

# Anaerobik Protozoonlarda (Protista) Solunum ve Detoksifikasyon Organeli: Hidrojenozom

Bayram GÖÇMEN

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir

**ÖZET:** Anaerobik ortamlarda yaşayan protozoonlarda görülen solunum ve detoksifikasyon organeli; hidrojenozom ele alınmıştır. Bu organel hakkında önceden bilinen bilgilerin çoğu, bu çalışmada elde edilen orijinal bulgularla birlikte gözden geçirilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Hidrojenozom, anaerobik protozoonlar, trichomonad kamçılılar, işkembe siliyatları

## The Respiratory and Detoxification Organelle in Anaerobic Protozoa: Hydrogenosome

**SUMMARY:** In anaerobic protozoa, the respiratory and detoxification organelle, hydrogenosome, was investigated. Previous information concerning this organelle has been reviewed and the original data obtained in the present study has been presented.

**Key words:** Hydrogenosomes, anaerobic protozoa, trichomonad flagellates, rumen protozoa

## GİRİŞ

Ökaryotik hücreler evrimsel açıdan çeşitli zarla çevrili organellerin bulunuşu ile karakterize olmuş, yüksek derecede bir hücre-altı farklılaşması sergilerler. Günümüzde mevcut olan bütün ökaryotik hücrelerin yapısal ve biyokimyasal organizasyonları, atmosferin anaerobikten aerobik durumuna geçmesinden çok daha önceki bir evrim periyodunda yerleşmiş olması olasıdır (1, 42). Bu durum Fransız Cuénot'un Preadaptasyon Teorisi ile uygun düşmektedir. Nitekim tipik ökaryotik hücreler aerobik yaşam biçimine çok iyi adapte olmuşlardır. Bu açıdan en önemli yapısal ve biyokimyasal adaptasyon mitokondrilerin bulunuşudur.

Mitokondriler, organik besinlerdeki kimyasal bağ enerjisinin, bütün biyolojik işlemlerde yaygın bir enerji kaynağı olarak kullanılan ATP-fosfat bağı enerjisi halinde aerobik (oksijenli) dönüşümü sağlayan en etkili biyolojik makinelerdir. Mitokondrilerin bu özellikleri, bu organeli içeren hücrelere enerji sağlanması açısından büyük avantaj sağlar (1, 42).

Elektron mikroskobunun biyolojiye kazandırılması ile diğer biyolojik sahalarda olduğu gibi protozoolojik araştırmalarda da çok geniş morfolojik adaptasyonlar sergileyen "tek hücreliliğin" bulunuşunu gösteren hayret verici yapısal farklılıklar ortaya çıkartılmıştır. Bu morfolojik çeşitliliğin biyokimyasal farklılıklara dayandığı kabul edilmektedir (32-35).

Gerçekten de protozoonların kimyasal çeşitliliği konusundaki kanıtlar gün geçtikçe artmaktadır. Ancak, biyokimyasal özelliklerin çalışılması için gerekli olan aksenik kültürler nispeten çok az sayıda tür için yapılabilmekte ve bu durum, bu

konudaki bilginin kolaylıkla elde edilmesi açısından bir sınır çizmektedir (1, 32-35, 42).

Fonksiyonel mitokondriler ökaryotik hücrelerin en önemli özellikleri olarak kabul edilir. Bu organellerin yokluğu, çoğunlukla, memelilerin eritrositlerinde olduğu gibi geriye dönüşsüz bir farklılaşmanın işareti olarak veya anaerobik olarak gelişen mayalarda olduğu gibi, metabolik adaptasyonların bir sonucu olduğu düşünülür (32, 35). İşte elektron mikroskobik bulgulara göre mitokondrisiz olduğu saptanan protozoon türlerine ilgi bu yüzdendir. Bununla birlikte, böyle fikir verici morfolojik kanıtlar, mitokondrial işlevlerin yokluğunu ve onların bu organizmalardaki yapısal esaslarını göstermek için yeterli olmadığı da açıktır. Bu konudaki tesellimiz; görünüş olarak mitokondrisiz birkaç türün saf kültürler halinde elde edilebilmiş olması ve bunların biyokimyasal olarak çalışılmasıdır (12-25, 27-31, 36, 40, 46, 47). Böylelikle bu tip çalışmalar, belli bazı anaerobik protozoonlarda mitokondrial işlevlerin yokluğunu açıkça ortaya koyan veriler sağlamışlardır.

Bu çalışmanın amacı bazı anaerobik protozoonlarda, mitokondrilerle yer değiştirmiş olan, alışılmamış bir redoks organeli tipi; hidrojenozomlar hakkında, yapı, ince-yapı, yaygınlık, biyokimyasal ve evrimsel açıdan yapılmış çalışmaların sonuçlarını, orijinal yapı ve ince-yapı bulguları ile bir araya getirerek özetlemektir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma materyalinin eldesi ve araştırılmasına ilişkin yöntemler Göçmen (7, 8) ile Ergen ve ark. (3) tarafından ayrıntılı olarak verildiğinden burada ayrıca değinilmeyecektir. Biyokimyasal yöntemlere ilişkin detaylar ile sonuçlarına ilişkin bilgiler ise literatür listesindeki kaynaklardan derlenmiştir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

**Mitokondrisiz Protozoonlar:** Düşük O<sub>2</sub> basınçları ile karakterize olmuş ortamlarda yaşayan protozoonlar çoğu kez mitokondriye sahip değildirler. Bu tip ökaryotlarda başlıca enerji metabolizması yeri sitosöldür. Bir başka deyişle enerji metabolizması, sadece aerobik solunumun ilk basamağı olan ve O<sub>2</sub>'ne gereksinim göstermeyen glikolizisten çok az farklı olan, fermentasyona dayanır (1, 32-35, 42, 48). Bununla birlikte genel olarak Trichomonad kamçılılarda (Mastigophora: Trichomonadea), işkembe ve sapropelik siliyatlarında (Ciliophora) *piruvatın, asetat ve hidrojene enzimik dönüşümü*, özelleşmiş bir hücre-altı organeli olan Hidrojenozom'da lokalize olmuştur.

Şimdiye dek yapılmış olan çalışmalarla (1-48) mitokondrisiz oldukları gözükten protozoonlar, diğer hayvanların anaerobik veya mikroaerobik iç boşluklarında ve yine anaerobik veya çok az O<sub>2</sub> içeren tatlı ve tuzlu sedimentlerinde yaşarlar. Bunların bazıları parazitik, bir kısmı kommensal bir kısmı ise serbest yaşayışlıdır. Parazitik yaşayanlar arasında potansiyel patojen özellikli olan, insan kalın bağırsağında bulunan *Entamoeba histolytica*, sürüngelelerin bağırsağında yaşayan *Entamoeba invadens* gibi amipler; diplomonad kamçılılardan insanın ince bağırsağında yaşayan *Giardia lamblia*, insan ürogenital kanallarında yaşayan *Trichomonas vaginalis*, sıgırların ürogenital kanallarında yaşayan *T. foetus*, sürüngelelerin bağırsaklarında yaşayan *T. lacertae* ve *Monocercomonas* sp. gibi trichomonad kamçılılar; hemen hemen bütün protistler ve metazoonlarda hücre-içi paraziti olarak yaşayan ve spor şekillendiren protozoonlar olan mikrosporidler (Microspora), örneğin ergin bal arılarının orta bağırsak mukozası ve Malpighi tüpçükleri içine yerleşerek, "Nosema" adı verilen tahrip edici bir hastalığa neden olan *Nosema apis*, keza ipek böceklerinin herhangi bir gelişim safhasını, hatta yumurtasını enfekte ederek, larvanın ipek kozalar örmeden ölmesine sebep olan "Peprine" hastalığından sorumlu *Nosema bombycis* bulunur.

Serbest yaşayan mitokondrisiz protozoonlar arasında: anaerobik deniz kumunda yaşayan *Metopus contortus*, *Plagiophyla* sp., *Sonderia vorax*, *Parablepharis mapellitum* ve *Saprodinium halophila* gibi spirotriş siliyatlar (Ciliophora: Spirotrichea); yine bir siliyat olan ve tatlısu havuzlarındaki anaerobik sedimentlerde yaşayan *Brachonella spiralis* bulunmaktadır. Kommensal ve mutuallistik yaşayışlı mitokondrisiz diğer protozoonlar ise; ruminant midesinin işkembe-börkenek (ruminoretikulum) kısmında yaşayan holotriş ve entodiniomorf siliyatlar (örneğin: *Isotricha* spp., *Dasytricha* spp., *Entodinium* spp., *Polyplastron multivesiculatum*); benzer şekilde diğer herbivor memelilerin sindirim kanallarında yaşayan siliyatlar; ayrıca termitler ile hamam böceklerinin sindirim kanallarında yaşayan, *Joenia* spp., *Trichonympha* spp. gibi yüksek derecede evrimleşmiş mutuallistik hipermastigid kamçılılarıdır (Mastigophora: Parabasalia).

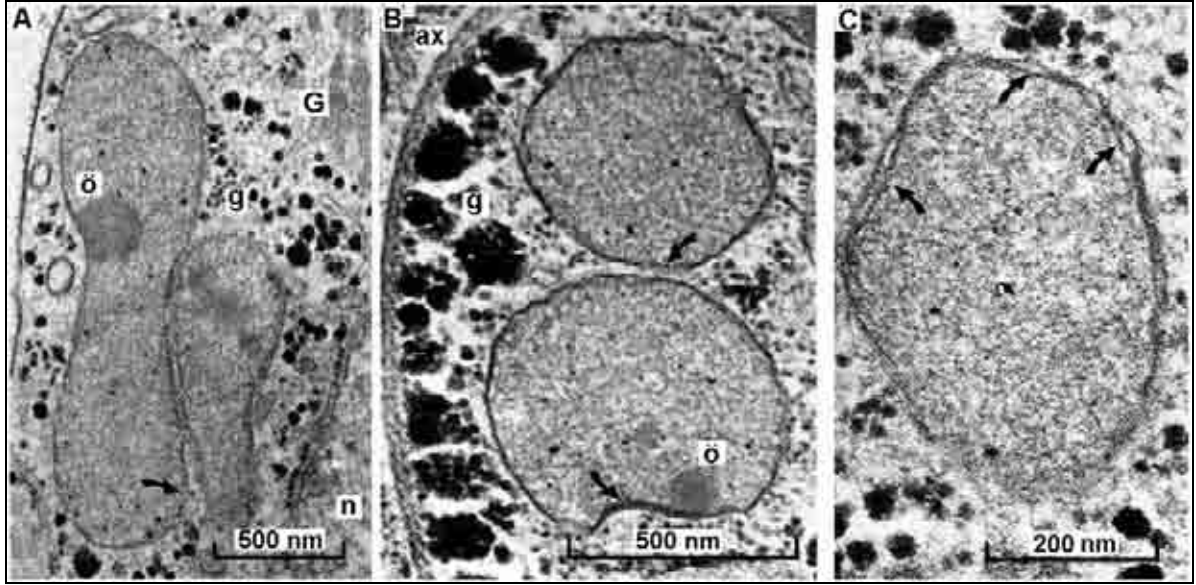
Tüm bu protozoon türlerine ilave olarak, mikroaerobik bir ortam olan kurbağa bağırsağında bulunan *Balantidium* ve *Nyctotherus*

türlerinde de henüz sitokimyasal olarak gösterilmemiş olmasına rağmen, hidrojenozom yapısı sergileyen organeller de Öktem (37, 38) ve Şenler (43) tarafından rapor edilmiştir. Öktem (37) *Nyctotherus*'daki bu yapıları tek zarlı ve kristasız mitokondri olarak tanımlamıştır. Şenler (43) *Balantidium*'daki benzer organellerin esasen hidrojenozomlar olduklarını, Müller (32, 38) ve Göçmen (7, 8)'in gözlemlerine dayanarak öne sürmüştür.

**Hidrojenozomların Ortaya Çıkışı:** Anaerobik ortamlarda yaşayan ökaryotik hücrelerin tıpkı prokaryotik hücrelerde, örneğin insanlarda yaralanmalara, gaz kangreni ve besin zehirlenmeleri ile ölüme neden olan *Clostridium* sp. (*C. perfirensi*, *C. botulinum*) bakterilerinde olduğu gibi CO<sub>2</sub> ve bilhassa, asetat ve H<sub>2</sub> gazı ürettikleri uzun bir zamandan beri bilinmektedir (27, 32, 38). Ökaryotik hücrelerde bu gibi glikolitik son ürünlerin ortaya çıkış mekanizmasının ne olduğu konusundaki biyokimyasal çalışmalar, ökaryotik hücrelerde oldukça enteresan olan yeni bir organeli açığa çıkarmıştır.

Bu konudaki ilk çalışmalar trichomonad kamçılılarda gerçekleştirilmiştir (12-14, 17-25, 27-30, 36, 41). Bilhassa çalışılanlar arasında *Trichomonas foetus* ve *Trichomonas vaginalis* yer almaktadır. Bunlar tipik zooflagellatlar olup, kamçı apareyleri 3 (*T. foetus*) veya 4 (*T. vaginalis*) ön kamçı ve bir dalgalı zar şekillendiren, geriye doğru uzanan posterior kamçıdan ibarettir. İskelet organellerinin bulunuşu bu gurubun en önemli özelliğidir. Bu organellerden birisi; hücrenin uzun eksenine boyunca kamçı kaide cisimciklerinden (kinetozom, blefaro-blast) hücrenin posterior ucuna kadar uzanan, birbirleriyle yakın ilişkili uzunlamasına mikrotübüllerin oluşturduğu bir çubuktan ibaret aksostil (axostyl), diğeri ise hücre zarının altında, dalgalı zarı takip eden ve diğer protozoonlarda bulunan kamçı kökçüklerine benzeyen enine çizgili yapı sergileyen kosta (costa, kot)'dır.

Trichomonadların sitoplazmasında 0.5-2 µm çapında organellerin bulunduğu uzun bir süreden beri bilinmektedir. Bu organeller aksostil ve kostaya yakın, yüzeysel bir ilişki sergilerler ve çoğu kez bu organeller boyunca uzanan sıralar halinde düzenlenirler (Şekil 1). Bu düzenleme nedeniyle, uzun süre bunlara paraaksostiler ve parakostal granüller ve bazen de, ışık mikroskopisinde kullanılan belirli boyalarla güçlü bir şekilde boyanmaları nedeniyle kromatik granüller gibi isimler verilmiştir. Bunların biyokimyasal açıdan karakterize edilmiş olmaları, bu organellerin metabolik rollerini yansıtan yeni bir terimin ortaya konmasına öncülük etmiş ve ABD Rockefeller Üniversitesi'nden D. G. Lindmark ile M. Müller, 1973'de (17) bunlara "Hidrojenozom" ismini vermişlerdir. Bugün için pek çok kitap ve makalede hidrojenozomlar, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i (Hidrojen Peroksit) serbest bırakan oksidaz enzimlerinin ve peroksiti oksidize eden katalaz enziminin bulunuşu ile karakterize olmuş olan Peroksizomlar ve normal olarak yağlardan karbonhidrat sentezi ile ilgili Gliksilat Döngüsü'nü barındıran Gliksizomlarla birlikte Mikrobadiyer adı altında sınıflandırılmaktadır (4, 42). Ancak, Müller de dahil olmak üzere pek çok araştırmacı, yapısal-işlevsel bazı



**Şekil 1.** Trichomonad kamçılların hidrogenozomlarına ait elektron mikrografları. (A): *Monocercomonas* sp.'de uzamış, ikiye bölünme gösteren hidrogenozomlar; (B): *Trichomonas foetus*'un aksostili (ax) boyunca uzanan hidrogenozomlar ve hidrogenozom matrisi içinde, DNA olabilecek yoğun öz (ö); (C): *Monocercomonas* sp. 'ye ait bir hidrogenozomda zarın ikili yapısını işaret eden yer yer açılmalar (oklar) görülmektedir [n: nukleus, G: golgi kompleksi, g: glikojen granülleri] (32'den).

farklılıkları esas alarak, hidrogenozomları bu organel grubundan ayrı olarak ele almaktadırlar (1, 3, 10, 11, 26, 32-35, 39, 44, 45, 48).

Hidrogenozomlar, diğer pek çok ökaryotta bulunan mitokondriler gibi trichomonad kamçıllar, işkembe siliyatları ve daha pek çok anaerobik protozoonda bir enerji metabolizması komponenti teşkil ederler.

**Metabolik Olaylar ve Hidrogenozomların İşlevleri:** Bütün heterotrofik organizmalar enerji ihtiyaçlarını oksidasyon-redüksiyon (yükseltgenme-indirgenme) reaksiyonlarından sağlarlar. Bu reaksiyonlarda elektronlar, elektron donörü (vericisi) denilen indirgenmiş bir bileşikten elektron akseptörü (yakalayıcısı) adı verilen yükseltgenmiş bir bileşiğe doğru taşınmaktadır. Bu taşınmada esas rol alan taşıyıcılar ise çoğunlukla enzimlerin (bilhassa Oksido-redüktazların) koenzim kısımları olarak iş gören Pirimidin ve Flavin nukleotidleri ile Fe-S proteinleri (Demir-Sülfür Proteinleri, Ferredoksinler)'dir (21, 23, 32, 34, 46, 47).

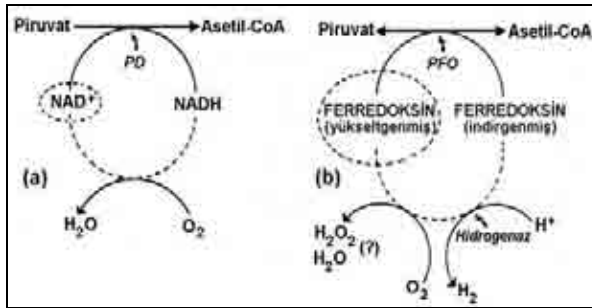
Bütün aerobik protozoonların enerji metabolizmaları eksogen ve endogen karbonhidratlara dayanır. Amilopektin içeren işkembe siliyatları hariç bu organizmalar bol miktarda ve glikojen formunda karbonhidrat rezervleri (yedek besin maddeleri) içerirler. Metabolizmaları, aerobik koşullar altında dahi fermentatifdir. Karbonhidratlar normal O<sub>2</sub> solunumunda olduğu gibi, CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O'ya tam oksidasyon olmaksızın çeşitli organik bileşiklere dönüştürürler. Bu yüzden anaerobik protozoonlarda enerji metabolizması besinlerin kullanımı açısından düşük randımanlıdır. Bu organizmaların bir kısmı H<sub>2</sub> gibi indirgeyici maddeleri uzaklaştırma yeteneğine sahiptirler.

Glikolizis ile şekillenen piruvat, enerji metabolizmasının kilit bir intermediantı (ara maddesi) ve ortama bırakılan pek çok metabolik son ürünün prekürsörü (öncül maddesi)'dür. Glikolizis her zaman mevcut olan klasik Emden-Mayerhof-Parnas (EMP) yolu ile ilerler (32, 34, 35). Piruvat metabolizması yolları anaerobik protozoonlarda önemli derecede farklılıklar sergiler. ATP, gerek esas olarak glikolitik yolda gerekse piruvatın ilave metabolizmasında sadece substrat düzeyinde fosforilasyonla meydana gelir. Anaerobik protozoonlar metabolizmalarının kompartmanlaşması esasına dayanarak iki grup halinde ele alınabilirler. Birinci grupta sitosöl enerji metabolizmasına ait bütün basamakların ve çoğunun yerleştiği yerdir. Bununla beraber ikinci grupta yer alan trichomonad kamçıllar ve işkembe siliyatları, bir kilit metabolik zincir olan piruvatın asetata dönüşümünün ayrı bir organel; hidrogenozom içerisinde yerleşmesi nedeni ile farklıdırlar. Burada da esas olarak ele alınacak grup, sadece hidrogenozom içeren anaerobik protozoonlar olacaktır. Bununla beraber evrimsel ilişkilerin karşılaştırılmasında önemli ölçütler oluşturacağı için birinci gruptaki anaerobik protozoonların metabolizmalarına da kısmen değinilecektir.

Daha önce değinildiği gibi anaerobik mikro-organizmalarda enerji oluşumunu sağlayan temel solunum biçimi Fermantasyon'dur. Karbonhidratlar, mitokondrilerde olduğu gibi CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O'ya tam okside olmaksızın çeşitli organik bileşiklere dönüştürülürler. Bu yüzden enerji metabolizmaları düşük randımanlıdır. Fermantasyonda son elektron alıcısı genellikle yine fermantasyon olayları dizisinde oluşturulan bir bileşiktir. Oysa oksijenli solunumda son elektron alıcısı

moleküler  $O_2$ 'dir. Temelde fermantasyon ile aerobik solunumun ilk basamağı olan Glikolizis arasında çok az fark vardır. Piruvata kadar olan basamaklar genelde benzerdir. Buraya kadar organizmanın net ATP kazancı 2'dir. Glikolitik yolda piruvat oluştuktan sonra, çevresel koşullara, metabolik yolların işleyişine ve türe bağlı olarak hücre, çeşitli seçeneklere sahiptir. Aerobik solunum Krebs Çemberi reaksiyonlarında piruvat yükseltgenmesine karşın, fermantasyonda indirgenerek, koşullara göre etanol, laktat, bütirat yada benzer organik moleküller oluşturulur.

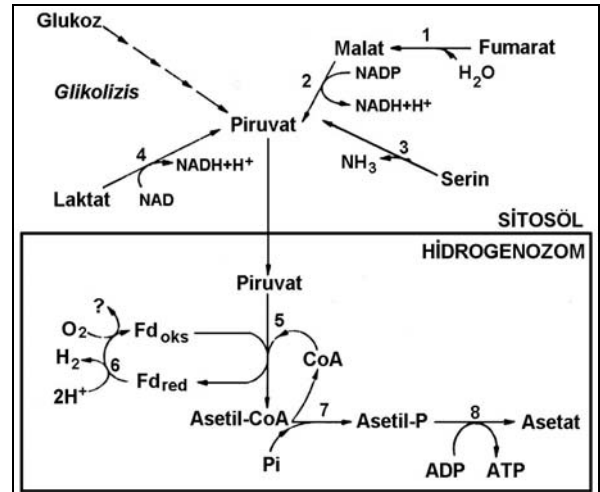
Diferansiyel ve izopiknik santrifüjleme kullanılarak yapılan hücre fraksiyonlama çalışmaları, anaerobik protozoonlarda piruvatın tıpkı mitokondrilerde olduğu gibi, Asetil-CoA üzerinden ilave bir oksidatif dekarboksilasyona tabi tutulduğunu ve neticede, piruvattan asetat ve moleküler  $H_2$ 'nin açığa çıkmasına öncülük eden bir yolun bütün basamaklarını açığa çıkarmıştır (Şekil 2). Bu basamakların, trichomonad kamçılılarda, büyük sitoplazmik granüller içinde lokalize olduğu 1973-1979'lu yıllarda Lindmark, Müller ve arkadaşları tarafından ortaya konmuştur (14-24, 27-31). Benzer çalışmalar ileriki yıllarda sürdürülmüş ve piruvatın hidrogenozomlarda, *Clostridium* türlerinde ve diğer primitif, olasılıkla ata prokaryotlar olarak kabul edilen anaerobik bakterilerinkine dikkati çekecek derecede benzer olan bir metabolik yolla, asetata oksidize edildiği gösterilmiştir. Bu metabolik yol, trichomonad kamçılılarda ve işkembe siliyatlarında bazı bakımlardan farklılıklar gösterirse de temelde aynıdır (Şekil 2, 3).



Şekil 2. Piruvatın (a): mitokondrilerde ve pek çok aereobik mikroorganizmadaki; (b): hidrogenozomlar ile bazı zorunlu anaeroblardaki oksidatif dekarboksilasyonunu gösteren şematik çizimler (32'den değiştirilerek).

Bu organeller ATP üretiminde bir anahtar metabolik merkez olarak hizmet görür. Hidrogenozom ismi, protozoonların bu organel ile metabolizma esnasında, bir gaz halinde serbest moleküler  $H_2$  meydana getirdiklerinin gözlemlenmesinden kaynaklanır.  $H_2$  gazı, metabolik yoldaki terminal bir noktada  $H^+$  (Hidronyum) iyonlarının moleküler  $H_2$ 'e indirgenmesiyle meydana getirilir. Bu reaksiyonu katalizleyen enzim anaerobik prokaryotlardan bilinen Hidrogenaz (Hidrojen:Ferredoksin Oksidoredüktaz) enzimidir. Glikolizisten türeyen piruvat, mitokondrilerde bulunan bu reaksiyonu katalizleyen Piruvat Dehidrogenaz (Piruvat Dekarboksilaz, PD) enziminden (Şekil 2a) farklı olan ve yine anaerobik prokaryotlarda bulunan, kısaca PFO (Piruvat:Ferredoksin

Oksidoredüktaz) adı verilen bir enzimle Asetil-CoA (Asetil Koenzim A)'ya yükseltgenir (Şekil 2b). Bu esnada hasil olan elektronlar, elektron paramanyetik rezonans (EPR) spektrobisi ile Ferrodoksin oldukları belirlenen ve primitif elektron taşıma bileşiği olarak kabul edilen bir Fe-S proteini tarafından yakalanırlar. İndirgenmiş taşıyıcı ( $Fd_{red}$ ) ise elektronları, moleküler hidrojeni meydana getirmek üzere  $H^+$ 'lara verir ve yeniden yükseltgenir. Aerobik şartlarda ise  $O_2$ , elektron taşıyıcı proteini yeniden okside etmek için kullanılır ve  $H_2$  oluşumu engellenir.  $H_2$  üretimi keza diğer elektron alıcılar tarafından da inhibe edilir. Bunlar arasında Nitro-derivatiferi, sözgelimi antitrichomonad ajanlar olarak bugün tıpta tedavide yaygın olarak kullanılan 5-nitroimidazoller bulunur. Piruvatın dekarboksilasyonu ve aynı anda CoA'nın katılımı ile şekillenmiş olan Asetil-CoA, elektron transferi ile eşleşen bir yolla, ortamda bulunan inorganik fosfatı (Pi) Fosfoasetil Transferaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla Asetil-P'a dönüştürülür ve serbest kalan CoA, piruvatın Asetil-CoA'ya yeniden oksidasyonuna katılır. Önemli bir intermediat olan Asetil-P tıpkı glikolizisteki gibi substrat-düzeyindeki fosforilasyonla ADP'den ATP ve asetat şekillendirir. Bu reaksiyonu katalizleyen enzim ise Asetat Kinaz'dır. Buradan da görüldüğü gibi elektron transportuna-bağımlı fosforilasyon yaktır.



Şekil 3. İşkembe siliyatlarından *Isotricha* spp.'nin karışık preperasyonunda ön görülen asetat şekillenmesi. 1: Fumaraz; 2: Malat Dehidrogenaz; 3: Serin Dehidrataz; 4: Laktat Dehidrogenaz; 5: Piruvat Sintataz; 6: Hidrogenaz; 7: Fosfoasetil Transferaz; 8: Asetat Kinaz (44'den değiştirilerek).

Anaerobik türlerdeki  $O_2$  kullanımının, mitokondrial elektron taşınımı, sitokrom oksidaz ve diğer mitokondrial oksidaz inhibitörleriyle veya oksidatif fosforilasyon bozucularıyla (uncoupler'ler), örneğin Aktinomisin A ile etkilenmediği gösterilmiştir. Bu durum bu gibi mitokondrial sistemlerin hidrogenozomlarda bulunmadığını işaret eder (23, 32). İngiltere Hannah Araştırma Enstitüsü'nden bazı araştırmacıların *Dasytricha ruminantium* ve *Isotricha* spp. gibi işkembe trichostomatid siliyatlarında yaptıkları biyokimyasal çalışmalar (25, 26, 44), önceden Fransa Clermond Üniversitesi'nden Grain (5) ve Grain &

Gamout (6) tarafından aynı türlerden rapor edilen “özelmiş mitokondrilerin” esasen yanlış tanımlanmış *hidrogenozomlar* olduklarını ortaya çıkarmıştır.

Spektroskopik ve kimyasal analiz metotları kullanılarak, hem izole hidrogenozomlar hem de canlı protozoonlar üzerinde yapılan çalışmalarda, anaerobik protozoonlarda sitokromların,  $Mg^{++}$  aktivasyonlu ve N,N-disikloheksilkarbodimid'e duyarlı ATPaz'ın bulunmadığı çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (32-35).

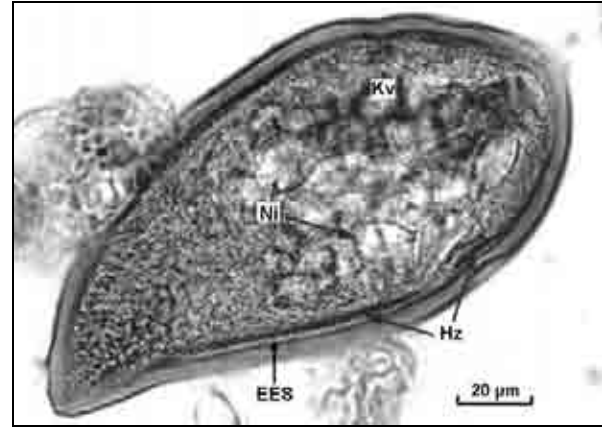
Canlı anaerobik protozoonlar tarafından  $O_2$ 'nin indirgenmesine ilişkin son ürün büyük bir olasılıkla  $H_2O$ 'dur.  $H_2O_2$  değildir. Zira dıştan  $H_2O_2$ 'i suya dönüştüren katalaz enzimi verilmesiyle  $O_2$  kullanım oranlarında bir değişiklik olmaz ve keza dıştan verilen  $H_2O_2$ 'e yüksek derecede duyarlıdır. Elde edilen kimyasal ve spektroskopik bilgiler, bu reaksiyonu katalizleyen enzimin bir Flavoprotein içeren NADH Oksidaz olabileceği yönündedir. Çünkü bu türlerdeki  $O_2$  alımı, sadece yüksek konsantrasyonlardaki Flavin antagonistleri ve demir bağlayıcı ajanlarla (örneğin Siyanid, Azid) inhibe edilebilmektedir. Dolayısıyla hidrogenozomal  $O_2$  tüketimi,  $O_2$ 'e duyarlı sistemler için, bir koruma şeklinde hücre içi  $O_2$  basınçlarını en aza indirme fonksiyonu görebilir. Bir başka deyişle düşük  $O_2$  basınçları altında bir  $O_2$  detoksifikasyonu mekanizmasıdır.

Benzer şekilde,  $O_2$ 'e duyarlı olan PFO (Piruvat:Ferrodoksin Oksidoredüktaz) ve Hidrogenaz enzimleri hidrogenozomlarla ilişkilidirler, halbuki  $O_2$ 'e toleranslı olan Malat Dehidrogenaz gibi enzimler, en azından işkembe trichostomatid siliyatlarında santrifüjleme ile çöktürülemezler. Yani bu gibi enzimlerin yerleşimi sitosöldedir. Bu durum hidrogenozom içerisinde gerçekleşen kompartmanlaşmanın, daha duyarlı enzimleri kısmen koruma amaçlı olduğunu işaret eder. Hidrogenozomal  $O_2$  tüketimi, organizmaları koruma yanında, piruvatın Asetil-CoA'ya dönüşümü ile ve bunu izleyen substrat-düzeyindeki fosforilasyonla eşleşerek ATP hasil etmesi ile de önemlidir. Ancak, bu organizmalarda gerek aerobik gerekse anaerobik şartlar altında metabolizma sürüm değerleri benzer ve metabolizma fermentatif özellikte kaldığı için, bu organel tarafından  $O_2$  tüketimi direkt olarak enerji muhafazası ile ilgili değildir. Bir başka açıdan bakıldığında ise bu organel, ATP üretimi açısından mitokondrilerdekinden daha az randımanlı olmasına rağmen, gerek aerobik şartlar gerekse anaerobik ortamlarda iş görmek üzere, evrimsel açıdan oldukça adaptif bir metabolik merkez oluşturur.

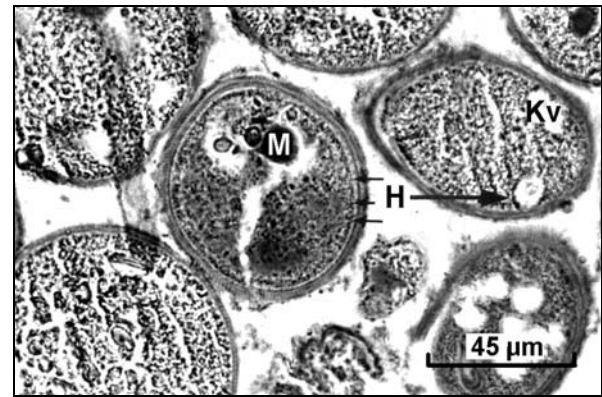
**Hidrogenozomların Yapı ve İnce Yapısı:** Işık mikroskopunda, ancak özel boyalar kullanılarak gösterilebilirler. İlk bakışta mitokondrilerinkine benzer sitoplazmik bir yerleşim gösterdiklerinden hidrogenozom oldukları düşünülmez. Ancak Göçmen (7-8) ve Göçmen & Öktem (9), Müller'in (28, 32-35) yaptığı çalışmaları ve aerobik şartlarda işkembe siliyatlarının  $O_2$ 'e karşı göstermiş oldukları toleranslılığı ve **Janus Green** ile *in vivo* boyanma özelliklerini de dikkate alarak ışık

mikroskobisinde görülen belli granüllerin hidrogenozomlar olduklarını göstermişlerdir.

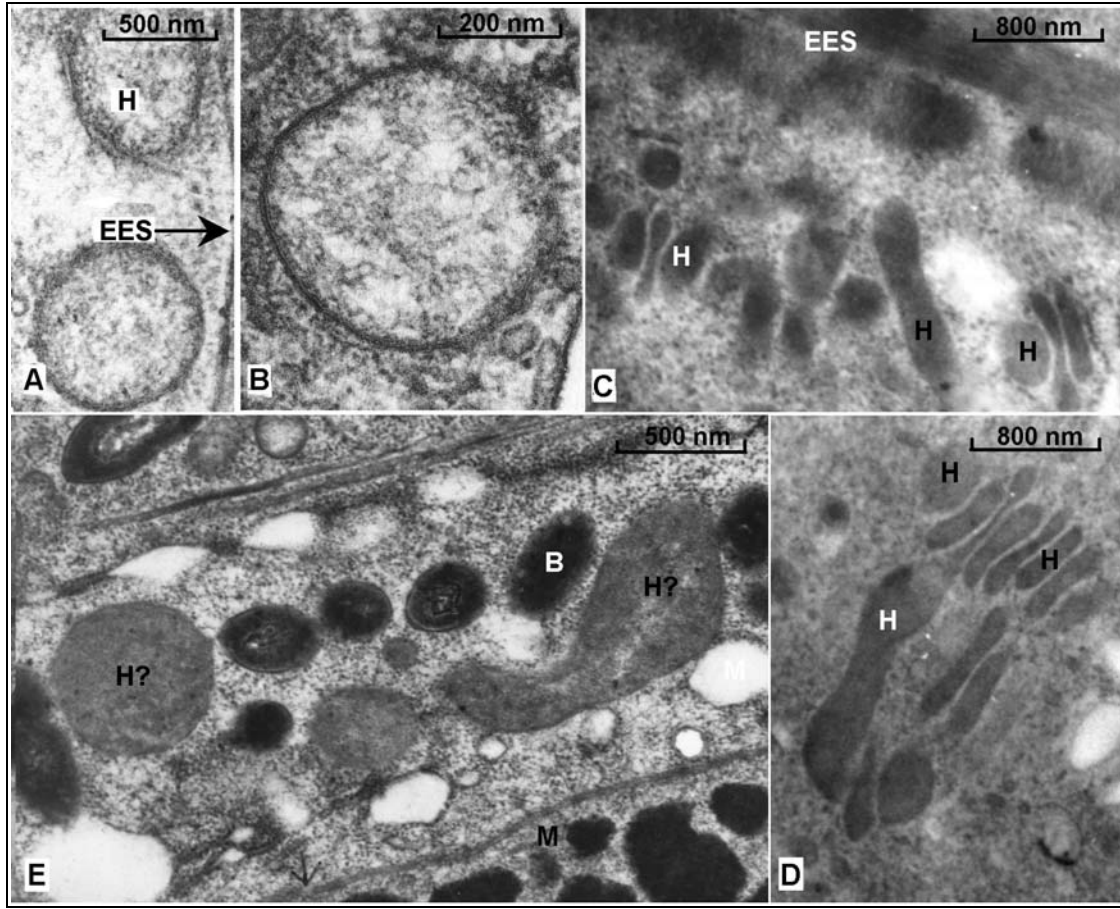
Göçmen (7, 8), Göçmen & Öktem (9), Göçmen & Özbel (11) ve Göçmen ve ark (10) *Isotricha* türlerinde yapmış oldukları çalışmalarda, ekto-endoplazma arasındaki fibriller sınırın altında yoğun granüller bir zon ayırt etmişlerdir. Buradaki demonstrasyon işlemi için klasik mitokondri boyaması olarak bilinen Heidenhein'in Demirli Hematoksilin-Light Green, Champy-Kull ve Altmann metotları kullanılmıştır. Bu zondaki granüller yaklaşık 0.5  $\mu m$  çapında olup, keza pellicülün şekil değiştirdiği yerlerde, nukleus ve kontraktıl vakuoller etrafında oldukça yoğun şekilde, diğer endoplazmik bölgelerde ise seyrek şekilde dağılmışlardır. Göçmen (7, 8) daha önceden bazı araştırmacıların “mitokondrial zon” diye isimlendirdikleri tabaka için “hidrogenozomal zon” ismini de teklif etmiştir (Şekil 4, 5).



**Şekil 4.** *Isotricha prostoma*'nın ventral taraftan görünümünde periferik endoplazmada yer alan “hidrogenozomal zon” (Hz), kontraktıl vakuoller (Kv) ve nişasta tanelerinin (Ni) yerleşimi. EES: Ekto-Endoplazmik Fibriller Sınır (Champy fiksasyonu ve Heidenhein'in Demirli Hematoksilin-Light Green Boyaması).



**Şekil 5.** Karışık haldeki *Isotricha* spp.'nin enine ve boyuna kesitlerinde Champy fiksasyonu ve Altmann boyama tekniği kullanılarak, hidrogenozomların (H) sitoplazmik yerleşimini gösteren fotomikrograf. M: Makronukleus, Kv: Kontraktıl Vakuol (kesit kalınlığı 4  $\mu m$ ).



**Şekil 6.** Endokommensal yaşayan bazı siliyat hidrogenozomları. (A-B): İşkembe entodiniomorphid siliyatı *Ophryoscolex purkynjei*; (C, D): İşkembe trichostomatid siliyatı *Isotricha intestinalis*; (E) Kuyruksuz kurbağa bağırsağından heterotrich siliyat, *Nyctotherus cordiformis*'e ait transmisyon elektron mikroskobu (TEM) fotoğrafları. **B:** Simbiyotik bakteri, **EES:** Ekto-endoplazmik fibriller sınır, **H:** Hidrogenozom, **M:** Makronukleus.

Elektron mikroskobunda hidrogenozomlar çoğunlukla 0.5-2 µm çapında, bir kılıfla çevrelenmiş küresel veya uzamış yapılar halinde görülürler. İnce granüllü bir matris ve çoğu kez elektronca yoğun bir merkez içerirler. Matris içersinde ribozom olabilecek az sayıda daha yoğun granüller bulunur. Trichomonad kamçılılarda bu kılıf, birbirine çok yakın olarak karşı karşıya gelmiş iki "birim zar"dan ibaret olmakla birlikte, bu kılıfın iç zarı kristaller oluşturmaz (Şekil 1).

Anaerobik akuatik sedimentlerde yaşayan siliyat hidrogenozomları üzerinde, 1989'da İngiltere Windermere Laboratuvarı, Tatlı Su Ekolojisi Enstitüsü'nden Finlay ve Danimarka Kopenhak Üniversitesi Deniz Biyolojisi Laboratuvarı'ndan Fenchel'in birlikte gerçekleştirdikleri TEM ve sitokimyasal çalışmalarla (4), bu siliyatlardaki hidrogenozom-ların "çift zarlı" oldukları ve iç zarın bazı türlerde, mitokondrilerde-kine benzer invaginasyonlar sergiledikleri gözlemlenmiştir. Bu çalışmada da işkembe trichostomatid (*Isotricha*) ve entodiniomorphid siliyatların (*Ophryoscolex*), keza heterotrich siliyat *Nyctotherus*'da da çift zar yapısının bulunduğu TEM ile ortaya konmuştur (Şekil

6). Hidrogenozomlarda genetik (DNA) ve protein sentez makinelerinin (ribozomlar) varlığı veya yokluğu konusunda kesin veriler yoktur. Şimdiye dek sadece *Trichomonas foetus*'tan hazırlanmış bir hidrogenozomal preparasyonda halkasal bir DNA molekülünün bulunduğunu gösteren tek bir yayın, Çerkasosová ve ark. (2) tarafından neşredilmiştir. Bu konulardaki bilgi eksikliği oldukça fazla olup, çalışılması gereken önemli konular arasındadır. Hidrogenozom-ların biyogenezi konusunda da kesin veriler olmamakla birlikte, Nielsen & Dimer (36) tarafından trichomonad kamçılılarda; Finlay ve Fenchel (4) tarafından da anaerobik akuatik sedimentlerde yaşayan belli siliyat türlerinde (*Metopus contortus*, *Sonderia vorax*, vs.) bazı halter biçimli yapıların gözlemlenmesi ve ayrıntılı morfometrik analizler, hidrogenozomlarda sitokinezis ile senkronize olmayan bir ikiye bölünme ile çoğalmanın meydana geldiğini işaret etmektedir. Benzer bulgular işkembe siliyatları ve heterotrich siliyat *Nyctotherus* için de bu çalışmada elde edilmiştir (Şekil 6).

**Hidrogenozomların Sitokimyasal Belirlenmesi:** Bu boyama prosedürleri tetrazolium tuzlarının (DSNBT: *Distryl Nitroblue*

*Tetrazolium Chloride* veya BSPT: *Benzothiazolyl Styryl Phthalhydrazidyl Tetrazolium Chloride*) hidrogenaz enzimi aracılığı ile indirgenmesine dayanır (34, 39, 44, 45). Diğer bir deyişle tetrazolium tuzları burada elektron yakalayıcısı (akseptörü) olarak iş görür. Substrat olarak ise hidrojen gazı ( $H_2$ ) kullanılır. İndirgenme ürünü ise postfiksasyon (ozmifikasyon) sonrası kolaylıkla görülebilen koyu mor Formazan depozitleridir (34, 39). Böylece hidrogenaz varlığı sitokimyasal olarak spesifik şekilde belirlenir.

Bu yöntemle protozoonlar pH'sı 7.4 olan  $H_2$ 'e doyurulmuş 0.2 M fosfat tamponu içerisinde hazırlanan tetrazolium tuzu (örneğin DSNBT) içinde sakrozla inkübe edildikten sonra, Sodyum kakodilat tamponuyla hazırlanan Glutaraldehit ile tespit edilirler. Daha sonra yine aynı tampon içinde hazırlanan Osmium tetraoksit ( $OsO_4$ ) ile ikinci kez tespit (postfiksasyon) işlemi uygulanır. Alınan kesitler ise daha sonra Uranil asetat ve Kurşun sitrat ile boyanır ve netice olarak elektron mikroskopik incelemeye alınır.

Trichomonad ve sapropelik siliyalarda inkübasyon için lipofobik tabiatta olan başka bir tetrazolium tuzu; BSPT kullanılmaktadır.

Dolayısıyla kullanılan sitokimyasal metotlarda hidrogenozomların belirlenmesi amacı ile "hidrogenaz aktivitesi" kontrol edilir. Hidrogenaz aktivitesi,  $O_2$ 'li ortamda inkübasyondan sonra bu aktivitede azalmanın olduğu ve hatta yüksek  $O_2$  basınçlarında tamamen kaybolduğunun gösterilmesiyle tayin edilebilir. Bu durum da ancak formazan depozitlerinin hidrogenozomlar içerisinde sadece merkezi matriks bölgesinde kalmasıyla veya tamamen kaybolması ile ortaya konur.

$O_2$ 'li ortamda yetiştirilen anaerobik protozoonlarda formazan depozitlerinin azalması veya kaybolması durumu, hidrogenaz enziminin  $O_2$ 'ne duyarlı olduğunun bir işareti olduğu kadar, hidrogenozomların  $O_2$ 'ne duyarlı enzimleri koruma görevine sahip olduğunu da işaret eder. Zira fazla yüksek olmayan  $O_2$  konsantrasyonlarında hidrogenozom matriksinde az da olsa hidrogenaz aktivitesi görülür

**Hidrogenozomların Evrimleri Konusundaki Fikirler:** Pek çok kitapta hidrogenozomların AGER (Agranüler Endoplazmik Retikulum)'dan orjinlendikleri gibi fikirler ortaya atılırsa da bu organellerin çift zarlı oldukları göz önünde tutulursa, bunun akla uygun olmayacağı açıktır. Belli anaerobik protozoonlarda sadece mitokondriler değil, keza hidrogenozomlar da bulunmaz. Bu tip organizmalar, bir takım büyük gruplar içerisinde yer alırlar: bunlar arasında daha önceden değinmiş olduğumuz gibi, amiplerden *Entamoeba* spp. Diplomonad kamçılılardan *Giardia* cinsi ve hücre içi paraziti olan mikrosporidler de (Microspora) bulunur. Bu organizmalarda da tıpkı *Clostridium* bakterilerinde bulunan PFO enzimi ve Ferrodoksin aracılıklı elektron transportu bulunur. Bu enzimlerin yerleşimi sitosöldedir. Mitokondrial fonksiyonlar ve sitokromlar bulunmazlar. Keza *Clostridium* bakterilerinde olduğu gibi Hidrogenaz aktivitesi ve dolayısıyla

$H_2$  gazı üretimi görülmez. Benzer şekilde, hidrogenozom içeren diğer ökaryotik organizmalarda da (Parabasal kamçılılar, işkembe siliyatları ve bir işkembe fungusu; *Neocallimastix patriciarum* ile anaerobik sedimentlerde yaşayan siliyatlar) değişik taksonomik gruplara dahildirler. Bunlar, hem prokaryotik hem de hidrogenozomsuz protozoonlarda bulunan özelleşmiş yola benzer bir metabolik yola sahiptirler.

Mitokondrisiz ökaryotların, böyle birbirinden farklı büyük sistematik gruplarda bulunması nedeniyle, bunların evolusyonları büyük bir olasılıkla tek bir evrim gidişatı göstermez. Müller'e göre (1988) mitokondrial fonksiyonların yokluğu; ya primer bir özellik yada sekonder bir adaptasyondur. Hidrogenozomsuz organizmalar, olasılıkla evolusyonun primitif bir safhasını temsil ederler. Bu organizmalardaki PFO ve Ferrodoksin, primer hücresel organizasyonlardaki basit karakterler olup, bunlarda bazı yaygın organeller bulunmaz. Primitif karakterleri keza, *Entamoeba* türlerinin prokaryotlarda olduğu gibi yüksek enerjili bir bileşik olan İnorganik Pirofosfat'a (PPI) bağlı kalmalarıyla da işaret edilmektedir (32, 34, 41). Bu bilginin ışığında Reeves ve ark. (40) *Entamoeba histolytica*'yı yaşayan bir fosil olarak kabul etmiştir.

Hidrogenozomlar içeren organizmaların pozisyonlarının tayini oldukça zordur. Bu gruptaki PFO ve Ferrodoksin sitosölde değil, bir organel içindedir. Bu organel açık bir şekilde atasal metabolik özellikler yansıtır. Ancak, trichomonad kamçılılar ve işkembe siliyatlarında, şayet hidrogenozomların varlığı göz ardı edilirse, diğer ökaryotik hücrelerden farklı olmazlar ve bunların kompleks morfolojileri ise, bunların dahil oldukları grupların bir ileri basamağını sergilediklerini işaret eder.

Müller (34) bu organellerin bu metabolik yolu içeren anaerobik prokaryotlardan, tıpkı mitokondriler ve kloroplastlar gibi "endosimbiyotik" olarak orjinlendiklerini kabul eder ve ona göre, mitokondrial bir orijin çok zayıf bir olasılıktır. Zira mitokondrial sistemle yer değiştirecek olan bu organel içerisine, tamamen primitif olan bir piruvat oksidasyonu yolunun ilave edilmesini gerektirecektir.

Bu fikre zıt olarak Finlay ve Fenchel (4), hidrogenozomların anaerobik bakteriyel endosimbiosis halinde orijinlendikleri fikrinin, trichomonad kamçılılar, kamçılı bir fungus, *Neocallimastix patriciarum* ve çeşitli siliyatlar gibi uzak akrabalar olan ökaryotik organizmalarda, böyle bir simbiyozisin, birbirinden bağımsız olarak yerleşmiş olduğunu ima etmiş olacağından, karşı çıkmakta ve söz konusu protozoonların çoğunun, mitokondriyi yakın aerobik akrabalara sahip oldukları gerçeğini de dikkate alarak, daha basit ve daha olası bir hipotez ortaya atmışlardır. Bu da hidrogenozomların "sekonder bir adaptasyon" olduğudur. Buna göre hidrogenozom;  $O_2$ 'nin bulunmadığı devamlı bir yaşam stilini kabul eden ve enaerobik bir niş keşfeden aerobik protozoonların, gereksinimlerine uyum

yapmak için modifiye olmuş bir mitokondriumdur. Bu modifikasyonlar, solunum zincirinin kaybını ve bazılarının anaerobik protozoonların, sitoplazmasında bulunduğu bilinen Hidrojenaz ve PFO gibi enzimlerin hidrojenozom içine ithalini içerecektir. Sonuçta oluşan hidrojenozomlar, hala kendilerini eşleyebilir ve hala daha iç zar katmanlarını muhafaza edebilirler. Şayet modifikasyon, küçük bir ince yapı değişimi gerektiriyorsa, hala daha türevlenmiş oldukları mitokondrilere benzeyebilirler.

Hidrojenozomların evrimleri konusunda, peroksizomlardan türevlendikleri gibi fikirler de ortaya atılmaktadır. Ancak, bu konunun aydınlanması için daha genetik, biyokimyasal ve moleküler biyolojiye dayanan veriler gerekmektedir. Bu konuda yapılacak çalışmalar, ökaryotik organizmaların evolüsyonunun aydınlatılması açısından önemli verilere yol açacağı bir gerçektir.

### SONUÇ

Çeşitli sistematik gruplara dahil belli protozoonlar, ökaryotik organizmalarda hemen daima üniversal olarak bulunan organeller olan mitokondrilere yoksundurlar. Amitokondrial simbiyotik ve serbest yaşayan protozoonların enerji metabolizmaları, bunları mitokondri protozoonlardan ayırt ettiren olasılıkla atasal ve primitif bir takım kilit özelliklerden kaynaklanmaktadır. Bu kilit farklılıklarından birisi: Piruvat dehidrojenaz kompleksi ile değil de, PFO ile katalize edilen piruvat oksidasyonunda görülür. Elektron taşınımı, özellikle Fe-S proteinleri aracılığıyla olur ve bazı organizmalarda (Hidrojenozom içerenlerde) hidrojen üretimine öncülük eder. Enerji sadece substrat-düzeyindeki fosforilasyonla muhafaza edilir. O<sub>2</sub>'nin indirgenmesi enerjinin muhafazası ile bağlantılı değildir. Gelişmiş enerji metabolizmasının iki önemli safhası, bu grup organizmalarda bulunmaz. Bunlar elektron taşınımına bağımlı fosforilasyon ve bu işlemle ilgili olan elektronlar için son elektron alıcısı olarak O<sub>2</sub>'nin kullanılması safhalarıdır.

Amitokondrial protozoonlar ata tip piruvat oksidasyonunun hücre-altı yerleşimi bakımından dikkati çeken bir dikotomi sergiler. Bu durum belli türlerde sitosölde bulunur ve bu yüzden hücrenin kendisinin bir özelliğidir. Diğer türlerde ise piruvat oksidasyonu, zarla sınırlı bir organel: hidrojenozom içersinde ilerler. Bu oksidasyonun pirimitif özellikleri konak hücrenin değil, bu organelin karakteristiğidir. Burada gözlenen dikotomi, bu iki grup organizmanın evrimsel gelişim farklılıkları olduğunu işaret eder. Müller (32, 34)'e göre birinci gruptaki enzimlerin sitosölik yerleşimi mitokondrilerinin ortaya çıkmasından önce ökaryotik evolüsyonun ana hattından uzaklaşmış olan organizmaların bir primer özelliğini yansıtmaktadır. Nükleik asit zinciri bilgileri de bu noktayı desteklemektedir. Buna zıt olarak hidrojenozom içeren organizmalar ise olasılıkla daha fazla evrim geçirmiş ökaryotların soyundan gelmişler ve daha erken bir safhadaki atasal metabolik özelliklere sahip bir organel kazanılmıştır. Bazı grup organizmaların hidrojenozomları bağımsız olarak kazanmış olmaları da muhtemeldir.

Anaerobik ökaryotlar ve hidrojenozomları hakkındaki moleküler veriler arttıkça, çok tartışılan ve ilginç bir problem haline gelen her iki grubun evrimi hakkında ilave yeni görüş açısına ulaşılması kaçınılmaz olacaktır.

### KAYNAKLAR

1. **Anderson O R**, 1986. *Comparative Protozoology*, Springer-Verlag, New York, p.482.
2. **Čerkasová A, Čerkasov J, Kulda J, Reischig J**, 1976. Circular DNA and cardiolipin in hydrogenosomes, microbody-like organelles of trichomonads. *Folia Parasitologica (Praha)*, 23: 33-37.
3. **Ergen G, Göçmen B, Falakalı B**, 2000. Ultrastructure of the Cortex of the Rumen Ciliate *Ophryoscolex purkynjei* Stein, 1858 (Entodiniomorpha: Ophryoscolecidae). *Turk J Zool*, 24 (4): 385-390.
4. **Finlay BJ, Fenchel T**, 1989. Hydrogenosomes in Some Anaerobic Protozoa Resemble Mitochondria. *FEMS Microbiology Letters*, 65: 311-314.
5. **Grain J**, 1965. Etude Cytologique de Quelques Ciliés Holotrichs Endocommensaux des Ruminants et des Equides (Parts 1 et 2). *Potistologica*, 2, 5-141.
6. **Gaumont R, Grain J**, 1967. L'anaerobiose et les Mitochondries chez les Protozoaires du Tube Digestif. *Annales Universite' et ARERS*, 5, 174-176.
7. **Göçmen B**, 1991. Sığır İşkembesindeki Bazı Simbiyont Siliyatların (*Isotricha* spp.) Morfolojik ve Sitolojik Yapıları. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir, s.77 (Yüksek Lisans Tezi).
8. **Göçmen B**, 1993. Sığır İşkembesinde Endosimbiyont Yaşayan *Isotricha* spp. Stein, 1859 (Isotrichidae, Trichostomatida) Üzerine Işık Mikroskobu Düzeyinde Morfolojik ve Sitolojik Gözlemler. *Doğa-Tr. J. of Zoology*, 17: 289-301.
9. **Göçmen B, Öktem N**, 1994. Paraldehyde Fuchsin Staining and Secretion of Rumen Ciliates of Cattle. *Doğa-Tr J Zoology*, 18: 107-110.
10. **Göçmen B, Akyurtlaklı N, Özbel Y**, 2001. İşkembe Siliyatları *Isotricha intestinalis* Stein, 1859 ve *Isotricha prostoma* Stein, 1961 (Trichostomatida: Isotrichidae) Hakkında İnce Yapısal Gözlemler. *T Parazitol Derg*, 25 (2): 202-211.
11. **Göçmen B, Özbel Y**, 2001. İşkembede Yaşayan Kamçılı (Mastigophora) ve Holotriş Siliyat (Ciliophora) Protozoonlar. *T Parazitol Derg*, 25 (4): 405-425.
12. **Johnson PJ, D'oliveria ACE, Gorrell TE, Müller M**, 1990. Molecular Analysis of the Hydrogenosomal Ferredoxin of Anaerobic Protist *Trichomonas vaginalis*. *Proc Nat Acad Sci*, 87: 6097-6101.
13. **Länge S, Rozario C, Müller M**, 1994. Primary Structure of Hydrogenosomal Adenylate Kinase of *Trichomonas vaginalis* and its Phylogenetic Relationships. *Mol Biochem Parasitol*, 66: 297-308.



14. **Lindmark DG**, 1976a. Acetate production by *Tritrichomonas foetus*. In *Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationships*, ed. H. van den Bossche, pp. 15-21. Amsterdam: North-Holland.
15. **Lindmark DG**, 1976b. Certain enzymes of the energy metabolism of *Entamoeba invadens* and their subcellular localization. In *Proceedings of the International Conference on Amebiasis*, ed. B. Sepulveda & L. S. Diamond, pp. 185-189. Mexico: Instituto Mexicano de Seguro Social.
16. **Lindmark DG**, 1979. Metabolism of *Giardia lamblia*. *J Protozool*, 26: 11A.
17. **Lindmark DG, Müller M**, 1973a. Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate, *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *J Biol Chem*, 248: 7724-7728.
18. **Lindmark DG, Müller M** 1973b. Subcellular distribution of flavins in two trichomonad species. *J Protozool*, 20: 500.
19. **Lindmark DG, Müller M**, 1974a. Biochemical cytology of trichomonad flagellates. II. Subcellular distribution of oxidoreductases and hydrolases in *Monocercomonas* sp. *J Protozool*, 21: 374-378.
20. **Lindmark DG, Müller M**, 1974b. Superoxide dismutase in the anaerobic flagellates, *Tritrichomonas foetus* and *Monocercomonas* sp. *J Biol Chem*, 249: 4634-4637.
21. **Lindmark DG, Müller M**, 1976. Antitrichomonad action, mutagenicity, and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. *Antimicrobial Agents Chemother*, 10: 476-82.
22. **Lindmark DG, Müller M, Shio H**, 1975. Hydrogenosomes in *Trichomonas vaginalis*. *J Parasitol*, 61: 552-554.
23. **Lloyd D, Lindmark DG, Müller M**, 1979a. Respiration of *Tritrichomonas foetus*: absence of detectable cytochromes. *J Parasitol*, 65: 466-469.
24. **Lloyd D, Lindmark DG, Müller M**, 1979b. Adenosine triphosphatase of *Tritrichomonas foetus*. *J Gen Microbiol*, 115: 301-307.
25. **Lloyd D, Williams J, Yarlett N, Williams AG**, 1982. Oxygen Affinities of the Hydrogenosome-containing Protozoa *Trichomonas foetus* and *Dasytricha ruminantium*, and two Aerobic Protozoa, Determined by Bacterial Bioluminescence. *J Gen Microbiol*, 128: 1019-1022.
26. **Lloyd D, Hillman K, Yarlett N, Williams AG**, 1989. Hydrogen Production by Rumen Holotrich Protozoa; Effects of Oxygen and Implications for Metabolic Control by *in situ* Conditions. *J Protozool*, 36 (2): 205-213.
27. **Müller M**, 1973. Biochemical cytology of trichomonad flagellates. I. Subcellular localization of hydrolases, dehydrogenases, and catalase in *Tritrichomonas foetus*. *J Cell Biol*, 57: 453-474.
28. **Müller M**, 1975. Biochemistry of protozoan microbodies (peroxisomes, -glycerophosphate oxidase bodies and hydrogenosomes). *Ann Rev Microbiol*, 29: 467-483.
29. **Müller M**, 1976. Carbohydrate and energy metabolism of *Tritrichomonas foetus*. In *Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationships*, ed. H. van den Bossche, pp. 3-14. Amsterdam: North-Holland.
30. **Müller M, Lindmark DG**, 1978. Respiration of hydrogenosomes of *Tritrichomonas foetus*. II. Effect of CoA on pyruvate oxidation. *J Biol Chem*, 253: 1215-1218.
31. **Müller M, Nseka V, Mack SR, Lindmark DG**, 1979. The effects of 2, 4-dinitrophenol on trichomonads and *Entamoeba invadens*. *Comp Biochem Physiol*, 64B: 97-100.
32. **Müller M**, 1980. The Hydrogenosome. *Symposia of the Society of General Microbiology*, 30: 127-142.
33. **Müller M**, 1985. Search for Cell Organelles in Protozoa. *J Protozool*, 32 (4): 559-563.
34. **Müller M**, 1988. Energy Metabolism of Protozoa Without Mitochondria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 42: 465-488.
35. **Müller M**, 1993. The Hydrogenosome. *J. Gen. Microbiol.*, 139: 2879-2889.
36. **Nielsen MH, Diemer NH**, 1976. The size, and relative area of chromatic granules ('hydrogenozomes') in *Trichomonas vaginalis* Donné from cultures in logarithmic and stationary growth. *Cell Tissue Res*, 167: 461-465.
37. **Öktem N**, 1969. *Nyctotherus cordiformis* ve *Nyctotherus hylae*'nin sitolojik yapısı, ultrastrüktürü ve Sistematik Münasebetleri. E. Ü. Fen. Fak. İlmi Raporlar Serisi, No.: 86, Bornova, İzmir, s.45.
38. **Öktem N**, 1971. *Trichomonas batrachorum*'un (Flagellata) ince yapısı üzerinde araştırmalar. E. Ü. Fen. Fak. İlmi Raporlar Serisi, No.: 119, Bornova, İzmir, s.17.
39. **Paul R.G, Willams AG, Buttler RD**, 1990. Hydrogenosomes in the Rumen Entodiniomorphid Ciliate, *Polyplastron multivesiculatum*. *J Gen Microbiol*, 136: 1981-1969.
40. **Reeves RE, Warren L0, Susskind B, Lo HS**, 1977. An energy conserving pyruvate-to-acetate pathway in *Entamoeba histolytica*. Pyruvate synthase and a new acetate thiokinase. *J Biochem Chem*, 252: 726-731.
41. **Searle SMJ, Müller M**, 1991. Inorganic Pyrophosphatase of *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol*, 44: 91-96.
42. **Sleigh MA**, 1989. *Protozoa and Other Protist*. Edward Arnold, London, p.342.
43. **Şenler N**, 1996. *Rana ridibunda* (Amphibia: Anura)'nın sindirim sisteminde endokommensal yaşayan iki siliyat türünün morfolojik ve sitolojik yapıları. *Doğa-Turkish Journal of Zoology*, 20: 319-333.
44. **Yarlett N, Hann AC, Lloyd D, Williams AG**, 1983. Hydrogenosomes in a Mixed Isolate of *Isotricha prostoma* and *Isotricha intestinalis* from Ovine Rumen Contents. *Comp Biochem Physiol*, 74B (2): 357-364.
45. **Yarlett N, Coleman GS, Williams AG, Lloyd D**, 1984. Hydrogenosomes in Known Species of Rumen Entodiniomorphid Protozoa. *FEMS Microbiol Letters*, 21: 15-19.
46. **Weinbach EC, Claggett CE, Takeuchi T, Diamond LS**, 1978. Biological oxidations and flavoprotein catalysis in *Entamoeba histolytica*. *Archivos de InvestuXracion Medica* (Mexico), 9 : 89-98.
47. **Weinbach EC, Diamond LS, Claggett CE**, 1976. Iron-sulfur proteins of *Entamoeba histolytica*. *J Parasitol*, 62, 127-128.
48. **Williams AG**, 1986. Rumen Holotrich Protozoa. *Microbiological Reviews*, 50: 25-49.

