

**T.C.**  
**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Vitreoscilla* HEMOGLOBİNİNİN RADYASYONA DİRENÇLİ**  
***Deinococcus radiodurans*'İN BÜYÜME ve ÇOĞALMA**  
**KARAKTERİSTİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Özgür YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MALATYA**

**AĞUSTOS 2012**

**Tezin Başlığı:** *Vitreoscilla* hemoglobininin radyasyona dirençli *Deinococcus radiodurans*'ın büyüme ve çoğalma karakteristikleri üzerine etkisi

**Tezi Hazırlayan:** Özgür YILMAZ

**Sınav Tarihi:** 04.07.2012

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerdendirilerek Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Sınav Jürisi Üyeleri:**

Prof. Dr. Dilek ASMA

---

Prof. Dr. Hikmet GEÇKİL

---

(Danışman)

Yrd. Doç. Dr. Hüseyin KAHRAMAN

---

---

Prof. Dr. Asım KÜNKÜL

Enstitü Müdürü

## Onur Sözü

Yüksek Lisans olarak sunduğum " *Vitreoscilla* hemoglobininin radyasyona dirençli *Deinococcus radiodurans*'ın büyüme ve çoğalma karakteristikleri üzerine etkisi " başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakça yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Özgür YILMAZ

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

*Vitreoscilla* HEMOGLOBİNİNİN RADYASYONA DİRENÇLİ *Deinococcus radiodurans*'IN BÜYÜME ve ÇOĞALMA KARAKTERİSTİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Özgür Yılmaz

İnönü Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

63+ viii sayfa  
2012

Danışman: Prof. Dr. Hikmet GEÇKİL

Bu çalışmada aktarılmış olduğu konakçılarına daha iyi bir büyüme ve oksijen alımı kazandıran prokaryotik *Vitreoscilla* hemoglobininin radyasyona dirençli bir bakteri olan *Deinococcus radiodurans*'ın büyüme ve çoğalma karakteristikleri, oksijen tüketimi ve radyasyona olan duyarlılığı üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu bakterinin yabanıl tipi, *Vitreoscilla* hemoglobin geni klonlanmış rekombinant suşu (*vgb*<sup>+</sup>) ve bu geni taşımayan rekombinant suşu (*vgb*<sup>-</sup>) farklı dozlarda iyonize radyasyona maruz bırakılmış ve bunun sonucu olarak hücrelerin canlı kalma özellikleri araştırılmıştır. Ayrıca, ortam oksijen ve radyasyon seviyesi ile ilişkili olarak katalaz, süperoksit dismutaz enzimlerinin aktiviteleri ve redükleyici bir ajan olan glutatyon seviyesinin her üç bakteri suşunda nasıl bir profile sahip oldukları karşılaştırmalı biçimde araştırılmıştır.

Sonuçlar bize *Vitreoscilla* hemoglobinin bu bakteriye yüksek bir büyüme ve çoğalma kabiliyeti kazandırdığını ancak radyasyona ekstrem direnciyle bilinen bu bakterinin radyasyona olan duyarlılığını arttırdığını göstermiştir. Ayrıca, her iki rekombinantın oksijen tüketiminin konakçıya göre önemli derecede düşük olduğu kaydedilmiştir. Rekombinant suşların süperoksit dismutaz aktivitesi ve glutatyon seviyesinde yabanıl suşa göre bir düşüş görülürken, katalaz aktivitesinde tersine genel olarak bir artış gözlenmiştir. Radyodirencin bir göstergesi olan hücresel Mn/Fe oranında ise konakçı suşun rekombinant suşlardan yaklaşık 3 kat daha fazla hücresel Mn/Fe oranına sahip olduğu saptanmıştır.

**ANAHTAR KELİMELEER:** *Vitreoscilla* hemoglobini, *Deinococcus radiodurans*, Radyodirenc

## ABSTRACT

Master Thesis

### EFFECT OF *Vitreoscilla* HEMOGLOBIN ON GROWTH CHARACTERISTICS OF RADIORESISTANT *Deinococcus radiodurans*

Özgür Yılmaz

Inonu University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

63+ viii pp  
2012

Advisor: Hikmet GEÇKİL, Professor

This study investigated the effect of *Vitreoscilla* hemoglobin, known to supply the heterologous hosts with better growth and higher oxygen uptake, on growth, oxygen uptake and radioresistance of *Deinococcus radiodurans*, a bacterium known for its extraordinary radioresistant properties. The wild-type and two recombinants, one carrying the *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*vgb*<sup>+</sup>) and the other missing it (*vgb*<sup>-</sup>), were exposed to various doses of ionizing radiation and investigated for their survival properties. Furthermore, given its relation of level of oxygen and radiation, the activities of catalase and superoxide dismutase and as well as the level of the reducing agent glutathione were investigated in comparative fashion.

Results showed that, both recombinant strains became highly sensitive to radiation and they had considerably higher growth rates than the wild-type strain. Further, both recombinant strains had substantially lower oxygen uptake rate, reduced superoxide dismutase activity and glutathione level compared to the wild-type host strain. The catalase activity in recombinants, in contrast, was higher than that of in the host strain. As an indicator of radioresistance, the cellular level of Mn/Fe in wild-type host was 3-fold higher than that of in recombinant strains.

**KEY WORDS:** *Vitreoscilla* hemoglobin, *Deinococcus radiodurans*, Radioresistance

## TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın yürütülmesinde bütün bölüm imkânlarından faydalanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında yardımını, önerilerini ve desteğini esirgemedi beni yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hikmet GEÇKİL' e;

Yüksek lisansa başladığımdan itibaren her türlü yardımını, desteğini ve anlayışını esirgemeyen sevgili laboratuvar arkadaşlarım Emel AYTAN, Aslı GİRAY KURT ve Merve Gökşin KARAASLAN' a;

Tez çalışmalarımda her türlü imkanlarından faydalandığım Turgut Özal Tıp Merkezi Radyasyon Onkoloji Servisi'ne, Uzman Eda Kaya PEPELE'ye;

2011/120 no'lu proje ile bu araştırmayı destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne;

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bana maddi ve manevi açıdan destekleyen ve bugüne gelmemi sağlayan değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                                        |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ÖZET.....                                                                                                                              | i    |
| ABSTRACT.....                                                                                                                          | ii   |
| TEŞEKKÜR.....                                                                                                                          | iii  |
| İÇİNDEKİLER.....                                                                                                                       | iv   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                                                                                                   | vi   |
| ÇİZELGELER DİZİNİ.....                                                                                                                 | vii  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR.....                                                                                                           | viii |
| <b>1. GİRİŞ</b> .....                                                                                                                  | 1    |
| 1.1. <i>Deinococcus radiodurans</i> .....                                                                                              | 2    |
| 1.1.1. <i>D. radiodurans</i> 'ın Filogeni ve Habitatı.....                                                                             | 3    |
| 1.1.2. <i>D. radiodurans</i> 'ın Hücre Duvar Yapısı.....                                                                               | 4    |
| 1.1.3. <i>D. radiodurans</i> 'ın Genetiği.....                                                                                         | 5    |
| 1.1.4. <i>D. radiodurans</i> 'da İyonize Radyasyona Karşı Direnç Mekanizması.....                                                      | 6    |
| 1.1.4.1. <i>Deinococcus radiodurans</i> 'da Katalaz ve Süperoksit Dismutaz'ın Radyasyon Direncine Etkisi.....                          | 8    |
| 1.1.4.2. <i>Deinococcus radiodurans</i> 'da Mn/Fe oranının Radyasyon Direncine Etkisi...                                               | 8    |
| 1.2. Radyasyon ve Oksitatif Stres.....                                                                                                 | 9    |
| 1.2.1. Radyasyon.....                                                                                                                  | 10   |
| 1.2.2. Oksidatif Stres.....                                                                                                            | 11   |
| 1.2.2.1. Reaktif Oksijen Türleri.....                                                                                                  | 12   |
| 1.2.2.2. Serbest radikal tipleri.....                                                                                                  | 13   |
| 1.2.2.2.1. Süperoksit (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) Radikali.....                                                                     | 13   |
| 1.2.2.2.2. Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....                                                                     | 14   |
| 1.2.2.2.3. Hidroksil radikali (•OH).....                                                                                               | 14   |
| 1.2.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynağı.....                                                                                         | 14   |
| 1.3. Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri.....                                                                                      | 15   |
| 1.3.1. Oksidatif DNA Yıkımı.....                                                                                                       | 15   |
| 1.3.2. Lipid Peroksidasyonu.....                                                                                                       | 16   |
| 1.3.3. Protein Oksidasyonu.....                                                                                                        | 16   |
| 1.4. Antioksidanlar.....                                                                                                               | 17   |
| 1.4.1. Enzimatik Antioksidanlar.....                                                                                                   | 18   |
| 1.4.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD).....                                                                                                | 18   |
| 1.4.1.2. Katalaz (CAT).....                                                                                                            | 18   |
| 1.4.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar.....                                                                                           | 19   |
| 1.4.2.1. Glutasyon.....                                                                                                                | 19   |
| 1.5. <i>Vitreoscilla</i> hemoglobin.....                                                                                               | 19   |
| 1.5.1. VHb fonksiyonunun Mekanizmaları.....                                                                                            | 21   |
| 1.5.2. VHb ve Oksitatif Stres.....                                                                                                     | 22   |
| 1.5.3. Metabolik Mühendislikte VHb'nin Kullanımı.....                                                                                  | 23   |
| <b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....                                                                                                        | 24   |
| <b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....                                                                                                     | 30   |
| 3.1. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar ve Ayırıcılar.....                                                                             | 30   |
| 3.2. Kullanılan Bakteriler.....                                                                                                        | 30   |
| 3.3. <i>D. radiodurans</i> ile <i>vgb</i> <sup>+</sup> ve <i>vgb</i> <sup>-</sup> Rekombinant Suşlarının Stoklarının Hazırlanması..... | 31   |
| 3.4. <i>Vgb</i> Klonları.....                                                                                                          | 31   |
| 3.5. <i>D. radiodurans</i> 'ın Genetik Manipülasyonu.....                                                                              | 32   |
| 3.5.1. Plazmid İzolasyonu.....                                                                                                         | 32   |

|           |                                                                                                                                                                                           |    |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.5.2.    | Plazmidlerin Restriksiyon Kesilimi ve Agaroz Jel Elektroforezi.....                                                                                                                       | 34 |
| 3.6.      | Bakteri Kùltürleri.....                                                                                                                                                                   | 35 |
| 3.6.1.    | Biyokùtle Òlçümü.....                                                                                                                                                                     | 36 |
| 3.6.2.    | Canlı Hücre Sayısının Belirlenmesi.....                                                                                                                                                   | 36 |
| 3.6.3.    | Kùltürlerin Asit Üretimi.....                                                                                                                                                             | 36 |
| 3.7.      | Bakterilerin Oksijen Alımı.....                                                                                                                                                           | 36 |
| 3.8.      | Bakterilerin Radyasyona Maruz Kalması.....                                                                                                                                                | 38 |
| 3.9.      | <i>D. radiodurans</i> ile <i>vgb<sup>+</sup></i> ve <i>vgb<sup>-</sup></i> Rekombinant Suşlarının Radyasyon Sonrası Hücre Ekstraktlarının Hazırlanması.....                               | 38 |
| 3.10.     | Mn/Fe Oranı.....                                                                                                                                                                          | 39 |
| 3.11.     | Enzim Aktivite Tayini .....                                                                                                                                                               | 39 |
| 3.11.1.   | Katalaz Aktivitesinin Òlçümü.....                                                                                                                                                         | 39 |
| 3.11.2.   | Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini .....                                                                                                                                           | 40 |
| 3.11.3.   | Total Glutasyon (GSH) Òlçümü.....                                                                                                                                                         | 41 |
| 3.11.4.   | Total Protein Tayini.....                                                                                                                                                                 | 41 |
| <b>4.</b> | <b>ARAŞTIRMA BULGULARI</b> .....                                                                                                                                                          | 42 |
| 4.1.      | TGY Ortamında Üretilen <i>D. radiodurans</i> (yabanıl) ve Onun <i>vgb<sup>-</sup></i> (Dr[pUC8]) ve <i>vgb<sup>+</sup></i> (Dr[pUC8:15]) Rekombinant Suşlarında Üremenin Òlçümü.....      | 42 |
| 4.1.1.    | Canlı Hücre Sayımı (Doğrudan Òlçümü).....                                                                                                                                                 | 42 |
| 4.1.2.    | OD Òlçümü (Dolaylı Òlçümü).....                                                                                                                                                           | 43 |
| 4.2.      | TGY Ortamında Üretilen <i>D. radiodurans</i> (yabanıl) ve Onun <i>vgb<sup>-</sup></i> (Dr[pUC8]) ve <i>vgb<sup>+</sup></i> (Dr[pUC8:15]) Rekombinant Suşlarında Oksijen Alımı .....       | 43 |
| 4.3.      | Radyasyon uygulanan <i>D. radiodurans</i> (yabanıl) ve Onun <i>vgb<sup>-</sup></i> (Dr[pUC8]) ve <i>vgb<sup>+</sup></i> (Dr[pUC8:15]) Rekombinant Suşlarında Mn/Fe Oranı.....             | 44 |
| 4.4.      | Radyasyon uygulanan <i>D. radiodurans</i> (yabanıl) ve Onun <i>vgb<sup>-</sup></i> (Dr[pUC8]) ve <i>vgb<sup>+</sup></i> (Dr[pUC8:15]) Rekombinant Suşlarında SOD, CAT ve GSH Tayini ..... | 45 |
| 4.4.1.    | Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi.....                                                                                                                                                 | 45 |
| 4.4.2.    | Katalaz (CAT) Aktivitesi.....                                                                                                                                                             | 47 |
| 4.4.3.    | Glutasyon (GSH) Miktarı.....                                                                                                                                                              | 48 |
| 4.5.      | Radyasyon Sonrası Bakterilerin Canlı Hücre Sayıları.....                                                                                                                                  | 49 |
| <b>5.</b> | <b>TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....                                                                                                                                                            | 51 |
| <b>6.</b> | <b>KAYNAKLAR</b> .....                                                                                                                                                                    | 56 |
|           | <b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....                                                                                                                                                                     | 63 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|           |                                                                                                                                                                                                        |    |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1 | <i>Deinococcus radiodurans</i> .....                                                                                                                                                                   | 2  |
| Şekil 1.2 | Durağan fazda tetrat şeklinde <i>Deinococcus radiodurans</i> 'ın epifloresan görüntüsü.....                                                                                                            | 6  |
| Şekil 1.3 | <i>D. radiodurans</i> 'da DNA tamirinde fonksiyon gösteren rekombinasyonel DNA çift zincir kırık tamir yolları.....                                                                                    | 7  |
| Şekil 1.4 | Üç farklı tip iyonize radyasyonun izlediği yol.....                                                                                                                                                    | 11 |
| Şekil 1.5 | Reaktif oksijen türlerinin kaynakları.....                                                                                                                                                             | 15 |
| Şekil 1.6 | VHb'nin 3-boyutlu yapısı.....                                                                                                                                                                          | 20 |
| Şekil 1.7 | Enerji metabolizmasını arttırmak için sitokrom kompleksi ve VHb etkileşiminin öngörülen mekanizması.....                                                                                               | 22 |
| Şekil 3.1 | pUC8 ve pUC8:15 plazmidlerinin fiziki haritası.....                                                                                                                                                    | 31 |
| Şekil 3.2 | Hind III ile kesilmiş $\lambda$ (1) ve Sal I ile kesilmiş <i>D. radiodurans</i> [pUC8] plazmidi (2) ve <i>D. radiodurans</i> [pUC8:15] plazmidinin (3) agaroz jeldeki restriksiyon fragmanları.....    | 35 |
| Şekil 4.1 | <i>D. radiodurans</i> (yabanıl) ile $vgb^-$ (Dr[pUC8]) ve $vgb^+$ (Dr[pUC8:15]) rekombinant suşlarının canlı hücre sayısı.....                                                                         | 42 |
| Şekil 4.2 | <i>D. radiodurans</i> (yabanıl) ile $vgb^-$ (Dr[pUC8]) ve $vgb^+$ (Dr[pUC8:15]) rekombinant suşlarında OD <sub>600</sub> değerleri.....                                                                | 43 |
| Şekil 4.3 | İyonize radyasyon uygulanan <i>D. radiodurans</i> ve rekombinant bakterilerinde (a) 6 saat (b) 24 saatlik hücrelerin radyasyon dozuna bağlı olarak süperoksit dismutaz aktivitesi.....                 | 46 |
| Şekil 4.4 | İyonize radyasyon uygulanan <i>D. radiodurans</i> yabanıl ve rekombinant bakterilerinde (a) 6 saat (b) 24 saatlik hücrelerin radyasyon dozuna bağlı olarak katalaz aktivitesi.....                     | 47 |
| Şekil 4.5 | İyonize radyasyon uygulanan <i>D. radiodurans</i> yabanıl suşu ile bu bakterinin pUC8 ve pUC8:15 plazmidini taşıyan rekombinant bakterilerin (a) 6 saat (b) 24 saatlik hücrelerindeki GSH miktarı..... | 48 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|             |                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 1.1 | Çeşitli hemoglobinlerin kinetik sabitleri.....                                                                                                                                                                                           | 21 |
| Çizelge 3.1 | TGY Sıvı Besiyerinin İçeriği (g L <sup>-1</sup> ).....                                                                                                                                                                                   | 30 |
| Çizelge 4.1 | <i>D. radiodurans</i> yabanıl suşu ile <i>vgb</i> <sup>-</sup> (Dr[pUC8]) ve <i>vgb</i> <sup>+</sup> (Dr[pUC8:15]) rekombinant bakterilerinin oksijen alımı.....                                                                         | 44 |
| Çizelge 4.2 | <i>D. radiodurans</i> yabanıl suşu ile <i>vgb</i> <sup>-</sup> (Dr[pUC8]) ve <i>vgb</i> <sup>+</sup> (Dr[pUC8:15]) rekombinant bakterilerin Mn/Fe oranı.....                                                                             | 44 |
| Çizelge 4.3 | <i>D. radiodurans</i> yabanıl suşu ile <i>vgb</i> <sup>-</sup> (Dr[pUC8]) ve <i>vgb</i> <sup>+</sup> (Dr[pUC8:15]) rekombinant bakterilerinin 24 saat pH değerleri.....                                                                  | 45 |
| Çizelge 4.4 | <i>D. radiodurans</i> 'ın yabanıl suşu ve onun <i>vgb</i> <sup>+</sup> rekombinant suşu ile <i>vgb</i> içermeyen ( <i>vgb</i> <sup>-</sup> ) suşlarının iyonize radyasyon sonrasında doz artışına bağlı olarak canlı hücre sayıları..... | 49 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                |                                        |
|----------------|----------------------------------------|
| SOD            | Süperoksit Dismutaz                    |
| CAT            | Katalaz                                |
| GSH            | Glutasyon                              |
| mM             | Milimolar                              |
| $\mu$ M        | Mikromolar                             |
| g              | Gram                                   |
| $\mu$ l        | Mikrolitre                             |
| rpm            | Dakikada dönme hızı                    |
| mg             | Miligram                               |
| <i>vgb</i>     | Bakteriyel hemoglobini sentezleyen gen |
| VHb            | <i>Vitreoscilla</i> hemoglobin         |
| ROT            | Reaktif Oksijen Türleri                |
| $O_2^{\cdot-}$ | Süperoksit radikali                    |
| $OH^{\cdot}$   | Hidroksil radikali                     |
| $H_2O_2$       | Hidrojen peroksit                      |
| U              | Ünite                                  |
| SA             | Spesifik aktivite                      |

## 1. GİRİŞ

“Mikroorganizma” terimi bakteri, fungus, alg ve hatta protozoaları da içeren geniş bir yelpazede birçok mikro boyutlardaki canlıyı tanımlamak için kullanılmaktadır. Bakteriler bunlar arasında ve hatta tüm canlılar arasında yerküre üzerinde en çok sayı, çeşit ve kütlede bulunan mikroorganizmalardır. Yapılan çalışmalar, dünyamızda  $10^7$ – $10^9$  kadar farklı bakteri türünün olabileceğini göstermektedir. Bakteriler tüm canlılar içerisinde en yüksek üreme oranı ve en düşük jenerasyon sürelerine sahip olmaları ve diğer canlılar gibi logaritmik bir çoğalma göstermelerinden dolayı uygun besi ortamlarında büyük kütlelere ulaşabilirler. Yapılan hesaplamalar *Escherichia coli* gibi laboratuarlarda yaygın kullanılan ve uygun besin ortamında çoğaltılan bir bakterinin her 20 dakika da bir bölünebileceğini ve dolayısı ile 24 saate 72 jenerasyon geçirebileceğini göstermiştir. Eğer bakteri bu hızla 24 saat boyunca çoğalabilseydi, tek hücresi yaklaşık  $10^{-12}$  g olan *E. coli* 1 günde yerkürenin toplam kütesinden daha büyük bir kütleyle ulaşacaktı. Ancak, bulundukları ortamdaki besin kısıtlamasından dolayı hiçbir bakteri bu şekilde çoğalmaya devam edemez ve ortam besini tükendiğinde bakteriler de çoğu zaman ortadan kalkarlar [1-3].

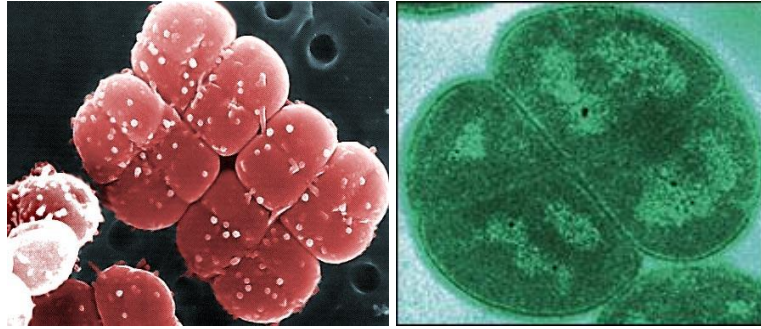
Ekstrem çevresel koşullardaki araştırmalar çeşitli mikroorganizmaların sadece bu koşulları tolera etmediklerini aynı zamanda çoğu zaman yaşamak için bu koşullara ihtiyaç duyduklarını göstermiştir. Ekstrem çevresel koşullara çoğu canlı sistemin canlılığını sürdürmesini ve gelişebilmesini zorlaştıran öğeler olarak bakılabilir. Bu koşullar fiziksel (sıcaklık, radyasyon ve basınç gibi) ve jeokimyasal (kuraklık, tuzluluk, pH, ve redoks potansiyelleri gibi) öğeleri içeriyor olabilir [4]. Bu ekstrem çevrelerde yaşamını sürdüren bazı canlılar ilginç biçimde yalnızca bu çevreleri tolere etmekte kalmaz, aynı zamanda üremek için bu çeşit çevrelere ihtiyaç duyarlar. Ekstremofiller her üç domainin (bakteri, arkea ve ökaryotlar) temsilcilerini içerir. Ancak, ekstremofil organizmaların çoğunu prokaryotlar oluşturur ve bunların büyük bir bölümü de arkea domainine dahildir [5].

Prokaryotik ekstremofiller dünyadaki yaşamın ilk temsilcileri olarak görülmektedirler ve bugünkü bütün bilinen ekosistemin evriminden sorumludurlar. Genom esnekliği bu canlıların muhtemelen ekstrem çevrelerin geniş bir spektrumuna adaptasyonuna izin vermiştir. Sonuç olarak, prokaryotik ekstremofildeki çeşitlilik

termofilik, psikrofilik, asidofilik, alkalifilik, halofilik, barofilik ve radyasyona dirençli türlerden oluşur [6-7]. Bu çalışmada kullanılan *Deinococcus radiodurans* iyonize radyasyon, kuraklık, soğuk, genotoksik kimyasalların olduğu ekstrem çevrelerde yaşayabilen [8] ve uzay çalışmalarında ve astrobiyoloji araştırmalarında en çok kullanılan bir bakteridir [9].

### 1.1. *Deinococcus radiodurans*

*D. radiodurans* pigmentli, spor oluşturmeyen, çapı 1.5 dan 3.5  $\mu\text{m}$ 'ye değişen küresel görünümlü bir bakteridir (Şekil 1.1) [10]. Ortam şartlarına bağlı olarak koloniler konveks, düz ve pembeden kırmızıya çeşitli renklerde bulunurlar. Dayanıklılığı sebebiyle bu canlı türü, "Conan the Barbarian" oyunundan esinlenilerek "Conan the Bacterium" (Türkçe: Bakteri Conan) olarak adlandırılmaktadır [11].



Şekil 1. 1. *Deinococcus radiodurans*

*D. radiodurans* Gram-pozitif bir bakteridir ancak Gram-negatif organizmalarındakine benzer kompleks bir hücre duvarına sahiptir. Hücreler kemoorganotrofik solunum mekanizmasına sahiptirler ve tipik bir şekilde TGY ortamında (0.5% tripton, 0.1% glukoz, 0.3% maya özütü) havalandırma ile büyürler. Optimal koşullar altında yabancıl tip *D. radiodurans*'ın jenerasyon zamanı yaklaşık 80 dakikadır. Hücreler sırası ile sıvı ortamda ikili ve dörtlü olarak iki düzlemde bölünürler. Optimal büyüme sıcaklığı 30 °C'dır fakat 37 °C'a kadar büyüme gerçekleşir. 4 °C altında ve 45 °C üstünde büyümesi durur [12]. Guinness rekorlar kitabına girmiş olan *D. radiodurans*'ın radyasyona dirençliliği diğer canlılarla kıyaslanacak olursa insanlar 5 Gy'e, *E. coli* 200-800 Gy'e, radyasyona dirençli su ayısı ise 4,000 Gy'e kadar dayanabilirken *D. radiodurans*'da 5,000 Gy iyonize radyasyonda canlılık kaybı görünmez, 15,000 Gy de ise % 37 oranında canlılık göstermektedir. Organizmanın DNA'sında 5, 000 Gy'de birkaç yüz çift zincir kırıkları olduğu tahmin edilmektedir. *D.*

*radiodurans* radyasyonun yanısıra genotoksik kimyasallara, oksidatif zararlara, yüksek seviyede iyonizasyona, soğuğa ve dehidrasyona karşı oldukça dayanıklılık göstermektedir ve bu özelliğinden dolayı poliektremofil bir bakteri olduğu belirlenmiştir [8].

#### 1.1.1. *D. radiodurans*'ın Filogeni ve Habitatı

*D. radiodurans* ilk olarak Anderson ve arkadaşları tarafından Oregon'da gamma-iyonize radyasyona maruz bırakılan konserve etlerden izole edildi ve morfolojik ve fizyolojik yapısı baz alınarak yapılan sistematigi sonucu *Micrococcus radiodurans* olarak isimlendirildi [13]. Ancak 16 S rRNA analizleri *M. radiodurans*'ın eşsiz bir yeni grup olduğunu gösterdi. Bu yüzden bu yeni tür *Deinococcaceae* olarak yeni bir familya içinde *Deinococcus radiodurans* olarak yeniden isimlendirildi [14].

|                |                                |
|----------------|--------------------------------|
| <b>Domain</b>  | Bacteria                       |
| <b>Alem</b>    | Eubacteria                     |
| <b>Filum</b>   | Deinococcus – Thermus          |
| <b>Sınıf</b>   | Deinococci                     |
| <b>Takım</b>   | Deinococcales                  |
| <b>Familya</b> | Deinococcaceae                 |
| <b>Cins</b>    | Deinococcus                    |
| <b>Tür</b>     | <i>Deinococcus radiodurans</i> |

*Deinococcus* türleri sıcak iklimler, çöller, alpin çevreler ve Antartika gibi çok farklı habitatlarda bulunabilmektedirler. Mezofilik, termofilik ve psikrofilik türler içermektedir. *D. radiodurans* yüksek neme toleranslı değildir. *Deinococcin*in kuru gıdalardan, ev tozundan, medikal cihazlardan ve tekstil ürünlerinden başarılı şekilde izolasyonları göstermiştir ki bu familya kuru ve besince fakir çevrelerde yaşama yeteneğine sahiplerdir. Bütün *Deinococcus* türleri DNA yıkıcı ajanlara karşı özellikle iyonize radyasyona karşı sahip oldukları sıra dışı toleranslarıyla diğer canlılardan ayrılırlar [15-16]. *Deinococcin*in doğal habitatı bu familyanın üyelerinin dünya genelinde çok farklı bölgelerde izole edilmesine rağmen belirlenemedi. Bu izolasyonların yapıldığı çevreler tüm ekolojileri ve coğrafik dağılımları yönünden bakıldığında oldukça büyüktür. Yapılan ekolojik çalışmalar büyük oranda *Deinococcin*in toprak bakterileri olduklarını göstermektedir. Zengin organik besinlerde,

toprakta, hayvan dışkısında, işlenmiş ette ve lağım sularında izole edilen Deinococcal organizmaların varlığı bu sonuçla uyumludur [12].

Bu izolasyonlar Deinococcinin daha çok uzun süreli stres koşullarında yaşayabilen spor oluşturan organizmalardaki gibi evrimleşmiş olduklarını düşündürmektedir. *D. radiodurans*'ın kuraklığa karşı dirençli olması da dikkate değerdir. Sistematik olmayan bir kayda göre bir desikatör içinde 6 yıl boyunca %10 canlılığını sürdürebilmektedir [12].

### **1.1.2. *D. radiodurans*'ın Hücre Duvar Yapısı**

*D. radiodurans*'ın hücre duvarı yapısı ve kompozisyonu açısından oldukça sıra dışıdır. *D. radiodurans*'ın gram negatif bakterilerin hücre duvarını andıran bir yapısı olmasına rağmen genellikle gram pozitifler gibi boyanır. Bunun, kalın peptidoglikan tabakasının yetersizliğinden kaynaklandığı sanılmaktadır. Bu bakterinin hücre duvarı 14 nm'den 20 nm'ye değişen kalınlıkta bir peptidoglikan tabaka ve karakterize edilmemiş bölümlere ayrılan bir tabakayla ayrılmış plazma ve dış zarlardan meydana gelir. En az 6 tabaka elektron mikroskopuyla tanımlanmıştır. En iç tabaka plazma membranıdır. Diğer tabaka peptidoglikan içerikli bir hücre duvarıdır ve delikli bir yapısı vardır ancak fizyolojik önemi bilinmemektedir. Üçüncü tabaka çok sayıda bölümlenmiş tabakadan oluşan iç içe girmiş bölümlerden oluşuyor görünümündedir. Dördüncü tabaka dış zar ve beşinci tabaka farklı bir fibrilli tabakadan oluşmaktadır. Altıncı tabaka diğer tipik bakteriyel S-tabakalarda görülen düzenli olarak paketlenmiş hegzagonal protein alt ünitelerinden oluşur. Hekzagonal paketlenmiş tabaka karotenoidler, lipidler, proteinler ve polisakkaritleri içerir. Polisakkaritler galaktoz ve glukoz ile eser miktarda ramnoz ve mannoz içerirken heptozları içermez. Yaygın bakteriyel fosfolipidler fosfotidiletanolamin, fosfotidilserin, fosfotidilkolin ve fosfotidilinositol'den oluşur [17]. *D. radiodurans*'ın birkaç suşu yoğun bir karbonhidrat kılıf da içermektedir. Sadece sitoplazmik zar ve peptidoglikan tabaka hücre bölünmesi boyunca septum oluşumuna dahil olur. Diğer tabakalar bir kılıf olarak görev yapmaktadırlar [18].

*D. radiodurans* plazma zarı ve duvarında diğer bakterilerde bulunan fosfolipidlerden yoksundur [17]. Plazma zarı ve duvarında bilinen lipopolisakkaritler bulunmaz. *D. radiodurans*'ın yağ asit kompozisyonunda hidroksi yağ asitleri, lipit A ve heptozlar bulunmaz. *D. radiodurans*'ın zar lipidinin % 43'ü bir seri alkilaminler içeren fosfoglikolipidden oluşmuştur [19]. Bu lipidlerin bir öncülü olan fosfatidil gliserol alkil

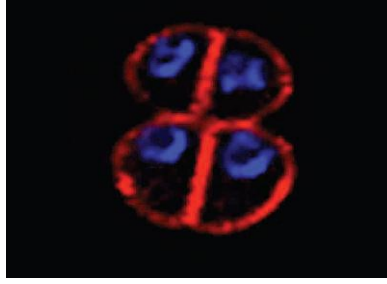
aminden kökenlendiği ve bu öncülün galaktoz ve glukozaminle glikosillendiği zaman oluştuğu açığa çıkarılmıştır. Glukozamin içerikli lipidlerin diğer türlerde de bulunmasına rağmen bu tip lipidlerin sadece *D. radiodurans*'da bulunduğu öngörülmektedir [20].

*D. radiodurans*'ın hücre zarında bulunan lipoproteinler başlıca çift zincirli, düz zincir, doymuş yağ asitleri içerir ancak ayrıca bakterilerde bulunan yaygın bileşenlerden olmayan tekli doymamış yağ asitleri ve tek zincirli doymuş yağ asitleri içerir [21]. Doymamış yağ asitleri hücre zar akışkanlığında etkilidir ve bakterinin kuraklıkta hacminde meydana gelen değişikliklere uyum sağlamasında önemli rol oynar. Hücre zar yapısında çoklu doymamış, siklopropil ve dallanmış zincirli yağ asitleri görülmemektedir [17].

### **1.1.3. *D. radiodurans*'ın Genetiği**

*D. radiodurans* multigenomik bir bakteridir. Genomu % 66.6 GC içeriğine sahiptir ve 3.28 Mb büyüklüğündedir. 295 bölgede genom içerisine yayılmış, büyüklükleri 60 bp'den 215 bp'ye kadar değişen 9 tip kısa nükleotid tekrarları bulunur. Genom bölümlenmiştir ve sırası ile 2.64-Mb (kromozom I), 0.41 Mb (kromozom II), büyüklüklerinde iki kromozomdan ve 0.18 Mb büyüklüğünde bir megaplazmitten ve 0.045 Mb büyüklüğünde bir diğer plazmitten oluşur [22-23]. *D. radiodurans* bakteriyel büyüme fazlarına bağlı olarak 4 ila 10 arasında değişen genom kopya sayılarına sahiptir [24]. Durağan fazdaki hücrelerde sıkı halka şeklinde düzenlenmiş bir nükleoid organizasyonu görülür (Şekil 1.2) [25].

*D. radiodurans* genomu ayrıca çeşitli mobil genetik elementler içerir. Bu mobil genetik elementler inteinler, insersiyon dizileri (IS), küçük kodlanmayan tekrarlar (SNR) ve iki profajdan oluşur [18]. *D. radiodurans* bakteriyel genomlar içerisinde en geniş sayıda insersiyon dizilerine sahip bakteri genomlarından birine sahiptir. 52 IS ve 247 SNR'ye sahiptir. IS'ler plazmidler üzerinde yaygındır. Ancak SNR'ler kromozomlar üzerine bulunurlar [26].



**Şekil 1.2.** Durağan fazda tetrat şeklinde *Deinococcus radiodurans*'ın epifloresan görüntüsü. DNA' sı ile mavi renkte görülmekte; membranı ise FM4-64 boyasıyla kırmızı renkte görülmektedir [25]

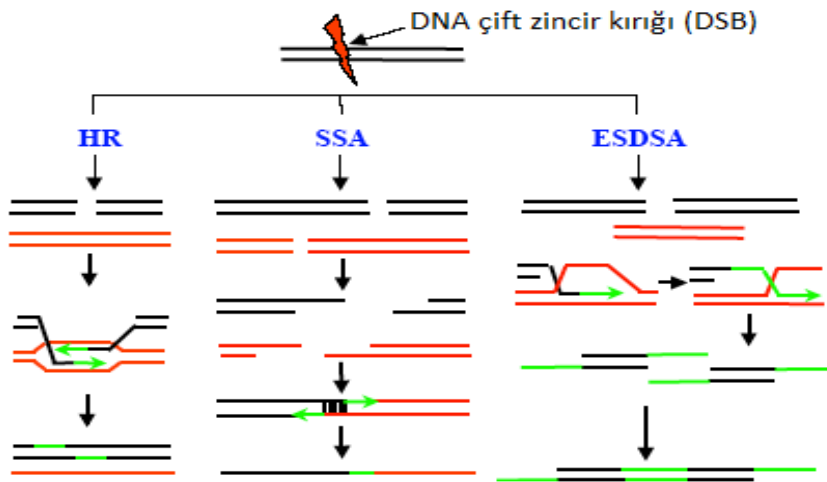
#### **1.1.4. *D. radiodurans*'da İyonize Radyasyona Karşı Direnç Mekanizması**

*D. radiodurans*'da bulunan mekanizmaların hiç biri iyonize radyasyon veya kuraklık sonrası DNA'da hasar oluşumunu engellemez. Benzer koşullar altında iyonize radyasyon uygulanan *E. coli* ve *D. radiodurans* hücrelerinde yapılan çalışmalar her iki bakteri DNA'sında aynı oranda DNA hasarı oluştuğunu göstermektedir. Ancak *D. radiodurans* DNA hasarından sonra DNA'nın yeniden hızlı bir şekilde oluşturulmasını sağlayan etkili mekanizmalara sahiptir [27].

*D. radiodurans*'da radyasyona direnç mekanizması iki başlıkta incelenebilir. Bunlardan biri rekombinasyonel DNA zincir kırık tamir mekanizmaları olarak diğeri radyasyon sonrası oluşan oksidatif strese karşı enzimatik ve enzimatik olmayan savunma mekanizmalarıdır. İyonize radyasyon sonucu oluşan çok sayıda DNA fragmentinden yeniden DNA'nın oluşturulması için *D. radiodurans*'da birkaç farklı rekombinasyonel mekanizmanın rol oynadığı düşünülmektedir. Bu mekanizmalar özellikle homolog rekombinasyon (HR), tek zincir uzaması (SSA) ve extended synthesis-dependent strand annealing (ESDSA) rekombinasyonel tamir mekanizmalarıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalar *D. radiodurans*'da özellikle ESDSA ve homolog rekombinasyonun iyonize radyasyon sonrası hızlı ve etkili DNA tamirinde daha fonksiyonel olduğunu göstermiştir (Şekil 1.3). ESDSA'da şiddetli DNA yıkımının hemen sonrasında fragmanlarına ayrılan DNA'da, tek zincir üzerindeki RecA- ve RadA- aracılı zincir çıkarma işlemiyle 3' ucundaki çıkıntılar çıkarılarak 5' - 3' yönünde girinti oluşturulur. DNA sentezi Pol III ile başlatılır ve Pol I veya Pol III ile zincir uzatılır. Yeni sentezlenen tek zincirler uzun çift zincirli DNA fragmanlarını oluşturan tamamlayıcı tek zincir uzantılarına eklenir. Bu çift zincir DNA fragmanları RecA-aracılı homolog rekombinasyon ile dairesel kromozom içerisine yerleştirilir [28-29].

*D. radiodurans*'ın transkriptom analizi kuraklığa veya iyonize radyasyona cevap olarak bu rekombinasyonel tamir mekanizmalarında görev alan düzenleyici role sahip yaklaşık 72 düzenleyici gene sahip olduğunu göstermiştir. Bu genler içerisinde *recA* (DR2340), *uvrA* (DR1771), *uvrB* (DR2275), *gyrA* (DR1913) ve *gyrB* (DR0906) iyi tanımlanmış olan genlerdir. *ddrA* (DR0423), *ddrB* (DR0070), *ddrC* (DR0003), *ddrD* (DR0326), ve *pprA* (DRA0346) genleride iyonize radyasyonda yüksek oranda indüklenmektedirler. Ancak bu 5 genin fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir [30].

*D. radiodurans*, bu rekombinasyonel tamir mekanizmalarının yanında radyasyon sonrası oluşan oksidatif strese karşı etkili antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. İyonize radyasyon sadece DNA'da hasara neden olmaz. İyonize radyasyon sonrası oluşan reaktif oksijen türleri başta proteinler olmak üzere lipid ve diğer hücresel bileşenlerde de hasara neden olarak hücre ölümüne neden olurlar. *D. radiodurans*'da antioksidan savunma mekanizması enzimatik ve enzimatik olmayan bileşenlerle yürütülür. En etkili enzimatik antioksidan savunma bileşenlerini katalaz ve süperoksit dismutaz oluşturur. Enzimatik olmayan antioksidan savunmada özellikle protein oksidasyonuna karşı *D. radiodurans* hücrelerinde manganez etkili bir fonksiyona sahiptir [31].



**Şekil 1.3** *D. radiodurans*'da DNA tamirinde fonksiyon gösteren rekombinasyonel DNA çift zincir kırık tamir yolları

#### 1.1.4.1. *Deinococcus radiodurans*'da Katalaz ve Süperoksit Dismutaz'ın Radyasyon Direncine Etkisi

*D. radiodurans*'da iyonize radyasyon sonrası yüksek aktivite gösteren enzimlerden başlıca ikisi süperoksit dismutaz (SOD) ve katalazdır (CAT). Katalaz  $H_2O_2$ 'yi ortadan kaldırır, süperoksit dismutaz ise hücreden süperoksit radikallerini temizler [32-33]. *D. radiodurans* üç katalaz (katE katalazlar DR1998 ve DRA0259 ve ökaryotik tip DRA0146), dört süperoksit dismutaz (Mn-bağlı DR1279 ve Cu/Zn-bağlı DR1546, DRA0202 ve DR06644), bir sitokrom c peroksidaz (DRA0301) ve bir demir bağlı peroksidaz (DRA0145) kodlayan genlere sahiptir [18].

Yapılan karşılaştırmalı çalışmalar *D. radiodurans*'ın  $H_2O_2$ 'ye *E. coli*'den daha yüksek dirençli olduğunu göstermektedir. İlerleyen ve durağan faz boyunca katalaz aktivitesi *E. coli*'den sırası ile 127 ve 32 kat daha yüksektir. Katalaz aktivitesi  $H_2O_2$ , iyonize radyasyon, manganez ve gelişim fazıyla etkilenmektedir. Öyleki durağan fazdaki katalaz aktivitesi ilerleyen fazdaki aktivitesinden daha fazladır [34-36]. Katalaz aktivitesi transkripsiyonel regülatör DrRRA tarafından pozitif olarak, OxyR tarafından negatif olarak kontrol edilir. DR1998 iyonize radyasyona cevap olarak indüklenir ve  $H_2O_2$  varlığında daha stabil durumdadır [30, 37-38].

*D. radiodurans*'da süperoksit dismutaz (SOD) proteinleri arasında, DR1279 esas olarak ifade edilen SOD proteinidir. DR1279 *E. coli*'deki Mn-SOD'lardan daha etkili bir şekilde daha yüksek konsantrasyonlardaki  $O_2^{\cdot -}$  'yi elimine eder. *D. radiodurans*'ın katalaz (DR1998) ve süperoksit dismutaz (DR1279) mutantları  $H_2O_2$ 'ye duyarlıdır ancak 16 kGy dozdan düşük iyonize radyasyonlara dirençlidirler [39-41].

#### 1.1.4.2. *Deinococcus radiodurans*'da Mn/Fe oranının Radyasyon Direncine Etkisi

Bakterilerde iyonize radyasyona direnç ve hücrel Mangan (Mn) / Demir (Fe) oranı arasında yakın bir ilişki vardır. Yaklaşık aynı hücrel Mn/Fe oranına sahip hücrelerde iyonize radyasyona maruz kaldıktan sonra aşağı yukarı aynı oranda DNA yıkımı görülür. Ancak hücrel Mn/Fe oranı yüksek bakterilerde iyonize radyasyona maruz kaldıkları süre boyunca oksidatif protein yıkımı hücrel Mn/Fe oranı düşük bakterilere göre çok azdır ve bu bakteriler düşük Mn/Fe oranına sahip hücrelerden daha çok radyasyona dirençlidirler. Özellikle yapılan çalışmalar hücre içi Mn/Fe oranı 0.14 ile 0.4 arasında olan bakterilerin radyasyona oldukça dirençli olduklarını göstermiştir.

Hücresel Mn/Fe oranı yüksek bakterilerden biri *D. radiodurans*'dır. Yaklaşık 0.24'lük bir hücre içi Mn/Fe oranına sahiptir [42].

Manganez ve hücresel metabolitlerin oluşturdukları kompleksler *D. radiodurans*'ın sitosolünde oldukça yüksek konsantrasyonda bulunur ve iyonize radyasyona maruz kaldıktan sonra hücrede hızlı ve doğrudan reaktif oksijen türlerini (ROT) temizleme fonksiyonu gösterir.  $Mn^{2+}$  kompleksleri bu nedenle iyonize radyasyondan sonra yıkılan ve tekrar sentezlenmeleri gereken enzimatik ROT temizleyici sistemlerden daha etkili ve yararlıdır [31].

*In vitro* divalent manganez iyonları ( $Mn^{2+}$ ) fosfat ile bir kompleks oluşturarak  $O_2^{\bullet-}$  radikallerini, bikarbonat ve amino asit veya peptidlerle oluşturdukları komplekslerle  $H_2O_2$ 'yi temizleyebilmektedirler [43].

*In vitro* olarak  $O_2^{\bullet-}$  süperoksit radikalının ortadan kaldırılması Mn'nin bir eşik konsantrasyonuna bağlıdır. *D. radiodurans* istisnai olarak yüksek hücre içi manganez içeriğine (0.2-4 mM) ve 0.24'lük yüksek hücre içi manganez-demir (Mn/Fe) oranına sahiptir [42, 44]. Bununla birlikte geç durağan fazdaki *D. radiodurans* hücreleri aynı Mn/Fe oranına sahip erken durağan fazdaki hücrelerden daha çok radyasyona duyarlıdır. Hem manganez azalması hemde manganezin aşırı birikimi oksidatif strese sebep olabildiği için büyüme ortamında optimal bir manganez konsantrasyonu (örneğin; 5M) manganez komplekslerinin antioksidan fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için gereklidir [45-46]. Mn içermeyen zengin besi ortamlarında yetişen *D. radiodurans* hücreleri 6 kat daha düşük Mn/Fe oranına sahiptirler ve yüksek seviyelerdeki oksidatif protein yıkımına neden olan iyonize radyasyona 6 kat daha duyarlıdırlar [44].

Antioksidan özelliklerinden başka UVDE endonükleaz, süperoksit dismutaz, DNA polimeraz X, NAD-bağımlı DNA ligaz ve çift fonksiyonlu esteraz/nükleaz DR0505 gibi enzimlerin aktivasyonu içinde manganeze ihtiyaç duyulur [47-48].

## 1.2. Radyasyon ve Oksidatif Stres

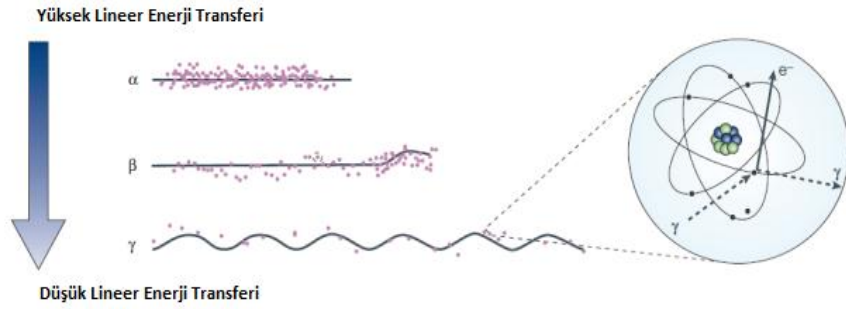
*D. radiodurans*'ın direnç mekanizmalarından biri bakterinin etkili bir antioksidan sistemine sahip olmasıdır [41]. Radyasyonun hücrede meydana getirdiği reaktif oksijen türleri sonucu oluşan oksidatif stres bakteride çok etkin bir şekilde çalışan bu antioksidan sistemlerle ortadan kaldırılmaktadır [49]. Bu antioksidan sistemler enzimatik ve enzimatik olmayan sistemler olarak ikiye ayrılır. Katalaz ve

SOD gibi enzimler aerobik hücrelerde süperoksit radikallerine ve hidrojen peroksit'e karşı savunmadan sorumlu enzimatik antioksidanların başında gelirler. Katalaz, hücreleri radikallere karşı korumada SOD enzimi ile birlikte çok önemli bir görev yüklenmiştir. *D. radiodurans* genomu farklı tipde CAT ve SOD kodlayan genlere sahiptir (CAT X, CAT E, SOD A, SOD C). Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında ise karotenoidler, vitaminler ve glutatyon etkili reaktif oksijen türlerini temizleme kapasitesine sahiptirler [50].

### 1.2.1. Radyasyon

İyonize radyasyon molekülleri iyonize etmek için gereken enerjiye sahip radyasyondur. İki tip iyonize radyasyon vardır. Her iki tip radyasyonda radyoaktif elementlerin çürümesi sonucu oluşur. Bu radyasyon tiplerinden biri elektromagnetik (radyo dalgaları ve görülebilir ışığı içeren elektromagnetik spektrum kısmını oluşturan X- ve  $\gamma$ -radyasyon) ve diğeri partiküllerdir ( $\alpha$  ve  $\beta$  partiküller). İyonize radyasyonun farklı tipleri nesneye farklı oranlarda enerji verirler.  $\alpha$ - ve  $\beta$ - partiküller nesneye girişinden hemen sonra kısa bir aralık içerisinde çarpışmalar yoluyla iyonizasyon üretirler.  $\gamma$ - ışınlar birkaç farklı tipteki enerji absorpsiyonu yoluyla (en yaygını cisimdeki elektronlarla çarpıştığı zaman elektromagnetik radyasyonun dalga boyunda bir artış oluşturan Compton etkisiyle oluşan enerji absorpsiyonu tipi) iyonlar üretirler ve derin bir şekilde bir hücre veya doku içerisine nüfuz edebilirler. İyon üretimi enerjetik elektronların serbest bırakılmasıyla birlikte oluşur. Şekil 1.4'de üç farklı tip iyonize radyasyonun izlediği yol gösterilmektedir. Küçük noktalar enerjinin verildiği olayları göstermektedir. Şekil 1.4'de bir  $\gamma$ - ışın fotonun çarpışma vasıtası ile oluşan bir iyon üretmek için bir atomdan bir elektronun fırlatılmasını göstermektedir.  $\gamma$ - ışını bir saçak elektronuna onun enerjisinin bir kısmını transfer eder ve bunun sonucunda çekirdekten fırlatılan bir iyon oluşturulur. Saçılmış  $\gamma$ - ışını cisim içerisinde başka Compton etkilerine maruz kalabilir. İyonlar nanosaniye zaman skalası içerisinde diğerk moleküllerle reaksiyona girerek serbest radikalleri üretirler. Su içerisinde ürünler oldukça yüksek reaktif hidroksil radikalleri içerirler. Tipik olarak her bir enerji veren olay birkaç nanometre yarıçap içerisinde 2-5 radikal çifti oluşturabilir. Enerji yüklemesi (hücreler, dokular veya diğerk cisimler tarafından absorbe edilen doz) rad veya Gray (SI ölçümüne göre; 100 rad=1 Gray) olarak ölçümlendirilir. Mikroorganizmaların radyasyona dirençleri D<sub>37</sub> (hücrelerin %37'sinin canlı kaldığı doz) doz ölçüsüyle kıyaslanır. Cisim boyunca geçiş yapan radyasyon olarak üretilen iyonlar ve serbest

radikaller hızlı bir şekilde moleküllerle reaksiyona girerler ve bu molekülleri modifiye ederler. Hücrede en çok etkilenen moleküller DNA, proteinler ve lipidlerdir. Bütün bu hücresel komponentlerin içinde genom hasarı muhtemelen hücre canlılığı üzerindeki en büyük etkiye sahiptir. Öyle ki herhangi bir kısmının kaybı tek hücreli organizmalar için katastrofiktir [51].



**Şekil 1.4.** Üç farklı tip iyonize radyasyonun izlediği yol

### 1.2.2. Oksidatif Stres

Serbest radikaller ve oksidanlar fazladan üretildikleri zaman oksidatif stresi oluştururlar. Bu olay hücre zarları ve diğer protein, lipid ve DNA gibi yapıları ciddi bir şekilde değiştiren zararlı bir süreçtir [52]. Hücreler aşırı serbest radikal yapıları ortadan kaldıramadığı zaman oksidatif stres artar. Yani oksidatif stres reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu ve nötralizasyonu arasındaki bir dengesizlikten dolayı oluşur. Örneğin aşırı hidroksil radikalleri ve peroksinitrit lipid peroksidasyonu olarak isimlendirilen bir süreçle hücre zarlarını ve lipoproteinleri yıkabilir. Bu reaksiyon malondialdehit (MDA) ve sitotoksik ve mutagenik bir bileşik olan eşlenmiş dien bileşiklerinin oluşumuna sebep olur. Lipid peroksidasyonu bir radikal zincir reaksiyonu ile meydana gelir. Bir kez başladımı hızlı bir şekilde yayılır ve büyük oranda lipid moleküllerini etkiler. ROT serbest radikalleri proteinlerde de ayrıca yapısal değişiklik ve enzim aktivitesi kaybına sebep olan yıkımlara sebep olurlar. DNA’da farklı oksidatif DNA lezyonlarının oluşumuna sebep olan oksidatif yıkım mutasyonlara sebep olabilir. Vücut DNA tamir enzimlerini ve antioksidanları kullanarak bu yıkıcı etkileri önlemek için birkaç mekanizmaya sahiptir. Eğer hızlı bir şekilde düzenlenmezse, oksidatif stres hücre

ölümü, yaşlanma süreci ve bazı akut hastalıklar (travma ve felç gibi) gibi çeşitli kronik ve dejeneratif hastalıkları indükleyebilir [53].

#### **1.2.2.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)**

Aerobik yaşam için oksijen zorunlu bir elementtir. Hücreler enerji üretmek için oksijeni kullandıkları zaman ya oksijenin kullanıldığı reaksiyonların doğal sonucu olarak ya da ekzojen kaynakların doğrudan ya da dolaylı etkisi sonucu yan ürünler olarak serbest radikaller üretilir. Bu yan ürünler genellikle reaktif oksijen türleridir (ROT). Diğer bir deyişle, reaktif oksijen türleri moleküler oksijenden kökenlenen moleküllerin ve serbest radikallerin (eşlenmemiş bir elektrona sahip kimyasal türler) bir türünü tanımlamak için kullanılan bir ibaredir. Temel durumda moleküler oksijen dış yörüngede eşlenmemiş iki elektron (triplet durum olarak da bilinir) içeren bir biradikaldır. İki tek elektron aynı yörüngede olduğu için oksijen bir seferde sadece bir elektronla reaksiyona girer ve bu yüzden bir kimyasal bağda çok reaktif değildir. Diğer taraftan eğer iki eşlenmemiş elektrondan biri uyarılır veya yörüngesini değiştirirse oluşan türler (tekil oksijen olarak bilinirler) güçlü birer oksidan olurlar. Çünkü karşı yörüngelerdeki iki elektron hızlı bir şekilde özellikle çift bağlarda diğer eşlenmiş elektronlarla reaksiyona girebilir. Bu reaktif oksijen türleri hem toksik hem de yararlı bileşikler olarak çift rol oynarlar. Düşük seviyelerde reaktif oksijen türleri hücresel cevaplarda ve immün fonksiyonlarda yararlı etkide bulunurlar. Yüksek konsantrasyonlarda bütün hücresel yapıları yıkabilecek zararlı bir süreç olan oksidatif stresi oluştururlar [54-55].

Biyosferdeki en önemli elektron alıcısı oksijendir. Atmosferde  $O_2$ 'nin oluşumu dünyadaki ilk büyük kirlilik olayları arasında yer alır. İndirgeyici ilk atmosferdeki çok yoğun bulunan ferrus demiri ve oksijen arasındaki reaksiyon bütün makromolekülleri (DNA, lipid ve proteinler) etkileyen zararlı süperoksit ve hidroksil radikallerinin oluşumuyla sonuçlanır. Yaşayan organizmalar oksidatif strese karşı kendilerini korumak için katalaz, süperoksit dismutaz gibi enzimlerin, tioredoksin ve glutaredoksin gibi küçük proteinlerin ve glutatyon gibi moleküllerin oluşturduğu mekanizmalar geliştirmek zorundadırlar. Oksidatif stresten sorumlu bakteriyel genetik başlıca iki büyük transkripsiyonel düzenleyici (OxyR ve SoxRS) tarafından kontrol edilmektedir [56-57].

### 1.2.2.2. Serbest radikal tipleri

Reaktif oksijen türleri süperoksit ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroksil ( $HO^{\bullet}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroklorus asit ( $HOCl$ ), peroksil ( $ROO^{\bullet}$ ) ve alkoksil ( $RO^{\bullet}$ ) gibi serbest radikallerin oluşumuna aracılık ederler. Bu reaktif moleküller içerisinde süperoksit, nitrik oksit ve nitrojen dioksit en geniş çalışılmış türlerdir [53]. Hidroksil radikalleri ( $HO^{\bullet}$ ), süperoksit anyonu ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve nitrik oksit ( $NO^{\bullet}$ ) radikalleri DNA zincir kırıklarına, lipid peroksidasyona, bazı enzim oksidasyonlarına ve büyük bir protein oksidasyonuna ve ayrışmasına sebep olan yüksek kimyasal reaktivitelerinden dolayı çok geçici türlerdir [58-59].

#### 1.2.2.2.1. Süperoksit ( $O_2^{\bullet-}$ ) radikali

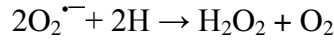
Süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\bullet-}$ ) NADPH oksidaz, ksantin oksidaz ve peroksidaz gibi birkaç hücrel oksidasyon sistemi üzerinden üretilir. Birkez oluştuktan sonra hidrojen peroksit, hidroksil radikali ( $HO^{\bullet}$ ), peroksinitrit ( $ONOO^-$ ), hidroklorus asit ( $HOCl$ ) gibi çeşitli ROT ve RNT'leri oluşturan birkaç reaksiyona dahil olur. Süperoksit radikali seçici reaktifliğe sahip oksijen merkezli bir radikaldir. Süperoksit ayrıca sitokrom c gibi belli demir kompleksleri indirger. Süperoksit anyonları doku yıkımını indükleyen biyolojik makromoleküllerle reaksiyona girme potansiyeline sahip aktif serbest radikallerin öncülleridir [60].

Bir seferde oksijenden bir elektronun indirgenmesi nispeten kararlı ara ürünler oluşturur. Oksijenin bir elektronunun indirgenmesiyle oluşan süperoksit anyonu ( $O_2^{\bullet-}$ ) çoğu reaktif oksijen türlerinin öncüsüdür ve oksidatif zincir reaksiyonlarında bir aracıdır.  $O_2^{\bullet-}$ 'nin dismutasyonu (ya kendiliğinden ya da süperoksit dismutaz tarafından kataliz edilen bir reaksiyon boyunca) hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ) üretir. Hidrojen peroksit sırasıyla tamamen suya indirgenebilir veya kısmen doğadaki en güçlü oksidanlardan biri olan hidroksil radikaline ( $HO^{\bullet}$ ) indirgenebilir.  $HO^{\bullet}$  formasyonu dönüşümlü metallerin indirgenmesiyle kataliz edilir [61].

Üstelik  $O_2^{\bullet-}$  her iki radikalın difüzyon oranıyla kontrol edilen bir reaksiyonda nitrik oksit ( $NO^{\bullet}$ ) içeren diğer radikallerle reaksiyona girebilir. Bu reaksiyonlardan oluşan ürün olan peroksinitrit ayrıca çok güçlü bir oksidandır.  $NO^{\bullet}$ 'den kökenlenen oksidantlar reaktif nitrojen türleri (RNT) olarak isimlendirilirler [62].

#### 1.2.2.2.2. Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

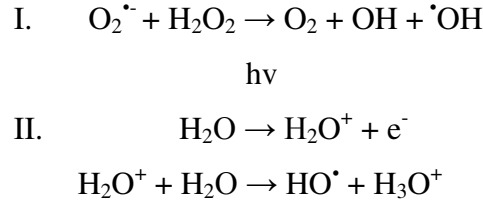
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> moleküler oksijenin iki elektron indirgenmiş durumudur ve başlıca süperoksit dismutaz izoformları tarafından kataliz edilen enzimatik dismutasyonlardan oluşur.



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> süperoksit radikalinin (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) enzimatik olmayan dismutasyonundan da oluşabilir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin başlıca özellikleri; kolayca biyolojik membranlardan diffüze olabilmesi; radikal olmayan etkili bir okside edici ajan olması; sulu çözeltilerde birkaç inorganik iyonu okside edebilmesi ve indirgeyebilmesi; O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ile reaksiyona girdiğinde çok yıkıcı ve reaktif bir tür olan HO<sup>•</sup> radikalini oluşturabilmesidir [63].

#### 1.2.2.2.3. Hidroksil radikali (HO<sup>•</sup>)

*In vivo* ortamlardaki en reaktif serbest radikal olan hidroksil radikali (HO<sup>•</sup>) Fe<sup>2+</sup> ve Cu<sup>+</sup> in varlığında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile O<sub>2</sub><sup>•-</sup>'nin reaksiyonu sonucu (I) veya suyun yüksek enerjili iyonize radyasyona maruz kalması sonucu (II) oluşur;

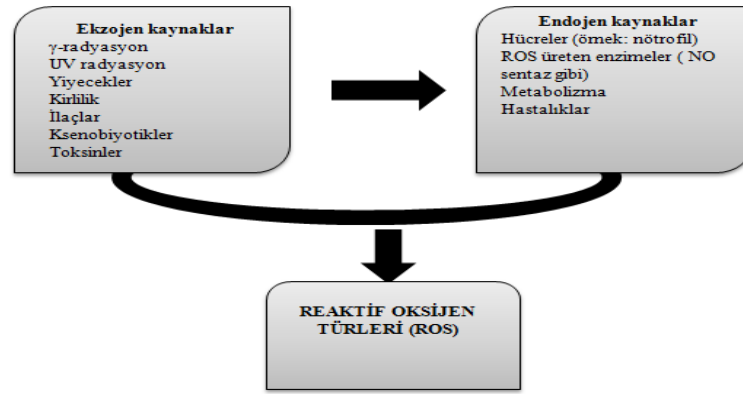


Hidroksil radikali oldukça reaktif bir oksidan radikaldir ve yarılanma ömrü çok kısadır. DNA ile tepkimesi sonucu baz modifikasyonlarına ve zincir kırıklarına neden olabilir. Proteinlerde proteolitik yıkıma neden olabildiği gibi lipid peroksidasyonuna sebep olarak membran yapısını bozar.

#### 1.2.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynağı

ROT'leri ya endojen ya da ekzojen kaynaklardan oluşur. Endojen serbest radikaller hücre aktivasyonlarından, metal stresinden, aşırı egzersizden, bölgesel kansızlıktan, enfeksiyondan, kanserden ve yaşlılıktan oluşur. Ekzojen ROT'ler hava ve su kirliliğinden, sigaradan, alkolden, ağır ve geçiş metallere (Cd, Hg, Pb, Fe, As), bazı ilaçlardan (siklosporin, takrolimus, gentamisin, bleomisin), endüstriyel

çözücülerden ve radyasyondan dolayı oluşur (Şekil 1.5). Farklı yollardan hücreye nüfuz etmelerinden sonra bu ekzojen bileşikler serbest radikallere dönüştürülür [64]. Bu ekzojen bileşiklerin fiziksel veya kimyasal etkilerin içinde en önemlisi radyasyondur. Radyasyonla indüklenen önemli serbest radikallerden biri hidroksil radikalidir. Hidroksil radikali ayırım göstermeksizin komşu moleküllere saldırır. Hidroksil radikalleri iyonize radyasyon tarafından ya direk olarak suyun oksidasyonu ile ya da dolaylı olarak ikincil reaktif oksijen türlerinin oluşumu vasıtasıyla üretilirler. Bu ikincil reaktif oksijen türleri hücrede metabolik süreçler aracılığı ile daha ileriki redüksiyonlar ile (aktivasyon) hemen hidroksil radikaline dönüştürülür. İkincil radyasyon zararı bu yüzden hücresel antioksidanların durumundan ve aktif haldeki mekanizmaların miktarı ve geçerliliğinden etkilenmektedir [56].



Şekil 1.5 Reaktif oksijen türlerinin kaynakları

### 1.3. Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri

#### 1.3.1. Oksidatif DNA Yıkımı

İyonize radyasyon sonucu oluşan oksidatif stresin en çok etkilediği hücresel bileşen DNA'dır. Bunun sebeplerinden biri genomik DNA hücrenin sahip olduğu hacmin en büyük kısmını kaplamaktadır ve bu yüzden iyonize radyasyon sonucu en sık yıkıma maruz kalacak kısımdır. İkincisi genom diğer moleküllerden daha az kopya sayısına sahiptir. Üçüncüsü ve en önemlisi genom bütün hücresel faaliyetleri düzenleyen kısımdır [51].

Reaktif oksijen türleri tarafından DNA’da tek veya çift zincir DNA kırıkları, pürin, pirimidin veya deoksiriboz modifikasyonları ve DNA çapraz bağlantıların yıkımı indüklenmektedir. Reaktif oksijen türleri tarafından oluşan DNA yıkımı transkripsiyonun durması veya başlaması, sinyal transdüksiyon yollarının başlatılması, replikasyon hataları ve genomik yapısal bozuklukları kapsamaktadır [65-66]. Bütün reaktif türleri içerisinde özellikle hidroksil radikali DNA’da daha çok etkili yıkımlara neden olmaktadır. Hidroksil radikalleri DNA bazlarının çift bağlarına eklenebilmekte ve timin bazının metil grubundan ve 2' - deoksiribozun beş karbon atomunun her birinden bir H atomunu ayırmaktadır. DNA bazlarının HO• radikalleri ek bir reaksiyon üzerinden üretildikleri için timinden kökenlenen alil radikali ve karbon merkezli şeker radikalleri çıkarılma reaksiyonları vasıtasıyla artar. Baz ve şeker radikallerinin daha sonraki reaksiyonları çeşitli modifiye olmuş baz ve şekerlerin, bazlardan yoksun bölgelerin, zincir kırıklarının ve DNA-protein çapraz bağlarının oluşumuna sebep olur [67].

### **1.3.2. Lipid Peroksidasyonu**

Lipid peroksidasyonu lipidlerin oksidatif bozulmasını tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Serbest radikaller hücre zarlarındaki lipidlerden bir elektronu koparırlar ve sonunda hücrede bir yıkıma sebep olurlar. Bu süreç arka arkaya meydana gelen serbest radikallerin zincir reaksiyonları sonucu meydana gelir. Reaktif oksijen türleri fosfolipidlerin genellikle çok sayıda çift bağ içeren ve oksidasyona çok daha duyarlı olan çoklu doymamış yağ asit uzantılarını etkiler [68]. Lipid peroksidasyonu üç aşamada ilerler. Başlama aşamasında peroksil radikalleri oluşur (ROO•). İlerleme aşamasında Peroksil radikalleri bir döngüsel zincir reaksiyonuyla endoperoksitlere (malondialdehitlerin öncülü) dönüştürülür. Son ürün olarak malondialdehitler (MDA) oluşur. MDA hem memeli hemde bakteri hücreleri için oldukça mutageniktir. MDA adenin, guanin ve sitozin bazlarına eklenerek DNA ile reaksiyona girebilmektedir. Lipid peroksidasyonu otokatalitik bir süreçtir ve sonlanması iki radikalın reaksiyona girerek radikal olmayan bir ürün oluşturmasıyla ya da substratın azalmasıyla gerçekleşir [69-70].

### **1.3.3. Protein Oksidasyonu**

Hücre zarlarında başlıca bileşenlerinden biri olan proteinler reaktif oksijen türlerinin hedefleri arasında yer alır. Çeşitli ROT’lar arasında HO•, RO• ve nitrojen reaktif radikalleri en çok protein yıkımına sebep olan türlerdir. Hidrojen peroksitin

kendisi ve süperoksit radikalleri fizyolojik konsantrasyonlarda proteinler üzerinde zayıf etkilere sahiptirler. Bununla birlikte bu türlerin  $H_2O_2$  ile etkileşimleri etkili oksidasyona neden olabilir. Proteinlerin ROT'lar ile etkileşimini takiben direk ve indirek yıkıma uğrarlar. Spesifik amino asit uzantılarında yıkıma neden olarak proteinlerin üçüncül yapılarında değişikliklere neden olurlar. Enzimatik aktivite kaybı, enerji üretimi gibi hücresel faaliyetlerin değişmesi, membran potansiyelinin oluşumunun engellenmesi ve hücresel proteinlerin tip ve seviyelerindeki değişiklikler oksidatif stres sonrası protein yıkımının hücresel sonuçlarıdır. Protein oksidasyonu sonucu oluşan ürünler genellikle aldehidler, keto bileşikler ve karbonillerdir. Başlıca oksidasyon sonrası oluşan ürün kolayca belirlenebilen ve bu yüzden protein oksidatif yıkımı için bir belirleyici olarak işlev gören 3-nitrotirozindir. Bu ürün ONOO ve diğer nitrojen reaktif türleri ile tirozin amino asidi arasındaki etkileşim sonucu oluşur.  $HO^{\bullet}$  radikalının atağını takiben hidroksiprolin, glutamil semialdehit gibi bir seri bileşik oluşur. Protein oksidasyonundan sonra modifiye olmuş proteinler fonksiyonlarındaki değişikliklerden çabuk etkilenir hale gelirler. Kimyasal fragmentasyon, inaktivasyon ve proteolitik bozulma artışı bu değişimlerden bazılarıdır [71-72].

#### **1.4. Antioksidanlar**

Bütün biyolojik sistemlerde ROT'lerinin yıkımına karşı koruma sistemleri kompleks antioksidan mekanizmalardan evrimleşmiştir [73]. Antioksidanlar biyolojik sistemlerde radikal yıkımları baskılamak için serbest radikal temizleyicileri, indirgeyici ajanlar, geçiş elementleri için bağlayıcı ajanları tekil oksijen söndürücüleri ve/veya antioksidan enzim sistemlerinin aktivatörleri olarak görev yapabilmektedirler [74-75].

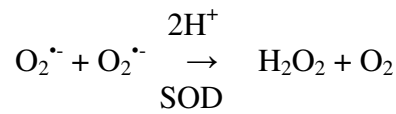
Hücrelerdeki antioksidan mekanizmayı oluşturan bileşikler enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak sınıflandırılabilir. Başlıca antioksidan enzimler doğrudan ROT ve RNT'leri nötralize etmekte rol oynarlar. Bu enzimler süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktazdır (GR). Enzimatik olmayan antioksidanlar metabolik antioksidanlar ve besinsel antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılır. Metabolik antioksidanlar endojen antioksidanlardır ve hücrede glutatyon, lipoid asit, L-arjinin, koenzim Q10, melatonin, ürik asit, bilirubin, metal bağlayıcı proteinler ve transferin gibi metabolizmalardan üretilir. Besinsel antioksidanlar ekzojen antioksidanlardır. Besinsel antioksidanlar vücutta üretilemeyen ve yiyeceklerden veya vitamin E, vitamin C, karotenoidler,

flavonoidler, iz elementler (selenyum, manganez gibi), omega-3 ve omega-6 yağ asitleri gibi ek besinlerden sağlanmak zorunda olunan antioksidanlardır [76].

#### **1.4.1. Enzimatik Antioksidanlar**

##### **1.4.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)**

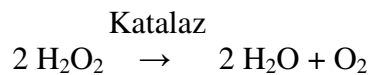
Süperoksit dismutaz, süperoksit anyonunun ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidrojen perokside ( $H_2O_2$ ) ve oksijene dönüşümünü katalize ederek bu radikallerin etkisini azaltmaktadır.



Bu reaksiyon, süperoksit anyonunun pH 11 ve altında oldukça stabil olmasına rağmen, enzim katalizi olmasa bile normal fizyolojik pH değerlerinde oldukça hızlı gerçekleşmektedir. Bununla birlikte, gerçekte tüm aerobik organizmaların SOD içerdiği belirlenmiştir. SOD enzimi reaksiyon hızını artırmak için yeterince güçlü bir katalisttir [77].

##### **1.4.1.2. Katalaz (CAT)**

Katalaz dört polipeptid zincirinden oluşmuş bir tetramerdir. Polipeptid zincirlerden her biri 500 amino asitten fazladır. Dört hem (demir) grubu içerir. Bu demir grupları enzimin hidrojen peroksitle reaksiyona girmesine izin verir. Bir metalloenzim olarak bilinen katalaz enzimi redoks reaksiyonunu teşvik eden en etkili protein katalistlerinden birisidir [77]. SOD enzimi faaliyeti sonucunda meydana gelen toksik hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), “katalaz” enzimi etkisiyle su ve oksijene dönüştürülmektedir [78].

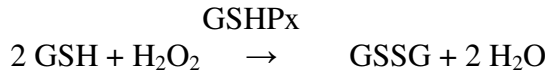


## 1.4.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar

### 1.4.2.1. Glutasyon

Glutasyon reaktif oksijen türleri tarafından yıkıma karşı hücre içi savunma mekanizmalarından en önemlilerinden biridir. Bir tripeptiddir (glutamil-sisteinil-glisin) ve sistein kısmı reaktif oksijen türlerinin atakları için yoğun bir hedef sağlayan oldukça reaktif korunmasız bir serbest sülfidril grubu içerir. Radikallerle reaksiyonu glutasyonu oksitler fakat indirgenmiş formu glutasyon redüktazın ve elektron alıcısı NADPH'nın işin içine girdiği bir redoks döngüsünde yeniden oluşturulur [79].

Tiyol grupları, enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla ve serbest radikalleri yakalamak suretiyle görev yapan hücresel antioksidanlardır. Tiyol grubu taşıyan bir tripeptid olan glutasyon, serbest radikallerin yıkıcı etkilerini önleyen veya azaltan transferazlar, peroksidazlar gibi birçok enzimin substratı olarak görev yapmaktadır. Suda çözünebilen bir tiyol olan ve birçok hücrede çok yüksek konsantrasyonlarda bulunan glutasyon, biyolojik membranları lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır. Bu koruma, enzimatik olarak gerçekleşmektedir [80]. Aktivitesi için Se mineraline ihtiyaç duyan GSHPx enzimi, glutasyon'un indirgenmiş formunu (GSH), oksitlenmiş hale (GSSG) dönüştürmektedir.



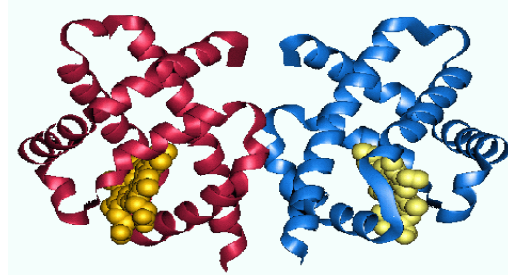
Glutasyon aynı zamanda hücre içinde tekil oksijen ( $^1\text{O}_2$ ), süperoksit anyonu ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), hidroksil ( $\text{HO}^{\cdot}$ ) radikalleri gibi birçok zararlı oksidanla enzim katalizi olmaksızın da reaksiyona girmektedir [77].

## 1.5. *Vitreoscilla* hemoglobin

1986 yılına kadar hemoglobinin sadece ökaryotik canlılarda bulunduğu biliniyordu. Daha sonra Beggiatoa familyasına ait kemoorganotrof, gram negatif ipliksi bir bakteri olan *Vitreoscilla stercoraria*'da bulunan hemoglobinle bakteriyel hemoglobinin de olduğu saptanmıştır. Bu bakteri tatlı su sedimentleri ve inek pislikleri gibi oksijenin sınırlı olduğu yerlerde bulunur. Bu şekilde, hipoksik koşullar altında bakteriler bir çeşit hemoglobin ifade ederek yaşamlarını devam ettirirler. Bu hemoglobin solunum ve oksijen alımını yükseltmekte ve enerji metabolizmasını arttırmaktadır. *V. stercoraria* (*Vitreoscilla hemoglobin*)'dan alınan bakteri

hemoglobininin oksijenin kısıtlanmış olduğu koşullarda yaşayan çeşitli bakterilere aktararak ifade edildiği zaman bu bakterilerin gelişimini, protein sentezlenmesinde, metabolit üretimini ve strese direnci geliştirmektedir [81-82]. Ayrıca bu genin (*vgb*) heterolog ifadesi gerçekleştirilen konaklarda farklı yararlı ürünlerin bu konaklarda üretimini arttırmaktadır. Ayrıca zararlı bileşiklerin etkisinin azaltılmasında da önemli etkisi vardır. Bu nedenle VHb'nin özellikle biyoteknolojik uygulamalarda yararlı bir etkisinin olabileceğini göstermektedir [83].

VHb'nin yapısı klasik globin katlanması göstermektedir ve ökaryotik hemoglobinleri ile yüksek bir homolojisine sahip olup klasik 8-helikse (A-H) sahiptir ve globin katlanması göstermektedir (şekil 1.6). *Vitreoscilla* hemoglobin ortalama moleküler ağırlığı 15,775 Da olan iki benzer alt üniteye sahiptir ve her molekül iki b-hem taşır. Hemoglobin sentezi organizma hipoksik koşullar altında bulunduğu zaman artar. Bu proteinin amino asit dizisi ökaryotik hemoglobinlerle yapısal bir homoloji göstermektedir fakat bu hemoglobin N-terminal bölgede diğerlerinden ayrılır ve bir A-heliks bulunmaz [84].



**şekil 1.6.** VHb'nin 3-boyutlu yapısı. Homodimerik yapıda “hem” grubunun lokalize olduğu yer sarı renk ile gösterilmiştir

Diğer hemoglobinlerle karşılaştırıldığında VHb'nin oksijen ayrışma oran sabiti ( $k_{off}$  5000/s) diğer globinlerden yüzlerce kez daha geniş olduğu halde VHb ortalama bir oksijen bağlama oranı sabiti'ne ( $k_{on}$  78/ $\mu$ M s) sahiptir. Ortalama  $k_{on}$  oksijen için orta derecede bir ilgiyi gösterir fakat çok daha büyük  $k_{off}$  değerı bu hemoglobinin bağlanmış oksijeni diğer bütün hemoglobinlerden çok daha kolay bir şekilde serbest bırakmasını mümkün kılar (izelge 1.1) [85-86].

**Çizelge 1.1.** Çeşitli hemoglobinlerin kinetik sabitleri

| Protein                                        | $k_{on}(\mu M^{-1} s^{-1})$ | $k_{off} (s^{-1})$ | Ref. |
|------------------------------------------------|-----------------------------|--------------------|------|
| <i>Vitreoscilla</i> hemoglobin (VHb)           | 78                          | 5000               | [87] |
| <i>Lupin</i> leghaemoglobin (Lba)              | 120                         | 5.6                | [88] |
| <i>Oryza xativa</i> hemoglobin 1               | 68                          | 0.038              | [89] |
| <i>Arabidopsis</i> hemoglobin 1 (AHB1)         | 75                          | 0.12               | [90] |
| <i>Arabidopsis</i> hemoglobin 2 (AHB2)         | 1.07                        | 0.14               | [90] |
| <i>Escherichia coli</i> flavohemoglobins (HMP) | 38                          | 0.44               | [91] |

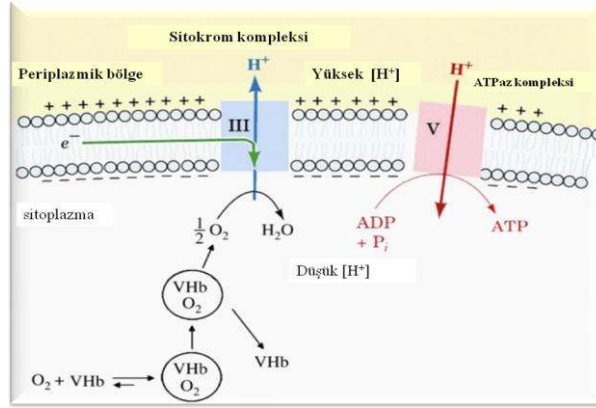
VHb'nin oksijen bağlamasında ortalama bir ilgi sabitine sahip olması VHb'nin oksijen taşınım ve depolanmasında önemli bir rol oynamadığını gösterir. Gerçekte bu fonksiyonlar düşük oksijenin kısmi basıncı altında metabolik ihtiyaçlar tarafından uyarılmış hızlı bir oksijen salınımını gerektirir ve bu yüzden organizmaların oksijenin sınırlı olduğu koşullarda kolaylaştırılmış oksijen difüzyonu ile yaşamlarını sürdürmelerini mümkün kılar. *Vitreoscilla* hemoglobinin fonksiyonel incelenmesi gösteriyor ki şu an bilinen globinler içinde VHb hemoglobini mikroorganizma, bitki ve hayvan hücrelerini içeren çeşitli organizmaların enerji metabolizması mühendisliği için özellikle uygundur. VHb'nin diğer bir önemli rolü genetik mühendislikle oluşturulmuş VHb geni taşıyan konaklarda VHb'nin heterolog ifadesi sıklıkla çeşitli konaklarda protein ve metabolit sentezinde olduğu kadar iyi bir şekilde büyümeyi geliştirir. Bu yüzden heterojen proteinlerin veya değerli metabolitlerin üretimi için VHb geninin uygulanması ile en uygun sonuç ve verimi almak daima tercih edilir [81].

### 1.5.1. VHb fonksiyonunun Mekanizmaları

Oksijenin sınırlı olduğu koşullarda VHb'nin heterolog ifadesi sonucu hücre büyümesinde ve konakların protein sentezinde daha iyi bir gelişim görülmektedir. Ayrıca VHb ifadesinin oksijen difüzyonunu kolaylaştırabildiği ve konaklarda aerobik metabolizmayı geliştirdiği de öne sürülmektedir. [82].

VHb ifade edilen hücrelerin hücresel enerji parametreleri üzerindeki araştırmalar VHb mekanizması için bir hipotez oluşturmuştur: ek bir oksijen kaynağı olarak hareket eden *Vitreoscilla* hemoglobini mikroaerobik koşullar altında hücreler arası etkili çözünmemiş oksijen konsantrasyonunu artırır ve çözünmemiş oksijen gerilimindeki artış hem sitokrom *o* hem de sitokrom *d'*'nin aktivitelerini artırır. Fakat farklı derecelere kadar sitokrom *o*'nun spesifik aktivitesi sitokrom *d'*'nin aktivitesinden daha hızlı bir şekilde artacaktır. Sonuç olarak terminal oksidazların aktiviteleri proton

pompalama etkinliğinde artışa sebep olacak bir etkiyle değiştirilir. ATP oluşturmak için başlıca proton çıkarma fonksiyonunda olduğu gibi protonlar ATPaz üzerinden sitoplazmaya tekrar giriş yaptıkları zaman proton pompalama etkinliğindeki artış hemen ardından ATP üretimi etkinliğinde bir artışa sebep olur (Şekil 1.7). Bu model *Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisiae*'de enerji metabolizması üzerinde yapılan çalışmalarla desteklemiştir [92-93].



**Şekil 1.7.** Enerji metabolizmasını arttırmak için sitokrom kompleksi ve VHB etkileşiminin öngörülen mekanizması

Ayrıca ribozom ve tRNA içeriğinin araştırılması çift VHB ifade eden hücrelerin kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında önemli oranda daha yüksek ribozom ve tRNA seviyelerine ulaştığını ortaya çıkardı. Bu sonuç kültürasyonun sonunda VHB ifade eden hücrelerin VHB-negatif kontrole göre iki kat daha fazla 70S ribozom ve tRNA'lar içerdiğini gösteren önceki çalışmayla uyum göstermektedir. Bu etki VHB vasıtasıyla translasyonel komponentlerin artmasından kaynaklanıyor olabilir [94-95].

### 1.5.2. VHB ve Oksidatif Stres

VHB'nin hücreleri nitrosatif ve oksidatif stresden koruduğu öne sürülmektedir. Nitrik oksit (NO) potansiyel olarak sitokromlara bağlanarak hücresel solunumu baskılar ve bu baskılama bariz düşük oksijen gerilimi altında bile meydana gelir [96]. VHB'nin ifadesi oksijen yokluğu veya oksidatif ve nitrosatif stres gibi birkaç uyarıcı vasıtasıyla teşvik edilir Hücresel redüktaz ile bağlantılı VHB'nin ifadesi hücresel redüktazın NO tüketim kapasitesini geliştirmekte ve bu yüzden NO tarafından solunum aktivitesinin baskılanması azalmaktadır Buna karşı VHB ifadesinin oksidatif strese karşı koruyucu bir etkisinin olup olmadığı belirlenememiştir [96-97].

### 1.5.3. Metabolik Mühendislikte VHb'nin Kullanımı

*Vitreoscilla* bakterisinde bulunan hemoglobin (VHb) belirlenen ilk mikrobiyal hemoglobindir. Bir çok istenen metabolitlerin endüstriyel üretimi bu metabolitlerin son biyolojik aktif formlarındaki yapıyı oluşturmak için kompleks enzimatik yolların uygulanması ile oluşturulmaktadır. Bu yollar kullanılarak VHb'nin çoğu endüstriyel fermentasyon işlemlerinde oldukça yararlı olabileceği görülmektedir. Örneğin antibiyotik üretiminde çözünmemiş oksijen konsantrasyonunu azaltarak biyosentez oranını azaltmaktadır. Son zamanlarda başarılı bir şekilde *Streptomyces aureofaciens*'de ifadesi sağlanan *Vitreoscilla* hemoglobini bu mühendislikle oluşturulan suşta klortetrasiklin (CTC) üretimi düşük çözünmemiş oksijen koşullarında olduğundan % 40-% 60 daha fazla olmaktadır [98]. Diğer bir çalışmada kromozomuna *vgb* geni integre edilmiş *Saccharopolyspora erytraea*'de endüstriyel öneme sahip eritromisin üretiminde yaklaşık % 60 bir artış olduğu gözlenmiştir [99]. *Streptomyces cinnamonensis* ve *Acremonium chrysogenum* gibi antibiyotik üreten diğer suşlarda da *Vitreoscilla* hemoglobini antibiyotik üretiminde benzer sonuçlar açığa çıkarmıştır [100-101].

Radyasyona dirençliliğiyle Guinness rekorlar kitabına girmiş olan *D. radiodurans*'ın *vgb*/VHb sistemini içeren rekombinant suşlarında büyüme, çoğalma, radyodirence etkisi ile organizmanın bundan nasıl etkilendiği ilk kez bu çalışmada araştırılmıştır. Sonuç olarak, *D. radiodurans*' da değişik genetik (*vgb*) şartlar altında hücrelerin büyüme ve çoğalma karakteristikleri çalışılmıştır. Bunun yanı sıra değişik radyasyon cGray'larında hemoglobin içeren bakterinin yabancı tipe göre değişen özellikleri belirlenmiştir. *D. radiodurans*'ın yabancı tipiyle *vgb*<sup>-</sup> ve *vgb*<sup>+</sup> rekombinantlarının oksijen alım özellikleri, Fe ve Mn oranlarına bakılarak bu bakterilerin radyodirence etkisi araştırılmıştır. Ayrıca antioksidan seviyelerinin nasıl etkilendiği de bu tezin çalışma konusu içerisinde. Ortam oksijenini tamponlamadaki rolü ve onu kültürün ileri fazlarında membran transferazlarına aktararak yaşlı hücrelerin daha iyi bir solunum, büyüme ve çoğalma karakteristiği sağlayan VHb/*vgb* sisteminin, bu amaç için önemli avantaj sağladığı kanısındayız. *D. radiodurans* ile rekombinantlarının değişik fazlarda farklı radyasyon cGray'larında antioksidan enzimlerin nasıl değiştiği ve VHb'nin buna etkisiyle Fe, Mn oranının değişmesiyle radyasyona olan dirençliliğinin nasıl değiştiği de belirlenmiştir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

*Deinococcus radiodurans*'ın R1 suşunda basit ve genel hedef mutasyonlar yapılarak katalaz (KatA) ve süperoksit dismutaz (SODA) mutantlarının oluşturulduğu bir çalışmada bütün bakteriyel kültürlerle 8,000' den 32,000 Gy'a kadar farklı dozlarda iyonize radyasyon uygulanmıştır. KatA ve yabanıl tip 8000 Gy iyonize radyasyona karşı benzer duyarlılıklar göstermesine rağmen 16,000 Gy'da KatA mutantının 2 ile 15 kat arasında yabanıl tipden daha fazla duyarlı hale geldiği görülmüştür. Diğer taraftan SODA mutanı 16,000 Gy veya daha fazla iyonize radyasyona yabanıl tip ve KatA mutantından 3 ile 90 kat arasında farklı oranlarda daha duyarlı hale geldikleri görülmüştür. Bu sonuçlar her iki mutantın yabanıl tip ile karşılaştırıldığında iyonize radyasyona çok daha duyarlı oldukları ve SODA tarafından kodlanan süperoksit dismutazın KatA tarafından kodlanan katalazdan daha önemli rol oynadığını göstermektedir [41].

*D. radiodurans*'da DNA tamirin de rol oynayan *pprA* genini taşıyan transgenik *E. coli*'nin radyasyon ve oksidatif strese karşı direnci çalışılmıştır. Yapılan bu çalışmada *pprA* geni taşıyan transgenik *E. coli*'nin kontrol ile karşılaştırıldığında yaklaşık 3 kat daha fazla hidrojen peroksit tolerans gösterdiği görülmüştür. Büyük oranda *in vivo* KatE tarafından desteklenen katalaz aktivitesinin uyarımı rekombinant olmayan kontrol ile karşılaştırıldığında 2.8 kat arttığı görülmüştür [102].

*D. radiodurans*'da manganez [Mn(II)] taşıyıcıları kodlayan genler olan DR1709 ve DR2523'ün bakterinin radyasyona direncindeki rollerinin araştırıldığı bir çalışmada DR1709 ve DR2523 mutantları oluşturulmuştur. Yabanıl tip ve mutantlar hem UV radyasyona hem de hidrojen peroksit maruz bırakılmış ve yaşamda kalma oranları analiz edilmiştir. DR2523'ün oluşturulan mutasyon sonucu yıkımı tripton-glukoz-mayaözütü (TGY) ortamında büyüyen *D. radiodurans*'ın gelişimini hemen hemen hiç etkilemediği görülmüştür. Fakat logaritmik fazın her bir bölgesinde DR1709 mutantının (M1709) OD<sub>600</sub> değerleri yabanıl tipin OD<sub>600</sub> değerlerinden daha düşük olduğu görülmüştür. M1709'un H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve UV ile muamele edilmesinden sonra her dozdaki canlılık oranları yabanıl tipin oranlarından daha düşük olduğu görülmüştür. Bununla birlikte DR2523 mutanı (M2523) ve yabanıl tip H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve UV ile muamele edildikten sonra yabanıl tip daha yüksek bir canlılığa sahip olmasına rağmen benzer bir görüntüye

sahip oldukları görülmüştür. Bu çalışmanın sonuçları DR1709 ve DR2523'ün *D. radiodurans*'ı iyonize radyasyondan ve süperoksit radikallerinden koruduğunu göstermiştir [103].

*Deinococcus radiodurans* (Drad) sadece manganez içeren bir süperoksit dismutaz (MnSOD) üretmektedir. MnSOD hücrel orijinine bağlı olarak etkili bir süperoksit radikali temizleyicisi olduğu için Drad Mn SOD etkinliği ile insan ve *E. coli* MnSOD'ları arasında bir karşılaştırma yapılmıştır. Radiolizis çalışmalar aynı orandaki enzimlerin süperoksit radikale karşı dismutasyon etkileri Drad MnSOD > *E. coli* MnSOD > İnsan MnSOD olarak belirlenmiştir. Ek olarak Drad MnSOD yüksek radyoaktivite koşulları altında yüksek süperoksit akışında en etkili olan MnSOD olarak görülmüştür [40].

Deinoksantin (DX) radyasyona en dirençli organizmalardan biri olan *Deinococcus radiodurans* tarafından sentezlenen eşsiz bir karotenoiddir. Deinoksantin *D. radiodurans*'ın radyasyona direncinde önemli bir rol oynayan reaktif oksijen türlerini (ROT) temizleme aktivitesinde önemli bir rol oynadığı kanıtlanmıştır. Yapılan bir çalışmada DX'in güçlü antioksidant aktivitesinde daha derin görüşler elde etmek için ROT-temizleme potansiyelini karakterize eden parametreler kuantum kimyasal hesaplamalar vasıtasıyla hesaplanmıştır. DX'in eşsiz yapısını korumak için diğer karotenoidlerden ( $\beta$ -karoten ve zeaksantin gibi) daha düşük üçlü uyarı enerjisine sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca DX'in H-atom verme potansiyeli kuramsal homolitik O-H bağı ayrılma entalpisine göre zeaksantinle benzer olduğu gösterilmiştir. Bu yüzden konjuge çift bağların çok sayıda olması DX'in antioksidant aktivitesi için çok önemli olduğu tespit edilmiştir [50].

Yapılan bir çalışmada, iyonik civa içeren radyoaktif atık karışımlarını arıtmak için radyasyona dirençli bir bakteri geliştirilmiştir. Nükleer silahların ürettiği radyoaktif atık bölgelerinin iyileştirilmesi için gereken yüksek maliyet radyasyona en dirençli bakteri olarak bilinen *Deinococcus radiodurans*'ın kullanıldığı biyolojik arıtım stratejilerinin geliştirilmesini teşvik etmiştir. Bu radyoaktif atık bölgelerinde en çok bulunan bileşen yüksek toksisiteye sahip iyonik civa (Hg) (II) olduğu için *Escherichia coli* BL308 suşundan Hg (II) direnç geni (*merA*) klonlanmış *D. radiodurans* suşlarını üretilmiştir. Bu amaçla 4 farklı ekspresyon vektörleri dizayn edilmiştir ve göreceli olarak birbirlerine göre avantajlarını karşılaştırılmıştır. Suşlar radyoaktif alanlardaki

konsantrasyon seviyelerinden daha fazla konsantrasyon seviyelerine sahip radyasyon ve iyonik civa bulunan ortamlarda geliştikleri ve etkili bir şekilde iyonize civanın (Hg) (II) uçucu daha az toksik elementel civaya indirgendiği görülmüştür. Ayrıca hem civayı hemde tolueni detoksifiye etmek için geliştirilen bir suş vasıtasıyla karışık radyoaktif atıkların arıtımı için *D. radiodurans*'ların kullanılabileceğini göstermişlerdir. Bu ifade sistemleri tek bir konağa birkaç arıtım fonksiyonunun entegrasyonunu amaçlayan gelecekteki *D. radiodurans* mühendislik çabalarına rehberlik etmek için model sağlayabilir [104].

Dünya genelindeki binlerce atık alanlar toksik klorlanmış çözeltiler, hidrokarbon çözeltiler ve radionükleitlerin karışımlarını içerirler. Böyle atıkların fizikokimyasal metodlarla temizlenmesinin maliyetinden dolayı diğer metotlar bu alanların temizlenmesinde çalışılmaya başlamasına teşvik etmiştir. Bir alternatif, böyle atıkları daha az zararlı bileşenlere ayrıştıran veya dönüştüren radyasyona dirençli mikrobların oluşturulmasıdır. Bu anlamda yapılan bir çalışmada, toluen dioksijenaz (TDO) geni aktarılan rekombinant *Deinococcus radiodurans*'ın yapısı ve karakterizasyonu tanımlanmıştır. Bakterinin kromozomuna tod (çok bileşenli TDO kodlayan) genlerin klonlanması suşa indol, 3,4-dikloro-1-bütan, klorobenzen ve toluen oksidasyonu yeteneğini verdiği saptanmıştır. Rekombinant suş oldukça yüksek radyasyon ortamda (60 Gy/h) gelişebilme ve TDO'nun fonksiyonel sentezini yapabilme yeteneğine sahip olduğu görülmüştür. *D. radiodurans* suşları ayrıca çoğu radyoaktif atık alanlardakinden fazla seviyelerdeki trikloroetilen ve toluenin çözücü etkilerine de toleranslı olduğu bilinmektedir. Bu veri hem nükleitleri hem de organik çözücülerini içeren atıkların biyolojik arıtım için mühendislikle oluşturulmuş *D. radiodurans*'ların muhtemel kullanımını desteklemektedir [105].

Bir çalışmada *D. radiodurans*'da manganez akış proteinini (MntE) belirlenmiştir. MntE mutantının manganez iyonlarına yabanıl tip suşdan daha çok duyarlı olduğu ve MntE mutantının gelişiminin manganez eklenmiş ortamda geçiktiği gösterilmiştir. Bu karakteristiklerin birbirine uygunluğu ile birlikte MntE mutantı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ultraviyole ışınlar ve δ-radyasyona daha dirençli olduğu belirlenmiştir. Mutant suşun hücre içi protein oksidasyon (karbonilasyon) seviyesi belirgin bir şekilde yabanıl tip suşdan daha düşüktür. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar Dr1236'nın bir MntE homoloğu olduğunu ve *D. radiodurans*'da manganez dengesini sürdürmek için zorunlu

olduğunu göstermiştir. Veri ayrıca radyasyona dirençli *D. radiodurans*'da hücre içi manganez iyonlarının gerekliliği için ek bir kanıt sağlamıştır [106].

*Deinococcus radiodurans* radyasyona direnci yüksek olan bir bakteridir. Manganez (II) iyonlarının süperoksit radikallere karşı proteinleri koruyarak bakterinin radyasyona ekstrem direncini sağlayan başlıca mekanizma olduğu düşünülmektedir. Fakat bu bakteride Mn (II) iyonlarının nasıl hücre içerisinde aktarıldığını ve bu sürecin detaylı bir moleküler ve fizyolojik işleyişi halen tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Yapılan bir çalışmada iki Mn (II) iyon taşıyıcı genin (DR1709 ve DR2523) mutasyona uğratılmaları sonucu bakterideki Mn (II) iyon taşınımının nasıl olduğu çalışılmıştır. Sonuçlar M1709'un düşük konsantrasyonlardaki Mn (II) iyonlarına M2523'den daha çok duyarlı olduklarını göstermiştir. Fakat düşük konsantrasyonlardaki Fe(II) iyonlarına M2523'den daha az duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Ortamda yeterli Mn (II) iyonları bulunduğu zaman bu iyonları almak için diğer genlerin ayrıca aktive olduğu görülmüştür. Fakat Mn (II) iyonlarının yetersiz olduğu ortamlarda Mn (II) absorpsiyonundan sorumlu tek adayın DR1709 olduğu saptanmıştır. DR1709'un ortamda yeterli Mn (II) iyonlarının olup olmamasına bağlı olmaksızın Mn (II) iyonlarının absorblanmasından sorumlu olduğu bu çalışmada gösterilmiştir. DR1709 ayrıca proteaz üretimini ve salınımını kontrol edebilmektedir. Bu çalışmada, DR1709 bir Mn (II) hücre içine doğru taşıyıcısı olduğu zaman DR2523'ün Mn (II) iyonlarının hücre dışına doğru taşınımından sorumlu olduğu gösterilmiştir [107].

Yapılan bir çalışmada, bakterilerde pleomorfizm üzerine kavramı güçlendirmek için, farklı hücre besin konsantrasyonuna yanıt olarak *Deinococcus radiodurans* morfolojileri çalışılmıştır. Bu çalışma sonucunda kültür ortamlarında *D. radiodurans* hücrelerinin monomer hücreler şeklinde görüldüğü rapor edilmiştir [108].

*Deinococcus radiodurans* R1 ve öbakteriyal *Deinococcaceae* ailenin diğer üyeleri aşırı derecede iyonize radyasyon ve diğer birçok DNA hasarına neden olan ajanlara karşı dirençlidir. Örneğin, ışınlama sonra, *D. radiodurans*, ölmeden veya mutasyon olmadan kromozomundaki 100> DNA çift zincir kırıklarını onarabilir. Oysaki, diğer organizmalar çoğu en fazla 2 veya 3 çift DNA zincirinde kırıklarla hayatta kalabilirler. *D. radiodurans* bu alışılmadık direnci recA'ya bağlıdır, ancak tamir yoluğu tam olarak bilinmemektedir. Son zamanlarda, *D. radiodurans* içinde bulunan mevcut plazmid (hücre başına plazmid kopya sayısı, -6; kromozom kopya sayısı, hücre

başına -4) yüksek doz radyasyon sırasında kromozomdaki gibi aşırı hasarı aynı verimlilikle tamir etmiştir. Bu iki plazmid hem restriksiyon fragman polimorfizmi ve rekombinasyon ilaç seçimi için tasarlanmıştır. Bu çalışma, *in vivo* hasar ve rekombinasyonel onarım analizi yeni bir sistem sunmuştur [109].

Son zamanlarda, *D. radiodurans* onarım kapasitesini, bünyesindeki plazmidlerle sağladığı düşünülmektedir. Bu tür çalışmalar diğer organizmalarda mümkün olmamıştır. *E. coli* -*D. radiodurans* mekik vektörü (pMD66) 27.5-kbç her iki organizmaya da birden çok ilaca direnç kazandıran genlerini taşıdığı ifade edilmiştir. Bu plazmidin sağ kalım veya rejenerasyonu *in vivo* ortamda *D. radiodurans* R1 pMD66 barındıran suşuna 75 megarads iyonize radyasyon maruz bırakılarak saptandı. R1/pMD66'de hem kromozomal ve hem de plazmid DNA yüksek radyasyona duyarlı suşu olan rec3O'nun rejenerasyonu ile karşılaştırılmıştır. Deinococcal *recA* gen yakınında kusurlu olduğu görülmüştür. R1/pMD66 ve rec30/pMD66 1.75 megarads radyasyona maruz kaldığında hem *D. radiodurans* plazmidi hem de kromozomal Southern blot analizi ve jel elektroforeziyle incelenmiştir [110].

Diğer bir çalışmada, *D. radiodurans*'da radyasyona dirençte rol alan *pprI* genini *E. coli*'ye aktararak bakterinin radyasyona direncini artırmayı hedeflemişlerdir. Transfer sonucunda bakterinin gama radyasyonun yüksek seviyelerine 1,6 kez daha dirençli olduğu belirlenmiştir. *E. coli*'de Deira-*pprI*'ın sentezi, iyonize radyasyonun yüksek dozlarına takiben RecA'nın sentezinde önemli bir artış söz konusudur. Deira-*pprI* sentezleyen *E. coli*'de antioksidan enzimlerin seviyeleri de ölçülmüş ve bu Katalaz G'nin enzimatik aktivitesini indüklediği böylece serbest radikallerin zararlı etkisinden koruduğu saptanmıştır [111].

Yapılan diğer bir çalışmada, radyasyona dirençli bakteri olan *Deinococcus radiodurans*'ın katalaz enzimi (KatA, DR1998) saflaştırılmış ve karakterizasyonu araştırılmıştır. Katalaz toksik reaktif oksijen türlerine karşı hücreleri korumada önemli bir rol oynar. Saflaştırılmış *D. radiodurans* KatA monomerinin büyüklüğü 65 kDa, enzimin büyüklüğü 240 kDa olduğunu ortaya çıkarmışlardır. KatA'nın homotetramerden oluştuğu düşünülmüştür. Saf KatA spesifik aktivitesi 68.800 U / mg proteindir. Bu sonuçlar göstermiştir ki, *D. radiodurans* KatA'sı tipik tek işlevli hem-içeren katalazdır. KatA stabilitesi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stresini gidermesi *Aspergillus niger* ile sığır karaciğer katalazlarından daha üstün olduğu saptanmıştır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> direncinin yanı sıra

hücrelerde katA nispi bolluğu, oksidatif hasara karşı *D. radiodurans* hayatta kalma stratejisinde önemli bir rol oynamaktadır [38].

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Araştırmada kullanılan Kimyasallar, Ayıraçlar ve Besiyerleri

Bu çalışmada kültürlerin yapıldığı besiyerlerin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar; plazmid izolasyonu, agaroz jel elektroforezi uygulamalarında kullanılan kimyasallar ve çeşitli tamponların hazırlanmasında kullanılan kimyasallar SİGMA'dan kullanılmıştır.

Bu çalışmada, gram-pozitif bir bakteri olan ve dünya üzerinde radyasyona en dayanıklı organizma olarak bilinen *Deinococcus radiodurans* R1 (ATCC BAA-816) ile bunun *vgb<sup>-</sup>* ve *vgb<sup>+</sup>* rekombinant suşları kullanıldı. Bu bakteri suşlarının kendine özel besiyeri olan TGY (tripton, glukoz, maya özütü) sıvı besi ortamının içeriği Çizelge 3.1’de verilmiştir. Besiyerleri 20 ml/100 ml erlenlerde olacak şekilde hazırlanmış olup 121°C’de 1 atm basınç altında 20 dakika otoklav edilmişlerdir. Otoklav sonrasında rekombinant bakterilerin üretileceği TGY sıvı besiyerine 100 µg/ml amfisilin eklendi.

Çizelge 3.1. TGY Sıvı Besiyerinin İçeriği (g L<sup>-1</sup>)

|            |    |
|------------|----|
| Tripton    | 10 |
| Maya özütü | 5  |
| Glukoz     | 1  |

Bu sıvı besi ortamına 15 g L<sup>-1</sup> agar ilavesiyle katı besiyeri elde edilmiştir.

#### 3.2. Kullanılan Bakteriler

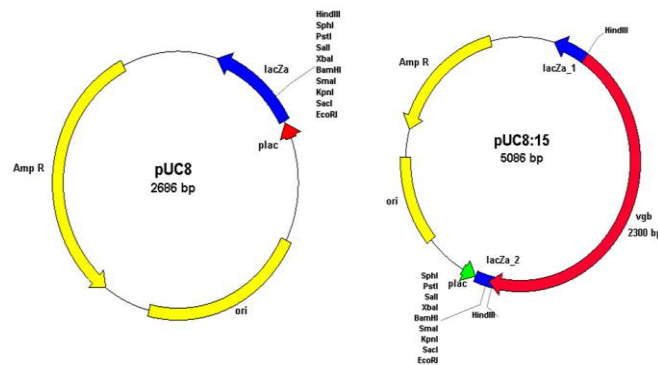
Bu çalışmada, gram-pozitif bir bakteri olan ve dünya üzerinde radyasyona en dayanıklı organizma olarak bilinen *Deinococcus radiodurans* R1 (ATCC BAA-816) ve onun *vgb<sup>-</sup>* ve *vgb<sup>+</sup>* rekombinant suşları kullanıldı.

### 3.3. Bakteri Stoklarının Hazırlanması

Çalışmada kullanılan bakterilerin uzun süreli stokları aynı zamanda % 20 gliserol (v/v) içeren TGY sıvı besiyerinde yapıldı. *D. radiodurans* TGY sıvı besiyerinde çoğaltılırken, bu bakterinin rekombinantları 100 µg/ml amfisilin içeren TGY sıvı besiyerinde inkübe edildi. Bu kültürlerden 1 ml alınarak ependorf tüplerine transfer edildi ve 10.000-rpm’de 5 dk. oda sıcaklığında santrifüj edilerek peletlere 800 µl TGY ve 200 µl gliserol eklenerek hafifçe vorteks yapıldı. Bu şekilde hazırlanmış olan hücre süspansiyonları -20 °C’de muhafaza edildi. Ancak, her çalışmada kullanılan bakteriler bu stok kültürlerden değil, TGY sıvı besiyeri ve rekombinantlar için amfisilin içeren TGY agar plaklar üzerine ekilen ve + 4 °C’de muhafaza edilen hücrelerden taze pasajlar alınarak yapıldı. Tüm çalışmalar sıvı besiyerine ekilen taze kültürler kullanılarak yapıldı.

### 3.4. *vgb* Klonları

Bu çalışmada kullanılan *D. radiodurans*’ın *vgb* rekombinantı bu geni bir pUC plazmidi üzerinde taşımaktadır (Şekil 3.1). *D. radiodurans*’ın *vgb*<sup>+</sup> rekombinantı “Dr[pUC8:15]” olarak adlandırıldı. Dr[pUC8:15] suşu, 2686 baz çiftine sahip pUC8 plazmidinin 665 baz çiftlik multi klonlama bölgesindeki Hind III restriksiyon bölgesine *vgb* geni (ve promotorunu) taşıyan yaklaşık 2.3-Kb’lık *Vitreoscilla* genomik fragmanının klonlanması ile oluşturulmuş rekombinant bir bakteri suşu olup, bu yeni oluşturulan plazmidin (yani, [pUC8:15]) büyüklüğü yaklaşık 5-Kb’dır [112].



Şekil 3.1. pUC8 ve pUC8:15 plazmidlerinin fiziki haritası

### 3.5. *D. radiodurans*'ın Genetik Manipölasyonu

Çalışmada plazmid izolasyonu ve restriksiyon haritalaması için standart protokoller kullanıldı. *D. radiodurans*'ın *vgb* klonlanmış rekombinant suşlarından plazmidler izole edildi. Plazmidlerin restriksiyon haritalarından bu vektörlerin istenen vektörler olup olmadığı araştırıldı. Bu transformantlardan elde edilen plazmidlerin minipreplerinden onların uygun plazmidi içerdikleri kanıtlandı. Çalışılan plazmidlerin genel özellikleri Şekil 3.1' de gösterilmiştir.

*Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) geninin (*vgb*) kaynağı olarak bu geni plazmid vektörler üzerinde taşıyan *D. radiodurans*'ın rekombinant suşu (Dr[pUC8:15]) kullanıldı. Negatif kontroller elde etmek için aynı plazmidin *vgb*<sup>-</sup> (yani *vgb* geni taşımayan) formunu taşıyan rekombinantından (Dr[pUC8]) bu plazmidler izole edildi. Bunun için bakterilerin pasaj yapıldığı plaklardan koloniden öze yardımıyla 100 µg ml<sup>-1</sup> amfisilin içeren 20 ml sıvı TGY besiyerine ekilerek gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Bu gece kültürlerinden 1,5 ml alınarak santrifüj edilmiştir ve elde edilen peletler plazmid izolasyonu için kullanıldı. Plazmid izolasyonu aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

#### 3.5.1. Plazmid İzolasyonu

Yukarıdaki şekilde kültürü yapılan *D. radiodurans*'ın *vgb*<sup>+</sup> ve *vgb*<sup>-</sup> rekombinantlarından plazmid izolasyonu standart alkali-lizis yöntemi kullanılarak yapıldı [113-114]. Bu yöntemle yaklaşık 1 µg plazmid DNA'sı ile 5 x 10<sup>6</sup>- 2 x 10<sup>7</sup> transformant elde edilebildiği saptanmıştır. İzlenen standart protokol aşağıdaki gibidir:

1. Gece boyunca inkübasyonu yapılan kültürlerden 1.5 ml alınıp bir ependorf tüpe aktararak 10.000-rpm'de 3 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atılarak pelet plazmid izolasyonu için muhafaza edildi.
2. Pelet 100 µl soğuk *Çözelti I* (GTE) ile sulandırılıp 30 sn. vorteksledikten sonra 5 dk. oda sıcaklığında bekletildi.
3. Taze olarak hazırlanmış 200 µl *Çözelti II* (NaOH/SDS) eklenip tüp alt-üst edildikten sonra 5 dk. buz içinde bekletildi.

4. Karışıma 150 µl oda sıcaklığındaki *Çözelti III* (potasyum asetat) eklenerek tekrar vortekslendi ve 5 dk. buzda bekletildi.
5. Karışım 10.000 rpm'de +4 °C'de 3 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı ve 0.8 ml % 95 etanol eklenerek 2 dk. oda sıcaklığında bekletildikten sonra 3 dk. 10.000 rpm'de santrifüj edilip süpernatant atıldı.
6. Peletin üzerine 1 ml % 70 etanol eklenerek yıkama işleminden sonra tekrar santrifüj edildi ve pelet inkübatörde 37°C'de yarım saat kurumaya bırakıldı.
7. Yukarıdaki pelete 30 µl steril TE tamponu eklenerek çözölmüş ve DNA solösyonu ileriki çalışmalara için +4 °C'de muhafaza edildi.

Buradaki alkali-lizis yöntemi ile plazmid izolasyonu için kullanılan solösyonların stokları ve hazırlanışları aşağıdaki gibidir:

- 10 ml GTE solösyonu
- 1.5 ml NaOH/SDS solösyonu (taze hazırlandı)
- 100 ml 5 M potasyum asetat solösyonu
- 10 ml TE tamponu

Bu solösyonların hazırlanış aşağıdaki şekilde yapıldı:

#### **GTE solösyonu (Glukoz/Tris.HCl/EDTA)**

50 mM glukoz

25 mM Tris-HCl, pH 8.0

10 mM EDTA

*GTE solösyonu hazırlandıktan sonra otoklav edildi ve 4 °C'de muhafaza edildi.*

#### **NaOH/SDS solösyonu**

0.2 N NaOH

% 1 (w/v) SDS

*Bu solösyonun taze hazırlanması gerekir.*

#### **Potasyum asetat solösyonu (5 M, pH 4.8)**

29.5 ml glasiyel asetik asit

KOH peletleri (pH 4.8 oluncaya kadar)

70.5 ml H<sub>2</sub>O

#### **TE (Tris/EDTA) Tamponu**

10 mM Tris.HCl, pH 8.0

1 mM EDTA, pH 8.0

*TE solösyonu otoklav edildikten sonra 4 °C'de muhafaza edildi.*

### 3.5.2. Plazmidlerin Restriksiyon Kesilimi ve Agaroz Jel Elektroforezi

Sal I restriksiyon enzimi ile muamele edilerek kesilen yukarıdaki plazmidlerin restriksiyon haritaları agaroz jel elektroforezi ile belirlendi. Jellerin hazırlanmasında ve yürütülmesinde 50X stok TAE tamponu kullanıldı. TAE tamponun içeriği aşağıdaki gibidir ( $L^{-1}$ ):

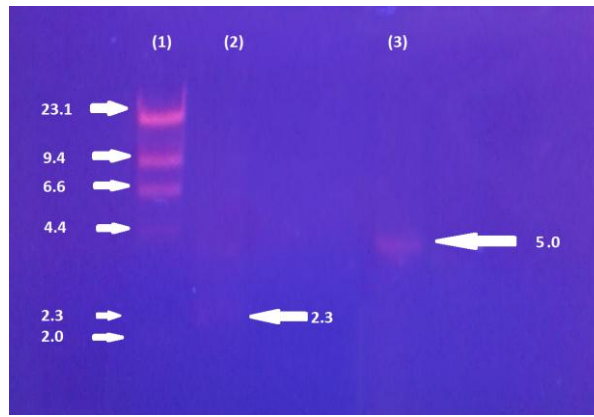
- 242 g Tris baz (pH 8.5)
- 57.1 g Glasiyel asetik asit
- 37.2 g EDTA (pH 8.0)

Jeller ve yürütme tamponu bu stokun 1X'e seyreltilmiş solüsyonu ile hazırlandı. Jellerin hazırlanması ve yürütülmesi genel olarak aşağıdaki protokole göre yapıldı [114].

1. Jeller toplam 100 ml jel solüsyonu ile yapıldı. Bunun için 98 ml  $dH_2O$ 'ya 2 ml 50X TAE tamponu eklendi ve agarozun jeldeki konsantrasyonu % 1.25 (w/v) olarak hazırlandı. Bu karışım mikrodalga fırında agaroz tamamen eriyip solüsyon berraklaşınca kadar kaynatıldı ve solüsyonun ısısı yaklaşık  $60-70^{\circ}C$ 'ye düşünce etidyum bromidin stok (10 mg/ml) solüsyonundan 5  $\mu$ l eklenerek hava kabarcığı veya köpürme olmayacak şekilde hafifçe karışması sağlandı.
2. Yukarıdaki jel solüsyonu jel yürütme tankına tarak dişlerini kapatacak kalınlıkta dökülerek yaklaşık 30 dk. beklendi.
3. Taraklar çıkarıldı ve jeli yaklaşık 0.5 cm kapatacak miktarda jel yürütme tamponu tanka dolduruldu.
4. Bu esnada plazmidlerin restriksiyon muameleleri yapıldı. 100  $\mu$ l TE tamponu içerisindeki eritilmiş plazmid örneklerinden 10  $\mu$ l alınıp steril ependorflara konuldu ve üzerine 2  $\mu$ l Sal I tamponu ve 2  $\mu$ l Sal I enzimi eklendi.
5. Karışım  $37^{\circ}C$  de 2 saat su banyosunda bekletildikten sonra içinde izleme boyası olarak brom fenol blue bulunan yükleme tamponundan 5  $\mu$ l eklendi.
6. Restriksiyon enzimi ile muamele görmüş plazmid DNA'sı, HindIII restriksiyon enzimi ile önceden kesilmiş ve standart markır olarak kullanılan lambda ( $\lambda$ ) DNA'sı uygun kuyucuklara eklenerek jel elektroforezi sabit voltajda (70 Volt) ve akımda (20–25 mA) 2 saat yürütüldü.
7. Jeldeki DNA bantlaşma motifi UV ışık altında floresan ışık yayan etidyum bromür ile belirlendi ve elektroforetogramları yapıldı.

8. Plazmidlerin restriksiyon bantlaşmasından istediğimiz DNA fragmanlarının bulunup bulunmadığı  $\lambda$  DNA'sının bilinen fragmanları ile oluşturulan standart eğriler yardımı ile tespit edildi.

Yukarıdaki şekilde hazırlanan jelin fotoğrafları çekilerek, jel üzerindeki plazmid DNA fragmanları bantlarının büyüklükleri (baz çifti sayısı veya kilobaz olarak), restriksiyon fragman büyüklüğü bilinen  $\lambda$  DNA'sı standardının logaritmik eğrisinden tespit edildi (Şekil 3.2).



**Şekil 3.2.** 1 nolu kuyucukta Hind III ile kesilmiş  $\lambda$ , 2 nolu kuyucukta *D. radiodurans* [pUC8] plazmid, 3 nolu kuyucukta *D. radiodurans* [pUC8:15] plazmidinin agaroz jeldeki restriksiyon fragmanları

### 3.6. Bakterilerin Kültürü

Bakteri kültürleri taze pasajlardan alınan kolonilerden yapıldı. Bunun için, pasajlardan bir koloninin bir kısmı öze ile alınarak 20 ml TGY sıvı besiyeri içeren 100 ml kapasiteli erlenlere ekim yapıldı ve gece boyunca çalkalamalı koşullarda (200-rpm) 30 °C'de inkübe edildi. Bu gece kültürlerinden yeni besi ortamlarına 1/100 inokulum (ör., 20 ml LB içeren erlenlere 200  $\mu$ l gece kültürü) transfer edilerek, enzim sentezi çalışmaları için değişik kültür koşulları altında inkübasyona bırakıldı.

### 3.6.1. Biyokütle Ölçümü

Hücre kültürlerinde çoğalma indikatörü olarak toplam ortam türbiditesinin optik densitesi ( $A_{600}$ ) kullanıldı.  $A_{600} > 0.5$  olduğunda kültürler uygun şekilde (1/5 veya 1/10) dilüsyon yapılarak  $A_{600}$  değerleri kaydedildi.

### 3.6.2. Canlı Hücre Sayısının Belirlenmesi

Hücre kültürlerinde çoğalma indikatörü hem radyasyon uygulanmadan önce hem de uygulandıktan sonra birim miktardaki canlı hücre sayısı belirlendi. Canlı hücre sayımı için, seçilmiş kültür fazlarında % 0.09 serum fizyolojiklerde uygun dilüsyonlar (1/10 veya 1/20) yapıldı. Son dilüsyondan sonra 50 µl alınarak petrilere ekim yapıldı. Yabanıl suş olan *D. radiodurans* 30 °C’de yaklaşık 2 gece, rekombinant suşlar olan *D. radiodurans* [pUC8] ve *D. radiodurans* [pUC8:15] 30 °C’de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Oluşan koloniler sayılarak o fazdaki kültür ortamında bulunan canlı hücre sayısı belirlendi. Radyasyon uygulanmadan önce yapılan canlı hücresiyle yabanıl bakteri ile  $vgb^-$  ve  $vgb^+$  rekombinant suşlarının üreme eğrileri çıkartılmıştır. 300, 600, 900, 1200, 1500 cGray doz uygulaması yapılan bu bakterilerin canlı kalma yeteneklerini anlamak için uygun dilüsyonlarla TGY agarlı plaklara ekimi yapıldı.

### 3.6.3. Kültürlerin Asit Üretimi

Kültürlerin asit üretimi pH değeri olarak kaydedildi. Bunun için kültür ortamlarının başlangıç pH değerinin (genellikle pH 7.5) kültür süresi sonunda nasıl değiştiği belirlendi.

### 3.7. Bakterilerin Oksijen Alımı

Hücrelerin oksijen alımı için öncelikle oksijen içeriği bilinen bir tampon sistemi (0.1 M potasyum fosfat, pH 7.6) hazırlandı. Bu tampon bir manyetik karıştırıcı aracılığı ile yaklaşık 400-rpm hızda gece boyunca karıştırılarak oksijene doyuruldu. Oksijen monitörü hücrelerin konduğu kuvvetlerin etrafını saran bir su banyosu ile desteklendi. Değişik bakteriler için su banyosunun ısı ölçümler öncesi kalibre edildi. Bakteri süspansiyonları ve kalibrasyon tamponunun konduğu kuvvetlerdeki ısı bu kuvvetlerin

etrafında sirkülasyon yapan suyun ısısı ile aynı oluncaya kadar bu küvetlerin içindeki manyetik karıştırıcılarla karıştırıldı. Bakterilerin oksijen tüketim hesapları 4 ml havaya doyurulmuş potasyum fosfat tamponunun bulunduğu küvete göre yapıldı. Bu küvette oksijen seviyesi % 100 kabul edilmektedir ve bakterilerin eklendikleri ortamda sebep oldukları % oksijen düşüşü onların oksijen alım güçleri olarak ifade edilmektedir.

1. Hücrelerin oksijen kullanımlarının tespitinde kullanılan bu yöntem uygulanırken inokülasyonun 6, 9 ve 12 saatlerinde örneklerden 5'er ml hücre kültürü alındı ve oda ısısında 5000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi.
2. Daha sonra peletler  $A_{600}$  değerlerine bakılarak eşit OD'de gece boyunca oksijene doyurulmuş 0.1 M potasyum fosfat tamponunda yeniden süspansiyon edildi.
3. Bu süspansiyondan 1 ml alınarak probun küvetine konmuş olan 3 ml havaya doyurulmuş potasyum fosfat tamponuna eklendi.
4. Kalibrasyon probuna (4 ml potasyum fosfatın bulunduğu küvette bulunan prob) göre, örneklerin yani bakteri süspansiyonlarının bulunduğu küvetteki belli zaman aralığındaki (genellikle 5 dak) % oksijen azalması kaydedildi ve bakterilerin oksijen alım oranları hesaplandı.

Havaya doyurulmuş yukarıdaki potasyum fosfat tamponunun oksijen konsantrasyonu 25 °C'de 250  $\mu\text{mol/L}$ , 32 °C'de 233  $\mu\text{mol/L}$ , 37 °C'de 218  $\mu\text{mol/L}$ 'dir. *D. radiodurans*'ın *vgb* içeren (*vgb*<sup>+</sup>) ve *vgb* içermeyen (*vgb*<sup>-</sup>) suşları ile yabanıl suşunun oksijen alım yetenekleri aşağıdaki formüle göre belirlendi [115].

$$R = N \mu\text{mol} / \text{Litre} \times (4/1000)L \times D/VT$$

Burada;

R= Bakteri başına tüketilen oksijen miktarını

N= Bakteriye özgü sıcaklık derecesinde tamponun içerdiği oksijen konsantrasyonunu

D= % Oksijen azalma oranını

V= Canlı hücre sayısını

T= D'deki oksijen oranının tüketilmesi için geçen zamanı ifade etmektedir.

### 3.8. Bakterilerin Radyasyona Maruz Kalması

Bu çalışmada Elekta marka Pricise model Lineer hızlandırıcı tedavi cihazı kullanılmıştır. Hızlandırıcı cihazı eksternal radyoterapi uygulamalarında kullanılan yüksek enerjili X ışınları ve elektronlarla çalışan tedavi cihazıdır. Farklı tipte foton ve elektron enerjilerine sahiptir. Bu çalışmada kullanılan Lineer hızlandırıcı cihazı 6 MV ve 25 MV foton enerjisine, 4, 6, 8, 10, 12, 15 MeV elektron enerjilerine sahiptir.

Bu çalışmada 6 MV foton enerjisi kullanılarak 30x30 cm<sup>2</sup> alan büyüklüğünde ışınlama ile tedavi cihazının kafası Gantry (G) = 0°, kolimatör (C) = 0°, SSD = 45 cm, derinlik (d) = 5 cm ışınlama koşullarında 300, 600, 900, 1200, 1500 cGray değerleri için yapılan doz hesabı ile ışınlama yapıldı.

### 3.9. Bakterilerin Radyasyon Sonrası Hücre Ekstraktlarının Hazırlanması

Radyasyon uygulamasında *D. radiodurans* ile  $vgb^+$  ve  $vgb^-$  rekombinant suşlarına sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. Yeni tüplerin boş ağırlıkları tartılarak kaydedildi ve tüplere radyasyona maruz kalan hücrelerden konuldu.
2. 10.000-rpm'de 10 dk. santrifüj edildi ve süpernatant atılarak peletler serum fizyolojiyle iki kez yıkandı.
3. Peletlerin ağırlığı hesaplandı ve peletlerin ağırlığının 4 katı kadar PBS tamponuyla (pH 7,4) süspansiyon yapıldı.
4. Bu süspansiyonlar bir ultrasonifikatör (Soniks vibra cell) ile 40 saniye sonifikasyon, 20 saniye buz üzerinde inkübasyon olacak şekilde toplam 3 dakika sonifiye edilerek ultrasonik hücre ekstraktları hazırlanmıştır.
5. Hücre ekstraktları 10,000 xg ve 4 °C'de 5 dakika santrifüj edilerek supernatantlardan 1'er ml alınıp alüminyum folyo ile kaplanmış ependorf tüplerine konuldu.
6. Antioksidan enzimleri (SOD, CAT) ile glutatyon (GSH) aktivitesinin belirleneceği ve Fe-Mn analizinin yapılacağı bu süpernatantlar ölçüm yapılana kadar -20°C'de muhafaza edilmişlerdir.

### 3.10. Mn/ Fe Oranı

Farklı inkübasyon zamanlarından gelen ve değişik dozlarda  $\gamma$  radyasyonu uygulanan *D. radiodurans* 'ın yabancı suşu ve onun  $vgb^+$  rekombinant suşu ile  $vgb$  içermeyen ( $vgb^-$ ) suşlarının Mangan (Mn) ve Demir (Fe) miktarları Perkin Elmer AAnalyst 800 Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresinde çalışılmıştır.

Mn Fırın Programı;

Mn dalga boyu: 279,5

|   | Sıcaklık (°C) | Başlangıç Zamanı | Geçiş Zamanı | İnternal akış | Gaz tipi |
|---|---------------|------------------|--------------|---------------|----------|
| 1 | 110           | 1                | 30           | 250           | Normal   |
| 2 | 130           | 15               | 30           | 250           | Normal   |
| 3 | 1200          | 10               | 20           | 250           | Normal   |
| 4 | 1800          | 0                | 5            | 0             | Normal   |
| 5 | 2450          | 1                | 3            | 250           | Normal   |

Fe Fırın Programı;

Fe dalga boyu: 243,3

|   | Sıcaklık (°C) | Başlangıç Zamanı | Geçiş Zamanı | İnternal akış | Gaz tipi |
|---|---------------|------------------|--------------|---------------|----------|
| 1 | 110           | 1                | 30           | 250           | Normal   |
| 2 | 130           | 15               | 30           | 250           | Normal   |
| 3 | 1200          | 10               | 20           | 250           | Normal   |
| 4 | 1800          | 0                | 5            | 0             | Normal   |
| 5 | 2450          | 1                | 3            | 250           | Normal   |

### 3.11. Enzim Aktivite Tayini

Enzim aktivitesi tayin işlemlerinde, mikrolaka okuyucu sistemi (Molecular Devices Corp., Versamax) ve spektrofotometre (Shimadzu UV-visible Spektrofotometre UV-1601) kullanıldı. Bütün enzimlerin aktiviteleri her bakteri için üç tekrarlı olarak ölçüldü.

#### 3.11.1. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü

Katalaz enziminin aktivite tayini Luck H. [116] yöntemine göre yapıldı.

Gerekli çözeltiler:

-- 1/15 M konsantrasyonda Na, K-fosfat tamponu ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) pH: 7

-- Derişik  $\text{H}_2\text{O}_2$  çözeltisi

Yöntem:

Katalaz ölçümünde kullanılmak üzere spektrofotometrede 240 nm’de absorbans 0,7-0,9 oluncaya kadar Na-K-fosfat tampon çözeltisine derişik (% 35 ‘lik) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edildi. Numunelerin katalaz içeriğini belirlemek için hazırlanan bu karışımdan 1000 µl alınıp küvete kondu ve üzerine çalışma aralığına bağılı olarak uygun miktarda sulandırma yapılan süpernatandan 20 µl eklendi. Bir kez karıştırılıp Shimadzu 1601-UV visible spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda 30 sn süreyle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’nin ( $\epsilon = 0,0396 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ ) absorbans değışimi okundu. Okunan bu optik dansite farkından mL’deki enzim ünite sayısı hesaplandı.

### 3.11.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini

SOD enziminin aktivite tayini McCord J.M, Fridovich [117] yöntemine göre yapılmış olup yöntemin esası ksantin/ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit radikallerinin *sitokrom-c*’yi indirgemesinin SOD tarafından inhibisyonu temeline dayanır.

Süperoksit dismutaz çeşitli yollarla ortaya çıkan süperoksit (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) radikalının hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dismutasyonu reaksiyonunu katalizler. SOD enzim aktivitesi ksantin/ksantin oksidaz (XO) sistemi ile üretilen O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikallerinin *sitokrom c* okside etmesi sonucu oluşan renk değışiminin inhibisyonu 550 nm’de takip edilerek belirlendi. Bu reaksiyona dayanan optik dansitedeki azalmadan yararlanarak SOD tarafından reaksiyonun % inhibisyonu belirlendi. Bu reaksiyonu % 50 inhibe eden örneklerdeki SOD miktarı 1 Unite (U) olarak kabul edildi ve sonuçlar U/mg protein olarak verildi.

$$\% \text{ inhibisyon} = ((\text{ODkör} - \text{ODnum}) / \text{ODkör}) \times 100.$$

Gerekli çözeltiler:

A çözeltisi:

-- 5 µmol ksantin 0.001 N NaOH’ daki çözeltisi: 10 hacim

-- 2 µmol *sitokrom-c*’nin 50 mM pH 7,8 ve 0,1 mM EDTA içeren fosfat tamponundaki çözeltisi: 100 hacim

A çözeltisi belirtilen hacim oranlarında karıştırılarak hazırlanır. Bu çözelti +4°C’ de 3 gün kararlıdır.

B Çözeltisi:

Ksantin oksidazın 0,1 mM EDTA’daki çözeltisi 0.2U/mL

B çözeltisi deneyden önce taze olarak hazırlanır.

Yöntem:

- 1) 1'lik spektrofotometre küvetine 1 mL A çözeltisi eklendi.
- 2) 50 µL örnek ilave edildi.
- 3) Tepkime 50 µL B çözeltisinin eklenmesiyle başlatıldı.
- 4) Daha sonra Shimadzu 1601-UV visible spektrofotometrede 550 nm' deki absorbans değişimi (1dk.) okundu.
- 5) Kör okuması yapılırken örnek yerine 50 µL distile su eklendi.
- 6) Örneklerin % inhibisyon değerleri hesaplandı.

### **3.11.3. Total Glutasyon (GSH) Ölçümü**

5-tio-2-nitrobenzoat (TNB) oluşumu, 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ekstrakt içindeki GSH miktarı, ticari bir GSH standart olarak kullanılarak, nmol/mg protein cinsinden belirlendi [118].

### **3.11.4. Total Protein Tayini**

Total protein tayini Bradford yöntemine göre yapılmıştır [119]. 5 µl supernatan mikropalakalara pipetlenip ve üzerine 250 µl Bradfoard reaktifi eklenerek reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 15 dakika karanlıkta inkübe edildi. Renk değişimine bağlı olarak 595 nm dalga boyunda mikropalaka okuyucu sistemi kullanılarak absorbansları ölçüldü. Protein miktarları saptanırken BSA standart eğrisi değerleri ile karşılaştırma yapılarak örnekteki total protein değerleri hesaplandı.

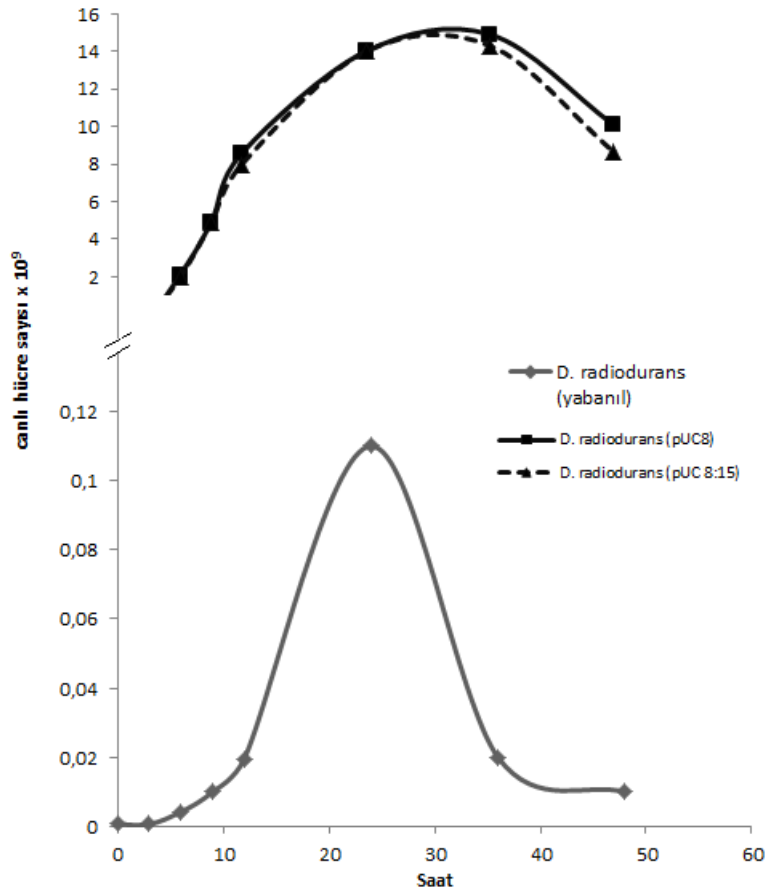
#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

##### 4.1. TGY Ortamında Üretilen *D. radiodurans* (yabanıl) ve Onun *vgb<sup>-</sup>* (Dr[pUC8]) ve *vgb<sup>+</sup>* (Dr[pUC8:15]) Rekombinant Suşlarında Üremenin Ölçümü

TGY (tripton, glukoz, maya özütü) koşullarında kültürü yapılan *D. radiodurans* 'ın yabanıl suşu ile onun *vgb<sup>-</sup>* ve *vgb<sup>+</sup>* rekombinant suşlarının üreme eğrileri çıkartılmıştır. Hücreler rahatlıkla üreyebildikleri bu besiyerinde 30 °C'de inkübe edildi. Canlı hücre sayıları ve OD<sub>600</sub> değerleri belirlendi.

##### 4.1.1. Canlı Hücre Sayımı (Doğrudan Ölçümü)

Çalışmanın bu kısmında, *D. radiodurans* (yabanıl) ve onun *vgb<sup>-</sup>* (Dr[pUC8]) ve *vgb<sup>+</sup>* (Dr[pUC8:15]) suşlarında canlı hücre sayıları araştırılmıştır ve Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

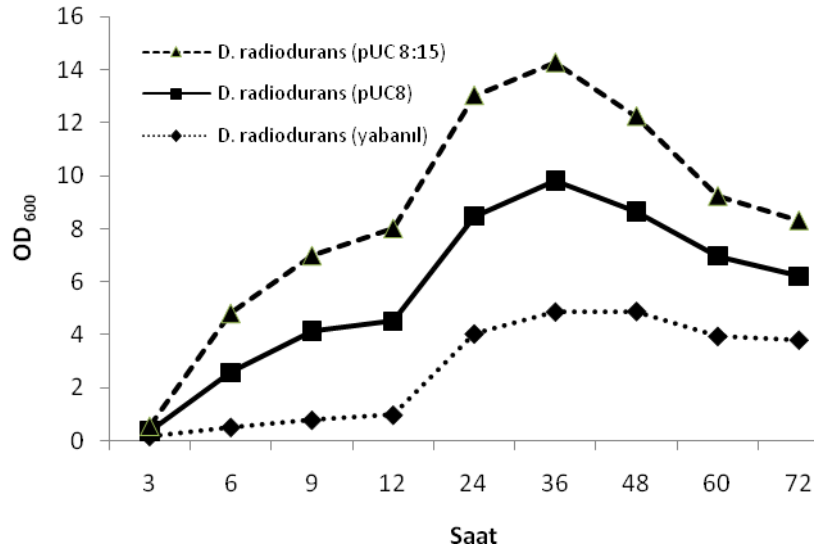


Şekil 4.1. *D. radiodurans* (yabanıl) ile *vgb<sup>-</sup>* (Dr[pUC8]) ve *vgb<sup>+</sup>* (Dr[pUC8:15]) rekombinant suşlarının canlı hücre sayısı

*D. radiodurans* ve rekombinant suşların üreme eğrilerine bağlı olarak üreme fazları tespit edilmiştir. Buna göre logaritmik üreme fazı *D. radiodurans* ve rekombinantları için yaklaşık olarak 14 saat olarak tespit edilmiştir. Hem *vgb*<sup>-</sup> hem de *vgb*<sup>+</sup> rekombinant suşlarının üreme hızında artış olduğu görülmüştür.

#### 4.1.2. OD Ölçümü (Dolaylı Ölçümü)

*D. radiodurans*'ın yabanıl suşu ile onun *vgb*<sup>-</sup> ve *vgb*<sup>+</sup> rekombinant suşlarının OD<sub>600</sub> değerleri Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.2.** *D. radiodurans* (yabanıl) ile *vgb*<sup>-</sup> (Dr[pUC8]) ve *vgb*<sup>+</sup> (Dr[pUC8:15]) rekombinant suşlarında OD<sub>600</sub> değerleri

#### 4.2. TGY Ortamında Üretilen *D. radiodurans* (yabanıl) ve Onun *vgb*<sup>-</sup> (Dr[pUC8]) ve *vgb*<sup>+</sup> (Dr[pUC8:15]) Rekombinant Suşlarında Oksijen Alımı

*D. radiodurans* yabanıl ve rekombinant hücrelerin oksijen kullanım karakteristikleri belirli sayıdaki hücrenin ortamdaki oksijeni ne kadar sürede ve ne oranda tükettiklerinin ölçülmesi ile belirlendi. Hücrelerin oksijen tüketimi materyal ve metot kısmında belirtildiği gibi yapılarak ve her bir bakteri hücresinin birim zamanda ne kadar oksijen tükettiği belirlendi.

**Çizelge 4.1.** *D. radiodurans* yabanıl ve rekombinant hücrelerinin oksijen alımı

|                                 | Oksijen tüketimi, nmol x 10 <sup>10</sup> hücre <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup> |        |         |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|--------|---------|
|                                 | 6 saat                                                                          | 9 saat | 12 saat |
| <i>D. radiodurans</i> [yabanıl] | 1.8                                                                             | 0.4    | 0.18    |
| <i>D. radiodurans</i> [pUC8]    | 0.004                                                                           | 0.0023 | 0.002   |
| <i>D. radiodurans</i> [pUC8:15] | 0.004                                                                           | 0.003  | 0.002   |

Kullanılmış olan bakterilerin oksijen tüketim karakteristikleri Çizelge 4.1’de gösterilmektedir. *D. radiodurans* ve bu bakterinin rekombinant suşlarının oksijen kullanım karakteristikleri karşılaştırıldığında, *vgb* içeren (*vgb*<sup>+</sup>) ve *vgb* içermeyen (*vgb*<sup>-</sup>) rekombinantların üç kültür fazında da konakçı hücreye göre daha az oksijen tükettiği görülmektedir. *D. radiodurans* yabanıl ile *D. radiodurans* [pUC8] ve *D. radiodurans* [pUC8:15]’nin oksijen alımının en yüksek olduğu 6 saatten 9 ve 12 saate doğru gidildiğinde bir azalma olduğu görülmüştür. Yabanıl suşun 12 saatteki oksijen tüketimi 6 saate göre yaklaşık 10 kat düşük olduğu kaydedilmiştir. *D. radiodurans*’ın *vgb*<sup>+</sup> ve *vgb*<sup>-</sup> suşlarının 6 saat ile 12 saati karşılaştırıldığında oksijen tüketiminin 2 kat olduğu görülmüştür.

#### 4.3. Radyasyon uygulanan *D. radiodurans* (yabanıl) ve Onun *vgb*<sup>-</sup> (Dr[pUC8]) ve *vgb*<sup>+</sup> (Dr[pUC8:15]) Rekombinant Suşlarında Mn/Fe Oranı

Çalışmanın bu kısmında farklı inkübasyon zamanlarından gelen ve değişik dozlarda iyonize radyasyonu uygulanan *D. radiodurans*’ın yabanıl suşu ve onun *vgb*<sup>+</sup> rekombinant suşu ile *vgb* içermeyen (*vgb*<sup>-</sup>) suşlarının Mn/Fe oranları araştırılmıştır. *D. radiodurans* yabanıl suşu ile *vgb*<sup>-</sup> (Dr[pUC8]) ve *vgb*<sup>+</sup> (Dr[pUC8:15]) rekombinant bakterilerin Manganez (Mn) Demir (Fe) oranları ile pH değerleri Çizelge 4.2 ve 4.3’de verilmiştir.

**Çizelge 4.2.** *D. radiodurans* yabanıl suşu ile *vgb*<sup>-</sup> (Dr[pUC8]) ve *vgb*<sup>+</sup> (Dr[pUC8:15]) rekombinant bakterilerin Mn/Fe oranı

|                                  |          | 300 cGy | 600 cGy | 900 cGy | 1200 cGy | 1500 cGy |
|----------------------------------|----------|---------|---------|---------|----------|----------|
| <i>D. radiodurans</i> [yabanıl]  | 6. saat  | 0.06    | 0.07    | 0.1     | 0.03     | 0.07     |
|                                  | 24. saat | 0.06    | 0.06    | 0.03    | 0.02     | 0.02     |
| <i>D. radiodurans</i> [pUC8]     | 6. saat  | 0.03    | 0.02    | 0.02    | 0.02     | 0.02     |
|                                  | 24. saat | 0.02    | 0.02    | 0.02    | 0.01     | 0.02     |
| <i>D. radiodurasns</i> [pUC8:15] | 6. saat  | 0.02    | 0.02    | 0.02    | 0.05     | 0.01     |
|                                  | 24. saat | 0.01    | 0.01    | 0.02    | 0.02     | 0.02     |

**Çizelge 4.3.** *D. radiodurans* yabanıl suşu ile *vgb<sup>-</sup>* (Dr[pUC8]) ve *vgb<sup>+</sup>* (Dr[pUC8:15]) rekombinant bakterilerinin 24 saat pH değerleri

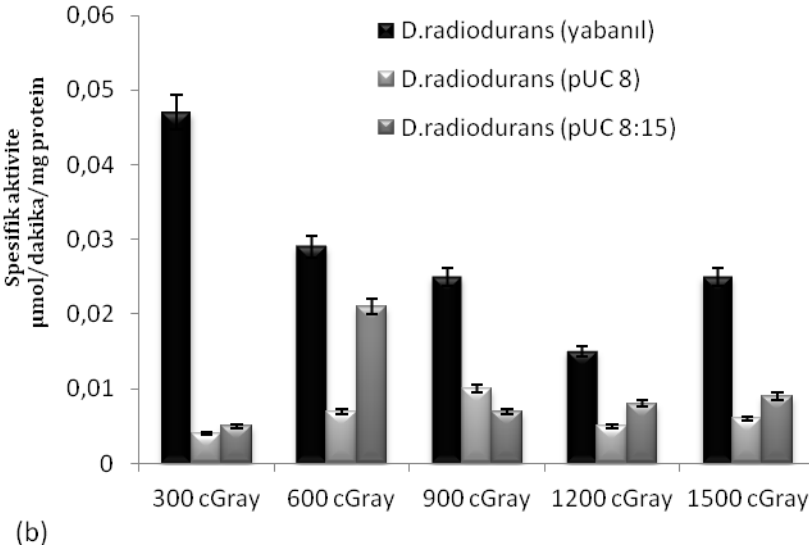
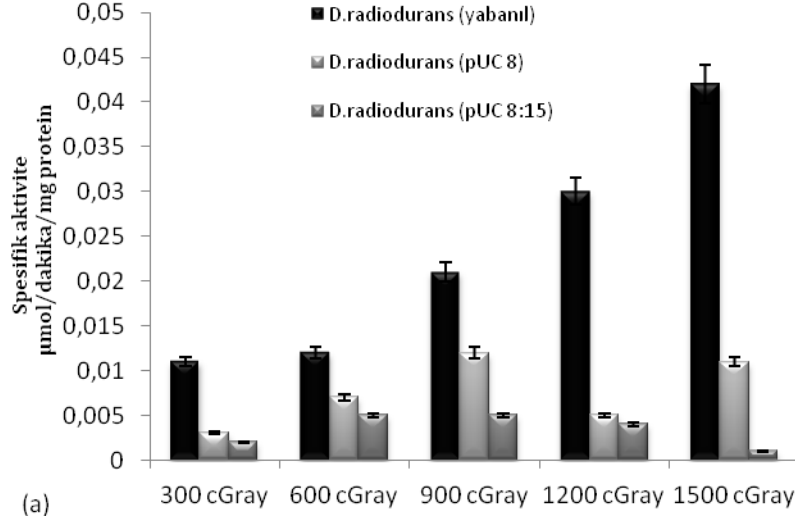
| pH Değerleri                    |     |
|---------------------------------|-----|
| <i>D. radiodurans</i> [yabanıl] | 8.7 |
| <i>D. radiodurans</i> [pUC8]    | 9.5 |
| <i>D. radiodurans</i> [pUC8:15] | 9.4 |

#### **4.4. Radyasyon uygulanan *D. radiodurans* (yabanıl) ve Onun *vgb<sup>-</sup>* (Dr[pUC8]) ve *vgb<sup>+</sup>* (Dr[pUC8:15]) Rekombinant Suşlarında SOD, CAT ve GSH Tayini**

300, 600, 900, 1200, 1500 cGray şeklinde uygulanan radyasyonun *D. radiodurans*'ın *vgb<sup>-</sup>* (Dr[pUC8]) ve *vgb<sup>+</sup>* (Dr[pUC8:15]) rekombinant bakterilerin antioksidan enzim aktiviteleri ve glutatyon (GSH) miktarlarındaki değişimler yabanıl suşuyla karşılaştırılarak belirlenmiştir.

##### **4.4.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi**

Burada farklı inkübasyon zamanlarından gelen ve değişik dozlarda iyonize radyasyon uygulanan *D. radiodurans* 'ın yabanıl suşu ve onun *vgb<sup>+</sup>* rekombinant suşu ile *vgb* içermeyen (*vgb<sup>-</sup>*) suşlarının SOD aktivitesi araştırılmıştır. *D. radiodurans* yabanıl suşu ile *vgb<sup>-</sup>* (Dr[pUC8]) ve *vgb<sup>+</sup>* (Dr[pUC8:15]) rekombinant bakterilerin SOD enziminin aktivitesi Şekil 4.3'de verilmiştir.



**Şekil 4.3.** İyonize radyasyon uygulanan *D. radiodurans* ve rekombinant bakterilerinde (a) 6 saat (b) 24 saatlik hücrelerin radyasyon dozuna bağlı olarak süperoksit dismutaz aktivitesi

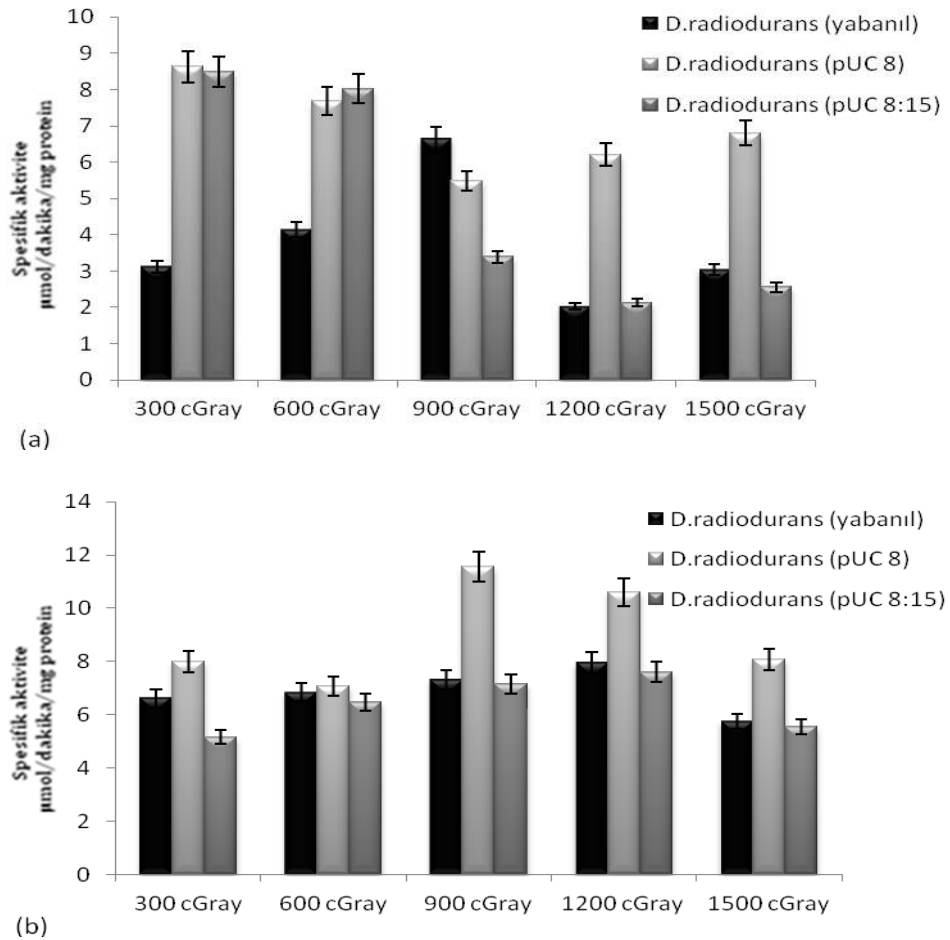
Şekil 4.3 (a)' da görüldüğü gibi 6 saatten gelen *D. radiodurans*'ın yabanıl suşuna bakıldığında radyasyon dozunun artışına paralel olarak genel anlamda bir artış gösterdiği saptanmıştır. Kültürün bu erken fazında (6 saat) en yüksek süperoksit dismutaz aktivitenin 1500 cGray radyasyon uygulanan yabanıl suş örneklerinde saptanmıştır. En düşük süperoksit dismutaz enziminin aktivite değeri de 1500 cGray radyasyon uygulanan *vgb*<sup>+</sup> rekombinant suşunda olduğu görülmüştür. Bu radyasyon uygulanan *D. radiodurans*'ın yabanıl suşu *vgb*<sup>+</sup> rekombinant suşuyla kıyaslandığında SOD aktivitesinin 42 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Görüldüğü gibi *vgb*<sup>+</sup> ve *vgb*<sup>-</sup> rekombinant suşları yabanıl suşuyla kıyaslandığında hem 6 saat hem de 24 saat örneklerinde SOD aktivitesinin düştüğü

belirlenmiştir. 24 saat’de 1200 cGray uygulanan *D. radiodurans*’ın yabanıl suşu *vgb*<sup>+</sup> rekombinantıyla karşılaştırıldığında 1,8 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. 1500 cGray de ise bu bakteriler arasındaki farkın 2.7 kat olarak *D. radiodurans*’ın yabanıl suşunun daha fazla SOD aktivitesi olduğu görülmüştür.

#### 4.4.2. Katalaz (CAT) Aktivitesi

Farklı dozlarda iyonize radyasyon uygulanan *D. radiodurans* bakterisinin yabanıl suşu ile bu bakterinin pUC8 plazmidini taşıyan rekombinantı ve aynı plazmidin *vgb* geni taşıyan formu olan pUC8:15 plazmidini taşıyan rekombinant hücrelerinin katalaz aktivitesi Şekil 4.4’de gösterilmiştir.



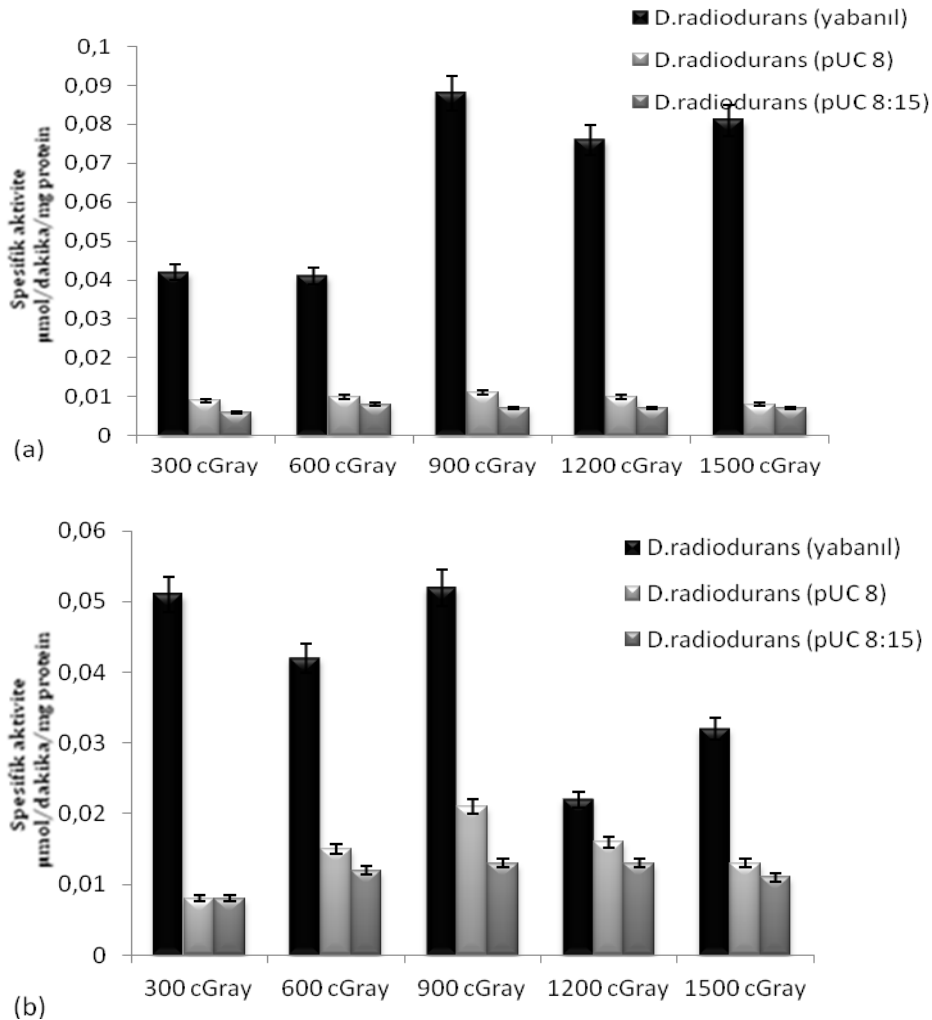
**Şekil 4.4.** İyonize radyasyon uygulanan *D. radiodurans* yabanıl ve rekombinant bakterilerinde (a) 6 saat ve (b) 24 saatlik hücrelerin radyasyon dozuna bağlı olarak katalaz aktivitesi

Şekil 4.4’e genel olarak bakıldığında, 6 ve 24 saatlerde *D. radiodurans*’ın *vgb*<sup>+</sup> rekombinant suşunun daha fazla katalaz aktivite gösterdiği saptandı. 24 saate baktığımızda *D. radiodurans* yabanıl ve *vgb*<sup>+</sup> rekombinant suşunun katalaz aktivitesinin

aynı olduğu *vgb*<sup>-</sup> rekombinant bakterisinin bunlardan daha fazla aktivite gösterdiği görülmektedir. 6 saat de 1500 cGray radyasyonda *vgb*<sup>-</sup> içeren bakterisi yabancıla karşılaştırılınca 2.2 kat daha fazla, 24 saat'lik hücrelerin 900 cGray radyasyon dozuna maruz kalan *vgb*<sup>-</sup> rekombinant suşu yabancı ile kıyaslanınca yaklaşık 1.6 kat artış gösterdiği saptanmıştır.

#### 4.4.3. Glutasyon (GSH) Miktarı

*D. radiodurans* bakterisinin yabancı suşu ile bu bakterinin pUC8 ve pUC8:15 plazmidini taşıyan rekombinant hücrelerine farklı dozlarda iyonize radyasyon uygulandıktan sonra glutasyon (GSH) miktarı saptanmış ve Şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5. İyonize radyasyon uygulanan *D. radiodurans* yabancı suşu ile bu bakterinin pUC8 ve pUC8:15 plazmidini taşıyan rekombinant bakterilerin (a) 6 saat (b) 24 saatlik hücrelerindeki GSH miktarı

Glutasyon miktarına bakıldığında kültürün hem erken fazında (6 saat) hem de ileri fazında (24 saat) *D. radiodurans* yabanıl suşu ile bu bakterinin pUC8 ve pUC8:15 plazmidini taşıyan rekombinant bakterileri kıyaslandığında en fazla yabanıl suşta olduğu görülmüştür. 6 saat düşük doz (300 cGray) radyasyona bakıldığında yabanılın *vgb*<sup>+</sup> rekombinant bakterisine göre 7 kat daha fazla, yüksek dozda ise yine bu bakteri suşları arasında yaklaşık 11.6 kat daha fazla GSH miktarı olduğu belirlenmiştir. 24 saate düşük dozda *D. radiodurans* yabanıl suşu ile bu bakterinin pUC8:15 plazmidini taşıyan rekombinant bakterisi kıyaslandığında yaklaşık 6.4 kat daha fazla, yüksek doz radyasyonunda ise bu oranın yaklaşık 3 kat daha fazla olduğu saptanmıştır (Şekil 4.5).

#### 4.5. Radyasyon Sonrası Bakterilerin Canlı Hücre Sayıları

Çalışmanın bu kısmında, farklı inkübasyon zamanlarından gelen ve değişik dozlarda (300, 600, 900, 1200, 1500 cGray) iyonize radyasyonu uygulanan *D. radiodurans*'ın yabanıl suşu ve onun *vgb*<sup>+</sup> rekombinant suşu ile *vgb* içermeyen (*vgb*<sup>-</sup>) suşlarının doz artışına bağlı olarak canlı hücre sayılarındaki azalış da çalışılmıştır.

**Çizelge 4.4.** *D. radiodurans*'ın yabanıl suşu ve onun *vgb*<sup>+</sup> rekombinant suşu ile *vgb* içermeyen (*vgb*<sup>-</sup>) suşlarının iyonize radyasyon sonrasında doz artışına bağlı olarak canlı hücre sayıları. Her veri üç bağımsız deneyin ortalamasıyla hesaplanmıştır

| 6 saat                           |                       |                        |                      |                      |                      |                      |
|----------------------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                                  | Kontrol               | 300<br>cGray           | 600<br>cGray         | 900<br>cGray         | 1200<br>cGray        | 1500<br>cGray        |
| <i>D. radiodurans</i> [yabanıl]  | 0.74x10 <sup>7</sup>  | 0.71 x 10 <sup>7</sup> | 0.63x10 <sup>7</sup> | 0.62x10 <sup>7</sup> | 0.58x10 <sup>7</sup> | 0.51x10 <sup>7</sup> |
| <i>D. radiodurans</i> [pUC8]     | 105.3x10 <sup>7</sup> | 97.2x10 <sup>7</sup>   | 90x10 <sup>7</sup>   | 97x10 <sup>7</sup>   | 72x10 <sup>7</sup>   | 43.2x10 <sup>7</sup> |
| <i>D. radiodurasns</i> [pUC8:15] | 98.5x10 <sup>7</sup>  | 90x10 <sup>7</sup>     | 69.2x10 <sup>7</sup> | 38.6x10 <sup>7</sup> | 50.6x10 <sup>7</sup> | 43.2x10 <sup>7</sup> |

| 24 saat                          |                     |                     |                     |                       |                     |                      |
|----------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|
|                                  | Kontrol             | 300<br>cGray        | 600<br>cGray        | 900<br>cGray          | 1200<br>cGray       | 1500<br>cGray        |
| <i>D. radiodurans</i> [yabanıl]  | 6.5x10 <sup>7</sup> | 6.3x10 <sup>7</sup> | 4x10 <sup>7</sup>   | 3.9x10 <sup>7</sup>   | 3.3x10 <sup>7</sup> | 4.6x10 <sup>7</sup>  |
| <i>D. radiodurans</i> [pUC8]     | 241x10 <sup>7</sup> | 220x10 <sup>7</sup> | 220x10 <sup>7</sup> | 130.6x10 <sup>7</sup> | 128x10 <sup>7</sup> | 96.6x10 <sup>7</sup> |
| <i>D. radiodurasns</i> [pUC8:15] | 237x10 <sup>7</sup> | 226x10 <sup>7</sup> | 208x10 <sup>7</sup> | 168.6x10 <sup>7</sup> | 128x10 <sup>7</sup> | 106x10 <sup>7</sup>  |

Çizelge 4.4'e genel olarak bakıldığında, bakteriler doz artışına bağlı olarak canlı hücre sayıları giderek azalmaktadır. Bakteriler en yüksek iyonize radyasyon dozu kontrolle kıyaslandığında en fazla canlılık kaybının *vgb*<sup>-</sup> rekombinantında olduğu görüldü. 6 saatten gelen *vgb*<sup>-</sup> suşu kontrolüyle karşılaştırıldığında canlılık kaybının

%58.9 olduğu saptandı. 24 saatlik *vgb*<sup>-</sup> hücrelerinde ise bu oran %59.9'dur. En az canlılık kaybı ise *D. radiodurans* konakcısında 6 saatte %31.1 iken 24 saatte %29.2 olarak kaydedilmiştir.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, farklı dozlarda iyonize radyasyona maruz bırakılmış *D. radiodurans* R1 (ATCC BAA-816) ve bu bakterinin pUC8 plazmidini taşıyan rekombinantı ile aynı plazmidin *vgb* geni taşıyan formu olan pUC8:15 plazmidini taşıyan rekombinantının büyüme ve çoğalması, oksijen alımı ve gen transformasyonu sonucu radyodirençlilik özelliği araştırılmıştır. Bakterilere değişik dozlarda (300, 600, 900, 1200, 1500 cGray) iyonize radyasyon uygulanmış ve yukarıdaki özelliklerin yanı sıra SOD, CAT aktiviteleri ile glutatyon miktarı, Mn/Fe oranları ve radyasyon dozuna bağlı olarak bakterilerin canlı kalma yüzdeleri belirlenmiştir.

VHb/*vgb* sisteminin, ortam oksijenini tamponlamadaki rolü ve kültürün ileri fazlarında membran transferazlarına aktararak yaşlı hücrelere daha iyi bir solunum, büyüme ve çoğalma yeteneği sağlaması önemli avantajdır [120]. VHb'nin diğer bir önemli rolü genetik mühendislikle oluşturulmuş VHb geni taşıyan hücrelerde heterolog ifadesinin çeşitli konakçılarda çoğunlukla protein ve metabolit sentezinde olduğu kadar büyümeyi de olumlu geliştirdiği ortaya konmuş [81], *vgb* ekspresyonu yapan bakterilerde üreme hızlarında artış olduğu belirlenmiştir [121]. Bu çalışmada da, *D. radiodurans* ve rekombinant suşların büyüme-çoğalma karakteristikleri tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre 24 saat kültürlerdeki *vgb*<sup>-</sup> ve *vgb*<sup>+</sup> rekombinant suşlarının yabanıl suş ile karşılaştırıldığında üreme hızında yaklaşık 140 katlık yüksek bir artışın olduğu saptandı.

Çalışmamızda *D. radiodurans* yabanıl tip kültürler ile *vgb*<sup>+</sup> ve *vgb*<sup>-</sup> rekombinant suş kültürlerinin 24 saat üreme ortamlarındaki pH değerleri ölçülmüştür. *D. radiodurans* yabanıl suşun 8.7, *vgb*<sup>+</sup> ve *vgb*<sup>-</sup> rekombinant suşların yaklaşık 9.5 pH değerlerinde kültür ortamlarına sahip oldukları tespit edildi. Bunun nedeni yüksek oksijen tüketen *D. radiodurans* yabanıl suşunda solunum zincirinde daha fazla oksijenin indirgenmesiyle hücre içine daha fazla proton akışının olması, bu proton akışının yabanıl suşla karşılaştırıldığında daha az oksijen tüketimine sahip rekombinantlarda daha düşük olmasından kaynaklanmaktadır [122].

Çalışmamızda farklı inkübasyon zamanlarından gelen ve değişik dozlarda iyonize radyasyon uygulanan *D. radiodurans*'ın yabanıl suşu ve onun *vgb*<sup>+</sup> rekombinant suşu ile *vgb* içermeyen (*vgb*<sup>-</sup>) suşlarının mangan (Mn) ve demir (Fe) oranları belirlenmiştir. Genel olarak bakıldığında, rekombinantlar radyodirençliğinin bir

göstergesi olan Mn/Fe oranı bakımından yabanıl suşa göre daha düşük bir Mn/Fe oranına sahip oldukları belirlenmiştir. pUC8 ve pUC8:15 rekombinant suşlarının 24 saat kültür pH değerlerinin yaklaşık 9.5, yabanıl suşun ise 8.7 (Çizelge 4.3, 4.4) olması, Mn/Fe oranının yabanıl suşta yüksek olmasına bağlanabilir. Bu sonucu destekleyen bir çalışmada, yüksek pH ortamının Mn redoks döngüsünü inhibe ettiği ve bunun sonucu olarak protein oksidasyonundaki artışla birlikte bakterinin iyonize radyasyona daha duyarlı hale geldiği gösterilmiştir [31].

Çeşitli biyoüretimlerde oksijen konsantrasyonunun belli kritik seviyelerin altına düşmesi en önemli belirleyici olup, böyle sistemlerde hücrelere etkin bir oksijen alım özelliği kazandıran *Vitreoscilla* hemoglobininin kullanılmasının hücreye önemli avantaj sağlayacağı düşünülmüştür. Ayrıca çalışmamızda, farklı dozlarda radyasyona maruz bırakılan *D. radiodurans* ve onun rekombinant suşlarında SOD, CAT ve glutatyon sentezinin farklı düzeylerde etkilendiği saptanmıştır.

İyonize radyasyon, hücrelerde oksidatif stresi tetikleyerek reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olmaktadır. Oksidatif stresin artmasıyla birlikte antioksidan sistemde yer alan enzimlerin aktivitelerinde değişiklikler meydana gelmektedir. Radyasyonun neden olduğu oksidatif stresi göstermek, antioksidan savunma sisteminde yer alan enzimlerdeki değişimlerin saptanmasıyla açıklanabilmektedir [123]. Çalışmamızda, kültürlerin erken (6 saat) ve geç fazında (24 saat) *D. radiodurans* ve onun rekombinant suşlarına, farklı dozlarda iyonize radyasyon uygulanmıştır. Farklı dozda radyasyon uygulamalarına bağlı olarak her üç suşun SOD aktivitelerinde suşa bağlı değişiklikler olduğu saptanmıştır. Farklı radyasyon dozlarına maruz bırakılan *D. radiodurans* ve onun rekombinant suşlarının SOD aktivitelerinde özellikle yabanıl suşun yüksek aktivite gösterdiği ve doz artışına bağlı olarak 6 saatte artış; 24 saatte ise genel olarak azalış olduğu görülmüştür (Şekil 4.4). Benzer bir çalışmada *D. radiodurans*'a radyasyon uygulanması sonucunda, SOD ve CAT aktivitelerinin yüksek olduğu ortaya konmuştur [41]. *D. radiodurans* ve *E. coli*'nin gama iyonize radyasyon sonrası SOD ve CAT enzim aktivitelerindeki değişikliklerin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada ise farklı dozlarda iyonize radyasyon uygulanmasına bağlı olarak *D. radiodurans*'ın SOD ve CAT aktivitelerinde artış gözlemlendiği bildirilmiştir [124]. Çalışmamızda kültürün erken fazında (6 saat) en yüksek süperoksit dismutaz aktivitesinin 1500 cGray radyasyon uygulanan yabanıl suş örneklerinde olduğu saptanırken, en düşük süperoksit dismutaz aktivite değeri ise 1500 cGray radyasyon

uygulanan  $vgb^+$  rekombinant suşunda görülmüştür. Bu radyasyon dozunda, *D. radiodurans*'ın yabanıl suşunun SOD aktivitesinin,  $vgb^+$  rekombinant suşuna göre 42 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. 1200 cGray uygulanan 24 saat kültürlerinde yabanıl suşun SOD aktivitesinin  $vgb^+$  rekombinantından 1.8 kat,  $vgb^-$  rekombinant suşundan ise yaklaşık 2.1 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. 1500 cGray'de ise yabanıl suşun SOD aktivitesinin  $vgb^+$  rekombinant suşdaki SOD aktivitesinden yaklaşık 2.7 kat,  $vgb^-$  rekombinant suşdaki SOD aktivitesinden ise yaklaşık 3.2 kat fazla olduğu görülmüştür. *Vitreoscilla* hemoglobin geninde, hem oksijenle regüle olan hem de katabolit baskılanma gösteren bağlanma bölgeleri vardır. Katabolit baskılanmayı promotor üzerinde bulunan cAMP-CRP bağlanma bölgesi sağlar. Yapılan bir çalışmada *Vitreoscilla* hemoglobin geninin katabolik baskılama gösterdiği görülmüştür [125]. Bizim çalışmamızda da aynı şekilde  $vgb^+$  rekombinantında katabolik baskılama olduğu belirlenmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada manganın SOD için bir ko-faktör olduğu ve ortama eklenen fazladan manganın *Deinococcus radiodurans*'ta SOD aktivitesini arttırdığı görülmüştür. Aynı çalışmada Mn-SOD'un iyonize radyasyonla daha fazla indüklendiği saptanmıştır [126]. Çalışmamızda elde ettiğimiz Mn/Fe oranları bize *D. radiodurans* yabanıl suşunun  $vgb^+$  ve  $vgb^-$  rekombinant suşlardan daha fazla mangan içeriğine sahip olduğunu göstermiştir. Bu bulgu, yabanıl suşun SOD aktivitesinin rekombinant suşlardan neden daha yüksek olduğunu açıklamaktadır.

Diğer bir çalışmada, *D. radiodurans*'da durağan fazdaki katalaz aktivitesinin logaritmik fazdaki aktivitesinden daha fazla olduğu saptanmıştır [35]. Çalışmamızda da 900 cGray radyasyonda  $vgb^-$  rekombinant suşunun durağan faz (24 saat) katalaz aktivitesi logaritmik fazdan (6 saat) gelen hücrelerin aktivitesiyle kıyaslandığında, yaklaşık olarak 2 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca 6 ve 24 saatlerde *D. radiodurans*'ın  $vgb^-$  rekombinant suşunun daha fazla katalaz aktivitesi gösterdiği saptanmıştır. 24 saat kültürlerinde *D. radiodurans* yabanıl ve  $vgb^+$  rekombinant suşunun katalaz aktivitesinin aynı olduğu  $vgb^-$  rekombinant suşunun ise daha fazla aktivite gösterdiği görülmüştür. 6 saat kültürlerinde 1500 cGray radyasyonda  $vgb^-$  içeren bakteri suşu konakçısına göre 2.2 kat daha fazla, 24 saatte ve 900 cGray radyasyonda  $vgb^-$  rekombinant suşu yabanıl suşa göre yaklaşık 1.6 kat artış gösterdiği belirlenmiştir.

*D. radiodurans* yabanıl suşunun hücre içi GSH seviyesinin rekombinant suşlara göre daha yüksek olduğu ve uygulanan radyasyon dozuna bağlı olarak da genel bir artış gösterdiği saptanmıştır. Kültürün hem erken fazında hem de ileri fazında *D.*

*radiodurans* yabanıl suşun glutatyon miktarın rekombinant suşlara göre daha fazla olduğu görülmüştür. 6 saatte en düşük dozda (300 cGray) radyasyon uygulanan yabanıl suşun,  $vgb^+$  ve  $vgb^-$  rekombinant bakterilerine göre yaklaşık 7 kat daha fazla, en yüksek dozda (1500 cGray) ise yine yabanıl suşun rekombinant suşlara göre yaklaşık 11.6 kat daha fazla GSH miktarına sahip olduğu belirlenmiştir. Radyasyon uygulanan rekombinant suşların, 24 saatte GSH miktarları yabanıl suşa göre karşılaştırıldığında ise rekombinantların düşük GSH miktarlarına sahip olduğu tespit edilmiştir. Radyasyon uygulamasına bağlı olarak rekombinant suşlarda 300, 600 ve 900 cGray radyasyon dozlarında GSH seviyesinde artış olduğu yabanıl suşun GSH seviyeleinde ise belirgin bir değişikliğin olmadığı görülmüştür. 900 cGray iyonize radyasyon dozunda yabanıl suşun GSH aktivitesi  $vgb^+$  rekombinant suşun GSH aktivitesinden yaklaşık 2.3 kat,  $vgb^-$  rekombinant suşun GSH aktivitesinden ise yaklaşık 3 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Artan dozlarda ise (1200 ve 1500 cGray) hem yabanıl hemde rekombinant bakterilerin GSH seviyelerinde bir azalışın olduğu belirlenmiştir. Hücre içi GSH miktarı enzim aktivasyonu (γ-glutamilsistein sentetaz) veya GSH öncüllerinin seviyesindeki değişikliklerle meydana gelebilmektedir [124, 127]. Buna göre, 6 saat yabanıl suş kültürlerinde radyasyon dozundaki artışla birlikte radikallerin ortamda birikmesi, hücredeki GSH havuzunun azalmasına neden olmuş olabilir ve bunun sonucu GSH sentezi indüklenerek GSH'ın sentezinin artmasına neden olmuş olabilir. 24 saat rekombinant suşların 300, 600 ve 900 cGray doz artışına bağlı olarak GSH seviyelerinde meydana gelen artışın GSH-R enziminin indüklenmesiyle GSH'ın ortamda artmasına bağlı olabileceği ve 900 cGray'den sonra rekombinant suşlardaki GSH miktarının azalmasının ise rekombinant bakterilerin radyasyona olan duyarlılığının sonucu oluşan oksidatif stres ile bu hücrelerdeki GSH havuzunun azalmasına bağlayabiliriz.

*D. radiodurans*'ın yabanıl ve rekombinant suşlarının oksijen tüketim karakteristiklerine, kültürün 6, 9 ve 12 saatlerinde bakılmıştır. Bakterilerin oksijen kullanım karakteristikleri karşılaştırıldığında,  $vgb$  içeren ( $vgb^+$ ) ve  $vgb$  içermeyen ( $vgb^-$ ) rekombinant suşların üç kültür fazında da yabanıl suşa göre daha az oksijen tükettiği görülmüştür. *D. radiodurans* yabanıl ile *D. radiodurans* [pUC8] ve *D. radiodurans* [pUC8:15]'nin en yüksek oksijen alımının kültürlerin erken logaritmik fazlarında (6 saat) gerçekleştiği, daha sonra 9 ve 12 saate doğru gidildikçe azalma olduğu görülmüştür. Yabanıl suşun 6 saatteki oksijen tüketiminin, 12 saate göre yaklaşık 10 kat yüksek olduğu kaydedilmiştir. Ayrıca, *D. radiodurans*'ın *Vitreoscilla*

hemoglobini sentezleyen suşunun (*vgb*<sup>+</sup>) 6 saatte tükettiği oksijen miktarının ise, 12 saate göre 2 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda VHb ekspresyonu yapan rekombinant *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas maltophilia* bakterilerde bizim sonuçlarımıza benzer hem canlı hücre sayısında artış hem de oksijen alımında rekombinant suşlar yabancılılarıyla kıyaslandığında düşüşün olduğu belirtilmiştir [121]. *Vitreoscilla* hemoglobinin konakçı bakterilere daha iyi bir oksijen bağlama kapasitesi sağlaması düşünülebilir ancak bizim çalışmamızda rekombinant suşlarda yabancı suşla karşılaştırıldığında çok daha düşük oksijen alımının gerçekleşmesi bakterilere plazmid tarafından yüklenmiş olan ekstra metabolik yük ile ilgili olabilir.

Farklı inkübasyon zamanlarından gelen ve değişik dozlarda iyonize radyasyonu uygulanan bakterilerde, doz artışına bağlı olarak canlı hücre sayılarının giderek azaldığı saptanmıştır. Bakteriler en yüksek iyonize radyasyon dozu kontrolle kıyaslandığında en fazla canlılık kaybının *vgb*<sup>-</sup> rekombinantında olduğu görüldü. En az canlılık kaybı ise *D. radiodurans* yabancı bakteride olduğu kaydedildi. Yapılan bir çalışmada, zengin demir (Fe) ve düşük mangan (Mn) içeren hücrelerde (yani Mn/Fe oranı düşük) radyasyona olan duyarlılığın arttığı rapor edilmiştir [128]. Yüksek Mn/Fe oranı iyonize radyasyon sonrası meydana gelen protein oksidasyonu ile yakından bağlantılıdır. Yüksek hücre içi Mn oranı protein oksidasyonunu azaltmakta ve hücreleri iyonize radyasyon sonrası oluşan oksidatif stresden korumaktadır. Bizim verilerimize göre Mn/Fe oranının en yüksek olduğu bakteri suşumuz *D. radiodurans* yabancı, en düşük oran ise *vgb*<sup>-</sup> ile *vgb*<sup>+</sup> rekombinantlardadır. Bu da bize en fazla canlılık kaybının rekombinant suşlarda, en düşüğünün ise yabancıda görülmesini açıklamaktadır.

Sonuç olarak, radyasyona dirençliliğiyle Guinness rekorlar kitabına girmiş olan *D. radiodurans*'ta ilk kez bu çalışmada araştırılmış olan *vgb*/VHb sisteminin büyüme, çoğalma, oksijen alımı, radyodirenç özelliği ve bunu sağlayan Fe ve Mn oranı ile antioksidan seviyesi arasındaki ilişki araştırılmış ve sadece VHb'ninin değil aynı zamanda yabancı bir vektörün (pUC8) yabancı konakçıya aktarılmasının onun yukarıdaki tüm özellikleri üzerinde değişik ve çoğu zaman dramatik etkilerle kendisini gösterdiği saptanmıştır.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] A. Novick, *Growth of bacteria*. **Annu Rev Microbiol**, 9 (1955) p. 97-110.
- [2] W.B. Whitman, D.C. Coleman, W.J. Wiebe, *Prokaryotes: The unseen majority. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95:12 (1998) p. 6578-6583.
- [3] M.T. Madigan, *Brock biology of microorganisms*. 13th ed. 2012, **San Francisco: Benjamin Cummings**. xxviii, 1043, 77 p.
- [4] P.H. Rampelotto, *Resistance of Microorganisms to Extreme Environmental Conditions and Its Contribution to Astrobiology*. **Sustainability**, 2 (2010) p. 1602-1623.
- [5] R. Cavicchioli, *Extremophiles and the Search for Extraterrestrial Life*. **Astrobiology**, 2:3 (2002) p. 281-292.
- [6] E.V. Pikuta, R.B. Hoover, J. Tang, *Microbial extremophiles at the limits of life*. **Crit Rev Microbiol**, 33:3 (2007) p. 183-209.
- [7] T. McGenity, R. Amils, R. Cavicchioli, *Life and Applications of Extremophiles*. **Microbial Biotechnology**, (2010)
- [8] B.E. Moseley, D.M. Evans, *Isolation and properties of strains of Micrococcus (Deinococcus) radiodurans unable to excise ultraviolet light-induced pyrimidine dimers from DNA: evidence for two excision pathways*. **J Gen Microbiol**, 129:8 (1983) p. 2437-45.
- [9] B. Diaz, D. Schulze-Makuch, *Microbial survival rates of Escherichia coli and Deinococcus radiodurans under low temperature, low pressure, and UV-Irradiation conditions, and their relevance to possible Martian life*. **Astrobiology**, 6:2 (2006) p. 332-47.
- [10] R.G.E. Murray, et al., *The family Deinococcaceae*. In *The Prokaryotes*. **Spinger- Verlag**, (1992) p. 3735-3738.
- [11] Huyghe and Patrick, *Conan the Bacterium*. **The Sciences** (1998) p. 16–19.
- [12] J.R. Battista, *Against all odds: The survival strategies of Deinococcus radiodurans*. **Annual Review of Microbiology**, 51 (1997) p. 203-224.
- [13] H.D. Raj, et al., *Utilization of carbohydrates and amino acids by Micrococcus radiodurans*. **Can J Microbiol**, 6 (1960) p. 289-98.
- [14] B.W. Brooks, M.R.G. E., *Nomenclature for “Micrococcus radiodurans” and other radiation-resistant cocci: Deinococcaceae fam. nov. and Deinococcus gen. nov., including five species*. **Int. J. Syst. Bacteriol**, 31 (1981) p. 353–360.
- [15] K. Dose, et al., *Survival of microorganisms under the extreme conditions of the Atacama Desert*. **Orig Life Evol Biosph**, 31:3 (2001) p. 287-303.
- [16] J.R. Battista, *Against all odds: the survival strategies of Deinococcus radiodurans*. **Annu Rev Microbiol**, 51 (1997) p. 203-24.
- [17] B.G. Thompson, R. Anderson, R.G. Murray, *Unusual polar lipids of Micrococcus radiodurans strain Sark*. **Can J Microbiol**, 26:12 (1980) p. 1408-11.
- [18] K.S. Makarova, et al., *Genome of the extremely radiation-resistant bacterium Deinococcus radiodurans viewed from the perspective of comparative genomics*. **Microbiol Mol Biol Rev**, 65:1 (2001) p. 44-79.
- [19] R. Anderson, K. Hansen, *Structure of a novel phosphoglycolipid from Deinococcus radiodurans*. **J Biol Chem**, 260:22 (1985) p. 12219-23.
- [20] R.A. Pask-Hughes, N. Shaw, *Glycolipids from some extreme thermophilic bacteria belonging to the genus Thermus*. **J Bacteriol**, 149:1 (1982) p. 54-8.

- [21] A.E. Girard, *A comparative study of the fatty acids of some micrococci*. **Can J Microbiol**, 17:12 (1971) p. 1503-8.
- [22] J.K.Grimley, et al., *Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of DNA double-strand breakage and repair in Deinococcus radiodurans and a radiosensitive mutant*. **Int J Radiat Biol**, 60:4 (1991) p. 613-26.
- [23] J. Lin, et al., *Whole-genome shotgun optical mapping of Deinococcus radiodurans*. **Science**, 285:5433 (1999) p. 1558-62.
- [24] M.T. Hansen, *Multiplicity of genome equivalents in the radiation-resistant bacterium Micrococcus radiodurans*. **J Bacteriol**, 134:1 (1978) p. 71-5.
- [25] S. Levin-Zaidman, et al., *Ringlike structure of the Deinococcus radiodurans genome: a key to radioresistance?* **Science**, 299:5604 (2003) p. 254-6.
- [26] K.S. Makarova, et al., *Short repeats and IS elements in the extremely radiation-resistant bacterium Deinococcus radiodurans and comparison to other bacterial species*. **Res Microbiol**, 150:9-10 (1999) p. 711-24.
- [27] M.M. Cox, J.R. Battista, *Deinococcus radiodurans - the consummate survivor*. **Nature Reviews Microbiology**, 3:11 (2005) p. 882-92.
- [28] E. Bentchikou, et al., *A major role of the RecFOR pathway in DNA double-strand-break repair through ESDSA in Deinococcus radiodurans*. **PLoS Genet**, 6:1 (2010) p. e1000774.
- [29] K. Zahradka, et al., *Reassembly of shattered chromosomes in Deinococcus radiodurans*. **Nature**, 443:7111 (2006) p. 569-73.
- [30] M. Tanaka, et al., *Analysis of Deinococcus radiodurans's transcriptional response to ionizing radiation and desiccation reveals novel proteins that contribute to extreme radioresistance*. **Genetics**, 168:1 (2004) p. 21-33.
- [31] M.J. Daly, et al., *Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance*. **PLoS Biol**, 5:4 (2007) p. e92.
- [32] M.S. Lipton, et al., *Global analysis of the Deinococcus radiodurans proteome by using accurate mass tags*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 99:17 (2002) p. 11049-11054.
- [33] F.I. Chou, S.T. Tan, *Manganese(II) Induces Cell-Division and Increases in Superoxide-Dismutase and Catalase Activities in an Aging Deinococcal Culture*. **Journal of Bacteriology**, 172:4 (1990) p. 2029-2035.
- [34] P. Wang, H.E. Schellhorn, *Induction of Resistance to Hydrogen-Peroxide and Radiation in Deinococcus Radiodurans*. **Canadian Journal of Microbiology**, 41:2 (1995) p. 170-176.
- [35] H.M. Hassan, I. Fridovich, *Regulation of the synthesis of catalase and peroxidase in Escherichia coli*. **J Biol Chem**, 253:18 (1978) p. 6445-20.
- [36] F.I. Chou, S.T. Tan, *Manganese(II) induces cell division and increases in superoxide dismutase and catalase activities in an aging deinococcal culture*. **J Bacteriol**, 172:4 (1990) p. 2029-35.
- [37] A. Tanaka, et al., *Changes in cellular proteins of Deinococcus radiodurans following gamma-irradiation*. **Radiation and Environmental Biophysics**, 35:2 (1996) p. 95-99.
- [38] I. Kobayashi, et al., *Characterization of monofunctional catalase KatA from radioresistant bacterium Deinococcus radiodurans*. **J Biosci Bioeng**, 101:4 (2006) p. 315-21.
- [39] M.S. Lipton, et al., *Global analysis of the Deinococcus radiodurans proteome by using accurate mass tags*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 99:17 (2002) p. 11049-54.

- [40] I.A. Abreu, et al., *The kinetic mechanism of manganese-containing superoxide dismutase from Deinococcus radiodurans: a specialized enzyme for the elimination of high superoxide concentrations.* **Biochemistry**, (2008) 47:8 p. 2350-6.
- [41] L.M. Markillie, et al., *Targeted mutagenesis by duplication insertion in the radioresistant bacterium Deinococcus radiodurans: radiation sensitivities of catalase (katA) and superoxide dismutase (sodA) mutants.* **J Bacteriol**, 181:2 (1999) p. 666-9.
- [42] J.K. Fredrickson, et al., *Protein oxidation: key to bacterial desiccation resistance?* **Isme Journal**, (2008) 2:4 p. 393-403.
- [43] B.S. Berlett, et al., *Manganese(II) catalyzes the bicarbonate-dependent oxidation of amino acids by hydrogen peroxide and the amino acid-facilitated dismutation of hydrogen peroxide.* **Proc Natl Acad Sci U S A**, 87:1 (1990) p. 389-93.
- [44] M.J. Daly, et al., *Accumulation of Mn(II) in Deinococcus radiodurans facilitates gamma-radiation resistance.* **Science**, 306:5698 (2004) p. 1025-8.
- [45] J. Sun, et al., *Isolation and identification of a new radiation-resistant bacterium Deinococcus guangriensis sp.nov. and analysis of its radioresistant character.* **Wei Sheng Wu Xue Bao**, 49:7 (2009) p. 918-24.
- [46] Y.M. Zhang, et al., *Induction of a futile Embden-Meyerhof-Parnas pathway in Deinococcus radiodurans by Mn: possible role of the pentose phosphate pathway in cell survival.* **Appl Environ Microbiol**, 66:1 (2000) p. 105-12.
- [47] S. Kota, C.V. Kumar, H.S. Misra, *Characterization of an ATP-regulated DNA-processing enzyme and thermotolerant phosphoesterase in the radioresistant bacterium Deinococcus radiodurans.* **Biochem J**, 431:1 (2010) p. 149-57.
- [48] D.M. Evans, B.E. Moseley, *Identification and initial characterisation of a pyrimidine dimer UV endonuclease (UV endonuclease beta) from Deinococcus radiodurans; a DNA-repair enzyme that requires manganese ions.* **Mutat Res**, 145:3(1985) p. 119-28.
- [49] P. Wang, H.E. Schellhorn, *Induction of resistance to hydrogen peroxide and radiation in Deinococcus radiodurans.* **Can J Microbiol**, 41:2 (1995) p. 170-6.
- [50] H.F. Ji, *Insight into the Strong Antioxidant Activity of Deinoxanthin, a Unique Carotenoid in Deinococcus Radiodurans.* **International Journal of Molecular Sciences**, 11:11 (2010) p. 4506-4510.
- [51] M.M. Cox, J.R. Battista, *Deinococcus radiodurans - The consummate survivor.* **Nature Reviews Microbiology**, 3:11 (2005) p. 882-892.
- [52] B. Hazra, S. Biswas, N. Mandal, *Antioxidant and free radical scavenging activity of Spondias pinnata.* **BMC Complement Altern Med**, 8 (2008) p. 63.
- [53] M. Genestra, *Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants.* **Cell Signal**, 19:9 (2007) p. 1807-19.
- [54] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine.* 4th ed. 2007, Oxford ; New York: **Oxford University Press**. xxxvi, 851 p., 8 p. of plates.
- [55] J.F. Turrens, *Mitochondrial formation of reactive oxygen species.* **Journal of Physiology-London**, 552:2 (2003) p. 335-344.
- [56] P.A. Riley, *Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation.* **Int J Radiat Biol**, 65:1 (1994) p. 27-33.
- [57] E. Cabiscol, J. Tamarit, J. Ros, *Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species.* **Int Microbiol**, 3:1 (2000) p. 3-8.

- [58] J.M. Mates, C. Perez-Gomez, I.N. De Castro, *Antioxidant enzymes and human diseases*. **Clinical Biochemistry**, 32:8 (1999) p. 595-603.
- [59] J.M. Mates, *Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology*. **Toxicology**, 153:1-3 (2000) p. 83-104.
- [60] T. Ak, I. Gulcin, *Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin*. **Chem Biol Interact**, 174:1 (2008) p. 27-37.
- [61] S.I. Liochev, I. Fridovich, *Superoxide and iron: Partners in crime*. **Iubmb Life**, 48:2 (1999) p. 157-161.
- [62] J.S. Beckman, W.H. Koppenol, *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad, and the ugly*. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, 271:5 (1996) p. C1424-C1437.
- [63] E. Novo, et al., *Intracellular redox changes and C-jun N-terminal kinase activation as crucial events in cytokine-induced chemotaxis of human activated hepatic stellate cells*. **Journal of Hepatology**, 48 (2008) p. S184-S184.
- [64] P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liaudet, *Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease*. **Physiol Rev**, 87:1 (2007) p. 315-424.
- [65] L.J. Marnett, *Oxyradicals and DNA damage*. **Carcinogenesis**, (2000) 21:3 p. 361-70.
- [66] M.S. Cooke, et al., *Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease*. **FASEB J**, 17:10 (2003) p. 1195-214.
- [67] M. Dizdaroglu, et al., *Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement*. **Free Radic Biol Med**, 32:11 (2002) p. 1102-15.
- [68] L.J. Marnett, *Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde*. **Mutat Res**, 424:1-2 (1999) p. 83-95.
- [69] I. Pinchuk, E. Schnitzer, and D. Lichtenberg, *Kinetic analysis of copper-induced peroxidation of LDL*. **Biochim Biophys Acta**, 1389:2 (1998) p. 155-72.
- [70] R. Kohen, A. Nyska, *Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification*. **Toxicol Pathol**, 30:6 (2002) p. 620-50.
- [71] K.J. Davies, *Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects*. **J Biol Chem**, 262:20 (1987) p. 9895-901.
- [72] T. Grune, T. Reinheckel, K.J. Davies, *Degradation of oxidized proteins in mammalian cells*. **FASEB J**, 11:7 (1997) p. 526-34.
- [73] E. Rial, R. Zardoya, *Oxidative stress, thermogenesis and evolution of uncoupling proteins*. **J Biol**, 8:6 (2009) p. 58.
- [74] J. Kool, et al., *An on-line post-column detection system for the detection of reactive-oxygen-species-producing compounds and antioxidants in mixtures*. **Anal Bioanal Chem**, 388:4 (2007) p. 871-9.
- [75] B. Nickavar, M. Kamalinejad, H. Izadpanah, *In vitro free radical scavenging activity of five Salvia species*. **Pak J Pharm Sci**, 20:4 (2007) p. 291-4.
- [76] J.K. Willcox, S.L. Ash, G.L. Catignani, *Antioxidants and prevention of chronic disease*. **Crit Rev Food Sci Nutr**, 44:4 (2004) p. 275-95.
- [77] L. R.A., *The antioxidants of higher plants*. **Phytochemistry**, 27 (1988) p. 969-978.
- [78] G.G. Duthie, K.W. Wahle, W.P. James, *Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease*. **Nutr Res Rev**, 2:1 (1989) p. 51-62.
- [79] B. Joseph, et al., *Retinoblastoma: a diagnostic model for India*. **Asian Pac J Cancer Prev**, 7:3 (2006) p. 485-8.

- [80] P. Di Mascio, M.E. Murphy, H. Sies, *Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols*. **Am J Clin Nutr**, 53:1 (1991) p. 194S-200S.
- [81] L. Zhang, et al., *Recent developments and future prospects of Vitreoscilla hemoglobin application in metabolic engineering*. **Biotechnol Adv**, 25:2 (2007) p. 123-36.
- [82] C. Khosla, J.E. Bailey, *The Vitreoscilla hemoglobin gene: molecular cloning, nucleotide sequence and genetic expression in Escherichia coli*. **Mol Gen Genet**, 214:1 (1988) p. 158-61.
- [83] B.C. Stark, K.L. Dikshit, K.R. Pagilla, *Recent advances in understanding the structure, function, and biotechnological usefulness of the hemoglobin from the bacterium Vitreoscilla*. **Biotechnology Letters**, 33:9 (2011) p. 1705-1714.
- [84] S. Wakabayashi, H. Matsubara, D.A. Webster, *Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from Vitreoscilla*. **Nature**, 322:6078 (1986) p. 481-3.
- [85] L. Bulow, et al., *The metabolic effects of native and transgenic hemoglobins on plants*. **Trends Biotechnol**, 17:1 (1999) p. 21-4.
- [86] A.D. Frey, P.T. Kallio, *Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins: versatile proteins and their impact on microbiology and biotechnology*. **Fems Microbiology Reviews**, 27:4 (2003) p. 525-45.
- [87] Y. Orii, D.A. Webster, *Photodissociation of oxygenated cytochrome o(s) (Vitreoscilla) and kinetic studies of reassociation*. **J Biol Chem**, 261:8 (1986) p. 3544-7.
- [88] C.A. Appleby, *The origin and functions of haemoglobins in plants*. **Sci Prog**, 76 (1992) p. 365-398.
- [89] R. Arredondo-Peter, et al., *Rice hemoglobins. Gene cloning, analysis, and O<sub>2</sub>-binding kinetics of a recombinant protein synthesized in Escherichia coli*. **Plant Physiol**, 115:3 (1997) p. 1259-66.
- [90] B. Trevaskis, et al., *Two hemoglobin genes in Arabidopsis thaliana: the evolutionary origins of leghemoglobins*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 94:22 (1997) p. 12230-4.
- [91] P.R. Gardner, et al., *Nitric-oxide dioxygenase activity and function of flavohemoglobins. sensitivity to nitric oxide and carbon monoxide inhibition*. **J Biol Chem**, 275:41 (2000) p. 31581-7.
- [92] P.T. Kallio, et al., *Intracellular expression of Vitreoscilla hemoglobin alters Escherichia coli energy metabolism under oxygen-limited conditions*. **Eur J Biochem**, 219:1-2 (1994) p. 201-8.
- [93] P.S. Tsai, M. Nageli, J.E. Bailey, *Intracellular expression of Vitreoscilla hemoglobin modifies microaerobic Escherichia coli metabolism through elevated concentration and specific activity of cytochrome o*. **Biotechnol Bioeng**, 79:5 (2002) p. 558-67.
- [94] V. Roos, et al., *Expression of double Vitreoscilla hemoglobin enhances growth and alters ribosome and tRNA levels in Escherichia coli*. **Biotechnol Prog**, 18:3 (2002) p. 652-6.
- [95] M. Nilsson, et al., *Expression of Vitreoscilla hemoglobin in Escherichia coli enhances ribosome and tRNA levels: a flow field-flow fractionation study*. **Biotechnol Prog**, 15:2 (1999) p. 158-63.
- [96] R. Kaur, et al., *Chimeric Vitreoscilla hemoglobin (VHb) carrying a flavoreductase domain relieves nitrosative stress in Escherichia coli: new insight into the functional role of VHb*. **Appl Environ Microbiol**, 68:1 (2002) p. 152-60.

- [97] H. Yu, et al., *Oxygen-dependent regulation of the respiration and growth of Escherichia coli by nitric oxide*. **FEBS Lett**, 409:2 (1997) p. 161-5.
- [98] C. Meng, et al., *[Cloning and expression of Vitreoscilla hemoglobin in Streptomyces aureofaciens]*. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, 42:3 (2002) p. 305-10.
- [99] P. Brunker, et al., *Genetic engineering of an industrial strain of Saccharopolyspora erythraea for stable expression of the Vitreoscilla haemoglobin gene (vhb)*. **Microbiology**, 144 ( Pt 9) (1998) p. 2441-8.
- [100] J.A. Demodena, et al., *The Production of Cephalosporin-C by Acremonium-Chrysogenum Is Improved by the Intracellular Expression of a Bacterial Hemoglobin*. **Bio-Technology**, 11:8 (1993) p. 926-929.
- [101] Y. Wen, Y. Song, J.L. Li, *[The effects of Vitreoscilla hemoglobin expression on growth and antibiotic production in Streptomyces cinnamonensis]*. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, 17:1 (2001) p. 24-8.
- [102] S. Kota, H.S. Misra, *PprA: A protein implicated in radioresistance of Deinococcus radiodurans stimulates catalase activity in Escherichia coli*. **Appl Microbiol Biotechnol**, 72:4 (2006) p. 790-6.
- [103] S. Chang, et al., *Disruption of manganese ions [Mn(II)] transporter genes DR1709 or DR2523 in extremely radio-resistant bacterium Deinococcus radiodurans*. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, 49:4 (2009) p. 438-44.
- [104] H. Brim, et al., *Engineering Deinococcus radiodurans for metal remediation in radioactive mixed waste environments*. **Nature Biotechnology**, 18:1 (2000) p. 85-90.
- [105] C.C. Lange, et al., *Engineering a recombinant Deinococcus radiodurans for organopollutant degradation in radioactive mixed waste environments*. **Nature Biotechnology**, 16:10 (1998) p. 929-933.
- [106] H. Sun, et al., *Identification and evaluation of the role of the manganese efflux protein in Deinococcus radiodurans*. **BMC Microbiol**, 10 (2010) p. 319.
- [107] H.Y. Shu, B.M. Tian, *Function analysis of two Mn(II) ion transporter genes (DR1709 and DR2523) in Deinococcus radiodurans*. **African Journal of Biotechnology**, 9:19 (2010) p. 2742-2747.
- [108] H.M. Joshi, R.S. Toleti, *Nutrition induced pleomorphism and budding mode of reproduction in Deinococcus radiodurans*. **BMC Res Notes**, 2 (2009) p. 123.
- [109] M.J. Daly, O. Ling, K.W. Minton, *Interplasmidic recombination following irradiation of the radioresistant bacterium Deinococcus radiodurans*. **J Bacteriol**, 176:24 (1994) p. 7506-15.
- [110] M.J. Daly, et al., *In vivo damage and recA-dependent repair of plasmid and chromosomal DNA in the radiation-resistant bacterium Deinococcus radiodurans*. **J Bacteriol**, 176:12 (1994) p. 3508-17.
- [111] G. Gao, et al., *Expression of Deinococcus radiodurans PprI enhances the radioresistance of Escherichia coli*. **DNA Repair (Amst)**, 2:12 (2003) p. 1419-27.
- [112] A.G. Kurt, et al., *Production of L-DOPA and dopamine in recombinant bacteria bearing the Vitreoscilla hemoglobin gene*. **Biotechnol J**, 4:7 (2009) p. 1077-88.
- [113] F.M. Ausubel, et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, 2005. **John Wiley & Sons, Inc.**
- [114] K.A. Armstrong, *Molecular-Cloning - A Laboratory Manual - Maniatis,T, Fritsch,Ef, Sambrook,J*. **Quarterly Review of Biology**, 58:2 (1983) p. 234-234.
- [115] H. Geçkil, *Effect of bacterial hemoglobin on microorganisms and butanediol production by Enterobacter aerogenes*. **Doktora tezi**, 1995.

- [116] H. Luck, *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie, Academic Press., New York, USA. , (1963) p. 885-888.
- [117] J.M. McCord, I. Fridovich, *Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein)*. **J Biol Chem**, 244:22 (1969) p. 6049-55.
- [118] T.P. Akerboom, H. Sies, *Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples*. **Methods Enzymol**, 77 (1981) p. 373-82.
- [119] B. M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. **Anal. Biochem**, 72:7 (1976) p. 248-254.
- [120] G.N. Qazi, N. Sharma, R. Parshad, *Role of Dissolved-Oxygen as a Regulator for the Direct Oxidation of Glucose by Erwinia-Herbicola and Gluconobacter-Oxydans*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 76:4 (1993) p. 336-339.
- [121] S.C. Liu, D.A. Webster, B.C. Stark, *Cloning and expression of the Vitreoscilla hemoglobin gene in pseudomonads: Effects on cell growth*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 44:3-4 (1995) p. 419-424.
- [122] R.Z. Chen, J.E. Bailey, *Energetic Effect of Vitreoscilla Hemoglobin Expression in Escherichia-Coli - an Online P-31 Nmr and Saturation-Transfer Study*. **Biotechnology Progress**, 10:4 (1994) p. 360-364.
- [123] S.D. Jun, et al., *Effect of N<sup>+</sup> Beam Exposure on Superoxide Dismutase and Catalase Activities and Induction of Mn-SOD in Deinococcus radiodurans*. **Plasma Sci. Technol**, 5:2 (2000) p. 491-497.
- [124] E. Özbey, *Radyasyona Dirençli Deinococcus radiodurans ile Escherichia coli'de Radyasyonun Antioksidan Sistem Üzerine Etkisinin Araştırılması*. **Yüksek Lisans Tezi**, 2009.
- [125] S.O. Erenler, et al., *Cloning and expression of the Vitreoscilla hemoglobin gene in Enterobacter aerogenes: Effect on cell growth and oxygen uptake*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 40:3 (2004) p. 241-248.
- [126] J.Y. Juan, S.N. Keeney, E.M. Gregory, *Reconstitution of the Deinococcus radiodurans apossuperoxide dismutase*. **Arch Biochem Biophys**, 286:1 (1991) p. 257-63.
- [127] G.V. Smirnova, O.N. Oktyabrsky, *Glutathione in bacteria*. **Biochemistry (Mosc)**, 70:11 (2005) p. 1199-211.
- [128] D. Ghosal, et al., *How radiation kills cells: survival of Deinococcus radiodurans and Shewanella oneidensis under oxidative stress*. **Fems Microbiology Reviews**, 29:2 (2005) p. 361-75.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : Özgür YILMAZ

**Doğum Yeri ve Tarihi** : MALATYA – 07.09.1979

## EĞİTİM DURUMU

**İlkokul** : Kemal Özalper İlköğretim Okulu, (Malatya, 1986-1991)

**Ortaokul** : Atatürk Ortaokulu, (Malatya, 1991-1994)

**Lise** : Malatya Lisesi, (Malatya, 1994-1997)

**Lisans** : İstanbul Üniversitesi, (İstanbul, 1999-2005)

**Yüksek Lisans** : İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji  
Anabilim Dalı, (Malatya, 2010-2012)

## BİLİMSEL FAALİYETLER

1. OPTOGENETİK (Seminer, 2012)
2. Hikmet Geçkil, Aslı Giray Kurt, Emel Aytan, **Özgür Yılmaz**. “Moleküler Yaşam Bilimlerinde PhD. Derecesi İçin Standartlar” 29-30 Mart 2012, İzmir