'Malley 2002), (Garpmpis, Damaskos vd. 2017) (Şekil 1).

HDAC'lar NH<sub>2</sub>-terminal lizin kalıntıları üzerindeki asetil gruplarının uzaklaştırılmasını katalize ederek transkripsiyonu ve tümör baskılayıcı gen aktivasyonunu baskılar (Grunstein 1997), (Garpmpis, Damaskos vd. 2018). Sonuç olarak, histon asetilasyonunun düzensizleşmesi potansiyel olarak farklı tür kanser oluşum sebeplerinden biri olarak ortaya çıkmaktadır (Şekil 2).



**Şekil 2.** Post-translasyonel asetilasyon, histonların negatif DNA'ya olan afinitesini azaltır, böylece DNA ipliklerinin çözülmesine ve transkripsiyona izin verir (Psilopatis, Garpms vd. 2023 yayınından alınmış ve türkçeleştirilmiştir).

### 3. Histon Deasetilazların Sınıflandırılması

Birçok farklı insan HDAC'ı tanımlanmıştır. Maya proteinleri ile olan homolojilerine ve fonksiyonel kriterlerine göre HDAC'lar dört sınıfa ayrılmaktayken,  $Zn^{2+}$  bağımlı sınıflar (sınıf I, II ve IV) ve NAD bağımlı sınıflar (sınıf III) olarak ikiye de ayrılabilir. Sınıf I, HDAC 1, 2, 3 ve 8'den oluşurken, sınıf IV'ün HDAC11 şeklinde sadece bir üyesi bulunmaktadır. Sınıf II ise sınıf IIa (HDAC4, 5, 7 ve 9) ve sınıf IIb (HDAC6 ve 10) olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır (Tablo I). (Olzscha, Sheikh vd. 2015). Sınıf III üyeleri, *Saccharomyces cerevisiae*'nin sessiz bilgi düzenleyicisi 2 (SIR2) ile homolog olmaları nedeniyle yaygın olarak sirtuinler olarak bilinir ve SIRT1-SIRT7'den oluşur

**Tablo 1.** HDAC sınıfları ve etkileşim kompleksi (Selim, Song vd. 2023 yayınından alınmış ve türkçeleştirilmiştir.)

Grup	HDAC Sınıfı	Alt sınıf	Kısmasık Etkileşimler	Protein	HDACİ	Hücre Bölmesi	
$Zn^{2+}$ bağımlı	I		Sin3 coREST NurD MiDAC	HDAC1	Belinostat, Chidamide, Entinostat, Mocentinostat, Panobinostat, Quinostat, Romidepsin, SAHA/Vorinostat, TSA, Valproic Asit	Çekirdek	
				HDAC2	Belinostat, Chidamide, Entinostat, Mocentinostat, Panobinostat, Quinostat, Romidepsin, SAHA/Vorinostat, TSA, Valproic Asit		
				HDAC3	Belinostat, Chidamide, Entinostat, Mocentinostat, Panobinostat, Quinostat, SAHA/Vorinostat, TSA, Valproic Asit		
				HDAC8	Belinostat, Panobinostat, Quinostat, SAHA/Vorinostat, TSA, Valproic Asit		
	II	IIa		N-CoR SMRT	HDAC4	Belinostat, Panobinostat, Quinostat, Romidepsin SAHA/Vorinostat, TSA, Valproic Asit	Sitoplazma/ çekirdek
					HDAC5	Belinostat, Panobinostat, Quinostat, SAHA/Vorinostat, TSA, Valproic Asit	
					HDAC7	Belinostat, Panobinostat, Quinostat, SAHA/Vorinostat, TSA, Valproic Asit	
					HDAC9	Belinostat, Panobinostat, Quinostat, SAHA/Vorinostat, TSA, Valproic Asit	
		IIb			HDAC6	Belinostat, Quinostat, Romidepsin SAHA/Vorinostat, TSA	Sitoplazma
					HDAC10	Belinostat, Chidamide, Quinostat, SAHA/Vorinostat, TSA	
	IV			SMN	HDAC11	Mocentinostat, SAHA/Vorinostat, TSA	Sitoplazma/ çekirdek
SIRT1-7					SAHA/Vorinostat		
NAD + bağımlı	III					Sitoplazma/ çekirdek	

#### 4. Histon Deasetilazların Meme Kanseri ile İlişkisi

HAT'ların ve HDAC'ların ekspresyonu arasındaki dengede herhangi bir bozulmanın kanser gelişimiyle sonuçlanabileceği açıktır. Meme kanserinde, HDAC ailesinin tüm üyelerinin ekspresyonu tam olarak tanımlanmamış olsa da HDAC1, 2, 3, 4 ve 6'nın ekspresyonu bir dereceye kadar tanımlanmıştır. Suzuki ve arkadaşları meme epitel hücrelerinden duktal karsinoma kadar histon asetilasyonundaki değişikliklerin tümör gelişimi sırasında HDAC1, 2 ve 6'nın azalmış ekspresyonundan kaynaklandığını tanımlamıştır (Suzuki, Chen vd. 2009). HDAC1/3 seviyelerinin ekspresyonu ile PR'ler ve ER'ler arasında anlamlı bir korelasyon ve HDAC1'in hastaliksız sağkalım için bağımsız bir prognoz belirteci olduğu Krusche ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (Krusche, Wülfing vd. 2005). Hu ve arkadaşları (Hu, Stern vd. 2009) ER- ve PR-pozitif BC hücrelerinin HDAC2 gen lokusunun delesyonuna veya kaybına sahip olduğunu bildirmiştir. Müller ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada HDAC2/3 ile agresif BC tümör tipleri arasında güçlü bir ilişki olduğu bildirilmiştir. (Müller, Jana vd. 2013) Özdağ ve arkadaşları (Özdağ, Teschendorff vd. 2006) akciğer ve kolon kanseri hücrelerine kıyasla meme kanseri hücrelerinde HDAC4 'ün aşırı ekspresyonunu göstermiştir. HDAC6 regülasyonunun hormon reseptörü pozitif meme kanseri hücrelerinde ER sinyali yoluyla kontrol edildiği belirlenmiştir (Saji, Kawakami vd. 2005). Zhang ve arkadaşları (Zhang, Yamashita vd. 2004) ER- ve PR-pozitif meme kanseri tümörlerinde HDAC6 mRNA seviyelerinin artmış ekspresyonunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada, HDAC6 'nın meme kanserindeki prognostik önemi tartışmalı olmaya devam etmektedir. HDAC6 ekspresyonunun siRNA ile susturulmasının meme kanseri tümör hücrelerinin hücre göçü ve invazyonunun inhibisyonuna neden olduğu bulunmuştur (Rey, Irondelle vd. 2011). Ververis ve Karagiannis tarafından yapılan bir çalışmada, meme kanseri dokularında sınıf II HDAC'lara kıyasla sınıf I HDAC'ların ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Ververis ve Karagiannis 2012).

Yapılan çalışmalara bakıldığında, HDAC'ların anormal ekspresyonunun meme kanseri gelişiminde ve tümör progresyonunda önemli bir rol oynadığı açığa çıkmaktadır. Bu nedenle, HDAC'lar meme kanseri patogenezi ve ilerlemesi için önem taşımakta ve meme kanseri tedavisi için yeni hedefler sağlamaktadır.



## 5. Histon Deasetilaz İnhibitörleri (HDACi)

Histon deasetilaz inhibitörleri (HDACi), meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli malignitelerin tedavisinde etkinlik gösteren birkaç bileşik ile umut verici bir antikanser ilaç sınıfı olarak ortaya çıkmıştır. Bu inhibitörler gen ifadesi kalıplarını değiştirmektedir (Li, Liu vd. 2016). Yaşanan bu değişim ile hücrel farklılaşmayı indüklemekte ve hücre döngüsünün durmasına ve apoptoza teşvik etmektedir. HDAC inhibitörlerinin antikanser etkilerini gösterdikleri mekanizmalar çok yönlüdür. Bu bileşiklerin tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu yukarı doğru düzenlediği, onkogenleri inhibe ettiği ve tümör anjiyogenezini bozduğu gösterilmiştir. Ek olarak, HDAC inhibitörleri bağışıklık sisteminin kanser hücrelerine karşı tepkisini artırarak terapötik potansiyellerine daha fazla katkıda bulunabilir. (Zhang, Yamashita vd. 2005). Çeşitli HDAC inhibitörleri meme kanseri tedavisindeki potansiyelleri açısından araştırılmıştır (Tablo 2).

**Tablo 2.** Kanser tedavisi için şu an FDA tarafından onaylanmış veya Klinik denemelerde olan histon deasetilaz inhibitörleri (Suraweera, O'Byrne vd. 2018 yayınından alınmış ve türkçeleştirilmiştir).

HDACi	FDA tarafından onaylanmış	Başka yerlerde onaylanmış	Faz I/II/III klinik denemelerinde	Hedeflenen kanser türü
Vorinostat (SAHA)	Evet			Kütanöz T-hücreli lenfoma (CTCL) (2006) (CTCL) (2006)
Romidepsin (FK288)	Evet			Periferik T-hücreli lenfoma (PTCL)
Chidamide		Çin		Multipl myeloma (FDA onaylı 2015) ve CTCL, PTCL (2014)
Panobinostat (LBH589)	Evet		III	PTCL (2014)
Belinostat (PXD101)	Evet			Rahim Ağzı ve yumurtalık
Valporik Asit			III	Multipl myelom ve akciğer kanseri
Tacedinaline (CI994)			III	Foliküler ve Hodgkin lenfoma ile akut myeloid lösemi
Mocetinostat			II	Sarkom ve lenfoma
Abexinostat (PCI24781)			II	Hodgkin, lenfoma, akciğer kanseri ve meme kanseri
(MS275-SNDX-275)			II	Rekürren veya metastatik prostat kanseri
Praclinosat (SB939)			II	Hodgkin lenfoma ve hepatoselüler karsinom
Reminostat(4SC201)			II	Refrakter lösemi ve miyelom
Givinostat (IFT2357)			II	Multipl myelom ve katı tümörler
Quisinostat (JNJ-26481585)			I/II	PTCL
HBI-8000		Çin		
Kevetin			I	Yumurtalık kanseri ve Dalak metastazı
CUDC-101			I	Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom
AR42			I	Multipl myelom, kronik lenfositik lösemi veya lenfoma
Tefinostat(CHR-2845)			I	Hematolojik maligniteler
CHR-3996			I	Refrakter katı tümörler
4SC202			I	Kolorektal kanser
CG200745			I	Katı tümörler
Rocilinosat (ACY1215)			I	Multipl myelom
ME-344			I	Refrakter katı tümörler

Örneğin, pan-HDAC inhibitörü vorinostat klinik çalışmalarda değerlendirilmiş ve standart kemoterapötik ajanların aktivitesini artırma ve ilerlemiş meme kanseri olan hastalar için sonuçları iyileştirme yeteneğini göstermiştir (Eckschlager, Plch vd. 2017). Bir başka HDAC inhibitörü olan romidepsin de prelinik çalışmalarda meme kanseri hücre hatlarında antiproliferatif ve pro-apoptotik etkiler göstererek umut vaat etmiştir (Li ve Seto 2016).

Günümüzde birçok inhibitör prelinik ve klinik çalışmaların ileri aşamalarında incelenmektedir (Güvenir Celik ve Eroglu 2023). Meme kanseri araştırmalarıyla ilgili olarak, HDAC inhibitörlerinin sitotoksik ilaçlar, aromataz inhibitörleri, pro-ilaçlar ve iyonlaştırıcı radyasyon ile kombine edildiğinde güçlü aktivite sergilediği gösterilmiştir. HDACi şu anda klinikte antikanser ajanlar olarak kullanılmaktadır ve histon ve histon olmayan proteinlerin düzenlenmesini sağlamaktadır (Tablo 3-4)

**Tablo 3.** Histon deasetilazların (HDAC'lar) Sınıflandırılması ve bunları hedef alan histon deasetilaz inhibitörleri (HDACi) (Suraweera, O'Byrne vd. 2018 yayınından alınmış ve türkçeleştirilmiştir).

Sınıf	Üyeler	HücreSEL fonksiyon	Histon Deasetilaz İnhibitörü
I	HDAC1	Hücre hayatta kalması ve çoğalması	Vorinostat, Panobinostat, Belinostat, ITF2357,
I	HDAC2	Hücre çoğalması ve insülin direnci	PCI-24781, FK228, Entinostat, MGCD0103, Fenil
I	HDAC3	Hücre hayatta kalması ve çoğalması	Bütirat, Valproik asit, Trichostatin A, LAQ824,
I	HDAC8	Hücre çoğalması	Mecetinostat, Pracinostat.
IIA	HDAC4	İskeletogenez ve glukoneogenezin düzenlenmesi	Vorinostat, Pracinostat, Panobinostat, Belinostat,
IIA	HDAC5	HücreSEL gelişim ve farklılaşma, kardiyovasküler büyüme ve fonksiyon, glukoneogenez	ITF2357, PCI-24781, Fenil Bütirat, Valproik asit, Trichostatin A, LAQ824,
IIA	HDAC7	Timosit farklılaşması, endotel fonksiyonu ve glukoneoz	
IIA	HDAC9	HR, timosit farklılaşması, kardiyovasküler büyüme ve fonksiyon	
IIIB	HDAC6	Hücre hareketliliği ve sitoskeletal dinamiklerin kontrolü	Vorinostat, Panobinostat, Belinostat, ITF2357,
IIIB	HDAC10	HR, otofaji aracılı hücre hayatta kalması	PCI-24781, Trichostatin A, LAQ824, Pracinostat
III	SIRT1	Apoptoz, yaşlanma, redoks düzenlenmesi ve bağışıklık sistemi düzenlenmesi	Nikotinamid [sınıf III'in tamamı]
III	SIRT2	Hücre döngüsünde mitotik çıkış, stres altındaki mitotik kontrol noktası düzenlenmesi ve nöronal hareketlilik ve farklılaşma	Cambinol, Tenovin-1, Tenovin-6, Sirtinol, EX-527 (sadece SIRT1 ve SIRT2)
III	SIRT3	Enerji metabolizmasının düzenlenmesi, apoptoz ve hücre sinyal iletimi	
III	SIRT4	İnsülin salgısının düzenlenmesi, ATP düzenlenmesi, metabolizma, apoptoz ve hücre sinyal iletimi	
III	SIRT5	Üre döngüsünün düzenlenmesi, enerji metabolizması ve ATP düzenlenmesi	
III	SIRT6	Metabolik düzenleme	
III	SIRT7	Apoptoz	
IV	HDAC11	İmmünomodülatörler, DNA replikasyonu	Vorinostat, Trikostatın, LAQ824, Belinostat, ITF2357, Mecetinostat, Pracinostat

**Tablo 4.** Histon deasetilaz inhibitörleri ve meme kanseri karşı etkileri (Damaskos, Garpis vd. 2017 yayınından alınmış ve türkçeleştirilmiştir). EMT: Epitelyal-Mezenkimal Geçiş; FOXA1: Forkhead Box Protein A1; BAX: BCL2-ile ilişkili X; ER $\alpha$ : Östrojen Reseptörü  $\alpha$ ; FTY720: Fingolimod; YCW1: Oktandioik asit (3-(2-(5-metoksi-1H-indol-1-il)etoksi)fenil)-amideN-hidroksiamide; BNIP3: BCL2/adenovirüs E1B19 kDa protein ile etkileşen protein 3; SCA: Santa Cruzamate A.

Madde	Etki
SAHA	Triple-negatif meme kanseri hücrelerinde HDAC8/FOXA1 sinyalleri yoluyla EMT'nin teşvik edilmesi
Trichostatin A	Tümör büyümesinin inhibisyonu ve siklin D1'in yukarı regülasyonunun baskılanması
Syberoy/bis-hidroksamik asit	p53-bağımlı yol ile apoptoz düzenlenmesi; p21, p27 ve BAX'ın düzenlenmesi
Panobinostat	ER $\alpha$ ifadesinin restorasyonu ve metastazın inhibisyonu (letrozol ile birlikte tedavi)
Entinostat	EMT'nin tersine çevrilmesi, metastazın önlenmesi
Valproik asit	Anti-proliferatif etki, p21 düzenlenmesi, hücre döngüsü duraklatılması ve apoptoz
Sodyum butirat	Apoptoz
SK7041	Sitotoksikite, G2-M faz duraklatılması ve apoptoz
FTY720	ER $\alpha$ ifadesinin reaktivasyonu ve hormon tedavisinin güçlendirilmesi
Bileşik 2	Anti-proliferatif etki, hedef HDAC8
Scriptaid	Tümör büyümesinin inhibisyonu
YCW1	Otofajik hücre ölümü, BNIP3 sitotoksitesinin inhibisyonu (iyonizan radyasyon ile birlikte tedavi)
SCA	Anti-proliferatif etki, sitotoksik T hücrelerinin degranülasyonu
Ferrocenil	ER $\alpha$ ve ER $\alpha$ - hücrelerinin proliferasyonunun inhibisyonu

**SAHA (vorinostat)**, T hücreli lenfoma tedavisinde 2006 yılında FDA tarafından onaylanan, en gelişmiş küçük moleküllü HDAC inhibitörlerinden biridir. Meme kanseri hücre hatları olan MCF-7, MDA-MB 231, MDA-MB-435, SKBR-3, BT-549 ile ilgili yapılan çalışmalarda hücre döngüsünü durdurmakta ve hücreleri apoptoza indüklemektedir (Mann, Johnson vd. 2007), (Marks 2007). Paklitaksel ve bevacizumab kombinasyonu ile çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır (Luu, Morgan vd. 2008).

**Trichostatin A**, Trichostatin A (TSA) antifungal bir antibiyotiktir. MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanser hücreleri ile yapılan bir çalışmada G1 ve G2 fazındaki hücre döngüsünü de durdurmaktadır. Ayrıca hücre farklılaşmasını engellemektedir (Alao, Lam vd. 2004).

**Suberoylbis-hidroksamik asit**, Suberoylbis-hidroksamik asit (SBHA), SAHA ve TSA ile benzer yapıya sahip bir HDAC inhibitördür. Medüller tiroid ve akciğer kanseri gibi birçok tümör türüne karşı antikanser aktivite göstermiştir (Ning, Jaskula-Sztul vd. 2008).

**Panobinostat (LBH589)**, immünmodülatör ajanlar ve bortezomib sonrası tümör progresyonu olan multipl miyelom tedavisi için yakın zamanda onaylanmış bir pan-HDAC inhibitörüdür. Akciğer, meme, yumurtalık kanseri ve multipl miyelom gibi solid tümörlere karşı inhibitör aktivitesi sağlamaktadır.

**Entinostat**, Tümör hücreleri, birincil bölgeden yayılmayı sağlayan EMT'ye uğrar. Bu geçiş, bir kanser hücrelerinin fenotipini invaziv hale getirerek (Scheel ve Weinberg 2012), mortaliteye yol açan metastazların oluşmasına izin verir (Singh ve Settleman 2010) Entinostat ile E-cadherin'in epigenetik baskılanmasıyla EMT fenotipini tersine çevirmektedir. Meme kanseri üzerinde yapılan bir çalışma ile entinostatın metastaz gelişimini önleyebileceğini gösterilmektedir (Schech, Kazi vd. 2015).

**Valproik Asit**, in vitro ve in vivo olarak H3 ve H4'ün N terminal kuyruklarının hiperasetilasyonuna neden olarak substratın erişimini engelleyerek katalitik merkeze bağlanarak HDAC aktivitesini inhibe etmektedir. Valproik asit hem in vitro hem de in-vivo olarak meme kanseri hücreleri üzerinde antiproliferatif ve pro-apoptotik etkilere sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmektedir (Terranova-Barberio, Roca vd. 2016).

**Mocetinostat (MGCD0103)**, hücre ölümünü ve otofajiyi indükler, proteazomal inhibitörlerle sinerji oluşturur ve mikrotübüller gibi histon olmayan hedefleri etkilemektedir. Son zamanlarda kanser hücreleri üzerindeki

histon dışı hedefler üzerinde hem hücre ölümünü hem de otofajiyi indüklediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Kaya Çakir ve Eroglu 2021).

**Sodyum Bütirat**, HDAC inhibitör ailesinin bir üyesi olan sodyum bütiratın etkili bir antikanser yeteneği sergilediği gösterilmiştir. Kromatin yapısının gevşemesine yol açarak transkripsiyonla ilgili proteinlere daha kolay erişim sağlar. Bu yetenekleri sodyum bütiratı birçok solid tümör türüne karşı yaygın bir tedavi haline getirmiştir (Jazirehi 2010). Ayrıca, MCF-7 hücrelerinde yapılan çalışmalar sodyum bütiratın doza ve zamana bağlı anti-proliferatif etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Li, Sun vd. 2015).

**FTY720**, Bir sfingozin analogu olan FTY720 (fingolimod), multipl skleroz tedavisi için FDA tarafından onaylanmış bir ön ilaçtır. Yapılan bir çalışmada, FTY720'nin hem ER-pozitif hem de ER-negatif meme kanseri hücrelerinin çekirdeğinde nükleer sfingozin kinaz 2 tarafından fosforile edildiğini göstermektedir. Nükleer FTY720-fosfat (P) bir sınıf I HDAC inhibitörüdür. Güçlü bir inhibitör olan FTY720-P, histon asetilasyonunda ve gen ekspresyonunda yüksek oranda rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda HDAC inhibitörlerinin endokrine dirençli ve üçlü-negatif meme kanseri hücre hatlarında ER'ye duyarlılığı geri kazandırabildiği bulunmuştur (Fan, Yin vd. 2008), (Thomas, Thurn vd. 2011).

HDAC inhibitörleri kansere karşı ilk başarılı epigenetik tedaviyi temsil etmektedir. Hematolojik malignitelerin alt tiplerinde klinik olarak faydalı görünmektedirler. Aksine, solid tümörlere karşı etkinlikleri araştırılmaktadır. Bazı klinik öncesi çalışmalardaki olumlu sonuçlara rağmen, tek ajan olarak kullanılan çoğu HDAC inhibitörü, solid tümörlere karşı tek bir tedavi olarak etkin tedavisi araştırılmaya devam etmektedir (Rodríguez-Paredes ve Esteller 2011).

HDAC inhibitörleri, özellikle diğer antikanser ajanlarla kombinasyon halinde kullanıldığında, meme kanseri tedavisinde umut verici bir terapötik stratejiyi temsil etmektedir. Histon hiperasetilasyonunu indükleyerek, kanser hücrelerinin büyümesinin durmasına ve apoptozuna yol açarak ve mevcut tedavilerin etkinliğini artırarak çalışırlar. Gelecekteki tedavi ilerlemeleri muhtemelen HDAC inhibitörleri ve kemoterapi veya diğer inhibitörlerin kullanıldığı kombinasyon tedavisini içerecektir. Terapötiklerin birleştirilmesi, aynı anda birden fazla onkogenik sinyal yolağını hedefleyebilir, oluşan ilaç direncin üstesinden gelebilir ve hastalıkta sağ kalım oranını arttırabileceği düşünülmektedir.

## KAYNAKÇA

- Alao, J. P., E. W. Lam, S. Ali, L. Buluwela, W. Bordogna, P. Lockey, R. Varshochi, A. V. Stavropoulou, R. C. Coombes and D. M. Vigushin (2004). "Histone deacetylase inhibitor trichostatin A represses estrogen receptor alpha-dependent transcription and promotes proteasomal degradation of cyclin D1 in human breast carcinoma cell lines." *Clin Cancer Res* 10(23): 8094-8104.
- Annunziato, A. (2008). "DNA packaging: nucleosomes and chromatin." *Nature education* 1(1): 26.
- Bannister, A. J. and T. Kouzarides (2011). "Regulation of chromatin by histone modifications." *Cell Res* 21(3): 381-395.
- Chiu, H. W., Y. L. Yeh, Y. C. Wang, W. J. Huang, S. Y. Ho, P. Lin and Y. J. Wang (2016). "Combination of the novel histone deacetylase inhibitor YCW1 and radiation induces autophagic cell death through the downregulation of BNIP3 in triple-negative breast cancer cells in vitro and in an orthotopic mouse model." *Mol Cancer* 15(1): 46.
- Damaskos, C., N. Garmpis, S. Valsami, M. Kontos, E. Spartalis, T. Kalampokas, E. Kalampokas, A. Athanasiou, D. Moris, A. Daskalopoulou, S. Davakis, G. Tsourouflis, K. Kontzoglou, D. Perrea, N. Nikiteas and D. Dimitroulis (2017). "Histone Deacetylase Inhibitors: An Attractive Therapeutic Strategy Against Breast Cancer." *Anticancer Res* 37(1): 35-46.
- Eckschlager, T., J. Plch, M. Stiborova and J. Hrabeta (2017). "Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs." *International Journal of Molecular Sciences* 18(7): 1414.
- Ediriweera, M. K., K. H. Tennekoon and S. R. Samarakoon (2019). "Emerging role of histone deacetylase inhibitors as anti-breast-cancer agents." *Drug Discov Today* 24(3): 685-702.
- Fan, J., W. J. Yin, J. S. Lu, L. Wang, J. Wu, F. Y. Wu, G. H. Di, Z. Z. Shen and Z. M. Shao (2008). "ER alpha negative breast cancer cells restore response to endocrine therapy by combination treatment with both HDAC inhibitor and DNMT inhibitor." *J Cancer Res Clin Oncol* 134(8): 883-890.
- Felsenfeld, G. (1992). "Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism." *Nature* 355(6357): 219-224.
- Garmpis, N., C. Damaskos, A. Garmpi, E. Kalampokas, T. Kalampokas, E. Spartalis, A. Daskalopoulou, S. Valsami, M. Kontos, A. Nonni, K. Kontzoglou, D. Perrea, N. Nikiteas and D. Dimitroulis (2017). "Histone Deacetylases as New Therapeutic Targets in Triple-negative Breast Cancer: Progress and Promises." *Cancer Genomics Proteomics* 14(5): 299-313.
- Garmpis, N., C. Damaskos, A. Garmpi, E. Spartalis, E. Kalampokas, T. Kalampokas, G.-A. Margonis, D. Schizas, N. Andreatos and A. Angelou (2018). "Targeting histone deacetylases in endometrial cancer: a paradigm-shifting therapeutic strategy?" *European Review for Medical & Pharmacological Sciences* 22(4).
- Garmpis, N., C. Damaskos, D. Dimitroulis, G. Kouraklis, A. Garmpi, P. Sarantis, E. Koustas, A. Patsouras, I. Psilopatis, E. A. Antoniou, M. V. Karamouzis, K. Kontzoglou and A. Nonni (2022). "Clinical Significance of the Histone Deacetylase 2 (HDAC-2) Expression in Human Breast Cancer." *J Pers Med* 12(10).

- Grunstein, M. (1997). "Histone acetylation in chromatin structure and transcription." *Nature* 389(6649): 349-352.
- Güvenir Celik, E. and O. Eroglu (2023). "Combined treatment with ruxolitinib and MK-2206 inhibits the JAK2/STAT5 and PI3K/AKT pathways via apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cell line." *Mol Biol Rep* 50(1): 319-329.
- Hu, X., H. M. Stern, L. Ge, C. O'Brien, L. Haydu, C. D. Honchell, P. M. Haverty, B. A. Peters, T. D. Wu, L. C. Amler, J. Chant, D. Stokoe, M. R. Lackner and G. Cavet (2009). "Genetic alterations and oncogenic pathways associated with breast cancer subtypes." *Mol Cancer Res* 7(4): 511-522.
- Huang, M., J. Zhang, C. Yan, X. Li, J. Zhang and R. Ling (2019). "Small molecule HDAC inhibitors: Promising agents for breast cancer treatment." *Bioorg Chem* 91: 103184.
- Jazirehi, A. R. (2010). "Regulation of apoptosis-associated genes by histone deacetylase inhibitors: implications in cancer therapy." *Anticancer Drugs* 21(9): 805-813.
- Kaya Çakir, H. and O. Eroglu (2021). "In vitro anti-proliferative effect of capecitabine (Xeloda) combined with mocetinostat (MGCD0103) in 4T1 breast cancer cell line by immunoblotting." *Iran J Basic Med Sci* 24(11): 1515-1522.
- Keck, K. M. and L. F. Pemberton (2012). "Histone chaperones link histone nuclear import and chromatin assembly." *Biochim Biophys Acta* 1819(3-4): 277-289.
- Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." *Cell* 128(4): 693-705.
- Krusche, C. A., P. Wülfing, C. Kersting, A. Vloet, W. Böcker, L. Kiesel, H. M. Beier and J. Alfer (2005). "Histone deacetylase-1 and -3 protein expression in human breast cancer: a tissue microarray analysis." *Breast Cancer Res Treat* 90(1): 15-23.
- Li, A., Z. Liu, M. Li, S. Zhou, Y. Xu, Y. Xiao and W. Yang (2016). "HDAC5, a potential therapeutic target and prognostic biomarker, promotes proliferation, invasion and migration in human breast cancer." *Oncotarget* 7(25): 37966-37978.
- Li, L., Y. Sun, J. Liu, X. Wu, L. Chen, L. Ma and P. Wu (2015). "Histone deacetylase inhibitor sodium butyrate suppresses DNA double strand break repair induced by etoposide more effectively in MCF-7 cells than in HEK293 cells." *BMC Biochem* 16: 2.
- Li, Y. and E. Seto (2016). "HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy." *Cold Spring Harb Perspect Med* 6(10).
- Luu, T. H., R. J. Morgan, L. Leong, D. Lim, M. McNamara, J. Portnow, P. Frankel, D. D. Smith, J. H. Doroshow, C. Wong, A. Aparicio, D. R. Gandara and G. Somlo (2008). "A phase II trial of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in metastatic breast cancer: a California Cancer Consortium study." *Clin Cancer Res* 14(21): 7138-7142.
- Mann, B. S., J. R. Johnson, K. He, R. Sridhara, S. Abraham, B. P. Booth, L. Verbois, D. E. Morse, J. M. Jee, S. Pope, R. S. Harapanhalli, R. Dagher, A. Farrell, R. Justice and R. Pazdur (2007). "Vorinostat for treatment of cutaneous manifestations of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma." *Clin Cancer Res* 13(8): 2318-2322.
- Marks, P. A. (2007). "Discovery and development of SAHA as an anticancer agent." *Oncogene* 26(9): 1351-1356.

- Marks, P. A., V. M. Richon and R. A. Rifkind (2000). "Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells." *J Natl Cancer Inst* 92(15): 1210-1216.
- McKenna, N. J. and B. W. O'Malley (2002). "Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators." *Cell* 108(4): 465-474.
- Müller, B. M., L. Jana, A. Kasajima, A. Lehmann, J. Prinzler, J. Budczies, K. J. Winzer, M. Dietel, W. Weichert and C. Denkert (2013). "Differential expression of histone deacetylases HDAC1, 2 and 3 in human breast cancer--overexpression of HDAC2 and HDAC3 is associated with clinicopathological indicators of disease progression." *BMC Cancer* 13: 215.
- Ning, L., R. Jaskula-Sztul, M. Kunnimalaiyaan and H. Chen (2008). "Suberoyl bishydroxamic acid activates notch1 signaling and suppresses tumor progression in an animal model of medullary thyroid carcinoma." *Ann Surg Oncol* 15(9): 2600-2605.
- Olzscha, H., S. Sheikh and N. B. La Thangue (2015). "Deacetylation of chromatin and gene expression regulation: a new target for epigenetic therapy." *Crit Rev Oncog* 20(1-2): 1-17.
- Ozdağ, H., A. E. Teschendorff, A. A. Ahmed, S. J. Hyland, C. Blenkiron, L. Bobrow, A. Veerakumarasivam, G. Burt, T. Subkhankulova, M. J. Arends, V. P. Collins, D. Bowtell, T. Kouzarides, J. D. Brenton and C. Caldas (2006). "Differential expression of selected histone modifier genes in human solid cancers." *BMC Genomics* 7: 90.
- Pathak, R., P. Singh, S. Ananthkrishnan, S. Adamczyk, O. Schimmel and C. K. Govind (2018).
- Peterson, C. L. and M. A. Laniel (2004). "Histones and histone modifications." *Curr Biol* 14(14): R546-551.
- Psilopatis, I., N. Garmpis, A. Garmpi, K. Vrettou, P. Sarantis, E. Koustas, E. A. Antoniou, D. Dimitroulis, G. Kouraklis, M. V. Karamouzis, G. Marinou, K. Kontzoglou, A. Nonni, K. Nikolettos, F. N. Fleckenstein, C. Zoumpouli and C. Damaskos (2023). "The Emerging Role of Histone Deacetylase Inhibitors in Cervical Cancer Therapy." *Cancers (Basel)* 15(8).
- Rey, M., M. Irondelle, F. Waharte, F. Lizarraga and P. Chavrier (2011). "HDAC6 is required for invadopodia activity and invasion by breast tumor cells." *European journal of cell biology* 90(2-3): 128-135.
- Rodríguez-Paredes, M. and M. Esteller (2011). "Cancer epigenetics reaches mainstream oncology." *Nat Med* 17(3): 330-339.
- Saji, S., M. Kawakami, S. Hayashi, N. Yoshida, M. Hirose, S. Horiguchi, A. Itoh, N. Funata, S. L. Schreiber, M. Yoshida and M. Toi (2005). "Significance of HDAC6 regulation via estrogen signaling for cell motility and prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer." *Oncogene* 24(28): 4531-4539.
- Schech, A., A. Kazi, S. Yu, P. Shah and G. Sabnis (2015). "Histone Deacetylase Inhibitor Entinostat Inhibits Tumor-Initiating Cells in Triple-Negative Breast Cancer Cells." *Mol Cancer Ther* 14(8): 1848-1857
- Scheel, C. and R. A. Weinberg (2012). "Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links." *Semin Cancer Biol* 22(5-6): 396-403.
- Selim, O., C. Song, A. Kumar, R. Phelan, A. Singh and N. Federman (2023). "A review of the therapeutic potential of histone deacetylase inhibitors in rhabdomyosarcoma." *Front Oncol* 13: 1244035.

- Singh, A. and J. Settleman (2010). "EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer." *Oncogene* 29(34): 4741-4751.
- Sterner, D. E. and S. L. Berger (2000). "Acetylation of histones and transcription-related factors." *Microbiol Mol Biol Rev* 64(2): 435-459.
- Suraweera, A., K. J. O'Byrne and D. J. Richard (2018). "Combination Therapy With Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi) for the Treatment of Cancer: Achieving the Full Therapeutic Potential of HDACi." *Front Oncol* 8: 92.
- Suzuki, J., Y. Y. Chen, G. K. Scott, S. Devries, K. Chin, C. C. Benz, F. M. Waldman and E. S. Hwang (2009). "Protein acetylation and histone deacetylase expression associated with malignant breast cancer progression." *Clin Cancer Res* 15(9): 3163-3171.
- Terranova-Barberio, M., M. S. Roca, A. I. Zotti, A. Leone, F. Bruzzese, C. Vitagliano, G. Scogliamiglio, D. Russo, G. D'Angelo, R. Franco, A. Budillon and E. Di Gennaro (2016). "Valproic acid potentiates the anticancer activity of capecitabine in vitro and in vivo in breast cancer models via induction of thymidine phosphorylase expression." *Oncotarget* 7(7): 7715-7731.
- Thomas, S., K. T. Thurn, E. Biçaku, D. C. Marchion and P. N. Münster (2011). "Addition of a histone deacetylase inhibitor redirects tamoxifen-treated breast cancer cells into apoptosis, which is opposed by the induction of autophagy." *Breast Cancer Res Treat* 130(2): 437-447.
- Turner, B. M. (2000). "Histone acetylation and an epigenetic code." *Bioessays* 22(9): 836-845.
- Ververis, K. and T. C. Karagiannis (2012). "An atlas of histone deacetylase expression in breast cancer: fluorescence methodology for comparative semi-quantitative analysis." *Am J Transl Res* 4(1): 24-43.
- Woo, Y. M. (2016). "Epigenetic Regulation in Cystogenesis." *Adv Exp Med Biol* 933: 59-68.
- Zhang, Z., H. Yamashita, T. Toyama, H. Sugiura, Y. Ando, K. Mita, M. Hamaguchi, Y. Hara, S. Kobayashi and H. Iwase (2005). "Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast\*." *Breast Cancer Res Treat* 94(1): 11-16.
- Zhang, Z., H. Yamashita, T. Toyama, H. Sugiura, Y. Omoto, Y. Ando, K. Mita, M. Hamaguchi, S.-i. Hayashi and H. Iwase (2004). "HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer." *Clinical Cancer Research* 10(20): 6962-6968.





## **BÖLÜM 4**

### **ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARLA İLİŞKİLİ MEKANİZMALAR**

Öğr. Gör. Dr. Hanife ARDAHANLI<sup>1</sup>

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.14564969>

---

<sup>1</sup> Kafkas Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars, Türkiye  
ardahanlihanife@gmail.com, Orcid ID: 0000-0002-0754-8699



## GİRİŞ

*Mycobacterium tuberculosis*, tüberküloza neden olmaktadır (Pottumarthy, Wells ve vd. 2000, Migliori, Ong ve vd. 2021). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2023 Küresel Tüberküloz Raporu'na göre, tahmini 10,6 milyon ve 2022 yılında 11,4 milyon kişi tüberküloza yakalandı. 2022 yılında tüberküloz dünya çapında 1,30 milyon ölüme neden olduğu bildirilmiştir (Organization 2023). Tüberküloz, tarihsel olarak diğer tüm hastalıklardan daha fazla insan ölümüne neden olmuştur. Aynı zamanda tüberküloz COVID-19 salgınından önce en yaygın bulaşıcı hastalık olarak bilinmekteydi. Hastalıktan sorumlu birincil patojen, aerobik, spor oluşturmeyen ve hareketsiz bir bakteri olan *M. tuberculosis*'tir. Solunduğunda, *M. tuberculosis* yüklü damlacıklar vücuda alınabilir, uykuda kalabilir (latent tüberküloz) veya aktif tüberküloz hastalığına ilerleyebilir (Delogu, Sali ve vd. 2013). Tüberküloz latent faz, bakteriyi sınırlamayı ve yayılmasını önlemeyi amaçlayan bağışıklık hücresi kümeleri olan granülom oluşumu ile karakterize bir şekilde hastalığın durdurulduğu fazdır. Aktif tüberküloz ise, CD4 sayısı 200'ün altında olan bağışıklık sistemi baskılanmış yetişkinlerde, yaşlı hastalarda ve çocuklarda bu granülomlar pnömoniye dönüşebilir ve vücuda yayılarak hastalığın ilerlemesine yol açabilir (Al-Obaidi, Al-Obaidi ve vd. 2024).

Tüberküloz, bir asırdan uzun süredir yenilmez bir hastalık olarak kalmıştır. Tüberkülozda ilaç direnci hastalıkla mücadele en büyük zorluktur. Bu durum her yıl yarım milyon yeni çoklu ilaca dirençli tüberküloz ve yaygın ilaca dirençli tüberküloz vakasıyla karşı karşıya kalınmasına sebep olmaktadır (Chin, Anibarro ve vd. 2023). Mikobakteriyel enfeksiyonların tedavisi zordur ve genellikle birden fazla antimikrobiyalin uzun süreli kullanımını gerektirir. Tüberküloz tedavisinde birinci basamak ilaçlar olan izoniazid, rifampisin, etambutol ve pirazinamid ile 2 ay ve izoniazid ve rifampisin ile ek 4 ay tedavi edilir (Sakiyama, Saren ve vd. 2023). WHO tarafından önerilen tedaviyi alan çoklu ilaca dirençli tüberküloz hastalarının yalnızca %57'sinin iyileştiği bildirilmiştir. Çoklu ilaca dirençli tüberküloz yıllık %20'den fazla bir oranda artmaktadır; dolayısıyla, 2020-2050 yılları arasında tahmini 31,8 milyon kişi tüberkülozdan ölebileceği düşünülmektedir. Diğer tahminler, önümüzdeki 35 yıl içinde çoklu ilaca dirençli tüberkülozun yaklaşık 75 milyon insanı öldüreceğini ve küresel ekonomiye büyük bir zarara sebep olabileceğini bildirmiştir (Chin, Anibarro vd. 2023).

## GENEL BİLGİLER

### Tüberküloz Nedir?

Tüberküloz, *Mycobacterium tuberculosis* tarafından havadan bulaşabilen bulaşıcı bir hastalık olarak bilinmektedir (Acharya ve vd. 2020). Hastalık, öksürme gibi zorlu ekspiratuar manevralar sırasında üretilen solunabilir boyuttaki *M. tuberculosis* içeren damlacıklar yoluyla bulaşır. Solunan damlacıklar, küçük boyutları nedeniyle bronşların savunmalarından kaçınır ve fagositik bağışıklık hücreleri (makrofajlar ve dentritik hücreler) tarafından yutuldukları zaman alveollere nüfuz eder (Ahmad 2011). Enfeksiyonun birincil yolu akciğerlerdir ve tüberküloz enfeksiyonu aktif veya gizli olabilir (Acharya, Acharya vd. 2020). Enfeksiyonun erken evresinde, fagositik bağışıklık hücreleri tarafından yutulan *M. tuberculosis hücre* içinde çoğalır ve bakteri yüklü bağışıklık hücreleri sistemik yayılmaya neden olmak için alveoler bariyeri geçebilir. Patojenin hücre içi çoğalması ve eş zamanlı olarak pulmoner lenf düğümlerine ve çeşitli diğer ekstrapulmoner bölgelere yayılması, adaptif bağışıklık yanıtından önce gerçekleşmektedir. Bu, *M. tuberculosis*'in bağışıklık sistemi tarafından ortadan kaldırılmaktan kaçınabilecekleri ve süresiz olarak varlığını sürdürebilecekleri korumalı bir niş oluşturduğunun en iyi göstergesidir (Ahmad 2011).

Akciğer enfeksiyonunu takiben, hücre aracılı bağışıklık 2-12 haftada geliştiğinde organizmanın çoğalması ve yayılması kontrol altına alınır. Bireyin enfeksiyondan sonraki aylar ve ilk birkaç yıl içinde aktif hastalığa ilerleme riski, bakteri yüküne ve bağışıklık savunmasının etkinliğine bağlıdır. Enfeksiyon anında bastırılmış bir bağışıklık tepkisi, ilerleyici birincil (yayılmış dahil) hastalık riskini artırır. Birey zaten enfekte olmuşsa, bağışıklığı düşük olduğunda yeniden etkinleştirme riski artar. Yeniden enfeksiyonların yokluğunda, enfeksiyondan 5-7 yıl sonra ortaya çıkan hastalık, genellikle hücre aracılı bağışıklıkta yaşa bağlı azalma ve iyatrojenik bağışıklık baskılanması dahil olmak üzere hücre aracılı bağışıklıkta bir düşüşü takip eder (Ahmed, Caviedes vd. 2003, Konstantinos 2010).

## TÜBERKÜLOZ TANISI

Tüberkülozun artan tehdidi, yeni ilaçlar geliştirmeyi, teşhis ve aşıları iyileştirmeyi ve konak-parazit etkileşimlerinin daha iyi anlaşılmasını amaçlayan temel ve uygulamalı araştırmalara duyulan ihtiyacı vurgulamıştır (Siddiqi, Lambert vd. 2003). Günümüzde tüberküloz tanısı esas olarak balgam

yayma mikroskopisi ve bakteri kültürü ile doğrulanan klinik muayene ve radyografik bulgulara dayanmaktadır (Siddiqi, Lambert vd. 2003, Gopaldaswamy, Shanmugam vd. 2020). Hastalığın en yaygın formu olan akciğer tüberkülozu için birincil örnekler balgam örnekleri, bronşiyal veya bronşioalveolar lavaj aspiratları veya trakeal aspiratlardır. tüberküloz endemik ülkelerde, ‘Aside dirençli basil boyama’ veya Ziehl-Neelsen boyama prosedürü, balgam örneklerinde *M. tuberculosis* tespiti için standart yöntemidir. Aside dirençli boyama, kaviter tüberkülozlu hastaların balgam örneğinde %70’e kadar duyarlılığa sahiptir (Gopaldaswamy, Shanmugam vd. 2020). WHO, yüksek riskli kişileri belirlemek için öncelikle tarama yöntemlerinden yararlanılmasını ve erken tespiti ve tedavilerin başlatılmasını hızlandırmak için akciğer tüberkülozunun sistematik olarak taranmasını önermektedir (Acharya, Acharya vd. 2020). Bakterileri sıvı veya katı besiyerinde kültür yapmak, tüberküloz tanısı için ‘altın’ referans olarak kabul edilmektedir, çünkü bu yöntem aside dirençli boyamadan daha iyi sonuç göstermektedir aside dirençli yayma mikroskobu 12-24 saat sürerken, kültür yöntemlerinin tüberküloz için tanısal sonuçlar üretmesi 2-6 hafta sürmektedir (Gopaldaswamy, Shanmugam vd. 2020).

*M. tuberculosis*’in sıvı kültürü gibi gelişmiş tanı testleri ve nükleik asit amplifikasyon testleri genellikle düşük gelirli toplumlarda tüberküloz kontrol programları tarafından rutin olarak kullanılmayacak kadar pahalı ve karmaşıktır. Mikroskopi ile karşılaştırıldığında, serolojik tüberküloz testleri, teknolojik basitlik ve anlaşılır eğitim gereksinimleri gibi avantajlara sahip olduğundan, potansiyel olarak hızlı tanıyı mümkün kılmaktadır. Ek olarak, bu testler bakım noktası formatlarına uyarlanabilir ve yerinde mikroskopi hizmetleri olmaksızın çevresel sağlık tesislerinde yapılabilirler (Harries 2004, Perkins ve Cunningham 2007, Steingart, Ramsay vd. 2012).

Tüberküloza karşı immünolojik yanıtların saptanmasına dayanan testler de bulunmaktadır. Bu testler, mikobakterilerin saptanmasına bağlı olmadıklarından, aktif tüberküloz tanısı için mevcut yöntemlere çekici alternatiflerdir. İmmünoagnostik testler arasında serum veya diğer biyolojik sıvılarda spesifik antikorların saptanmasına dayanan yöntemler birçok sebepten dolayı umut vericidir. Birincisi, ilk kez 1898’de tespit edilen, tüberküloz sırasında güçlü antikor tepkilerinin oluştuğu gerçeğidir (Arloing 1898). Bu bulgu, tüberküloz teşhisine serolojik bir yaklaşım için temel sağlamaktadır. İkincisi, serolojik yöntemlerdir bu yöntemler basit, hızlı, ucuz ve nispeten invaziv olmayabilir. Üçüncüsü, tüberkülin deri testinin aksine serolojik

yöntemler, aktif hastalık ile semptomatik olmayan enfeksiyon arasında potansiyel olarak ayırım yapabilir, çünkü tüberkülin deri testi pozitif olan semptomatik olmayan bireylerde spesifik antikor yanıtları nadiren saptanmaktadır. Bu nedenle serolojik testler, aktif tüberkülozun hızlı teşhisi için yararlı bir tanı aracı olma potansiyeline sahiptir (Daniel, McDonough vd. 1991, Gennaro 2000).

Tüberküloz alanındaki serolojik çalışmaların geçmişi, tüberküloz sırasında humoral immün yanıtların eksikliği genellikle yetersiz serodiagnostik yöntemlere yol açtığını göstermektedir. Geleneksel olarak, tüberküloz sırasındaki antikor yanıtları hakkındaki bilgilerin çoğu serodiagnostik çalışmalardan elde edilmiştir. Serodiagnostik amaçlar için saflaştırılmış antijenlerin seçilmesi sürecinde ise; yüksek düzeyde çapraz reaktif kompleks antijen karışımları zayıf özgüllükte reaksiyonlar veren tek antijen bazlı testlerin hiçbir zaman tatmin edici serodiagnostik performansa ulaşmadığı tekrar eden çalışmalarla gözlenmiştir (Daniel 1988, Cocito 1991).

## ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLAR

İlaç duyarlı tüberküloz tedavisi için standart antibiyotik rejimi, en az 6 ay boyunca uygulanan izoniazid, rifampisin, pirazinamid ve etambutol içerir. Bununla birlikte, çoklu ve aşırı ilaca dirençli tüberküloz vakalarının tedavisi için uzun süreli bir antibiyotik tedavisine ihtiyaç duyulmaktadır. Bedakilin ve delamanid gibi daha yeni ilaç sınıflarının kullanılabilir olmasıyla, çoklu ilaca dirençli-tüberküloz vakaları kısa sürede tedavi edilebilmektedir (Gopaldaswamy, Shanmugam vd. 2020).

### İzoniazid

Antitüberküloz tedavisinin temel ilacı olan isoniazid (INH), arilamin N-asetiltransferaz2 (NAT2), sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) ve glutatyon S-transferaz (GST) tarafından metabolize edilir (Sotsuka, Sasaki vd. 2011). INH, bakteriyel katalaz-peroksidaz (KatG) tarafından aktive edilen bir ilaçtır. *M. tuberculosis*'teki tek katalaz/peroksidaz (bifonksiyonel) olan KatG, fagosit oksidatif stres sırasında oluşan peroksitleri katabolize ederek ve böylece konak bağışıklık mekanizmasını antagonize ederek bakterinin fizyolojisi ve patogeneğinde önemli bir rol oynar. KatG'nin bu oksidatif stres oluşturma durumu, INH'yi NAD+ /NADH'yi bağlayarak bir inhibitör adükt (INH-NAD) oluşturabilen bir izonikotininil asil radikaline dönüştürmek için bakterilere karşı kullanılır. Bu adükt, mikolik asit sentezi için gerekli bir enzim olan enoil-[asil-

taşıyıcı-protein] redüktaz (InhA) proteinini inhibe ederek mikobakteriyel hücre duvarı sentezini bozmaktadır (Reingewertz, Meyer vd. 2020).

INH direncinin birincil mekanizmaları 1) katG mutasyonu nedeniyle prodrug izoniazidin aktivasyonunun önlenmesi ve 2) inhA'nın promotör bölgesinin mutasyonu, INH hedefi InhA'nın aşırı ekspresyonuna yol açar. InhA mutasyonu düşük ila orta düzey fenotipik dirençle sonuçlanma eğilimindedir, katG mutasyonu ise güvenli izoniazid dozlarıyla üstesinden gelinebilen veya gelinemeyebilen yüksek düzey dirençle sonuçlanır. INH için, ilaç maruziyetlerinin ana belirleyicisi NAT2 durumudur ve bu genetik polimorfizmler, bakım noktasında olmasa da mevcut teknolojiyle belirlenebilir (Gausi, Ignatius vd. 2021).

## Etambutol

*M. tuberculosis* için bakteriyostatik bir ajan olarak bulunan etambutol, *M. tuberculosis* ve *M. avium* kompleksinin neden olduğu enfeksiyonlar için birincil tedavi olarak kullanılmaktadır. Etambutol oküler toksisitesinin kesin mekanizması henüz belirlenmemiştir; bununla birlikte mitokondrideki bakır seviyesinin azalmasından veya retina ganglion hücrelerinin lizozomlarında çinko birikmesinden kaynaklanabileceği bilinmektedir (Jin, Lee vd. 2019). Tüberküloz tedavisinde yaygın olarak kullanılan *etambutol*, *embCAB operonu* tarafından kodlanan zarla ilişkili arabinosil transferaz tarafından arabinogalaktan biyosentezini inhibe eden temel bir birinci basamak antitüberküloz ilaçtır (Anand ve Akhter 2022). Altı aylık bir uygulama olarak rifampisin, pirazinamid ve INH ile birinci basamak antitüberküloz ilaç olarak kullanılır. Etambutol, monoterapi olarak tek başına kullanılmamalı, bunun yerine en az bir diğer antitüberküloz ilaçla birlikte kullanılmalıdır. Etambutol *M. tuberculosis* hücre duvarındaki arabinogalaktan biyosentezine müdahale eden ve basiller tarafından çoğalmasını engelleyen bir bakteriyostatik ilaçtır (Barliana, Afifah vd. 2023).

## Rifamisin

Rifamisin antibiyotikleri, WHO'nun temel ilaçları olan rifampin, rifabutin ve rifapentini içermektedir. Bunlar, başlangıçta toprak bakterisi *Amycolatopsis rifamycinica*'dan izole edilen doğal ürün rifamisinlerin yarı sentetik türevleridir. Bu antibiyotikler, öncelikle tüberküloz dahil mikobakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılır. Rifamisinler,



bakteriyel RNA polimerazının (RpoB)  $\beta$ -alt birimine bağlanarak transkripsiyonu inhibe eder ve bu durum hücre ölümüyle sonuçlanır (Surette, Spanogiannopoulos vd. 2021). Mikobakterilerde rifampisin direnci kazandıran çok sayıda nokta mutasyonu vardır. Bunlardan en sık görülen, tüm ilaca dirençli izolatların yaklaşık %43'ünü oluşturabilen S531L mutasyonudur. Bu mutasyon, RpoB'nin 81 bp rifampisin direncini belirleyen bölgesinde meydana gelir (Giddey, Ganief vd. 2021). Rifampisine karşı bakteriyel direnç esas olarak RpoB mutasyonları ile ortaya çıkar, ancak aynı zamanda monooksijenasyon, glikozilasyon, fosforilasyon veya RNA polimeraz için rifampisinin bağlanma afinitesini azaltan ADP-ribozilasyon gibi enzimatik antibiyotik modifikasyonu ile de oluşur (Morgado, Fonseca vd. 2021).

### **Pirazinamid**

Pirazinamid, mikobakteriyel pirazinamidaz (PZase) enzimi tarafından pirazinoik aside dönüştürülen ve daha sonra RpsA proteininin korunan bölgesindeki doğuştan mutasyonlar (T370P ve W403G) nedeniyle dirençle ilişkili ribozomal protein S1'i hedef alan bir ilaçtır, ancak pirazinamidin tam direnç mekanizması henüz net değildir (Anand ve Akhter 2022). Pirazinamid direnci, *pncA*, *rpsA* ve *panD* dahil olmak üzere birden fazla hedef gendeki mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir; ancak, *pncA*'daki mutasyonlar, ortalama %85 direnç izolatıyla % 70-97 vakada pirazinamid direncinin ana mekanizması olarak kabul edilmiştir. Pirazinamidaz dört  $\alpha$ -heliks ve altı paralel  $\beta$ -tabakadan oluşmaktadır. Metal iyonu  $Fe^{2+}$ , aspartat (Asp49) ve histidinler (His51, His57 ve His71) ile çevrilidir. Amino asitler, Asp8, F13, L19, V21, D49, W68, H71, F94, Y95, Lys96, Y103, I133, A134, H137 ve C138 reaksiyon katalizinde rol oynamıştır. Genetik mutasyonlar sıklıkla protein yüzeyinin elektrostatik yapısını etkiler ve değişiklikler aktiviteyi, kararlılığı veya katlanmayı etkileyerek ilaç bağlanma afinitesinin ve işlevinin zayıflamasına veya kaybolmasına neden olabilir. Hedef proteinlerdeki mutasyonların taranması ve analizi, ilaç direncinin altında yatan moleküler mekanizmaların ortaya çıkarılmasına yardımcı olabilir ve böylece dirençli tüberkülozun yönetimini iyileştirebilir (Khan ve Malik 2020).

### **SONUÇ VE ÖNERİLER**

Tüberküloz bugün dünya çapındaki sağlık tehditleri arasındadır. *M. tuberculosis*'in dirençli suşları yavaş yavaş ortaya çıktıkça, özellikle hastalara uyarlanmış uzun ve maliyetli tedaviyi sağlamak için gerekli sağlık

koşullarından yoksun ülkelerde, tedavi başarısızlığının fazla olduğu bildirilmiştir (Janin 2007). Antibiyotik bileşiklerin bakterilerin RNA, DNA, protein ve hücre duvarı için biyosentetik süreçleri hedeflemesine yol açmıştır. Bu yaklaşım geçmişte çok sayıda ilaç üretmiş olsa da günümüzde keşfedilen antibiyotik sayısı azalmaktadır. Bu durum, mevcut direnç mekanizmalarını aşan yeni kimyasalları ortaya çıkarma vaadi nedeniyle antibiyotik keşfi için alternatif hedefler aranmaktadır (Tong ve Brown 2023). Ek olarak bakteriyel enfeksiyonlarla mücadele için enzim tetiklemeli akıllı ilaç salım sistemleri de geliştirilmeli ve bazı noktalara dikkat edilmelidir. Daha önce hedeflenen enzimler dışında, kolajenaz, streptokinaz, lesitinazlar ve glikohidrolazlar vb. gibi diğer bakteriye özgü enzimler de enzime duyarlı antimikrobiyal ilaç salım sistemleri tasarlamak için tetikleyiciler olarak düşünülebilir. Uygun deneysel metodolojiler ve klinik keşifle birlikte bakteriyel enfeksiyon tedavisi için ve kolayca ilaç direnci kontrolü yapılabilen enzim tetiklemeli akıllı dağıtım sistemlerine geliştirilmelidir (Zhou, Si vd. 2022).

## KAYNAKÇA

- Acharya, B., A. Acharya, S. Gautam, S. P. Ghimire, G. Mishra, N. Parajuli and B. Sapkota (2020). "Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*." *Molecular biology reports* 47: 4065-4075.
- Ahmad, S. (2011). "Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection." *Journal of Immunology Research* 2011(1): 814943.
- Ahmed, N., L. Caviedes, M. Alam, K. R. Rao, V. Sangal, P. Sheen, R. H. Gilman and S. E. Hasnain (2003). "Distinctiveness of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes from human immunodeficiency virus type 1-seropositive and-seronegative patients in Lima, Peru." *Journal of clinical microbiology* 41(4): 1712-1716.
- Al-Obaidi, H., A. D. Al-Obaidi, P. Moliya, H. Harb, I. Agha, N. Merza, H. T. Hashim, M. N. Al-Obaidi and O. Al-Obaidi (2024). "Gastric Tuberculosis Masquerading as Persistent Epigastric Pain in an Immunocompetent Patient: A Case Report." *Journal of Investigative Medicine High Impact Case Reports* 12: 23247096241298160.
- Anand, P. and Y. Akhter (2022). "A review on enzyme complexes of electron transport chain from *Mycobacterium tuberculosis* as promising drug targets." *International journal of biological macromolecules* 212: 474-494.
- Arloing, S. (1898). "Agglutination de bacille de la tuberculose vraie." *CR Acad Sci* 126: 1398-1400.
- Barliana, M. I., N. N. Afifah, V. Yunivita and R. Ruslami (2023). "Genetic polymorphism related to ethambutol outcomes and susceptibility to toxicity." *Frontiers in Genetics* 14: 1118102.
- Chin, K. L., L. Anibarro, M. E. Sarmiento and A. Acosta (2023). "Challenges and the Way forward in Diagnosis and Treatment of Tuberculosis Infection." *Tropical medicine and infectious disease* 8(2): 89.
- Cocito, C. G. (1991). "Properties of the mycobacterial antigen complex A60 and its applications to the diagnosis and prognosis of tuberculosis." *Chest* 100(6): 1687-1693.
- Daniel, T. M. (1988). "Antibody and antigen detection for the immunodiagnosis of tuberculosis: why not? What more is needed? Where do we stand today." *The Journal of infectious diseases* 158(4): 678-680.
- Daniel, T. M., J. A. McDonough and R. E. Huebner (1991). "Absence of IgG or IgM Antibody Response to *Mycobacterium tuberculosis* 30, OOO-Da Antigen after Primary Tuberculous Infection." *Journal of Infectious Diseases* 164(4): 821-821.
- Delogu, G., M. Sali and G. Fadda (2013). "The biology of mycobacterium tuberculosis infection." *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases* 5(1).
- Gausi, K., E. H. Ignatius, X. Sun, S. Kim, L. Moran, L. Wiesner, F. von Groote-Bidlingmaier, R. Hafner, K. Donahue and N. Vanker (2021). "A semimechanistic model of the bactericidal activity of high-dose isoniazid against multidrug-resistant tuberculosis: results from a randomized clinical trial." *American journal of respiratory and critical care medicine* 204(11): 1327-1335.

- Gennaro, M. L. (2000). "Immunologic diagnosis of tuberculosis." *Clinical infectious diseases* 30(Supplement\_3): S243-S246.
- Giddey, A. D., T. A. Ganief, N. Ganief, A. Koch, D. F. Warner, N. C. Soares and J. M. Blackburn (2021). "Cell Wall proteomics reveal phenotypic adaption of drug-resistant *Mycobacterium smegmatis* to subinhibitory rifampicin exposure." *Frontiers in Medicine* 8: 723667.
- Gopaldaswamy, R., S. Shanmugam, R. Mondal and S. Subbian (2020). "Of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infections—a comparative analysis of epidemiology, diagnosis and treatment." *Journal of biomedical science* 27: 1-17.
- Harries, A. (2004). "How does the diagnosis of tuberculosis in persons infected with HIV differ from diagnosis in persons not infected with HIV." *TOMAN'S TUBERCULOSIS*: 80.
- Janin, Y. L. (2007). "Antituberculosis drugs: ten years of research." *Bioorganic & medicinal chemistry* 15(7): 2479-2513.
- Jin, K. W., J. Y. Lee, S. Rhiu and D. G. Choi (2019). "Longitudinal evaluation of visual function and structure for detection of subclinical Ethambutol-induced optic neuropathy." *Plos one* 14(4): e0215297.
- Khan, M. T. and S. I. Malik (2020). "Structural dynamics behind variants in pyrazinamidase and pyrazinamide resistance." *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 38(10): 3003-3017.
- Konstantinos, A. (2010). "Testing for tuberculosis." *Australian prescriber* 33(1).
- Migliori, G. B., C. W. Ong, L. Petrone, L. D'Ambrosio, R. Centis and D. Goletti (2021). "The definition of tuberculosis infection based on the spectrum of tuberculosis disease." *Breathe* 17(3).
- Morgado, S., É. Fonseca and A. C. Vicente (2021). "Genomic epidemiology of rifampicin ADP-ribosyltransferase (Arr) in the Bacteria domain." *Scientific Reports* 11(1): 19775.
- Organization, W. H. (2023). *Global status report on road safety 2023: summary*, World Health Organization.
- Perkins, M. D. and J. Cunningham (2007). "Facing the crisis: improving the diagnosis of tuberculosis in the HIV era." *The Journal of infectious diseases* 196(Supplement\_1): S15-S27.
- Pottumarthy, S., V. C. Wells and A. J. Morris (2000). "A comparison of seven tests for serological diagnosis of tuberculosis." *Journal of clinical microbiology* 38(6): 2227-2231.
- Reingewertz, T. H., T. Meyer, F. McIntosh, J. Sullivan, M. Meir, Y.-F. Chang, M. A. Behr and D. Barkan (2020). "Differential sensitivity of mycobacteria to isoniazid is related to differences in KatG-mediated enzymatic activation of the drug." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 64(2): 10.1128/aac.01899-01819.
- Sakiyama, A., C. Saren, Y. Kaneko and K.-I. Oinuma (2023). "Identification of a mycobacterial hydrazidase, an isoniazid-hydrolyzing enzyme." *Scientific Reports* 13(1): 8180.
- Siddiqi, K., M.-L. Lambert and J. Walley (2003). "Clinical diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in low-income countries: the current evidence." *The Lancet infectious diseases* 3(5): 288-296.

- Sotsuka, T., Y. Sasaki, S. Hirai, F. Yamagishi and K. Ueno (2011). "Association of isoniazid-metabolizing enzyme genotypes and isoniazid-induced hepatotoxicity in tuberculosis patients." *In vivo* 25(5): 803-812.
- Steingart, K. R., A. Ramsay, D. W. Dowdy and M. Pai (2012). "Serological tests for the diagnosis of active tuberculosis: relevance for India." *Indian Journal of Medical Research* 135(5): 695-702.
- Surette, M. D., P. Spanogiannopoulos and G. D. Wright (2021). "The enzymes of the rifamycin antibiotic resistome." *Accounts of chemical research* 54(9): 2065-2075.
- Tong, M. and E. D. Brown (2023). "Food for thought: Opportunities to target carbon metabolism in antibacterial drug discovery." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1524(1): 51-64.
- Zhou, Q., Z. Si, K. Wang, K. Li, W. Hong, Y. Zhang and P. Li (2022). "Enzyme-triggered smart antimicrobial drug release systems against bacterial infections." *Journal of Controlled Release* 352: 507-526.

## **BÖLÜM 5**

### **BİYOTEKNOLOJİDE YÜKSEK VERİMLİ TARAMA TEKNOLOJİLERİ**

Doç. Dr. Huri DEMİRCİ<sup>1</sup>

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.14564987>

---

<sup>1</sup> Biruni Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Bölümü İstanbul, Türkiye.  
hdemirci@biruni.edu.tr, Orcid ID:0000-0003-2706-9625



## **GİRİŞ**

Mikrobiyal sistemler, endüstriyel ihtiyaçları ve toplumsal zorlukların üstesinden gelmek için genetik mühendisliği yoluyla derinlemesine incelenmekte ve kullanılmaktadırlar. Ancak, karmaşıklıkları nedeniyle, tekil yaklaşımlar genellikle istenen veya en iyi sonuçları vermez ve araştırmacıları kombinasyonel stratejileri keşfetmeye itmektedir. Sentetik biyolojideki ilerlemelerle, büyük ve kapsamlı kütüphaneler oluşturmak için çeşitli yöntemler kolayca kullanılabilir. Ancak, uygulanabilir araçlar olarak hizmet etmek için, bu yetenek en iyi performans gösteren suşu ve/veya istenen özelliği taşıyanları belirlemek için yüksek verimli tarama (HTS) tekniklerinin geliştirilmesini gerektirir. HTS'ye yönelik mevcut zorlukların ortadan kaldırılması ve potansiyel iyileştirmeler, sentetik biyoloji, nanoteknoloji ve yapay zekadaki hızlı gelişmeler ile desteklenmektedir. Rasyonel entegrasyonlar, biyoteknolojide daha geniş uygulamalara sahip daha verimli endüstriyel mikroorganizmalar oluşturmak için önemli bir itici güç olacaktır.

Bu bölümde yüksek çeşitliliğe sahip tarama kütüphanelerinin oluşturulması ve arama aralığını genişletmek ve hedef bileşikleri vurgulamak için yeni tespit yöntemlerinin kullanımı dahil olmak üzere HTS verimliliğini artıracak en önemli faktörleri ve uygulamalar özetlendi.

## **Mikroorganizmaların Endüstri İçin Yetiştirilmesindeki Zorluklar**

Biyoteknoloji alanı, kimyasallar, yakıtlar, enzimler, antibiyotikler, malzemeler ve sağlık ürünleri gibi çok sayıda önemli ürünü üretmek için mikroorganizmalar ve enzimler kullanır. Biyoteknolojide kullanılan mikroorganizmalara genellikle hücre fabrikaları denir (Lee vd. 2019). Doğal olarak izole edilmiş mikroorganizmalar, düşük verimleri ve zorlu endüstriyel koşullara karşı zayıf toleransları nedeniyle nadiren doğrudan endüstriyel ölçekte üretim için kullanılabilir. Bu sorunların üstesinden gelmek için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir; bunlar arasında mikroorganizmanın fizyolojik



işlevlerini gen düzeyinde değiştirerek hücre fabrikalarını yeniden yapılandırmak ve suş büyümesi ve ürün birikimi için optimum ortamların sağlanması gibi koşullar yer almaktadır (Rugbjerg ve Sommer, 2019).

Hedef ürünlerin birikimini artırmak için, fiziksel ve kimyasal mutagenesi (Zhang vd. 2018), adaptif laboratuvar evrimi (ALE) (Choe vd. 2019) ve genetik- metabolik mühendislik dahil olmak üzere çeşitli rastgele mutagenesi ve rasyonel mühendislik yaklaşımları geliştirilmiştir. Yararlı bir mutasyon olasılığı çok düşük olabileceğinden, büyük bir mutant kütüphanesindeki mikrobiyal suşları hızla taramak için yöntemler geliştirmek çok önemlidir. Geleneksel taramanın verimliliği, düşük verim ve yavaş tespit yöntemleri sebebiyle önemli ölçüde sınırlandırılır. Bu durum çok sayıda mutanti taramayı yüksek maliyetli kılar. Bu nedenle, HTS prosedürleri yüksek üreticili mikrobiyal hücre fabrikalarını izole etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Endüstriyel mikroorganizmaların seçiminde iki husus dikkatlice ele alınmalıdır: taramanın kapsamının nasıl genişletileceği (çeşitli bir tarama kütüphanesinin oluşturulması ve arama aralığını genişletmek için teknolojilerin etkinleştirilmesi) ve hedef ürünlerin tanınmasının nasıl artırılacağı (mutasyona uğramış veya tasarlanmış mikroorganizmalardan biyosentezlenen belirli hedef ürünleri tespit etmek için analitik yöntemler) (Ma vd. 2018). Yapılan bazı çalışmalarda, mutant kütüphane oluşturma (Zhou ve Alper 2019) ve analiz (Leavell vd. 2020) için yaygın olarak kullanılan stratejileri özetlenmiştir. Bu çalışmalarda, esas olarak mutant kütüphane oluşturma, arama aralığını genişletme teknolojilerini etkinleştirme ve HTS için kullanılan analitik yöntemlere kadar HTS prosedürlerinin mevcut stratejilerine ve gelecekteki perspektiflerine odaklanmaktadır.

## **Tarama Kütüphaneleri Zenginleştirme ve Uyum**

Doğada arkeler, bakteriler, mayalar, aktinomisetler ve mantarlar dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizmalar bulunur. Bu mikroorganizmalar genellikle yararlı ürünler biriktirir. Bu birikim, pH, sıcaklık, ozmotik basınç,

radyasyon ve mutajenik maddeler dahil olmak üzere çevresel faktörlere uzun vadeli uyum sağlayarak geliştirilebilir. Bu nedenle, belirli fermantasyon ürünleri biriktiren mikrobiyal suşlar önce doğal kütüphaneden zenginleştirilir ve uyum sağlanır (Held vd. 2019). Doğal kütüphanede belirli bir suşu taramak için genel prosedür aşağıdaki adımları içerir:

- a) hedef suş açısından zengin numuneler toplamak,
- b) hedef suşu belirli bir ortamla zenginleştirmek,
- c) saf türleri ayırmak,
- d) ayrı suşların performansını belirlemek,
- e) dizi analizi yoluyla en umut verici suşu belirlemek (Yang vd. 2015; Pandey vd. 2019).

## **Mutagenез Teknolojileri**

Mutagenез, endüstriyel mikroorganizmaların rafine edilmesinde yaygın olarak uygulanmıştır ve birçok endüstriyel biyoteknoloji sürecini önemli ölçüde geliştirmiştir. Yaygın olarak kullanılan bazı fiziksel mutagenез yaklaşımları arasında UV ışığı,  $\alpha$  ışınları,  $\beta$  ışınları,  $\gamma$  ışınları ve X ışınlarının yanı sıra alkile edici ajanlar, baz analogları ve antibiyotikler kullanan kimyasal mutagenез yaklaşımları yer alır (Zhou ve Alper, 2019). Son yıllarda atmosferik ve oda sıcaklığında plazma (ARTP) (Zhang vd. 2015) ve ağır iyon ışınlanması (Jiang vd. 2018) gibi bazı yeni mutasyon yöntemleri endüstriyel mikroorganizmalar üretmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında, bu iki yöntem daha yüksek mutasyon oranları, daha rastgele mutasyon bölgeleri gibi çeşitli avantajlar sunar ve toksik ve zararlı kimyasallar gerektirmezler (Jiang vd. 2018; Ban vd. 2019). Günümüzde, mutagenез hala endüstriyel mikroorganizmalar, özellikle aktinomisetler ve mantarlar gibi ikincil metabolit üreticileri üretmek için geçerli bir yol olarak kabul edilmektedir.

## **Uyarlanabilir Laboratuvar Evrimi (ALE)**

ALE, mikroorganizmaların farklı genlerde ve düzenleyici bölgelerdeki faydalı mutasyonlar yoluyla farklı çevre koşullarına uyum sağlama yeteneği

gibi önemli bir özelliğine dayanmaktadır. Bu yöntemin tipik uygulamaları: (i) mikroorganizmaları yüksek ozmotik basınç, düşük/yüksek pH veya yüksek/düşük sıcaklık gibi zorlu çevresel streslere dayanacak şekilde uyarlamak (Pereira vd. 2019); (ii) suşların büyüme hızı, substrat tüketimi veya ürün birikimi açısından kapasitesini iyileştirmek (Pfeifer vd. 2017) ve (iii) yerel olmayan ürünleri sentezlemek veya yerel olmayan substratları tüketmek için potansiyel yolları etkinleştirmek (Graf vd. 2019) şeklinde sınıflandırılabilir. eVOLVER (Wong vd. 2018) ve mikro damlacık mikrobiyal kültür (MMC) sistemi (Tan vd. 2019), mikrobiyal yüksek verimli yetiştirme ve uyarlanabilir evrim için tasarlanmıştır. eVOLVER, maya ve bakteriler için uyarlanabilir nişlerin karakterizasyonuna izin veren şişe içinde sürekli bir yetiştirme sistemidir. Verimlilik, tekrarlanabilirlik ve kaliteyi verimli bir şekilde dengeleyebilir. Farklı koşullar altında maya fizyolojisini karakterize etmek için birden fazla sensörle donatılmış bir minichemostat sistemi inşa edilmiştir (Bergenholtz vd. 2019). MMC, mikro damlacık üreten çipleri bir tespit modülüyle birleştirmeye dayanmaktadır (Jian vd. 2019). Bu sistemler ile, düşük maliyetle büyük ölçekli HTS elde edebilir. Ek olarak, ALE'ye dayalı olarak, *Escherichia coli*'de L-lizin üretimini iyileştirmek için genom replikasyon mühendisliği destekli sürekli evrim (GREACE) kullanılmıştır (Wang vd. 2019). ALE, daha verimli mikrobiyal hücre fabrikaları inşa etmek için metabolik mühendislik ve sentetik biyoloji stratejileriyle entegre edilebilir.

## Yönlendirilmiş Evrim

Hedef ürünün biyosentezi bir dizi enzimatik reaksiyonu içerir. Hedef ürünün birikimini iyileştirmenin pratik bir yolu enzim aktivitelerini artırmaktır. Yönlendirilmiş evrim, enzim mühendisliği için güçlü bir yöntemdir ve endüstriyel biyosentez süreçlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Mutant kütüphaneleri oluşturmak için kullanılan yöntemlere göre rasyonel olmayan tasarım, rasyonel tasarım ve yarı rasyonel tasarım olarak ayrılabilir (Debon vd. 2019). Rasyonel olmayan tasarım, enzim dizisi ve yapısının derinlemesine anlaşılmasını gerektirmeyen rastgele bir evrim stratejisidir ve ana modeller hata eğilimli polimer zincir reaksiyonu (PZR), DNA karıştırma ve doyunluk

mutagenesi içerir. Rasyonel tasarım, hedef mutantların daha verimli bir şekilde taranabileceği doğal enzimlerin kinetiğini ve evrimini simüle etmek için akıllı hesaplama stratejilerine dayanır (Ebert vd. 2017). Yarı rasyonel tasarım, rasyonel olmayan ve rasyonel tasarımların birleştirilmesiyle oluşturulur. Bir dizi yarı rasyonel strateji geliştirilmiştir ve yarı rasyonel tasarım, dizi alanından ve tarama ölçeğinden yararlandığı için en yaygın uygulanan yol olarak kabul edilir (Cheng vd. 2015).

### **Rastgele Birleştirme Tabanlı Stratejiler**

Daha rasyonel bir şekilde suş kütüphaneleri oluşturmak için, promotör-5'-UTR (5'-çevrilmemiş bölge) komplekslerinin genlerle rastgele birleştirilmesi (Zhou vd. 2017), multipleks otomatik genom mühendisliği (MAGE) (Si vd. 2017), ePathBrick (Zha vd. 2018), CasEMBLR (Jakociunas vd. 2015) ve COMPASS (Naseri vd. 2019) gibi birçok rastgele birleştirme tabanlı stratejiler oluşturulmuştur. Promotör-5'-UTR kompleksleriyle genlerin rastgele birleştirilmesi, bir hedef ürünün biyosentez yolunu optimize etmek için en basit stratejidir (Zhou vd. 2019). Başlangıçta *E. coli*'de geliştirilen multipleks otomatik genom mühendisliğinde, kromozomdaki birden fazla bölgenin hızlı ve sürekli modifikasyonu yoluyla büyük ölçekli programlama ve evrim elde edebilir. Yükseltilmiş versiyonu CRMAGE, CRISPR/Cas9 ve  $\lambda$  Red aracılı rekombinasyona dayalı olarak geliştirilmiştir (Ronda vd. 2016). Ek olarak, EMAGE *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (Barbieri vd. 2017) gibi ökaryotlar için kurulmuştur. ePathBrick yöntemi, dört izokaudamer çiftinde yer alan bir vektöre dayalı olarak metabolik yolların hızlı tasarımı ve optimizasyonu için çok yönlü bir platform sağlar. Homolog dizilere sahip DNA parçalarını genomun belirli bölgelerine entegre edebilen CasEMBLR, *S. cerevisiae* için in vivo çoklu gen birleştirme için belirteçsiz bir yöntemdir. Çok lokuslu CRISPR/Cas9 aracılı modifikasyonla donatılmış COMPASS,  $\beta$ -karoten üretimi ve  $\beta$ -iyonon ve biyosensöre duyarlı naringenin eş üretimi için kullanılmıştır. Bu rastgele birleştirme stratejileri, potansiyel olarak birbirleriyle esnek bir şekilde etkileşime girebilen çok sayıda farklı işleve ve düzenleyici

birime sahip büyük ölçekli kütüphaneler oluşturmak için yararlı olabilmektedirler.

## **Geniş Arama Aralığı Taramalarında Kullanılan Teknolojiler Spektroskopi Ekipmanı**

HTS'nin uygulanması genellikle yüksek verimli tespit ekipmanına dayanır. Mikro plaka okuyucular HTS'de en sık kullanılan ekipmanlardır. Yükseltilmiş versiyonlar arasında çoklu tespit modlarına sahip çoklu etiketli plaka okuyucular bulunur. 200-1000 nm aralığındaki bir tespit dalga boyu, absorbansı, floresan yoğunluğunu, zamanla çözülen floresansı, floresan polarizasyonunu ve kemilüminesansı tespit etmek için çoklu etiketli bir plaka okuyucuda kullanılabilir (Swasey vd. 2018). Bu yaklaşım, hücre apoptozu veya büyümesini, metabolit içeriğini, enzim aktivitesini vb. tespit etmek için yaygın olarak uygulanmaktadır (Wagner vd. 2018; Debon vd. 2019). Ek olarak, araştırmacılar Raman (Schie vd. 2018), Fourier dönüşümü IR (Yu vd. 2019) ve yakın-IR (Morita vd. 2014) spektrumlarına dayalı olarak genişletilmiş bir kimyasal yelpazesini tespit edebilen cihazlar da geliştirmişlerdir. Bu cihazlardan bazıları, floresanla aktive edilen hücre ayırma (FACS), mikroakışkanlar ve optik cımbızlardan yararlanılarak yüksek verimli tek hücre tespiti, analizi ve ayırma için daha da geliştirilmiştir (He vd. 2019).

## **Otomatik Sistemler**

Otomasyon, HTS'nin önemli bir özelliğidir ve mikro kantitatif deneylerin ve büyük ölçekli analizlerin temelini oluşturur. HTS, bir dizi sürekli otomatik deneysel işlemi entegre eder.

Klasik HTS'de yer alan ekipmanlar esas olarak bir koloni seçici, bir sıvı işleme sistemi ve bir yazılım sisteminin kontrolü altında bağlanıp çalıştırılabilen çok işlevli bir mikro plaka okuyucu içerir (Dörr vd. 2016). Ayrıca, PZR makineleri, santrifüjler, buzdolapları ve sterilizasyon ve paketleme sistemleri dahil olmak üzere bir dizi aksesuar cihazı bir HTS sistemine entegre edilmek üzere değiştirilmiş veya yeniden tasarlanmıştır. Son yıllarda, yüksek

performanslı endüstriyel üreticileri seçmek için akış sitometrisi (FC) ve mikroakışkanlara dayalı farklı otomatik tarama hatları kurulmuştur (Ma vd. 2018; Oin vd. 2019).

### **Floresan Aktiveli Hücre Ayırma (FACS)**

Akış sitometrisi (FC), tek bir hücrenin birden fazla parametresini hızlı bir şekilde analiz edebilir ve hedef grupları birden fazla şekilde hızla sınıflandırabilir. Hücrelerden gelen bilgiler, hücre yoğunluğu ve boyutu, dahili karmaşıklık ve diğer floresan sinyalleri dahil olmak üzere FC kullanılarak doğru bir şekilde tespit edilebilir. FC, eş zamanlı niceliksel ve nitel analizler gerçekleştirme yeteneği nedeniyle HTS için umut vadeden bir tekniktir (Stavrakis vd. 2019). FC ile donatılmış floresan aktifli hücre ayırma (FACS), hedef hücreleri yüksek saflık ve verimle tek hücre düzeyinde taramak için geliştirilmiştir. Bir dizi ticari FACS cihazı ortaya çıkmış ve temel biyolojik araştırmalarda ve endüstriyel uygulamalarda vazgeçilmez bir araç haline gelmiştir. FACS,  $10^6$  hücre/s'ye kadar ulaşan ultra yüksek sıralama hızıyla iyi bilinmektedir. Ancak, FACS'nin ana dezavantajı yüksek düzeyde spesifik olmayan geçmişi ve FACS ile taranan suşların mikro plaka tabanlı bir HTS işlemiyle daha fazla yeniden taranması gerekir. Endüstriyel biyoteknolojideki hedef ürünlerin çoğu, hücre içi geri bildirim inhibisyonundan kaçınan ve ayrıca akış aşağısı işleme dayanabilen hücre dışı ürünlerdir. FACS yalnızca hedef bileşiklerle ilişkili floresan sinyalleri üreten hücre içi veya membrana bağlı ürünlerin analizi için kullanılabilir (Wang vd. 2014) ve hücre dışı ürünleri analiz etmek için FACS kullanımı zordur. Bunun yanında mikroakışkanları ve hücre ayırmayı birleştiren mikroakışkan FACS, geleneksel FACS'ın sınırlamalarının üstesinden gelebilmekte ve maliyet etkin tanımlama ve ayırma yöntemleri nedeniyle ilgi görmektedir (Ren vd. 2018; Oin vd. 2019).

### **Mikroakışkan Teknolojisi**

Mikroakışkan, sıvıları mikrolitreden pikolitreye kadar ölçekte işlemek için kullanılan bir tekniktir. Kimya, akışkan fiziği, mikroelektronik, malzemeler ve biyolojiyi içeren disiplinler arası, gelişmekte olan bir teknolojidir.

Mikroakışkan teknolojisi genellikle biyolojik ve kimyasal laboratuvarların en temel işlevlerini kapsayabilmesi nedeniyle 'çip üzerinde laboratuvar' olarak bilinen bir mikroakışkan çip kullanır. Mikroakışkan çip teknolojisine dayalı olarak, bağımsız tek hücre analizi için damlacık tabanlı bir mikroakışkan sistem geliştirilmiştir. Bu, yüksek hassasiyet, nicel okuma ve doğruluk gibi avantajları göz önüne alındığında, aşırı tüketen/salgılayan fenotiplerin taranması ve yönlendirilmiş enzim evrimi gibi çeşitli uygulamalarda kullanılmıştır (Wang vd. 2014; Sesen vd. 2017). Tek bir damlacıkta tek hücrelerin paketlenmesini sağlayan mikroakışkan çipler tasarlanabilir. Ürün konsantrasyonuna orantılı floresan sinyalleri üreten substratların sağlanması, paketlenmiş damlacıkların FACS analizini kolaylaştırabilir. Damlacık tabanlı mikroakışkan sistemlerinin tarama verimliliği, bunların gelişmiş floresan etiketleme ve ayırma yöntemleriyle birleştirilmesiyle önemli ölçüde artırılabilir (Ma vd. 2018). Ek olarak, kütle spektrometrisi, Raman spektroskopisi ve kılcal yaklaşımlar gibi bazı tespit teknikleri, tarama prosedürünün evrenselliğini daha da genişletmek için damlacık tabanlı bir mikroakışkan sisteme entegre edilebilir (Chen vd. 2019; He vd. 2019). Yakın zamana kadar mikroakışkan damlacık yönteminin en belirgin dezavantajı, düzgün damlacıklar elde etmek için kapsülleme hızının yaklaşık  $10^3$ - $10^4$ /s olmasıydı; bu, FACS'nin çok altındadır. Özel yapım mikroakışkan çipler ve yüksek performanslı damlacık sabitleyici yüzey aktif maddeler bu sorunu hafifletebilmektedir (Sesen vd. 2017; He vd. 2019).

## **Yüksek Verimli Kültür Sistemleri**

Minyatürleştirme, analiz için gereken biyolojik ve kimyasal numune miktarını azaltabildiği için HTS'nin önemli bir özelliğidir (Lin vd. 2019). Genel olarak, yüksek verimli analiz 96 veya 384 kuyulu mikrotitre plakalarında (MTP'ler) yürütülürken, yüksek verimli kültür esas olarak kültür ortamı ve oksijene ihtiyaç duyulması nedeniyle derin 24, 48 ve 96 kuyulu MTP'lerde gerçekleştirilir. MTP'lerde çalkalama şişelerine benzer bir karıştırma etkisi elde etmek için, MTP kültürleri için çalkalayıcılar 800-1000 rpm'ye ulaşmalıdır, oysa tipik bir şişe çalkalayıcı hızı ~100-300 rpm'dir. MTP kültürü hem fermantasyon suyunun buharlaşma hızı hem de kuyular arasındaki çapraz

kontaminasyon önemli ölçüde azaltılabilir (Zhou vd. 2019). İdeal bir mikro kültür cihazı genellikle büyük ölçekli yetiştirme koşullarını doğru bir şekilde yeniden üretebilmeli ve mikroorganizmanın fizyolojik metabolizmasını ve üretim kapasitesini yansıtabilmelidir (Tajsoleiman vd. 2019). Geleneksel tarama genellikle çalkalama şişelerinde ve biyoreaktörlerde sırayla gerçekleştirilir. Ancak, çalkalama şişelerindeki işlem parametrelerinin gerçek zamanlı olarak ölçülmesi ve düzenlenmesi zordur, bu durum biyoreaktörde iyileştirilmiş bir suşun amplifikasyonunu ciddi şekilde sınırlar. Mikrobiyoreaktörler, çalkalama şişelerinde ve biyoreaktörlerde geleneksel iki adımlı fermantasyonu tek adımlı entegre bir işlemle değiştirmek için yüksek verimli optimizasyon için tasarlanmıştır. Geliştirilen tasarım ayrıca susuz bir sıcaklık kontrol sistemi, mikro vana kontrollü besleme ve invaziv olmayan optik pH ve çözülmüş oksijen (DO) biyosensörleri ile donatılmıştır. Ancak, bu tekniklerin özellikle çok sınırlı kültür hacminde pH ve DO elektrotlarının tespit aralığı ve hassasiyeti açısından daha fazla iyileştirilmesi gerekmektedir (Sandner vd. 2019; Totlani vd. 2023).

## **Hedef Bileşiklerin Tarama Yöntemleri**

### **UV/Görünür Spektroskopi Tabanlı Tarama**

HTS'nin pratik uygulamaları için, UV/görünür spektroskopisine dayalı çok sayıda tarama yöntemi oluşturulmuştur. Bunlar doğrudan ve dolaylı tespit yöntemleri olarak ikiye ayrılabilir. Avermektin, sefalosporin C, likopen ve p-kumarik asit gibi nispeten karmaşık moleküler yapıya veya doğuştan gelen renk özelliklerine sahip ürünler, doğrudan absorbans ölçümü yoluyla taranabilir (Wang vd. 2014; Zhou vd. 2016). Doğrudan tespit için belirgin bir absorbans özelliğine sahip olmayan bazı ürünler, pH göstergelerinin dahil edilmesi, metal iyonlarıyla şelasyon veya enzimatik veya kimyasal reaksiyonlarla birleştirme yoluyla tespit edilebilir. Örneğin, bir suş hedef ürün olarak tek bir tür organik asit biriktirirse, uygun pH göstergeleri eklenerek bir tarama prosedürü oluşturulabilir (Zeng vd. 2015). Düşük bir pH, yalnızca suşun daha fazla organik asit biriktirdiğini değil, aynı zamanda suşun daha düşük bir pH'ı tolere etme kapasitesine sahip olduğunu da gösterir. Pirüvik asit gibi hedef organik



asidin daha spesifik tespiti için, tespit edilebilir sarı bir kompleks üreten bir şelasyon iyonu eklenerek bir tarama işlemi oluşturulabilir. Ek olarak, hedef metabolit konsantrasyonu ile ATP/ADP ve NAD(P)<sup>+</sup> gibi kromojenik maddeler arasında niceliksel ilişkiler kuran kimyasal veya eşleştirilmiş enzim reaksiyonlarına dayalı tarama yöntemleri geliştirilmiştir (Agu vd. 2018; Guo vd. 2018).

### **Floresan Spektroskopisi Tabanlı Tarama**

UV/görünür spektroskopisi tabanlı HTS'ye benzer şekilde, floresan spektroskopisi tabanlı HTS, hedef ürünün özelliklerine göre doğrudan ve dolaylı tespit yöntemlerine ayrılabilir. Örneğin, riboflavin 450/518 nm'de floresan uyarım/emisyon dalga boylarına sahiptir ve riboflavin üretimi artmış *Yarrowia lipolytica* mutantları 518 nm'de floresan yoğunluğuna göre taranabilir (Wagner vd. 2018). Floresan boyaların/probların tarama için kullanımı örneğin ölü veya canlı hücreleri boyalarla etiketlemek, lipitleri ve tek hücreli yağları Nil kırmızısıyla analiz etmek (Katre vd. 2017) ve menakinon ve polimalik asidi rodaminle ölçme (Liu vd. 2016) örneklerinde olduğu gibi yaygındır. İlginç bir şekilde, Nil kırmızısına dayalı tarama öncesinde, *Y. lipolytica* yoğunluğu yüzen hücrelerin tanımlanması yoluyla daha verimli lipojenik suşların ön taraması için kullanılmıştır (Liu vd. 2015). Floresan sinyalleri üreten kimyasal veya enzimle eşleştirilmiş reaksiyonlara dayalı yöntemler de endüstriyel mikroorganizmaların verimli bir şekilde seçilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Debon vd. 2019; Zhou vd. 2019). Floresansa dayalı HTS, FACS ile kıyaslanabilir bir taramaya izin verdiği için ultra-HTS'ye (uHTS) ulaşabilir. Floresan spektroskopisi, biyosensör tabanlı HTS'ye genişletilebilmektedir (Zeng vd. 2020).

### **Biyosensör Tabanlı Floresan Spektroskopisi Taraması**

Mikroorganizmaların hedef ürünleri veya önemli ara maddeleri doğrudan veya dolaylı renk veya floresan reaksiyonları ile kesin tespit edilemediğinden alternatif olarak biyosensör tabanlı tarama stratejileri önerilmiştir (Dekker vd. 2017). Bu sistem, bir biyosensör, bir sensör ve bir

raporlayıcıdan oluşur. Sensör, belirli hücre içi metabolitleri belirlerken, raporlayıcı, sensör sinyaline bağlı bir dizi programlanmış genetik devre aracılığıyla kantitatif sinyaller üretir. Bu prensibe dayalı olarak uHTS için bir dizi biyosensör geliştirilmiştir. Biyosensörler genellikle iki tiptir olup bunlar protein tabanlı biyosensörler ve nükleik asit tabanlı biyosensörlerdir. Protein tabanlı biyosensörlerin çoğu transkripsiyon faktörlerine (TF'ler) ve tasarlanmış floresan proteinlere (FP'ler) dayanırken, nükleik asit tabanlı biyosensörler esas olarak RNA riboswitch'leri, RNA Spinach'i ve yapı değiştirme tabanlı DNA biyosensörlerini içerir (Chen vd. 2019).

TF'ler, hedef genlerin güçlendirici veya promotör bölgelerine bağlanan ve çevresel değişikliklere veya önemli hücre içi sinyallere yanıt olarak ifadelerini düzenleyen doğal duyuşal proteinlerdir. TF tabanlı biyosensörler, en yaygın ve değerli biyosensör türlerinden biri haline gelmiştir ve amino asitler, organik asitler, flavonoidler, şekerler ve lipitler dahil olmak üzere metabolitlerin HTS'si için yaygın olarak kullanılmaktadır (Cheng vd. 2018). TF tabanlı biyosensörlerin kapsamı, hibrit veya füzyon TF biyosensörlerinin ve in vitro TF biyosensörlerinin inşasıyla daha da genişlemiştir (Silverman vd. 2019). FP'ler ayrıca bir ligand bağlama alanı tanımlanarak belirli metabolitleri tespit edecek şekilde tasarlanabilir. FP biyosensörleri, Förster rezonans enerji transferi (FRET), dairesel olarak değiştirilmiş ve dengesizleştirici alan-bağlantılı floresan dahil olmak üzere çeşitli farklı modlarda kullanılmış olsa da, endüstriyel mikroorganizmaların HTS'si için FP tabanlı biyosensörlerin uygulanması nadiren bildirilmiştir (Lin vd. 2017). Bir mRNA'nın düzenleyici alanını hedef alan RNA riboswitch'leri, RNA aptamer alanları aracılığıyla çeşitli metabolitleri tespit edebilir ve böylece kodlanmış proteinin transkripsiyonunu ve translasyonunu düzenleyebilir. Bakteriyel ve ökaryotik ribozom bağlanma bölgesi (RBS) ve ribozim bazlı biyosensörler, özellikle *E. coli* ve *S. cerevisiae*'de metabolit taraması ve suş mühendisliği için yaygın olarak kullanılır. RNA Ispanak bazlı biyosensörler, *S. cerevisiae*'de tirozin üretimini ve rekombinant protein salgılanmasını artırmak için RNA “damlacıklarda aptamerler” olarak geliştirilmiştir. Ek olarak, DNA

biyosensörleri metabolitleri algılamak için tasarlanmıştır; ancak, endüstriyel biyoteknolojide HTS için nadiren uygulanmışlardır (Lin vd. 2017). Bununla birlikte, biyosensörlere dayalı HTS, endüstriyel mikroorganizmaların üretiminde büyüyen bir eğilimdir (Zeng vd. 2020).

### **Elektrokimyasal Sensör (ES) Tabanlı Tarama**

ES cihazları, bir elektrot yüzeyinde meydana gelen biyokimyasal reaksiyonlar tarafından üretilen elektrik akımındaki değişime dayanır. ES elektrotları, hedefleri için son derece hassas ve seçici olmaları, hızlı tepkiler göstermeleri ve minyatürleştirme potansiyeline sahip olmaları nedeniyle önemli avantajlara sahiptir (Yousefi vd. 2019). Biyolojik bir tanıma elemanı (sensör) ve biyolojik reaksiyonu ölçülebilir bir elektrokimyasal sinyale (raporlayıcı) dönüştüren bir dönüştürücü içerirler. ES cihazları, kullanılan elektrot tekniğine bağlı olarak genellikle dört tiptedir: amperometrik, potansiyometrik, kondüktometrik ve impedimetrik. Elektrot malzemesi, ES performansını etkileyen en önemli faktördür ve ES tasarımı, karbon nanotüpler, metal ve metal oksit nanopartiküller, silika nanopartiküller ve yarı iletken malzeme tabanlı nanopartiküller gibi gelişmiş nanomalzemeleri içermektedir (Majdinasab vd. 2019). ES cihazları şu anda klinik tanı, gıdalardaki zararlı bileşenlerin analizi ve çevresel izlemede yaygın olarak uygulanmaktadır (Silva vd. 2018). HTS'de, ES teknikleri, esas olarak oksidoredüktazlar ve oksidazlar olmak üzere NAD(P)H veya H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile ilişkili enzimlerin aktivitesini artırmak için kullanılmıştır (Aymard vd. 2017); ancak, endüstriyel biyoteknolojide belirli fermente ürünlerin tespiti için ES uygulamaları sınırlı sayıda çalışmada ele alınmıştır (Zeng vd. 2020).

### **Gelişmiş Spektroskopik Tekniklere Dayalı Tarama**

Sınıflama verimliliğini artırmak ve belirli hedef fenotiplere sahip endüstriyel üreticiler elde etmek için, Raman, Fourier dönüşümü IR (FTIR) ve Fourier dönüşümü yakın-IR (FTNIR) spektroskopisi gibi gelişmiş cihaz platformlarına dayalı spektroskopik teknikler endüstriyel biyoteknolojide uygulanmaktadır. Raman spektroskopisi, Raman etkisine dayanır ve hızlı,

hassas, tahribatsız ve gerçek zamanlı tespit avantajlarına sahiptir. Tek hücrelerin (Wang vd. 2017) ve biyokatalizörlerin (Westley vd. 2016) etiketsiz taranması için bir HTS Raman spektroskopisi platformu kurulmuştur. Raman spektroskopisine benzer şekilde, FTIR ve FTNIR spektroskopisi de yüksek verim ve hızlı ve otomatik tespit avantajlarına sahip tahribatsız analitik yöntemlerdir. Bu iki analitik yöntem *Aurantiochytrium* sp., *Mucor* sp. ve *S. cerevisiae*'nin taranması için kullanılmıştır (Morita vd. 2014; Yu vd. 2019). Bu spektroskopik teknikler ve konfokal lazer taramalı mikroskopi ile entegre ileri görüntüleme teknolojileri, endüstriyel HTS'de büyük potansiyele sahiptir.

### **Sonuç ve Gelecek Perspektifi**

HTS ilk olarak 1990'ların başında geliştirilmiş ardından verimdeki artış ile birlikte, deney minyatürizasyonu, otomasyon ve robotikteki teknolojilerin gelişimini daha da teşvik etmiştir. HTS rutin bir laboratuvar tekniği haline gelmiş hatta ultra-HTS formları endüstriyel biyoteknolojide temel ve uygulamalı çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Koloni toplayıcılar, sıvı işleme sistemleri, floresanla aktive edilmiş hücre ayırma (FACS) ve damlacık mikro akışkanlığı gibi yeni ekipmanların geliştirilmesiyle HTS'nin kapsamı önemli ölçüde genişletilmiştir.

Mikrotiter plak tabanlı HTS teknikleri, daha iyi fenotiplere sahip endüstriyel mikroorganizmalar elde etmek için hem otomasyonu hem de verimi artırarak daha az emek yoğun ve daha verimli iş akışları sağlamıştır. FACS ve mikroakışkan tabanlı HTS teknikleri, farklı floresan problemleri ve biyosensörlerle birlikte, tarama verimliliğini 105/günden 1011/güne önemli ölçüde artırmıştır. Bu gelişmiş teknikler, tarama kapsamını genişletir ve hedef ürünlerin tanınmasını iyileştirir. Ancak, 1000 amino asit kalıntısı barındıran bir enzim teorik olarak 191000'e kadar varyant üretebilir ve mevcut tarama verimi bu büyüklüğün çok altındadır. Mikroorganizmaların tarama aralığının daha da genişletilmesi çok sayıda zorlukla karşı karşıyadır ve nanoteknoloji ve elektronik teknikler kullanarak FACS tabanlı yöntemlerden daha verimli tarama tekniklerinin geliştirilmesi önemli bir hedeftir. Nanoteknoloji, nano

gözenekler ve nano problemlerin tümör hücrelerini ve patojenik bakterileri analiz etmek için kullanıldığı yeni bir teknolojidir. Bu teknolojiler, mikroakışkanlar ve diğer ölçüm teknikleriyle birleştirildiğinde, daha çeşitli metabolitleri veya enzimleri taramak ve tarama verimliliğini daha da artırmak için daha hassas biyosensör sistemleri inşa etmede büyük bir potansiyele sahiptir. Özellikle biyosensörlere dayalı olanlar olmak üzere birçok etkili analitik yöntem, mikrobiyal hücre fabrikalarını geliştirilmiş performansla izole etmek için HTS için başarıyla kullanılmıştır. Ancak, bu stratejiler yalnızca belirli hedef ürünler için uygundur. Sentetik biyoloji ve genom düzenleme araçlarındaki gelişmeler, biyosensörlerin kapsamını daha geniş bir küçük molekül yelpazesine özel olarak yanıt verecek şekilde genişletme olasılığı yüksektir. Ayrıca, endüstriyel mikroorganizmaların damlacıklar ve MTP'lerdeki performansı biyoreaktörlerdekinden farklı olabileceğinden, endüstriyel ölçekli koşulları simüle edebilen güvenilir bir ölçek küçültme süreci, daha doğru nihai tarama sonuçları sağlamak için hayati önem taşıyacaktır. Ayrıca, yapay zekadaki gelişmeler ve büyük biyo-verilerin ortaya çıkması, mevcut tarama hatlarında devrim yaratmaya ve HTS maliyetlerini daha da düşürmeye hazırdır.

## KAYNAKÇA

- Agu, C. V., Lai, S. M., Ujor, V., Biswas, P. K., Jones, A., Gopalan, V., & Ezeji, T. C. (2018). Development of a high-throughput assay for rapid screening of butanologenic strains. *Scientific Reports*, 8(1), 3379.
- Aymard, C., Bonaventura, C., Henkens, R., Mousty, C., Hecquet, L., Charmantray, F., ... & Doumèche, B. (2017). High-Throughput Electrochemical Screening Assay for Free and Immobilized Oxidases: Electrochemiluminescence and Intermittent Pulse Amperometry. *ChemElectroChem*, 4(4), 957-966.
- Ban, S., Lin, W., Luo, Z., & Luo, J. (2019). Improving hydrogen production of *Chlamydomonas reinhardtii* by reducing chlorophyll content via atmospheric and room temperature plasma. *Bioresource technology*, 275, 425-429.
- Barbieri, E. M., Muir, P., Akhuetie-Oni, B. O., Yellman, C. M., & Isaacs, F. J. (2017). Precise editing at DNA replication forks enables multiplex genome engineering in eukaryotes. *Cell*, 171(6), 1453-1467.
- Bergenhalm, D., Liu, G., Hansson, D., & Nielsen, J. (2019). Construction of mini-chemostats for high-throughput strain characterization. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(5), 1029-1038.
- Chen, P., Chen, D., Li, S., Ou, X., & Liu, B. F. (2019). Microfluidics towards single cell resolution protein analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 117, 2-12.
- Chen, X., Zhang, D., Su, N., Bao, B., Xie, X., Zuo, F., ... & Yang, Y. (2019). Visualizing RNA dynamics in live cells with bright and stable fluorescent RNAs. *Nature Biotechnology*, 37(11), 1287-1293.
- Cheng, F., Tang, X. L., & Kardashliev, T. (2018). Transcription factor-based biosensors in high-throughput screening: advances and applications. *Biotechnology journal*, 13(7), 1700648.
- Cheng, F., Zhu, L., & Schwaneberg, U. (2015). Directed evolution 2.0: improving and deciphering enzyme properties. *Chemical Communications*, 51(48), 9760-9772.
- Choe, D., Lee, J. H., Yoo, M., Hwang, S., Sung, B. H., Cho, S., ... & Cho, B. K. (2019). Adaptive laboratory evolution of a genome-reduced *Escherichia coli*. *Nature communications*, 10(1), 935.
- Debon, A., Pott, M., Obexer, R., Green, A. P., Friedrich, L., Griffiths, A. D., & Hilvert, D. (2019). Ultrahigh-throughput screening enables efficient single-round oxidase remodelling. *Nature Catalysis*, 2(9), 740-747.
- Dekker, L., & Polizzi, K. M. (2017). Sense and sensitivity in bioprocessing—detecting cellular metabolites with biosensors. *Current opinion in chemical biology*, 40, 31-36.
- Dörr, M., Fibinger, M. P., Last, D., Schmidt, S., Santos-Aberturas, J., Böttcher, D., ... & Bornscheuer, U. T. (2016). Fully automatized high-throughput enzyme library

- screening using a robotic platform. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(7), 1421-1432.
- Ebert, M. C., & Pelletier, J. N. (2017). Computational tools for enzyme improvement: why everyone can—and should—use them. *Current Opinion in Chemical Biology*, 37, 89-96.
- Graf, M., Haas, T., Müller, F., Buchmann, A., Harm-Bekbenbetova, J., Freund, A., ... & Takors, R. (2019). Continuous adaptive evolution of a fast-growing *Corynebacterium glutamicum* strain independent of protocatechuate. *Frontiers in microbiology*, 10, 1648.
- Guo, C., Hu, Y., Yang, C., Urs, A. N. N., & Zhang, Y. (2018). Developing a colorimetric assay for Fe (II)/2-oxoglutarate-dependent dioxygenase. *Analytical biochemistry*, 548, 109-114.
- He, Y., Wang, X., Ma, B., & Xu, J. (2019). Ramanome technology platform for label-free screening and sorting of microbial cell factories at single-cell resolution. *Biotechnology Advances*, 37(6), 107388.
- Held, T., Klemmer, D., & Lässig, M. (2019). Survival of the simplest in microbial evolution. *Nature communications*, 10(1), 2472.
- Jakociunas, T., Rajkumar, A. S., Zhang, J., Arsovska, D., Rodriguez, A., Jendresen, C. B., ... & Keasling, J. D. (2015). CasEMBLR: Cas9-facilitated multiloci genomic integration of in vivo assembled DNA parts in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS synthetic biology*, 4(11), 1226-1234.
- Jian, X., Guo, X., Wang, J., Tan, Z. L., Xing, X. H., Wang, L., & Zhang, C. (2020). Microbial microdroplet culture system (MMC): An integrated platform for automated, high-throughput microbial cultivation and adaptive evolution. *Biotechnology and bioengineering*, 117(6), 1724-1737.
- Jiang, A. L., Hu, W., Li, W. J., Liu, L., Tian, X. J., Liu, J., ... & Chen, J. H. (2018). Enhanced production of l-lactic acid by *Lactobacillus thermophilus* SRZ50 mutant generated by high-linear energy transfer heavy ion mutagenesis. *Engineering in Life Sciences*, 18(9), 626-634.
- Katre, G., Ajmera, N., Zinjarde, S., & RaviKumar, A. (2017). Mutants of *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 grown on waste cooking oil as a biofactory for biodiesel production. *Microbial cell factories*, 16, 1-14.
- Leavell, M. D., Singh, A. H., & Kaufmann-Malaga, B. B. (2020). High-throughput screening for improved microbial cell factories, perspective and promise. *Current Opinion in Biotechnology*, 62, 22-28.
- Lee, S. Y., Kim, H. U., Chae, T. U., Cho, J. S., Kim, J. W., Shin, J. H., & Jang, Y. S. (2019). A comprehensive metabolic map for production of bio-based chemicals. *Nature catalysis*, 2(1), 18-33.

- Lima, H. R. S., da Silva, J. S., de Oliveira Farias, E. A., Teixeira, P. R. S., Eiras, C., & Nunes, L. C. C. (2018). Electrochemical sensors and biosensors for the analysis of antineoplastic drugs. *Biosensors and Bioelectronics*, 108, 27-37.
- Lin, J. L., Wagner, J. M., & Alper, H. S. (2017). Enabling tools for high-throughput detection of metabolites: metabolic engineering and directed evolution applications. *Biotechnology advances*, 35(8), 950-970.
- Lin, Y., Chen, Y., Li, Q., Tian, X., & Chu, J. (2019). Rational high-throughput screening system for high sophorolipids production in *Candida bombicola* by co-utilizing glycerol and glucose capacity. *Bioresources and Bioprocessing*, 6, 1-9.
- Liu, L., Pan, A., Spofford, C., Zhou, N., & Alper, H. S. (2015). An evolutionary metabolic engineering approach for enhancing lipogenesis in *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic engineering*, 29, 36-45.
- Liu, Y., Xue, Z. L., Chen, S. P., Wang, Z., Zhang, Y., Gong, W. L., & Zheng, Z. M. (2016). A high-throughput screening strategy for accurate quantification of menaquinone based on fluorescence-activated cell sorting. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(6), 751-760.
- Ma, F., Chung, M. T., Yao, Y., Nidetz, R., Lee, L. M., Liu, A. P., ... & Yang, G. Y. (2018). Efficient molecular evolution to generate enantioselective enzymes using a dual-channel microfluidic droplet screening platform. *Nature communications*, 9(1), 1030.
- Majdinasab, M., Mitsubayashi, K., & Marty, J. L. (2019). Optical and electrochemical sensors and biosensors for the detection of quinolones. *Trends in biotechnology*, 37(8), 898-915.
- Morita, H., Hasunuma, T., Vassileva, M., Kondo, A., & Tsenkova, R. (2014). A new screening method for recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains based on their xylose fermentation ability measured by near infrared spectroscopy. *Analytical Methods*, 6(17), 6628-6634.
- Naseri, G., Behrend, J., Rieper, L., & Mueller-Roeber, B. (2019). COMPASS for rapid combinatorial optimization of biochemical pathways based on artificial transcription factors. *Nature communications*, 10(1), 2615.
- Pandey, B. R., Ghimire, S., Bhattarai, S., Shrestha, E., Thapa, P., & Shrestha, B. G. (2019). Isolation, growth, enzyme assay and identification via 16S rRNA full sequencing of cellulolytic microbes from Nepal for biofuel production. *Renewable Energy*, 132, 515-526.
- Pereira, R., Wei, Y., Mohamed, E., Radi, M., Malina, C., Herrgård, M. J., ... & Chen, Y. (2019). Adaptive laboratory evolution of tolerance to dicarboxylic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 56, 130-141.
- Pfeifer, E., Gätgens, C., Polen, T., & Frunzke, J. (2017). Adaptive laboratory evolution of *Corynebacterium glutamicum* towards higher growth rates on glucose minimal medium. *Scientific reports*, 7(1), 16780.



- Qiang, W., Ling-ran, F., Luo, W., Han-guang, L., Lin, W., Ya, Z., & Xiao-bin, Y. (2014). Mutation breeding of lycopene-producing strain *Blakeslea trispora* by a novel atmospheric and room temperature plasma (ARTP). *Applied biochemistry and biotechnology*, 174, 452-460.
- Qin, Y., Wu, L., Wang, J., Han, R., Shen, J., Wang, J., ... & Chiu, D. T. (2019). A fluorescence-activated single-droplet dispenser for high accuracy single-droplet and single-cell sorting and dispensing. *Analytical chemistry*, 91(10), 6815-6819.
- Ren, L., Yang, S., Zhang, P., Qu, Z., Mao, Z., Huang, P. H., ... & Huang, T. J. (2018). Standing surface acoustic wave (SSAW)-based fluorescence-activated cell sorter. *Small*, 14(40), 1801996.
- Ronda, C., Pedersen, L. E., Sommer, M. O., & Nielsen, A. T. (2016). CRMAGE: CRISPR optimized mage recombineering. *Scientific reports*, 6(1), 19452.
- Rugbjerg, P., & Sommer, M. O. (2019). Overcoming genetic heterogeneity in industrial fermentations. *Nature biotechnology*, 37(8), 869-876.
- Sandner, V., Pybus, L. P., McCreath, G., & Glassey, J. (2019). Scale-down model development in Ambr systems: An industrial perspective. *Biotechnology journal*, 14(4), 1700766.
- Schie, I. W., Rüger, J., Mondol, A. S., Ramoji, A., Neugebauer, U., Krafft, C., & Popp, J. (2018). High-throughput screening Raman spectroscopy platform for label-free cellomics. *Analytical chemistry*, 90(3), 2023-2030.
- Sesen, M., Alan, T., & Neild, A. (2017). Droplet control technologies for microfluidic high throughput screening ( $\mu$ HTS). *Lab on a Chip*, 17(14), 2372-2394.
- Si, T., Chao, R., Min, Y., Wu, Y., Ren, W., & Zhao, H. (2017). Automated multiplex genome-scale engineering in yeast. *Nature communications*, 8(1), 15187.
- Silverman, A. D., Kelley-Loughnane, N., Lucks, J. B., & Jewett, M. C. (2018). Deconstructing cell-free extract preparation for in vitro activation of transcriptional genetic circuitry. *ACS synthetic biology*, 8(2), 403-414.
- Stavrikis, S., Holzner, G., Choo, J., & DeMello, A. (2019). High-throughput microfluidic imaging flow cytometry. *Current opinion in biotechnology*, 55, 36-43.
- Swasey, S. M., Nicholson, H. C., Copp, S. M., Bogdanov, P., Gorovits, A., & Gwinn, E. G. (2018). Adaptation of a visible wavelength fluorescence microplate reader for discovery of near-infrared fluorescent probes. *Review of Scientific Instruments*, 89(9).
- Tajsoleiman, T., Mears, L., Krühne, U., Gernaey, K. V., & Cornelissen, S. (2019). An industrial perspective on scale-down challenges using miniaturized bioreactors. *Trends in biotechnology*, 37(7), 697-706.
- Tan, Z. L., Zheng, X., Wu, Y., Jian, X., Xing, X., & Zhang, C. (2019). In vivo continuous evolution of metabolic pathways for chemical production. *Microbial Cell Factories*, 18, 1-19.

- Totlani, K., van Tatenhove-Pel, R. J., Kreutzer, M. T., van Gulik, W. M., & van Steijn, V. (2023). Microbioreactors for nutrient-controlled microbial cultures: Bridging the gap between bioprocess development and industrial use. *Biotechnology Journal*, 18(6), 2200549.
- Wagner, J. M., Liu, L., Yuan, S. F., Venkataraman, M. V., Abate, A. R., & Alper, H. S. (2018). A comparative analysis of single cell and droplet-based FACS for improving production phenotypes: Riboflavin overproduction in *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic engineering*, 47, 346-356.
- Wang, B. L., Ghaderi, A., Zhou, H., Agresti, J., Weitz, D. A., Fink, G. R., & Stephanopoulos, G. (2014). Microfluidic high-throughput culturing of single cells for selection based on extracellular metabolite production or consumption. *Nature biotechnology*, 32(5), 473-478.
- Wang, X., Li, Q., Sun, C., Cai, Z., Zheng, X., Guo, X., ... & Ma, Y. (2019). GREACE-assisted adaptive laboratory evolution in endpoint fermentation broth enhances lysine production by *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 18, 1-13.
- Wang, X., Ren, L., Su, Y., Ji, Y., Liu, Y., Li, C., ... & Ma, B. (2017). Raman-activated droplet sorting (RADS) for label-free high-throughput screening of microalgal single-cells. *Analytical Chemistry*, 89(22), 12569-12577.
- Westley, C., Xu, Y., Carnell, A. J., Turner, N. J., & Goodacre, R. (2016). Label-free surface enhanced Raman scattering approach for high-throughput screening of biocatalysts. *Analytical chemistry*, 88(11), 5898-5903.
- Wong, B. G., Mancuso, C. P., Kiriakov, S., Bashor, C. J., & Khalil, A. S. (2018). Precise, automated control of conditions for high-throughput growth of yeast and bacteria with eVOLVER. *Nature biotechnology*, 36(7), 614-623.
- Yang, H., Yu, H., & Shen, Z. (2015). A novel high-throughput and quantitative method based on visible color shifts for screening *Bacillus subtilis* THY-15 for surfactin production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42(8), 1139-1147.
- Yousefi, M., Dehghani, S., Nosrati, R., Zare, H., Evazalipour, M., Mosafer, J., ... & Ramezani, M. (2019). Aptasensors as a new sensing technology developed for the detection of MUC1 mucin: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 130, 1-19.
- Yu, X. J., Huang, C. Y., Chen, H., Wang, D. S., Chen, J. L., Li, H. J., ... & Wang, Z. P. (2019). High-throughput Biochemical fingerprinting of oleaginous *Aurantiocytrium* sp. strains by fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) for lipid and carbohydrate productions. *Molecules*, 24(8), 1593.
- Zeng, W., Du, G., Chen, J., Li, J., & Zhou, J. (2015). A high-throughput screening procedure for enhancing  $\alpha$ -ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* by random mutagenesis. *Process Biochemistry*, 50(10), 1516-1522.

- Zeng, W., Guo, L., Xu, S., Chen, J., & Zhou, J. (2020). High-throughput screening technology in industrial biotechnology. *Trends in biotechnology*, 38(8), 888-906.
- Zha, J., Zang, Y., Mattozzi, M., Plassmeier, J., Gupta, M., Wu, X., ... & Koffas, M. A. (2018). Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for anthocyanin production. *Microbial Cell Factories*, 17, 1-13.
- Zhang, X., Zhang, C., Zhou, Q. Q., Zhang, X. F., Wang, L. Y., Chang, H. B., ... & Xing, X. H. (2015). Quantitative evaluation of DNA damage and mutation rate by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) and conventional mutagenesis. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 5639-5646.
- Zhang, X., Zhang, X., Xu, G., Zhang, X., Shi, J., & Xu, Z. (2018). Integration of ARTP mutagenesis with biosensor-mediated high-throughput screening to improve L-serine yield in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 5939-5951.
- Zhou, S., & Alper, H. S. (2019). Strategies for directed and adapted evolution as part of microbial strain engineering. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 94(2), 366-376.
- Zhou, S., Ding, R., Chen, J., Du, G., Li, H., & Zhou, J. (2017). Obtaining a panel of cascade promoter-5'-UTR complexes in *Escherichia coli*. *ACS Synthetic Biology*, 6(6), 1065-1075.
- Zhou, S., Liu, P., Chen, J., Du, G., Li, H., & Zhou, J. (2016). Characterization of mutants of a tyrosine ammonia-lyase from *Rhodotorula glutinis*. *Applied microbiology and biotechnology*, 100, 10443-10452.
- Zhou, S., Lyu, Y., Li, H., Koffas, M. A., & Zhou, J. (2019). Fine-tuning the (2S)-naringenin synthetic pathway using an iterative high-throughput balancing strategy. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(6), 1392-1404.

## BÖLÜM 6

### LABORATUVARDAN ENDÜSTRİYE: BİYOFARMASÖTİK ENDÜSTRİSİNDE ENZİM ÜRETİMİ

Mustafa TANKUŞ<sup>1</sup>

Gamze BALCI<sup>2</sup>

Derya İlke GÜNGÖR<sup>3</sup>

Pelinsu ALBEY<sup>4</sup>

Ahmet KATI<sup>5</sup>

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.14565001>

---

<sup>1</sup> Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye. [mustafaatankuss@gmail.com](mailto:mustafaatankuss@gmail.com), Orcid ID: 0009-0007-7960-0402

<sup>2</sup> Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye. [gamzebalci622@gmail.com](mailto:gamzebalci622@gmail.com), Orcid ID: 0009-0005-5595-1852

<sup>3</sup> Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye. [deryailke.14@gmail.com](mailto:deryailke.14@gmail.com), Orcid ID: 0009-0003-6630-3442

<sup>4</sup> Marmara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İstanbul, Türkiye. [pelinsualby72@gmail.com](mailto:pelinsualby72@gmail.com), Orcid ID: 0009-0000-6615-5847

<sup>5</sup> Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye. [ahmet.kati@sbu.edu.tr](mailto:ahmet.kati@sbu.edu.tr), Orcid ID: 0000-0002-9903-634X



## **1. Biyofarmasötik Sektöründe Laboratuvar Araştırmaları ve Enzim Üretimi**

### **1.1 Biyofarmasötik ve Enzim**

Enzimler, biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran ve yüksek spesifiklik gösteren etkili biyokatalizörlerdir. Günümüzde biyoteknolojik teknikler ile üretilen enzimler, çeşitli hastalıkların tedavisinde tek başına veya diğer tedavilerle birlikte kullanılarak sağlık alanında artan bir popülerlik kazanmıştır. Özellikle sindirim desteği, anti-enflamatuvar, anti-kanser ve fibrinolitik özelliklere sahip mikrobiyal enzimler umut verici tedavi potansiyeli taşır (Vachher vd. 2021). Düşük moleküler kütleyle sahip moleküller genel olarak ilaç olarak adlandırılırken, nükleotid (RNA ve DNA) ya da amino asit (peptitler ve proteinler) polimerleri tarafından temsil edilen yüksek moleküler kütleli ilaçlar biyofarmasötik olarak adlandırılır. Nükleik asitlere dayalı biyofarmasötikler, small interfering RNA (siRNA), DNA aşılı ve gen terapisi gibi çok umut verici stratejilerdir (Jozala vd. 2016).

### **1.2 Enzim Üretim Teknolojileri**

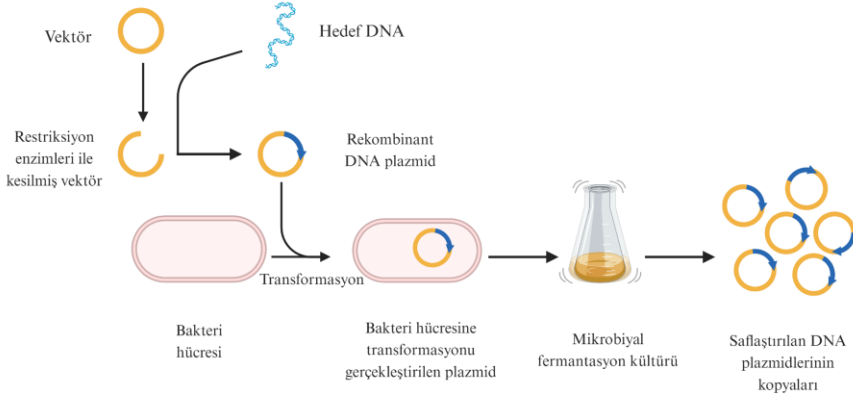
Enzim üretiminde en yaygın kullanılan teknikler mikrobiyal ve rekombinant DNA teknolojileridir. Biyofarmasötik rekombinant proteinler; organlar, dokular, mikroorganizmalar, hayvan sıvıları veya genetik olarak değiştirilmiş hücreler ve organizmalar gibi biyolojik kaynaklardan biyoteknolojik süreçler ile elde edilebilir. Mikroorganizmaların hızla büyüebilmesi ve enzimlerin büyük ölçeklerde üretilmesi sebebiyle tercih edilir. Mikrobiyal enzimler, daha kolay izole edilip üretebilmeleri, yüksek verimlilik ve stabil olmaları nedeniyle tercih edilir. Ayrıca, mikrobiyal enzimlerin ürün modifikasyonu ve optimizasyon süreçleri, hayvanlar ve bitkilerden elde edilen enzimlere kıyasla daha kolaydır (Jozala vd. 2016).

### **1.3 Rekombinant DNA Teknolojisi**

Rekombinant DNA teknolojisi, biyoteknolojinin temellerinden biridir. Bu teknoloji, farklı organizmalardan elde edilen belirli bir genetik materyalin alınıp, başka bir organizmanın DNA'sına eklenmesini içerir. Sonuç olarak, modifiye edilen organizma, normalde üretmediği bir proteini veya enzimi üretme yeteneği kazanır. Bu teknolojinin temeli, 1970'lerde DNA'nın kesilmesi ve yeniden birleştirilmesi için kullanılan restriksiyon enzimlerinin keşfine dayanır. Bu enzimler, belirli DNA dizilerini keser. Ardından ligaz enzimleri, kesilen DNA parçalarını birleştirir. DNA dizisi bir bakteriye, mayaya veya

memeli hüresine aktarılır ve burada hedeflenen protein üretilir (Şekil 1.1). En çok kullanılan organizma, hızlı büyüme kapasitesine sahip olan *Escherichia coli* bakterisidir (Bose & Bose, 2022).

## REKOMBİNANT ENZİM ÜRETİMİ



**Şekil 1.1.** Hedef DNA'nın vektör kullanılarak bakteri hücresine transformasyonu ve üretimi.

Rekombinant DNA teknolojisi, birçok farklı alanda kullanılmaktadır. Tıpta, diyabet tedavisi için rekombinant insülin üretiminde, kanser tedavisinde kullanılan monoklonal antikorların geliştirilmesinde, aşı üretiminde, gen tedavisinde ve daha birçok alanda kullanımı önemli bir rol oynamaktadır (Parasuraman vd. 2024).

### 1.4 Fermantasyon Teknikleri

Fermantasyon, biyoteknolojinin temel taşlarından biri olarak, mikroorganizmaların veya enzimlerin metabolik aktivitelerinden yararlanılarak biyolojik ürünlerin üretilmesini sağlayan bir süreçtir. Bu teknik, endüstriyel ölçekli biyoteknolojik üretimlerin yanı sıra gıda, ilaç, enerji ve çevre uygulamaları gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Fermantasyon teknikleri, kullanılan substratın türü, besin giriş çıkış kontrolü ve süreç yönetimine bağlı olarak farklı kategorilere ayrılmaktadır. Bu kategoriler, spesifik ihtiyaçlara göre süreçlerin optimize edilmesini ve verimliliğin artırılmasını sağlar.

Aşağıda fermantasyon tekniklerinin temel özellikleri ve uygulama alanları özetlenmiştir:

**Kesikli fermantasyon:** Mikroorganizmalar sabit bir substrat ve besin miktarıyla başlatılır ve fermantasyon sürecinde bu maddeler değiştirilemez. Bu yöntem, mikroorganizmaların büyüme döngülerini incelemek için kullanılır ancak düşük verimlilik ve uzun temizlik süreleri gibi dezavantajları olabilir.

**Sürekli fermantasyon:** Substrat girişi ve ürün çıkışı kontrol edilerek mikroorganizmaların belirli bir büyüme hızında çalıştırıldığı yöntemdir. Yüksek verimlilik sağlar ancak kontaminasyona daha açık olabilir ve ürün geri kazanımı daha pahalı olabilir.

**Beslemeli-Kesikli fermantasyon:** Kesikli ve sürekli fermantasyonun bir kombinasyonudur ve genellikle endüstriyel amaçlarla kullanılır. Yan ürünlerin zararlı olabileceği aşamalarda aralıklı olarak uzaklaştırılmasını sağlar. İki türü vardır: katı madde fermantasyonu (SSF) ve daldırma fermantasyonu (SmF). SSF, katı substratlar kullanırken, SmF sıvı substratlar kullanır ve genellikle yüksek su aktivitesi gerektiren bakteriler için uygundur (Rahman, 2013).

## **1.5. Yukarı Akış (Upstream) Süreçleri**

Yukarı akış süreci, biyofarmasötiklerin üretimi için biyolojik malzemenin (genellikle hücreler veya mikroorganizmalar) büyütülmesini içerir. Bu süreç, biyoteknolojik ilaç üretiminin ilk adımlarını kapsar (Şekil 2.1). Enzim teknolojisi, burada enzimlerin biyosentezini destekleyen ortamların hazırlanmasında kullanılır. Örneğin, rekombinant DNA teknolojisi ile modifiye edilmiş mikroorganizmalar veya hücre hatları kullanılarak enzimlerin büyük miktarlarda üretimi sağlanır. Bu mikroorganizmalar ya da hücre hatları, kontrollü koşullar altında fermentörler ya da biyoreaktörlerde büyütülür. Fermantasyon sırasında, hücrelerin enzim üretimini optimize etmek için besin ortamları, sıcaklık, pH ve oksijen düzeyi gibi faktörler dikkatlice kontrol edilir. Bu süreç, istenilen enzimin maksimum verimde üretilmesini hedefler (Jozala vd. 2016).

## **1.6. Aşağı Akış (Downstream) Süreçleri**

Aşağı akış süreci, üretilen biyolojik ürünlerin saflaştırılması ve işlenmesini içerir. Bu aşamada enzimler, istenen ürünün biyokimyasal özelliklerine göre izole edilir ve saflaştırılır. Aşağı akış sürecindeki işlemler genellikle çok aşamalı bir süreçtir ve bu aşamalar arasında hücre hasadı, lizis, filtrasyon, kromatografi ve saflaştırma yer alır (Şekil 1.2). Örneğin, fermentasyon sonrası elde edilen biyokütle, santrifüj ya da filtrasyon



işlemleriyle ayrılır. Daha sonra, enzimlerin saflaştırılması için sıklıkla afinite kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi gibi teknikler kullanılır. Saflaştırma işlemleri hem enzimin stabilitesini hem de aktivitesini koruyacak şekilde tasarlanırlar. Son aşamada, saflaştırılmış enzimler genellikle liyofilizasyon (dondurarak kurutma) işlemi ile stabilize edilip saklanabilir (Tripathi & Shrivastava, 2018).

## ENZİM ÜRETİM TEKNOLOJİLERİNDE SÜREÇLER

### YUKARI AKIŞ



**Transformasyon:** Hücre, transformasyon yoluyla rekombinant hedef DNA'yı alarak enzim üretimini gerçekleştirir.



**Optimizasyon:** Uygun medyum bileşenleri, enzim verimini artırarak maliyetleri düşürür.



**Sonikasyon:** Hücreleri parçalayarak hedef enzimin ekstraksiyonunu sağlar.



**Kromatografi:** Saflaştırma işlemiyle enzimlerin yüksek saflıkta ayrılmasını sağlar.



**Fermantasyon:** Biyoreaktörler, kontrollü koşullarda yüksek miktarda enzim üretimini sağlar.



**Santrifüj:** Üretilen enzimin saflığını artırmak için mikroorganizmalardan ayrıştırılır.



**Ultrasontrifüj:** Enzimleri çözeltiliden ayırarak yoğunlaştırır ve saflaştırma sürecini destekler.



**Liyofilizatör:** Enzimi dondurarak kurutur, böylece uzun süreli saklama ve stabilite sağlar.

Şekil 1.2. Enzim üretim süreçlerinde kullanılan metot ve cihazlar.

## 2. Farmasötik Üretiminde Ölçek Büyütme Süreçleri

### 2.1.Laboratuvardan Pilot Ölçeğe Geçiş

Farmasötik üretimde laboratuvardan pilot ölçeğe geçiş, üretim sürecinin daha büyük ölçeklerde test edilmesini ve optimize edilmesini içerir. Laboratuvar koşullarında yapılan küçük çaplı denemeler, yalnızca araştırma ve geliştirme aşamasında başarılı olabilirken, gerçek dünya koşullarında bu süreçlerin ne kadar uygulanabilir olduğunu anlamak için daha büyük ölçeklerde test edilmesi gerekir. Pilot ölçekte üretim yapılmadan önce proses simülasyonu gerçekleştirilir. Proses simülasyonu, üretim sürecinin bir modellemesi olup kullanılan ekipmanların ve koşulların belirlenmesine yardımcı olur. Örneğin, hangi fermentörlerin veya biyoreaktörlerin kullanılacağı, işlem sıcaklıkları, karıştırma hızları gibi parametreler simülasyon ile belirlenir. Bu süreçte çevresel etkiler de göz önünde bulundurulur, çünkü farmasötik ürünlerin

çevresel düzenlemelere uygun olması gerekir (Papavasileiou vd. 2007) (Petrides vd. 2014).

Pilot ölçekte üretim yapılırken, ürünün verimliliği ve kalitesi optimize edilir. Bu süreç, küçük ölçekli üretimden daha büyük ölçeklere geçişte, ürünün stabilitesini ve saflığını korumanın yollarını bulmayı amaçlar. Aynı zamanda, ürünlerin biyoyararlanımı da optimize edilmelidir. Bu, farmasötik ürünlerin vücutta ne kadar iyi emildiğini ve etkili olduğunu belirleyen bir ölçüttür. Ürünün doğru dozda ve yeterli etkinlikte olması, üretim sürecinin başarıya ulaşması için kritik öneme sahiptir. Proses simülasyonu ve optimizasyonu tamamlandıktan sonra, pilot tesis devreye alınır ve ürün üretimi bu tesiste gerçekleştirilir. Bu aşamada, mikroorganizmaların büyüme koşulları (örneğin sıcaklık, pH, oksijen ihtiyacı) optimize edilir ve bu parametrelerin daha büyük ölçeklerde ne kadar etkili olduğu değerlendirilir (Papavasileiou vd. 2007) (Petrides vd. 2014).

Pilot ölçek aynı zamanda kalite kontrol testlerinin yapılmasını sağlar. Ürünün saflık ve etkinlik düzeyi bu aşamada test edilir ve farmasötik ürünlerin kabul edilebilir standartlara uygun olup olmadığı belirlenir. Kalite kontrol, farmasötik üretimde en kritik unsurlardan biridir ve ürünün pazara sunulmadan önce gerekli tüm testlerden geçtiğinden emin olunur. Pilot ölçekli üretim sırasında elde edilen veriler, endüstriyel ölçekli üretime geçiş için temel teşkil eder. (Papavasileiou vd. 2007; Petrides vd. 2014).

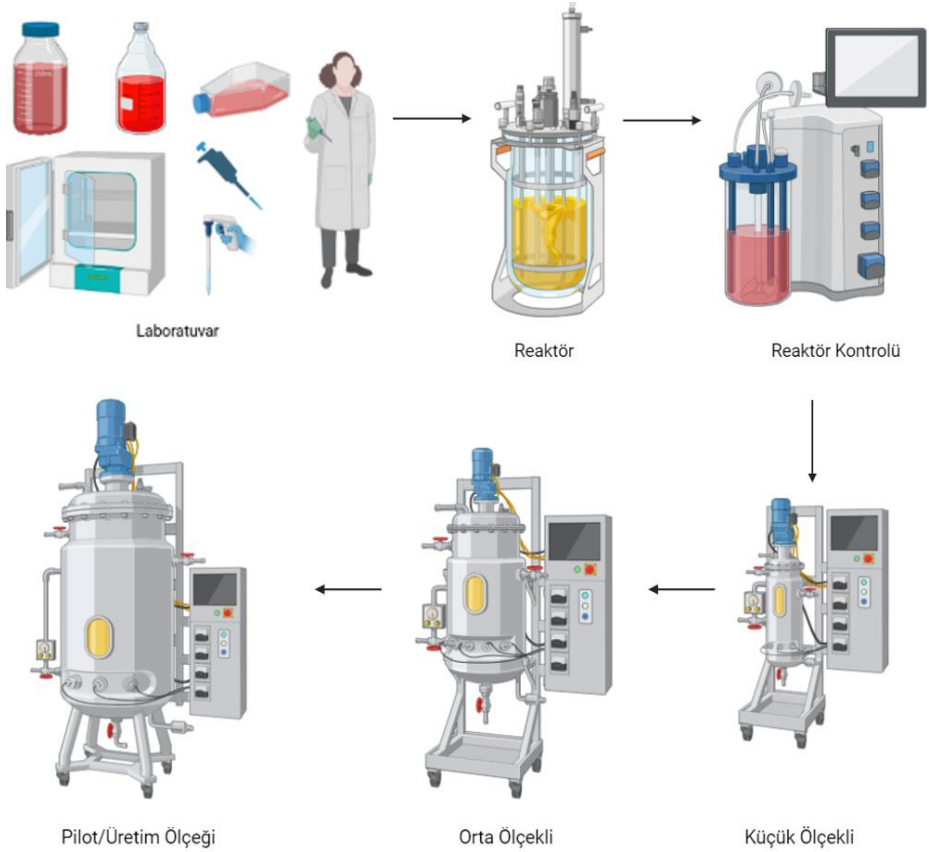
## **2.2. Pilot Ölçekten Endüstriyel Ölçeğe Geçiş**

Pilot ölçekte başarı sağlandıktan sonra, farmasötik ürünlerin endüstriyel ölçeğe taşınması aşaması başlar. Bu aşama, farmasötik üretimin tam kapasiteye çıkması anlamına gelir. Endüstriyel üretim, genellikle binlerce litre kapasiteli biyoreaktörler ve fermantasyon sistemlerini içerir (Piccinno vd. 2016). Bu aşamada, madde tedarik zinciri, üretim hızı ve enerji tüketimi gibi faktörler optimize edilir. Laboratuvarında optimize edilen sıcaklık, karıştırma hızı ve oksijen transfer hızı gibi parametreler, endüstriyel ölçekte daha büyük ölçeklerde yeniden değerlendirilir ve düzenlenir. Üretim sürecindeki bu parametrelerin doğru bir şekilde ayarlanması, ürün kalitesini doğrudan etkiler ve daha verimli bir üretim süreci sağlar.

Endüstriyel üretimde dikkat edilmesi gereken önemli unsurlardan biri de maliyet analizleridir. Laboratuvar ölçeğinde üretilen ürünlerin maliyeti düşük olabilir, ancak endüstriyel üretim ölçeğinde bu maliyetler genellikle katlanarak

artar. Bunun yanı sıra, lojistik planlaması da bu aşamada oldukça önemlidir. Farmasötik ürünlerin soğuk zincir gereksinimlerine uygun olarak taşınması ve saklanması gerekebilir. Bu nedenle, ürünlerin uygun sıcaklık koşullarında muhafaza edilmesi ve son kullanıcıya ulaştırılması için gerekli tüm planlamalar yapılmalıdır.

Endüstriyel üretimde karşılaşılan en büyük zorluklardan biri de regülasyonlara uyumdur. Özellikle farmasötik ürünlerde, regülasyonlar oldukça sıkı olabilir ve her bir üretim aşamasının bu düzenlemelere uygun olması gerekir. Ayrıca, endüstriyel ölçekte üretim yapılırken sürekli iyileştirme süreçleri de devreye girer. Üretim hattında meydana gelen küçük hatalar bile büyük maliyetlere yol açabileceğinden, bu hataların minimize edilmesi ve üretim sürecinin sürekli olarak gözden geçirilmesi gerekir (Piccinno vd. 2016) (Dong vd. 2021).

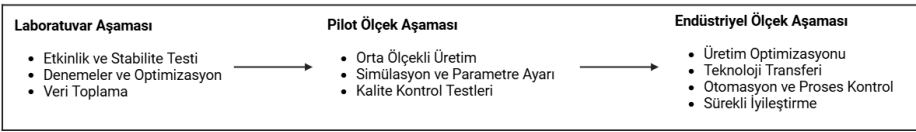


**Şekil 2.1:** Laboratuvaradan pilot ölçeğe ön izlenim

## 2.3. Farmasötik Üretiminde Ölçek Büyütme Stratejileri

Farmasötik üretimde ölçek büyütme stratejileri, ürünün laboratuvar koşullarından endüstriyel üretim aşamasına kadar geçen süreçteki kritik adımları kapsar. İlk aşama, laboratuvar koşullarında yapılan denemeler ve optimizasyon çalışmalarıdır. Bu aşamada ürünün etkinliği ve stabilitesi laboratuvar ortamında test edilir ve optimize edilir. İkinci aşama, pilot ölçekli üretimdir. Bu aşamada, ürünün daha büyük ölçeklerde ne kadar verimli üretilebileceği ve kalite standartlarına uygun olup olmadığı test edilir. Son aşama ise endüstriyel üretimdir. Endüstriyel ölçekte üretim yapılırken, pilot aşamada elde edilen veriler kullanılarak süreç optimize edilir. Bu aşamada kullanılan biyoreaktörlerin boyutu, üretim sürecindeki aşamaların tekrarlanabilirliği ve ürün kalitesinin korunması gibi unsurlar değerlendirilir (Yeom & Choi, 2019) (Domokos vd. 2021).

Ölçek büyütme sürecinde dikkat edilmesi gereken bir diğer unsur da teknoloji transferidir. Laboratuvar ölçeğinde yapılan araştırma ve geliştirme çalışmalarında kullanılan teknolojilerin, endüstriyel ölçekte nasıl uygulanacağı dikkatle planlanmalıdır. Ayrıca, otomasyon sistemleri ve proses kontrol mekanizmaları bu aşamada devreye girer. Üretim hattının otomasyonu, üretim verimliliğini artırabilir ve insan hatasını minimize edebilir. Bu süreçte, sürekli iyileştirme ve kalite kontrol unsurları da büyük önem taşır (Yeom & Choi, 2019) (Domokos vd. 2021).



Şekil 2.2: Ölçek büyütme stratejilerinin kısa bir özeti

## 2.4. Farmasötiklerde Kullanılan Endüstriyel Biyoreaktörler

### 2.4.1. Membran Biyoreaktörler (MBR)

Membran biyoreaktörler, biyolojik ürünlerin yüksek saflık düzeyinde elde edilmesi amacıyla kullanılır. Yarı geçirgen membranlar yardımıyla hücreler ve biyolojik ürünler birbirinden ayrıştırılır. Özellikle enzim, rekombinant protein ve monoklonal antikor üretimi gibi alanlarda yaygın olarak kullanılır. Ayrıca, MBR'ler ilaç atıklarının sudan ayrıştırılmasında da etkilidir. Ancak, membranların yüzeyinde biriken mikrobiyal ürünler ve

polimerik maddeler nedeniyle membran kirlenmesi zamanla oluşabilir. Bu kirlenmeler, sistemin maliyetini artırabilir ve verimliliği düşürebilir. Bu nedenle, membran biyoreaktörlerde periyodik temizlik ve bakım işlemleri kritik önem taşır (Sengar & Vijayanandan, 2022) (Tambosi vd. 2010).

#### **2.4.2. Damlatmalı Yatak Biyoreaktörü (Trickle-Bed Bioreactor)**

Trickle-bed biyoreaktörler, biyofilm tabanlı üretim süreçlerinde tercih edilen reaktörlerdir. Mikroorganizmalar sabit yüzeylerde tutularak büyür ve üretim süreci boyunca bu yüzeylerde biyofilm oluşumu sağlanır. Bu reaktörler, enzim ve antibiyotik üretiminde yaygın olarak kullanılır. Örneğin, penisilin gibi antibiyotiklerin üretim süreçlerinde bu tür reaktörler tercih edilmektedir. Ayrıca, farmasötik üretim atıklarının geri dönüştürülmesinde de trickle-bed biyoreaktörler etkili bir çözüm sunar. Bu biyoreaktörler, düşük enerji maliyetleri ve sürekli üretim avantajları ile endüstriyel üretimde tercih edilir (Tormo-Budowski vd. 2021) (Manjrekar & Mills, 2022).

#### **2.4.3. Havalandırmalı (Bubble Column) Biyoreaktörler**

Havalandırmalı biyoreaktörler, sıvı ortamda gazların kabarcık formunda verildiği ve gaz kabarcıklarının sıvı ile temas ettiği sistemlerdir. Bu reaktörlerde karbondioksit ve oksijen gibi gazların sıvı içindeki değişimi sağlanır.

#### **2.4.5. Akışkan Yataklı Reaktörler (Fluidized Bed Reactors)**

Akışkan yataklı reaktörler, katı partiküllerin bir sıvı veya gaz ile taşındığı sistemlerdir. Bu reaktörler, granülasyon ve tablet kaplama gibi farmasötik üretim süreçlerinde sıkça kullanılır. Ayrıca, kurutma işlemleri için de uygundur. Antibiyotiklerin toz formunda kurutulmasında bu tür reaktörler yaygın olarak tercih edilir (Saravanane vd. 2001) (Cruz-Morató vd. 2013).

### **3. Farmasötik Enzim Üretiminde Kalite Kontrol ve Regülasyon**

#### **3.1. Enzim Üretiminde Kalite Kontrol**

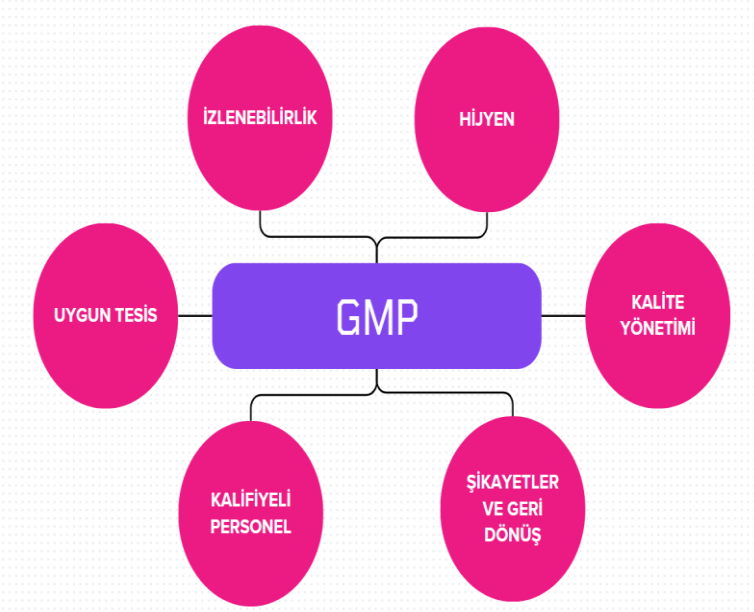
Terapötik enzimler, küçük ancak önemli bir biyofarmasötik alanıdır. Lösemi ve Gaucher hastalığı gibi enzim eksikliği hastalıkları dahil hastalıklar için terapötik enzim geliştirilmiştir. Terapötik enzimlerin üretimi ve test edilmesi hedef ürünün kaliteli ve tekrarlanabilir olması nedeniyle son derece

önemlidir. Aynı zamanda protein saflaştırılması veya akış aşağı işlenmesi (DSP), bu ilaçların doğru şekilde iletilmesini sağlamak için önemlidir. Saflaştırma işleminden sonra, ilaç maddesi klinik ve hastaya sunulmasını sağlamak için mevcut düzenleyici kılavuza göre sıkı kalite kontrol testinden geçer. Kalite kontrol testi, tıbbi enzim/ürünün güvenliğini, saflığını korumak için yapılır. İyi etki görebilmek için doğru izlenmiş ve analitik yöntemlerle doğruluğu gösterilmiştir (Gervais, 2019).

Enzim kalite kontrolü farmasötiklerin saflık ve etkinliğinin kontrolü noktasında önemli rol oynamaktadır. Kalite Yönetimi, iyi imalat uygulamaları (GMP) ve kalite risk yönetimi başlıkları altında analiz edilmektedir.

### 3.1.1 İyi İmalat Uygulamaları (GMP)

Kalite Yönetimi; bir ürünün, tek veya çoklu olarak kalitesini etkileyen tüm öğeleri kapsayan bir kavramdır. Tıbbi ürünlerin kullanım amaçları için gerekli kalite unsurlarını güvene almak amacıyla yapılan düzenlemelerin tümünü kapsamaktadır. Bu yüzden kalite kontrol yönetimi İyi İmalat Uygulamaları'nı (GMP) kapsamaktadır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. GMP yaklaşımının temel unsurları.

GMP'nin prensipleri ise şunlardır:

- Tüm üretim aşamaları detaylı açıklanmalıdır. Tıbbi ürünlerin istikrarlı şekilde gerekli kalitede ve spesifikasyonlara uygun olarak üretimine uygun oldukları gösterilmelidir.
- Üretim aşamalarının riskli basamakları protokolde yapılan değişiklikler valide edilmelidir.
- GMP için gerekli koşullar sağlanmalıdır: uygun uzmanlık ve eğitilmiş personel, uygun tesisler veya alanlar, uygun materyal, uygun etiketler, farmasötik kalite sistemi tarafından onaylanmış prosedürler, uygun depolama ve nakliye.
- Prosedürler, herkesin anlayabileceği dilde açıkça yazılmalıdır
- Prosedürler doğru şekilde yerine getirilmelidir.
- Üretim yapılırken tüm işlemlerin prosedürlere uygun yapılmalı ve ürünün istenen kalitede, istenen miktarda olduğunu kanıtlayacak veriler tutulmalıdır.
- Proseste her anlamlı sapma kaydedilmeli, ana sebebin bulunması için araştırılır ve gerekli düzenlemeler yapılmalıdır.
- Seyredilecek olan serinin, dağıtım da dâhil olmak üzere, tüm aşamaları anlaşılır ve kolay erişilebilir halde olmalı ve saklanmalıdır.
- Ürünlerin dağıtımı, kalitelerini etkilemeden tüm riskler en aza indirilebilir şekilde yapılmalıdır.
- Ürünün, satış veya dağıtım sonrası geri çekme avantajı sunan bir sistemde mevcut olmalıdır
- Piyasaya sürülmüş ürünlere ait varsa şikâyetler incelenmeli, kalite hata sebepleri araştırılmalı ve hata tekrarı olmaması adına gerekli önlemler alınır (International Pharmaceutical Federation).

### 3.2. Enzim Üretiminde Regülasyon

Enzim üretiminde kullanılan rekombinant DNA teknolojilerinin regülasyonu üzerine odaklanmaktadır. Avrupa ve ABD gibi büyük regülasyon yapılarının yaklaşımları karşılaştırılmaktadır. Avrupa odağını üretim süreçlerine vermekteyken; ABD ise ürün odaklı bir yaklaşım izlemektedir.

İlaç formülasyonlarındaki enzim potansiyellerinin belirlenmesinde analiz doğruluğu ve tekrarlanabilirlik en katı gerekliliklerdir. Ayrıca, birim değeri doktorun ilişkilendirilebileceği bir enzim aktivitesine karşılık gelmelidir. Aktivitenin zaman birimi başına molar konsantrasyon değişikliklerine dayalı birimlerle ifade edilmesi, yalnızca substrat molar

konsantrasyonu, reaksiyon mekanizması ve ortaya çıkan hız denklemi bilindiğinde mümkündür. Farmasötik enzimler için bu çoğu durumda imkansızdır. Biyolojik substratlar (proteinler, polisakkaritler, bakteriler, yağ emülsiyonları) genellikle moleküler karmaşıklığa sahiptir ve enzimin saldırısına duyarlı bağların potansiyel sayısının her zaman bilinmemesi, uygun yöntemlerin geliştirilmesini ve iyi standartlaşma uygulamalarını zorunlu kılar (Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu).

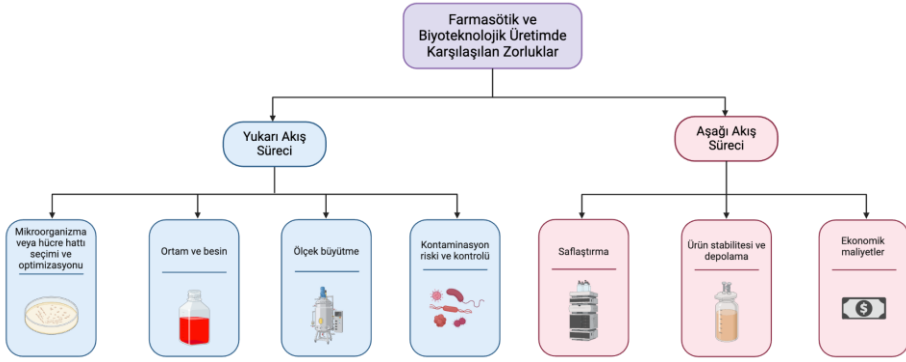
Farmasötik regülasyonlar; ilaçların kalite, güvenlik, saflık etkinlik standartlarını sağlamak amacıyla düzenlenmiş bir dizi kuralları kapsamaktadır. Bu regülasyonlar, farmakope gibi yönetmeliklerle desteklenmektedir. Farmasötik regülasyonlar genellikle üretim sürecinde kullanılan ürünlerdeki safsızlık oranlarının ilaçların güvenilirliğine olan olumsuz etkilerini indirmeyi hedeflemektedir. İlaç üretiminde modern (yeşil kimya) tasarımlar geliştirilmekte ve uygulanmaktadır. (Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu) (Kyle, 2022).

Özetlenecek olursa; farmasötik regülasyonlar güvenli, etkili ve kaliteli olmasını sağlamak amacıyla uygulanan yasalar ve kurullarla bir bütün içerisinde. Bu regülasyonlar, sürecin geliştirilmesinden onaylanması, sonrasında pazarda genişlemesine kadar olan geniş bir süreci kapsamaktadır.

#### **4. Farmasötik ve Biyoteknolojik Üretimde Karşılaşılan Zorluklar ve Çözümler**

Biyofarmasötiklerin biyoteknolojik yöntemlerle üretimi yukarı akış ve aşağı akış olmak üzere iki genel prosese ayrılır. Yukarı akış işlemlerindeki ana amaç substratı istenen metabolik ürünlere dönüştürmek iken, aşağı akış işlemleri istenen metabolik ürünü iyi verimle saflaştırmayı amaçlar (Gronemeyer vd. 2014). Bu bölümde ara yukarı ve aşağı akış yöntemlerinin basamaklarında karşılaşılan zorluklar işlenecektir.



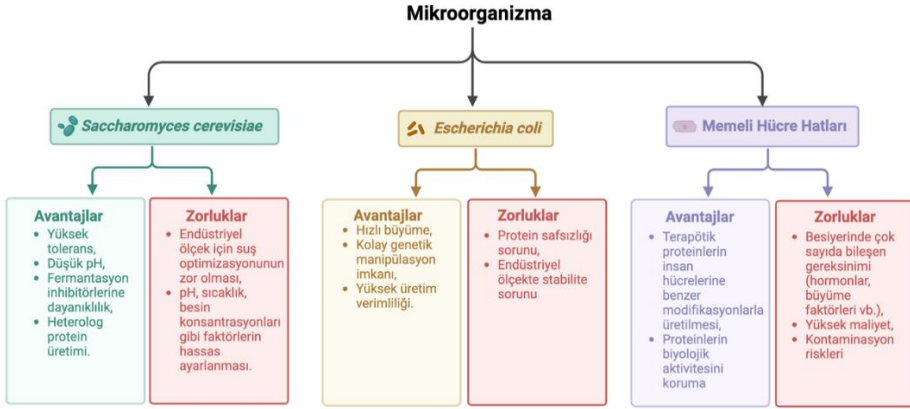


**Şekil 4.1.** Farmasötik ve Biyoteknolojik Üretimlerde Karşılaşılan Zorluklar

#### 4.1 Yukarı Akış (Upstream) Süreçte Karşılaşılan Zorluklar

Mayalar, biyofarmasötik heterolog protein üretimi yapabilmesi, fajlara dirençli olması, düşük pH'a ve fermantasyon inhibitörlerine karşı gösterdikleri tolerans nedeniyle biyofarmasötik üretiminde en çok tercih edilen mikroorganizmadır. Moleküler biyoloji, metabolik mühendisliği ve omik teknolojilerinin son yıllardaki hızlı gelişmeleri biyofarmasötiklerin rekombinant mayalar aracılığıyla biyoteknolojik yöntemlerle üretilmesi konusunda çok önemli gelişmeler sağlamıştır. Ancak mayaların endüstriyel ölçekte kullanılması yukarı akış sürecinde hala önemli bir problemdir. Rekombinant suşların oluşturulması, sürecin ölçeklendirmesi için suş yetiştirme koşullarının optimizasyonu (pH, sıcaklık, besin konsantrasyonları vb.), tarama yoluyla suşun optimize edilmesi, organizmanın büyüme farmasötik üretim kinetiği, biyokütle optimizasyonu hala geliştirilmesi gereken alanlardır (Madhavan vd. 2021).

Özellikle genomik çağda makine öğrenimi, gelişmiş istatistiksel yöntemlerin uygulamaları suşların laboratuvar ölçeğinde kullanılmadan bir ön değerlendirme sağlayabilmektedir (Wehrs vd. 2019). Bu da araştırmacıların hem zaman hem de maliyet açısından avantajları nedeniyle biyofarmasötik üretimi için yeni endüstriyel suşların bulunması veya mevcut suşların iyileştirilmesi konusunda hızlanmasına yardımcı olacaktır.



**Şekil 4.2.** Farmasötik biyoteknolojide kullanılan organizmaların avantaj ve zorlukları

#### 4.1.2 Ortam ve Besin

Biyofarmasötik üretiminin yukarı akış aşamasında ortamın bileşenlerine karşı en hassas olan memeli hücre kültürleridir. Memeli hücrelerinin küçük bir kısmı takviye olmadan bazal bir ortama tutunma yeteneğine sahipken, hücrelerin büyük çoğunluğu korunmak, çoğalmak ve farklılaşmak için hormonlar, büyüme faktörleri, vitaminler ve amino asitler ve hidrolizatlar gibi 100'e kadar farklı bileşenin ortamda bulunmasını gerektirir. Ayrıca her hücre tipinde bulunan reseptörler ve gereksinimleri farklı moleküller olduğundan evrensel bir besiyeri henüz geliştirilememiştir (van der Valk vd. 2010). Ancak kimyasal olarak tanımlanmış besiyerleri (KOTB) sayesinde besin ortamında bulunan her bir bileşenin kesin miktarı bilinmektedir. Safsızlık oluşturacak herhangi bir bileşen ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Safsızlığı bozacak bileşenlerin yanında, geleneksel besiyerinde bulunan sığır serum albümin, insan serum albümin, fetal sığır serumu gibi hayvansal kaynaklı bileşenler de rekombinant varyasyonlarıyla değiştirilmektedir. KOTB sayesinde memeli hücrelerinin besin gereksinimleri, her hücre hattı ve süreçleri geleneksel yöntemlere göre daha iyi optimize edilmekte ve hücrelerin tam ihtiyacını karşılamaktadır (McGillicuddy vd. 2018).

Başka bir sorun ise lojistik ve ticaridir. Şirketler artan biyofarmasötik üretimdeki nedeniyle meydana gelen talep artışını karşılamakta zorlanmaktadır. Şirketler ayrıca hammaddelerin artan fiyatları, ürünlerin depolanma süresi ve farklı depolama koşullarında ürünlerinin stabil kalmasını konusunda hala sorun yaşamaktadır (McGillicuddy vd. 2018).

### 4.1.3 Ölçek Büyütme

*Saccharomyces cerevisiae* ve *Escherichia coli* gibi model organizmalar dışında, laboratuvar ölçeğinde karbon kaynaklarını istenilen ürüne dönüştürülmesinde çeşitli mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Ancak laboratuvar ortamında yetiştirilen organizmaların ürettiği enzim konsantrasyonları ve büyüme verimliliği düşüktür. Bu nedenle nihai ürüne ulaşılmasında problem olmasa da düşük verimlilik nedeniyle endüstriyel ölçeğe geçiş imkânsız hale gelmektedir. Biyofarmasötik üretimindeki yukarı akış sürecinde mikroorganizmalarla ilgili bir diğer zorluk seçilen organizmaların endüstriyel sürece adaptasyonlarıdır. Birçok suşun laboratuvar ve endüstriyel ölçekte aynı performansı göstermediği bilinmektedir (Wehrs vd. 2019). Dolayısıyla laboratuvar ölçeğinde verimli şekilde ürün üretme yeteneğine sahip organizmaların büyük bir kısmı endüstriyel ölçekte istenilen verimi verememektedir. *S. cerevisiae* ve *E.coli*'de olduğu gibi genetik mühendisliği uygulamaları ile genetik olarak manipüle edilmiş ve standartize edilmiş suşlar üretilebilir. Ancak bu süreç son derece maliyetli ve zaman gerektirmektedir.

### 4.1.4 Kontaminasyon Riski ve Kontrolü

Biyofarmasötik üretimdeki yukarı akış sürecinde karşılaşılan son zorluk ise kontaminantlardır. Rekombinant protein, aşı ve plazma üretmek için kullanılan hücre hatları özellikle viral kontaminantlara karşı son derece hassastır. Ayrıca virüsler hücre içerisinde çoğaldıklarından diğer mikrobiyal kontaminantlara göre daha zor tespit edilmektedir. Bu durum da işletmelerin kontaminasyon riskini minimuma indirmek için ekstra işlemler yapmasına neden olacağından ürün maliyetine doğrudan etki etmektedir. Tarihsel sürece bakıldığında 1980'lerin başında, insan plazmasından gelen terapötik proteinlerin nakledildiği hemofili hastalarına insan immün yetmezlik virüsü (HIV) gibi virüslerin yaygın bir şekilde bulaşmasına neden olmuştur. Sonraki süreçte terapötik protein üretimi için hm prokaryotik hem de ökaryotik organizmalarda rekombinant DNA teknolojisi kullanılmıştır. Ayrıca virüs riski içerme ihtimali düşük hammaddelerin kullanılması, viral kontaminantlardan

arınmış hücre bankalarının ve malzemelerin kullanılması, terapötik proteinlerin saflaştırma aşamasında potansiyel kontaminasyonu elimine etmek için ekstra adımlar eklenmiştir. Bu üç aşamalı önlemlerden sonra üretilen bir terapötik proteinden hastaya virüs bulaşması rapor edilmemiştir (Barone vd. 2020).

## **4.2 Aşağı Akış (Downstream) Süreçte Karşılaşılan Zorluklar**

Aşağı akış sürecinde üretilen ürünün geri kazanımı ve saflaştırmasını temsil eden süreçler bütünüdür. Aşağı akış süreci genel olarak dört aşamadan oluşur.

1. Çözünmeyen Bileşenlerin Ayrılması: İlk aşamada katı formda bulunan hücresel materyal sıvı formdaki besiyerinden ayrılmalıdır. Bu aşamada filtreleme ve santrifüjleme en sık kullanılan yöntemlerdir.

2. Ürün İzolasyonu: Ürünün hücre dışına çıkarılıp üründen farklı fizikokimyasal özellikler bulunan bileşenler ayrılır. Amonyum sülfat çöktürmesi, ultrafiltrasyon gibi yöntemler kullanılır.

3. Ürün Saflaştırılması: Bu adımda, hedef ürünle benzer fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip bileşenler uzaklaştırılır. Kompleks kromatografik yöntemler kullanıldığından tam saflaştırma pahalıdır.

4. Parlatma: Saflaştırılmış ürünün kolay ve güvenli bir şekilde nakledilmesi ve depolanması için stabil bir formda hazırlanması işlemleridir. Kristalleştirme, püskürtmeli kurutma ve dondurarak kurutma yöntemleri sıklıkla kullanılır.

### **4.2.1 Saflaştırma**

Biyofarmasötik üretiminin aşağı akış sürecindeki saflaştırma adımları çok farklı uygulamalar içerebilir. Bu aşamaların herhangi birinde araştırmacıların karşılaştığı en büyük zorluklardan birisi konakçı hücre proteinlerinin (KHP) ürünü yıkıma uğratmasıdır. Katepsin, matrix metalloproteinaz, serin proteinaz ve protein disülfid isomeraz gibi KHP'lerin biyofarmasötiklere hücre yıkımı aşamasında zarar verdiği ve degrade ettiği bilinmektedir. KHP'lerin terapötikleri kullanan kişilerde immünolojik etkiye sebep olma potansiyeli taşıyan çeşitleri de vardır. Protein S100, 60s ribozomal protein, annexin, C-X-C motif kemokin, fosfolipaz B benzeri proteinler gibi KHP'ler hastalar için immünolojik olabileceğinden kesin olarak ortamdan uzaklaştırılmalıdır. Son geliştirilen yaklaşımlarla eliminasyonu en zor olan ve sıklıkla karşılaşılan KHP'ler tanımlanmıştır. İlgili KHP'lerin KHP-monoklonal antikor (mAb) bağlanması sebebiyle gideriminin zor olduğu tespit edilmiştir. Zhang ve

arkadaşlarının bir yaklaşımına göre KHP:mAb etkileşimlerini bozduğu bilinen tamponlar tercih edilmelidir. Bir örnek olarak proteaz katepsin D'nin monoklonal antikolarla bağlanmasını negatif etkilemek için saflaştırma aşamasında tuz ve kaprilat ile yüksek pH'ta bir yıkama adımı uygulanması verilebilir (Gilgunn & Bones, 2018).

#### **4.2.2 Ürün Stabilitesi ve Depolama**

Terapötik proteinler uzun geliştirme süreçlerinden sonra üretilir. Ancak en uygun formülasyonda üretildiği koşulda bile son derece hassas moleküller olduklarından depolama ve klinik kullanım sırasında bozulma ihtimali vardır. Bu bozulma ihtimalinden kaçınmak için formülasyonundaki birçok parametre optimize edilmelidir. Protein konsantrasyonu, pH, iyonik moleküller, moleküler sıkıştırma ajanları, yüzey aktif maddeler, antioksidanlar ve metal şelatlayıcılar optimize edilmesi gereken başlıca parametrelerdir. Sahada en sık karşılaşılan bozulmalardan biri deamidasyon veya karbonilasyon gibi yük değişiklikleridir. Bu yük değişiklikleri yapıda bulunan metiyonin veya triptofanın oksidasyonu sonucu meydana gelir ve kimyasal yapının yanında fiziksel yapıya da doğrudan etki edebilir. Bir başka sorun oksidasyondur. Terapötik ilaçlarda oksidasyon genellikle ışığa doğrudan maruziyetle meydana gelir. Bu nedenle üretim sürecinden başlayarak klinikteki uygulama aşamasına kadar özel koruma prosedürleri gerekebilir. pH ve sıcaklık Asparajin kalıntılarının deaminasyon sürecini hızlandırarak proteinin yapısında değişikliklere neden olabilir. Sıralanan bu parametrelerin konsantrasyonları veya derecesi birbirlerini etkilediğinden tek başlarına optimize edilmesi yeterli değildir. Örneğin yüksek doz gerektiren formülasyonlarda agregasyonun fazla olması veya pH'ın fiziksel ve kimyasal kararlılığa ters etki yapabilmesi bu tür durumlara örnek olarak verilebilir (Krause & Sahin, 2019). Biyofarmasötiklerin üretimi ve uygulanmasına kadar geçen süreç son derece karmaşıktır. Bu süreçte meydana gelebilecek her türlü olumsuz durumun önceden tespiti, karakterizasyonu ve giderilmesi ile etkili ve raf ömrü uzun terapötik ajanların üretilmesi sağlanabilir.

#### **4.2.3 Ekonomik Maliyetler**

İlaç sektöründe satılan dört ilaçtan biri biyoteknolojik yöntemle üretilmiş biyofarmasötiktir. İlaç sektöründe en hızlı gelişen sektördür. Büyük bir ivme ile gelişen bu sektörde en büyük dezavantajlarından birisi maliyettir. Günümüz teknolojisi ile biyomoleküllerin biosentezi hala çok pahalı ve

karmaşıktır. Bu durum biyofarmasötiklerin geniş bir kitle tarafından kullanılmasını engellemektedir. Yüksek maliyetin en büyük nedenlerinden birisi detaylı saflaştırma yöntemleridir. Sıvı-sıvı ekstraksiyon gibi geleneksel ve düşük maliyetli yöntemler organik çözücülerin çeşitli biyoürünlerin yapısı ve biyolojik aktivitesi üzerindeki olumsuz etkisi nedeniyle, proteinlerin önemli ölçüde denatürasyonuna neden olabilir. Bu nedenle basit ve ucuz geleneksel yöntemler biyomoleküllerin ekstraksiyonu için uygun değildir. Biyofarmasötik kullanımının geniş kitlelere ulaşması için ucuz, basit saflaştırma tekniklerinin keşfedilmesi gerekmektedir (Santos vd. 2017).

## KAYNAKÇA

- Behin, J., & Amiri, P. (2023). A review of recent advances in airlift reactors technology with emphasis on environmental remediation. *Journal of Environmental Management*, 335, 117560.
- Bose, R., & Bose, K. (2022). A brief introduction to recombinant DNA technology. In *Textbook on cloning, expression and purification of recombinant proteins* (pp. 1-12). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Cruz-Morató, C., Ferrando-Climent, L., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D., Marco-Urrea, E., Vicent, T., & Sarrà, M. (2013). Degradation of pharmaceuticals in non-sterile urban wastewater by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor. *Water Research*, 47(14), 5200–5210.
- Domokos, A., Nagy, B., Szilagyi, B., Marosi, G., & Nagy, Z. K. (2021). Integrated continuous pharmaceutical technologies—a review. *Organic Process Research & Development*, 25(4), 721–739.
- Dong, Z., Wen, Z., Zhao, F., Kuhn, S., & Noël, T. (2021). Scale-up of micro-and milli-reactors: An overview of strategies, design principles, and applications. *Chemical Engineering Science: X*, 10, 100097.
- Gervais, D. (2019). Quality control and downstream processing of therapeutic enzymes. In *Therapeutic enzymes: Function and clinical implications* (pp. 55-80).
- Gilgunn, S., & Bones, J. (2018). Challenges to industrial mAb bioprocessing—removal of host cell proteins in CHO cell bioprocesses. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 22, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2018.08.001>
- Gronemeyer, P., Ditz, R., & Strube, J. (2014). Trends in upstream and downstream process development for antibody manufacturing. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 1(4), 188–212. <https://doi.org/10.3390/bioengineering1040188>
- International Pharmaceutical Federation (FIP). (n.d.). Pharmaceutical enzymes. Retrieved August 18, 2024, from <https://www.fip.org/pharmaceutical-enzymes>.
- Jozala, A. F., Geraldes, D. C., Tundisi, L. L., Feitosa, V. D. A., Breyer, C. A., Cardoso, S. L., ... & Pessoa Jr, A. (2016). Biopharmaceuticals from microorganisms: From production to purification. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(Suppl. 1), 51–63.
- Krause, M. E., & Sahin, E. (2019). Chemical and physical instabilities in manufacturing and storage of therapeutic proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 60, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.01.014>
- Kyle, M. K. (2022). Incentives for pharmaceutical innovation: What’s working, what’s lacking. *Journal de Droit de la Santé et de l’Assurance Maladie*, (5), 24–40.
- Madhavan, A., Arun, K. B., & Sindhu, R. (2021). Customized yeast cell factories for biopharmaceuticals: from cell engineering to process scale up. *Microbial Cell Factories*, 20, 124. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01617-z>

- Manjrekar, O. N., & Mills, P. L. (2022). Trickle bed reactors. In *Multiphase flows for process industries: Fundamentals and applications* (Vol. 2, pp. 533–588).
- McGillicuddy, N., Floris, P., Albrecht, S., & Bones, J. (2018). Examining the sources of variability in cell culture media used for biopharmaceutical production. *Biotechnology Letters*, *40*(1), 5–21. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2437-8>
- Palit, S. (2014). Advanced oxidation processes, nanofiltration, and application of bubble column reactor. In *Nanomaterials for environmental protection* (pp. 205–215).
- Papavasileiou, V., Koulouris, A., Siletti, C., & Petrides, D. (2007). Optimize manufacturing of pharmaceutical products with process simulation and production scheduling tools. *Chemical Engineering Research and Design*, *85*(7), 1086–1097.
- Parasuraman, S., Kumar, L. N. D., Thanapakiam, G., Sayem, A. S. M., Chuah, J. J., & Venkateskumar, K. (2024). Biopharmaceutical production by recombinant DNA technology: Future perspectives. In *Microbial products for health and nutrition* (pp. 285–303). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Petrides, D., Carmichael, D., Siletti, C., & Koulouris, A. (2014). Biopharmaceutical process optimization with simulation and scheduling tools. *Bioengineering*, *1*(4), 154–187.
- Piccinno, F., Hischier, R., Seeger, S., & Som, C. (2016). From laboratory to industrial scale: A scale-up framework for chemical processes in life cycle assessment studies. *Journal of Cleaner Production*, *135*, 1085–1097.
- Qamar, M. O., Balu, K., & Ahn, Y. H. (2024). BiVO<sub>4</sub>-driven photocatalytic degradation of pharmaceuticals in slurry bubble column reactor: Influencing factors and toxicological profiling. *Chemical Engineering Journal*, *496*, 153526.
- Rahman, M. (2013). Medical applications of fermentation technology. *Advanced Materials Research*, *810*, 127–157.
- Santos, N., Santos-Ebinuma, V., Pessoa, A., & Pereira, J. (2017). Liquid-liquid extraction of biopharmaceuticals from fermented broth: Trends and future prospects. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *93*. <https://doi.org/10.1002/jctb.5476>
- Saravanane, R., Murthy, D. V. S., & Krishnaiah, K. (2001). Bioaugmentation and anaerobic treatment of pharmaceutical effluent in fluidized bed reactor. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, *36*(5), 779–791.
- Sengar, A., & Vijayanandan, A. (2022). Effects of pharmaceuticals on membrane bioreactor: Review on membrane fouling mechanisms and fouling control strategies. *Science of The Total Environment*, *808*, 152132.
- Tambosi, J. L., de Sena, R. F., Favier, M., Gebhardt, W., José, H. J., Schröder, H. F., & Moreira, R. D. F. P. M. (2010). Removal of pharmaceutical compounds in membrane bioreactors (MBR) applying submerged membranes. *Desalination*, *261*(1–2), 148–156.



- Tormo-Budowski, R., Cambronero-Heinrichs, J. C., Durán, J. E., Masís-Mora, M., Ramírez-Morales, D., Quirós-Fournier, J. P., & Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2021). Removal of pharmaceuticals and ecotoxicological changes in wastewater using *Trametes versicolor*: A comparison of fungal stirred tank and trickle-bed bioreactors. *Chemical Engineering Journal*, 410, 128210.
- Tripathi, N. K., & Shrivastava, A. (2018). Scale-up of biopharmaceuticals production. In *Nanoscale fabrication, optimization, scale-up and biological aspects of pharmaceutical nanotechnology* (pp. 133–172). William Andrew Publishing.
- Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK). (n.d.). Beşeri tıbbi ürünler imalathaneleri iyi imalat uygulamaları (GMP) kılavuzu. *T.C. Sağlık Bakanlığı*. Retrieved August 18, 2024, from [https://www.titck.gov.tr/dosya/1/gmp\\_kilavuz.pdf](https://www.titck.gov.tr/dosya/1/gmp_kilavuz.pdf).
- van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Fex Svenningsen, A., Honegger, P., Knudsen, L. E., Lindl, T., Noraberg, J., Price, A., Scarino, M. L., & Gstraunthaler, G. (2010). Optimization of chemically defined cell culture media—replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in Vitro*, 24(4), 1053–1063. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.03.016>
- Wehrs, M., Tanjore, D., Eng, T., Lievense, J., Pray, T. R., & Mukhopadhyay, A. (2019). Engineering robust production microbes for large-scale cultivation. *Trends in Microbiology*, 27(6), 524–537. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.01.006>

## **BÖLÜM 7**

### **MİKROBİYAL ENZİMLERİN TERAPÖTİK AJANLAR OLARAK UYGULAMALARI**

Dr. Öğr. Üyesi Nilgün POYRAZ<sup>1</sup>

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.14565020>

---

<sup>1</sup> Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Kütahya, Türkiye. [nilgun.kavak@dpu.edu.tr](mailto:nilgun.kavak@dpu.edu.tr), Orcid ID: 0000-0002-5861-7922



## 1. GİRİŞ

Enzimler, canlı sistemlerdeki biyokimyasal reaksiyonların normal işleyişini sağlayan, canlıların büyümesi ve çoğalması için reaksiyonların uygun ortamlarda yürütülmesini kolaylaştıran işlevsel proteinler veya nükleik asitlerdir. Biyokatalizörler olarak da bilinen enzimler canlı sistemlerdeki biyokimyasal reaksiyonları etkin ve seçici bir şekilde katalize ederler (Nelson vd. 2008; Brasil vd. 2017; Tandon vd. 2021).

Enzimler, yüzyıllar boyunca süt ürünleri, biracılık, tabaklama, fırıncılık, gıda endüstrisi gibi çeşitli endüstrilerde katalizör olarak kullanılmıştır. Günümüzde ise enzimler, temel biyoteknolojik tekniklerin uygulanması için ana araçlar, terapötik ilaçların hedefleri ve tüm biyoteknolojik süreçlerde vazgeçilmez ara ürünler oldukları için biyoteknolojinin çekirdeği olarak kabul edilirler (Sharma vd. 2001). Enzimler artık günümüzde ilaç endüstrisinde baskın bir rol oynamaktadır. Enzimlerin insan sağlığı üzerinde oldukça önemli etkileri olduğundan enzim bazlı ilaçlar araştırma odağı haline gelmiştir (Tandon vd. 2021). Enzim teknolojisi, ilaç araştırma, geliştirme ve üretiminde uygulanmakta olup büyüyen bir alandır. Enzimlerin ve enzim açısından zengin besinlerin düzenli tüketimi sağlığa, hastalıkların önlenmesine ve yaşlanma karşıtı sürece katkıda bulunur. Tıbbi alandaki rollerine bağlı olarak enzimler terapötik enzimler veya teşhis enzimleri olarak adlandırılır.

## 2. TERAPÖTİK ENZİMLER

Enzimlerin ilaç olarak kullanılabilmesine dair öncül çalışmalar yüzyıldan önceye dayanmaktadır ve *Bacillus pyocyaneus*'un hücre dışı salgısının şarbon basilini öldürebildiğinin belirlenmesi bu konudaki öncül çalışmalardan biridir. Daha sonrasında ise enzimlerin enfeksiyonların, kanserin ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanımına ilişkin çalışmalar yapılmıştır. Terapötik enzim kavramı ise 40 yıldan daha uzun bir süre öncesinde ortaya çıkmıştır.

Terapötik özelliklere sahip enzimler, kendileri terapötik ajan olan proteinlerdir. Terapötik enzimler hedefe yönelik yüksek özgüllük, azaltılmış immünojenite gibi özellikleri nedeniyle enzimatik olmayan ilaç ürünlerine göre birçok avantaja sahiptir ve bu da klinikte kullanım potansiyellerini artırmaktadır (Lutz vd. 2017). Terapötik enzimler, çeşitli hastalıkları tedavi etmek için tek başlarına veya diğer terapilerle birlikte kullanılabilir. Genel

olarak, enzimler biyofarmasötik olarak boyutları ve denatürasyona duyarlılıkları nedeniyle enjeksiyon yoluyla kullanılır. Ancak, bu biyoterapötik maddenin verilme şekli hastalığın türüne ve enzim hedefinin konumuna da bağlıdır. Örneğin, sindirimi kolaylaştırıcı takviye olarak enzimler oral olarak kullanılmaktadır (Vellard 2003). Terapötik enzimlerin etki etmesi için genellikle hedeflerine yüksek afinite ve özgüllükte bağlanması gerekir. Ayrıca katalitik aktiviteye sahip olması ve birden fazla hedef molekülü istenen ürüne dönüştürmesi de sahip olması gereken bir diğer özelliktir. (Cooney ve Rosenbluth 1975; Vellard 2003). Bu özellikteki enzimler, azaltılmış toksisite, etkili kataliz, minimal yan etki ve daha az miktarda terapötik maddenin uygulanmasına olanak tanır (Yari vd. 2017).

Terapötik enzimlerin üretimi üzerine yapılan araştırmalar yeni aday enzimlerin keşfine ve tıbbi amaçlı kullanım potansiyellerinin belirlenmesine öncülük etmiş olup hem terapötik hem de analitik amaçlar için ilaç alanında yeni kapılar açmıştır (Li 2018). Terapötik enzim kaynakları arasında hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar (bakteriler, virüsler ve mantarlar) bulunmaktadır. Ancak genellikle üretimin daha ekonomik, enzim içeriğinin belirlenebilir ve kontrol edilebilir olması sebebiyle mikrobiyal kaynaklı enzimler ve uygulamaları tercih edilmektedir.

### **3. MİKROBİYAL TERAPÖTİK ENZİMLER**

Farklı fizyolojik, biyokimyasal ve genetik özellikleri, coğrafi dağılımları ve genomik çeşitlilikleri nedeniyle çok çeşitli enzim üretme potansiyeline sahip olan mikroorganizmalar enzim üretimi için uygun kaynaklardır. Uygulamalarda hızlı üretim, yüksek verim, düşük maliyet, kolay ölçeklendirme, geri kazanım ve saflaştırma, overekspresyon için suşların manipülasyonu gibi avantajları bulunmaktadır (Taipa vd. 2019). Bu sebeple mikrobiyal enzimlerin sağlık sektöründe terapötik ve tanısal ajanlar olarak kullanımı ve bu alanda yapılan çalışmalar giderek artmaktadır (Yang vd. 2017; Vachher vd. 2021). Örneğin, mikrobiyal enzimlerin pazar büyüklüğünün 2020 ile 2027 yılları arasında önemli bir artış göstereceği öngörülmektedir (Enzim Pazarı Büyüklüğü, Payı ve Trend Analiz Raporu, 2020-2030). 200 den fazla mikrobiyal enzim ticari olarak kullanılmaktadır (Liu ve Kokare 2017). Sağlık alanında kullanılan enzimler, endüstriyel kullanılanlara kıyasla çok daha az miktarda gereklidir ancak bu enzimlerin yüksek oranda saf ve özgül olması önemli bir kriterdir. Tıbbi açıdan önemli enzimler genellikle biyoyumlu tampon tuzları ve mannitol seyreltici içeren liyofilize saf preparatlar olarak

pazarlanır. Bu enzimlerin maliyeti yüksektir ancak terapötik ajanların veya tedavilerin maliyetini aşmaz veya onlarla karşılaştırılmaz (Gurung vd. 2013).

### 3.1. Mikrobiyal Terapötik Enzimlerin Tıp ve Farmakolojideki Yeri

Mikrobiyal enzimler tıp ve farmakolojide geniş bir uygulama alanına sahip olup kullanımları son yıllarda artış göstermektedir. Mikrobiyal enzimler genetik ve metabolik bozuklukların tedavisi, Gaucher ve Parkinson hastalığının tedavisi, kanser tedavisi, bulaşıcı hastalıkların tedavisi gibi pek çok rahatsızlıkta terapötik olarak kullanılmasının yanı sıra kan dolaşımındaki sitotoksik ve toksik maddeleri uzaklaştırmak, sindirime yardımcı olmak, anti-inflamatuar, yara iyileştirici, antimikrobiyal ve antikoagülan ajanlar olarak da uygulanmaktadır (Kaur ve Sekhon 2012; Gurung vd. 2013; Darbandi vd. 2024).



**Şekil 1.** Mikrobiyal terapötik enzimler ve yaygın uygulamaları

Özellikle kanser, iltihaplı ve hasarlı doku onarımı ve yeni antibiyotiklere keşif ihtiyacı terapötik enzimlerle ilgili çalışmalara öncülük etmektedir. Çünkü kanser dünya çapında en önemli ölüm nedenlerinden biridir (Dube vd. 2019). Kanser, kontrolsüz ve düzensiz hücre büyümesi, anjiyogenez ve metastaz ile karakterizedir (Chang vd. 2011). Cerrahi, kemoterapi, radyasyon, immunoterapi gibi pek çok tedavi yöntemi olmasına rağmen bu tedavilerin yetersiz kaldığı noktalar bulunduğundan (Lalitha vd. 2016), kanserin önlenmesi ve tedavisi için son yıllarda mikroorganizmalardan elde edilen doğal ürünlerin

araştırılmasına ilişkin çalışmalar artmıştır (Tan vd. 2019). Antitümör enzimlerinin terapötik etkisi, tümör büyümesi için gerekli amino asit seviyelerini düşürme yeteneklerine dayanmaktadır. Ayrıca antitümör ajan olarak kullanılacak terapötik enzimlerin substrat afinitesinin yüksek olması, safsızlık içermemesi, biyolojik sıvılarda ve kanda kararlı yapıda olması ve aktiviteleri için bir kofaktöre ihtiyaç duymaması gerekmektedir.

Hasarlı dokuların tedavisi için, enzimatik yöntemlerin cerrahi ve mekanik prosedürlerle karşılaştırıldığı çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Yanıkların üzerindeki ölü dokuyu parçalamak için çok sayıda bakteri ve bitki enziminin kullanımını incelenmiştir (Gurung 2013). Bakteri kökenli çok sayıda proteolitik enzim, yanıklardaki ölü deriyi gidermek için çalışılmıştır. Daha yüksek kalite ve saflıktaki çeşitli enzimler için de klinik deneyler devam etmektedir.

Terapötik trombolitik enzimlerin de pazarı oldukça büyüktür. Ürokinaz ve hiyaluronidazın miyokard enfarktüsü üzerindeki eş zamanlı etkisinin incelenmesi gibi bu enzimlerin etkinliğini inceleme ve artırmaya yönelik birçok çalışma yürütülmektedir. Araştırmacılar ayrıca trombolitik tedavi için katalaz ve süperoksit dismutaz gibi serbest radikal detoksifiye edici enzimlerin diğer ilaçlarla birlikte kullanıldığını bildirmiştir (Elshafe 2018).

Antibiyotiklerin kötü ve bilinçsiz kullanımı nedeniyle ilaca dirençli bakteriler hızla evrimleşmiş ve antibiyotik tedavisinin başarısız olmasına yol açmıştır. Bakteriyel direncin ortaya çıkması mevcut antibiyotiklerin terapötik etkisini azaltmıştır. Bu nedenle de bakteriyel dirençten kaçınırken yeni antimikrobiyal stratejiler geliştirme gereği ortaya çıkmıştır. Son yıllarda, yaygın antimikrobiyal stratejiler arasında antimikrobiyal enzimler ve biyoteknolojik uygulamaları yer almaktadır (Zhou vd. 2022).

## **3.2. Tedavide Kullanılan Bazı Önemli Mikrobiyal Terapötik Enzimler**

### **3.2.1. L-Asparaginaz (EC 3.5.1.1)**

L-asparaginın geniş bir tıbbi uygulama alanına sahiptir. Temel olarak çocuklarda akut lenfoblastik lösemi tedavisinde kullanılmakla birlikte, Hodgkin hastalığı, akut miyelomonositik lösemi, lenfosarkom ve melanosarkom gibi başka kanser türlerinin tedavisinde de kullanılmaktadır. Aspartat ve amonyağa hidrolizi katalize eder. Tümör hücreleri, esansiyel olmayan amino asit L-asparaginın sentezini durduran aspartat-amonyak ligaz

aktivitesinden yoksundur. Asparginazın aktivitesi buna dayanmaktadır. Asparginaz, kendi ihtiyaçları için L-asparagin sentezleme kapasitesine sahip olan normal hücreleri etkilemez, ancak serbest ekzojen konsantrasyonda bir düşüşe neden olur ve bu da tümör hücrelerinde ölümcül bir açlık durumuna neden olur. Enzim, intravenöz olarak uygulanabilir ve yalnızca kan dolaşımındaki asparagin seviyeleri son derece düşük olduğunda etkilidir (Gurung vd. 2013). *Erwinia carotovora* veya *Escherichia coli*'den elde edilen L- asparginaz, akut lenfositik lösemi tedavisinde kullanımı incelenmiştir (Eden vd.,1990). Enzimin bu hastalık için terapötik bir ajan olarak mükemmel sonuçlar ürettiği bildirilmiştir (Dinndorf vd. 2007). Bu enzimin ayrıca farengit, glomerülonefrit, kızıl hastalığı, toksik şok sendromu, menenjit gibi bulaşıcı hastalıkları tedavi etmede de potansiyeli olduğu raporlanmıştır. Bu kadar geniş tıbbi uygulama alanı bulunan bu enzimin pazar talebi oldukça yüksektir, ancak kaynaklar bu talebi karşılayamamaktadır. Bu yüzden bu alandaki çalışmalar artmış ve mevcut *Escherichia coli* ve *Erwinia chrysanthemi* gibi ticari üretim yapılan ve Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı suşlara alternatifler geliştirilmektedir (Vimal ve Kumar 2017; Darvishi vd.,2022).

### 3.2.2. Kolajenaz (EC 3.4.24.3)

Doğal kolajeni özel olarak hidrolize edebilen benzersiz bir proteazdır ve aktif bölgede bir çinko kısmı yer almaktadır. Bakteriyel kolajenazların ekstraselüler matrisleri parçalama yetenekleri bulunmaktadır. Ayrıca bakteriyel kolajenazlar, fibriler kolajen moleküllerinin helezon bölgelerini kesen enzimler olarak da tanımlanmaktadır (Harrington,1996). Kolejenaz cilt ülserleri ve yanıkların tedavisinde kullanılabilir. Ölü doku ve derileri parçalamaya yardımcı olur. Bu da antibiyotiklerin daha fazla etki ederek iyileşme sürecini hızlandırmasını sağlar (Ostlie vd. 2012). *Clostridium histolyticum* tarafından üretilen kolajenaz, travmatik cerrahide yanık izlerini iyileştirmek için kullanılmıştır (Klasen 2000). Kolajenazın ayrıca fibroproliferatif bir bozukluk olan Dupuytren hastalığını tedavi ettiği bilinmektedir. *Clostridium histolyticum*'un bu hastalık için uygulanabilecek bir tedavi olduğu ileri sürülmüştür (Hartig-Andreasen vd. 2019).

### 3.2.3. Lipazlar (EC 3.1.1.3)

Yağların sindirimine yardımcı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca kötü huylu tümörlerin tedavisinde uygulanmaktadır. Lipazlar geçmişte de dispepsi, gastrointestinal rahatsızlıklar, sindirim alerjilerinin sebep olduğu deri



lezyonları ve daha birçok enfeksiyonun tedavisinde kullanılmıştır. Bakteriler arasında *Achromobacter sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus sp.* ve *Chromobacterium sp.* lipazların üretimi için kullanılmıştır (Reshma 2019). *Candida rugosa*'dan elde edilen lipaz, serum kolesterol seviyesini düşürme yeteneğine sahip bir ilaç olan lovastatin sentezinde görev almaktadır (Matsumae vd. 1993). *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia* ve *Rhizopus oryzae*'den elde edilmiş lipazlarla oluşturulan, yağların %90'ına kadarını hidrolize edebilen ticari bir ürün yağ sindirimini ve emilimini iyileştirerek hastaların tedavisinde kullanılmaktadır (Basso ve Serban 2020; Stevens vd. 2018). Lipazın enzim takviyesi ve probiyotik uygulamaları da yine bağırsak mikrobiyal dengesinin sağlanması, korunması ve sindirim bozukluklarının giderilmesinde etkili terapötik uygulamalar olarak görülmektedir (Ianiro vd. 2016; Oak ve Jha 2019).

#### **3.2.4. Serratiopeptidaz (Serratia E15 proteaz, EC 3.4.24.40):**

Serratiopeptidaz tripsin ailesine ait bir proteazdır ve yaklaşık 52 kDa'lık bir moleküler kütleye sahiptir (Metkar vd. 2020). Bu enzim üzerine klinik uygulamaları uzun yıllardır mevcuttur (Mohankumar ve Krishna Raj 2011) ve iltihap ve ağrı tedavisinde kullanılmaktadır. İltihabı azaltmak için fibrini parçalamaktadır. Doku onarım sürecini hızlandırmakla birlikte, ağrı indükleyici peptid olan bradikinin salınımını engelleyerek ağrıyı hafifletmektedir (Esch vd. 1989; Rothschild 1991). Serratiopeptidaz veya serrapeptaz, başlangıçta ipekböceği *Bombyx mori*'de bulunan enterobakteri *Serratia spp.*'den izole edilmiştir. Ortopedi, cerrahi, jinekoloji, kulak burun boğaz ve diş hekimliğinde uygulamaları bulunmaktadır. Dental implantlarla ilişkili periodontal inflamatuvar bozuklukların tedavisinde ve kazeinolitik ve fibrinolitik özelliklere sahip olduğundan ateroskleroz tedavisinde de rol oynar (Bhagat vd. 2013; Tamimi vd. 2021). *Serratia marcescens*'ten elde edilen serrapeptaz antiinflamatuvar ajan olarak, karpal tünel sendromu ve fibroistik tedavisi için uygulanmaktadır (Preethi vd. 2011). Serratiopeptidazın bağırsaktan, muhtemelen klattrin aracılı endositozla emilebileceği gösterilmiştir (Tiwari 2017). Son yıllarda rekombinant teknoloji ile bazı mikroorganizmaların genetik olarak serropeptidaz üretimi üzerine çalışmalar mevcuttur. Örneğin *Escherichia coli BL21* tarafından üretilen bu tür rekombinant bir serratiopeptidaz, anti-biyofilm özelliğe sahiptir (Rouhani vd. 2020).

### 3.2.5.Nattokinaz (EC 3.4.21.62)

Natto adı verilen Japon fermente soya fasulyesinden elde edilip saflaştırılan bir fibrinolitik enzimdir (Metkar vd. 2017). *Bacillus subtilis var. Natto*'nun rol oynadığı fermentasyon sonucu elde edilen bir alkalın serin proteinazıdır. Ancak diğer *Bacillus* ve bazı *Pseudomonas* türlerinden de üretilebilir. Fibrinolitik etkiye sahiptir kanın pıhtılaşmasını önlemekle birlikte (Milner 2008) kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde nötrasötik olarak düşünülebilir (Hsia vd. 2009). Bu tarz fibrinolitik enzimeler çeşitli fermente gıdalardan saflaştırılmış ve fizikokimyasal özellikleri açısından karakterize edilmiştir (Banerjee vd. 2004). Son yıllarda, nattokinazın Alzheimer hastalığını önleme, retina bozukluklarını tedavi etme, hiperlipidemi ile mücadele etme ve inflamatuvar bağırsak hastalıklarını iyileştirme gibi ek terapötik özellikleri belirlenmiştir (Fang vd. 2023).

### 3.2.6.Antibakteriyel Enzimler-Enzibiyotikler

Son yıllarda, antibiyotik dirençli bakterilerin ortaya çıkmasında dünya çapında bir artış meydana gelmesi küresel bir sağlık tehdidi oluşturmuştur. Bu nedenle, yenilikçi antibakteriyel tedaviler ve stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır. Son yirmi yıldır, bakteriyofajlar tarafından kodlanan antimikrobiyal enzimler, bakterileri lize edip öldürebilen virüsler ilgi odağı haline gelmiştir (Danis-Włodarczyk vd. 2021). Enzibiyotik terimi ilk kez Nelson ve arkadaşları (2001) tarafından 2001 yılında kullanılmış olup, enzim ile antibiyotik kelimelerinden oluşmaktadır. Bu enzim grubunda lizinler, bakteriyosinler, lizozimler, otolizinler ve biyofilm degrade eden depolimerazlar yer alır (Wu vd. 2012; Danis-Włodarczyk vd.,2021).

**Lizinler (EC 3.2.1.17)** spesifiktir, hızlıdır, antibiyotik dirençli bakterileri öldürebilir. Lizinler mikroflora üzerinde herhangi bir olumsuz etki yaratmadan mukoza zarlarında kolonize olan *Staphylococcus aureus* gibi patojenleri hassas bir şekilde uzaklaştırarak tıpta yaygın olarak kullanılırlar (Wertheim vd. 2005). Son yıllarda, birçok ilaca direnç gösteren Gram pozitif bakterileri kontrol altına almak için bir diğer alternatif antimikrobiyal strateji olarak bakteriyofaj **endolizindir**. Bu hidrolazlar, hücre duvarı karbonhidratları ve peptidoglikan katmanları üzerine etkili olup dışarıdan uygulandıklarında bile hedeflenen Gram pozitif bakterileri hızla öldürebilirler. Bu potansiyeli dolayısıyla son yıllarda ilaca dirençli *S. aureus* suşlarına karşı

endoliziner ile ilgili çalışmalar ve bu çalışmalara ilişkin olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Kaur vd. 2020).

**Otoliziner (EC 3.4.24.38)** potansiyel enzimiyotikler olarak işlev görebilecek litik enzimlerin bir diğer kategorisidir. Antibakteriyel ajan olarak kullanılan ilk otolizinin, *Streptococcus pneumoniae* suşlarından elde edilen LytA amidaz enzimi olmuştur (Rodriguez-Cerrato vd. 2007).

**Bakteriyosinler**, bakterilerin rekabetçi bakterilerin büyümesini önlemek için ürettiği peptitlerdir (Diep ve Nes 2002). *Streptococcus equis sp. zooepidemicus 4881* tarafından üretilen Zoocin A, potansiyel bir enzimiyotiktir. *Staphylococcus simulans biovar staphylolyticus* tarafından kodlanan lizostafin MRSA ve vankomisine direnç gösteren suşlar da dahil olmak üzere tüm *S. aureus* suşlarını öldürebilir (Thumm ve Gotz 1997). 27 kDa'lık bir çinko metalloenzimdir. Lizostafin, topikal ve sistemik stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır (Oluola vd. 2007). Yüksek özgülüğü nedeniyle, lizostafin antibiyotik dirençli stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde yüksek potansiyele sahip olabilir. Lizostafin'in yüzey kolonizasyonunu azalttığı belirlenmiştir. Bu nedenle ilaç *S. aureus*'un burun kolonizasyonunu önlemede daha etkilidir. Ayrıca rekombinant lizostafin'in aort endokarditinin tedavisinde etkili olduğu bulunmuştur (Wu vd. 2003; Kumar 2008). Bakteriyosinlerin diğer bazı önemli örnekleri arasında *Lactococcus lactis*'in nisini (Galvan Marquez vd. 2020) sayılabilir. Nisin içeren probiyotiklerin, diş eti iltihabı ve periodontitis gibi çeşitli ağız hastalıklarında ve diyabet, kanser ve kalp hastalığı gibi sistemik hastalıklarda iyileştirme potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir (Nguyen vd. 2020).

**Lizozimler veya  $\beta$ -1,4-N-asetilmuramidazlar (EC 3.2.1.17)**, peptidoglikan tabakasındaki N-asetilmuramik asit ve N-asetilglukozamin grupları arasındaki  $\beta$ -1,4 glikozidik bağlarını özel olarak kesen hidrolitik enzimlerdir. (Pushkaran vd. 2015). Lizozimler, *Staphylococcus aureus*, *Arthrobacter crystallopoites*, *Bacillus subtilis*, *B. thuringiensis*, *Enterococcus hirae* ve *Streptomyces griseus* gibi bakterilerde raporlanmıştır (Ercan ve Demirci 2016). Lizozimler antibakteriyel özelliklerine ek olarak antiviral, antikanser ve antiinflamatuvar aktiviteye sahiptir. Lizozimlerin tıpta kullanımına ilişkin son uygulamalar arasında yaralara topikal uygulama için jel formülasyonları, akne tedavisi ve trakeit ve zatürre tedavisinde aerosol olarak kullanımı yer almaktadır (Vachher vd. 2021).

### 3.2.7. Streptokinaz (EC 3.4.24.29)

Streptokinaz,  $\beta$  hemolitik streptokoklar tarafından üretilen bir hücre dışı enzim olup fibrinolitik etki gösteren tek zincirli bir polipeptittir. Streptokokların belirli suşları tarafından üretilen streptokinaz, kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde terapötik bir ajan olarak kullanılır (Reshma 2019).

### 3.2.8. Stafilokinaz (EC 3.4.99.22)

Stafilokinaz, belirli stafilokok suşları tarafından üretilen, fibrinolitik ve trombolitik aktivitelere sahip bir enzimdir (Vakili vd. 2017). Stafilokinaz, yaklaşık 15,5 KDa moleküler ağırlığa ve 163 amino asit uzunluğa sahip tek bir polipeptit zinciridir. Stafilokinaz, miyokard enfarktüsünün tedavisinde kullanılır (Lijnen vd.,1992; Szarka vd. 1999)

### 3.2.9. Lakkaz (EC 1.10.3.2)

Lakkazlar, mono-, di- ve polifenoller, amino fenoller, metoksi fenoller, aromatik aminler ve askorbat dahil olmak üzere çok çeşitli organik ve inorganik substratların oksidasyonunu katalize eden bakır içeren enzimlerdir (Galhaup vd.,2002). Lakkaz aktivitesi *Azospirillum lipoferum*, *Marinomonas mediterranea*, *Streptomyces griseus* ve *Bacillus subtilis* türlerinde saptanmıştır (Octavio vd. 2006). Lakkaz, anestezikler, anti-inflamatuar ajanlar, antibiyotikler, sedatifler, vb. gibi karmaşık tıbbi bileşiklerin sentezinde kullanılabilir (Reshma,2019).

### 3.2.10. $\alpha$ -Galaktosidaz (E.C. 3.2.1.22)

Glikoproteinlerden, glikolipidlerden, galaktomannanlardan ve galaktolipidlerden terminal  $\alpha$ -galaktosil kısımlarını hidrolize ederek çalışan bir ekzoglikozidazdır. Enzim ayrıca melibiyozda galaktoz ve glikoz arasındaki  $\alpha$ -1,6 bağlantısını keser, bu nedenle melibiaz olarak da bilinir Enzimin biyomedikal uygulama alanları arasında Fabry hastalığının tedavisi, kan grubu dönüşümü ve ksenotransplantasyonda  $\alpha$ -gal tipi immünojenik epitoplara uzaklaştırılması yer almaktadır.

Enzim, galaktozidaz taşıma sisteminin varlığı nedeniyle melibiyoz tarafından indüklenebildiği *E.coli*'de iyi çalışılmıştır. Probiyotik mikroorganizmalar ve funguslar üzerine de birçok alfa-galaktozidaz çalışması yürütülmüştür. *Aspergillus niger*'den elde edilen ticari enzimatik ürünler

mevcuttur ve sindirimi iyileştirici ve gazı önleyici takviyeler olarak kullanılmaktadır (Bhatia vd.,2020).

**3.2.11. Fenilalanin amonyak liyaz (EC 4.3.1.24; PAL):** L-fenilalaninin trans-sinnamik asit ve amonyağa oksidatif olmayan deaminasyonunu katalize eden hidrolitik olmayan bir enzimdir (Koukol ve Conn,1961). *Anabaena variabilis*, *Oscillatoria sp.* gibi siyanobakteriler, çeşitli *Streptomyces* türleri ve bazı mantarlarda varlığı raporlanmıştır. En önemli biyomedikal uygulama alanı yetişkin fenilketonüri (PKU) hastalarının tedavisidir. Ayrıca, kanser, mikrobiyal hastalıklar ve tirozinemi metaabolik hastalıkları tedavi etmede kullanılmaktadır (Kawatra vd. 2020).

### 3.3.Mikrobiyal Terapötik Enzimlerin Üretimi

Terapötik ve endüstriyel olarak kullanılan mikrobiyal enzimler, yenilenebilir kaynaklar kullanılarak fermentasyon sonucu mikroorganizmalardan elde edildikleri için sürdürülebilir kalkınmaya etkili bir şekilde katkıda bulunurlar. Hem katı hem de sıvı enzim preparatları çok az depolama alanına ihtiyaç duyar ve ayrıca, enerji, kimyasallar ve su kullanımını ve sonrasında oluşan atık üretimini azaltarak üretimin çevre üzerindeki zararlı etkilerini azaltır (Gram vd. 2001; Raven 2002; Clark ve Dickson 2003). *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, laktik asit bakterileri ve *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, ve *Saccharomyces cerevisiae* enzim üretimi için en çok kullanılan mikroorganizmalardır (Patel vd. 2017).

Farmasötik enzimler, genel olarak güvenli kabul edilen kategoriye giren mikroorganizmalar (bakteri ve mantarlar) kullanılarak fermentasyon teknolojisi ile üretilir (Patel vd. 2017) (Yang vd. 2017). Bu üretim esas olarak submerged fermentasyonu (SmF) ve solid state fermentasyonu (SSF) adı verilen iki yöntem ile gerçekleştirilir. Her iki yöntemin de kendine özgü avantajları ve sınırlamaları vardır

Submerged fermentasyon (SmF)'de mikroorganizmaların büyümesi sıvı bir kültür ortamında gerçekleşir. İstenen özelliklere sahip mikroorganizmalar yeterli besin ve oksijen içeren kapalı, steril fermentasyon ortamına aşılır. Mikroorganizmalar besin ortamındaki besinleri kullanarak enzimleri ortama salar (Yadav vd. 2019). Mikroorganizmalar sıvı fermentasyon ortamında asılı halde büyür ve çoğalır. Genellikle endüstriyel üretim süreçlerinde mikroorganizmalar hücre dışı enzimler ve hücre içi aşırı ifade edilen enzimler için karıştırmalı bir tank reaktöründe batık kültürlerde yetiştirilir (Yang vd.

2017). SmF'nin başarısının arkasındaki temel sebep, pilot ölçekli fermentörlerin üretim ölçeğinin milyon litre kapasiteye artırılabilir olmasıdır. Ayrıca bu işlem sıcaklık, çözünmüş oksijen, pH ve köpük oluşumu gibi parametreler üzerinde oldukça gelişmiş çevrimdışı/çevrimiçi bir kontrole sahiptir (Patel vd. 2017).

Solid state fermentasyon (SSF) /Katı hal fermantasyonu enzim üretimi için büyük bir potansiyele sahiptir. Bu yöntemde mikroorganizmalar susuz veya az su içeren katı substratların bulunduğu ortamda pirinç, tahıl, şeker kamışı gibi katı bir substrat üzerinde yetiştirilir. Bu süreç SmF sürecine göre yüksek ürün titresi, daha az atık üretimi, basit fermantasyon ekipmanı kullanımı, daha az eğitilmiş işgücü vb. gibi çeşitli avantajlar sunar. Birçok substrat, SSF uygulaması için kullanılabilir. Diğer yöntemle kıyasla artıları olmasına rağmen sürecin yavaş işlenmesi, ortamda az miktarda suyun bulunmasından dolayı optimum koşulları sağlamanın zor olması ve ürünün saflık oranı gibi negatif yönleri de mevcuttur (Afşin 2010, Thomas vd. 2013; Patel vd. 2017)

### **3.4. Yeni mikrobiyal terapötik enzimlerin keşfinde ve üretiminde modern yaklaşımlar**

Yeni enzimlerin keşfi için bugüne kadar kolay erişilebilirliği nedeniyle karasal ekosistemler yaygın olarak tercih edilmiştir. Son yıllarda, tuzla, sıcak su kaynakları, kutuplar gibi aşırı/ekstrem ortamlardan izole edilen ekstremofiller de yeni enzim kaynakları olarak dikkat çekmektedir (Zhang ve Kim 2010; Rao vd. 2017; Lima vd. 2022). Ancak yeni enzimlerin keşfi için bilinen mikroorganizmaların %98'inden fazlası kültüre alınamadığından kültür bağımlı gibi yöntemler yetersiz kalmaktadır (Garrido-Cardenas vd. 2017). Bu sorunların üstesinden gelmek için dizileme ve ifadeye dayalı metagenomik yaklaşımlar uygulanmaktadır. Bu iki yaklaşımın birleşimi ise S-GAM olarak bilinen metagenomlardan gen-spesifik amplikon taramasıdır. Dizi ve ifadeye dayalı metagenomiğin birleşimi ise metagenomlardan gen-spesifik amplikon taraması (S-GAM) olarak bilinmektedir. Bir primer, bir metagenom içindeki ilgi duyulan tam uzunluktaki geni çoğaltmak için tasarlanır; amplikon daha sonra klonlanır ve ifade için taranır (Tatta vd. 2022).

Mevcut enzimlerin kullanım ve uygulamaları, rekombinant DNA teknolojilerini kullanan enzim mühendisliği yaklaşımlarıyla artırılmaktadır (Jemli vd. 2016; Basheer ve Chellappan 2017; Arbige vd. 2019).

Yönlendirilmiş evrim, rasyonel tasarım, yarı rasyonel tasarım, mutagenез teknikleri ve de novo tasarım teknikleri yaygın uygulamalar arasındadır.

Ancak bilinen yöntemlere ek olarak yüksek verimli tarama (HTS) protokolleri ve metotları ortaya çıkmaktadır. Bu yaklaşımda genomik, transkriptomik, proteomik, metabolomik ve robotik gibi kaynakların ve metotların yardımıyla enzim tasarımı ve seçimi çok aşamalı ve kapsamlı bir noktaya ulaşmaktadır (Longwell vd. 2017; Mazurenko vd. 2019; Yi vd. 2021). Geleneksel deneysel ve hesaplamalı teknikler, gelişmiş yeni nesil yüksek verimli teknolojiyle birleştirildiğinde, yeni enzimler üretmek için potansiyel yöntemler ortaya çıkabilir. Makine öğrenimi (ML) bu yöntemlerden biridir. Uygun enzimleri geliştirmek ve gereken temel özellikleri analiz etmek için uygulanır (Mazurenko vd. 2019). Robotik de yeni enzimlerin keşfini ve çeşitli alanlardaki uygulamaların geliştirilmesini hızlandırır. Yüksek verimli enzim taraması için tam otomatik robotik platformlar geliştirilmekte ve üretilmektedir. Bu tür platformlar, hidrolazlar, monooksijenaz, dehalojenaz, transaminaz ve asilaz gibi çeşitli enzim türlerinin taranmasında başarıyla kullanılmaktadır (Dixit vd. 2021).

#### **4.SONUÇ**

Terapötik enzimlerin çoğu mikroorganizmalardan üretilmektedir ve bu mikrobiyal enzimler oldukça önemli olup pek çok hastalığın tedavisinde alternatif olabilecek terapötik potansiyele sahiptir. Terapötik enzimlerin mikrobiyal üretimi hem ekonomik hem de çevre dostudur. Terapötik enzimlerin onkolitikler, trombolitikler antikoagülanlar, fibrinolitikler, enzimiyotikler gibi çok çeşitli geniş bir kullanım yelpazesi vardır. Yeni enzimlerin keşfi, potansiyellerinin değerlendirilmesi ve mevcut olanların optimizasyonu tıp ve farmakoloji alanında bir ihtiyaçtır. Bu mikrobiyal enzim biyofarmasötiklerinin keşfi, izolasyonu, karakterizasyonu, rekombinant ve endüstriyel üretim uygulama denemeleri kimyasal terapötik ajanlara alternatif olacağından ve çeşitli insan hastalıklarının tedavisinde fayda sağlayacağından daha detaylı ve ilgi odağı haline getirilerek araştırılmalıdır.

## 5.KAYNAKÇA

- Afşin, M. (2010). Katı faz fermantasyon (solid state fermentation; SSF) yöntemiyle *Bacillus licheniformis* ATCC 14580'den proteaz üretimi. Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (Doctoral dissertation, Yüksek Lisans Tezi 95 sy).
- Arbige, M. V., Shetty, J. K., & Chotani, G. K. (2019). Industrial enzymology: the next chapter. *Trends in biotechnology*, 37(12), 1355-1366.
- Banerjee, A., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2004). Streptokinase—a clinically useful thrombolytic agent. *Biotechnology advances*, 22(4), 287-307.
- Basheer, S. M., & Chellappan, S. (2017). Enzyme engineering. *Bioresources and Bioprocess in Biotechnology: Volume 2: Exploring Potential Biomolecules*, 151-168.
- Basso, A., & Serban, S. (2020). Overview of immobilized enzymes' applications in pharmaceutical, chemical, and food industry. *Immobilization of Enzymes and Cells: Methods and Protocols*, 27-63.
- Bhagat, S., Agarwal, M., & Roy, V. (2013). Serratiopeptidase: a systematic review of the existing evidence. *International Journal of Surgery*, 11(3), 209-217.
- Bhatia, S., Singh, A., Batra, N., & Singh, J. (2020). Microbial production and biotechnological applications of  $\alpha$ -galactosidase. *International journal of biological macromolecules*, 150, 1294-1313.
- Brasil, B. D. S. A. F., de Siqueira, F. G., Salum, T. F. C., Zanette, C. M., & Spier, M. R. (2017). Microalgae and cyanobacteria as enzyme biofactories. *Algal research*, 25, 76-89.
- Chang, C. C., Chen, W. C., Ho, T. F., Wu, H. S., & Wei, Y. H. (2011). Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms. *Journal of bioscience and bioengineering*, 111(5), 501-511.
- Clark, W.C., Dickson, N.M. 2003. Sustainable science: the emerging research program. *Proc. Natl. Acad.*
- Cooney, D. A., & Rosenbluth, R. J. (1975). Enzymes as therapeutic agents. *Advances in Pharmacology*, 12, 185-289.
- Danis-Wlodarczyk, K. M., Wozniak, D. J., & Abedon, S. T. (2021). Treating bacterial infections with bacteriophage-based enzybiotics: in vitro, in vivo and clinical application. *Antibiotics*, 10(12), 1497.
- Darbandi, A., Elahi, Z., Dadgar-Zankbar, L., Ghasemi, F., Kakavandi, N., Jafari, S., ... & Ghanavati, R. (2024). Application of microbial enzymes in medicine and industry: current status and future perspectives. *Future Microbiology*, 1-19.
- Darvishi, F., Jahanafrooz, Z., & Mokhtarzadeh, A. (2022). Microbial L-asparaginase as a promising enzyme for treatment of various cancers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(17), 5335-5347.
- Diep, D. B., & Nes, I. F. (2002). Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Current drug targets*, 3(2), 107-122.
- Dinndorf, P. A., Gootenberg, J., Cohen, M. H., Keegan, P., & Pazdur, R. (2007). FDA drug approval summary: pegaspargase (Oncaspar®) for the first-line treatment



- of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *The oncologist*, 12(8), 991-998.
- Dixit, M., Panchal, K., Pandey, D., Labrou, N. E., & Shukla, P. (2021). Robotics for enzyme technology: innovations and technological perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(10), 4089-4097.
- Dube, P. N., Sakle, N. S., Dhawale, S. A., More, S. A., & Mokale, S. N. (2019). Synthesis, biological investigation and docking study of novel chromen derivatives as anti-cancer agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 19(9), 1150-1160.
- Eden, O. B., Shaw, M. P., Lilleyman, J. S., & Richards, S. (1990). Non-randomised study comparing toxicity of escherichia coli and erwinia asparaginase in children with leukaemia. *Medical and pediatric oncology*, 18(6), 497-502.
- Elshafe, A. M. (2018). Medical, Diagnostic and Therapeutic Applications of Enzymes. *UPI Journal of Pharmaceutical, Medical and Health Sciences*, 01-10.
- Enzymes Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Carbohydrase, Proteases, Polymerases & Nucleases), By Type (Industrial, Specialty), By Source (Plants, Animals), By Region, And Segment Forecasts, 2024 – 2030. Report ID: 978-1-68038-022-4
- Ercan, D., & Demirci, A. (2016). Recent advances for the production and recovery methods of lysozyme. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(6), 1078-1088.
- Esch, P. M., Gerngross, H., & Fabian, A. (1989). Reduction of postoperative swelling. Objective measurement of swelling of the upper ankle joint in treatment with serrapeptase--a prospective study. *Fortschritte der Medizin*, 107(4), 67-8.
- Fang, M., Yuan, B., Wang, M., Liu, J., & Wang, Z. (2023). Nattokinase: Insights into Biological Activity, Therapeutic Applications, and the Influence of Microbial Fermentation. *Fermentation*, 9(11), 950.
- Galhaup, C., Goller, S., Peterbauer, C. K., Strauss, J., & Haltrich, D. (2002). Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology*, 148(7), 2159-2169
- Galván Márquez, I. J., McKay, B., Wong, A., Cheetham, J. J., Bean, C., Golshani, A., & Smith, M. L. (2020). Mode of action of nisin on *Escherichia coli*. *Canadian journal of microbiology*, 66(2), 161-168.
- Garrido-Cardenas, J. A., Polo-López, M. I., & Oller-Alberola, I. (2017). Advanced microbial analysis for wastewater quality monitoring: metagenomics trend. *Applied microbiology and biotechnology*, 101, 7445-7458.
- Gram, A., Treffenfeldt, W., Lange, U., McIntyre, T., Wolf, O. 2001. The application of biotechnology to industrial sustainability, OECD Publications Service, Paris, France.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V. (2013). A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed research international*, 2013(1), 329121.
- Harrington, D. J. (1996). Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease. *Infection and immunity*, 64(6), 1885-1891.

- Hartig-Andreasen, C., Schroll, L., & Lange, J. (2019). Clostridium histolyticum as first-line treatment of Dupuytren's disease. *Danish medical journal*, 66(2), A5527.
- Hsia, C. H., Shen, M. C., Lin, J. S., Wen, Y. K., Hwang, K. L., Cham, T. M., & Yang, N. C. (2009). Nattokinase decreases plasma levels of fibrinogen, factor VII, and factor VIII in human subjects. *Nutrition Research*, 29(3), 190-196.
- Ianiro, G., Pecere, S., Giorgio, V., Gasbarrini, A., & Cammarota, G. (2016). Digestive enzyme supplementation in gastrointestinal diseases. *Current drug metabolism*, 17(2), 187-193.
- Jemli, S., Ayadi-Zouari, D., Hlima, H. B., & Bejar, S. (2016). Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes. *Critical reviews in biotechnology*, 36(2), 246-258.
- Kaur, J., Singh, P., Sharma, D., Harjai, K., & Chhibber, S. (2020). A potent enzymatic against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Virus Genes*, 56, 480-497.
- Kaur, R., & Sekhon, B. S. (2012). Enzymes as drugs: an overview. *Journal of Pharmaceutical Education & Research*, 3(2).
- Kawatra, A., Dhankhar, R., Mohanty, A., & Gulati, P. (2020). Biomedical applications of microbial phenylalanine ammonia lyase: Current status and future prospects. *Biochimie*, 177, 142-152.
- Klasen, H. J. (2000). A review on the nonoperative removal of necrotic tissue from burn wounds. *Burns*, 26(3), 207-222.
- Koukol, J., & Conn, E. E. (1961). The metabolism of aromatic compounds in higher plants: IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *Journal of Biological Chemistry*, 236(10), 2692-2698.
- Kumar, J. K. (2008). Lysostaphin: an antistaphylococcal agent. *Applied microbiology and biotechnology*, 80, 555-561.
- Lalitha, P., Veena, V., Vidhyapriya, P., Lakshmi, P., Krishna, R., & Sakthivel, N. (2016). Anticancer potential of pyrrole (1, 2, a) pyrazine 1, 4, dione, hexahydro 3-(2-methyl propyl)(PPDHMP) extracted from a new marine bacterium, *Staphylococcus* sp. strain MB30. *Apoptosis*, 21, 566-577.
- Li, M. (2018). Enzyme replacement therapy: a review and its role in treating lysosomal storage diseases. *Pediatric annals*, 47(5), e191-e197.
- Lijnen, H. R., Van Hoef, B., Vandebossche, L., & Collen, D. (1992). Biochemical properties of natural and recombinant staphylokinase. *Fibrinolysis*, 6(4), 214-225.
- Lima, I. G., Bispo, J. R., Agostinho, A. Y., Queiroz, A. C. D., Moreira, M. S. A., Passarini, M. R. Z., ... & Duarte, A. W. F. (2022). Antarctic environments as a source of bacterial and fungal therapeutic enzymes. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 94(suppl 1), e20210452.
- Liu, X., and Kokare, C., (2017) Chapter 11: Microbial Enzymes of Use in Industry (in *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*.) Academic Press Books, Elsevier.
- Longwell, C. K., Labanieh, L., & Cochran, J. R. (2017). High-throughput screening technologies for enzyme engineering. *Current opinion in biotechnology*, 48, 196-202.

- Lutz, S., Williams, E. and Muthu, P. (2017). Engineering Therapeutic Enzymes. In Directed Enzyme Evolution: Advances and Applications (pp. 17–67). Cham: Springer International Publishing.
- Matsumae, H., Furui, M., & Shibatani, T. (1993). Lipase-catalyzed asymmetric hydrolysis of 3-phenylglycidic acid ester, the key intermediate in the synthesis of diltiazem hydrochloride. *Journal of fermentation and bioengineering*, 75(2), 93-98.
- Mazurenko, S., Prokop, Z., & Damborsky, J. (2019). Machine learning in enzyme engineering. *ACS Catalysis*, 10(2), 1210-1223.
- Metkar, S. K., Girigoswami, A., Murugesan, R., & Girigoswami, K. (2017). Lumbrokinase for degradation and reduction of amyloid fibrils associated with amyloidosis. *Journal of Applied Biomedicine*, 15(2), 96-104.
- Metkar, S. K., Girigoswami, A., Vijayashree, R., & Girigoswami, K. (2020). Attenuation of subcutaneous insulin induced amyloid mass in vivo using Lumbrokinase and Serratiopeptidase. *International journal of biological macromolecules*, 163, 128-134.
- Milner, M. (2008). Nattokinase: clinical updates from doctors support its safety and efficacy. *FOCUS Allergy Res Group News: Lett.*
- Mohankumar, A., & Krishna Raj, R. H. (2011). Production and characterization of serratiopeptidase enzyme from *Serratia marcescens*. *International Journal of Biology*, 3(3), 39-51.
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan. 5th ed., W.H. Freeman, New York.
- Nelson, D., Loomis, L., & Fischetti, V. A. (2001). Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(7), 4107-4112.
- Nguyen, T., Brody, H., Lin, G. H., Rangé, H., Kuraji, R., Ye, C., ... & Kapila, Y. (2020). Probiotics, including nisin-based probiotics, improve clinical and microbial outcomes relevant to oral and systemic diseases. *Periodontology 2000*, 82(1), 173-185.
- Oak, S. J., & Jha, R. (2019). The effects of probiotics in lactose intolerance: A systematic review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(11), 1675-1683.
- Octavio L.C., Ricardo P.P., Francisco V.O. (2006). Editors: Ramón. Gerardo Guevara-González and Irineo Torres-Pacheco. *Laccases*: 323-340.
- Oluola, O., Kong, L., Fein, M., & Weisman, L. E. (2007). Lysostaphin in treatment of neonatal *Staphylococcus aureus* infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(6), 2198-2200.
- Ostlie, D. J., Juang, D., Aguayo, P., Pettiford-Cunningham, J. P., Erkmann, E. A., Rash, D. E., ... & Peter, S. D. S. (2012). Topical silver sulfadiazine vs collagenase ointment for the treatment of partial thickness burns in children: a prospective randomized trial. *Journal of pediatric surgery*, 47(6), 1204-1207.

- Patel, A. K., Dong, C. D., Chen, C. W., Pandey, A., & Singhania, R. R. (2023). Production, purification, and application of microbial enzymes. In *Biotechnology of microbial enzymes* (pp. 25-57). Academic Press.
- Patel, A. K., Singhania, R. R., Pandey, A., Eds. (2017). *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*. pp. 13-41, Academic Press Books.Elsevier.
- Preethi C, Dimpi G, Jodha D, Singh J. (2011). Applications of microbial proteases in pharmaceutical industry: an overview. *Reviews in Medical Microbiology*. 2011; 22(4):96-101.
- Pushkaran, A. C., Nataraj, N., Nair, N., Götz, F., Biswas, R., & Mohan, C. G. (2015). Understanding the structure–function relationship of lysozyme resistance in *Staphylococcus aureus* by peptidoglycan O-acetylation using molecular docking, dynamics, and lysis assay. *Journal of chemical information and modeling*, 55(4), 760-770.
- Rao, T. E., Imchen, M., & Kumavath, R. (2017). Marine enzymes: production and applications for human health. In *Advances in food and nutrition research* (Vol. 80, pp. 149-163). Academic Press.
- Raven, P. H. (2002). Science, sustainability, and the human prospect. *Science*, 297(5583), 954-958.
- Reshma, C. V. (2019). Microbial enzymes: therapeutic applications. *Microbiol. Res. J. Int*, 27(2), 1-8.
- Rodríguez-Cerrato, V., García, P., Del Prado, G., García, E., Gracia, M., Huelves, L., ... & Soriano, F. (2007). In vitro interactions of LytA, the major pneumococcal autolysin, with two bacteriophage lytic enzymes (Cpl-1 and Pal), cefotaxime and moxifloxacin against antibiotic-susceptible and-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 60(5), 1159-1162.
- Rothschild, J. (1991). Clinical use of serrapeptase: An alternative to non-steroidal antiinflammatory agents. *The American Chiropractor*, 58, 17.
- Rouhani, M., Valizadeh, V., Molasalehi, S., & Norouzian, D. (2020). Production and expression optimization of heterologous serratiopeptidase. *Iranian Journal of Public Health*, 49(5), 931.
- Sharma, R., Chisti, Y. and Banerjee, U.C. (2001) Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases. *Biotechnology Advances*, 19, 627-662. -6
- Stevens, J., Wyatt, C., Brown, P., Patel, D., Grujic, D., & Freedman, S. D. (2018). Absorption and safety with sustained use of RELIZORB evaluation (ASSURE) study in patients with cystic fibrosis receiving enteral feeding. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 67(4), 527-532.
- Szarka, S. J., Sihota, E. G., Habibi, H. R., & Wong, S. L. (1999). Staphylokinase as a plasminogen activator component in recombinant fusion proteins. *Applied and environmental microbiology*, 65(2), 506-513.
- Taipa, M. Â., Fernandes, P., & de Carvalho, C. C. (2019). Production and purification of therapeutic enzymes. *Therapeutic Enzymes: Function and Clinical Implications*, 1-24.

- Tamimi, Z., Al Habashneh, R., Hamad, I., Al-Ghazawi, M., Roqa'a, A. A., & Kharashgeh, H. (2021). Efficacy of serratiopeptidase after impacted third molar surgery: a randomized controlled clinical trial. *BMC oral health*, 21, 1-9.
- Tan, L. T. H., Chan, C. K., Chan, K. G., Pusparajah, P., Khan, T. M., Ser, H. L., ... & Goh, B. H. (2019). *Streptomyces* sp. MUM256: A source for apoptosis inducing and cell cycle-arresting bioactive compounds against colon cancer cells. *Cancers*, 11(11), 1742.
- Tandon, S., Sharma, A., Singh, S., Sharma, S., & Sarma, S. J. (2021). Therapeutic enzymes: discoveries, production and applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 63, 102455.
- Tatta, E. R., Imchen, M., Moopantakath, J., & Kumavath, R. (2022). Bioprospecting of microbial enzymes: current trends in industry and healthcare. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(5), 1813-1835.
- Thomas, L., Larroche, C., & Pandey, A. (2013). Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 81, 146-161.
- Thumm, G., & Götz, F. (1997). Studies on polysostaphin processing and characterization of the lysostaphin immunity factor (Lif) of *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus*. *Molecular microbiology*, 23(6), 1251-1265.
- Tiwari, M. (2017). The role of serratiopeptidase in the resolution of inflammation. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 12(3), 209-215.
- Vachher, M., Sen, A., Kapila, R., & Nigam, A. (2021). Microbial therapeutic enzymes: A promising area of biopharmaceuticals. *Current Research in Biotechnology*, 3, 195-208.
- Vakili, B., Nezafat, N., Negahdaripour, M., Yari, M., Zare, B., & Ghasemi, Y. (2017). Staphylokinase enzyme: an overview of structure, function and engineered forms. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 18(13), 1026-1037.
- Vellard, M. (2003). The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. *Current opinion in biotechnology*, 14(4), 444-450.
- Vimal, A., & Kumar, A. (2017). In vitro screening and in silico validation revealed key microbes for higher production of significant therapeutic enzyme l-asparaginase. *Enzyme and Microbial Technology*, 98, 9-17.
- Wertheim, H. F., Melles, D. C., Vos, M. C., Van Leeuwen, W., Van Belkum, A., Verbrugh, H. A., & Nouwen, J. L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet infectious diseases*, 5(12), 751-762.
- Wu, H., Lu, H., Huang, J., Li, G., & Huang, Q. (2012). EnzyBase: a novel database for enzymatic studies. *Bmc Microbiology*, 12, 1-5.
- Wu, J. A., Kusuma, C., Mond, J. J., & Kokai-Kun, J. F. (2003). Lysostaphin disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on artificial surfaces. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(11), 3407-3414.
- Yadav, A. N., Kour, D., Sharma, S., Sachan, S. G., Singh, B., Chauhan, V. S., ... & Saxena, A. K. (2019). Psychrotrophic microbes: biodiversity, mechanisms of adaptation, and biotechnological implications in alleviation of cold stress in

- plants. Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable stress management: volume 1: rhizobacteria in abiotic stress management, 219-253.
- Yang, H., Li, J., Du, G., and Liu, L., Eds. (2017) . *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*. pp. 151–165, Academic Press Books.Elsevier.
- Yari, M., B. Ghoshoon, M., Vakili, B., & Ghasemi, Y. (2017). Therapeutic enzymes: applications and approaches to pharmacological improvement. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 18(7), 531-540.
- Yi, D., Bayer, T., Badenhorst, C. P., Wu, S., Doerr, M., Höhne, M., & Bornscheuer, U. T. (2021). Recent trends in biocatalysis. *Chemical Society Reviews*, 50(14), 8003-8049.
- Zhang, C., & Kim, S. K. (2010). Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects. *Marine drugs*, 8(6), 1920-1934.
- Zhou, C., Wang, Q., Jiang, J., & Gao, L. (2022). Nanozybiotics: Nanozyme-based antibacterials against bacterial resistance. *Antibiotics*, 11(3), 390.



## BÖLÜM 8

### SAĞLIK ALANINDA NANOZİM TEKNOLOJİLERİ

Dr. Öğr. Üyesi Selma SEZEN<sup>1</sup>

Arş. Gör. Feyza BURUL<sup>2</sup>

Bilim Uzmanı Yusuf GÜLŞAHİN<sup>3</sup>

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KARADAYI<sup>4</sup>

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.14565084>

---

<sup>1</sup> Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı, Ağrı, Türkiye. ssezen@agri.edu.tr, Orcid ID: 0000-0001-6575-6149

<sup>2</sup> Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı, Ağrı, Türkiye. fburul@agri.edu.tr, Orcid ID: 0009-0002-2193-1106

<sup>3</sup> Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Erzurum, Türkiye. yusufgulsahinn@gmail.com, Orcid ID: 0000-0002-3770-2116

<sup>4</sup> Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Erzurum, Türkiye. mkaradayi@atauni.edu.tr, Orcid ID: 0000-0002-2473-0409





## GİRİŞ

Enzimler, canlılarda yaşamsal faaliyetlerin gerçekleşmesi için gerekli olan kimyasal reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşüren makromoleküler biyokatalizörlerdir. Hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar dahil olmak üzere çeşitli canlılarda bulunan enzimler, organizmanın enerji üretimi, hücre yenilenmesi, çeşitli biyomoleküllerin sentez veya yıkımının yanı sıra hücre sel sinyal iletimi ve DNA onarımı gibi hayati süreçlerin düzenlenmesinde görev olarak homeostazın korunmasına aracılık etmektedir. Bununla birlikte, enzim seviyelerindeki değişiklikler bu enzimlerin birer biyobelirteç olarak kullanılmasını ve hastalıkların tanısında yer almasını sağlamaktadır. Birçok hastalığın enzim aktivitesindeki değişikliklerle ilişkili olması enzimleri potansiyel terapötik araçlar haline getirmektedir (Wu, Darland vd. 2021, Kuo, Huang vd. 2022, Lewis and Stone 2024).

Enzimlerin tedavide kullanılmaları için buldukları canlılardan izole edilerek saflaştırılmaları gerekir. Ancak doğal enzimlerin üretim prosedürleri karmaşık ve üretim maliyetleri de oldukça yüksektir. Ayrıca doğal enzimlerin stabiliteilerinin düşük olması, yüksek sıcaklık ve pH seviyelerinde kolayca denatüre olmaları gibi sınırlamaları da bulunmaktadır (Mou, Wu vd. 2022). Yapılan araştırmalarda, bazı nanomalzemelerin kendi biyoaktivitelerinin yanı sıra ilginç bir şekilde enzim benzeri aktivite de sergiledikleri gösterilmiştir. Bu nanomalzemeler arasında karbon veya metal bazlı nanopartiküller (NP) başta olmak üzere çeşitli polimerler, dendrimerler ve biyomoleküller bulunmaktadır. Özellikle metal NP'lerin, atomik yapısı sebebiyle reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu ve elektron transfer sürecini kolaylaştıran enzimatik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Wu, Darland vd. 2021). Demir (Fe), altın (Au) ve ferromanyetik NP'ler gibi çeşitli metal NP'ler, enzim benzeri aktivite gösterdiği belirlenen biyomalzemeler arasındadır. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NP'lerin peroksidaz (POD) aktivitesi, Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NP'lerin süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GPOx) aktivitesi göstermeleri sebebiyle doğal enzimlerin ve nanomalzemelerin özelliklerini birleştiren yeni bir yaklaşım geliştirilmiştir (Liang and Yan 2019, Wu, Wang vd. 2019, Kim, Hong vd. 2021). Au NP'lerin ribonükleaz benzeri aktivitesinin belirlenmesinin üzerine ise ilk defa nanozim terimi literatürde yer almış ve nanozimoloji alanında yapılan araştırmalar hız kazanmıştır (Manea, Houillon vd. 2004). Nanozimoloji, doğal enzimlerin yapı ve fonksiyonlarından yola çıkarak siklodekstrinler, porfirinler, polimerler, dendrimerler, çeşitli biyomoleküller ve

metal kompleksleri gibi biyomalzemelerin enzim benzeri aktivitelerini araştırmaktadır (Wu, Wang vd. 2019).

Nanozimler, enzim kaynaklı olmayan ancak enzimler gibi yüksek katalitik aktivite gösteren yapay enzimlerdir. Doğal antioksidan enzimlere benzer şekilde oksidatif ajanların yıkımını katalize edebilmekte, hidrolaz enzimlerine benzer şekilde protein ve ester bağlarını yıkabilmektedirler. Nanozim tasarımında üstün fizikokimyasal özellikleri sebebiyle diğer biyomalzemelere kıyasla NP'ler daha fazla tercih edilmektedir. NP'ler küçük boyutları ile hücreler arası matristen geçerek dokulara ulaşabilmekte ve buldukları yerde birikerek istenen terapötik konsantrasyonu sağlayabilmektedir. Bu durum, katalitik aktivitenin işlevsel bir şekilde sürdürülmesine olanak sağlamaktadır. Özellikle reaksiyonların devamı için metallerin birer kofaktör olarak kullanılması sebebiyle metal NP'lerin yüksek enzimatik aktivite gösterdiği bilinmektedir. Antioksidan bir enzim olan SOD'un aktif bölgesinde redüksiyon ve oksidasyon döngüsünü sağlayan bakır (Cu)-manganez (Mn) gibi redoks-aktif geçiş metalleri yer almaktadır. SOD benzeri aktivite gösteren birçok nanozimin yapısında da bu sebeple geçiş metalleri (Cu, Fe, Ce vb.) ve azot, oksijen, karbon ve kükürt gibi elementler kullanılmıştır (Kim, Hong vd. 2021, Yang, Yang vd. 2021, Thao, Do vd. 2023). Seryum (Ce) metali içeren nanozimler ile yapılan bir çalışmada nanozimlerin SOD benzeri aktivitesiyle süperoksit anyonlarını hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve KAT aktivitesi ile  $H_2O_2$ 'yi  $H_2O$  ve  $O_2$ 'ye dönüştürebildiği gösterilmiştir (Kim, Hong vd. 2021).

Doğal enzimler yüksek sıcaklık ve değişen pH seviyelerinde kolayca denatüre olabilen, stabilitesi düşük, kararsız protein yapılarıdır (Chen, Li vd. 2019). Nanozimler ise doğal enzim aktivitesine benzeyen birçok fonksiyonunun yanı sıra metal veya karbon gibi çeşitli materyallerden üretilmeleri sebebiyle geniş bir pH ve sıcaklık aralığında doğal enzimlere kıyasla daha kararlı bir yapı sergilemektedir. Ayrıca nanozimler üretimlerinden sonra düşük maliyetle uzun süre stabil koşullarda saklanabilmektedir (Liang and Yan 2019). Nanozimlerin tasarımı çeşitli substratlarla etkileşime girme yetenekleri sayesinde çoklu enzim aktivitesi sergilemelerine de olanak tanımaktadır. Ancak nanozimlerde çoklu enzim aktivitesi reaksiyon verimini artırmasına karşın, nanozimin katalitik özgülüğüyle birlikte substrat seçiciliğini düşürmekte ve hedeflenmeyen reaksiyonların katalizlenme riskini artırmaktadır. Bu durum nanozimlerin standart katalitik profillerinin belirlenmesini zorlaştırmaktadır. Biyolojik sistemde çeşitli ve çok sayıda doğal

enzim bulunmasına rağmen, nanozim türlerinin yalnızca oksidoredüktaz, hidrolaz gibi enzimlerle sınırlı kalması da önemli bir eksikliklerdir. Nanozim çeşitliliğinin artırılmasının yanı sıra stimulan ve inhibitörlerinin belirlenmesine yönelik yapılacak çalışmalar, nanozimlerin gelecekteki uygulamaları açısından kritik bir öneme sahiptir (Jiang, Ni vd. 2019).

Tasarım sırasında nanomalzeme bileşenlerinin üstün fiziko-kimyasal özelliklerinden yararlanılarak çok işlevli nanozimlerin geliştirilmesinin tedavide seçiciliği artıracığı belirtilmiştir (Wu, Wang vd. 2019). Ancak nanozim üretiminde kullanılan biyomalzemeler için potansiyel toksisite endişesi devam etmekle birlikte nanozimlerin farmakokinetik profillerinin anlaşılabilmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Zandieh and Liu 2024). Bu bölümde gelecekteki potansiyel kullanımlarına ilişkin araştırmaları hız kazanan nanozimlerin sınıflandırılması, etki mekanizmaları ve uygulama alanları değerlendirilmiştir.

### **Nanozimlerin Sınıflandırılması ve Etki Mekanizmaları**

Nanozimlerin farklı yapısal ve işlevsel özelliklerine göre sınıflandırılması, katalitik etkinlikleriyle birlikte kullanım alanlarının belirlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Nano boyutlarıyla doğal enzimlere benzer katalitik aktivite gösteren nanozimler, üretildikleri nanomateryalin cinsine ve fiziko-kimyasal özelliklerine göre metal oksit nanozimler, karbon bazlı nanozimler ve metal-organik kafes (MOF) nanozimler olmak üzere üç grupta incelenmektedir. En çok araştırılan nanozimler arasında metal oksit nanozimler yer almaktadır (Wu, Darland vd. 2021).

Metal oksit nanozimler, serbest radikalleri kullanarak oksidasyon-redüksiyon (redoks) tepkimelerini hızlandırabilen ve insan vücudunun fizyolojik koşullarında katalitik aktiviteyi sürdürebilen nano boyutlu metal oksit yapay enzimlerdir (Singh 2021). Metal iyonlarının değişken valans değerleri, redoks süreçlerinde etkin rol oynamalarını sağlar. CuO nanozimi,  $Cu^{2+}/Cu^{+}$  çiftleri aracılığıyla elektron transferini gerçekleştirerek oksijen indirgenmesi gibi redoks reaksiyonlarını katalize eder (Xu, Huang vd. 2023). Bu mekanizma, metal oksit nanozimlerin çeşitli biyokimyasal reaksiyonlarda katalizör olarak işlev görmesini sağlamaktadır. CuO gibi diğer metal oksit NP'ler de (çinko oksit-ZnO, FeO, vanadyum oksit- $V_2O_5$ , grafen oksit-GO,  $CeO_2$ ) katalitik aktivitelerinin yanı sıra antioksidan, antimikrobiyal etkileri sebebiyle biyomedikal uygulamalarda büyük ilgi görmektedir (Kim, Hong vd. 2021). Bu bağlamda metal oksit nanozimlerin biyokimyasal süreçlerin önemli

rol oynadığı tümör tedavisinde radyoterapiyi güçlendirmenin yanı sıra bakteriyel enfeksiyon hastalıkları ve ROS ile ilişkili hastalıklarda da etki gösterdiği raporlanmıştır (Kim, Hong vd. 2021, Zhang, Chen vd. 2021). Ayrıca nanozimlerin biyosensörler ve ilaç taşıyıcı sistemler gibi çeşitli biyomedikal uygulamalarda da potansiyel kullanım alanlarına sahip olduğu bildirilmiştir (Zhang, Chen vd. 2021, Ren, Chen vd. 2022, Ghazzy, Nsairat vd. 2024).

Hastalıkların oluşumunda vücuttaki metabolik olayları katalizleyen doğal enzimlerin aktivitelerindeki değişimler önemli bir rol oynamaktadır (Lewis and Stone 2024). Metaller/ metal oksitler, redoks tepkimelerine katılırken vücuttaki fizyolojik ortamda bulunan  $H_2O_2$  gibi çeşitli oksijen kaynaklarını substrat olarak kullanırlar.  $H_2O_2$  fizyolojik koşullarda hücre morfolojisi, çoğalması, sinyalleme ve apoptoz dahil birçok biyolojik süreçte yer almaktadır. Canlı hücrelerin metabolik süreçleri sonucunda  $H_2O_2$  gibi düşük konsantrasyonlarda üretilen diğer endojen ROS'lar da fizyolojik sinyal iletiminde haberci olarak önemli işlevlere sahiptir. Ancak oksidatif stresi düzenleyen SOD, KAT, POD enzimlerinin aktivitelerindeki değişimlerin yol açtığı yüksek ROS konsantrasyonları DNA ve RNA'ya zarar vererek hücre ölümüne neden olabilmektedir. Yüksek  $H_2O_2$  konsantrasyonu, oksidatif stres ve antioksidan kapasite arasındaki dengenin bozulmasına yol açarak ROS ilişkili hastalıkların patogenezinde rol oynamaktadır (Glorieux and Calderon 2017, Wu, Darland vd. 2021).

Oksidazlar, elektron transferi aracılığıyla ROS oluşumunu artıran enzimlerdir. POD benzeri aktivite gösteren nanozimler de oksidazlar gibi elektron alıcısı olarak hareket ederler. Oksidoredüktaz enzimlerinden KAT, çeşitli metabolik reaksiyonlar sonucunda oluşan reaktif  $H_2O_2$ 'nin moleküler oksijen ve suya ayrıştırılmasından sorumludur. POD ve KAT enzimlerinin her ikisinin de aktif bölgesinde kofaktör olarak bir porfirin hemi bulunmaktadır. Substrat olarak  $H_2O_2$  kullanan bu iki enzim aynı zamanda serbest radikal ve oksijen oluşturarak aerobik solunum yapan canlılarda hücrel oksidatif hasarı önlemede önemli bir rol oynamaktadırlar (Yang, Yang vd. 2021, Ghazzy, Nsairat vd. 2024). SOD ise,  $HOO\cdot$  ve  $O_2^-$  dahil olmak üzere hücrelerde dağınık halde bulunan yıkıcı süperoksit anyonları  $H_2O_2$  ve  $O_2$  formlarına dönüştürerek toksik radikallerin serbestliğini azaltan antioksidan bir enzimdir (Glorieux and Calderon 2017, Yang, Yang vd. 2021). Bu bağlamda ROS seviyelerini düzenleyen POD, oksidaz, SOD ve KAT enzimlerinin aktivitesinin düzenlenmesi, ROS ilişkili hastalıklarda önemli bir tedavi hedefi olarak değerlendirilmiştir (Fan, Xi vd. 2018, Wang, Yu vd. 2020).

Doğal enzimlere çeşitli üstünlükleri bulunan nanozimlerin tasarlanabilir yapıları, doğal enzim benzeri aktivitelerinin geliştirilerek hedeflenen hastalığa özgü tedavi etkinliğinin artırılmasını sağlamaktadır. Özellikle kompleks metabolik süreçleri yöneten enzimlerin kritik rol oynadığı kanser gibi hastalıklarda nanozimlerin etkisi ön plana çıkmaktadır (Ren, Deng vd. 2020). Bu mekanizmadan hareketle SOD, POD, KAT, GPx ve oksidaz aktivitelerine sahip nanozimlerin tümörlerdeki oksidatif stresi artırarak redoks reaksiyonlarını başlatma yetenekleriyle malign tümörlerin gelişimini yavaşlattığı bildirilmiştir. Cu ve Fe bimetalik kombinasyonundan oluşan  $CuFe_2O_4$  nanozimleri ile yapılan bir çalışmada POD, KAT ve GPx benzeri aktivite sayesinde  $CuFe_2O_4$  aracılığıyla  $H_2O_2$  ayrıştırılarak tümör bölgesinde  $O_2$  üretimi sağlanmıştır. Böylece glutatyon (GSH) seviyelerinin azalmasıyla antioksidan kapasite baskılanmış ve tümör mikroçevresinde ROS artmıştır. ROS birikimi, kanserli hücrelerde artan oksidatif stres üzerinden ölüme yol açmıştır (Li, Ding vd. 2022). Metal oksit nanozimlerin etkisi kanserin yanı sıra farklı metabolik hastalıklarda da araştırılmıştır. İnflamatuvar bağırsak hastalığının tanısı sırasında gastrointestinal sistemin görüntülenmesi için bilgisayarlı tomografi kontrast maddesi olarak farelerde dekstran kaplı  $CeO_2$  nanozimlerinin oral kullanılabilmesi gösterilmiştir. Ayrıca, bu nanozimlerin farelerde ROS ve proinflamatuvar sitokin seviyelerini azaltarak inflamatuvar bağırsak hastalığında antiinflamatuvar etki sergilediği raporlanmıştır. Nanozimlerin bu aktivitesi SOD ve KAT benzeri aktiviteleriyle ilişkilendirilmiştir (Cao, Cheng vd. 2023).

Doğal enzimlerde olduğu gibi metal oksit nanozimlerin kataliz derecesi, ürettikleri nanomalzemenin fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak değişmektedir. Yapay metal ve metal oksit nanozimlerinin parçacık boyutu küçüldükçe yüzey alanı/hacim oranı artmaktadır. Bu durumun metal oksit nanozimlerin substratlarıyla etkileşiminde daha yüksek bir katalitik aktivite sergilemesine katkı sağladığı düşünülmektedir (Chen, Li vd. 2019). Küçük boyutlu NP'lerin büyük boyutlu NP'lere kıyasla daha yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahip olması, NP'lerin özgül yüzey alanlarını artırarak yüzey enerjisinde değişikliklere yol açmaktadır. Böylece küçük boyutlu NP'ler, büyük boyutlu NP'lere kıyasla daha fazla aktivite göstermektedir. Nanozimlerin aktivitelerindeki farklılıkların atomların konformasyonlarıyla da ilişkili olduğu bildirilmiştir. Farklı boyut veya morfolojideki NP'lerin yüzeyine substratın erişim oranı da değişeceğinden, bu durumun aktiviteyi etkilediği bilinmektedir (Kim, Hong vd. 2021).  $Fe_3O_4$  metal nanozimleri ile yapılan bir

çalışmada nanozimlerin üçgen, oktahedral ve küresel yapılarının katalitik aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Yüksek yüzey enerjisine bağlı olarak en yüksek katalitik aktivite küresel yapıda tespit edilmiştir. Küresel yapı nanozimlerden sonra sırasıyla en yüksek katalitik aktiviteyi üçgen ve oktahedral yapı nanozimler göstermiş, çalışmada nanozimlerin kristal yapısının katalitik aktiviteyi belirleyen önemli bir özellik olduğu bildirilmiştir (Liu vd., 2011). Morfolojinin yanı sıra nanozimlerin üretiminde kullanılan maddenin kimyasal yapısı ve nanozimin kaplamasının katalitik aktiviteyi değiştirdiği tespit edilmiştir. DNA ile kaplı  $Fe_3O_4$  NP'lerin, kaplama yapılmayan NP'lere göre daha yüksek POD aktivitesi gösterdiği kaydedilmiştir. Artan katalitik aktivite, uzun DNA zincirleri ve diğer nükleotidlere kıyasla sitozindeki artışa bağlı olarak  $Fe_3O_4$  NP'lerinin daha kararlı bir yapıya ulaşmasıyla ilişkilendirilmiştir (Liu and Liu 2015). Ayrıca doğal enzimlere kıyasla nanozimler geniş bir sıcaklık ve pH aralığında çok daha iyi bir termal iletkenlik ve ışık absorpsiyonu göstermektedir. Özellikle  $Fe_3O_4$  nanozimleri, asidik koşullarda (pH 3.6) POD aktivitesi sergilerken, nötr veya alkali koşullarda (pH  $\geq$  7) KAT benzeri aktivite göstermiştir (Fan, Wang vd. 2016, Chen, Li vd. 2019).

Farklı fizikokimyasal özelliklerde farklı karakterler sergileyen metal oksit nanozimlerin bu özelliklerinden hareketle çeşitli yüzey modifikasyonları gerçekleştirilmektedir. Yüzey modifikasyonları, kullanılan nanomalzemenin yüzey yükü ve kararlılığını güçlendirmekle birlikte, sonraki biyokimyasal süreçler için fonksiyonel grupların işlevsel kalmasını sağlamaktadır. Böylece nanozimlerin katalitik özellikleri, kaplama tabakasının kalınlığı ve modifiye edilmiş aktif bölgelerin yoğunluğu gibi modifikasyon koşullarının kontrolüyle değiştirilebilmektedir (Dong, Zhuang vd. 2018).  $Fe_3O_4$  NP'lerinin POD benzeri aktivitesinin, yüzeylerine spesifik fonksiyonel gruplar eklenerek önemli ölçüde artırılabilceği gösterilmiştir. Dekstranla yüzey modifikasyonu yapılan  $Fe_3O_4$  nanozimlerinin aktivitesi kaplama yapılmayan  $Fe_3O_4$  nanozimlerin aktivitesine kıyasla daha yüksek bulunmuşken, kaplama ajanı olarak polietilen glikol kullanıldığında bu aktivitenin azaldığı tespit edilmiştir (Gao, Zhuang vd. 2007). Başka bir çalışmada negatif yüzey yüklü heparinle kaplanan Fe NP'lerinin POD aktivitesi, 3, 3', 5, 5'-Tetrametilbenzidin (TMB) substratına karşı pozitif yüklü etilenimin kaplamasına kıyasla 5,9 kat daha yüksek bulunmuştur. Ancak substrat 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) olduğunda, ilginç bir şekilde pozitif yüzey yüküne sahip nanozimlerin katalitik aktivitesi 11,5 kat artmıştır. Bu durum yüzey modifikasyonunun nanozim aktivitesi

üzerindeki etkisinin karmaşık olmasıyla ilişkilendirilmiştir (Gao, Fan vd. 2017).

Metal oksit nanozimlere ek olarak nanozimler grafen, elmas, fulleren, amorf karbon ve karbon nanotüpler gibi farklı özelliklere sahip karbon allotroplarından da üretilmektedir. Bu yapılardan elmas hariç diğer türevlerin POD, KAT ve SOD enzim benzeri aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir. Enzim benzeri aktiviterler karbon atomlarının yüzey grupları ve üstün elektronik özellikleriyle ilişkilendirilmiştir (Sun, Xu vd. 2023). Bununla birlikte çeşitli çalışmalarda karbon türevlerinin yapısal özellikleri sebebiyle antioksidan ve antibakteriyel etkiler de gösterdiği belirlenmiştir (Mu, He vd. 2019, Xu, Wang vd. 2019). Katalitik verimliliklerinin yüksek olması, düşük toksisiteleri, fizyolojik mikroçevreye tepki verebilmeleri, büyük ölçekte ve kolaylıkla üretilibilmeleri, tüm bunlara ek olarak stabiliteilerinin yüksek olması gibi avantajları sebebiyle grafen kuantum noktaları (GQD) başta olmak üzere diğer karbon türevleri de katalitik tedavilerde tercih edilmiştir (Wang, Yu vd. 2020, Sun, Xu vd. 2023). 100 nm'den küçük boyutta bir veya birkaç grafen katmanından oluşan GQD'nin yapısında bulunan hidroksil (C-OH), karbonil (C=O) ve karboksil (COOH) gibi çeşitli oksijenli gruplar, katalitik aktivitede rol oynamaktadır. Bununla birlikte GQD gibi karbon kaynaklı materyaller, tedavi ajanının kimyasal yapısına benzer morfolojide üretilme avantajına sahiptir. Böylece yapı-aktivite ilişkisinden hareketle yüksek aktiviteli ajanlar elde edilebilmektedir. Yapılan bir çalışmada böbreklerde ROS birikimine bağlı gelişen akut böbrek hastalığının tedavisinde etkileri incelenmek üzere, fenolik antioksidanların yapısına benzer morfolojide GQD'ler üretilmiştir. Akut böbrek hastalığı modeli indüklenen farelerde GQD fenol benzeri aktif gruplarının yüksek *in vivo* antioksidan aktivite gösterdiği raporlanmıştır (Wang, Yu vd. 2020).

Nanozim sınıfının bir diğer grubu, metal iyonlar ve organik ligandlar arasındaki güçlü etkileşimler aracılığıyla kafes benzeri yapılar oluşturan MOF nanozimlerdir. Bu nanozimlerdeki metal bileşenler, katalitik aktivitenin sağlanmasında temel rol oynarken, organik ligandlar ise substrattan elektron alarak başka bir substrata elektron iletimini mümkün kılmaktadır. Böylece MOF nanozimler oksidaz, POD ve SOD benzeri aktiviterler göstermektedir (Niu, Li vd. 2020). Mezogözenekli yapıya sahip MOF nanozimler, substratla temas yüzeyini artırarak katalitik aktiviteyi yükseltme potansiyeline sahiptir (Wang, Jana vd. 2020). Bununla birlikte MOF nanozimlerin yüksek özgül



yüzey alanına sahip olmaları ve biyoyumluluk göstermeleri gibi avantajları da bulunmaktadır (Li, Chai vd. 2024).

Yapılan bir çalışmada vanadyum (V) metali ve 1,4-benzenedikarboksilik asit (BDC) ligandından MOF'lar üretilmiştir. Elde edilen yapıların sitotoksikite deneylerinde MOF'ların biyoyumlu oldukları tespit edilmiştir. MIL-47(V) adı verilen MOF'ların kulak enfeksiyonu ve kolit gibi inflamatuvar hastalıklarda güçlü GPx benzeri aktivite ile ROS üzerinden inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (Wu, Yu vd. 2021).  $Fe^{3+}$  ve 2-aminotereftalik asitten oluşan bir diğer MOF türü ise POD benzeri aktivitesi ile glutamat tespit eden biyosensörde başarıyla uygulanmıştır (Hu, Li vd. 2022). Tanı ve tedavi amacıyla çeşitli biyomedikal alanlarda kullanılan MOF'lar, yenilikçi çözümler sunmaktadır. Umut vadeden sonuçlara rağmen MOF nanozimlerin sulu ortamdaki kararlılıklarının düşük olması ve substrat özgüllüklerinin sınırlı kalması, geliştirilmesi gereken başlıca zayıf yönleri arasında bulunmaktadır (Niu, Li vd. 2020). MOF'larda kararlılığı artırmak, substrat seçiciliğini geliştirmek amacıyla çeşitli modifikasyonlar ve yüzey mühendisliği teknikleri de önemli stratejiler olarak öne çıkmaktadır. MOF nanozimlerin potansiyel kullanımına yönelik araştırmalar hız kesmeden devam etmektedir (Chen, Qin vd. 2024).

## Nanozimlerin Uygulama Alanları

Nanozimler yüksek katalitik aktiviteleri, biyoyumlulukları, kararlılıkları ve maliyet etkinliklerinin uygun olması gibi üstünlükleri sebebiyle tıbbi, endüstriyel, teknolojik ve biyolojik alanlarda geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir (Jeyachandran, Srinivasan vd. 2023). Floresans, kolorimetri ve immünojenik analiz gibi çeşitli tespit yöntemlerinde nanozimlerin sinyal amplifikatörleri olarak kullanımı, biyosensör ve cihaz geliştirme alanında geniş bir uygulama potansiyeli sunmaktadır (Wu, Darland vd. 2021). Nano iskelet yapılarına glukoz oksidaz (GOx) enziminin entegre edilmesiyle oluşturulan nanozim cihazı aracılığıyla canlı hayvanların beyinlerinde glikoz düzeylerinin zamana bağlı değişiminin başarıyla ölçüldüğü bildirilmiştir. Cihazdaki nano iskelet katalitik aktivitenin artmasını sağlarken GOx enzimi, glikozu glukonik aside ve  $H_2O_2$ 'ye dönüştürerek ikinci katalitik merkezde hassas biyokimyasal ölçümün yapılmasına olanak sağlamıştır. Böylece nano boyuttaki yapay enzim teknolojisi, nörolojik araştırma ve metabolik hastalıkların takibinde yeni kapılar açmıştır (Cheng, Zhang vd. 2016). Elektrokimya ve biyoteknolojinin yanı sıra vücutta katalitik aktivite

gösteren nanozimler kanser, diyabet, enfeksiyon, nörodejeneratif hastalıklar ve çeşitli diğer hastalıkların görüntüleme ve tedavisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır (Kim, Hong vd. 2021). Araştırmaları henüz devam eden bazı nanozim türleri, tedavi hedefleri, terapötik etki mekanizmaları ve ilgili referanslar Tablo 1’de derlenmiştir (Tablo 1).

**Tablo 1.** Nanozimlerin uygulama alanları ve terapötik mekanizmaları

Nanozim Türü	Tedavi Hedefleri	Terapötik Etki Mekanizması	Referans
GQD Nanozimler	Akut Böbrek Hasarı	Oksidatif stres hasarının azaltılması	(Wang, Yu vd. 2020)
ZnO Grafidin Nanozimler	Kontamine Yara	POD benzeri aktivite	(Bai, Zhang vd. 2022)
CeO Nanozimler	Akut İnflamasyon	SOD ve KAT benzeri aktivite	(Kim, Hong vd. 2021)
Polidopamin/Rutenyum Nanozimleri	Alzheimer Hastalığı	KAT benzeri aktivite	(Liu, Chen vd. 2023)
MnO <sub>2</sub> Nanozimler	Meme Kanseri	KAT benzeri aktivite	(Fan, Bu vd. 2015)
CuZn -QD	İskemi-Reperfüzyon Hasarı	SOD ve KAT benzeri aktivite	(Xue, Zhang vd. 2021)
ACPCAH Nanozimler	Diyabetik ayak yarası	SOD, KAT, POD, NOS, GOx benzeri aktivite	(Shang, Yu vd. 2023)
Platin-NP Nanozimleri	Epitelial Akciğer Kanseri	SOD, GPx ve KAT benzeri aktivite	(Ismail, Lee vd. 2022)
Azotlu Karbon Nanozim	Kolon Kanseri	SOD, KAT, POD, Oksidaz benzeri aktivite	(Fan, Xi vd. 2018)
Platin Nanozimler	Hipertürisemi	KAT benzeri aktivite	(Liu, Zhang vd. 2016)
Au Nanozimler	Karaciğer Kanseri	GPx benzeri aktivite	(Gong, Ma vd. 2019)
İridyum Oksit Nanozimler	Meme Kanseri	KAT benzeri aktivite	(Xu, Wang vd. 2020)
Karbon Nanotüp Nanozimler	Kryoproteksiyon	POD, KAT, GSH benzeri aktivite	(Ren, Deng vd. 2020)

ACPCAH: Hyaluronik asit kapsüllenmiş l-arginin ve ultra küçük Au P’leri ve Cu<sub>1,6</sub>O NP’leri eş yüklü fosfor katkılı grafit karbon nitrür nanotabakaları, GOx: Glukoz oksidaz

## KAYNAKÇA

- Bai, Q., J. Zhang, Y. Yu, C. Zhang, Y. Jiang, D. Yang, M. Liu, L. Wang, F. Du, N. Sui and Z. Zhu (2022). "Piezoelectric activatable nanozyme-based skin patch for rapid wound disinfection." *ACS Appl Mater Interfaces*.
- Cao, Y., K. Cheng, M. Yang, Z. Deng, Y. Ma, X. Yan, Y. Zhang, Z. Jia, J. Wang, K. Tu, J. Liang and M. Zhang (2023). "Orally administration of cerium oxide nanozyme for computed tomography imaging and anti-inflammatory/anti-fibrotic therapy of inflammatory bowel disease." *Journal of Nanobiotechnology* 21(1): 21.
- Chen, M., Y. Qin, Y. Peng, R. Mai, H. Teng, Z. Qi and J. Mo (2024). "Advancing stroke therapy: The potential of MOF-based nanozymes in biomedical applications." *Front Bioeng Biotechnol* 12: 1363227.
- Chen, W., S. Li, J. Wang, K. Sun and Y. Si (2019). "Metal and metal-oxide nanozymes: Bioenzymatic characteristics, catalytic mechanism, and eco-environmental applications." *Nanoscale* 11(34): 15783-15793.
- Cheng, H., L. Zhang, J. He, W. Guo, Z. Zhou, X. Zhang, S. Nie and H. Wei (2016). "Integrated nanozymes with nanoscale proximity for *in vivo* neurochemical monitoring in living brains." *Anal Chem* 88(10): 5489-5497.
- Dong, W., Y. Zhuang, S. Li, X. Zhang, H. Chai and Y. Huang (2018). "High peroxidase-like activity of metallic cobalt nanoparticles encapsulated in metal-organic frameworks derived carbon for biosensing." *Sensors and Actuators B: Chemical* 255: 2050-2057.
- Fan, K., H. Wang, J. Xi, Q. Liu, X. Meng, D. Duan, L. Gao and X. Yan (2016). "Optimization of Fe(3)O(4) nanozyme activity via single amino acid modification mimicking an enzyme active site." *Chem Commun (Camb)* 53(2): 424-427.
- Fan, K., J. Xi, L. Fan, P. Wang, C. Zhu, Y. Tang, X. Xu, M. Liang, B. Jiang, X. Yan and L. Gao (2018). "*In vivo* guiding nitrogen-doped carbon nanozyme for tumor catalytic therapy." *Nat Commun* 9(1): 1440.
- Fan, W., W. Bu, B. Shen, Q. He, Z. Cui, Y. Liu, X. Zheng, K. Zhao and J. Shi (2015). "Intelligent MnO<sub>2</sub> nanosheets anchored with upconversion nanoprobe for concurrent pH-/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-responsive ucl imaging and oxygen-elevated synergetic therapy." *Adv Mater* 27(28): 4155-4161.
- Gao, L., J. Zhuang, L. Nie, J. Zhang, Y. Zhang, N. Gu, T. Wang, J. Feng, D. Yang, S. Perrett and X. Yan (2007). "Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles." *Nat Nanotechnol* 2(9): 577-583.
- Gao, L., K. Fan and X. Yan (2017). "Iron oxide nanozyme: A multifunctional enzyme mimetic for biomedical applications." *Theranostics* 7(13): 3207-3227.
- Ghazzy, A., H. Nsairat, R. Said, O. A. Sibai, A. AbuRuman, A. S. Shraim and A. Al Hunaiti (2024). "Magnetic iron oxide-based nanozymes: From synthesis to application." *Nanoscale Adv* 6(6): 1611-1642.
- Glorieux, C. and P. B. Calderon (2017). "Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach." *Biol Chem* 398(10): 1095-1108.
- Gong, N., X. Ma, X. Ye, Q. Zhou, X. Chen, X. Tan, S. Yao, S. Huo, T. Zhang, S. Chen, X. Teng, X. Hu, J. Yu, Y. Gan, H. Jiang, J. Li and X. J. Liang (2019). "Carbon-

- dot-supported atomically dispersed gold as a mitochondrial oxidative stress amplifier for cancer treatment." *Nat Nanotechnol* 14(4): 379-387.
- Hu, H., P. Li, Z. Wang, Y. Du, G. Kuang, Y. Feng, S. Jia and J. Cui (2022). "Glutamate oxidase-integrated biomimetic metal-organic framework hybrids as cascade nanozymes for ultrasensitive glutamate detection." *J Agric Food Chem* 70(12): 3785-3794.
- Ismail, N. A. S., J. X. Lee and F. Yusof (2022). "Platinum nanoparticles: The potential antioxidant in the human lung cancer cells." *Antioxidants (Basel)* 11(5).
- Jeyachandran, S., R. Srinivasan, T. Ramesh, A. Parivallal, J. Lee and E. Sathiyamoorthi (2023). "Recent development and application of "nanozyme" artificial enzymes- a review." *Biomimetics (Basel)* 8(5).
- Jiang, D., D. Ni, Z. T. Rosenkrans, P. Huang, X. Yan and W. Cai (2019). "Nanozyme: New horizons for responsive biomedical applications." *Chem Soc Rev* 48(14): 3683-3704.
- Kim, J., G. Hong, L. Mazaleuskaya, J. C. Hsu, D. N. Rosario-Berrios, T. Grosser, P. F. Cho-Park and D. P. Cormode (2021). "Ultrasmall antioxidant cerium oxide nanoparticles for regulation of acute inflammation." *ACS Appl Mater Interfaces* 13(51): 60852-60864.
- Kuo, C.-H., C.-Y. Huang, C.-J. Shieh and C.-D. Dong (2022). "Enzymes and biocatalysis." *Catalysts* 12(9): 993.
- Lewis, T. and W. L. Stone (2024). *Biochemistry, proteins enzymes*. StatPearls. Treasure Island (FL).
- Li, S., H. Ding, J. Chang, S. Dong, B. Shao, Y. Dong, S. Gai, F. He and P. Yang (2022). "Bimetallic oxide nanozyme-mediated depletion of glutathione to boost oxidative stress for combined nanocatalytic therapy." *J Colloid Interface Sci* 623: 787-798.
- Li, Y., H. Chai, Z. Yuan, C. Huang, S. Wang, Y. Sun, X. Zhang and G. Zhang (2024). "Metal-organic framework-engineered enzyme/nanozyme composites: Preparation, functionality, and sensing mechanisms." *Chemical Engineering Journal* 496: 153884.
- Liang, M. and X. Yan (2019). "Nanozymes: From new concepts, mechanisms, and standards to applications." *Acc Chem Res* 52(8): 2190-2200.
- Liu, B. and J. Liu (2015). "Accelerating peroxidase mimicking nanozymes using DNA." *Nanoscale* 7(33): 13831-13835.
- Liu, X., Z. Zhang, Y. Zhang, Y. Guan, Z. Liu, J. Ren and X. Qu (2016). "Artificial metalloenzyme-based enzyme replacement therapy for the treatment of hyperuricemia." *Advanced Functional Materials* 26(43): 7921-7928.
- Liu, Y., Y. Chen, Y. Gong, H. Yang and J. Liu (2023). "Polydopamine/ruthenium nanoparticle systems as photothermal therapy reagents and reactive oxygen species scavengers for Alzheimer's disease treatment." *ACS Applied Nano Materials* 6(7): 5384-5393.
- Manea, F., F. B. Houillon, L. Pasquato and P. Scrimin (2004). "Nanozymes: Gold-nanoparticle-based transphosphorylation catalysts." *Angew Chem Int Ed Engl* 43(45): 6165-6169.
- Mou, X., Q. Wu, Z. Zhang, Y. Liu, J. Zhang, C. Zhang, X. Chen, K. Fan and H. Liu (2022). "Nanozymes for regenerative medicine." *Small Methods* 6(11): e2200997.

- Mu, X., H. He, J. Wang, W. Long, Q. Li, H. Liu, Y. Gao, L. Ouyang, Q. Ren, S. Sun, J. Wang, J. Yang, Q. Liu, Y. Sun, C. Liu, X. D. Zhang and W. Hu (2019). "Carbogenic nanozyme with ultrahigh reactive nitrogen species selectivity for traumatic brain injury." *Nano Lett* 19(7): 4527-4534.
- Niu, X., X. Li, Z. Lyu, J. Pan, S. Ding, X. Ruan, W. Zhu, D. Du and Y. Lin (2020). "Metal-organic framework based nanozymes: Promising materials for biochemical analysis." *Chem Commun (Camb)* 56(77): 11338-11353.
- Ren, L., S. Deng, Y. Chu, Y. Zhang, H. Zhao, H. Chen and D. Zhang (2020). "Single-wall carbon nanotubes improve cell survival rate and reduce oxidative injury in cryopreservation of *Agapanthus praecox* embryogenic callus." *Plant Methods* 16: 130.
- Ren, X., D. Chen, Y. Wang, H. Li, Y. Zhang, H. Chen, X. Li and M. Huo (2022). "Nanozymes-recent development and biomedical applications." *J Nanobiotechnology* 20(1): 92.
- Shang, L., Y. Yu, Y. Jiang, X. Liu, N. Sui, D. Yang and Z. Zhu (2023). "Ultrasound-augmented multienzyme-like nanozyme hydrogel spray for promoting diabetic wound healing." *ACS Nano* 17(16): 15962-15977.
- Singh, N. (2021). "Antioxidant metal oxide nanozymes: Role in cellular redox homeostasis and therapeutics." *Pure and Applied Chemistry* 93(2): 187-205.
- Sun, Y., B. Xu, X. Pan, H. Wang, Q. Wu, S. Li, B. Jiang and H. Liu (2023). "Carbon-based nanozymes: Design, catalytic mechanism, and bioapplication." *Coordination Chemistry Reviews* 475: 214896.
- Thao, N. T. M., H. D. K. Do, N. N. Nam, N. K. S. Tran, T. T. Dan and K. T. L. Trinh (2023). "Antioxidant nanozymes: Mechanisms, activity manipulation, and applications." *Micromachines (Basel)* 14(5).
- Wang, D., D. Jana and Y. Zhao (2020). "Metal-organic framework derived nanozymes in biomedicine." *Accounts of Chemical Research* 53(7): 1389-1400.
- Wang, H., D. Yu, J. Fang, Y. Zhou, D. Li, Z. Liu, J. Ren and X. Qu (2020). "Phenol-like group functionalized graphene quantum dots structurally mimicking natural antioxidants for highly efficient acute kidney injury treatment." *Chem Sci* 11(47): 12721-12730.
- Wu, J., X. Wang, Q. Wang, Z. Lou, S. Li, Y. Zhu, L. Qin and H. Wei (2019). "Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): Next-generation artificial enzymes (II)." *Chem Soc Rev* 48(4): 1004-1076.
- Wu, J., Y. Yu, Y. Cheng, C. Cheng, Y. Zhang, B. Jiang, X. Zhao, L. Miao and H. Wei (2021). "Ligand-dependent activity engineering of glutathione peroxidase-mimicking mil-47(v) metal-organic framework nanozyme for therapy." *Angew Chem Int Ed Engl* 60(3): 1227-1234.
- Wu, Y., D. C. Darland and J. X. Zhao (2021). "Nanozymes-hitting the biosensing "target"." *Sensors (Basel)* 21(15).
- Xu, B., H. Wang, W. Wang, L. Gao, S. Li, X. Pan, H. Wang, H. Yang, X. Meng, Q. Wu, L. Zheng, S. Chen, X. Shi, K. Fan, X. Yan and H. Liu (2019). "A single-atom nanozyme for wound disinfection applications." *Angew Chem Int Ed Engl* 58(15): 4911-4916.
- Xu, G., J. Huang, X. Li, Q. Chen, Y. Xie, Z. Liu, K. Kajiyoshi, L. Wu, L. Cao and L. Feng (2023). "Heterostructured Cu/CuO nanoparticles embedded within N-doped carbon nanosheets for efficient oxygen reduction reaction." *Catalysts* 13(2): 255.

- Xu, P., X. Wang, T. Li, H. Wu, L. Li, Z. Chen, L. Zhang, Z. Guo and Q. Chen (2020). "Biom mineralization-inspired nanozyme for single-wavelength laser activated photothermal-photodynamic synergistic treatment against hypoxic tumors." *Nanoscale* 12(6): 4051-4060.
- Xue, S., T. Zhang, X. Wang, Q. Zhang, S. Huang, L. Zhang, L. Zhang, W. Zhu, Y. Wang, M. Wu, Q. Zhao, P. Li and W. Wu (2021). "Cu,Zn dopants boost electron transfer of carbon dots for antioxidation." *Small* 17(31): e2102178.
- Yang, W., X. Yang, L. Zhu, H. Chu, X. Li and W. Xu (2021). "Nanozymes: Activity origin, catalytic mechanism, and biological application." *Coordination Chemistry Reviews* 448: 214170.
- Zandieh, M. and J. Liu (2024). "Nanozymes: Definition, activity, and mechanisms." *Adv Mater* 36(10): e2211041.
- Zhang, R., L. Chen, Q. Liang, J. Xi, H. Zhao, Y. Jin, X. Gao, X. Yan, L. Gao and K. Fan (2021). "Unveiling the active sites on ferrihydrite with apparent catalase-like activity for potentiating radiotherapy." *Nano Today* 41: 101317.



## **BÖLÜM 9**

### **ENDÜSTRİYEL BİYOTEKNOLOJİDE KULLANILAN ANAHTAR ENZİMLER: LAKTAZ, LİPAZ, A-AMİLAZ VE GLUKOZ İZOMERAZIN UYGULAMALARI VE İLERİ ARAŞTIRMALARI**

Arş. Gör. Sena Nur BAŞARAN<sup>1</sup>

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.14565080>

---

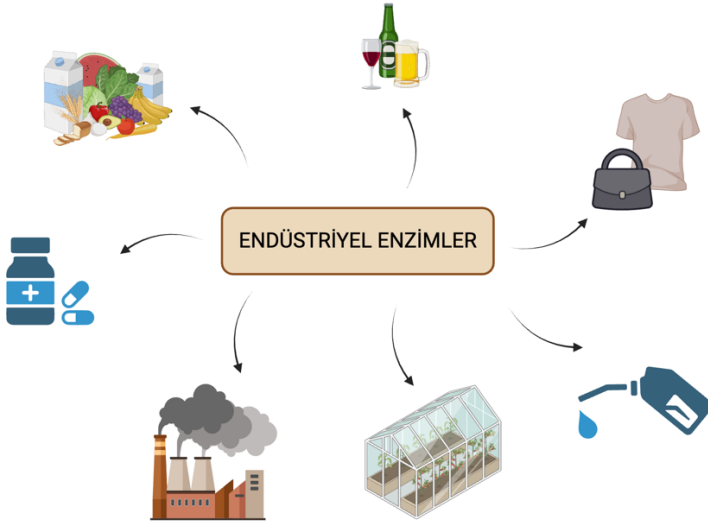
<sup>1</sup> Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, Ağrı, Türkiye ORCID: 0000-0002-9959-9214, E-mail: snbasaran@agri.edu.tr





## Endüstriyel Biyoteknolojide Kullanılan Enzimlerin Rolü

Endüstriyel biyoteknolojide kullanılan enzimler, çeşitli biyokimyasal süreçleri hızlandırarak, endüstriyel üretim süreçlerinin etkinliğini ve verimliliğini artırmaktadır. Enzimler, spesifik biyokimyasal reaksiyonları katalize eden protein molekülleri olup, endüstriyel süreçlerde, ürünlerin kalitesini iyileştirme, maliyetleri düşürme ve çevresel etkileri azaltma gibi pek çok avantaj sunar. Biyoteknoloji, enzimlerin geleneksel kullanımını devrim niteliğinde değiştirmiştir. Laktaz, lipaz,  $\alpha$ -amilaz ve glukoz izomeraz gibi enzimler, bu bağlamda önemli rol oynar ve bu enzimler gıda, içecek, kişisel ve ev bakımı, tarım, biyoenerji, tekstil, farmasötiklerin sentezi gibi birçok endüstride uygulanabilir hale gelmiştir (Şekil 1.) (Fasim vd. 2021). Pazarın %31'i gıda sektörüne, %6'sı yem sektörüne, geri kalan %63'ü ise deterjan, deri ve biyoenerji gibi endüstriyel uygulamalarda kullanılan enzimlere ayrılmaktadır (İlgin 2017).



Şekil 1. Endüstriyel enzimlerin kullanım alanları.

Enzimlerin endüstriyel biyoteknolojideki rolü, çeşitli biyokimyasal süreçlerin optimizasyonunda ve verimliliklerinin artırılmasında belirleyici bir etkiye sahiptir. Laktaz, lipaz,  $\alpha$ -amilaz ve glukoz izomeraz gibi enzimler, geniş bir uygulama alanına sahip olup, endüstriyel süreçlerin etkinliğini ve sürdürülebilirliğini artırmak amacıyla kullanılmaktadır. Endüstriyel enzimlerin

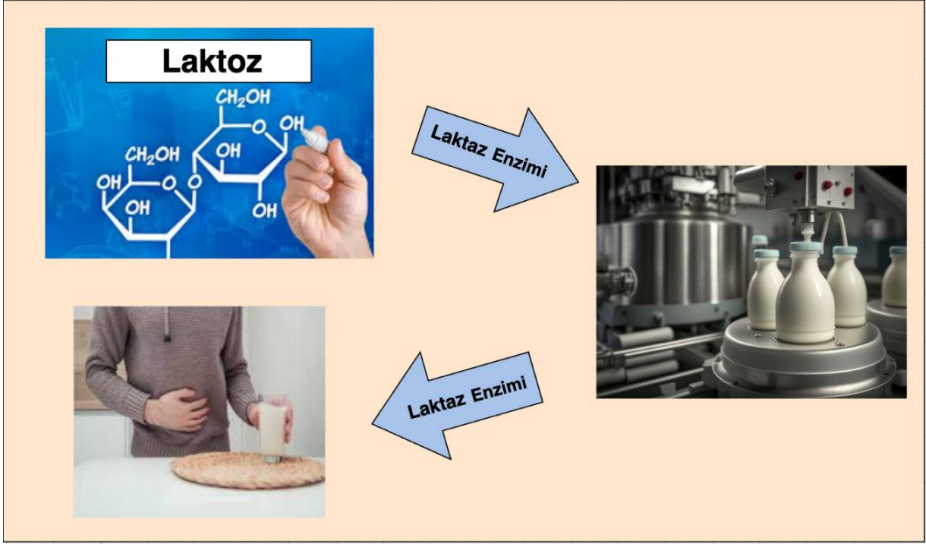
yaklaşık %60'ı mantarlardan, %24'ü bakterilerden, %4'ü mayalardan, geri kalan %10'u ise bitkisel ve hayvansal kaynaklardan elde edilmektedir (Raveendran vd. 2018). Mikrobiyal enzimler, yüksek verimlilik, aktivite, maliyet etkin üretim ve kolay optimizasyon avantajları nedeniyle tercih edilmektedir (Oyewole 2022). Modern biyoteknolojik yöntemler, bu enzimlerin üretim süreçlerini ve özelliklerini optimize etmeye yönelik araştırmalara odaklanmakta olup, genomik ve metagenomik teknolojiler, daha verimli ve stabil enzim formlarının geliştirilmesine olanak tanımaktadır. Enzim mühendisliği ve sentetik biyoloji alanlarındaki ilerlemeler, endüstriyel uygulamalarda daha yüksek performans ve maliyet etkinliği sağlamak amacıyla enzimlerin özelliklerini iyileştirmekte ve bu sayede biyoteknolojinin potansiyelini genişletmektedir (Fasim vd. 2021).

## **Endüstriyel Biyoteknolojide Kullanılan Anahtar Enzimler**

### **1. Laktaz**

Laktaz, laktozu glikoz ve galaktoza hidrolize eden bir enzim olup, endüstriyel biyoteknolojinin birçok alanında kritik bir öneme sahiptir. Laktaz, maya, bakteri, mantar, bitki ve rekombinant kaynaklardan izole edilmiştir. Endüstride laktaz üretimi için en yaygın olarak kullanılan kaynaklardan biri laktik asit bakterileridir. Bu bakteriler, gıda sınıfı laktaz üretiminde tercih edilmekte olup, saflaştırma işlemi gerektirmeksizin doğrudan etkili enzimatik aktivite sergileyerek ekonomik ve verimli bir seçenek sunmaktadır. Laktaz üreten bakteriler arasında *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum* gibi çeşitli türler bulunmaktadır. Bu bakteriyel suşlar, yüksek enzimatik aktivite göstererek endüstriyel süreçlerdeki enzim ihtiyaçlarını karşılamaktadır (Lamsal 2012).

Laktaz enziminin biyoteknolojik süreçlerde geniş bir uygulama alanı bulunmakta olup, süt ürünlerinden elde edilen atıkların yönetiminde de önemli bir rol üstlenmektedir. Laktoz intoleransı olan bireyler için laktozsuz süt ve süt ürünleri üretiminde laktazın kullanımı, sindirimi kolaylaştıran ürünlerin elde edilmesini sağlamaktadır. Laktozsuz süt üretimi, laktozun glikoz ve galaktoza parçalanması ile gerçekleştirilmekte olup, bu süreç, laktoz intoleransı nedeniyle ortaya çıkan gastrointestinal rahatsızlıkları ortadan kaldırmaktadır (Şekil 2). Laktozsuz ürünlerin üretimi sırasında laktazın etkisi, dondurma ve yoğurt gibi süt ürünlerinde kremamsı yapının artmasını sağlarken, kristalizasyonu engelleyerek ürünlerin kalitesini yükseltmektedir (García-Cano vd. 2020).



**Şekil 2.** Laktoz intoleransı olan bireyler için laktozsuz süt ve süt ürünleri üretiminde laktazın kullanımı.

Peynir üretim süreçlerinde, laktazın kullanımı süt yağlarının ve proteinlerinin işlenmesinde etkili bir rol oynamaktadır. Peynir altı suyunda bulunan laktozun çevresel etkileri, laktazın kullanımı ile azaltılmaktadır. Laktozun yüksek biyolojik ve kimyasal oksijen ihtiyacı, su kirliliğine sebep olabileceğinden, peynir üretiminden artakalan peynir altı suyu laktaz ile işlemden geçirilmekte ve çevresel etkiler minimize edilmektedir. Bu süreç, sürdürülebilir peynir üretimine katkı sağlarken, peynir altı suyunun etanol üretimi gibi alanlarda değerlendirilmesine olanak tanımaktadır (García-Cano vd. 2020).

Laktaz enzimi, laktozun hidroliziyle beraber transglukozilasyon aktiviteleri de sergileyebilmektedir. Bu aktiviteler, laktozun ve açığa çıkan monosakkaritlerin galaktozil alıcıları olarak kullanılmasını sağlar ve disakkaritler, trisakkaritler ile galaktooligosakkaritler (GOS) gibi daha yüksek yapıli oligosakkaritlerin oluşmasına yol açar. Bu GOS yan ürünleri prebiyotik özellik göstermekte olup, özellikle bebek mamalarında insan sütü oligosakkaritlerinin faydalarını taklit etmek amacıyla kullanılmaktadır. Prebiyotik özellikler taşıyan GOS, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi faydalı bakterilerin bağırsakta çoğalmasını desteklerken, patojenik bakterilerin bağırsak mukozasına yapışmasını engellemektedir (Chen ve Gänzle 2017).

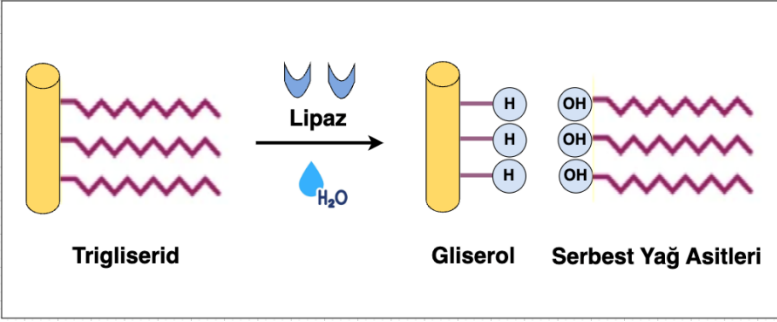
Bunun yanı sıra, laktazın şeker ve tatlandırıcı üretiminde de yaygın bir kullanımı bulunmaktadır. Laktaz, laktozu glikoz ve galaktoza parçalayarak bu monosakkaritlerin tatlandırıcı olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Elde edilen bu şekerler, gıda ve içecek endüstrisinde tatlandırma amacıyla geniş bir kullanım alanına sahiptir. Laktozun bu şekilde parçalanması, tatlı şurupların üretiminde, fırıncılık ürünlerinde ve çeşitli gıda maddelerinde daha etkili bir tatlandırma sağlayarak ürünlerin kalitesini artırmaktadır (Wang vd. 2021).

Laktazın endüstriyel biyoteknoloji alanındaki önemi, genomik ve metagenomik teknolojiler ile de giderek artmakta ve bu teknolojiler, laktazın daha verimli ve stabil formlarının geliştirilmesine olanak tanımaktadır. Bu tür yenilikçi yaklaşımlar, endüstriyel biyoteknoloji süreçlerinde maliyetlerin düşürülmesine ve laktazın etkinliğinin artırılmasına yönelik çözümler sunmaktadır (Ryabtseva vd. 2023).

Laktaz enzimi, endüstriyel biyoteknolojinin çeşitli alanlarında geniş bir uygulama çeşitliliğine sahip bir enzim olarak öne çıkmaktadır. Laktozun hidrolizi ve transglukozilasyon aktiviteleri ile hem gıda endüstrisinde hem de çevresel süreçlerde önemli rol oynayan laktaz, ürün kalitesini artırmakta, çevresel etkileri azaltmakta ve biyoteknolojik süreçlerin verimliliğini yükseltmektedir. Bu bağlamda, laktazın üretiminde kullanılan mikroorganizmaların ve enzimatik özelliklerinin optimize edilmesi, endüstriyel biyoteknolojideki yenilikçi uygulamaların geliştirilmesine katkı sağlamaktadır (Ryabtseva vd. 2023).

## 2. Lipaz

Lipazlar, biyokatalizörler arasında kritik bir öneme sahip olup, endüstriyel biyoteknolojinin pek çok alanında etkin bir rol oynamaktadır. Bu enzimler, on karbon atomlu uzun zincirli asilgliserol karboksilik esterlerini hidrolize ederek serbest yağ asitleri ve gliserol üretimini sağlamaktadır (Şekil 3.). Bu biyokimyasal süreç, lipazları endüstriyel uygulamalarda vazgeçilmez bir bileşen haline getirmektedir (Casas-Godoy vd. 2018; Arora 2020). Lipazların endüstriyel üretimi, filamentli mantarlar, mayalar ve bakteriler gibi geniş bir mikroorganizma çeşitliliği kullanılarak gerçekleştirilmektedir. *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Rhizomucor* spp., *Rhizopus* spp. ve *Pseudomonas* spp. gibi mikroorganizmalar, lipazların yüksek verimle ve ekonomik olarak üretimi için sıklıkla tercih edilmektedir. Bu mikroorganizmaların seçimi, lipazların aktivitesini, stabilitesini ve üretim verimliliğini doğrudan etkilemektedir (Motta vd. 2023).



**Şekil 3.** On karbon atomlu uzun zincirli asilgliserol karboksilik esterlerini hidrolize ederek serbest yağ asitleri ve gliserol üretimini sağlayan lipaz enzimi.

Lipazların endüstriyel biyoteknolojideki geniş uygulama alanları, enzimlerin yüksek substrat seçiciliği, geniş işlem koşullarına toleransı ve ekonomik verimliliği ile doğrudan ilişkilidir. Gıda endüstrisinde, lipazlar peynir üretimi ve yağların işlenmesinde önemli bir rol üstlenmektedir. Peynir üretiminde lipazlar, süt yağlarını hidrolize ederek peynirin karakteristik tat ve aroma profilinin oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Bu işlev, peynirin organoleptik özelliklerini ve kaliteli tat profilini belirlemektedir. Ayrıca dondurma ve margarin gibi ürünlerde lipaz kullanımı, ürünlerin tekstürel özelliklerini ve raf ömrünü iyileştirmekte, bu da hem ürün kalitesini artırmakta hem de üretim süreçlerini optimize etmektedir (Arora 2020).

Deterjan endüstrisinde lipazlar, ev tipi çamaşır deterjanlarında yağ lekelerinin etkili bir şekilde temizlenmesini sağlamaktadır. Bu enzimler, deterjan formülasyonlarında fosfat bazlı kimyasalların miktarını azaltarak çevresel etkileri minimize etmekte ve daha sürdürülebilir ürünlerin geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır. Lipazların bu özellikleri, çevre dostu deterjanların formülasyonunda önemli bir avantaj sağlamaktadır. Ayrıca lipazlar, fosfat içermeyen alternatiflerin geliştirilmesine yönelik araştırmalara da katkıda bulunarak çevresel etkilerin azaltılmasına yardımcı olmaktadır (Saraswat vd. 2017).

Biyoremediasyon süreçlerinde lipazlar, petrol kirliliği ve diğer organik kirleticilerin temizlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle *Acinetobacter* spp., *Mycobacterium* spp. ve *Rhodococcus* spp. gibi türlerden elde edilen lipazlar, petrol sızıntılarının temizlenmesinde etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Lipazlar, yağ ve petrol bazlı kirleticilerin biyolojik olarak parçalanmasını sağlayarak çevresel kirliliğin azaltılmasına katkıda bulunmaktadır. Petrol ürünlerinden kaynaklanan mineral yağ hidrokarbonları, otomobil motor yağıyla kirlenmiş topraklardan izole edilen bakteri suşları

tarafından üretilen lipazlar yardımıyla parçalanabilmekte, bu da petrol sızıntılarının etkilerini azaltmada etkili bir biyoremediasyon stratejisi sunmaktadır (Verma vd. 2012; Mahmood vd. 2017).

Tekstil endüstrisinde lipazların kullanımı, özellikle denim ve diğer tekstil ürünlerinin işlenmesinde önemli bir yere sahiptir. Lipazlar, kumaşın estetik ve fonksiyonel özelliklerini iyileştirirken, kumaşın yumuşaklığını artırmakta ve renk solmasını desteklemektedir. Bu uygulama, tekstil ürünlerinin kalitesini artırmakta ve endüstriyel süreçlerin etkinliğini yükseltmektedir (Arora 2020).

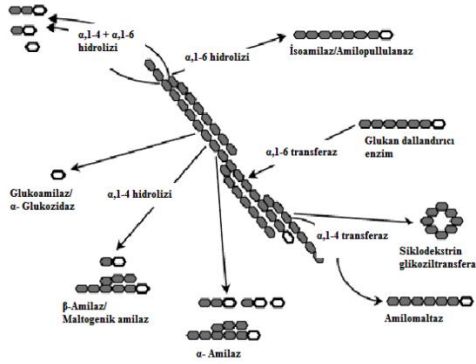
Farmasötik ve kozmetik ürünlerde de lipazlar, çeşitli formülasyonlarda kritik bir rol oynamaktadır. Lipazlar, yağ ve lipidlerin hidrolizinde kullanılarak emülsiyonların stabilitesini artırmakta ve ürünlerin performansını iyileştirmektedir. Kozmetik kremler ve ilaçlarda lipazların kullanımı, ürünlerin biyoyararlanımını artırarak aktif bileşenlerin etkinliğini güçlendirmektedir (Arora 2020).

Modern biyoteknolojik yaklaşımlar, lipazların üretim sürecini ve özelliklerini optimize etmeye yönelik araştırmalara odaklanmaktadır. Genomik ve metagenomik teknolojiler, lipazların daha verimli ve stabil formlarını geliştirmeye yönelik yenilikçi çözümler sunmaktadır. Genomik yaklaşımlar, lipazların genetik mühendisliği ile modifikasyonunu ve bu modifikasyonların enzim aktiviteleri üzerindeki etkilerini incelemekte önemli bir rol oynamaktadır. Bu gelişmeler, endüstriyel uygulamaların genişletilmesini ve maliyetlerin düşürülmesini sağlamakta; biyoteknolojik süreçlerde kullanılan lipazların biyolojik aktivitesini artırarak endüstriyel süreçlerin verimliliğini yükseltmeyi hedeflemektedir (Hassan vd. 2018).

Lipazlar, endüstriyel biyoteknolojinin çeşitli alanlarında geniş bir uygulama potansiyeline sahip olup, endüstriyel süreçlerin verimliliğini artırmada önemli bir rol oynamaktadır. Enzimlerin üretiminde kullanılan mikroorganizmaların seçimi, lipazların etkinliği ve üretim sürecindeki verimlilik üzerinde büyük etkiye sahiptir. Lipazların özelliklerinin geliştirilmesi ve optimizasyonu, endüstriyel biyoteknolojinin yenilikçi uygulamalarının önünü açmakta ve çeşitli endüstriyel süreçlerde yenilikçi çözümler sunmaktadır. Bu bağlamda, lipazların çeşitli endüstriyel süreçlerdeki rolünü daha iyi anlamak ve optimize etmek amacıyla sürekli araştırmalar yapılması gerekmektedir (Sajid vd. 2023).

### 3. $\alpha$ - Amilaz

$\alpha$ -Amilaz, nişasta ve glikojenin hidrolizinde kritik bir rol oynayan ve  $\alpha$ -1,4 ile  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağlarını parçalayarak bu büyük molekülleri daha küçük şeker birimlerine dönüştüren önemli bir enzimdir.  $\alpha$ -Amilazın bu fonksiyonu, birçok endüstriyel süreçte hayati öneme sahiptir ve dolayısıyla endüstriyel biyoteknolojinin temel bileşenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Shukla 2019; Motta vd. 2023). Nişastayı parçalayan enzimler, genellikle endoamilazlar ve ekzoamilazlar olarak iki ana gruba ayrılmaktadır. Endoamilazlar, amiloz ve amilopektin içindeki  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağları parçalayarak oligosakkaritler ve dekstrinler üretirken, ekzoamilazlar glukoamilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz gibi enzimler aracılığıyla dıştaki  $\alpha$ -1,4 ve  $\alpha$ -1,6 bağlarını keserek glikozu serbest bırakmaktadır. Ayrıca  $\beta$ -amilazlar,  $\alpha$ -maltozu  $\beta$ -maltoza dönüştürerek şekerlerin parçalanmasına katkıda bulunmaktadır (Şekil 4.) (Sarian vd. 2017; García-Cano vd. 2020).



**Şekil 4.** Nişasta ve glikojenin hidrolizinde kritik bir rol oynayan ve  $\alpha$ -1,4 ile  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağlarını parçalayan enzim:  $\alpha$ -Amilaz

$\alpha$ -Amilazların endüstriyel üretimi genellikle bakteriler, mantarlar ve bazı bitkiler gibi mikroorganizmalardan sağlanmaktadır. Bu mikroorganizmalar arasında *Bacillus* türleri ve filamentli mantarlar, özellikle *Aspergillus* türleri ön plana çıkmaktadır. *Bacillus* türleri, yüksek verim ve stabilite sağlayan termostabil  $\alpha$ -amilazlar üretirken, *Aspergillus* türleri geniş substrat spektrumu ve yüksek enzim aktivitesi ile dikkat çekmektedir. *Bacillus* türleri özellikle yüksek sıcaklıklarda dahi etkinliğini koruyabilen termostabil  $\alpha$ -amilazlar ürettiği için endüstriyel işlemler sırasında avantaj sağlamaktadır (Shukla 2019).



Filamentli mantarlar, özellikle *Aspergillus* türleri, geniş substrat yelpazesi ve yüksek aktivite ile endüstriyel amilaz üretimi için ideal kaynaklar arasında yer almaktadır (García-Cano vd. 2020).

Amilazlar, dünya genelinde en yaygın kullanılan enzimlerden biri olup, toplam enzim üretiminin yaklaşık %25'ini oluşturmaktadır (García-Cano vd. 2020).  $\alpha$ -Amilazın endüstriyel biyoteknolojideki önemi, özellikle gıda ve içecek sektörlerinde belirgindir. Fırıncılıkta  $\alpha$ -amilaz, hamurda bulunan nişastayı parçalayıp şeker birimlerine dönüştürerek fermentasyon sürecini hızlandırmakta, hamurun viskozitesini azaltmakta ve sonuç olarak ürünlerin hacmini ve dokusunu iyileştirmektedir. Ayrıca ekmeğin renk, lezzet ve kabuk özelliklerini geliştiren fermentasyon yan ürünlerinin oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Dolayısıyla  $\alpha$ -amilaz, fırıncılıkta ürün kalitesini artırmak adına kritik bir enzimdir (Zhang vd. 2018).

Bira endüstrisinde  $\alpha$ -amilaz, jelatinleşen nişastaların hidrolizini gerçekleştirerek şıra viskozitesinin kontrol edilmesine olanak tanımaktadır. Şıra viskozitesi, bira üretiminde kritik bir parametre olup, nihai ürünün kalitesini doğrudan etkilemektedir. Ayrıca  $\alpha$ -amilaz, nişasta bazlı tatlandırıcıların, özellikle glikoz ve maltodekstrinlerin üretiminde de önemli bir rol oynamaktadır. Bu tatlandırıcılar, gıda ve içecek ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır.  $\alpha$ -Amilazın bu işlevi, şeker üretiminin verimliliğini artırmakta ve tatlandırma işlemlerine önemli katkılar sağlamaktadır (Duan vd. 2019).

Endüstriyel biyoteknolojide  $\alpha$ -amilazın kullanım alanı, yalnızca gıda ve içecek endüstrisi ile sınırlı kalmamakta, çeşitli biyoteknolojik ve kimyasal süreçlerde de yer almaktadır. Özellikle polimerizasyon ve diğer kimyasal dönüşüm süreçlerinde  $\alpha$ -amilazın rolü, substrat seçiciliği ve enzimatik aktivitesi ile doğrudan ilişkilidir. Modern biyoteknolojik yaklaşımlar,  $\alpha$ -amilaz üretim sürecinin optimize edilmesine ve enzim özelliklerinin geliştirilmesine yönelik araştırmalara odaklanmaktadır. Genomik ve metagenomik teknolojiler, daha verimli ve stabil  $\alpha$ -amilaz formlarının geliştirilmesine yönelik yenilikçi çözümler sunmaktadır. Bu gelişmeler, enzimin endüstriyel uygulamalarda daha etkin ve ekonomik kullanılmasını sağlamaktadır (Phytosci vd. 2021).

$\alpha$ -amilazın endüstriyel biyoteknolojideki önemi, sadece gıda ve içecek üretimiyle sınırlı kalmayıp, çeşitli endüstriyel süreçlerin verimliliğini artıran önemli bir araç olarak kabul edilmektedir. Enzim üretiminde kullanılan

mikroorganizmaların seçimi,  $\alpha$ -amilazın etkinliği, stabilitesi ve üretim sürecindeki verimlilik üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Ayrıca  $\alpha$ -amilazın özelliklerinin geliştirilmesi ve optimize edilmesi, endüstriyel biyoteknolojide yenilikçi uygulamaların önünü açmakta ve birçok sektördeki süreçleri iyileştirmektedir. Bu bağlamda  $\alpha$ -amilaz, biyoteknolojik süreçlerin ve endüstriyel uygulamaların iyileştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Sarian vd. 2017; Zhang vd. 2018; Duan vd. 2019; Shukla 2019; García-Cano vd. 2020; Motta vd. 2023).

## **1. Glikoz İzomeraz**

Glikoz izomeraz, glikozu fruktoza dönüştüren enzimlerin başında gelmekte olup, endüstriyel biyoteknoloji alanında önemli bir yere sahiptir. Bu enzim, özellikle yüksek fruktozlu mısır şurubu (HFCS) üretiminde kritik bir bileşen olarak tanımlanmaktadır. HFCS, gıda ve içecek endüstrilerinde geniş çapta kullanılan bir tatlandırıcıdır. Fruktoz, glikoza göre yaklaşık 1,7 kat daha tatlı bir bileşendir; bu durum, HFCS'nin tatlandırma kapasitesini artırmakta ve böylece daha düşük miktarda şeker kullanılarak benzer bir tat profili elde edilmesini sağlamaktadır. Bu özellik, HFCS'nin gıda endüstrisinde yaygın bir şekilde tercih edilmesinin ana sebeplerinden biridir. Glikoz izomerazın endüstriyel uygulamaları yalnızca tatlandırma kapasitesinden değil, aynı zamanda nem tutma ve kristalleşmeyi önleme gibi işlevlerinden de yararlanmaktadır. Bu işlevler, ürünlerin uzun ömürlü olmasını sağlamak ve tatlandırıcıların ürünlerde daha homojen bir şekilde dağılmasını mümkün kılmaktadır (Mokale Kognou vd. 2022).

Glikoz izomeraz, glikoz ile fruktoz arasında izomerizasyon reaksiyonlarını katalize ederek fruktoz üretimini gerçekleştirmektedir. Fruktozun yüksek tatlandırma kapasitesi, HFCS'nin geniş kullanımının temel nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Enzim, bu dönüşümü yüksek verimlilikle gerçekleştirdiği gibi, aynı zamanda ürünlerin kıvamını iyileştirmekte ve raf ömrünü uzatmaktadır. Glikoz izomerazın stabilitesi ve etkinliği, endüstriyel üretim süreçlerinde bu enzimin tercih edilmesinde önemli bir faktördür. Enzimin etkinliği, üretim süreçlerinin verimliliğini artırmaktadır. Bu bağlamda, glikoz izomerazın özelliklerinin optimize edilmesi, endüstriyel üretim süreçlerinin başarısı için kritik bir öneme sahiptir (Bhasin ve Modi 2012).

Son yıllarda, glikoz izomerazın verimliliğini artırmak ve üretim süreçlerini optimize etmek amacıyla çeşitli yeni teknolojik gelişmeler ortaya çıkmıştır. Protein mühendisliği ve gen düzenleme teknikleri, enzimin daha verimli ve stabil formlarının geliştirilmesini mümkün kılmaktadır. Protein mühendisliği ile yapılan yapısal modifikasyonlar, enzimin aktivitesini artırmakta ve böylece daha yüksek verimli üretim süreçlerinin sağlanmasına katkıda bulunmaktadır. Ayrıca, gen düzenleme teknikleri kullanılarak, enzimin üretimini gerçekleştiren mikroorganizmaların genetik yapısında yapılan iyileştirmeler, enzimin üretim kapasitesini ve stabilitesini artırmaktadır. Bu yöntemler, enzimin aktif formunu korurken aynı zamanda üretim maliyetlerini de düşürmektedir (Neifar vd. 2020).

Glikoz izomeraz üretim süreci genellikle mikroorganizma fermentasyonu ile başlamaktadır. *Streptomyces* ve *Bacillus* türleri, bu enzimin endüstriyel üretiminde yaygın olarak kullanılan mikroorganizmalar arasında yer almaktadır. Bu mikroorganizmalar, yüksek verimli enzim üretimini sağlamak ve üretim maliyetlerini optimize etmektedir. Fermentasyon süreci, mikroorganizmaların uygun koşullarda büyümesini ve yüksek miktarda enzim üretmesini sağlamaktadır. Enzimler, fermentasyonun ardından ayrıştırılmakta ve saflaştırılmaktadır; bu süreçte kullanılan modern biyoteknolojik yöntemler, üretim sürecinin verimliliğini artırmaktadır (Motta vd. 2023).

Glikoz izomeraz, HFCS üretiminde olduğu gibi birçok diğer gıda ve içecek ürününde de kullanılmaktadır. HFCS, şeker yerine kullanıldığında ürünlerin tat profilini iyileştirmekte, glikoz izomeraz ise şekerin tatlandırıcı özelliklerini geliştirmek ve ürünlerin kalitesini artırmak için önemli bir araç olarak görülmektedir. Ayrıca, glikoz izomerazın kullanımı, ürünlerin kıvamını artırmakta ve raf ömrünü uzatmaktadır. Bu durum, glikoz izomerazın endüstriyel biyoteknolojideki rolünün sadece tatlandırıcı ürünlerle sınırlı olmadığını, aynı zamanda ürünlerin genel kalitesini ve dayanıklılığını artırmakta da önemli olduğunu göstermektedir (Nam 2022).

Endüstriyel biyoteknoloji alanındaki gelişmeler, glikoz izomerazın uygulama alanlarını genişletmektedir. Glikoz izomeraz, ilaç üretimi ve biyokatalizörler gibi çeşitli diğer alanlarda da kullanılmaktadır. Örneğin, bazı çalışmalar glikoz izomerazın biyokatalizör olarak kullanımının biyomoleküllerin sentezinde ve diğer biyoteknolojik süreçlerde potansiyel faydalar sağlayabileceğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, glikoz izomerazın gıda

dışı uygulamaları, çevresel sürdürülebilirlik açısından da önemli avantajlar sunmaktadır (Neifar vd. 2020).

Glikoz izomeraz, endüstriyel biyoteknoloji alanında önemli bir enzim olarak tanımlanmaktadır. D-glikozu D-fruktoza dönüştürme yeteneği, özellikle yüksek fruktozlu mısır şurubu üretiminde kritik bir rol oynamaktadır. Modern biyoteknolojik yöntemler ve mikroorganizma seçimi, glikoz izomerazın üretim sürecini optimize etmekte, aynı zamanda enzimin endüstriyel uygulama alanlarını genişletmektedir. Gıda endüstrisinde kullanılan bu enzim, şekerli ürünlerin tatlandırılmasında ve kalitesinin artırılmasında önemli bir araç olarak kalmaya devam etmektedir. Glikoz izomerazın endüstriyel biyoteknoloji alanındaki rolü, bu enzimin potansiyelini ve önemini sürekli olarak artırmaktadır (Nam 2022).

**Tablo 1.** Endüstriyel biyoteknolojide kullanılan anahtar enzimler, kullanım alanları ve üretilmesinde kullanılan mikroorganizmalar

Enzim	Kullanım Alanları	Mikroorganizmalar
<b>Laktaz</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Laktozsuz süt ve süt ürünleri üretimi</li> <li>- Peynir üretiminde süt yağlarının ve proteinlerinin işlenmesi</li> <li>- Şeker ve tatlandırıcı üretimi</li> <li>- Prebiyotik GOS üretimi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Streptococcus thermophilus</i></li> <li>- <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i></li> <li>- <i>Lactobacillus acidophilus</i></li> <li>- <i>Lactobacillus sakei</i></li> <li>- <i>Lactobacillus plantarum</i></li> </ul>
<b>Lipaz</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peynir üretimi</li> <li>- Yağ ve gres lekelerinin temizlenmesi (detarjanlarda)</li> <li>- Biyoremediasyon (petrol kirliliği temizliği)</li> <li>- Tekstil ürünlerinin taşlanması</li> <li>- Kozmetik ve farmasötik ürünlerde yağ ve lipidlerin hidrolizi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Candida</i> spp.</li> <li>- <i>Aspergillus</i> spp.</li> <li>- <i>Rhizomucor</i> spp.</li> <li>- <i>Rhizopus</i> spp.</li> <li>- <i>Pseudomonas</i> spp.</li> </ul>
<b><math>\alpha</math>-Amilaz</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fırıncılıkta nişastanın parçalanması</li> <li>- Bira üretiminde şıra viskozitesinin kontrolü</li> <li>- Nişasta bazlı tatlandırıcı üretimi</li> <li>- Kimyasal dönüşüm işlemleri</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Bacillus</i> spp.</li> <li>- <i>Aspergillus</i> spp.</li> </ul>

<b>Glikoz İzomeraz</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Yüksek fruktozlu mısır şurubu (HFCS) üretimi</li> <li>- Şeker yerine tatlandırıcı olarak kullanımı</li> <li>- Ürünlerin kıvamının artırılması ve raf ömrünün uzatılması</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Streptomyces</i> spp.</li> <li>- <i>Bacillus</i> spp.</li> </ul>
------------------------	---	--

Sonuç olarak, endüstriyel biyoteknolojide kullanılan enzimler, modern üretim süreçlerinin etkinliğini ve sürdürülebilirliğini artırmada kritik bir rol oynamaktadır. Laktaz, lipaz,  $\alpha$ -amilaz ve glikoz izomeraz gibi anahtar enzimler, gıda ve içecek endüstrisinden biyoremediasyon süreçlerine kadar geniş bir uygulama çeşitliliğine sahiptir. Bu enzimler, yalnızca ürün kalitesini artırmakla kalmaz, aynı zamanda çevresel etkileri azaltarak daha sürdürülebilir endüstriyel uygulamalara olanak tanır. Enzim mühendisliği ve biyoteknolojik yenilikler sayesinde, bu enzimlerin verimliliği ve stabilitesi sürekli olarak geliştirilmektedir. Genomik ve metagenomik teknolojiler, enzimlerin üretim süreçlerini optimize ederken, endüstriyel biyoteknolojinin potansiyelini genişletmektedir. Bu bağlamda, endüstriyel biyoteknolojide kullanılan enzimlerin araştırılması ve geliştirilmesi hem ekonomik hem de çevresel açıdan önemli faydalar sağlamakta ve gelecekteki uygulama alanlarının genişlemesine katkıda bulunmaktadır.

## KAYNAKÇA

- Arora, N. K., Mishra, J., & Mishra, V. (Eds.). (2020). *Microbial enzymes: roles and applications in industries* (pp. 1-110). Springer.
- Bhasin S, Modi HA (2012) Optimization of Fermentation Medium for the Production of Glucose Isomerase Using *Streptomyces* sp. SB-P1 . *Biotechnol Res Int* 2012:1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/874152>
- Casas-Godoy L, Gasteazoro F, Duquesne S, et al (2018) Lipases: An overview. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., pp 3–38
- Chen XY, Gänzle MG (2017) Lactose and lactose-derived oligosaccharides: More than prebiotics? *Int Dairy J* 67:61–72
- Duan X, Shen Z, Zhang X, et al (2019) Production of recombinant beta-amylase of *Bacillus aryabhatai*. *Prep Biochem Biotechnol* 49:88–94. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1536987>
- Fasim A, More VS, More SS (2021) Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. *Curr Opin Biotechnol* 69:68–76
- García-Cano I, Rocha-Mendoza D, Kosmerl E, et al (2020) Technically relevant enzymes and proteins produced by LAB suitable for industrial and biological activity. *Appl Microbiol Biotechnol* 104:1401–1422
- Hassan SWM, El Latif HHA, Ali SM (2018) Production of cold-active lipase by free and immobilized marine *Bacillus cereus* HSS: Application in wastewater treatment. *Front Microbiol* 9:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02377>
- İlgin M (2017) Keçiyoynuzu Ekstraktının İnülinaz Enzimi Üretiminde Karbon Kaynağı Olarak Kullanımı. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
- Lamsal BP (2012) Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides. *J Sci Food Agric* 92:2020–2028
- Mahmood MH, Yang Z, Thanoon RD, et al (2017) Lipase Production and Optimization from Bioremediation of Disposed Engine Oil. Available online [www.jocpr.com](http://www.jocpr.com) *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 26–36
- Mokale Kognou AL, Shrestha S, Jiang Z, et al (2022) High-fructose corn syrup production and its new applications for 5-hydroxymethylfurfural and value-added furan derivatives: Promises and challenges. *Journal of Bioresources and Bioproducts* 7:148–160
- Motta JFG, de Freitas BCB, de Almeida AF, et al (2023) Use of enzymes in the food industry: a review. *Food Science and Technology (Brazil)* 43
- Nam KH (2022) Glucose Isomerase: Functions, Structures, and Applications. *Applied Sciences (Switzerland)* 12:. <https://doi.org/10.3390/app12010428>
- Neifar S, Cervantes F V., Bouanane-Darenfed A, et al (2020) Immobilization of the glucose isomerase from *Caldicoprobacter algeriensis* on Sepabeads EC-HA and its efficient application in continuous High Fructose Syrup production using packed bed reactor. *Food Chem* 309:. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125710>
- Oyewole, OA, Yakubu, JG, Gana, M., Adamu, BB, Idris, AD (2022). Mikrobiyal Enzimlerin Endüstrilerde ve Tıpta Uygulamaları. Maddela, NR, Abiodun, AS, Prasad, R. (editörler) *Mikrobiyal Enzimolojide Ekolojik Etkileşimler. Çevresel ve Mikrobiyal Biyoteknoloji*. Springer, Singapur. [https://doi.org/10.1007/978-981-19-0155-3\\_14](https://doi.org/10.1007/978-981-19-0155-3_14)

- Phytosci GJ, Hussain M, Jabbar B (2021) Applications of Alpha ( $\alpha$ )-Amylase in Biotechnology: A Review. *Gu Journal of Phytosciences* 1(1): 98-105:
- Raveendran S, Parameswaran B, Ummalyma SB, et al (2018) Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technol Biotechnol* 56:16–30
- Ryabtseva SA, Khramtsov AG, Shpak MA, et al (2023) Biotechnology of Lactulose Production: Progress, Challenges, and Prospects. *Food Processing: Techniques and Technology* 53:97–122
- Sajid A, Khan SA, Hamayun M, Lee IJ (2023) The Recent Advances in the Utility of Microbial Lipases: A Review. *Microorganisms* 11
- Saraswat R, Verma V, Sistla S, Bhushan I (2017) Evaluation of alkali and thermotolerant lipase from an indigenous isolated *Bacillus* strain for detergent formulation. *Electronic Journal of Biotechnology* 30:33–38. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.08.007>
- Sarian FD, Janeček Š, Pijning T, et al (2017) A new group of glycoside hydrolase family 13  $\alpha$ -amylases with an aberrant catalytic triad. *Sci Rep* 7:. <https://doi.org/10.1038/srep44230>
- Shukla P (2019) Synthetic Biology Perspectives of Microbial Enzymes and Their Innovative Applications. *Indian J Microbiol* 59:401–409
- Verma S, Saxena J, Prasanna R, et al (2012) Medium optimization for a novel crude-oil degrading lipase from *Pseudomonas aeruginosa* SL-72 using statistical approaches for bioremediation of crude-oil. *Biocatal Agric Biotechnol* 1:321–329. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2012.07.002>
- Wang Z, Qi J, Goddard JM (2021) Concentrated sugar solutions protect lactase from thermal inactivation. *Int Dairy J* 123:.. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105168>
- Zhang Y, He S, Simpson BK (2018) Enzymes in food bioprocessing — novel food enzymes, applications, and related techniques. *Curr Opin Food Sci* 19:30–35

## **BÖLÜM 10**

### **FAJ ENZİMLERİ VE UYGULAMA ALANLARI**

Dr. Öğr. Üyesi Ülkü Zeynep ÜREYEN ESERTAŞ<sup>1</sup>

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.14565092>

---

<sup>1</sup> Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü Ağrı, Türkiye. [uzesertas@agri.edu.tr](mailto:uzesertas@agri.edu.tr) Orcid ID: 0000-0001-9897-5313





## GİRİŞ

Ernest Hankin tarafından 1896 yılında literatüre kazandırılan Fajlar Dünya'da en bol bulunan mikroorganizma grubu olarak bilinmektedir (Clokier vd. 2011). Bakteriyofajlar bakteriye özgülürler, insan, hayvan mikrobiyotasına etkileri yoktur ve açık okyanuslarda, toprakta, okyanus tortularında, kısacası bakteri ve arke gibi konak hücrelerinin bulunduğu her yerde bulunabilmektedirler (Merill vd. 2003). Bakteriyofajların en yaygın sınıflandırması yaşam döngülerine göre yapılmakta olup litik (virulent) ve lizojenik (ılımlı) olarak 2'ye ayrılmaktadır. Litik döngüde, bakteriyofajlar konakçıya bağlanmakta ve kendi DNA'sını bakteriyel DNA ile aktarmaktadır. Ortamda yeni bakteriyofajlar oluştuğunda, konakçı hücrenin enzimlerinin yardımıyla, konakçı hücrenin lizisi gerçekleşmektedir. Litik döngüden farklı olarak, lizojenik döngüde, bakteriyofaj lizis olmadan konakçıda kalabilmektedir (Motlagh vd. 2015). Çevre koşulları bozulduğunda, lizojenik döngünün litik döngüye dönüşebildiği bilinmektedir (Carvalho vd. 2017). Son zamanlarda, gıda endüstrisinde veya diğer alanlarda litik bakteriyofajlar kullanılmaktadır. Ayrıca, umut verici olmalarına rağmen, lizojenik yaşam döngüsünü takip eden bakteriyofajların yatay gen transferi yoluyla bakterilerdeki direnç mekanizmasını arttırdığı bilinmektedir (Chibani-Chennoufi vd. 2004). Bu nedenle, lizojenik bakteriyofajların bu özelliklerinden dolayı çalışmalarda tercih yönünden kısıtlı kaldığı bilinmektedir.

1915 yılında, İngiliz bakteriyolog Frederick Twort, in vitro olarak üzerinde çalıştığı çiçek aşısı virüsünü yetiştirmeye çalışırken, kültürlerin büyümediğini ve normalden farklı bir görünüme sahip olduğunu fark etmiştir. Ekim yaptığı agar tüplerinde, normalden farklı "camsı ve şeffaf" bölgeler gözlemleyen araştırmacı gözlemlediği bu bölgelerin bakteri hücrelerinin yıkımı sonucu oluştuğunu varsaymıştır (Keen, 2015). Fakat bakteriyofaj ismini veren 1917'de Felix d'Herelle'tir ve bakteriyofajların antimikrobiyal aktiviteleri hakkında ilk literatür verileri kendisi tarafından oluşturulmuştur. Felix d'Herelle, bakteriyofajları ilk olarak I. Dünya Savaşı sırasında dizanteri salgınını araştırırken fark etmiştir. Dizanteriye neden olan *Bacillus*'u izole edip karakterize ettikten sonra kültürlerde "delikler" olduğunu fark etmiştir. Daha sonra bu alanların filtrelenebileceğini ve "plak" oluşabileceğini fark eden araştırmacı bu oluşumlara "bakteriyofajlar", yani "bakteri yiyen" adını vermiştir (Taylor ve Taylor, 2014).

Avustralyalı mikrobiyolog Macfarlane Burnet 1937'de bakteriyofajların fizikokimyasal ajanlara karşı direnç farklılıkları gösterdiğini raporlamıştır. 1940 yılında Helmut Rushka elektron mikroskobu kullanarak fajları görüntülemiştir (Ustaçelebi vd. 1968). Fajlar antibiyotiklerin keşfine kadar yoğun olarak tedavide kullanılmıştır. Antibiyotiklerin keşfiyle fajların kullanımını gittikçe geri planda kalmış olsa da Polonya, Gürcistan gibi ülkelerde faj çalışmaları istikrarlı bir şekilde sürdürülmüştür. Fajların izolasyon ve terapi araştırmalarında Gürcistan'ın EIBMV (Eliava Institute of Bacteriophage Microbiology and Virology) ve Polonya'nın HIIET (Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy) enstitüleri büyük önem taşımaktadır (Sulakvelidze vd. 2001).

Endolizinler, litik döngünün sonuna doğru bakteriyofajlar tarafından üretilen peptidoglikanın hidrolizine neden olan enzimlerdir. Endolizinler, bakterilerin peptidoglikan yapısının parçalanmasında rol oynar ve hücrenin hücre lizi meydana geldikten sonra, yavru virionlar serbest kalır (Schmelcher ve Loessner, 2016). Endolizinler, Gram (+) veya Gram (-) bakterileri hedeflemelerinde yapısal olarak farklılık gösterse de genellikle iki korunmuş protein alanı içermektedirler: N-terminal enzimatik olarak aktif alan ve C-terminal hücre duvarı bağlanma alanı (Villa ve Crespo, 2010). N-terminal enzimatik olarak aktif alan, hücre duvarını katalize etmek için gereken protein alanıdır ve peptidoglikanı nerede kestiklerine göre sınıflandırılır. C-terminal hücre duvarı bağlanma alanı, hedef substratların tanınmasını ve endolizinlerin konakçıya özgülüğünü sağlayan hücre duvarı parçasıdır (Oliveira vd. 2013). Endolizinler mikroflorayı bozmadığı, özgül olduğu ve bakteriyofajların aksine bakteri direncini artırmadığı için son zamanlarda patojen tespiti, biyofilm kontrolü ve gıda güvenliği gibi konularda gıda endüstrisinde oldukça tercih edilmektedir. Gram (+) ve Gram (-) bakterilerin hücre duvarlarının farklılıkları mevcuttur. Gram (+) bakterilerin peptidoglikanı daha katmanlı iken, Gram (-) bakterilerde tek katmanlıdır (Silhavy vd. 2010). Öte yandan, Gram (-) bakterilerin hücre duvarı, bir bariyer görevi gören ve endolizinlerin peptidoglikana ulaşmasını engelleyen dış zar içermektedir. Bu nedenle, genel olarak Gram (-) bakteriler üzerinde etki gösterebilmek için endolizinin yanı sıra, Gram (-) hücrelerinin patlamasında aktif rol oynayan holin adı verilen bir proteine daha ihtiyaç göstermektedirler (Xu vd. 2005). Holinler, iç zarda delikler açmaktan sorumlu küçük zar proteinleridir. Açılan delikler sayesinde endolizin peptidoglikana ulaşarak onu parçalamakta ve ozmotik dengenin bozulması hücrenin parçalanmasına neden olmaktadır. Çalışmalar, holin

yokluğunda çeşitli organik asitlerin, kimyasalların veya yardımcı teknolojilerin endolizin ile sinerjik bir etki gösterdiğini bildirmektedir. Sitrik asit, malik asit, EDTA (Etilendiamin Tetra Asetik asit) gibi organik maddeler dış zarın geçirgenliğini arttırmakta ve endolizin bir holine gereksinim olmadan peptidoglikanı parçalayabilmektedir (Chang vd. 2017). Bazı çalışmalarda, yüksek hidrostatik basınç (HHP) içeren gıda prosedürlerinde endolizinlerin eş zamanlı kullanımının daha başarılı olduğunu göstermektedir (Misiou vd. 2018).

Hedef bakteri konakları hariç tüm organizmalar için zararsız olan bu mikroorganizmalar bakteriyel adaptif evrimin başlıca itici güçlerindedir (Pirnay vd. 2015). Bakteriyofajların elektron mikroskobu ile ölçümlerinde genel olarak büyüklükleri 20- 200 nm aralığında görülmektedir. Farklı morfolojik özellikler gösterebiliyor olsalar da büyük çoğunluğu baş kısmında dsDNA (doublestranded) genomu bulunduran kübik simetrik yapı ihtiva etmektedir. Ana yapılarının yüzde 90'ı DNA olmakla birlikte, DNA ya da RNA karakterinde genetik materyalden oluşabilmektedirler (Haq vd. 2012). Bilinen en küçük genom büyüklüğüne sahip bakteriyofaj, yaklaşık 3300 bp'lik genom büyüklüğüne sahip ssRNA taşıyan *Escherichia coli* bakteriyofajı ve bilinen en büyük genom büyüklüğüne sahip, 500 kb'lik dsDNA taşıyan *Bacillus megaterium* bakteriyofajıdır (Hatfull ve Hendrix, 2011).

Fajlar, üç boyutlu yapı gösteren kapsid ile çevrili nükleik asit ihtiva eden zorunlu hücre içi parazitler olarak tanımlanmaktadır. Buna paralel lipoprotein zarfı ile çevrili olanları da bulunmaktadır. Fajların reseptör olarak adlandırılan hedef konakçının zarına bağlanmaktan sorumlu proteinleri sunan liflerin bulunduğu bir kuyruklu yapı bulunmaktadır aynı zamanda spiral bir temas kılıfları bulunabilmektedir. Çoğu fajın dsDNA (çift sarmallı) genomu vardır, ancak dsRNA, ssDNA (tek sarmallı) ve ssRNA genomları içerebilmektedir (Elois vd. 2023). Moleküler uygulamaların geliştirilmesine büyük katkı sağlayan fajlar tanımlanmalarından günümüze kadar pek çok farklı uygulama alanında kendilerine yer bulmuşlardır.

Alfred Hershey ve Martha Chase tarafından gerçekleştirilen Hershey-Chase deneyi deneyi faj araştırmalarının öncülerindedir. Genlerin DNA'dan oluştuğunu fajlar kullanılarak ortaya koyan bu deney büyük önem taşımaktadır. Faj araştırmaları, santral dogmayı tanımlamada etkili olmuştur. Yukarıda bahsedildiği gibi DNA'nın genetik materyal olarak tanımlanması ve aynı zamanda genin tanımlanması ve haritalanması ve protein üretimi için bir ara

madde olarak mRNA'nın keşfinde faj araştırmaları büyük önem taşımaktadır (Cairns vd. 2006).

Özellikle bakteri genlerinin mutagenезini içeren araştırmalar fajlar kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Elois vd. 2023).

Fajlar çok fazla sayıda gen içermekte ve pek çoğu tam olarak tanımlanmamış durumdadır bu da araştırmaları arttırmakta ve aynı zamanda hızlandırmaktadır. Gıdaların korunması ve kontrolü, çoklu ilaç dirençli enfeksiyonların antibiyotik terapisi, DNA transfer uygulamalı teknolojileri gibi alanlarda işlev gören proteinleri kodlayan fajların genomları özellikle biyoteknolojide büyük yer almaktadır. Fajların sirküle enfeksiyon hızları çok yüksektir ve araştırmalar için büyük önem taşımaktadır. Bu sirkülasyon bakteriyofajların bakteri hücrelerini enfeksiyonu çoğalmas ve ardından serbest kalan yeni viryonların başka bakteri hücrelerin de enfeksiyon oluşturması şeklinde devam etmektedir.

Klinik uygulamalarda 1920'lerin başından itibaren kullanılmaya başlanan fajların, antibiyotiklerin keşfinden sonra tedavide kullanımı gerilese de özellikle son yıllarda artan antibiyotik dirençli bakteriler nedeniyle faj terapisi ve faj temelli ürünler sıklıkla araştırılmakta ve tedavide korumada kullanılmaktadır (Kutateladze ve Adamia 2010). Fajlar ve antibiyotiklerin karşılaştırılması Tablo 1.'de verilmiştir.

**Tablo 1.** Antibiyotikler ve fajların karşılaştırılması

Antibiyotikler	Fajlar
Antibiyotiklerin bakteriyostatik aktivite gösterenleri mevcuttur.	Fajlar bakterisidal aktivite göstermektedirler.
Vücuttan metabolize edilerek atılmaktadırlar, Antibiyotiklerin yarılanma ömürleri bulunmaktadır.	Fajlar akıllı ilaç olarak sınıflandırılmaktadır, enfeksiyon bölgesinde çoğalır konağın yok olmasıyla üremeleri dururlar.
Sıklıkla dozların tekrarlar şeklinde uygulanmaktadır.	Konağın mikroorganizmanın varlığında kendiliğinden çoğalmaktadırlar ve tekrarlayan dozlara ihtiyaç duymamaktadırlar.
Patojen bakteriler ile mikrobiyotaya da zarar vermektedirler	Konak bakterilere spesifiktirler ve mikrobiyotaya zarar vermemektedirler
Dirence neden olmaktadırlar	Dirence neden olmamaktadırlar
İntestinal bozukluk, ikincil mantar enfeksiyonları ve alerjik reaksiyonlar başta olmak üzere çok farklı yan etkiler görülebilmektedir	Yan etki olasılıkları çok daha düşüktür.

Yeni bir antibiyotiğin eldesi uzun yıllar alabilmektedir.	Yeni fajların eldesi hızlı ve kolaylıkla gerçekleştirilebilmektedir.
Antibiyotiklerde alerji ihtimali görülmektedir.	Alerji riski bulunmamaktadır.

Danovaro ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, bakteriyofajlar her gün okyanustaki bakterilerin ortalama %20-25'ini öldürmektedir. Bunun sonucunda oksijen üretimleri, fitoplankton üretkenlik oranları, çözülmüş karbona göre partikül oranı, iklim ve hava değişimlerinin etkilendiği ortaya konmuştur (Danovaro vd. 2006). Ayrıca bakteriler, bakteriyofajların öldürücü etkisinden kaçmak için savunma mekanizması geliştirme, yani evrimleşme eğilimindedir. Özellikle lizojenik yaşam döngüsünü izleyen bakteriyofajlar, yatay gen transferi için önemli ajanlardır ve bakteriyel evrimi tetiklemektedirler (Chibani-Chennoufi vd. 2004). Genomların evrimi, bakteriyel adaptif evrim ve DNA'nın ifade edilme ve kopyalanma gibi potansiyel olarak yeni biyoteknoloji ürünlerinin geliştirilmesine yardımcı olacak bilgilere erişilmesi için de faj genom araştırmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Ökaryotik hücrelere karşı afinite göstermemelerinin nedeni metabolik mekanizma içermemeleri olan fajların bu özellikleri ilaç olarak uygulanma ve çeşitli biyoteknolojik ürün potansiyellerini arttırmaktadır (Chan ve Abedon, 2012).

Özellikle, faj bazlı aşılama uygulamalarında bakteriyofaj parçacıklarının kullanımı, hayvan ve bitkilerde gen transfer uygulamaları, faj görüntüleme tabanlı seçimlerin biyolojik afinite molekülleri için uygulanmalarında, bakteriyel biosensör cihazlarının geliştirilmesinde, gen iletimi teknolojilerinde, gıda biyoprezervasyonu ve güvenliğinde, bitki patojenlerinin biyokontrolünde, biyofilm kontrolü, yüzey dezenfeksiyonu ve korozyon kontrolü gibi işlemlerde umut verici önleyici stratejilerin arasında yer almaktadır. İnsan antibiyoterapisi başta olmak üzere çevre dezenfeksiyonu, gıda korunumu gibi pek çok farklı alanda bakteriyofajların biyoteknolojik uygulamaları mevcut olup bunların geliştirilmesi ve çok daha farklı biyoteknolojik alanda uygulanma potansiyeli yüksektir. Son elli yıl içinde 5100'den fazla bakteriyofaj araştırılmış ve tanımlamaları yapılmıştır. Bu bakteriyofajların %90'ından daha fazlasının kuyruklu, *Myoviridae*, *Siphoviridae* ve *Podoviridae* ailelerine ait olduğu bildirilmiştir (Wittebole vd. 2013; Harada vd. 2018).

Fajların biyoteknolojik kullanımları özellikle yeni ürünlerin geliştirilmesinde büyük önem taşımaktadır. Bakteriyofaj terapisi, dirençli

bakteri enfeksiyonlarının antimikrobiyal tedavisinde bir alternatif olarak litik döngüleriyle kullanılmaktadır.

Fajların insan enfeksiyonlarındaki potansiyeli: faj terapisi dışında, gen iletimi için nanokafesler, gıda biyoprezervasyonu ve güvenliği, bitki patojenlerinin biyokontrolü, bakteriyel biyosensör cihazları, aşular ve aşı taşıyıcıları, biyofilm ve bakteriyel büyüme kontrolü, yüzey dezenfeksiyonu, korozyon kontrolü, yapısal ve işlevsel stabilizasyon gibi konuları içermektedir. Bu alanlarda özellikle faj enzimlerinin büyük potansiyel göstereceği öngörülmektedir.

Fajlar hücreler arası yayılımlarını sınırlama kapasiteleriyle spesifik tedaviler için büyük potansiyel taşımaktadırlar (Lu ve Koeris, 2011). Fajların endolizinleri spesifik hücrelerin peptidoglikan bileşenlerinin hidrolizasyonunda görev alan faj enzimleridir. Özellikle son yıllarda enzim temelli çalışmalar büyük önem taşımakta aynı zamanda sentetik enzimlerin üretilmesi ve biyoteknolojik uygulamaları yaygın şekilde araştırılmaktadır. Fajlar enzim içermeleri ve spesifik olmalarıyla da enzim temelli teknolojiler için büyük önem taşımaktadır. Aynı zamanda enzimlerin genetik kontrolünde büyük önem taşıyan fajlar gen ve enzim çalışmaları için uygun kullanılabilirliğe sahiptirler (Elois vd. 2023).

Fajların antimikrobiyal ajan olarak potansiyelinin sıklıkla bildirilmesinin yanında fajlardan elde edilen enzim vb., ürünlerde hızla araştırılmaktadır (Bertozzi Silva ve Sauvageau 2014). Bakteri yüzeylerindeki polisakkaritlerin varlığı ve/veya bakterilerin biyofilm formunda yaşaması gibi özellikler fajların aktivitesini engellemektedir. Endolizinleri içeren uygulamalar bu olumsuzluklarında önüne geçebildiği için fajların potansiyelini dahada arttırmaktadır.

Antikorlar, enzimler veya nükleik asitler geleneksel olarak farklı transdüksiyon mekanizmalarına dayalı hassas ve seçici analitik yöntemlerin geliştirilmesinde kullanılmış olsa da bakteriyofajlar son zamanlarda biyosensör ve görüntüleme için prob olarak kullanılmak üzere analitik kimya başta olmak üzere tüm teknolojiler için büyük ilgi görmektedir (Peltomaa vd. 2016).

Fajlar tarafından kodlanan proteinlerden, endolizinler peptidoglikanı parçalayarak, hollinler ise enfekte hücrenin hücre zarını parçalayarak önemli antibakteriyel etkiler göstermişlerdir. Bakteriyofajların replikasyon siklusunun

son aşamasında konak tarafından sentez ettirilen konağın peptidoglikan yapısını hidrolize ederek fajın serbest kalmasını sağlayan enzimdir

Çalışmalar özellikle hücre duvarı peptidoglikanını parçalayan bakteriyofaj enzimleri (virion ilişkili lizinler ve endolizinler) odaklanmakta ve çok sayıda in vitro ve in vivo çalışma, bu enzimlerin antibiyotiklere alternatif olarak olası kullanımını üzerine yoğunlaşmaktadır.

Endolizinler, bakteriyofaj litik enzimleridir ve hücrede bakteriyofajın büyümesi sırasında üretilen enzimler olarak bilinmektedir. Endolizinler, bakterinin hücre duvarını ve hücre zarını bozarak ve yeni oluşan virüsleri serbest bırakarak hücre ölümüne neden olmaktadır. Endolizinler, pH ve sıcaklıktaki değişikliklere karşı daha sürdürülebilir ve daha kararlı oldukları için gıda uygulamaları için uygun olabilmektedirler.

Enzimatik aktivitelerine göre, yani kırabildikleri peptidoglikan bağının türüne bağlı olarak, endolizinler farklı gruplara sınıflandırılmaktadır.

**Litik transglikozilazlar** (örn. T7 faj gp16 proteini) kompleks şekerlerdeki glikozidik bağları kırabilmektedirler.

**Endopeptidazlar** (örn. Tuc2009 fajından Tal2009) terminal olmayan amino asitlerdeki peptit bağlarını kırabilmektedirler.

**Lizozimler** (örn. faj T4 gp5 proteini) konağının dış zarıyla kaynaşarak peptidoglikan tabakasını parçalayabilmektedir.

**Glukozaminidazlar** GlcNAc- ( $\beta$ -1,4)-MurNAc bağı kesen çekirdek-spesifik enzimlerdir.

Bir diğer uygulanabilir alternatif, kapsüllenmiş bakterilerin hücre dışı maddelerini parçalayabilen ve fajlardan türetilen enzimlerin kullanımınıdır, örneğin *Escherichia coli* K1, *Vibrio cholerae* O139 ve *Pseudomonas* suşları, enfeksiyonun erken evrelerini kolaylaştırmakta ve fajların reseptörlerine bağlanmasına yardımcı olmaktadır.

Şu ana kadar belirlenen fajların büyük çoğunluğu, spesifik membran yüzey reseptörleri ifade eden bakteri hücreleriyle etkileşime girmektedir. Bakteri hücresi yüzeyinde belirli bir faj için spesifik bir reseptör açığa çıkarmazsa, faj onu enfekte edememektedir bu da bir fajın belirli bir bakteri konağına karşı doğal olarak yüksek özgüllüğünü göstermektedir.



Araştırmacılar, her bakteri hücresi için yaklaşık on farklı bakteriyofaj olduğunu ve bunlardan bazılarının bakteri konakçıları için oldukça spesifik olduğunu (ya monofajlar (sadece bir reseptör türünü tanır) ya da polifajlar (daha geniş bir konakçı aralığı gösterir ve birden fazla reseptör türünü tanır) ileri sürmektedir.

Bakteriyofajlarda bakteri zarının yüzeyindeki belirli molekülleri tanıtmaktan sorumlu reseptör bağlayıcı proteinleri içeren bir taban plakasına bağlı altı kuyruk lifi bulunmaktadır.

Fajların hücreler arası yayılımlarını kontrol edebilme yetenekleri onların tedavide spesifik olarak kullanımlarına olanak sağlamaktadır (Lu ve Koeris, 2011). Fajların direkt kullanımlarının yanında fajlardan elde edilen ürünlerde yaygın olarak araştırmalara konu olmakta ve özellikle son zamanlarda bu ürünlerin potansiyeli hızla artmaktadır. Faj temelli ürünlerinin en bilinenlerinden olan endolizinler spesifik hücrelerin peptidoglikan komponentlerini hidrolize etme özelliği olan enzimleridir. Fajların endolizinleri ile ilgili ilk araştırmalar Vincent Fichetti ile 1940 yılında başlamıştır. Endolizinler bakterilerin hücre duvar yapılarını bozarak bakterinin yok olmasına neden olacak lizler oluşturmaktadır. Birçok Gram pozitif patojenik mikroorganizmanın enfeksiyonları ile mücadelesinde lizinlerin etkin bir şekilde kullanılabilmesi farelerde ile yapılan çalışmalarla ortaya konmaktadır. Bu deneylerle ortaya konan veriler insanlardaki enfeksiyonların tedavisi içinde büyük bir potansiyel göstermektedir (Fischetti, 2010). Fajların kodladığı endolizinlerin antibiyotik benzeri şekilde kullanımlarının araştırılması değerlendirilmektedir. Hücre duvarındaki dört temel bağa etki edebilen lizinler bu özellikleriyle bakteriyel enfeksiyonlar için büyük önem taşımaktadır. Üst-alt solunum yolları, intestinal, ürogenital veya oküler mukozalardaki *stafilokok*, *streptokok* veya *pnömokok* gibi mikroorganizmaların neden olduğu viral veya bakteriyel insan enfeksiyonları için özellikle kullanımları yaygın olarak düşünülmektedir. Özellikle hayvan modelleri ile gerçekleştirilen araştırmalarda mukozal kolonizasyonu engellemek amacıyla faj lizinleri kullanılmaktadır.

Benzer çalışmaların önemli örneklerinden bir tanesi Loeffler vd. (2001) tarafından nazofarengal *Streptococcus pneumoniae* taşıyıcılığını azaltmak (Loeffler vd. 2001) diğeri Nelson vd. (2001) üst solunum yollarındaki *Streptococcus pyogenes* taşıyıcılığını önlemek (Nelson vd. 2001) amacıyla

gerçekleştirilmiştir. Özellikle Lambda profajı özel bir enzim sistemiyle kromozomun belli bir bölgesine tutunabilmektedir.

Çeşitli çalışmalar aynı zamanda, bakteriyofajların sistemik uygulama sonrasında kanser hücrelerine gen ve ilaçların etkili ve hedeflenmiş bir şekilde iletilmesini sağlayan vektörler oluşturmak için kullanılabileceğini göstermektedir. Fajların yapısı ve biyolojik özellikleri ve yukarıda bahsedildiği şekilde çeşitli tıbbi uygulamalarda kullanımının kanıtlanmış güvenliği, onları kanser tedavisi için potansiyel olarak güçlü bir araç haline getirmektedir. Bakteriyofajlar kanser aşılı geliştirmek için aktif olarak kullanılmaktadır. Fajların çevre koşullarına karşı son derece yüksek stabilitesi ve direnci, tümörlere çeşitli terapötikleri seçici olarak iletmek için kullanılmaktadır. MS2 ve P22 gibi fajların kapsidleri, sırasıyla HCC hücrelerine terapötik kodlamayan RNA'ları ve servikal karsinom hücrelerine sitokrom P450'yi iletmek için başarıyla kullanılmıştır. Bakteriyofajlar, ışık ve belirli bir fotosensitizörün etkileşimi sonucunda tümör dokusunda reaktif oksijen türlerinin oluşumuna dayanan fotodinamik kanser tedavisinde uygulama bulmuştur. Bu fotosensitizörlerin meme kanseri hücrelerine seçici faj aracılı iletimi, tümör canlılığında gözle görülür bir azalma sağladığı bildirilmektedir. Seçici kanser tedavisine yönelik birçok faj aracılı yaklaşım vardır; ancak en ilgi çekici olanlar, virüs genetik materyalinin hücre sel moleküler etkileşimine dayanan yöntemlerdir. Fajların kanser gen terapisi için vektör olarak kullanımıyla ilgili en son verilerin oldukça umut verici olduğu görülmektedir (Petrov vd. 2022).

Fajların memeli hücreleriyle doğrudan etkileşime girme yeteneğine dair ilk kanıt 1940'lara dayanır ve Bloch tarafından belirlenmiş ve bu çalışma, bakteriyofajların kanserli dokularda birikme ve tümör büyümesini engelleme yeteneğini ortaya koymuştur. Daha sonra, Kantoch, fajların kobay lökositlerine bağlanma ve onları içselleştirme yeteneğini belirlemiştir (Bakhshinejad vd. 2014). Güncel çalışmalar fajların memeli bağışıklık sistemi hücreleriyle etkileşimlerinin yüksek sıklığını doğrulamaktadır. Lambda fajının insan fibroblast hücreleriyle etkileşime girme yeteneğini 1970'lerde gösterilmiştir (Merril vd. 1972). Sonuç olarak bakteriyofajlar giderek artan sayıda çalışma ve klinik denemede kanser için gen terapisi vektörleri olarak kullanılmakta ve başarı oranlarını hızla arttırmaktadırlar.

Litik yaşam döngüsünün sonuna doğru, bazı bakteriyofajlar, hem Gram (+) hem de Gram (-) bakterilerin hücre duvarı peptidoglikanın (murein) enzimatik bozunmasına neden olan ve yavru virionları serbest bırakan

“endolizin” adı verilen bir enzim üretmektedirler (Schmelcher ve Loessner, 2016). Gram (+) ve Gram (-) bakterileri hedef alan endolizinler yapısal olarak birbirlerinden farklıdır. Gram (+) hedef alan endolizinler modüler bir yapıya ve iki korunmuş protein alanına sahiptir ve bu alanlar peptidoglikanı hidrolize ederek konak hücrenin lizisini sağlayan N-terminal enzimatik olarak aktif alan ve substratı tanımak için gereken C-terminal hücre duvarı bağlanma alanı olarak isimlendirilmektedir (Villa ve Crespo, 2010).

Enzimatik olarak aktif alan hücre duvarını katalize etmekte ve bunların sınıflandırılması Gram (+) ve Gram (-) bakterilerdeki peptidoglikandaki kesme bölgelerine dayandırılmaktadır. Enzimatik olarak aktif alan glikozidazları, endopeptidazlar, litik transglikozilaz ve amidohidrolaz türleri bulunmaktadır. Bir glikozidaz türü olarak bilinen N-asetilglukozaminidaz, GlcNAc'nin indirgeyici etki etmekte ve peptidoglikanda bulunan glikan bileşenlerini kesmekle görevlidir; bu aktivite otolizinlerde görülmektedir. Bir diğer glikozidik aktivite ise MurNAc'nin indirgeyici bölgesinde etki eden ve glikan bileşenini kesen N-asetilmuramidazdır (Nelson vd. 2012). Enzim aktivitelere göre sınıflandırmaya dahil edilen bir diğer grup ise proteaz olarak da bilinen endopeptidazlardır. Bu enzim iki amino asit arasındaki peptit bağlarını koparmaktan sorumludur. Endopeptidazlar, interpeptit köprüsünde veya kök peptitlerde yer alabilmektedirler (Loessner vd. 1995; Navarre vd. 1999). Diğer hidrolazların aksine, üçüncü grup olan litik transglikozilazlar, peptidoglikanın katalizlenmesi için suya ihtiyaç duymazlar. N-asetilmuramil ve N-asetilglukozaminil kalıntıları arasındaki  $\beta$  (1→4) bağlarını koparmaktan sorumludurlar. Bu açıdan muramidazlara benzerdirler. Litik transglikozilazların farklı bir grupta sınıflandırılmasının nedeni, glikozidik bölünme meydana gelirken N-asetil-1,6-anhidro-muramil parça kalıntısı oluşturmalarıdır. Peptidoglikan hidrolaz için sınıflandırılan son grup amidohidrolazlardır. N-asetilmuramoil-l-alanin amidaz, peptidoglikanın glikan ve peptit kısımları arasındaki temel bir amid bağının kesilmesinde rol oynamaktadırlar. Bu amid bağının kırılmasıyla, peptidoglikan diğer bağların hidrolizine kıyasla oldukça dengesizleşir ve bu nedenle bakteriyofajlar tarafından evrimsel olarak tercih edilmektedirler (Nelson vd. 2012).

Spesifik olmaları, antibiyotiklerin aksine mikroflorayı bozmamaları, endolizinelere karşı bakteriyel direnç olasılığının düşük olması ve insanlar ve hayvanlar üzerinde herhangi bir olumsuz etkiye sahip olmamaları endolizinlerin yüksek popülaritesinin kanıtıdır (Nelson vd. 2012). Aynı zamanda Gram (-) bakterileri hedef alan bakteriyofajlar tarafından üretilen

endolizinlerin modüler yapılarının sayısı da artmış olup, bu modüler yapıların özellikle jumbo bakteriyofajlarda tanımlandığı gözlemlenmiştir (Briers vd. 2007). Gram (+) hedefli endolizinlerle karşılaştırıldığında, Gram (-) hedefli endolizinler daha yavaş bakteri öldürme kinetiğine sahiptir. 2018 yılında yapılan çalışmaya göre, *Escherichia coli* hedefli bir lizin olan bakteriyofaj PlyE146'dan elde edilen endolizin, 1 saatlik inkübasyondan sonra öldürme etkisi ve 2 saat sonra 3,6 log azalma göstermiştir (Larpin vd. 2018). Endolizinin etkisi *E. coli* hücrelerinde yalnızca 30 dakikalık maruziyetten sonra gözlenirken, Gram (+) bakteri hedefli endolizinlerde 5 dakika sonra gözlenmiştir (Pastagia vd. 2013). Yavaş öldürme kinetiği, dış membranın ilk yavaş penetrasyonundan sonra peptidoglikan hidrolizi ile, yani iki aşamalı bir mekanizma ile açıklanmıştır. Sykilinda vd. (2018) endolizinin *Acinobacter baumannii*'ye karşı öldürücü etkisinin birkaç dakika içinde başladığını ve 1-2 saat içinde maksimuma ulaştığını göstermiştir (Sykilinda vd. 2018). Ancak bazı çalışmalar Gram (-) endolizinlerin de kısmen hızlı bir şekilde öldürebileceğini göstermiştir. *Pseudomonas aeruginosa*'yı etkileyen PlyPa03 ve PlyPa91 lizinleri sırasıyla 5 ve 20 dakikada bakteri popülasyonunu azaltmıştır (Raz vd. 2019). Endolizinlerin hızlı öldürme kinetiği ayrıca bakterinin iç ozmotik basıncıyla da ilişkilendirilmiştir (Lai vd. 2020). Öte yandan, dsDNA içeren bakteriyofajlar, endolizine ek olarak, peptidoglikanı parçalamak için konak hücrenin lizi sırasında holin adı verilen bir proteine ihtiyaç duymaktadırlar. Holinler, endolizinlerin amacına ulaşmasını sağlamak için membranda delikler açmakla görevli küçük membran proteinleridir ve peptidoglikan glikozidik bağlarını, amid bağlarını veya peptid bağlarını kesmeye çalışmaktadırlar (Xu vd. 2005). Litik yaşam döngüsünün ardından, bakteriyofajlar bu döngünün sonuna doğru holin-endolizin sistemiyle endolizin üretmekte ve sitoplazmaya dolmaktadır. Holinler, endolizinin substratına ulaştığı sitoplazmik membranda delikler oluştururlar. Peptidoglikan parçalandıktan sonra, hücrede ozmotik bir dengesizlik olur ve hücre lizi meydana gelmektedir. Holin-endolysin sistemi lambda paradigması olarak bilinir ve salgı sinyallerinden yoksundur. Lambda paradigmasına alternatif olarak, konak Sec mekanizması kullanabilmektedir. Sec mekanizması, bakteriyel proteinlerin sitoplazmik zar boyunca taşınmasını sağlayan bir mekanizmadır (Jiang vd. 2021). Endolizinlerdeki N-terminal sinyal dizileri Sec mekanizmasını kullanırsa, holin ihtiyacı olmadan peptidoglikana ulaşabilir ve onu parçalayabilirler (Fischetti, 2010).

Başka bir alternatif, endolizinlerin bölünemez N-terminal tip II sinyal çapasını içerdiği tek tutuklama-serbest bırakma (SAR) sistemidir. Bu sistemde,

N-terminal tip II sinyal çapası aktif formda değildir ve iç hücre zarına gömülüdür. Ancak bu noktada, endolizinlerin konak hücre duvarına ulaşmak için membran depolarizasyonu sağlamak amacıyla pinholinlere ihtiyacı vardır (Xu vd. 2005).

### **Endolizinler ve virionla ilişkili peptidoglikan hidrolazlar**

Fajlar, muramidaz, transglikozilaz, glukozaminidaz, amidaz ve endopeptidaz dahil olmak üzere çok çeşitli PG parçalayıcı enzimler üretebilmektedirler. Farklı mikroorganizma türlerinde enzim isimlendirmeleri çeşitlilik gösterebilmektedir. Örneğin mikobakteriler, mikolil-arabinogalaktan-peptidoglikan kompleksinden (mAGP) oluşan mikomembrana sahip belirli bir hücre duvarı yapısına sahiptir. Bu nedenle mikobakteriyofajlar, LysA (PG hidrolaz, endolizin olarak bilinmektedir) ve LysB (mikolilarabinogalaktan esteraz) olmak üzere iki tür hücre duvarı hidrolitik enzimi ile donatılmıştır (Azeredo vd. 2021).

Ekzopolisakkarit parçalama aktivitesine sahip kuyrukla ilişkili proteinlerdir. Enzim aktivitesine göre sınıflandırmaya dahil edilen bir diğer grup, proteazlar olarak da bilinen endopeptidazlardır. Bu enzim, iki amino asit arasındaki peptit bağlarını koparmaktan sorumludur. Endopeptidazlar, interpeptit köprüsünde veya kök peptitlerde yer alabilmektedir (Loessner vd. 1995; Navarre vd. 1999).

*Pseudomonas* bakteriyofajlarından elde edilen küresel ve modüler endolizinler üzerinde yapılan deneyler hızla artmakta ve substrat özgüllükleri üzerine denemeler devam etmektedir (Walmagh vd. 2013; Walmagh Maarten ve Briers, 2012). Bakteriyofajlar tarafından üretilen enzimler olan endolizinler, bakterilerin peptidoglikan yapısını etkilemektedir. Glikozidik bağları kopararak, peptit çapraz bağlarını hidrolize ederek, peptidoglikanın kafes yapısını bozarak bakterinin parça lizisine sebep olmaktadır (Young vd. 2000).

Endolizinler, bakteriyofajlara kıyasla daha geniş bir aktivite aralığına sahip olmaları, daha geniş bir pH ve sıcaklık aralığında stabil olmaları, enzimlere veya kimyasallara karşı daha dirençli olmaları ve daha uzun bir raf ömrüne sahip olmaları nedeniyle son zamanlarda daha önemli bir yer edinmiştir (Murray vd. 2021).

Etki mekanizmalarına göre, varsayılan faj depolimerazlar; hidrolazlar ve liyazlar olmak üzere iki ana grupta toplanmaktadır. Bu iki ana grup kendi içinde

alt gruplara ayrılmaktadır. Tüm *Caudovirales* fajları tarafından kodlanan yapısal lipopolisakarit ve peptidoglikanı hidrolaze eden enzimler olan ekzozimlerin (yapısal lizinler) veya endozimlerin daha önce tanımlanmış ve raporlanmıştır (Oliveira vd. 2013). Bu nedenle, çalışmalar hücre dışı polimerik maddeleri parçalayan daha az keşfedilmiş enzimlere odaklanmaktadır. Buda faj temelli çalışmalar için büyük önem taşımaktadır.

## **Faj depolimerazlarının çeşitliliği**

### **Hidrolazlar**

O-glikozil hidrolazlar, glikozidik bağların hidrolizini katalize eden enzimlerdir (Davies ve Henrissat 1995). Bu enzim sınıfında, altı farklı faj depolimerazı grubu bulunmaktadır: sialidazlar, levanazlar, ksilozidazlar, dekstranazlar, ramnosidazlar ve peptidazlar (Tablo 1).

### **Liyazlar**

Polisakarit liyazlar,  $\beta$ -eliminasyon mekanizmasıyla (1,4) glikozidik bağları kesen bir enzim sınıfıdır (Sutherland 1995; Michaud vd. 2003). Bu enzim sınıfı, üç faj depolimerazı grubunu içerir: hiyaluronat, aljinat ve pektin/pektat liyazları.

### **Diğerleri**

Lipazlar veya triasilgliserol hidrolazlar, organik asitleri ve gliserölü serbest bırakmak için triasilgliserollerin karboksil ester bağları üzerinde etki eden enzimlerdir (Jaeger vd. 1994; Gupta vd. 2004).

Lipazlar doğada her yerde bulunabilmektedirler. Farklı organizma türleri tarafından üretilen lipazlar aynı zamanda bakteriler tarafından da üretilmektedirler. Lipaz üreten en önemli bakteri türleri arasında *Bacillus*, *Pseudomonas* ve *Burkholderia* sayılabilmektedir (Gupta vd. 2004).

Son yıllarda çalışmalar lipazlar üzerinde yoğunlaşmakta ve çalışmalar sekiz *Cellulophaga* fajında ve bir *Pseudomonas* fajında lipit hidroliz aktivitesine sahip yalnızca bir faj depolimeraz alanı (Lipase\_GDSL\_3) bulunduğu belirtilmektedir (Pires vd. 2016)

Farklı enzim sınıfları, bulunan tahmini depolimerazlar ve bunların uygulama alanları ile fajlarda depolimeraz aktivitesi bulunan her konak bakteri grupları bildirilmiştir (Tablo 2,3). Bakteriyofajların aşağıda verilen enzimlerinin çeşitli alanlarda kullanımı hızla artmaktadır (Pires vd. 2016).

**Tablo 2.** Hidrolaz grubu enzimlerin kullanım alanları ve ilgili mikroorganizmalar

<b>Hidrolazlar</b>	Sialidase	Tıbbi endüstride (klinik açıdan önemli asialoproteinlerin işlenmesi için kullanılmaktadırlar)	<i>Bacillus</i> <i>Enterobacter</i> <i>Escherichia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Prochlorococcus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Serratia</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Streptomyces</i>
	Levenase	Gıda endüstrisinde (levan oligosakkaritlerinin üretimi, polifruktanların hidrolizinde rol oynayan enzimler endüstriyel uygulamalar için ilgi çekicidir)	<i>Bacillus</i>
	Ksilanazlar	Kimya endüstrisinde (odun hamurunun biyolojik ağartılması ve tekstillerin biyolojik işlenmesinde) Gıda endüstrisi (kümes hayvanlarına ve buğday işlemede gıda katkı maddeleri)	<i>Caulobacter</i>
		İşleme endüstrisinde (ksilanın ksilitol gibi daha yüksek katma değerli ürünlere biyolojik dönüşümü) Biyoenjerji endüstrisinde (daha ekonomik biyorafinasyon süreçleri için)	
	Dextranases	Gıda endüstrisinde (şeker pancarı işleme)	<i>Lactobacillus</i>
Rhamnosidase	Gıda endüstrisinde (narenciye meyve sularından acılığın giderilmesi) Şarap yapımı (aroma geliştirme) Tıbbi endüstri (ilaç hazırlama)	<i>Escherichia</i> <i>Salmonella</i> <i>Shigella</i>	

**Tablo 3.** Liyaz grubu enzimlerin kullanım alanları ve ilgili mikroorganizmalar

<b>Liyazlar</b>	Hyaluronidases	Tıbbi endüstride (birçok alanda lokal anestezinin etkinliğini artırmak için)	<i>Streptococcus</i>
	Aljinat liyazları	Biyo-fonksiyonel aljinat oligosakkaritlerinin hazırlanması (bifidobakteri florasını artırır) Tıbbi uygulamalar (kistik fibrozis tedavisi için antibiyotiklerle birlikte uygulama) Gıda endüstrisi (gıda katkı maddeleri, stabilizatör ve jelleştirici maddeler)	<i>Azotobacter</i> <i>Pseudomonas</i>
	Pektin/pektat liyazlar	Gıda ve şarap yapım endüstrisinde (meyve suyu çıkarma ve berraklaştırma)	<i>Bacillus</i> <i>Brucella</i> <i>Burkholderia</i> <i>Cellulophaga</i> <i>Clostridium</i> <i>Cronobacter</i> <i>Enterobacter</i> <i>Escherichia</i> <i>Erwinia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Pantoea</i> <i>Shigella</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Streptomyces</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Salmonella</i> <i>Serratia</i>
	Diğer liyazlar		<i>Cellulophaga</i> <i>Pseudomonas</i>

### Endolizin Uygulamaları

Bakteriyofajların uygulama alanlarından yukarıda bahsettik. Bununla birlikte başta gıda endüstrisinde umut vadeden bir yöntem olsa da faj kullanımının bazı dezavantajları olabilmektedir. Bu nedenle, bakterilerde antibiyotik direncine neden olan mekanizmalardan biri olan transdüksiyonu önleyecek bir bakteriyofaj seçilmelidir (Shannon vd. 2020). Aynı zamanda fajlar fermentasyonu yavaşlatarak ve ürünün kalitesini düşürerek süt endüstrisindeki maya kültürleri için tehdit oluşturabilmektedir (Brüssow,



2001). Bu nedenle, gıda endüstrisinde, endolizinlerin bakteriyofajların yerine antimikrobiyal aday olarak kullanılabilmesi bildirilmektedir. Endolizinler sadece gıda endüstrisinde değil, aynı zamanda tarım, veterinerlik ve tıp gibi alanlarda da kullanılmaya başlanmıştır.

Fitopatojenik bakteriler tarımda gıda güvenliğini tehdit etmektedir. Bu nedenle, endolizinler gıda güvenliğini sağlamak ve bakteriyel hastalıkları önlemek için bir çözüm olarak kullanılmaktadır. Gram (-) bakterisi *Agrobacterium tumefaciens*'in hedeflenen endolizinlerinin bu bakteriyi parçalama yeteneğine sahip olduğu gözlemlenmiştir (Attai vd. 2017). Kivi üretiminde bir sorun olan *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*'ye (Psa) karşı etki eden EDTA ile endolizin LysPN09'un sinerjik kombinasyonu ile litik aktivite göstermiştir (Ni vd. 2021). Kanser neden olabilen bir bakteri türü olan *Clavibacter michiganensis*, CMP1 bakteriyofaj endolizinleri ile transgenik domatesler tarafından inhibe edilmiştir (Hausbeck vd. 2000). Benzer bir çalışmada, transgenik patateslerin çürümeye neden olan bakteri *Pectobacterium carotovora*'ya karşı dirençli olduğu belirtilmiştir (Düring vd. 1993). Bu açıdan bakıldığında, endolizinlerin öngörü mekanizmalarıyla transgenik bitkilerin antibiyotiklere ihtiyaç duymadan gıda güvenliğini sağlayabileceği söylenebilir.

Pirinçte yaprak yanıklığına neden olan *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* bakterisinin bazı suşları antibiyotik direncine sahiptir. 2006 yılında yapılan bir çalışma sonucunda, Lys411 endolizinin *Xanthomonas*'a karşı litik aktiviteye sahip olduğu anlaşılmıştır. *Stafilokok* ve *Streptokok* bakterileri hayvancılık ve süt endüstrisinde bir sorun oluşturmaktadır (Donovan vd. 2006). İneklerde meme bezinin iltihaplanmasına (sığırmastitisi) neden olarak süt kalitesini ve güvenliğini azaltır. Bu nedenle, 2015 yılında Schmelcher vd. sığırmastitis farelerine *Streptokokkal* bakteriyofaj endolizinleri uygulamışlardır (Schmelcher vd. 2015). Fare meme kanalına enjekte edilen endolizinlerin kullanılan *Streptokokkal* suşların konsantrasyonunu azalttığı gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, *Staphylococcus aureus*'un neden olduğu mastitisi önlemek için fareler, bakteriyofaj endolizinlerine modüler yapıda benzer olan bakteriyosin lizostafin ile tedavi edilmiş ve bakteri konsantrasyonunda azalmalar gözlemlendiği bildirilmiştir (Schmelcher vd. 2012).

Farelerin model olarak kullanılması ve ineklere endolizin verilmesi tam olarak aynı sonuçları vermeyebilmektedir. Bu nedenle, başka bir çalışmada, transgenik ineklerin lizostafin salgıladığı ve *S. aureus*'un neden olduğu

mastitise karşı direnç gösterdiği belirtilmiştir (Wall vd. 2005). Bir çalışmaya göre, Streptokok bakteriyofajından saflaştırılmış bir endolizin farelere oral yoldan verildiğinde, 2 saat sonra hiçbir Streptokok gözlenmediği bildirilmiştir (Nelson vd. 2001). Benzer bir çalışmada, kolonize farelere enzim tedavisi olarak uygulanan pnömokok bakteriyofaj endolizini Pal, penisiline dirençli suşlar da dahil olmak üzere 15 pnömokok serotipi öldürdüğü bildirilmiştir (Loeffler vd. 2001).

Çalışmalar göstermektedir ki hem bakteriyofajlar hem de onlardan elde edilen endolizinler tıp, sağlık, gıda, endüstri, ekonomi, çevre ve birçok alanda büyük önem taşımakta ve kullanımı yaygınlaşmaktadır.

## KAYNAKLAR

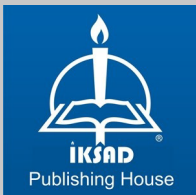
- Attai, H., Rimbey, J., Smith, G. P., & Brown, P. J. B. (2017). Expression of a peptidoglycan hydrolase from lytic bacteriophages Atu\_ph02 and Atu\_ph03 triggers lysis of *Agrobacterium tumefaciens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(23), e01498-17.
- Azeredo, J., Garcia, P., & Drulis-Kawa, Z. (2021). Targeting biofilms using phages and their enzymes. *Current Opinion in Biotechnology*, 68, 251-261.
- Bakhshinejad, B., Sadeghizadeh, M. (2014). Bacteriophages as vehicles for gene delivery into mammalian cells: Prospects and problems. *Expert Opin. Drug Deliv.* 11, 1561–1574.
- Bertozi Silva J, Sauvageau, D (2014). Bacteriophages as antimicrobial agents against bacterial contaminants in yeast fermentation processes. *Biotechnol Biofuels* 7:123.
- Brüssow, H. (2001). Phages of dairy bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 283–303.
- Briers, Y., Volckaert, G., Cornelissen, A., Lagaert, S., Michiels, C. W., Hertveldt, K., & Lavigne, R. (2007). Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages  $\phi$ KZ and EL. *Molecular Microbiology*, 65(5), 1334–1344.
- Cairns, J. et al., eds (2006) *Phage and the Origins of Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Carvalho, C., Costa, A. R., Silva, F., & Oliveira, A. (2017). Bacteriophages and their derivatives for the treatment and control of food-producing animal infections. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(5), 583–601.
- Chan, B.K., Abedon, S.T., 2012. Phage therapy pharmacology phage cocktails. In: In: Laskin, A.I., Sariaslani, S., Gadd, G.M. (Eds.), *Advances in Applied Microbiology* Vol. 78. Elsevier Academic Press Inc., San Diego, pp. 1–23.
- Chang, Y., Yoon, H., Kang, D.-H., Chang, P.-S., & Ryu, S. (2017). Endolysin LysSA97 is synergistic with carvacrol in controlling *Staphylococcus aureus* in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 244, 19–26.
- Chibani-Chennoufi, S., Bruttin, A., Dillmann, M.-L., & Brüssow, H. (2004). Phage-Host Interaction: an Ecological Perspective. *Journal of Bacteriology*, 186(12), 3677–3686.
- Clokic, M.R., Millard, A.D., Letarov, A.V., Heaphy, S (2011) Phages in nature. *Bacteriophage* 1:31–45.
- Davies, G., Henrissat, B (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3:853–859.
- Donovan, D. M., Dong, S., Garrett, W., Rousseau, G. M., Moineau, S., & Pritchard, D. G. (2006). Peptidoglycan hydrolase fusions maintain their parental specificities. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2988–2996.
- Düring, K., Porsch, P., Fladung, M., & Lörz, H. (1993). Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. *The Plant Journal*, 3(4), 587–598.
- Elois, M. A., Silva, R. D., Pilati, G. V. T., Rodríguez-Lázaro, D., & Fongaro, G. (2023). Bacteriophages as biotechnological tools. *Viruses*, 15(2), 349.

- Fischetti, V. A. (2010). Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(6), 357–362.
- Gupta R, Gupta N, Rathi P (2004) Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:763–781.
- Hankin, E. H., (1896). L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du cholera, *Ann. Inst. Pasteur*, 10(5), II.
- Haq, U.I., Chaudhry, W.N., Akhtar, M.N., Andleeb, S., Qadri, I. (2012). Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Virology Journal*. (9), 1-9.
- Harada LK, Silva EC, Campos WF, Del Fiol FS, Vila M, Dąbrowska K, Krylov VN, Balcão VM. Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiol Res*. 2018 Jul-Aug;212-213:38-58.
- Hatfull, G. F., & Hendrix, R. W. (2011). Bacteriophages and their genomes. *Current Opinion in Virology*, 1(4), 298–303.
- Hausbeck, M. K., Bell, J., Medina-Mora, C., Podolsky, R., & Fulbright, D. W. (2000). Effect of bactericides on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field. *Phytopathology*, 90(1), 38–44.
- Jaeger KE, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, van Heuvel M, Misset O (1994) Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* 15:29–63.
- Jiang, Y., Xu, D., Wang, L., Qu, M., Li, F., Tan, Z., & Yao, L. (2021). Characterization of a broad-spectrum endolysin LysSPI encoded by a *Salmonella* bacteriophage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(13), 5461–5470.
- Keen, E. C. (2015). A century of phage research: bacteriophages and the shaping of modern biology. *Bioessays*, 37(1), 6–9.
- Kutateladze, M., Adamia, R (2010) Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends Biotechnol* 28: 591–595.
- Lai, W. C. B., Chen, X., Ho, M. K. Y., Xia, J., & Leung, S. S. Y. (2020). Bacteriophage-derived endolysins to target gram-negative bacteria. *International Journal of Pharmaceutics*, 589, 119833.
- Larpin, Y., Oechslin, F., Moreillon, P., Resch, G., Entenza, J. M., & Mancini, S. (2018). In vitro characterization of PlyE146, a novel phage lysin that targets Gram-negative bacteria. *PLoS One*, 13(2), e0192507.
- Loeffler, J. M., Nelson, D., & Fischetti, V. A. (2001). Rapid Killing of *Streptococcus pneumoniae* with a Bacteriophage Cell Wall Hydrolase. *Science*, 294(5549), 2170–2172.
- Loessner, M. J., Wendlinger, G., & Scherer, S. (1995). Heterogeneous endolysins in *Listeria monocytogenes* bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes. *Molecular Microbiology*, 16(6), 1231–1241.
- Lu, T. K., & Koeris, M. S. (2011). The next generation of bacteriophage therapy. *Current opinion in microbiology*, 14(5), 524-531.
- Merril, C. R., Scholl, D., & Adhya, S. L. (2003). The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(6), 489–497.

- Merril, C.R.; Friedman, T.B.; Attallah, A.F.M.; Geier, M.R.; Krell, K.; Yarkin, R. Isolation of bacteriophages from commercial sera. *In Vitro. Cell. Dev. Biol.* 1972, 8, 91–93.
- Michaud P., Da Costa A., Courtois B., Courtois J (2003) Polysaccharide lyases: recent developments as biotechnological tools. *Crit Rev Biotechnol* 23:233–266.
- Misiou, O., van Nassau, T. J., Lenz, C. A., & Vogel, R. F. (2018). The preservation of Listeria-critical foods by a combination of endolysin and high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 266, 355–362.
- Motlagh, A. M., Bhattacharjee, A. S., & Goel, R. (2015). Microbiological study of bacteriophage induction in the presence of chemical stress factors in enhanced biological phosphorus removal (EBPR). *Water Research*, 81, 1–14.
- Murray, E., Draper, L. A., Ross, R. P., & Hill, C. (2021). The advantages and challenges of using endolysins in a clinical setting. *Viruses*, 13(4), 680.
- Navarre, W. W., Ton-That, H., Faull, K. F., & Schneewind, O. (1999). Multiple enzymatic activities of the murein hydrolase from staphylococcal phage  $\phi$ 11: Identification of a D-alanyl-glycine endopeptidase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 274(22), 15847-15856.
- Nelson, D. C., Schmelcher, M., Rodriguez-Rubio, L., Klumpp, J., Pritchard, D. G., Dong, S., & Donovan, D. M. (2012). Chapter 7- Endolysins as Antimicrobials. In M. Łobocka & W. Szybalski (Eds.), *Bacteriophages, Part B* (Vol. 83, pp. 299–365). Academic Press.
- Nelson, D., Loomis, L., & Fischetti, V. A. (2001). Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(7), 4107–4112.
- Ni, P., Wang, L., Deng, B., Jiu, S., Ma, C., Zhang, C., Almeida, A., Wang, D., Xu, W., & Wang, S. (2021). Characterization of a lytic bacteriophage against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and its endolysin. *Viruses*, 13(4), 631.
- Oliveira H, Melo LDR, Santos SB, Nóbrega FL, Ferreira EC, Cerca N, Azeredo J, Kluskens LD (2013) Molecular aspects and comparative genomics of bacteriophage endolysins. *Journal of Virology*, 87:4558–4570.
- Oliveira, H., Melo, L. D. R., Santos, S. B., Nóbrega, F. L., Ferreira, E. C., Cerca, N., Azeredo, J., & Kluskens, L. D. (2013). Molecular Aspects and Comparative Genomics of Bacteriophage Endolysins. *Journal of Virology*, 87(8), 4558–4570.
- Pastagia, M., Schuch, R., Fischetti, V. A., & Huang, D. B. (2013). Lysins: the arrival of pathogen-directed anti-infectives. *Journal of Medical Microbiology*, 62(10), 1506–1516.
- Peltomaa, R., Lopez-Perolio, I., Benito-Pena, E., Barderas, R., & Moreno-Bondi, M. C. (2016). Application of bacteriophages in sensor development. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408, 1805-1828.
- Petrov, G., Dymova, M., & Richter, V. (2022). Bacteriophage-mediated cancer gene therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 14245.
- Pires, D. P., Oliveira, H., Melo, L. D., Sillankorva, S., & Azeredo, J. (2016). Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 100, 2141-2151.
- Pirnay, J. P., Blasdel, B. G., Bretaudeau, L., Buckling, A., Chanishvili, N., Clark, J. R., ... & Van den Eede, G. (2015). Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products. *Pharmaceutical research*, 32, 2173-2179.

- Raz, A., Serrano, A., Hernandez, A., Euler, C. W., & Fischetti, V. A. (2019). Isolation of phage lysins that effectively kill *Pseudomonas aeruginosa* in mouse models of lung and skin infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(7), e00024-19.
- Schmelcher, M., & Loessner, M. J. (2016). Bacteriophage endolysins: applications for food safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 37, 76–87.
- Schmelcher, M., Powell, A. M., Camp, M. J., Pohl, C. S., & Donovan, D. M. (2015). Synergistic streptococcal phage  $\lambda$ SA2 and B30 endolysins kill streptococci in cow milk and in a mouse model of mastitis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 8475–8486.
- Schmelcher, M., Powell, A. M., Becker, S. C., Camp, M. J., & Donovan, D. M. (2012). Chimeric phage lysins act synergistically with lysostaphin to kill mastitis-causing *Staphylococcus aureus* in murine mammary glands. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(7), 2297–2305.
- Shannon, R., Radford, D. R., & Balamurugan, S. (2020). Impacts of food matrix on bacteriophage and endolysin antimicrobial efficacy and performance. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(10), 1631–1640.
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5), a000414.
- Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris Jr. J.G., (2001). Bacteriophage therapy. *ASM Antimicrob Agents Chemother.* 45, 649-659.
- Sutherland IW (1995) Polysaccharide lyases. *FEMS Microbiol Rev* 16:323–347.
- Sykilinda, N. N., Nikolaeva, A. Y., Shneider, M. M., Mishkin, D. v, Patutin, A. A., Popov, V. O., Boyko, K. M., Klyachko, N. L., & Miroshnikov, K. A. (2018). Structure of an *Acinetobacter* broad-range prophage endolysin reveals a C-terminal  $\alpha$ -helix with the proposed role in activity against live bacterial cells. *Viruses*, 10(6), 309.
- Taylor, M. W., & Taylor, M. W. (2014). The discovery of bacteriophage and the d’herelle controversy. *Viruses and Man: A History of Interactions*, 53–61.
- Ustaçelebi Ş., Okuyan M., Odabaşoğlu N. (1968). T4 R mutant bakteriyofajları ile serolojik deneyler ve normal insan serumlarının faj enfeksiyonunda stimulan etkisi. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 4, 131-141.
- Villa, T. G., & Crespo, P. V. (2010). *Enzybiotics: Antibiotic enzymes as drugs and therapeutics*. John Wiley & Sons.
- Walmagh, M., Briers, Y., Santos, S. B. D., Azeredo, J., & Lavigne, R. (2012). Characterization of modular bacteriophage endolysins from Myoviridae phages OBP, 201 $\phi$ 2-1 and PVP-SE1. *PLoS One*, 7(5), e36991.
- Wall, R. J., Powell, A. M., Paape, M. J., Kerr, D. E., Bannerman, D. D., Pursel, V. G., Wells, K. D., Talbot, N., & Hawk, H. W. (2005). Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nature Biotechnology*, 23(4), 445–451.
- Walmagh, M., Boczkowska, B., Grymonprez, B., Briers, Y., Drulis-Kawa, Z., & Lavigne, R. (2013). Characterization of five novel endolysins from Gram-negative infecting bacteriophages. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(10), 4369–4375.
- Wittebole, X., de Roock, S., Opal, S.M., 2013. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence* 4 (8), 1–10.

- Xu, M., Arulandu, A., Struck, D. K., Swanson, S., Sacchettini, J. C., & Young, R. (2005). Disulfide isomerization after membrane release of its SAR domain activates P1 lysozyme. *Science*, 307(5706), 113–117.
- Young, R. Y., Wang, N., & Roof, W. D. (2000). Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends in Microbiology*, 8(3), 120–128.



**ISBN: 978-625-378-065-4**