

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN *Deinococcus radiodurans*'DAN
KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE BİYOKİMYASAL
KARAKTERİZASYONU**

Ayşe Hümevra TAŞKIN KAFA

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2016**

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Ayşe Hümeýra TAŞKIN KAFA tarafından “**Karbonik Anhidraz Enziminin *Deinococcus radiodurans*'dan klonlanması, ekspresyonu ve biyokimyasal karakterizasyonu**” adlı tez çalışması **20/12/2016** tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN
Ankara Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalı

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ
Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi Rektör Yardımcısı

Üye : Doç. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Belma ASLIM
Gazi Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ
Gazi Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. İbrahim DEMİR
Enstitü Müdürü V.

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

20.12.2016

Ayşe Hümeysra TAŞKIN KAFA

ÖZET

Doktora Tezi

KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN *Deinococcus radiodurans* 'DAN KLONLANMASI,
EKSPRESYONU VE BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

Ayşe Hümeysra TAŞKIN KAFA

Ankara Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN

Radyasyonun insanlar üzerine zararlı etkileri olmasına rağmen, yüksek seviyedeki iyonize radyasyon varlığında hayatta kalabilen, ekstremofil bakterilerden biri olarak bilinen *Deinococcus radiodurans*, kuruluk, oksidanlar, Ultra Viole Radyasyon (UVR) gibi aşırı strese olağanüstü karşı koyma yeteneğindedir. Bu çalışma kapsamında, *D.radiodurans* R1 'in direnç fizyolojisinde önemli olduğunu düşündüğümüz hücre içi DrCA enziminin klonlanması, saflaştırılması ve kısmi karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca bakterinin çeşitli dozlarda gama radyasyon uygulaması ve farklı pH değerlerine sahip TGYB besiyerlerinde geliştirilmesi sonucunda radyasyon ve pH ile ilişkili DrCA enzim aktivitelerindeki değişimler belirlenmiştir. Bakterinin en iyi gelişim gösterdiği pH aralığı 6.75-7.75 olarak belirlenmiş ve 24 saat süresince DrCA enziminin en yüksek aktivite değişiminin olduğu pH değeri 7.0 olarak bulunmuştur. Radyasyon uygulaması sonrası DrCA aktivite sonuçlarında, ilk 800 Gy'a kadar aktivitenin 5.4 kat olacak şekilde sürekli arttığı, bu noktadan sonra aktivitede bir düşüş görüldüğü tespit edilmiştir. PCR ile çoğaltılan DrCA geni, pFN2K Flexi vektörüne klonlanmış ve sonuçlar dizi analizi ile de teyit edilmiştir. Sub-klonlama çalışmaları için *E. coli* DH5 α ve protein ekspresyonu için ise *E. coli* BL21 (DE3) konakları kullanılmıştır. Saflaştırma aşamasında MagneGST saflaştırma sistemi kullanılmış ve enzim %94.68 oranında yüksek bir verim ve 494.5 saflaştırma kat sayısı ile saflaştırılabilmektedir. Ayrıca rekombinant *E.coli* BL21 konağında enzimin spesifik hidrataz aktivitesi 0.109 U/mg iken, saf enzimin spesifik aktivitesi 5 kat artarak 0.539 U/mg olarak belirlenmiştir. Enzimin pH 9.0'de optimum aktivite ve termostabilite gösterdiği sıcaklık 30°C olarak bulunmuştur. Enzimin pH 8.0'de, 25°C'de en yüksek hidrataz aktivitesi gösterdiği saptanmıştır. Saf enzimin esteraz aktivitesi ise eser miktarda (0.0002 U/ml) bulunmuştur. Saf enzim üzerinde metal iyonlarından Zn⁺² aktivatör, sülfonamid ise inhibitör etki göstermiştir. Saf enzimin pNP-asetat substrata afinitesinin çok düşük olduğu ve diğer β -DrCA'lar gibi CO₂'e yüksek spesifite gösterdiği belirlenmiştir.

Aralık 2016, 128 Sayfa

Anahtar Kelimeler: *D.radiodurans*, DrCA enzimi, radyasyon direnci

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF CARBONIC ANHYDRASE FROM RADIORESISTANT BACTERIUM *DEINOCOCCUS RADIODURANS*

Ayşe Hümeyra TAŞKIN KAFA

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN

Although the radiation has harmful effects on humans, *Deinococcus radiodurans*, known as one of the extremophile bacteria which is capable of surviving at high levels of ionizing radiation, has the ability to resist extreme stresses such as dryness, oxidants, Ultra-Violet Radiation (UVR). In this study, cloning, purification and partial characterization studies of the intracellular DrCA enzyme, which we considered that important in the resistance physiology of *D. radiodurans* R1, have been conducted. In addition, changes in radiation and pH-related DrCA enzyme activities as a result of gamma irradiation at various doses, and development of the bacterium in TGYB media with different pH values have been identified. The pH range at which the bacteria showed the best improvement was 6.75-7.75 and the pH value at which the highest activity change of DrCA enzyme was found to be 7.0 for 24 hours. DrCA activity data after radiation treatment showed that the activity continuously increased by 5.4 fold, up to the first 800 Gy, which a decrease in activity was observed thereafter. The PCR-amplified DrCA gene was cloned into the pFN2K Flexi vector and the results confirmed by sequence analysis. For gene subcloning studies *E. coli* DH5 α and for protein expression *E. coli* BL21 (DE3) was used as the host. The MagneGST purification system was used during the purification step and the enzyme was purified with a yield of 94.68% and a purification index of 494.5. Also, the specific hydratase activity of the enzyme in the recombinant *E. coli* BL21 was 0.109 U/mg, while the specific activity of the pure enzyme was found to be 0.539 U/mg with a 5-fold increase. The temperature at which the enzyme exhibits optimum activity and thermostability at pH 9.0 was found to be 30°C. The esterase activity of the pure enzyme was found in trace amounts (0.0002 U/ml). It has been found that the enzyme exhibited high activity at 25°C and pH 8.0 Among the divalent metal ions, Zn⁺² showed activatory and sulfonamide showed inhibitory effect on the pure enzyme. It has been determined that the affinity of the pure enzyme to the pNP-acetate was very low and exhibited high specificity to CO₂ as other β -DrCAs.

December 2016, 128 pages

Key Words: *D. radiodurans*, DrCA enzyme, ionizing radiation resistance

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince bana bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, her türlü yardımını ve desteğini esirgemeyen, değerli hocam, tez danışmanım, Sayın Doç. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN'a, (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı) bu çalışmanın yürütülmesinde bütün laboratuvar imkanlarından faydalanmamı sağlayan ve desteğini esirgemeyen değerli hocam, eş danışmanım, Sayın Doç Dr. Murat ÇANKAYA'ya (Erzincan Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı) sonsuz teşekkür ederim.

Laboratuvar ve teorik çalışmalarımın her anında yardımını ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, değerli arkadaşım Arş. Gör. Dr. Mehmet KUZUCU'ya, bilgi ve tecrübeleriyle bu çalışmaya destek olan canım dostum Arş Gör. Ayşenur Eminoğlu'na ve laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen yüksek lisans öğrencileri Uğur Durmuş ve Oğuzhan Bayrak'a ve bütün laboratuvar çalışanlarına teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca her konuda güç aldığım, her başarımda imzası olan, yanlarında olmasam da sevgi ve destekleriyle beni bir an bile yalnız bırakmayan, fedakarlıklarıyla beni bu güne getiren canım anneme, babama ve kardeşime;

Ayrıca bana inanan ve her zaman yanımda olan ve tüm zorlukları aşmamda beni yüreklendiren sabırlı ve merhametli sevgili eşim Haydar KAFA'ya, bu zor günlerde benim tek neşe ve motivasyon kaynağım, biricik meleğim, oğlum Yusuf Tunahan KAFA'ya sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Son olarak doktora eğitimim süresince, 2211-A Genel Yurtiçi Doktora Burs Programı kapsamında verdiği destekten dolayı TÜBİTAK'a ve FEN-A-080715-0153 No'lu proje ile bu araştırmayı destekleyen Erzincan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne; sonsuz teşekkür ederim.

Ayşe Hümeysra TAŞKIN KAFA
Ankara, Aralık 2016

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	5
2.1 Ekstrem Yaşam; Ekstremofiller	5
2.2 Radyasyon ve Radyasyon Direnci	6
2.3 <i>Deinococcus radiodurans</i> 'ın Genel Özellikleri.....	7
2.4 <i>Deinococcus</i> Cinsi Bakterilerin Habitatları.....	9
2.5 Sistematikteki Yeri ve Filogenisi	9
2.6 Fiziksel Özellikleri.....	12
2.7 Metabolizma	14
2.8 Genom Organizasyonu	16
2.9 Ekstrem Radyasyon Direnci	17
2.10 İyonize Radyasyona Karşı Direnç Stratejileri.....	18
2.10.1 Dirence pasif olarak katkı sağlayan bileşenler	18
2.10.1.1 Genom kopya sayısı.....	18
2.10.1.2 Nükleoid organizasyonu	19
2.10.1.3 Mangan miktarı.....	19
2.10.2 Dirençte aktif rol oynayan bileşenler	20
2.10.2.1 Enzimler	20
2.10.2.2 DNA'nın uç kısmının korunması	20
2.10.2.3 RecA bağımsız çift zincir kırık onarımı	21
2.10.2.4 Rekombinasyonel DNA onarımı	22
2.11 Karbonik Anhidraz (CA)	23
2.11.1 CA ailesinin sınıflandırılması.....	25

2.11.1.1 α -CA	25
2.11.1.2 β - CA.....	28
2.11.1.2.1 β -CA famesına dahil enzimlerin karakterizasyonlarında kullanılan temel analizler.....	29
2.11.1.3 γ -CA.....	31
2.11.2 Prokaryotik CA	32
2.12 Hücre İçi pH Homeostasisi.....	34
2.13 pH Homeostazis Mekanizmaları ve CA'nın Rolü	37
2.14 Prokaryotik Hücrelerin Karbonik Anhidraz Enziminin Klonlama ve Saflaştırma alışmaları.....	40
2.15. <i>D. radiodurans</i> R1'in tüm genom dizilemesi sonrası genomik çalışmalarla tespit edilen hipotetik karbonik anhidraz geni	41
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	43
3.1 Materyal.....	43
3.1.1. Mikroorganizmalar.....	43
3.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	43
3.1.3 Sıvı ve Katı Besiyerleri	44
3.1.4 Primerler	45
3.1.5 Plazmid Vektörü	46
3.1.6 Kullanılan zelti ve tamponların hazırlanışları.....	46
3.1.6.1 Agaroz jel elektroforezi	46
3.1.6.2 Lizis tamponları	47
3.1.6.2.1 DrCA gDNA saflaştırması sırasında kullanılan lizis tamponu.....	47
3.1.6.2.2 Hücrelerin homojenizasyonu için kullanılan lizis tamponu.....	47
3.1.6.3 Esteraz aktivitesi tayininde kullanılan tampon ve zeltiler	47
3.1.6.4 Hidrataz aktivitesi tayininde kullanılan tampon ve zeltiler	48
3.1.6.5 Transformasyon için kompetent hücre hazırlama çözeltileri	48
3.1.6.6 Lowry protein tayininde kullanılan tampon ve zeltiler	48
3.1.6.7 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezinde (SDS-PAGE) kullanılan tampon ve zeltiler	49
3.1.6.8 Rekombinant proteinin saflaştırma aşamasında kullanılan çözelti ve tamponlar.....	50
3.1.6.9 Stok İnhibitör zeltileri.....	50

3.1.6.10 Diğer çözeltiler.....	51
3.2 Metod.....	51
3.2.1 Primer tasarımı ve biyoinformatik çalışmalar	51
3.2.2 <i>D. radiodurans</i> R1 suşunun geliştirilmesi.....	52
3.2.3 Karbonik anhidraz aktivite tayin metodları	52
3.2.3.1 CO ₂ -hidrataz aktivitesi	53
3.2.3.2 Esteraz aktivitesi	54
3.2.4 <i>D. radiodurans</i> R1 gelişim eğrisinin ve karbonik anhidraz aktivite eğrisinin oluşturulması	55
3.2.5 <i>D. radiodurans</i> 'a radyasyon uygulanması ve sonrasında CA aktivitesi ölçümü	56
3.2.6 Farklı pH değerine sahip TGYB besiyerlerinde DrCA aktivitesinin belirlenmesi	57
3.2.7 <i>D. radiodurans</i> R1'in genomik DNA'sının saflaştırılması	58
3.2.8 PCR ile gen izolasyonu.....	58
3.2.9 DNA konsantrasyonunun ve saflığının ölçülmesi	60
3.2.10 Agaroz jel elektroforezi	60
3.2.11 DrCA geninin pFN2K ekspresyon vektörüne klonlanması.....	61
3.2.12 Transformasyon için kompetent hücre hazırlanması.....	62
3.2.12.1 Elektrokompotent hücre hazırlanması.....	62
3.2.12.2 Kimyasal kompetent hücre hazırlanması	63
3.2.13 Klonlama amacıyla DrCA geninin <i>E. coli</i> DH5α konağına transformasyonu.....	64
3.2.13.1 Elektroporasyon	64
3.2.13.2 Kimyasal transformasyon	64
3.2.14 Plazmid DNA izolasyonu	65
3.2.15 <i>E. coli</i> DH5α'dan izole edilen plazmid DNA'nın kesimi ve kontrolü.....	65
3.2.16 Dizi analizi	65
3.2.17 Ekspresyon amacıyla <i>E. coli</i> DH5α'dan izole edilen plazmid DNA'nın <i>E. coli</i> BL21 (DE3)'e transformasyonu	66
3.2.18 Rekombinant protein ekspresyonu.....	66
3.2.18.1 IPTG kullanılarak drCA geninin indüklenmesi.....	66

3.2.18.2 Magic Media <i>E. coli</i> ekspresyon besiyeri kullanılarak drCA geninin ifadesi	67
3.2.19 DrCA enziminin spesifik aktivitesinin belirlenmesi.....	67
3.2.20 IPTG ile indüksiyon sonrası alınan örneklerin SDS-PAGE analizi	68
3.2.21 Rekombinant proteinin saflaştırılması.....	69
3.2.21.1 Magne GST Protein Saflaştırma Sistemi ile rekombinant proteinin saflaştırılması.....	69
3.2.21.1.1 Hücre lizisi	69
3.2.21.1.2 Partikül dengeleme.....	70
3.2.21.1.3 Bağlanma	71
3.2.21.1.4 Yıkama	71
3.2.21.1.5 Proteinin elüsyonu.....	71
3.2.21.2 GST-tag'ın Pro-Tev Proteaz ile füzyon proteininden ayrılması.....	72
3.2.22 Saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin optimum pH, optimum sıcaklık ve termostabilite isteğinin belirlenmesi	73
3.2.23 Bazı metal iyonlarının ve Sülfonamid'in saf DrCA üzerine etkisi	74
4. BULGULAR	75
4.1 <i>D. radiodurans</i> R1 Gelişim Eğrisi ve DrCA Enzim Üretimi Arasındaki İlişkiye Dair Sonuçlar	75
4.2 <i>D. radiodurans</i> 'a Radyasyon Uygulaması Sonrasında Ölçülen CA Aktivite Miktarları	78
4.3 Farklı pH Değerine Sahip TGYB Besiyerlerinde DrCA Aktivitesi Sonuçları.....	79
4.4 Primer Tasarımı ve Biyoinformatik Çalışma Sonuçları	81
4.5 PCR ile Gen İzolasyonu	1
4.6 DrCA geninin pFN2K (GST) Flexi Vektörüne Klonlanması.....	84
4.7 Dizi Analizi.....	86
4.8 <i>E. coli</i> DH5 α 'dan İzole Edilen Plazmidin <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Konağına Aktarımı.....	87
4.9 Rekombinant DrCA Enziminin Spesifik Hidrataz Aktivitesinin Belirlenmesi	88
4.10 Rekombinant Proteinin DrCA Enziminin Analizi	90
4.10.1 MagneGST ile rekombinant proteinin saflaştırılması.....	90

4.10.2 GST-tag Pro-Tev Proteaz ile DrCA'nın füzyon proteininden ayrılması	91
4.10.3 İntraselüler rekombinant DrCA enziminin saflaştırılma çalışmasına ait sonuçlar	93
4.10.4 Saflaştırılan DrCA enziminin hidrataz aktivitesinin optimum pH, optimum sıcaklık ve termostabilite değerlerinin belirlenmesi	93
4.11. Bazı metal iyonlarının ve Sülfonamid'in saf DrCA üzerine etkisi	96
4.12 Klonlama ve Saflaştırmanın <i>D. radiodurans</i> R1'deki DrCA Aktivitesi ile Kıyaslanması	98
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	101
KAYNAKLAR.....	109
EK 1	124
ÖZGEÇMİŞ.....	127

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
S	Standart Sapma
td	İkikatına çıkma süresi
M	Molarite
μ	Mikro
β	Beta
α	Alfa
Δ	Delta
m	Mili
γ	Gama
δ	Sigma
Tm	Erime sıcaklığı
V	Volt
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
Da	Dalton
bp	Baz çifti
Gy	Gray
pH	H ⁺ iyon konsantrasyonunun eksi logaritması
nm	Nanometre
n	Örnek sayısı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu)'de <i>D. radiodurans</i> R1 tetrat hücre yapısına ait tez kapsamında görüntülenen bir fotomikrografi	8
Şekil 2.2 2016 itibariyle <i>Deinococcus</i> cinsine dahil 16S rRNA analizleri yapılmış türlerin filogenetik diyagramı	11
Şekil 2.3 <i>D. radiodurans</i> 'ın hücre duvar yapısının kısımları	13
Şekil 2.4 Kırmızı pigmentli <i>D. radiodurans</i> hücresinin, halkasal genom morfolojisinin görünümü	17
Şekil 2.5 <i>D. radiodurans</i> 'da ESDSA ve Rec A aracılı çift zincir kırığının onarımının şematik görünümü	22
Şekil 2.6 CA enziminin substratları CO ₂ ve ester hidrolizinin şematik görünümü	24
Şekil 2.7 hCAII izoenziminin aktif bölgesi ve reaktif bölgeleri	27
Şekil 2.8 α CA'nın CO ₂ hidrasyon mekanizması	27
Şekil 2.9 H ₂ CO ₃ , HCO ₃ ⁻ ve CO ₃ ⁻² 'in pH'da dağılımı	30
Şekil 2.10 <i>H. pylori</i> 'de pH homeostasisini sağlamada görevli olan CA enzimleri ve üreazın ilişkisi	39
Şekil 2.11 <i>D. radiodurans</i> R1 DR-2238 (NC_001263.1) karbonik anhidraz geninin beta_CA ailesinin olası C kladına dahil olduğunu gösteren kladogram	42
Şekil 2.12 Tez çalışması kapsamında <i>D. radiodurans</i> R1'den klonlanan beta-DrCA enziminin olası üç boyutlu yapıları	42
Şekil 3.1 PFN2K (GST) Flexi Vektörün Genetik Haritası ve Nükleotid Dizi içeriği	46
Şekil 3.1 Hidrataz aktivitesinde, CO ₂ hidrasyonu sırasında reaksiyon tüplerindeki a) reaksiyon öncesi, b) reaksiyon sonrası görünüm.	54
Şekil 3.2 CA'nın <i>p</i> -nitroferol substratının kullanıldığı esteraz aktivitesi mekanizması	55
Şekil 3.3 <i>D. radiodurans</i> R1'e radyasyon uygulaması deney şeması	57
Şekil 3.4 MagneGST Protein Saflaştırma kitindeki manyetik partiküller ile protein saflaştırma basamakları	70

Şekil 3.5 GST-tag içeren füzyon proteininin saflaştırılması sırasında gerçekleşen olayların şematik görünümü	72
Şekil 3.6 Rekombinant proteini, tag kısmına bağlayan 7 amino asitlik dizisi ve bu füzyon proteinde TEV proteazın etki ettiği yer gösterilmektedir.	72
Şekil 4.1 <i>D. radiodurans</i> R1'in 15. Saatlik gelişimindeki seyreltme plaka ile koloni sayımında kullanılan petri görüntüleri	75
Şekil 4.2 TGY broth besiyerine ekilen <i>D. radiodurans</i> 'ın sırasıyla 0. ve 72. saatlerde elde edilen sıvı kültürleri	76
Şekil 4.3 <i>D. radiodurans</i> R1'in zamana bağlı seyreltme plaka ve bulanıklık ölçümü ile oluşturulmuş gelişme eğrisi grafiği.	77
Şekil 4.4 <i>D. radiodurans</i> R1'in zamana bağlı olarak (pH 9.0, 25°C) ölçülen intraselüler aktivitesi.....	78
Şekil 4.5 <i>D. radiodurans</i> hücrelerine uygulanan radyasyon dozuna (Gy) bağlı olarak (pH 9.0, 25°C) ürettiği DrCA hidrataz aktivite grafiği.....	79
Şekil 4.7 Tasarlanan ileri ve geri primerlerin <i>D. radiodurans</i> R1 genomundaki olası bağlanma bölgelerinin belirlenmesi için yapılan BLAST'daki tarama sonucu	1
Şekil 4.8 <i>Pfu</i> (A) ve <i>Taq</i> (B) DNA Polimeraz ile yapılan Gradient PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	83
Şekil 4.9 Vektörün kesim ve ligasyon kontrolü sonrası agaroz jel görüntüsü.....	84
Şekil 4.10 <i>E. coli</i> DH5 α klonlarının sırasıyla LBA'da ve LB'de görünümü.....	85
Şekil 4.11 <i>E. coli</i> DH5 α 'dan izole edilen plazmid DNA'nın restriksiyon kesim sonrası jel görüntüsü	86
Şekil 4.12 DNA dizi analizi sonucu elde edilen dizinin sırasıyla a) ileri ve b) geri primerlerle okunması sonrası <i>D. radiodurans</i> R1 genomu ile yapılan karşılaştırmalı NCBI BLAST tarama sonucu	87
Şekil 4.13 <i>E. coli</i> BL21 (DE3) klonlarının LBA'daki görüntüsü	88
Şekil 4.14 pFN2K: DrCA Ekspresyonunun Optimizasyonu için farklı sıcaklık ve IPTG konsantrasyonlarında (pH 9, 25°C) ölçülen DrCA hidrataz aktivitesi değerleri	89
Şekil 4.15 IPTG indüksiyonu sonrası numunelerin SDS-PAGE görüntüsü.	90

Şekil 4.16 Magic besiyeri kullanılarak 30°C’de 18 saat geliştirilen rekombinant <i>E. coli</i> BL21 (DE3)’e ait DrCA’nın saflaştırılması sırasında elde edilen örneklerin SDS-PAGE görüntüsü.....	91
Şekil 4.17 GST-tag füzyon proteini ve GST-kuyruğun Pro-TEV proteaz ile kesimini takiben yapılan MagneGST saflaştırması sonucu elde edilen saf DrCA proteininin SDS-PAGE görüntüsü.	92
Şekil 4.18 Rekombinant DrCA enziminin farklı pHdeğerlerinde gösterdiği hidrataz aktivitesi grafiği.....	95
Şekil 4.19 Rekombinant DrCA enziminin farklı sıcaklık değerlerinde (pH 9.0, 25°C) gösterdiği hidrataz aktivitesi grafiği	95
Şekil 4.20 Rekombinant DrCA enziminin (pH 9.0, 25°C) farklı sıcaklık değerlerinde termostabilitesini gösteren hidrataz aktivitesi grafiği	96
Şekil 4.21 Sülfonamidin DrCA enzimi üzerindeki inhibitör etkisi.....	97
Şekil 4.22 Zn ⁺² İyonunun DrCA enzimi üzerindeki etkisi.....	97
Şekil 4.24 Mn ⁺² iyonunun DrCA enzimi üzerindeki etkisi.....	98
Şekil 4.25 Ca ⁺² iyonunun DrCA enzimi üzerindeki etkisi.....	98
Şekil 4.26 DrCA’nın http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER adresinden olası üç boyutlu yapısı.....	100

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Ekstreofillerin yaşadıkları ekstrem koşullar ve sınıflandırmaları.....	6
Çizelge 2.2 <i>Deinococcus</i> cinsine dahil türler.....	10
Çizelge 2.3 NCBI veri tabanında bulunan kayıtlarına göre <i>Deinococcus</i> cinsine dahil türler.....	10
Çizelge 2.4 Yüksek omurgalılarda α -CA izoenzimlerinin hücre içi yerleşimleri, hidrataz Aktiviteleri ve Sulfonamid inhibisyonları	26
Çizelge 2.5 Patojenik bakterilerden klonlanan ve şimdiye kadar karakterize edilen CA'ların inhibisyon çalışmaları	31
Çizelge 3.1 Kullanılan Bakteri Konakları.....	43
Çizelge 3.2 Kullanılan Cihazlar	44
Çizelge 3.3 Kullanılan Primerler	46
Çizelge 3.4 SDS-PAGE'de Kullanılan Jellerin Hazırlanışı.....	49
Çizelge 3.1 DrCA geninin <i>Pfu</i> DNA polimeraz ile PCR reaksiyon karışımı protokolü.....	59
Çizelge 3.2 DrCA geninin <i>Taq</i> DNA polimeraz ile PCR reaksiyon karışımı protokolü.....	59
Çizelge 3.3 <i>Pfu</i> DNA polimeraz ile uygulanan PCR programı	59
Çizelge 3.4 <i>Taq</i> DNA polimeraz ile uygulanan PCR programı.....	60
Çizelge 3.5 Ligasyon Kontrol Protokolü	61
Çizelge 3.6 Vektör Kesim Protokolü	62
Çizelge 3.7 PCR ürünü Kesim Protokolü	62
Çizelge 3.8 Ligasyon Protokolü.....	62
Çizelge 3.9 SgfI ve PmeI ile Klonları Tarama Protokolü	65
Çizelge 3.10 Uygulanan farklı sıcaklıklar ve IPTG konsantrasyonları.....	68
Çizelge 3.11 ProTEV Plus Füzyon Proteini-Tag Koparma Protokolü	73
Çizelge 3.12 Kullanılan metal iyonlarının ve sulfanamidin çözelti konsantrasyonları	74
Çizelge 4.1 <i>D. radiodurans</i> 'a ait OD ₆₀₀ nm'deki absorbans değerleri, koloni sayımı ve DrCA hidrataz aktivitesi sonuçları.....	76

Çizelge 4.2 <i>D. radiodurans</i> R1'in farklı pH'lardaki gelişimine ait bulanıklık ölçümü ile DrCA hidrataz aktivitesi değerleri	80
Çizelge 4.3 Sıcaklık ve IPTG konsantrasyonlarına bağlı olarak ölçülen pFN2K: DrCA'nın Spesifik hidretaz enziminin Aktivite Sonuçları	89
Çizelge 4.4 DrCA enziminin saflaştırma basamakları	93

1. GİRİŞ

Dünyanın oluşumuyla birlikte açığa çıkan ve çok uzun yıllar yok olmadan kalan radyoaktif elementler yeryüzünde doğal bir radyasyon düzeyi oluşturmuştur. Tüm canlılar yaşamları boyunca devamlı olarak bu doğal ve nükleer bomba denemeleri, nükleer reaktörlerin geliştirilmesi ve bazı teknolojik ürünlerin kullanımının yol açtığı yapay radyasyon kaynaklarından köken alan iyonlaştırıcı radyasyonun etkisi altına girmiştir. Bu nedenle söz konusu radyasyon kaynakları ile canlı sistemler arasındaki etkileşimlerin araştırılması büyük önem taşımaktadır.

Ozon tabakasında devam eden azalma biyosferdeki Ultra Viyole Radyasyon (UVR) miktarını büyük oranda etkilemektedir. Buna ek olarak radyasyon farklı amaçlara hizmet etmek üzere daha yoğun kullanılmaktadır. Tıpta, tarımda, araştırma ve sanayide radyoaktif elementlerin aşırı kullanımı, çevreye radyoaktif atıklar üretmektedir. 2011’de Fukushima Daiichi nükleer felaketi ve 1986 yılında Çernobil felaketi doğada radyonüklitlerin (kararsız atom çekirdeği) ve radyoizotopların artmasına neden olmuştur (Kaya 2002, McColl vd. 2015).

Ekstremofilik canlılar, mikroorganizmaları, bitkileri ve ekstrem koşullarda yaşayabilen hayvanları içine alır. Ekstremofiller, insan hayatı için ekstrem olarak nitelendirilebilecek, sıcak su kaynakları, volkanik alanlar, ekstrem sıcaklıklar, yüksek tuz yoğunluğu, yüksek radyasyon, asidik ve alkali alanlar gibi koşulları sadece tolere etmeyen, aynı zamanda optimum olarak bu doğal şartlarda yaşamını sürdürebilen canlılardır. Bu denli özel ve ekstrem habitatlarda yaşayabilme yeteneğinde olan mikroorganizmalar, farklı alanlardan bilim insanlarının ilgisini uyandırmakta ve bu ilgi her geçen gün giderek artmaktadır (Demirjian vd. 2001, Rothschild ve Mancinelli 2001, Karaağaç ve Dönmez 2004).

Radyasyonun insanlar üzerine zararlı etkileri olmasına rağmen yüksek seviyede radyasyon altında hayatta kalabilmek için çok sayıda önemli yeteneğe sahip farklı tipte mikroorganizmalar bulunmaktadır. Bu bakterilerden biri *Deinococcus radiodurans*’dır. *D. radiodurans*, kuruluk, oksidantlar, UVR ve iyonize radyasyonu içeren aşırı çevresel

strese olağanüstü derecede karşı koyma kapasitesine sahip ekstremofilik bir bakteridir. Bu patojenik ve fotosentetik olmayan bakteri, >10,000 Gy iyonize radyasyona karşı koyabilme yeteneğiyle, radyasyona en dirençli aerobik organizma olarak Guinness rekorlar kitabına girmiştir (Cox vd. 1979). *D. radiodurans*'ın ekstrem radyasyon direncinin, bakterinin sahip olduğu: i) etkili bir DNA çift zincir kırık onarım sistemi, ii) yüksek antioksidan aktivitesi, iii) protein fonksiyonlarını korumak üzere evrimleşmiş mekanizmalar ve iv) hücre zarının koruyucu sıra dışı yapılarının mevcut olduğu hücresel koruma mekanizmalarının tamamının sinerjistik etkilerinden ileri geldiği düşünülmektedir (Menglong Yuan vd. 2009a).

İyonize ışınlar hücrede en fazla bulunan molekül olan suyu ayrıştırır. Bu olay 10-12 sn gibi çok kısa bir sürede gerçekleşir ve sonuçta çok aktif H^+ ve OH^- radikalleri oluşur. Sonrasında ise hücre içerisinde pH dengesi ve metabolik reaksiyon devamlılığı kaybolur. Fizyolojik pH dışında bir H^+ iyon konsantrasyonu hücresel proteinlerin, enzimlerin yapısında ve fonksiyonunda değişimlere neden olur. Hücreler enzimatik veya enzimatik olmayan antioksidan ve pH dengeleyici sistemleri kullanarak tekrar pH homeostasisini sağlamaya çalışır. Katalaz, süperoksit dismutaz peroksidaz ve diğer antioksidan enzimler serbest radikal giderimi yaparak, hücre içi pH dengesinin tekrar kurulmasında önemli rol oynar. Ayrıca hücre içi pH dengesinin sağlanmasında; histidin, arginin gibi bazı amino asitler, fosfat bileşikleri, hücre membranında bulunan H^+ pompaları, üreaz ve karbonik anhidraz görev almaktadır (Booth 1985, Smith vd. 1999a, Ferradini ve Jay-Gerin 2000, Smith ve Ferry 2000, Swiatla-Wojcik 2008).

Karbonik anhidrazlar (EC 4.2.1.1, karbonat dehidrataz, DrCA) metabolizmada CO_2 'in hidratasyonunu ve HCO_3^- 'in dehidratasyonunu çift yönlü olarak katalizleyebilen ve aktif bölgelerinde Zn^{2+} iyonu içeren bir metaloenzim ailesidir (Maren 1967). Metabolizma için CO_2 ve HCO_3^- 'in birbirlerine dönüşümleri çok önemlidir. CO_2 hücre içine ve hücre dışına çok kolay geçebilmesine rağmen, HCO_3^- lipitlerde az çözüldüğünden hücre membranından geçemez. Bu nedenlerden dolayı gerekli durumlarda HCO_3^- 'in hücre içine geçmesi ve CO_2 'in hücre içerisinde tutulabilmesi için bu dönüşüm reaksiyonu gerçekleşmektedir. Fizyolojik pH'da bu olay katalizör, bir aktivatör olmadan kendiliğinden kolaylıkla gerçekleşmez ve oldukça uzun zaman alır.

Karbonik anhidraz enzimi bu tepkimeyi enzimatik olarak katalizleyerek çok hızlı ve özgül bir şekilde gerçekleşmesini sağlar. CO_2 ve HCO_3^- , pH homeostasisinde hücre içi ve hücreler arası pH tamponu olarak aktivite göstererek merkezi bir rol oynar. Ayrıca bu kompleks HCO_3^- bağımlı pH düzenleyici taşıyıcı proteinlerin substrat kaynağıdır (Smith ve Ferry 2000, Swietach vd. 2007).

Karbonik anhidraz enziminin katalitik aktivitesinin sebebi aktif bölgesinde Zn^{2+} iyonu ve ona bağlı bir hidroksil grubu ihtiva etmesidir. Ayrıca aktif bölge yakınındaki amino asitler de proton gradienti oluşturabilecek yapıdadırlar. Yapısal olarak bir Zn^{2+} iyonu, bir OH^- iyonu ve üç histidin kalıntısı (His-94, His-96, His-119) ile bağ yapmıştır. Karbonik anhidraz enzimi, yapısındaki Zn^{2+} iyonuna bağlı OH^- iyonundan dolayı nükleofilik olarak CO_2 molekülüne saldırır ve Zn^{2+} iyonuna bağlanmış HCO_3^- iyonunun oluşmasını sağlar. Daha sonra HCO_3^- iyonu bir su molekülüyle yer değiştirir ve çözeltiye geçer. Böylece CO_2 molekülünün HCO_3^- iyonuna dönüşümü gerçekleşmiş olur (Stams vd. 1998, Supuran ve Scozzafava 2001).

Hayvan metabolizmasında özellikle eritrositler olmak üzere birçok dokuda karbonik anhidraz enzimi pH düzenleyicisi olarak görev yapar (Beydemir vd. 2000). Bitkilerde karbonik anhidraz enziminin hücre içi pH'nın düzenlenmesinde rol oynadığı ve değişken durumlardaki pH değişimlerinden oluşabilecek denatürasyonlardan hücreyi koruduğu bildirilmiştir. Karbamoil fosfat sentetaz-I ve piruvat karboksilaz enzimlerine sıralı olarak bikarbonat iyonu sağlamasından dolayı, üre devri ve glukoneojenezde rol oynadığı öngörülmektedir. Karbonik anhidraz enzimi hayvan, bitki ve bakterilerde iyon değişimi, asit-baz dengesi, elektrolit salınımı, üre döngüsü ve glukoneojenez gibi metabolik yollar için öncül maddelerin sentezlenmesi gibi hayati öneme sahip fizyolojik ve metabolik bir çok olayda rol oynamaktadır. Bu enzimin ayrıca lipogenez olayında da etkili olduğu bildirilmiştir (Graham vd. 1984, Smith vd. 1999a).

Karbonik tamponun kimyasal bileşenleri ($\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$) metabolik reaksiyonlara ve pH homeostasisine doğrudan katılmaktadır. Hücrede meydana gelen her türlü pH değişiminde tamponlama önemlidir. H^+ iyonları hücrenin gelişmesi ve bölünmesine aracılık eder ve birçok metabolik reaksiyonda H^+ iyonu son ürün olarak üretilir. Ancak

bu iyonların hücrede birikimi ve sonucunda hücre içi proteinlere karşı gösterdiği yüksek kimyasal aktivite nedeniyle hücreden uzaklaştırılmak zorundadırlar.

Karbonik anhidraz enzimi H^+ iyonlarının hücre dışına difüzyonunda önemli yere sahiptir. *D. radiodurans*'da radyasyonun etkisiyle hücre içinde meydana gelen pH düzensizliğine karşı koymada önemli yeri olduğu düşünülen karbonik anhidraz enziminin incelenmesi, direnç fizyolojisindeki yerinin aydınlatılması bakımından önemlidir.

D. radiodurans bir ekstremofil olması sebebiyle tüm genom dizisi çıkarılmış model organizmalardandır. Karbonik anhidraz geni ve enzimi özellikle pek çok patojen mikroorganizmada klonlanarak saflaştırılmış ve karakterize edilmiş olsa da, radyasyon direnci ve pH homeostasisi arasındaki ilişkisi düşünülen *Deinococcus* kaynaklı karbonik anhidraz, enzimi ile ilgili temel bir çalışma mevcut değildir. Bu konu ile ilgili literatürdeki tek çalışma, farklı radyasyon dozları uygulanmış, *D. radiodurans* R1 türünde yürütülen bir transkriptom çalışması olup, 1000 Gy'a kadar artacak şekilde uygulanan farklı radyasyon dozlarında karbonik anhidraz enziminin artan dozla korele şekilde ekspresyonundaki yüksek artıştır (Kuzucu 2016).

Bu nedenlerle yürütülen bu çalışmada *D. radiodurans*'ın karbonik anhidraz (DrCA) enzimini kodlayan DrCA geninin (AE000513.1) klonlanması (*E.coli* DH5 α konağına), ekspresyonu (*E.coli* BL21(DE3)), saflaştırılması ve kısmi enzim karakterizasyonu yapılmıştır. DrCA enziminin karakterizasyonunun yapılması, bu bakterinin radyasyona karşı direncinin aydınlatılmasına katkıda bulunması bakımından önemlidir. Ayrıca bu çalışma, bu tür radyasyona dirençli bir bakteriye ait karbonik anhidraz enziminin çalışılması bakımından literatürde bir ilk oluşturmuştur.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Ekstrem Yaşam; Ekstremofiller

Dünyamızdaki canlı çeşitliliğinin büyük bir kısmını oluşturan mikroorganizmalara yaşamlarını destekleyecek her türlü yer altı ve yer üstü habitatta rastlamak mümkündür. Bu ortamlara, aşına olduğumuz toprak, su, hayvanlar ve bitkiler gibi yaygın habitatlar ve insan yapımı hemen hemen bütün yapıların içi veya yüzeyi dahildir. Gerçekte, doğada bulunan canlı veya cansız her türlü habitatta yaşam formlarının bulunmaması neredeyse imkansızdır. Bazı mikrobiyal çevreler, bize göre yaşam için çok ekstrem olsa da, bu tür ekstrem ortamlar pek çok mikrobiyal yaşam formunu destekler. Yaşamın fizyokimyasal uç sınırlarındaki, ekstrem çevre koşullarında yaşayan organizmalar *ekstremofiller* olarak adlandırılır. Ekstremofilik prokaryotlar volkanik kayaçlar, kaynayan sıcak su kaplıcaları, buz kaplı göller, buzullar veya kutup denizleri, aşırı tuzlu sular, derin denizler gibi yüksek basınç ortamları, çok düşük ve yüksek pH değerleri (pH 0-12.0), farklı radyasyon koşulları gibi çok özel çevrelerde yaşayabilme yeteneğinde olan organizmalardır. Bu denli farklı fizikokimyasal özelliğe sahip ortamlarda dahi mikrobiyal hayatın varlığı, farklı metabolik aktiviteler geliştiren mikroorganizmaların kültüre edilmesi veya onların çevresel DNA dizilerinin çıkarılmasıyla belirlenmiştir. İlginç olan, bu mikroorganizmaların yalnızca bu ortamları tolere edebilmekle kalmayıp, aynı zamanda bu doğal şartlarda optimum olarak yaşamlarını sürdürebilmeleridir. Çizelge 2.1'de, prokaryotik ekstremofilik grupların güncel ve buldukları habitat tiplerinin bir listesi sunulmuştur (Aguilar 1996, Niehaus vd. 1999, Vorgias ve Antranikian 2002, Karaağaç ve Dönmez 2004, Madigan ve Martinko 2010).

Çizelge 2.1 Ekstreofillerin yaşadıkları ekstrem koşullar ve sınıflandırmaları

Ekstrem Çevre	Ekstreofilik Gruplar	Tür adı	Minimum-Maksimum, (Optimum)
Sıcaklık (4°C)	Psikrofil	<i>Pyrolobus fumarii</i>	90-113 °C, (106°C)
	Hipertermofil	<i>Paloromonas vacuolata</i>	0-12 °C, (4°C)
pH	Asidofil	<i>Picrophilus oshimae</i>	0,6-4,0, (0,7)
	Alkalifil	<i>Natranaerobius thermophilus</i>	8,5-12, (10)
Basınç (atm)	Barofil	<i>Moritella yayanosi</i>	500- >1000, (700)
Tuz (%)	Halofil	<i>Halobacterium salinarum</i>	15-32, (25)
Radyasyon (Gy)	Radyofil	<i>Deinococcus radiodurans</i>	15,000 >

2.2 Radyasyon ve Radyasyon Direnci

Radyasyon, partiküller veya elektromanyetik dalgalar (Gamma, X- ışını, UVR, radyo dalgaları vs) formunda bir enerjidir. Bu enerji canlılarda moleküler ve hücresel düzeyde DNA, RNA, protein ve enzimler gibi biyomoleküllerde oksidatif hasar dahil olmak üzere bir takım değişikliklere yol açmaktadır. Bu değişiklikler iyonize radyasyonun türüne, etki süresine, miktarına göre hücrede geçici (onarılabilen) veya kalıcı (onarılmayan) tipte hasarlara neden olabilir. Bu enerji örn; DNA’da onarımı daha kolay olan tek zincir kırıklarına yol açabildiği gibi, onarımı güç ve çoğu kez onarımı mümkün olmayan ve hücre ölümlerine yol açan çift zincir kırıklarına da neden olmaktadır. Bundan başka yine pürin ve primidin baz hasarları, protein çapraz bağlanmaları, proteinler ve enzimler üzerinde oksidatif etki, mutajenik ve karsinojenik etkiler, lipid peroksidasyon zincir reaksiyonları gibi pek çok olumsuz etki gösterir (Ravanat vd. 2001, Kaya 2002, Gabani ve Singh 2013, Adewoye vd. 2015, Lara vd. 2015).

İyonize radyasyon doğrudan veya dolaylı yolla molekülleri etkilemektedir. Doğrudan etkilediğinde, değişikliğe uğrayan molekül direk olarak iyonize radyasyona maruz kalır ve uyarılmış duruma geçer, dolaylı etkide ise iyonize radyasyon sonucu oluşan serbest radikaller gibi bazı ara ürünler, bir dizi kimyasal reaksiyona girerek diğer moleküllerin değişmesine neden olur.

Örnek olarak; iyonize radyasyon hücrede en fazla bulunan su molekülünü ayrıştırarak serbest radikallerin oluşmasına ve hücre içi pH'nın değişmesine neden olarak tesir eder (Machlin ve Bendich 1987, Weiss vd. 1990, Athar vd. 1993, Kaya 2002, Gabani ve Singh 2013).

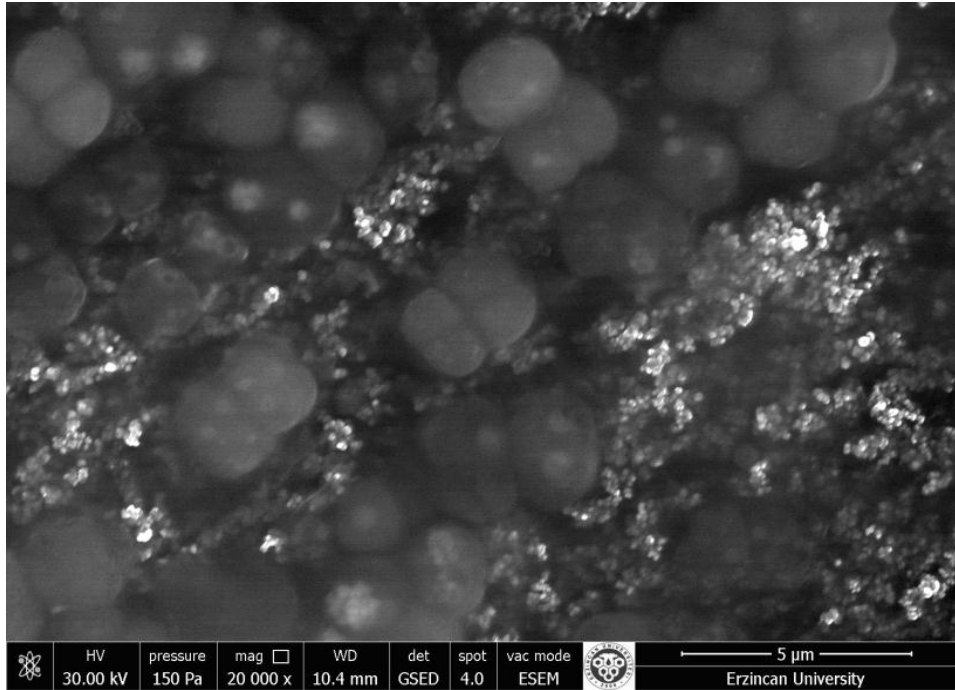
Farklı radyasyon koşullarında yaşayabilen mikroorganizmalar radyasyona dirençli veya radyotolerant olarak isimlendirilirler. Bu organizmalar, sıra dışı bir şekilde diğer birçok organizma için ölümcül olan hem iyonize radyasyon hem de iyonize olmayan radyasyon varlığında yaşamlarını sürdürebilmektedirler. Bunlar arasında en çok çalışılan organizma olan *D. radiodurans*, öldürücü dozun çok üzerinde bir iyonize radyasyon ve UVR'ye (1000 Jm⁻²) karşı koyabilme yeteneğinde olan bir mikroorganizmadır (Menglong Yuan vd. 2009a, Yvonne V Yuan vd. 2009b, Gabani ve Singh 2013).

2.3 *Deinococcus radiodurans*'ın Genel Özellikleri

D. radiodurans (Yunanca: deinos: güçlü, sıra dışı ve coccus: tanecikli meyve), *Deinococcaceae* ailesinin bir üyesidir. *D. radiodurans* ilk olarak Anderson (1956) tarafından, Amerika Birleşik Devletleri, Oregon State Üniversitesi, Oregon Tarımsal Deneysel Tesisinde, 4000 Gy gama ışını uygulanarak sterilize edilmiş konserve etten izole edilmiş ve başlangıçta fiziksel karakterlerine dayalı olarak *Micrococcus radiodurans* olarak adlandırılmıştır. Fakat sonraki 16S rRNA gen dizi analizleri ile yeni bir filogenetik grubun varlığı ortaya çıkarılmış ve bu nedenle, bakteri yeni bir aile olan *Deinococcaceae* ailesine dahil edilerek *Deinococcus radiodurans* olarak yeniden isimlendirilmiştir (Anderson vd. 1956, Raj vd. 1960, Blasius vd. 2008, Slade ve Radman 2011).

D. radiodurans, Gram pozitif, pigmentli, spor oluşturmeyen, hareketsiz, 0.5-3.5 µm boyutlarında kok şeklinde, sıklıkla diyad ve tetrad halde bulunan, katalaz pozitif, patojen olmayan, aerobik bir bakteridir (Şekil 2.1). Kolonileri karotenoid pigment içermesi sebebiyle pembe renklidir. 39°C üzerinde bir termal yaşama sınırı olup, genellikle 30-37°C arasında gelişim gösteren mezofilik bir bakteridir.

D. radiodurans, 32 °C’de zengin TGY besiyerinde (0.5% tripton, 0.1% glukoz, 0.15% maya ekstraktı), oksijenli ortamda oldukça iyi bir gelişme gösterebilmektedir. İki katına çıkma süresi yaklaşık 1,5-3 saattir ve kolonilerin yeterli gelişimi 3 gün sürer. Yüksek hücre yoğunluğuna ulaşmak ve büyük ölçekli üretimini yapmak için 37°C’de HEPES tamponu (pH 7.0) ile hazırlanmış magnezyum destekli TGY besiyeri (0.5% tripton, 0.1% glukoz, 0.15% maya ekstraktı) kullanılır (Anderson vd. 1956, Englander vd. 2004, He 2009, Slade ve Radman 2011, Misra vd. 2013, Agapov ve Kulbachinskiy 2015).



Şekil 2.1 SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu)’de *D. radiodurans* R1 tetrad hücre yapısına ait tez kapsamında görüntülenen bir fotomikrografi

D. radiodurans iyonize radyasyon, UVR, hidrojen peroksit gibi çok sayıda öldürücü ve mutajenik ajana karşı çok yüksek miktarda direnç gösterir. Ayrıca kuruluk, yüksek miktardaki reaktif oksijen türleri ve mitomisin C gibi genotoksik ajanlara da direnç gösterebilmektedir. Dünyanın radyasyona en dirençli aerobik bakterisi olarak bilinmektedir. Ayrıca, *D. radiodurans* RNA sentezini (aktinomisin D), protein sentezini (kloramfenikol, streptomisin, neomisin, kanamisin ve eritromisin) ve hücre duvar sentezini inhibe eden (penisilin, basitrasin ve vankomisin) antibiyotiklere karşı da duyarlıdır (Hawiger ve Jeljaszewicz 1967, Minton 1994, 1996, Li ve Lu 2001, Slade ve Radman 2011, Agapov ve Kulbachinskiy 2015).

2.4 *Deinococcus* Cinsi Bakterilerin Habitatları

Deinococci'nin doğal habitatı net olarak tanımlanmamıştır. *Deinococcaceae* ailesine ait türler, dünyanın çeşitli yerlerinden izole edildiklerinden, izolasyon ortamları, onların genel ekolojik ve coğrafik dağılımları açısından büyük ölçüde değişiklik gösterir. Konu ile ilgili yürütülen iki ekolojik çalışmada, *Deinococci*'nin çoğunlukta toprakta yayılım gösterdiği ileri sürülmektedir (Brooks ve Murray 1981, Murray 1992, Battista 1997). Bu çalışmalarda çoğu *Deinococcal* izolatin organik besinlerce zengin toprak, hayvan feçesi, işlenmiş et, atık sular, gibi ortamlarda da bulunduğu belirtilmiştir. Bunun dışında kuru gıdalar, besince fakir çöller, oda tozu, radyoaktivite ile kontamine bölgeler, ışınlanmış medikal cihazlar, tekstil ürünleri gibi farklı kaynaklardan izole edilip tanımlanabilmişlerdir. (Minton 1994, Battista 1997, White vd. 1999, Dose vd. 2001, Slade ve Radman 2011). Farklı bölgelerden izole edilmiş olmaları ve çok sayıda farklı habitatlarının bulunması, *Deinococci*'nin evrimleşmesine büyük katkı sağlamıştır. Çünkü her ne kadar spor oluşturamasa da çevresel strese uzun süre dayanabilmektedir. Dikkate değer diğer bir özelliği de *D. radiodurans*'ın kuruluğa sıra dışı direncidir. Bir desikatörde sadece 6 yıl boyunca kültürün %10'u canlı kalacak şekilde yaşayabilmektedir. *D. radiodurans*'ın iyonize radyasyon direnci ile kuruluk direnci arasında bir ilişki olduğu kanıtlanmıştır. *D. radiodurans*'ın iyonize radyasyona duyarlı (IRS) 41 suşunun desikatörde 6 hafta yaşadığını ve IRS izolatinin aynı zamanda kuruluğa da duyarlı olduğu ispatlanmıştır. Ayrıca, *D. radiodurans* IRS'de dehidrasyon süresince DNA hasarının da biriktiği belirlenmiştir (Murray 1992, Mattimore ve Battista 1996, Battista 1997).

2.5 Sistematikteki Yeri ve Filogenisi

2016 itibariyle LPSN bacterio.net adresi kayıtlarına göre *Deinococcus* cinsine ait 59 tür bulunmaktadır (Çizelge 2.2). Yine bu yıl itibariyle NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanında kayıtlı olan *Deinococcus* cinsine dahil 7 adet bakterinin 16S rRNA gen dizi verisi bulunmaktadır (Çizelge 2.3). *Deinococcus* 16S rRNA gen dizilerinin türlerinin filogenetik analizi sonucu oluşturulan diyagram Şekil 2.2'de gösterilmiştir.

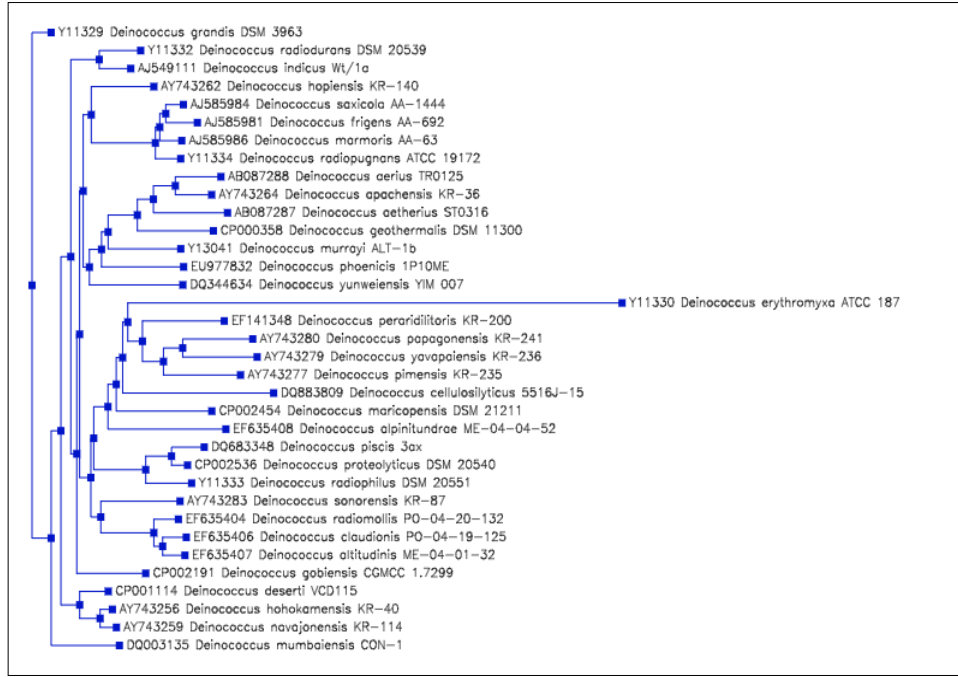
Çizelge 2.2 *Deinococcus* cinsine dahil türler (LBSN-bacterio.net, 2013)

<i>Deinococcus carri</i>	<i>Deinococcus phoenicis</i>	<i>Deinococcus depolymerans</i>
<i>Deinococcus daejeonensis</i>	<i>Deinococcus pimensis</i>	<i>Deinococcus deserti</i>
<i>Deinococcus erythromyxa</i>	<i>Deinococcus piscis</i>	<i>Deinococcus peraridilitoris</i>
<i>Deinococcus aeriis</i>	<i>Deinococcus proteolyticus</i>	<i>Deinococcus ficus</i>
<i>Deinococcus aerolatus</i>	<i>Deinococcus mumbaiensis</i>	<i>Deinococcus frigenis</i>
<i>Deinococcus aerophilus</i>	<i>Deinococcus radiodurans</i>	<i>Deinococcus geothermalis</i>
<i>Deinococcus aetherius</i>	<i>Deinococcus radiomollis</i>	<i>Deinococcus gobiensis</i>
<i>Deinococcus alpinitundrae</i>	<i>Deinococcus radiophilus</i>	<i>Deinococcus grandis</i>
<i>Deinococcus altitudinis</i>	<i>Deinococcus radiopugnans</i>	<i>Deinococcus hohokamensis</i>
<i>Deinococcus antarcticus</i>	<i>Deinococcus radiotolerans</i>	<i>Deinococcus hopeniensis</i>
<i>Deinococcus apachensis</i>	<i>Deinococcus reticulitermitis</i>	<i>Deinococcus humi</i>
<i>Deinococcus aquaticus</i>	<i>Deinococcus roseus</i>	<i>Deinococcus indicus</i>
<i>Deinococcus aquatilis</i>	<i>Deinococcus xibeiensis</i>	<i>Deinococcus maricopensis</i>
<i>Deinococcus aquiradiocola</i>	<i>Deinococcus saxicola</i>	<i>Deinococcus marmoris</i>
<i>Deinococcus metallilatus</i>	<i>Deinococcus sonorensis</i>	<i>Deinococcus metalli</i>
<i>Deinococcus caeni</i>	<i>Deinococcus swuensis</i>	<i>Deinococcus misasensis</i>
<i>Deinococcus cellulosityticus</i>	<i>Deinococcus wulumuqiensis</i>	<i>Deinococcus murrayi</i>
<i>Deinococcus citri</i>	<i>Deinococcus xinjiangensis</i>	<i>Deinococcus navajonensis</i>
<i>Deinococcus claudionis</i>	<i>Deinococcus yavapaiensis</i>	<i>Deinococcus papagonensis</i>
<i>Deinococcus daejeonensis</i>	<i>Deinococcus yunweiensis</i>	

Çizelge 2.3 NCBI veri tabanında bulunan kayıtlarına göre *Deinococcus* cinsine dahil türler (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, 2013)

<i>Deinococcus soli</i>	<i>Deinococcus aerea</i>	<i>Deinococcus aquivivus</i>
<i>Deinococcus actinosclerus</i>	<i>Deinococcus puniceus</i>	
<i>Deinococcus enclensis</i>	<i>Deinococcus sahariensis</i>	

D. radiodurans ilk olarak morfolojik ve fiziksel karakteristik özelliklerine dayalı olarak *Micrococcus radiodurans* olarak adlandırılmıştır. Fakat daha sonra 16S rRNA gen dizi analizi temelli moleküler çalışmaların artmasıyla, 1980'lerde yapılan farklı çalışmalarda, 16S ile 5S rRNA ve yüksek düzeyde korunmuş protein dizilerinin karşılaştırılması sonucunda *Deinococcus* cinsinin filogenetik olarak *Thermus* cinsine daha yakın olduğu ortaya çıkarılmış ve bu nedenle, bakteri yeni bir aile olan *Deinococcaceae* ailesine dahil edilerek *Deinococcus radiodurans* olarak yeniden isimlendirilmiştir (Hensel vd. 1986, Woese 1987, Weisburg vd. 1989, Agapov ve Kulbachinskiy 2015).



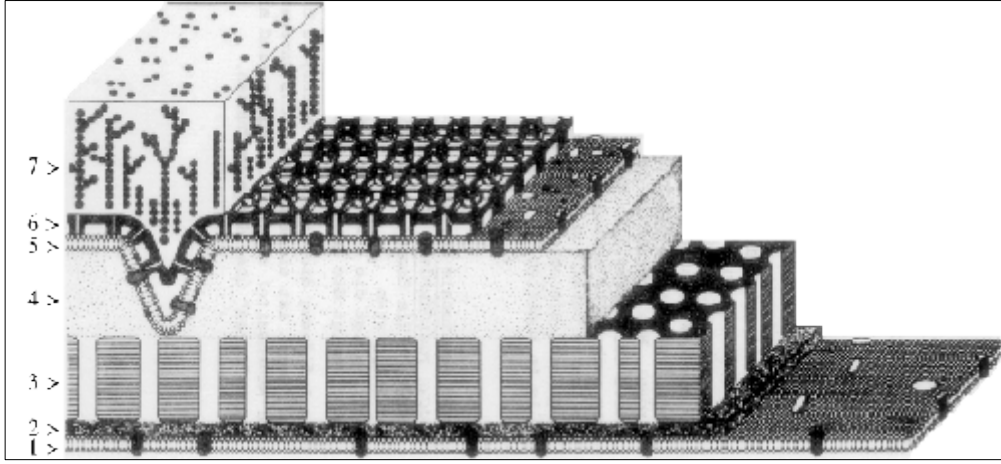
Şekil 2.2 2016 itibariyle *Deinococcus* cinsine dahil 16S rRNA analizleri yapılmış türlerin filogenetik diyagramı (<http://www.straininfo.net/>, 2016)

White vd. (1999) yaptıkları çalışmada, *Thermus thermophilus* ait güncel 175 protein dizisini, *D. radiodurans*'ın tüm genom dizisi ile karşılaştırmışlar ve 143 proteinin yüksek bir oranda benzerlik gösterdiğini ortaya koymuşlardır. *D. radiodurans* ve *T. thermophilus* yakın GC miktarları, her ikisinin de kırmızı pigmentli oluşu, spor oluşturmamaları, aerobik olmaları ve peptidoglikan (peptid köprüleri olarak L-ornitin, diamino asit ve glisilglisin) tabakalarında A3 tip mureine sahip olma gibi pek çok ortak özelliği paylaşırlar. *Deinococcus* ve *Thermus* cinslerinin fenotipleri de benzerdir. *Thermus* türleri Gram negatif boyanırlar fakat hücre duvar yapısı birkaç özellik bakımından Gram pozitif bakterilerinkine benzerlik gösterir. Örneğin peptidoglikan yapısında ornitin ve dallanmış zincirli yağ asitlerinin varlığı gibi. Buna karşın *Deinococcus* türleri Gram pozitif boyanmasına karşın, yağ asit profili bakımından çoğunlukla Gram negatif bakterilere benzerlik gösterir. Ayrıca bir çalışmada *Deinococcus-Thermus* şubesine ait türlerin *Cyanobacteria* ve *Actinobacteria* ile de ilişkili oldukları bildirilmektedir (Pask-Hughes ve Williams 1978, Donato ve Seleiro 1990, Wolf vd. 2001, Battistuzzi vd. 2004, Henne vd. 2004, Slade ve Radman 2011).

Yürütülen evrensel filogenetik analizlere göre, *Deinococcus-Thermus* cinslerine ait türlerin ataları mezofilik veya fakültatif termofilik üreme gösterirler. Grupların evrimsel olarak ayrılmasından sonra *Thermus*'un yüksek sıcaklığa adaptasyon yeteneğini Arke ve termofilik bakterilerden yatay gen transferi sonucu kazandığı, ayrıca *Deinococcus*'un strepten sorumlu pek çok geni de diğer bakterilerden edinmiş olduğu düşünülmektedir. *D. radiodurans* genomunun yaklaşık %10-15'inin yatay gen transferi ile kazanılmış olduğu tahmin edilmektedir. Bu kazanılmış genlerin çoğu mega plazmid DNA'ların üzerinde kodludur (Makarova vd. 2001, Omelchenko vd. 2005, Slade ve Radman 2011).

2.6 Fiziksel Özellikleri

D. radiodurans hücre duvarı yapısı ve kompozisyonu bakımından eşsizdir. Bakteri Gram pozitif olmasına rağmen, hücre duvar yapısının çok sayıda tabakadan oluşması ve lipit kompozisyonu bakımından Gram negatif bakterilere benzer. Hücre duvarı, 14-20 nm bir peptidoglikan tabakası içeren bir plazma membran (iç membran) ve dış membrandan oluşur (Thornley vd. 1965, Lancy Jr ve Murray 1978, Makarova vd. 2001, Slade ve Radman 2011). *D. radiodurans* elektron mikroskopunda görülen en az 6 tabakadan oluşan toplam 150 nm kalınlığında bir hücre duvarına sahiptir (Şekil 2.3), *D. radiodurans*'ın sahip olduğu bu kalın hücre duvarının, sitozolünde yüksek konsantrasyonda bulunan ve Reaktif Oksijen Türevleri (ROS)'nin temizlenmesi ile oksidatif hasara karşı korumada önemli bir yeri olan küçük moleküllerin neden olduğu yüksek ozmotik basınca karşı hücreyi koruduğu bilinmektedir (Work ve Griffiths 1968, Lancy Jr ve Murray 1978, Slade ve Radman 2011).



Şekil 2.3 *D. radiodurans*'ın hücre duvar yapısının kısımları

(1) Plazma Membran, (2) Tipik peptidoglikan tabaka, (3) Holey (delikli) tabaka, (4) Diğer bir plazma membran, (5) Dış fosfolipit tabaka, (6) Hekzogonal proteinlerce sıkı paketlenmiş S-tabaka, (7) Yoğun dallanmış zincirli polisakkarit tabaka

Dış membran S tabaka ve polisakkarit tabaka ile kaplıdır. Son çalışmalar, iç membranın dış membran ile protein kompleksleri aracılığıyla bağlantılı olduğunu göstermiştir. D-proteini bu ilişkide kilit rol oynamaktadır. Holey adı verilen tabaka glukozamin, muramik asit ve dört ana amino asit (glutamik asit, alanin, glisin ve l-ornitin) içeren bir peptidoglikandan oluşur. Diamino asit l-ornitin, normalde bakteri hücre duvarlarında nadiren bulunur; ancak *Deinococcus* hücre duvarı L-ornitince zengindir (Work 1964, Work ve Griffiths 1968, Slade ve Radman 2011, Agapov ve Kulbachinskiy 2015).

Deinococcus'da dış membran, S tabakası ve polisakkaritler bir araya gelerek, bakteriye pembe rengini veren karotenoidler içeren, tek bir yapı halinde bulunur. Membrana bağlı bu karotenoidlerin serbest radikallerin inaktivasyonunda ve onların üretiminin önlenmesinde koruyucu rol oynadığı bilinmektedir. *In vitro* çalışmalarda karotenoidten yoksun suşlarda oksidatif stres koşullarında protein hasar seviyesinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, bu bakterilerin yabancı türe göre radyasyona daha duyarlı hale geldiği bildirilmiştir (Kübler ve Baumeister 1978, Bing Tian vd. 2007, B Tian vd. 2009, Agapov ve Kulbachinskiy 2015).

S tabakanın ana protein bileşeni hegzagonal yapıdaki Hpi'dir. S tabaka ayrıca karotenoid, lipid, protein ve polisakkaritleri içerir. Polisakkarit olarak galaktoz, glukoz, eser miktarda ramnoz ve mannoz içerirken, heptoz bulunmaz. S tabaka kısmen hücre sağlamlığını artırır ve çeşitli ligantlarla ilişkiyi kolaylaştırır. Ayrıca yüksek dozda UVR ve iyonize radyasyona karşı dirençte önemli bir yere sahiptir (Kübler ve Baumeister 1978, Farci vd. 2014, Agapov ve Kulbachinskiy 2015).

Deinococcus'un membran lipitlerinin % 43'ü, alkilamin içeren fosfoglikolipidlerden oluşur. Bakterilerde yaygın olan fosfotidiletanolamin, fosfotidilserin, fosfotidilkolin ve fosfotidilinositol gibi fosfolipidler bulunmaz. Lipoproteinler temelde çift sayıda, düz zincirli ve doymuş yağ asitleri içerip, palmitolatca zengindir ayrıca önemli miktarda tek sayıda doymuş yağ asidi ve genellikle bakterilerde bulunmayan tekli doymamış yağ asidi bulundurur. Doymamış yağ asitleri hücre zarının akışkanlığını artırır. Bu yapının kuruluğa dirençte önemli olabileceği düşünülmektedir. Bu cins üyelerinde çoklu doymamış, siklopropil ve dallanmış zincirli yağ asitleri tespit edilmemiştir (Knivett vd. 1965, Girard 1971, Thompson vd. 1982, Slade ve Radman 2011).

2.7 Metabolizma

D. radiodurans proteolitik yaşam biçimine sahip organotrofik bir bakteridir. *D. radiodurans*'ın verimli gelişimi için bazı minimal gereksinimleri vardır. Bir karbon kaynağı, nikotinik asit, bir nitrojen kaynağı ve bir mangan (Mn^{+2}) kaynağı gibi. Amino asitler primer karbon kaynağı olarak tercih edilir. Karbonhidratlardan en çok früktoz, pürivat, glukoz, oksaloasetat, gliserol sırasıyla kullanılır. Karbohidratlar muhtemelen mega plazmitte kodlanan fosfoenolpürivat fosfotransferaz sistemiyle hücre içine alınmaktadır (Murray 1992, White vd. 1999, Makarova vd. 2007, He 2009, Slade ve Radman 2011).

Metabolizmadaki birkaç özellik iyonize radyasyon ve oksidatif stresi de içine alan çok sayıda çevresel strese karşı koruyucu destek sağlar. Proteoliziz, ekzojen peptid materyallerinin alımı, ölü hücrelerden gelen proteinler ve hasarlı proteinlerin geri dönüşümü ve hücre fonksiyonlarının yenilenmesi için kritik öneme sahiptir.

Nitekim hücrenin iyonize radyasyona maruziyeti süresince hücre içi proteolizinin hızlandığı ispatlanmıştır. Proteinlerin geri kazanımı biyosentetik ihtiyacı minimize eder ve manganlı peptidler ile amino asitlerin antioksidan kompleksine katkı sağlar (Liu vd. 2003, Ghosal vd. 2005, Daly vd. 2010, Slade ve Radman 2011).

D. radiodurans, Fe veya Fe-S kofaktörüne gereksinim duyan birkaç protein sentezler. İyonize radyasyonu takiben reaktif oksijen türevlerinin (ROS) üretimi ve beraberinde ise ekstrem oksidatif stres gelişir. Trikarboksilik asit döngüsünün (TCA) gliksilat bypassı indüklenir ve Fe-S içeren enzimleri ile solunum enzimlerinin (sitokrom ve flavoproteinler) sayısı azalarak, ROS üretimi baskılanır (Slade ve Radman 2011).

D. radiodurans direk olarak glikoz metabolizmasını besleyen karbohidrat granülleri muhafaza eder. Deoksinükleozit trifosfat öncülleri DNA hasarını takiben, granül depolarından salınan glukoz ile yapılır. Bunun dışında glikoliz, glikojen sentezi, pentoz fosfat yolu, trikarboksilik asit döngüsü gibi birçok metabolik süreçte glukozu kullanır (Thornley vd. 1965, Makarova vd. 2001, Slade ve Radman 2011).

D. radiodurans'ın NAD biyosentezi ile ilişkili anahtar enzimi yoktur. Karbon kaynağı olarak ne nükleozid üridin ve adenozini ne de TCA ürünleri süksinat, malat, fumarat ve alfa ketoglutaratı kullanabilir. Bu metabolik eksiklik nükleozitlerin ve NAD öncüllerinin birikimine neden olur. Bu olumsuz gibi görünen durumun, en az DNA onarım mekanizmaları kadar radyasyon toleransına katkıda bulunduğu günümüz araştırmalarına dayanarak açıklanmaktadır. Fakat, bu konuda daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. *D. radiodurans*'ın metabolik konfigürasyonu sadece endojen ROS üretimini baskılamaz aynı zamanda eksojen etkilerce uyarılmış ROS'a karşı da hücreyi korur. Özellikle ROS temizleyici gibi yaygın hücresel metabolitler, Mn^{2+} ile birlikte bu işlevi gerçekleştirir (Ghosal vd. 2005, Daly vd. 2010, Slade ve Radman 2011).

Wan ve arkadaşları 2013'te yaptıkları bir çalışmada *D. radiodurans* metabolizmasına ait 8 mekanizmanın radyasyon direncinde rol oynadığını biyoinformatik olarak ortaya koymuştur: Arjinin metabolik işlevi, GTP metabolik işlevi, dikarboksilik asit taşınımı,

protein taşınımı, protein oligomerizasyonu, hücre duvar organizasyonu, glisin katabolik işlevi tRNA aminoaçılması (Wan vd. 2013).

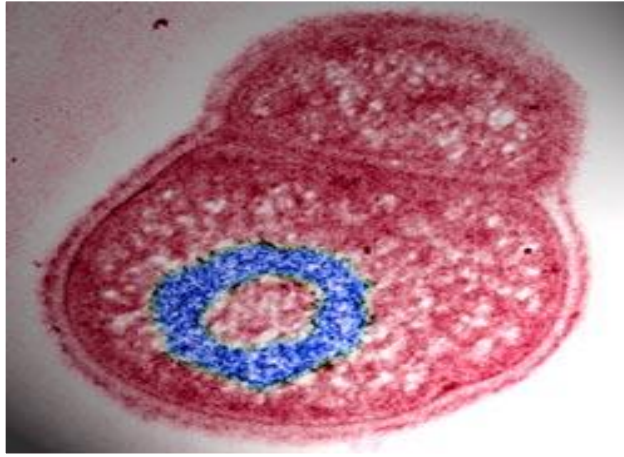
2.8 Genom Organizasyonu

D. radiodurans genomu 3.28 megabaz büyüklüğündedir. Genom 2,648,638 bp ile 412.348 bp büyüklüğünde iki kromozom ve 177.466 bp ile 45.704 bp büyüklüğünde iki plazmitten oluşur. Ayrıca 3.187 açık okuma çerçevesi (ORF) içerir ve yüksek GC miktarına (% 66.6) sahiptir. *D. radiodurans*'ın logaritmik fazda, genomun 10 kopyasını içeren her bir hücre için ortalama DNA miktarı $3,4 \times 10^7$ bazdır. Son yapılan çalışmalarda TGY besiyerinde gelişen hücrelerde genom kopya sayısı minimal besiyerinde gelişen hücrelerden 2 kat daha fazladır. Genom kopya sayısı ile radyasyon direnci arasında bir korelasyon olmamasına rağmen, 2 genom kopyası iyonize radyasyonun yol açtığı çift zincir kırık onarımını içeren DNA hasarının etkili bir şekilde homolog rekombinasyon ile onarılması için daima bir kalıp olarak işlev görür (Driedger 1970, White vd. 1999, Slade ve Radman 2011, Agapov ve Kulbachinskiy 2015).

Deinococcus genomu mozaik bir yapıdadır, birçok gen *Thermus* ve *Bacillus* genomlarıyla homologdur. Çok sayıda gen ise Arkeleri ve Ökaryotları içeren diğer domainlere ait genlerle yaygın bir kökene sahiptir. *D. radiodurans* hücrelerinin doğal yeteneğinden dolayı yoğun yatay gen transferi görülür. Diğer bakterilere kıyasla ilginç şekilde, *D. radiodurans* UVR'ye maruz kalmış hasarlı DNA'yı çok daha etkin bir şekilde aktarır. *D. radiodurans*'da DNA onarımının çok daha etkili olması bunun bir sonucu olabilir (BE Moseley ve Setlow 1968, Türgari ve Moseley 1980, MICHAEL D Smith vd. 1988, Agapov ve Kulbachinskiy 2015).

D. radiodurans önemli miktarda yabancı DNA'yı (>500,000 bç, > %10 *D. radiodurans* genomu) kendi genomuyla birleştirebilir. *D. radiodurans* hücre duvarı, doğal transformasyon da önemli rol oynayan bir DNA taşıyıcısına sahip bir DNA onarım kompleksi bulundurur. *D. radiodurans* genomu sıkıca paketlenmiştir ve halkasal yapıdaki nükleoid formundadır (Şekil 2.4). Bu yapı, iyonize radyasyon ve radyasyon tarafından hücre içinde üretilen aktif radikaller gibi mutajenik faktörlerden DNA'yı

koruyan bir mekanizma olarak hizmet etmektedir. İyonize radyasyonun DNA'da meydana getirdiği hasar *D. radiodurans* ve *Escherichia coli* hücrelerinde benzer seviyelerdedir. Fakat *D. radiodurans*'ın spesifik nükleoid yapısı, DNA yakınındaki çift zincir kırıklarının oluşmasına karşı korunmaya yardımcı olmakta ve DNA onarımını kolaylaştırmaktadır (Levin-Zaidman vd. 2003, Englander vd. 2004, Zimmerman ve Battista 2005, Agapov ve Kulbachinskiy 2015).



Şekil 2.4 Kırmızı pigmentli *D. radiodurans* hücresinin, halkasal genom morfolojisinin görünümü (Levin-Zaidman vd. 2003)

2.9 Ekstrem Radyasyon Direnci

Deinococcaceae ailesi üyeleri ekstrem radyasyon karşı direnç fenotip sergileyen bakterilerdir. *D. radiodurans*'ın en karakteristik özelliği, çok yüksek dozda radyasyona dirençli olmasıdır. İyonize radyasyon yüksek düzeyde reaktif radikallerin (örn; hidroksil radikalleri) oluşumuna yol açar ve DNA'da tek-çift zincir kırıkları ve baz modifikasyonlarına neden olur. *E. coli*'den 30 kat, insandan 1000 kat daha dirençlidir. 5000 Gy doz her bir *D. radiodurans* genomunda yaklaşık 200 tane DNA çift zincir kırığı ve 190 çapraz bağ meydana getirir. Buna karşın *E. coli* hücresi sadece birkaç DNA çift zincir kırığı ile ölür *D. radiodurans* kültürü ise 5000 Gy radyasyonda canlılığını kaybetmeden yaşayabilir. *D. radiodurans*'ın radyasyon direnci, DNA hasarının önlenmesi ile ilişkili değildir. Çünkü aynı koşullar altında radyasyona uğrayan *D. radiodurans* ve *E. coli*'de DNA çift zincir kırığı oluşma oranı aynıdır. Bu nedenle radyasyon direnci, bakterinin oldukça etkin DNA onarım sistemleri ve sıra dışı DNA

onarım kapasitesiyle ilişkilidir. (Moseley ve Mattingly 1971, Krasin ve Hutchinson 1977, Gerard vd. 2001, Michael M Cox ve Battista 2005, Blasius vd. 2008, Slade ve Radman 2011).

D. radiodurans'da diğer organizmalarda bulunmayan, spesifik olarak DNA onarımı ile ilişkili çok sayıda enzim bulunmaktadır. Son çalışmalarla, *Deinococcus* DNA'sının hasara karşı direncinin, hasar miktarı veya onarım kapasitesinden ziyade, DNA onarımında ve oksidatif hasara karşı korunmasında rol oynayan enzimlerin korunmasıyla ilişkili olduğu ispatlanmıştır (Slade ve Radman 2011).

2.10 İyonize Radyasyona Karşı Direnç Stratejileri

2.10.1 Dirence pasif olarak katkı sağlayan bileşenler

2.10.1.1 Genom kopya sayısı

Hücrelerde genom kopya sayısının artışı iyonize radyasyon direncini artırır. Statik fazda hücrelerde kromozomun 4 kopyası bulunurken, aktif olarak bölünen hücreler 10 kopya içerir. Dolayısıyla çok sayıda genom kopyası hücreye genetik bilginin bir deposu olma özelliği kazandırır. Bu sayede organizmada DNA onarım süreci daha etkili olmaktadır. Özellikle hücrede yaşamsal genleri içeren ek DNA kopyalar, radyasyona karşı hücrenin hayatta kalma şansını artırmaktadır. Mortimer 1958 yılında yaptığı bir çalışmada *S. cerevisiae*'nin diploid ve tetraploid formlarının haploid formuna göre radyasyona daha dirençli olduğunu ispatlamıştır. Bu sonuçlara göre, ekstra genetik bilginin radyasyonun neden olduğu hücre ölümüne karşı poliploid hücreleri koruduğu ileri sürülmektedir. Çünkü çoklu genom kopyasının, hasarlı veya kayıp DNA sekansının homolog rekombinasyon mekanizmasıyla onarılması sırasında substrat olarak tercih edildiği düşünülmektedir.

Genom kopya sayısının tek başına dirençte etkili olmadığı, diğer birçok mekanizma ile birlikte dirence katkı sağladığı söylenebilir. Çünkü birçok bakteri üssel gelişme fazında

çok sayıda genom kopyasına sahipken, iyonize radyasyona direnç gösterememektedir. Yine de DNA çift zincir kırıklarının rekombinasyonel onarımı genomun birden çok kopyasını gerektirir ve bu yüzden dirençte etkisi göz ardı edilemez (Mortimer 1958, Kitayama ve Matsuyama 1981, Battista 1997, Michael M Cox ve Battista 2005).

2.10.1.2 Nükleoid organizasyonu

Statik fazda *D. radiodurans* hücrelerinin nükleoidleri yüksek doz iyonize radyasyon ile değişmeden kalan sıkı bir halka yapısı halinde düzenlenmiştir. Minsky vd.(2003), *D. radiodurans*'ın nükleoid yapısının çift zincir kırıklarının oluşturduğu fragmentlerin oluşumunu önleyerek radyasyon direncine pasif olarak katkı sağladığını ileri sürmektedir. Ancak, bu hipotez tartışmalıdır; çünkü farklı gelişim koşulları altında bu tür sıkı paketlenmiş nükleoitlerin sıklığı ile iyonize radyasyon direnci arasında doğrudan bir ilişki yoktur. Fakat *Deinococcus* ve *Rubrobacter* cinslerine ait türlerin nükleoidleri üzerine yapılan son çalışmada, bu bakterilerin özellikle radyasyona daha duyarlı *E.coli* ve *Thermus aquaticus* türlerine göre, nükleoid şekline bakılmaksızın çok daha yüksek yoğunlaşmış bir genoma sahip oldukları ortaya çıkarılmıştır. Bu sebeple genomun sıkı bir şekilde paketlenmesinin, iyonize radyasyona karşı korunmaya katkı sağladığı düşünülmektedir (Levin-Zaidman vd. 2003, Daly vd. 2004, Cox ve Battista 2005, Zimmerman ve Battista 2005).

2.10.1.3 Mangan miktarı

Daly vd. (2004), *D. radiodurans* hücrelerinde biriktirilen yüksek Mn^{+2} konsantrasyonunun radyasyona karşı korunmada etkisini araştırmıştır. *D. radiodurans* kültürü Mn^{+2} bakımından fakir olduğunda, iyonize radyasyon direnci azalmaktadır. Ancak hücreye aynı spesifik dozda iyonize radyasyon verildiğinde Mn^{+2} varlığında ve yokluğunda DNA çift zincir kırık oranında bir farklılık görülmemiştir. Bu sebeple Mn^{+2} DNA hasarını önlemez. Ancak, yüksek dozda radyasyona maruz kalan hücre, Mn^{+2} varlığında hasarı daha iyi tolere eder.

DNA hasarının büyük çoğunluğu iyonize radyasyona maruz kalan hücrede, suyun hidrolizi sonucu oluşan reaktif oksijen türevlerinin aktivitesiyle meydana gelir. Hücre içi Mn^{+2} , serbest radikallerin temizlenmesini sağlar. Daly vd. Mn^{+2} birikiminin, süperoksit ve ROS'un radyasyon süresince proteinlerde meydana getirdiği hasarı önlediğini ileri sürmektedir. Ayrıca Mn^{+2} konsantrasyonunun artışı *D. radiodurans* genomunun yoğunlaşmasına katkı sağlamaktadır (Daly vd. 2004, Michael M Cox ve Battista 2005).

2.10.2 Dirençte aktif rol oynayan bileşenler

2.10.2.1 Enzimler

DNA zincir kırıkları enzimatik olarak onarılır. *Deinococcus* türlerinin yeni onarım mekanizmalarını kullandığı bilinmektedir. 1996'da Daly ve Minton genom onarımının en az iki farklı aşamada gerçekleştirildiğini kanıtlamıştır. Kromozom onarımı, hücre yüksek doz iyonize radyasyona maruz bırakıldıktan sonra, ilk 1.5 saat içinde RecA bağımsız onarım mekanizmasıyla gerçekleştirilir. Bu aşamada yaklaşık 1-3 çift zincir kırığı onarılır. RecA bağımlı rekombinasyonel DNA onarımı radyasyona maruz kalımdan birkaç saat sonrasında görev almaya başlar ve genomun yeniden yapılandırılmasının ileri safhalarında etkilidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise iyonize radyasyon ve kuruluğa yanıtta hem RecA bağımlı hem de RecA bağımsız çift zincir kırık onarımının önemli olduğu ispatlanmıştır. Radyasyondan sonra üssel fazda gelişen hücrelerde toplam 72 gen, normal zamana göre 3 katı veya daha fazla oranda uyarılır ve ifade edilir. Özellikle *ddrA*, *ddrB*, *ddrC*, *ddrD* ve *pprA* 5 genleri stres yanıtında oldukça önemlidir (Daly ve Minton 1996, Tanaka vd. 2004, Michael M Cox ve Battista 2005).

2.10.2.2 DNA'nın uç kısmının korunması

ddrA gen lokusu 5 yeni gen içerisinde ilk karakterize edilendir. DNA'nın uç kısmının korunmasında rol aldığı bilinmektedir. Genin delesyonu sonucunda, zengin

besiyerindeki hücrelerde radyasyona duyarlılık az miktarda artar. Fakat hücreler, besince fakir besiyerine bırakıldığında canlılık oranı yabancı tipe göre 100 kat azalır. Çünkü *ddrA* proteini tek zincirli DNA'nın 3' ucuna bağlanmakta ve onu nükleolitik degradasyondan korumaktadır. *ddrA* geninin delesyonu, nükleolitik degradasyon ile genomik DNA miktarının ani bir şekilde azalmasına neden olur (Harris vd. 2004, Michael M Cox ve Battista 2005).

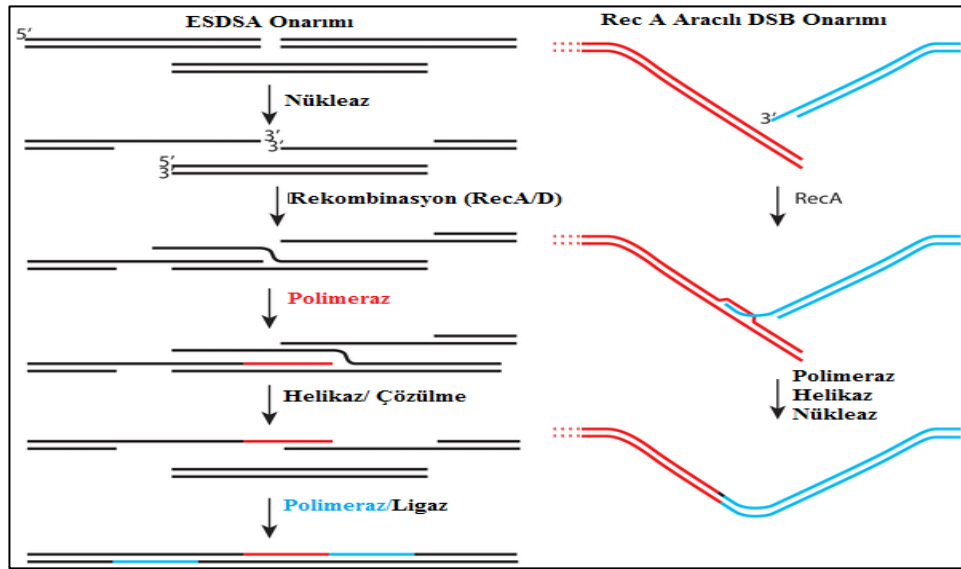
2.10.2.3 RecA bağımsız çift zincir kırık onarımı

D. radiodurans'da hem homolog olmayan uçların birleştirilmesi (NHEJ) hem de tek zincir bağlanma (SSA) mekanizmaları işlevseldir. Minsky vd. (2008) NHEJ'nin çift zincir kırık onarımında yararlı bir mekanizma olduğunu ileri sürmüştür. PprA ve PolX proteinlerinin NHEJ mekanizmasında rol oynadığı tahmin edilmektedir. Ancak sonraki çalışmalar ile klasik NHEJ sisteminin genelde hataya meyilli ve tam genom onarımına elverişsiz olduğu gözlenmiştir (Haber 2000, Levin-Zaidman vd. 2003, Englander vd. 2004, Lecointe vd. 2004, Narumi vd. 2004, Michael M Cox ve Battista 2005).

Son çalışmalar, *D. radiodurans* R1 suşunda sentez bağımlı tek zincir bağlanma (ESDSA) olarak adlandırılan daha etkili bir mekanizmanın bulunduğunu ileri sürmektedir (Şekil 2.5). Genomun onarılmasının ilk aşamasında bu mekanizma devrededir. Bu mekanizmada reaksiyonel tamirde görev alan Holiday kesişmesi olmaksızın bir onarım gerçekleşir. Bu süreçte çift zincir kırık oluştuktan sonra, serbest 3' ucu, kardeş çift zincirdeki homologuna saldırır ve DNA'nın ilk sentezi başlar. Kardeş zincir çözülür ve D-loop genişler. Yerinden ayrılmış hasarsız zincir, çift zincir kırığı sonucu oluşmuş serbest 3' ucuna bağlanır ve komplementer DNA sentezi gerçekleştirilir. Bu şekilde çift zincir kırıkları hatasız bir şekilde onarılmaktadır. RecA bağımsız DNA onarımında DdrB proteinin rolü büyüktür. *ddrA* ve *ddrB* genleri bakımından mutant olan suşlarda iyonize radyasyona karşı önemli ölçüde duyarlılığın arttığı gözlemlenmiştir. Bu da DdrA ve DdrB'nin onarımda tamamlayıcı bir aktiviteye sahip olduğunu gösterir (Daly ve Minton 1996, Tanaka vd. 2004, Michael M Cox ve Battista 2005).

2.10.2.4 Rekombinasyonel DNA onarımı

Rekombinasyonel onarım, DNA'nın hatasız bir şekilde onarılması için ekstra genetik bilginin kullanıldığı bir onarım şeklidir. *D. radiodurans*'da rekombinasyonel DNA onarımında rol oynayan proteinler; rekombinaz A (RecA), tek zincir bağlama proteini (SSB), Rekombinaz D (RecD), DNA polimeraz I, Rekombinaz R (RecR) ve Rekombinaz O (RecO)'dur. *E. coli*'nin RecA proteininin DNA zincir değişim reaksiyonları bu güne kadar detaylı olarak incelenmiştir. Burada çift zincirli DNA'nın bağlanmasından önce tek zincirli DNA'nın bağlanması düzenlenir. RecA proteini DNA'da hasarlı bölgelerde ve durmuş replikasyon çatalında tek zincir boşluklarına bağlanmayı hedefler. Bunun aksine, *D. radiodurans*'da RecA proteini öncelikle DNA çift zincirine bağlanır sonrasında homolog tek zincire bağlanır. Önemi tam olarak açıklanmamasına rağmen RecA'nın çift zincir kırık onarımında önemli fonksiyonu olduğu ileri sürülmektedir (Şekil 2.5), (Kim ve Cox 2002, Michael M Cox ve Battista 2005). Bu gen bakımından mutant suşlarda yüksek düzeyde UV radyasyona ve gama ışınına duyarlılık gözlemlenmiştir. Diğer organizmaların aksine hasar görmemiş *Deinococcal* hücrelerde RecA proteini bulunmaz. RecA'nın, DNA hasarını ve onarımı takiben sentezlendiği görülmüştür (Carroll vd. 1996, Makarova vd. 2001).



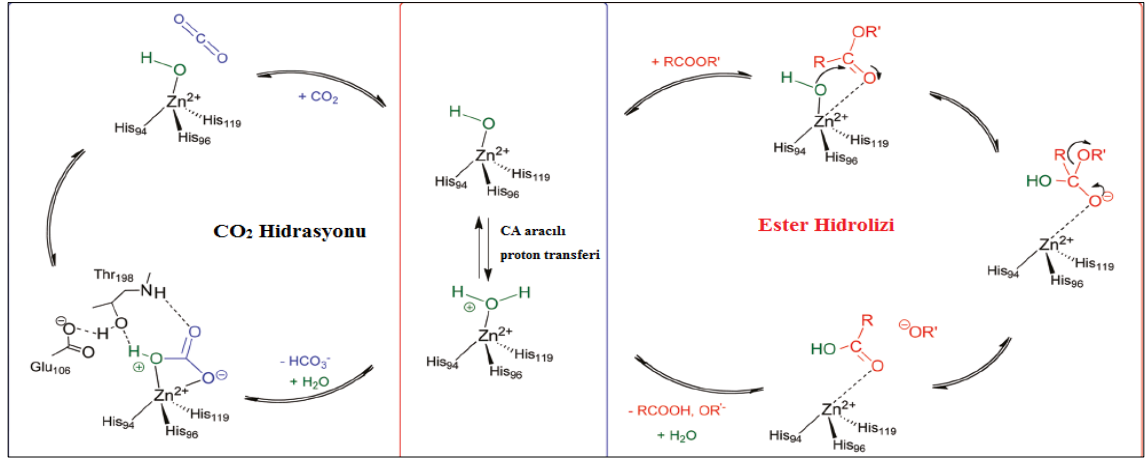
Şekil 2.5 *D. radiodurans*'da ESDSA ve Rec A aracılı çift zincir kırığının onarımının şematik görünümü (Cox vd. 2010)

2.11 Karbonik Anhidraz (CA)

Tüm canlı organizmalar için kilit rol oynayan bir metabolit olan CO_2 'in çevresel konsantrasyonu nadiren yüksektir. Ayrıca CO_2 ve HCO_3^- dengesi fizyolojik açıdan oldukça önemlidir. HCO_3^- negatif yüklüdür ve sıvı ortamlarda yüksek çözünürlüğe sahiptir. Bu yüzden CO_2 serbestçe hücreden difüze olabilirken, HCO_3^- hücre membranından taşınmak zorundadır. pH 6.3'ün üzerinde bu iki bileşik arasındaki eşitlik HCO_3^- 'a doğru yön değiştirir ve sonuçta CO_2 ile HCO_3^- 'in hücreler arası konsantrasyon dengesinin sürdürülmesi gerektiğinden, hücre için ciddi bir problem ortaya çıkar.

CO_2 ve HCO_3^- 'in birbirlerine dönüşümü fizyolojik pH'da çok yavaş olduğundan, bu reaksiyon için enzimatik katalizasyon gerekir. CO_2 'in HCO_3^- 'a dönüşümü, hücrede CO_2 'in yakalanması için önemli iken, HCO_3^- 'in CO_2 'e dönüşümü de onun hücrede taşınmasını kolaylaştırması bakımından önemlidir. Bu nedenle CO_2 'in HCO_3^- 'a enzimatik dönüşümü yalnızca hücresel enzimler için gerekli olan CO_2 seviyesini sağlamakla kalmaz, aynı zamanda CO_2 ve HCO_3^- 'in hücreler arası seviyesinin hücre için uygun düzeyde sürdürülmesine yardımcı olur (Smith ve Ferry 2000).

Karbonik anhidrazın substrat spesifikliği çok dar olup, çok CO_2 'e afinite gösterir. CA enziminin CO_2 hidrasyonu dışında, 4-nitrofenil asetat gibi bazı fenolik esterler de substrat olarak düşük afinite ile sağlanabilir. Ayrıca, asetaldehit ve pridin aldehitleri hidrolize edebilen karbonik anhidraz sınıfları da mevcuttur (Şekil 2.6), (Thorslund ve Lindskog 1967).



Şekil 2.6 CA enziminin substratları CO_2 ve ester hidrolizinin şematik görünümü (Lopez vd. 2011)

Karbonik anhidraz (Karbonat hidrolizaz, karbonik dehidrataz, karbonat anhidraz, karbonik asit anhidraz, DrCA, CA, E.C.4.2.1.1), Bakteriler, Ökaryotlar ve Arkelerde yaygın olarak bulunan CO_2 'in HCO_3^- 'a dönüşümünü tersinir olarak katalizleyen, aktif merkezinde Zn^{+2} bulunduran bir metalloenzimdir (Lindskog 1997, Supuran ve Scozzafava 2001, Scozzafava vd. 2006, Supuran ve Scozzaava 2007). Karbonik anhidraz enzimi ilk olarak 1933 yılında birbirlerinden bağımsız şekilde Meldrum ve Roughton ile Stadie ve O'Brien tarafından keşfedilmiştir. Meldrum ve Roughton (1933) enzimi sığır eritrositlerinden tam saflaştırmıştır (Meldrum ve Roughton 1933, Stadie ve O'Brien 1933). Enzim, HCO_3^- iyonunun eritrositlerden akciğer kılcallarına hızlı transferi için gerekli olan katalitik faktörün araştırıldığı bir çalışmada karakterize edilmiştir. Zn^{+2} 'nin katalizde spesifik bir rol oynadığını ve aktivitenin Zn^{+2} miktarı ile doğrudan bağlantılı bir çok çalışma ile ispatlanmış ve karbonik anhidraz enzimi ilk olarak Zn^{+2} metalloenzimi olarak tanımlanmıştır. β CA'nın varlığı ilk olarak 1939'da Neish tarafından bitki yaprak kloroplastının bir yapıtaşı olarak tespit edilmiştir.

Önceleri bitkilerdeki kloroplastik CA evrimsel ve yapısal olarak farklı bir CA formu olarak tanımlanamamıştır. Bundan yaklaşık 50 yıl sonra DNA dizileme teknolojisinin ortaya çıkmasıyla, bitkilerde saflaştırılan enzimin, hayvanlardakine kıyasla sülfonamid inhibitörlerine daha az duyarlı ve boyut olarak farklı olduğu gösterilmiştir (Neish 1939, Rowlett 2010). Enzim 1963 yılında ilk kez Veitch ve Blankenship tarafından prokaryotik bir konaktan izole edilmiştir. Solunum yolları enfeksiyonu çeken bir

hastanın nazal salgısında CA aktivitesi bulunmuştur. Ayrıca *Lactobacillus*, *Neisseria* ve *Streptococcus salivarius* ayrıca CA aktivitesinin incelendiği bakterilerdir. CA, Arke domaininde ilk olarak *methanoarchaea*'da tanımlanmış ve 1994 yılında *Methanosarcina thermophila*'dan saflaştırılıp karakterize edilmiştir (Alber ve Ferry 1994, Smith ve Ferry 2000).

Hücrede en etkili enzimler arasında yer alan CA, katalizlediği reaksiyonun hızını oldukça artırarak saniyede $10^4 - 10^6$ tepki hızına ulaştırır (Smith ve Ferry 2000, Supuran ve Scozzafava 2001). Enzim, HCO_3^- ve H^+ oluşturarak hem CO_2 'in uzaklaştırılmasında hem de hücre içi pH dengesinin korunmasında önemli rol oynar. Bunun dışında solunum, fotosentez, CO_2 ve iyon taşınımı gibi çok önemli temel hayati fonksiyonların yerine getirmesinde anahtar bir enzimdir (Sly ve Hu 1995, Henry vd. 1997).

2.11.1 CA ailesinin sınıflandırılması

CA'nın evrimsel olarak farklı 5 sınıfı α - , β - , γ - , δ - ve ϵ bulunmaktadır. Ancak bu gruplar içerisinde 3 domainde de en sık karşılaşılan ve üzerinde çalışılan 3 ana enzim sınıfı α , β ve γ olarak bilinmektedir. Bu 3 sınıf homolog enzim grubu arasında önemli bir farklılık bulunmamaktadır. Bağımsız bir kökene sahiptirler ve bu özelliklerine dayanılarak CA'nın konvergent (daralan) evrimin mükemmel bir örneği olduğu söylenebilir. Bir takım yapısal farklılıklara rağmen izoenzimlerin tamamında ortak olarak aktif bölgede Zn^{+2} atomu bulunur ve bu sebeple katalitik özellikleri bakımından benzerdir. Memelilerin çoğunda α -CA, bitkilerde β -CA bulunur. Diğer yandan prokaryotlarda CA'nın dağılımı düzensizdir (Hewett-Emmett ve Tashian 1996, Smith ve Ferry 2000).

2.11.1.1 α -CA

α -CA sınıfı enzimleri, ilk tespit edilmiş ve en iyi karakterizasyonu yapılmış, monomerik yapıdaki CA sınıfıdır. Çoğu 30 kDa molekül ağırlığındadır ve sıklıkla memelilerde bulunmasına rağmen az da olsa prokaryotlarda da gözlenmiştir. Memelilerde yaklaşık

16 izoenzimi tanımlanmıştır. Bu izoenzimler, farklı inhibitörlere duyarlılığı ve seçiciliği, katalitik oranları ve hücre içinde bulunma yeri ve dağılımına göre tanımlanmıştır (Çizelge 2.4), (Smith ve Ferry 2000, Supuran ve Scozzafava 2001, Tripp vd. 2001).

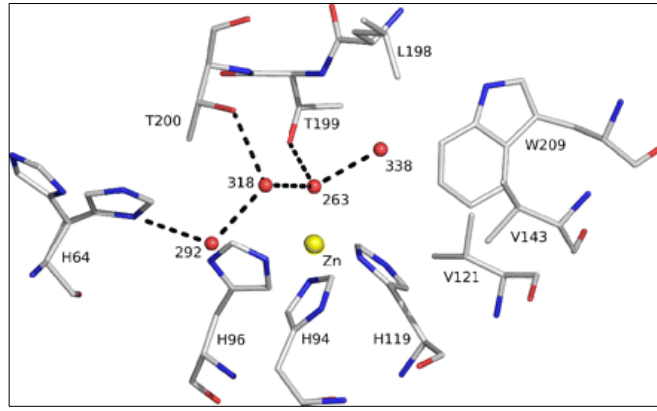
Çizelge 2.4 Yüksek omurgalılarda α -CA izoenzimlerinin hücre içi yerleşimleri, hidrataz Aktiviteleri ve Sulfonamid inhibisyonları (Supuran vd. 2003)

İzoenzim	Hücreyel Yerleşim	Katalitik Aktivite (CO ₂ Hidrasyonu)	Sulfonamidlerle İnhibisyon
CA I	Sitozol	Düşük (CAII'nin % 10'u)	Orta
CA II	Sitozol	Yüksek	Çok Yüksek
CA III	Sitozol	Çok Düşük (CAII'nin % 0,3'ü)	Çok Düşük
CA IV	Membrana bağlı	Yüksek	Yüksek
CA V	Mitokondri	Orta-Yüksek	Yüksek
CA VI	Salgı (hücre dışı)	Orta	Orta-Düşük
CA VII	Sitozol	Yüksek	Çok Yüksek
CA IX	Membrana bağlı	Yüksek	Yüksek
CA XII	Membranlar arası	Düşük-Orta	Düşük
CA XIII	Bilinmiyor	Yüksek	Bilinmiyor
CA XIV	Bilinmiyor	Düşük	Düşük
CA XV	Membrana bağlı	Düşük	Düşük

Bu izoenzimler arasında en iyi karakterize edilen sitozolik hCAII enzimidir. Bu izoenzim çok sayıda hücre ve dokuda bulunur. α -CA sınıfı enzimleri, katalitik özelliği en iyi çalışılmış olandır. Enzimlerin aktif bölgesi oyuk şeklindedir. Zn⁺² iyonu bu oyğun alt kısmına bitişiktir ve aktif bölgeye 3 histidin (His 94, His 96, His 119) ve bir H₂O veya OH⁻ iyonu ile bağlanır. Bu su molekülü aynı anda Thr199'un hidroksil ve karboksil kısmı ile de bağ yapmıştır.

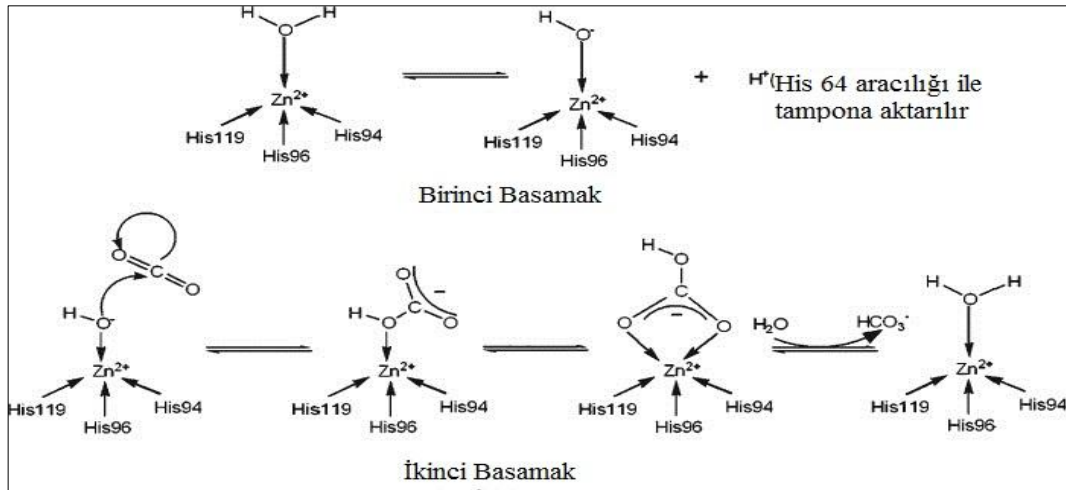
Bu durum Zn⁺² ile ilişkili olan su molekülünün nükleofilik karakterini arttırmakta ve bu sayede substratı olan CO₂'e nükleofilik saldırı için uygun şekilde yönlendirilmiş olmaktadır (Şekil 2.7), (Smith ve Ferry 2000, Tripp vd. 2001).

Birinci basamakta aktif bölgeden protonun dış ortama aktarılmasında His-64 birimi aracı rol oynamaktadır. Proton His-64'e, His-64 ile çinko atomu arasındaki su molekülleri aracılığı ile aktarılır. İkinci basamakta Zn^{+2} iyonuna bağlı $-OH$ (enzimin aktif formu) grubundaki bağ yapmayan elektron çifti, CO_2 molekülüne nükleofilik atak yaparak karbon oksijen bağı oluşturur ve bu esnada π bağı açılır. Sonraki aşamada, HCO_3^- iyonu oluşur ve su molekülüyle yer değiştirerek çözeltilmeye geçer. Son olarak Zn^{+2} iyonuna su molekülü bağlanır ve bileşik yeniden başlangıçtaki inaktif forma dönüşür (Johansson ve Forsman 1993, Smith ve Ferry 2000, Smith vd. 2000) (Şekil 2.8).



Şekil 2.7 hCAII izoenziminin aktif bölgesi ve reaktif bölgeleri

Çinko iyonu 3 histidin (His-94, His-96, and His-119) ve bir katalitik su (Wat-263) ile tetrahedral bir yapı oluşturmuştur (Sjöblom vd. 2009)



Şekil 2.8 α CA'nın CO_2 hidrasyon mekanizması (Zhang vd. 2010)

2.11.1.2 β - CA

Bu sınıfa ait enzimlerin ilk kristal yapısı 2000 yılında rapor edilmiştir. Önceleri sadece bitkilerde bulunduğu sanılan bu sınıftaki izoenzimler son zamanlarda çeşitli alg türlerinde ve geniş çapta bakterilerden izole edilmiştir. 1999 yılında Smith ve Ferry tarafından metanojenik bir Arke olan *M. thermoautotrophicum*'da β -CA'nın keşfedilmesiyle birlikte bu sınıfa ait enzimelerin 3 domainde de bulunduğu gösterilmiştir (Eriksson vd. 1996, Smith vd. 1999b, Mitsunashi vd. 2000, Smith ve Ferry 2000).

β -CA sınıfına ait enzimlerin özelliklerine bakıldığında, diğer iki gruptan çok net şekilde ayrılmalarını sağlayan farklılıklar ortaya konmuştur. α -CA ve γ -CA grubu sırasıyla monomer ve trimerken, β -CA sınıfında bulunan enzimler dimer, tetramer, heksamer ve oktamer halindedir. Temel yapıtaşının dimer olduğu ileri sürülmektedir. Ayrıca filogenetik analizler β -CA'nın diğer iki sınıfa nazaran daha çok çeşitlilik gösterdiklerine işaret etmektedir. Bu sınıftaki izoenzimlerin kristal yapısına bakıldığında aktif bölgedeki Zn^{+2} atomunun korunmuş iki sistein ve bir histidin ile bağlantı kurduğu görülür. Dizi analizleri bu sınıftaki izoenzimlerde yalnızca 5 aminoasit biriminin ve aktif bölgede 3 çinko ligandının, bir aspartat ve bir de arginin biriminin korunmuş olduğunu göstermektedir.

Yakın zamanda β -sınıfındaki izoenzimlerin bitki tipi ve Cab tipi diye 2 alt gruba ayrılacağı savunulmaktadır. Bunun nedeni, aralarındaki yapısal değişiklikler ve inhibitörlere karşı verilen cevaptaki farklılıklar gösterilmektedir. (Smith vd. 1999a, Kimber ve Pai 2000, Strop vd. 2001, Tripp vd. 2001).

Prokaryotlarda karbonik anhidrazlarla ilgili pek çok çalışma mevcuttur. Bu çalışmaların büyük kısmı ise klinik öneme sahip insan patojeni bakterilerle yürütülmüştür. Bu patojenlerle hücre içi ve hücre dışı lokalize olan ve çoğunlukla β grubu karbonik anhidrazilara rastlanmaktadır. Bu da özellikle patojenik suşlarda β -CA'nın yaygın olduğunu göstermektedir. Tez konusu kapsamında bulunan *Deinococcus* cinsine ait

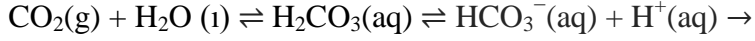
bakterilerle ilgili bir karbonik anhidraz enzim çalışması ise literatürde bulunmamaktadır. Ancak *D. radiodurans*'ın tüm genom dizilimi çıkarıldığında, β -CA sınıfı enziminin bakterideki varlığı bilinmektedir.

2.11.1.2.1 β -CA famiyasına dahil enzimlerin karakterizasyonlarında kullanılan temel analizler

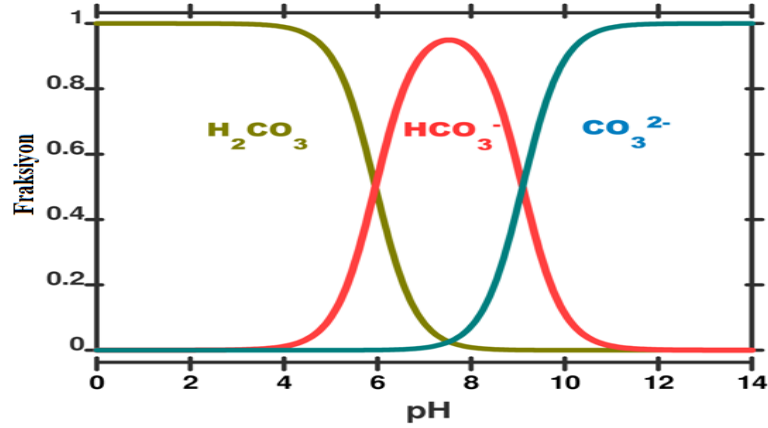
β -CA grubu karbonik anhidraz enzimi, diğer α - ve γ - gruplarına benzer şekilde CO_2 hidrasyonu yapmak adına temel substratı olan CO_2 'ye çok yüksek afinite ile bağlanırlar. Bu nedenle de enzimin substrat spesifikliğı çok dar bir aralıkta olup, neredeyse sadece CO_2 'ye karşı afinite gösterir. Enzim aktivitesi ise hidrataz enzim aktivitesi ile ölçülür. α -CA'lardan farklı olarak, esteraz aktivitesinde kullanılan *p*-nitrofenil asetat gibi fenolik esterlere afinitesi yok denecek kadar düşüktür (Thorslund ve Lindskog 1967). Çizelge 2.5'de patojenik bakterilerden klonlanan ve şimdiye kadar karakterize edilen CA'ların inhibisyon çalışmaları sunulmuştur. Çizelge'ye bakıldığında enzimlerin en fazla inhibe olduğu molekülün sülfonamid türevi ilaçlar olduğu görülmektedir. Bunların yanı sıra, enzimin minimum, maksimum ve optimum aktivite ve stabilite gösterdiği pH ve sıcaklık değerinin belirlenmesi de yürütülen diğer çalışmalar arasındadır.

Wilbur-Anderson (1948) ve Maren (1967) tarafından uygulanan CO_2 -hidrataz aktivitesi kolorometrik bir yöntem olup, CO_2 'in hidrasyonu sonucu açığa çıkan H^+ iyonları nedeniyle pH değerinin 9.0'dan 6.3'e düşer ve sonuçta indikatör olarak kullanılan brom timol mavisinin renginin sarımsı yeşile dönüşmesi için geçen süre kronometrik olarak ölçülür. β grubuna DrCA enziminin esteraz aktivitesinin çok düşük olması nedeniyle enzimin ileri karakterizasyon için sadece sürenin ölçüldüğü kronometrik bir analiz olan hidrataz aktivitesi, son yıllarda Stopped-Flow spektrofotometresi ile yürütülmektedir. Bu cihaz, hidrataz aktivitesinde substratın bir gaz olduğu CO_2 'nin bikarbonata milisaniyeler içerisindeki hızlı dönüşümünü ölçerken, reaksiyonu kapalı bir haznede, çok düşük hacimdeki kinetik ölçümlerle ve floresan bir spektrofotometre yardımıyla yapabilmektedir. Stopped-Flow spektrofotometresi kronometrik yöntemle göre çok daha hassas olduğundan, saflaştırılan karbonik anhidraz enzimlerin kinetik çalışmaları ve daha ileri karakterizasyon çalışmaları bu cihazla çalışılmaktadır.

CO₂'in suda çözülmesi ortam sıcaklığına, pH'sına ve basınca bağlı olarak değişir. Sıcaklık azaldıkça CO₂'in sudaki çözünürlüğü artmaktadır.



Bu reaksiyon kinetik olarak yavaştır. CO₂'nin sadece % 0.2-1'lik bir kısmı H₂CO₃'e dönüşür. CO₂'in büyük bir kısmı suda moleküler halde çözünmeden kalır. Ortam bazik olduğu durumda reaksiyon HCO₃⁻ oluşma eğilimi gösterir. Asidik olduğunda tam tersi yönde reaksiyon gerçekleşir. Şekil 2.9'da farklı pH düzeylerinde H₂CO₃, HCO₃⁻ ve CO₃²⁻'in dağılımı gösterilmektedir.



Şekil 2.9 H₂CO₃, HCO₃⁻ ve CO₃²⁻'in pH'da dağılımı

Çizelge 2.5 Patojenik bakterilerden klonlanan ve şimdiye kadar karakterize edilen CA'ların inhibisyon çalışmaları

Bakteri	Enzim Grubu	Enzimin Adı	İnhibisyon Çalışması		Referans
			<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	α	-	Sülfonami, anyonlar	Sülfonamid	Chirica vd. 1997, Elleby vd. 2001
<i>Neisseria sicca</i>	α	-	Sülfonamid	Sülfonamid	Adler vd. 1972, Sanders 1967
<i>Helicobacter pylori</i>	α	hp α CA	Sülfonamid, anyonlar	Sülfonamid	Chirica vd. 2002, Nishimori vd. 2006, 2007, Marcus vd. 2005, Shahidzadeh vd. 2005
<i>H. pylori</i>	β	hp β CA	Sülfonamid, anyonlar	Sülfonamid	Marcus vd. 2005, Shahidzadeh vd. 2005
<i>E. coli</i>	β	-	Çalışma yok	Çalışma yok	Cronk vd. 2006
<i>Haemophilus influenzae</i>	β	HICA	Bikarbonat	Çalışma yok	Cronk vd. 2006, Hoffmann vd. 2011
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	β	mtCA 1	Sülfonamid	Aktivite yok	Suarez Covarrubias vd. 2005, 2006
<i>M. tuberculosis</i>	β	mtCA 2	Sülfonamid	Aktivite yok	Minakuchi vd. 2009, Nishimori vd. 2009, 2010
<i>M. tuberculosis</i>	β	mtCA 3	Sülfonamid	Aktivite yok	Güzel vd. 2009, Carta vd. 2009, Davis vd. 2011, Winum vd. 2010
<i>Brucella suis</i>	β	bsCA1	Sülfonamid	Sülfonamid	Joseph et al. (2010), Vullo et al. (2010)
<i>Brucella suis</i>	β	bsCA2	Sülfonamid	Sülfonamid	Joseph vd. 2011, Winum vd. 2010
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	β	PCA	Sülfonamid, anyonlar	Çalışma yok	Burghout vd. 2010, 2011
<i>Salmonella enterica</i>	β	stCA 1	Sülfonamid, anyonlar	Çalışma yok	Vullo vd. 2011
<i>Salmonella enterica</i>	β	stCA 2	Sülfonamid, anyonlar	Çalışma yok	Vullo vd. 2011
<i>Vibrio cholerae</i>	Bilinmiyor	-	Sülfonamid	Sülfonamid	Kovacikova vd. 2010, Abuaita ve Withey 2009

2.11.1.3 γ -CA

Üçüncü sınıf olan γ enzimleri trimer yapıda olup, bu sınıfın yapısı aydınlatılmış tek üyesi 1994'te bir Arke olan *Methanosarcina thermophila*'dan izole edilmiş izoenzimdir. İzole edilen bu izoenzim aktif merkezinde Zn^{+2} yerine Co^{+2} bulundurur ve bu nedenle

daha yüksek hidrataz aktivitesi gösterir. Ayrıca *p*-nitrofenil asetatla esteraz aktivitesine sahiptir.

Metal bağlanma bölgesinde α -sınıfındaki gibi 3 histidin birimi ligand oluşturmaktadır; ancak bunların ikisi bir monomere, bir tanesi ise bitişikteki monomere aittir (Alber ve Ferry 1994, Smith vd. 1999a, Smith ve Ferry 2000, Tripp vd. 2001).

Son zamanlarda *Thalassiosira weissflogii*'den izole edilen karbonik anhidraz TWCA1'in diğer karbonik anhidraz sınıflarından ayrı bir sınıfa (δ -sınıfı) ait olduğu bildirilmiştir. TWCA1 öteki sınıflardaki karbonik anhidraz izoenzimlerine yapısal ve amino asit dizilimi açısından benzememektedir (Roberts vd. 1997).

2.11.2 Prokaryotik CA

Karbonik anhidrazın enzimolojik ve fizyolojik özellikleri ökaryotik domainde, özellikle insanlarda iyi çalışılmıştır. Prokaryotlar olan Bakteri ve Arkelerde daha az dikkat çekmiştir ve sınırlı sayıda organizmadan saflaştırma yapılmıştır. Kapsamlı filogenetik ve metabolik incelemeler sonucunda prokaryotik CA'nın çok çeşitli olduğu görülmüştür. Bakteri ve Arke domainlerinde β ve/veya γ sınıfına ait enzimler baskındır. Memelilerin tüm izoenzimleri α sınıfına aittir; fakat birkaç α sınıfı karbonik anhidraza ait genin bakteri domaininde de bulunduğu rapor edilmiştir (Smith vd. 1999a, Smith ve Ferry 2000, Tripp vd. 2001).

Prokaryotlarda, CA'lar iki temel fonksiyona sahiptir: (i) farklı ortamlar doku ve organizmalar arasında $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ taşınımı, (ii) enzimatik reaksiyonlar için $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ 'ün temini. Fotosentetik olmayan çok sayıda prokaryotta CA'nın amacı aktif bölge civarına $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ sağlamak veya bu bileşiklerin reaksiyon enerjetiklerini arttırmak için uzaklaştırmaktır. Karboksilasyon/dekarboksilasyon reaksiyonunu yürüten prokaryotik CA'ların çoğu, böylesi önemli bir fizyolojik fonksiyona sahiptir (Supuran ve Scozzaava 2007).

Prokaryotlarda α sınıfına ait enzim ilk kez *N. gonorrhoeae*'nin geninin klonlanmasıyla keşfedilmiştir. Bu keşiften sonra prokaryotlarda bu sınıfa ait sadece iki enzim daha tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Arke domaininde ait hiçbir türde α sınıfı CA'ya henüz rastlanmamıştır. Birkaç prokaryotik genom tarafından kodlanan α sınıfına ait genlere bakıldığında, karbonik anhidrazın 0,5-0,6 milyon yıl önce yaygın bir atasal gen tarafından evrimleştiği görülmüştür (Chirică vd. 1997, Soltes-Rak vd. 1997, Smith ve Ferry 2000).

Hem bitki hem de alg kloroplastlarında bulunan β sınıfına ait enzimlere, Arke ve Bakteri domaininde de rastlanmıştır. Çoğu prokaryot bu üç gruba ait genlerin 2 veya 3'üne sahiptir ya da memelilerde olduğu gibi aynı sınıfa ait çoklu genleri içerebilir. Birçok araştırmacı prokaryotlarda çoklu karbonik anhidraz genlerinin varlığının, prokaryot fizyolojisinde önemli bir rolünün olduğunu ileri sürmektedir. Fakat bu rolün sebebi hala bilinmemektedir. Ancak yürütülecek yeni çalışmalar, hiç şüphesiz ki prokaryotik karbonik anhidrazın yeni fonksiyonlarını ortaya çıkaracaktır (Smith vd. 1999a, Smith ve Ferry 2000).

Taze su kaynaklarında ve denizlerde yaşayan, mezofilik, termofilik, aerobik, anaerobik, patojenik, simbiyotik, metilotrofik, asetotrofik, metanojenik, asetojenik, heterotrofik ve fotosentetik türlerden elde edilen karbonik anhidrazlar, bu enzimlerin yalnızca prokaryotlarda baskın olmadığını, aynı zamanda metabolik olarak çok daha farklı türlerde de yaygın olduğu görüşünü kanıtlanmıştır. Daha önce de belirtildiği gibi incelenen bu türlerde α sınıfı CA'dan ziyade β ve γ sınıfına ait enzimler baskındır. Sadece birkaç mikroorganizmada α sınıfı CA tespit edilmiştir (Smith vd. 1999a, Smith ve Ferry 2000).

CA, dekarboksilasyon reaksiyonlarında oluşan CO_2 'in HCO_3^- 'a dönüşümüyle ortamdan uzaklaştırılmasını sağlayarak, bu reaksiyonların sağlıklı bir şekilde ilerlemesine yardımcı olmaktadır. Fotosentetik olmayan çeşitli prokaryotik hücrelerde önemli miktarda CO_2 fiksasyonu meydana gelir ve özellikle CA enziminin CO_2 'in hücre dışına taşınmasında ve CO_2 konsantrasyonunun hücre içi homeostasisinde önemli roller oynadığı bilinmektedir. Prokaryotik metabolizmada hemen hemen her yerde bulunan

CO₂'in dönüşümü ve taşınımı, çeşitli fizyolojik fonksiyonların gerçekleşmesinde CA'nın ne kadar önemli bir araç olduğunu göstermektedir. Yine prokaryotik birkaç türde izole edilen bir transmembran proteinin yapısal olarak β CA'ya benzediği ve CA'nın simport ve antiport mekanizmalarında önemli olduğu ileri sürülmektedir. Ayrıca CA, CO₂ ve HCO₃'ün birbirlerine dönüşümünü farklı birkaç reaksiyonda da gerçekleştirir; aldehit hidrasyonu, korboksilik esterlerin ve çeşitli halojen türevlerinin hidrolizi gibi. Fenol esterleri, sulfonik ve fosforik asitler bu enzim için substrat olarak aktivite gösterir. Bu aktiviteler insan α CA üzerinde tanımlanmış olmasına rağmen henüz β veya γ sınıf CA enzimlerinin bu reaksiyonlardaki rolü bilinmemektedir (Smith vd. 1999a, Smith ve Ferry 2000, Tripp vd. 2001).

Bitkilerin ve memelilerin enzimleri ile ilgili çok fazla detay bilinmesine rağmen prokaryotik karbonik anhidrazlar ile çalışmak neden önemlidir? Önceki çalışmalarda prokaryotlara ait karbonik anhidrazın dar bir işlevi olduğu belirtilmekteydi. Sınırlı sayıda prokaryotik türden saflaştırılan bu enzim ve CA aktivitesini belirlemek için sarfedilen çabaların bıraktığı etki, enzimin prokaryot fizyolojisinde önemli olmadığı yönündeydi. Şu anda prokaryotik karbonik anhidrazların genel olarak çok düşük miktarda oluşu ve bu durumun CA varlığının tespitini zorlaştırdığı bilinen bir gerçektir. γ sınıfı CA'nın keşfedilmesiyle birlikte birçok prokaryotun genom dizisinin incelenmesi ve prokaryotik enzimleri içeren antiserumların her sınıf CA'yı bulundurması, bu alanla ilgili daha kapsamlı çalışmalara olanak sağlamıştır. Bu analizler, karbonik anhidrazların aslında metabolik ve filogenetik olarak farklı prokaryotlarda (hem bakteri hem de arke domaini) yaygın olarak bulunan ve sık rastlanan bir enzim olduğunu ortaya koymakta ve prokaryot fizyolojisinde önemli rol oynadığını düşündürmektedir. Özellikle bu türlerin genomlarında enzimi aynı sınıfına ait çoklu gen kopyaları halinde bulundurmaları ve dolayısıyla çok çeşitli sayıda CA içermeleri, bu durumu desteklemektedir (Smith ve Ferry 2000).

2.12 Hücre İçi pH Homeostasisi

Tüm mikroorganizmalar yaşamsal fonksiyonlarını yerine getirebilmek ve gelişebilmek için hücre içi ortamda uygun bir pH aralığına ihtiyaç duymaktadır ve bunu hücre içi

dengeyi korumak üzere evrimleşmişlerdir. Çünkü proteinlerin çoğu farklı pH aralıklarında aktivite gösterirler. Bakteriler, buldukları ortamın pH'sında meydana gelen değişiklikleri algılayarak belirli bir süre içinde uyum sağlama yeteneğine sahiptir. Buna "pH homeostasis mekanizması" adı verilir. Hücre membranından proton taşınımını gerçekleştiren bu mekanizma ile sitoplazma pH'sı korunur (Slonczewski vd. 2009).

Bakteriyal pH homeostasisi fizyoloji, ekoloji ve patojenite de oldukça önemlidir. Hücrede enzim aktivitesi, reaksiyon oranı, protein stabilitesi, nükleik asitler ve diğer birçok biyolojik molekülün yapısını etkileyen hücre dışı pH, kısmen sitoplazmik veya hücre içi pH değerini belirler. Fakat birçok mikroorganizma pH homeostasisini bir noktaya kadar korur. Hücre zarının, proton ve diğer iyonlara geçirgenliğinin düşük olması, sitoplazma pH'sında büyük değişimlerin oluşmasını önler. Dolayısıyla ortamda bulunan protonlar, hücre zarından kolayca geçip sitoplazma pH'sını düşüremez. Sitoplazma pH'sının önemli ölçüde değişimini engelleyen ikinci faktör, hücrenin yüksek tamponlanma kapasitesidir (Wilks ve Slonczewski 2007, Slonczewski vd. 2009).

Sitoplazmik pH, hücre dışı pH'dan daha dar bir aralıkta tutulur. Sitoplazmik pH genellikle nötral pH'ya yakındır. Örneğin *E. coli*'nin optimal gelişme koşulları boyunca sitoplazmik pH'sı 7.4 ile 7.8 arasında sınırlandırılır. Oysa hücre dışı pH değişkendir ve pH 5.0-9.0 aralığındadır. Benzer bir oran *Bacillus subtilis*'de gözlemlenmiştir. *Acidithiobacillus ferrooxidans*'ın dinlenme hücrelerinin iç pH'sı 6.0-7.0 aralığındayken, hücre dışı pH 1.0-8.0 arasındadır (Cox vd. 1979, Shioi vd. 1980, Wilks ve Slonczewski 2007, Slonczewski vd. 2009).

Mikroorganizmalar pH 0'dan pH 13.0 ve üzerindeki çevresel pH oranlarında gelişebilme kapasitesine sahiptirler. Bu denli geniş pH aralığında yaşayabilen mikroorganizmalar ile çalışmak ilgi çekicidir. pH aralığı çok çeşitlense de genel olarak mikroorganizmalar için genel bir sınıflandırma yapmak mümkündür; pH 0.5-5.0 aralığında optimum gelişim gösteren mikroorganizmalar asidofil, pH 5.0-9.0 aralığında nötrofil, pH 9.0-12.0 aralığında yaşayan mikroorganizmalar ise alkalifil olarak

tanımlanır. Farklı habitatlara adapte olmuş ve farklı çevresel pH aralığında yaşayabilen Bakteri ve Arkelerde pH homeostasisi için farklı mekanizmalar evrimleşmiştir. pH spektrumunun hücre için uygun şartlarda korunması amacıyla homeostasinin bazı yaygın prensipleri uygulanır (Roadcap vd. 2006, Slonczewski vd. 2009).

Sitoplazmik pH, organeller, amino asitler gibi küçük organik moleküller, proteinlerin iyonlaşabilen grupları ve polifosfat gibi inorganik polimerlerce tamponlanır ve sitoplazma pH'sı bu sayede korunur. Bu parametrelerin her birinin tamponlama kapasitesi farklıdır. Çeşitli kaynakların tamponlama özelliğine rağmen, aktif pH homeostasis mekanizmalarının yokluğunda, iyonoforlar veya kalıcı asitler, bazlar ve protonların hücre içi ve hücre dışına hızlı bir şekilde geçiş mekanizmasıyla bir şekilde sitoplazmik pH değişir. Asitlerin membrandan geçişiyle birlikte sitoplazma içerisinde fermentasyon ürünü asitler konsantre hale gelir. Bu konsantre etki hücre içi ile hücre dışı arasında bir pH farklılığı varsa ve özellikle sitoplazmik pH, hücre dışı pH'dan daha yüksek ise gözlemlenir. pH farklılığı nötrofillerde genelde dardır; fakat asidofillerde çok geniştir. Bu sebeple membran geçirgenliği olan asitlerin üretimi asidofiller için çok daha toksik etki yaratır. Asitlerin sitoplazmada birikmesiyle kısmen veya tamamiyle pH homeostasisi bozulur ve gelişmeyi yavaşlatan organik asitlerin konsantrasyonu artabilir. Benzer şekilde sitoplazmik pH, hücre dışı pH'dan daha düşük olduğu durumlarda poliaminler gibi membran geçirgenliği olan bazların birikimi tercih edilir. Bu koşullar altında hücreye giren yüksüz bazlar sitoplazma içerisinde protonlanır ve sitoplazmik protonların tüketimi pH homeostasisinin bozulmasına yol açabilir (Salmond vd. 1984, Sally White vd. 1992, Slonczewski vd. 2009).

Hücre zarında yer alan elektron taşıma sistemi elemanlarının zardaki yerleşimleri taşıma işlemi sırasında protonların elektronlardan ayrılmasını sağlamaya uygundur. NADH gibi bir molekülden uzaklaştırılan iki elektron ve iki proton özgül taşıyıcılar aracılığıyla zincirin başından sonuna doğru taşınırlar. Bu sırada protonlar hücre dışına pompalanır Gram-negatif prokaryotlarda ise protonlar periplazmaya pompalanır. Protonların dışarıya çıkışı, zarın dış yüzeyinin nispeten asidik hale gelmesine neden olur. Elektron taşınmasının net sonucu olarak, zarın iki yüzeyi arasında hem pH gradiyenti hem de *elektro-kimyasal potansiyel* farkı ortaya çıkar. Zarın iç yüzeyi negatif elektrik yüklü ve

bazik hale gelirken, dış yüzeyi elektriksel olarak pozitif ve asidiktir. Bu pH gradiyenti ve elektrokimyasal potansiyel farkına proton itici (PMG) güç adı verilir. Zarın bir batarya gibi enerji yüklü hale gelmesine neden olur. Ortaya çıkan elektriksel enerjinin bir kısmı hücre tarafından ATP şeklinde korunur. Elektron taşınması sırasında zarın enerjistik hale gelmesiyle oluşan PMG enerjisi bakteriyal pH homeostasisi başta olmak üzere, ATP sentezi, iyon taşınması, kamçı rotasyonu ve hareket gibi birçok hayati fonksiyonun yerine getirilmesinde kullanılır. Enerji gerektiren işlemlerin sürdürülmesi için PMG yeterli düzeyde ve kalıcı olmalıdır. Bu nedenle de, membran proton geçirmez ve PMG hızlı bir şekilde proton veya yük hareketliliğiyle dağılmaz. Membranın iyon geçirgenliğini, özellikle proton geçirgenliğini, sağlamaya yönelik mekanizmalar olmasına rağmen, özellikle bazı türlerde bulunan belirli membran lipidleri (örneğin asidofilik Arkelerde tetraeterler gibi) sayesinde diğer türlere nazaran protonun zardan geçmesi çok daha zordur (Albers vd. 2001, Slonczewski vd. 2009)

Sitoplazmik pH'nın, hücre dışı pH'dan daha yüksek veya daha düşük olup olmamasına bağlı olarak ΔpH , biyoenerjik çalışmayı sürdüren proton itici gücü artırır veya azaltır. PMG elektrokimyasal veya kemiosmotik bir proton gradiyentidir. Bu güç aktif proton pompalama ve sekonder iyon hareketlerinin geçişiyle kurulmuştur (Slonczewski vd. 2009). Bazı Bakteri ve Arkelerde bulunan proton pompalama kompleksleriyle PMG üretimi arasında bir bağlantı bulunmaktadır. Bu proton pompalama kompleksleri elektron donörü olarak işlev görür. İyonoforların varlığı gibi durumlarda PMG azalabilir. Örneğin dinitrofenol veya permeant iyonların kombinasyonu sitoplazmik pH homeostatisinde başarısızlığa yol açabilir (Khan ve Macnab 1980, Slonczewski vd. 2009).

2.13 pH Homeostasis Mekanizmaları ve CA'nın Rolü

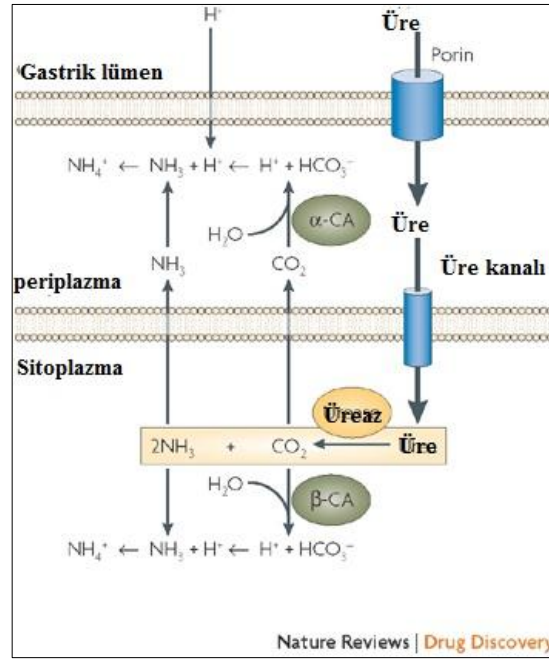
Aktif pH homeostasisini sürdüren farklı mekanizmalar büyük oranda pasif sitoplazmik tamponlamaya destek olur. Aktif pH homeostasisi mekanizmalarının ana kategorileri şunlardır: Katyonların (K^+ , Na^+) veya anyonların (Cl^-) uygun şekilde enerjistik olarak membrandan geçişi, alkalın pH homeostasisi olarak bilinen bir strateji, metabolik olarak üretilen asidik veya nötral son ürünlerin birbirlerine dönüşümü, asit kaynaklı amino asit

dekarboksilazlar, baz kaynaklı amino asit deaminazlar, karbonik anhidraz ile birlikte iş gören üreaz aktivitesi, sitoplazmik ve periplazmik pH'yı düzenleyen yağ asitleri, tetraeter lipidler, yüksek pH'da artış gösteren anyonik fosfolipidler veya spesifik nötral lipidler ile pH değişimine bağlı geçici hasardan proteinleri koruyan şaperonlar buna örnek verilebilir. (Richard vd. 2004, Padan vd. 2005, Sachs vd. 2005, Slonczewski vd. 2009).

Karbonik anhidrazlar, asit/baz kinetiği ile oksidatif fosforilasyon tarafından CO₂ şeklinde asit üretimi ve anaerobik glikoliz tarafından asit üretimi süreçlerinde hayati rol oynar. CO₂ ökoryotik hücrelerde örn; mitokondride oksidatif fosforilasyon ile arttığında, ya hücre membranından serbestçe difüze olur veya sitozolik CA'nın katalitik aktivitesine bağlı olarak H⁺ ve HCO₃⁻'e dönüştürülür. İnsanda, birçok hücrede CAII gibi CA'nın en hızlı izoformu eksprese olur veya beyinde ise CAIV ve CAXIV gibi diğer hızlı ekstraselüler izoformu ifade olur. CAIV'ın son zamanlarda intraselüler aktivitesi de gözlenmiş ve intraselüler aktivitenin daha yüksek olduğu görülmüştür. Ökaryotik canlılarda, farklı hücre tiplerinde ve dokularda asit/baz çiftinin membrandan taşınması, ekstraselüler ve intraselüler pH'nın düzenlenmesi, H⁺ tamponlanması, enerji metabolizması, H⁺/HCO₃⁻ membran taşınımı gibi fonksiyonların hepsi farklı CA izoformlarının aktivitesine ve CA'nın katalitik olmayan fonksiyonlarına bağlıdır (Deitmer vd. 2015).

Karbonik anhidrazın hücre içi pH homeostasisinin sağlanmasında önemli bir yeri olduğunu, mide lümeninde yaşamaya uyum sağlamış *Helicobacter pylori* bakterisinde görmek mümkündür. En iyi çalışılmış bakteriyel α CA (hpaCA), *H. pylori*'ye aittir. Mide lümeni asidik bir pH'ya sahiptir. *H. pylori* burada ancak birkaç dakika yaşayabilir ve en kısa sürede, yaşayabileceği pH'ya sahip olan mukus tabakasına ulaşması gerekir. Sülfatlanmış polisakkaritlerden oluşan mukus tabakası, mide asidinden protonların difüzyonuna olanak sağlamakta ve tampon görevi ile mukoza hücrelerini asitten korumaktadır. Bakteri hızlı hareketi ve üreaz enzimi sayesinde bu tabakaya ulaşır. Mide epitel hücrelerinden bikarbonat ve üre salgınmaktadır. Üreaz enzimi ile bu üreyi parçalayarak amonyak üretir ve bu amonyak bulutu içerisinde kendi yaşayabileceği pH'yı oluşturur. Yine bakteri sahip olduğu α ve β karbonik anhidraz enzimi sayesinde

karbondioksitin bikarbonata dönüşümünü katalizler ve çevreye adaptasyonunu sağlar. Şekil 2.10'da *H. pylori*'de pH homeostasisini sağlamada görevli olan CA enzimleri ve üreazın hücredeki fonksiyonu şematize edilmiştir (Amieva ve El-Omar 2008, Bury-Moné vd. 2008, Gürbüz ve Yılmaz 2011).



Şekil 2.10 *H. pylori*'de pH homeostasisini sağlamada görevli olan CA enzimleri ve üreazın ilişkisi (Supuran 2008)

Maya CA geninin delesyonunun yapıldığı bir çalışmada, mutant maya hücresinin oksijene karşı duyarlı olduğu ve CA'nın oksidatif strese karşı gerekli olduğu düşünülmüştür (Götz vd. 1999). Bakteriler üzerinde yapılacak olan yapısal biyolojik çalışmalar, pH homeostasisini destekleyen mekanizmaların, proton siklusunun ve proton hareketlerini kontrol eden komplekslerin açığa çıkarılmasında ve anlaşılmasında merkezi rol oynamaktadır. Bir takım fonksiyonel araştırmalar neticesinde bazı ekstremofillere ait yeni adaptasyon mekanizmaları bulunmuştur; ancak daha çok ekstremofilin genom verisine ulaşabilmek adına ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.14 Prokaryotik Hücrelerin Karbonik Anhidraz Enziminin Klonlama ve Saflaştırma Çalışmaları

Çizel 2.5’de de sunulduğu üzere, pek çok bakteri türünden α , β ve γ familyasına ait karbonik anhidraz enzimi klonlanmış ve saflaştırılmıştır. Prokaryotik karbonik anhidraz enzimi ilk kez Veitch ve Blankenship tarafından 1963 yılında *Neisseria sicca* bakterisinden saflaştırılmıştır. α grubuna dahil olan enzim 28.6 kDa ağırlığındadır. Enzimin zayıf bir esteraz aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Optimal pH 7.1 olduğu ve enzimin sulfonamidlerle inhibe edildiği bulunmuştur. Chirică vd.1997’de *N. gonorrhoeae* CA enzimini klonlayıp saflaştırmıştır. α grubuna dahil olan enzimin yüksek CO₂ hidrataz aktivitesine sahip olduğu ve pH 9.0 ve 25°C’de K_m değerinin 20 mM, (k_{cat} 1.1x 10⁶ s⁻¹) olduğu bildirilmiştir. Carta vd.2009’da *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin β CA enziminin klonlama ve karakterizasyon çalışmalarını yapmıştır. Enzimin yüksek oranda bir CO₂ hidrataz aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (k_{cat} of 9.8 × 10⁵ s⁻¹). Bunların yanı sıra *E. coli*, *Synechocystis* spp., *Asetobacterium woodi*, *Anabaena variabilis* ve *Rhodospirillum rubrum* gibi bir çok bakteride α - , β - ve γ -CA’ların klonlanması ve saflaştırılması çalışmaları yapılmıştır. (Veitch ve Blankenship 1963, Chirică vd. 1997, Carta vd. 2009).

Kuzucu’nun 2016 yılında yaptığı çalışmada, farklı dozlarda (100 Gy-1000 Gy aralığında) iyonize radyasyon uygulanmış *D. radiodurans* R1 hücresinde DrCA geninin ekspresyonu çalışılmıştır. Ekspresyon sonuçları artan radyasyon dozuna bağlı olarak 800 Gy’a kadar sürekli artmış (sırasıyla 2^{- $\Delta\Delta$ ct} değerleri; 6.18, 6.36, 8.11, 8.28, 8.63, 8.85, 9.38, 10.34, 7.89) bu noktadan sonra bir düşüş görülmüştür (Kuzucu 2016).

Bu çalışma dışında prokaryotlara dahil olan *Deinococcus* cinsi mikroorganizmalar radyasyon dirençlikleri nedeniyle ekstremofil olarak bilinmelerine rağmen doğrudan pH homeostasisi ve CA enziminin ilişkisinin çalışıldığı herhangi bir literatür verisi bulunmamaktadır. Ökaryotlarda çok detaylı olarak çalışılan α ve β -CA’lar prokaryotlarda da oldukça önemlidir. *H. pylori*’de aydınlatılan mekanizmadan da anlaşılacağı gibi pH homeostasisi ile karbonik anhidrazın doğrudan bir ilişkisi olduğu açıktır. *H. pylori* kadar ekstrem bir ortamda yaşayan *D. radiodurans*’da da

karbonik anhidraz enzimi ile radyasyon direnci ve pH homeostasisi arasındaki bağlantının yapılacağı her çalışma, ekstrem radyasyon direncinin aydınlatılmasına katkıda bulunacaktır.

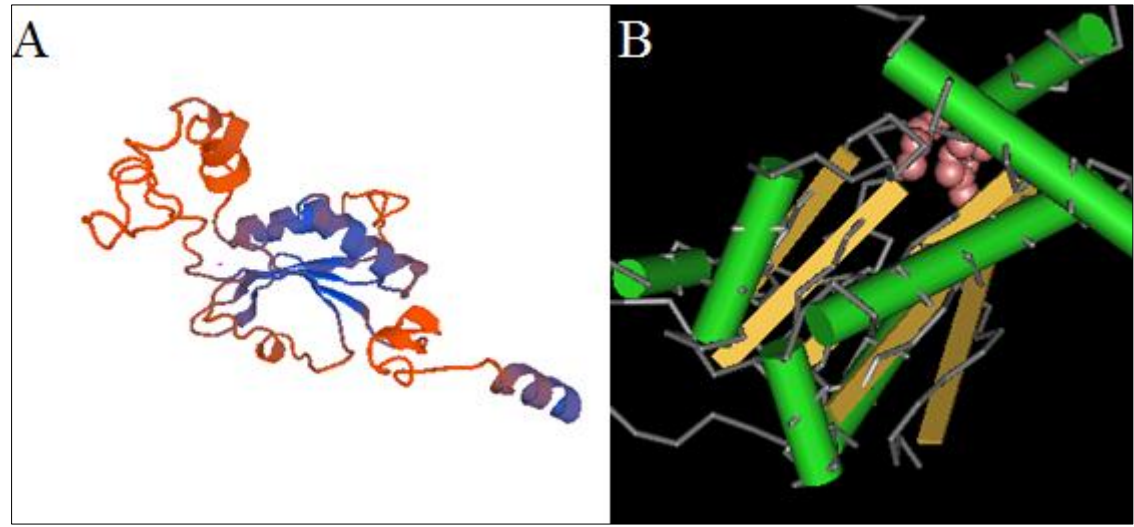
2.15 *D. radiodurans* R1'in tüm genom dizilemesi sonrası genomik çalışmalarla tespit edilen hipotetik karbonik anhidraz geni

Radyasyona dirençli model bir ekstremofil olması nedeniyle *D. radiodurans* R1 suşunun 2,648,638 bç'lik 1. kromozomundaki tüm genom dizilemesi 1999 yılında White ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (GenBank aksesyon no: NC_001263). Bu genom dizisi üzerinde yürütülen işlevsel ve karşılaştırmalı *in silico* genomik analizlerde, genomun 2,320,61-2,232,855 bazlarına tekabül eden 795 bç'lik hipotetik bir DR_2238 kodlu (aksesyon no: NC_001263.1) karbonik anhidraz enziminin varlığı saptanmıştır. Şekil 2.11'de de görüldüğü gibi beta_CA familyası içerisinde evrimsel olarak farklılaşmış, A'dan D'ye kadar sıralanan 4 ayrı filogenetik enzim kladı yer almaktadır. Açık okuma çerçevesi belirlenmiş bu genin 193 amino asitlik, β -CA grubunun C kladına dahil (cd03378) bir enzimi kodladığı tahmin edilmektedir. Bu hipotetik enzim veri tabanlarında mevcut diğer DNA ve/veya protein dizileri ile %58.95 dizi benzerliği gösteren putatif bir enzimdir. Enzimin karbonik anhidraz süper familyası (c100391) içerisindeki beta-CA familyasının (cd00382) beta_CA-kladC alt familyasına (cd03378) dahil olduğu düşünülmektedir. Bu hipotetik beta_CA-kladC grubuna dahil DR_2238 kodlu karbonik anhidraz enzimi en çok *Mycobacterium tuberculosis* H37RV (aksesyon no: 2A5V-D), *Synechocystis* sp. PCC6803 (aksesyon no: WP_01087397.1) ve *Desulfotalea psychrophila* (aksesyon no: GA635579) gibi türlerinin β -CA enzimlerine dizi benzerliği göstermektedir. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=239473>, erişim tarihi 2.12.2016).

Tez çalışması kapsamında klonlanan DrCA enziminin varlığı hipotetik olarak genomik çalışmalarla saptanmış, ancak şu ana kadar hiç saflaştırılıp karakterize edilmemiştir. Enzimin biyoinformatik araçlarla belirlenen olası üç boyutlu yapısına bakıldığında enzimin α heliks ve β pilili tabakalardan oluştuğu görülmektedir. Aktif bölgesinde bir çinko iyonu bulunmakta ve enzim homo-dimer bir yapı göstermektedir (Şekil 2.12).



Şekil 2.11 *D. radiodurans* R1 DR-2238 (NC_001263.1) karbonik anhidraz geninin beta_CA ailesinin olası C kladına dahil olduğunu gösteren kladogram



Şekil 2.12 Tez çalışması kapsamında *D. radiodurans* R1'den klonlanan beta-DrCA enziminin:

a. <https://swissmodel.expasy.org/> biyoinformatik aracıyla belirlenen ve **b.** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=239473> (erişim tarihi: 2.12.2016) adresinden alınan olası üç boyutlu yapısı

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Mikroorganizmalar

Tezde kullanılan *Deinococcus radiodurans* R1 (DSM 20539) ve *Escherichia coli* DH5 α suşu Leibniz-Institute DSMZ GmbH'den (DSM 6897) liyofilize formda tedarik edilmiştir. *E. coli* BL21 (DE3) Sigma'dan (CM0014) ticari olarak alınmıştır. Moleküler biyolojik çalışmalarda kullanılan bakteri konaklarının genel özellikleri çizelge 3.1'de sunulmuştur.

Çizelge 3.1 Kullanılan bakteri konakları

Tür	Suş	Genomda Mutasyona Uğramış Bölgeler	Kullanım Amacı
<i>E. coli</i>	DH5 Alpha	F- 80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1endA1hsdR17(rk-,mk+) phoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA1	Klonlama Hücresi
<i>E. coli</i>	BL21(DE3)	fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] Δ hsdS λ DE3 = λ sBamHIo Δ EcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δ in5	Ekspresyon Hücresi

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar çizelge 3.2 belirtilmiştir.

Çizelge 3.2 Kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka
Otoklav	Sümer SM3
Spektrometre	Perkin Elmer Lambda 35 UV-vis
PCR cihazı	Bio-Rad C1000 Touch
Elektroporasyon cihazı	Bio-Rad Gene Pulser Xcell™ Electroporation System
Gama ışını kaynağı	Izotop Ob-Servo Ignis
Çalkalamalı inkübatör (8-60°C)	Shellab SSI5
Epoch Mikro Plaka Okuyucu	Biotek Take3 Plate
Soğutmalı santrifüj	Hanil Smart R17
Yatay jel elektroforez tankı	Thermo Owl Easycast B2-BP
Protein elektroforez düzeneği	Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems
Ultrasonikatör	Sonics Vibra Cell VCX750
Vorteks	Heidolph Reaxtop
Hassas terazi	Shimadzu ATX 120
pH metre	Radiometer meterlab PHM 210
Kuru blok ısıtıcı (5-120°C)	IKA Dry Block Heater 1
Magnetik karıştırıcı	Heidolph MR Hei-Standart
Otomatik Pipetler	Eppendorf Research Plus
Kar makinası	Scotsman AF-20
Saf su cihazı	Nüve
Buzdolapları	Arçelik
Derin dondurucu (-30 °C)	Haier
Ultra low dondurucu (-80 °C)	Haier, New Brunswick U410
Mikrodalga fırın	Arzum
Jel görüntüleme cihazı	Vilber Lourmat Quantum ST5
Dijital orbital karıştırıcı	WiseShake SHO
Güç kaynağı	Thermo EC 300 XL
Işık mikroskopi	Leica DM 4000B

3.1.3 Sıvı ve Katı Besiyerleri

D. radiodurans'ın için stok ve inokülasyon kültürlerinde Tripton Glukoz Yeast Broth (TGYB) ve Tripton Glukoz Yeast Agar (TGYA) besiyerleri kullanılmıştır. Klonlama ve gen ekspresyonu için kullanılan *E. coli* DH5α ve *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinin geliştirilmesi için Luria Bertani Broth (LB) (Sigma L3022) ve Luria Broth Agar (LBA) besiyerleri kullanılmıştır. Gen ekspresyonu için Magic Media (Termo K6803) besiyeri kullanılmıştır. Elektroporasyon ve kimyasal transformasyon sonrasında hücreleri canlandırmak için bakteriler SOC (Glukoz içeren Super Optimal Broth) besiyerinde geliştirilmiştir. Besiyeri içerikleri aşağıda sunulmuştur.

Tripton Glukoz Yeast Broth (TGYB): 10 g/L tripton ve 5 g/L maya özütü içeren sıvı besiyeri hazırlanmıştır. Otoklav ile sterilizasyonun (121 °C, 1.1 atm basınçta 20 dk) ardından son konsantrasyon 5 g/L olacak şekilde saf su içerisinde hazırlanmış ve 0.22 µm steril filtreden geçirilerek steril edilmiş glukoz ilave edilmiştir (Raj vd. 1960).

Tripton Glukoz Yeast Agar (TGYA): Gerekli hacimde hazırlanmış TGYB besiyeri içerisine 15 g/L olacak şekilde agar ilave edilerek hazırlanmıştır (Raj vd. 1960).

Super Optimal Broth Besiyerleri (SOB/SOC): 2 gr Tripton, 0.5 gr maya ekstraktı, 0.2 ml 5 M NaCl, 0,25 ml 1 M KCl tartılarak 90 ml distile suda çözüldü. pH, 0.1 M HCl ile 7.0'ye ayarlanarak toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı. 121 °C'de, 20 dk süreyle sterilizasyondan sonra, 1 M steril MgCl₂'den (Sigma 7786-30-3) 1 ml ve 1 M steril MgSO₄'tan (Sigma 10034-99-8) 1ml ilave edilerek SOB besiyeri hazırlandı. SOC besiyeri için ise, 100 ml glukozsuz SOB sıvı besiyerine filtre ile steril edilmiş 1M glukozdan (Sigma G5767) 2 ml eklenmiştir.

1 M MgCl₂: 10.165 gr MgCl₂.6H₂O tartılıp, hacim 50 ml olacak şekilde distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

1M MgSO₄: 12.324 gr MgSO₄.7H₂O'dan tartılıp, hacim 50 ml olacak şekilde distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

5M NaCl: 14.61 gr NaCl, 50 ml distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

1M KCl: 3.73 gr KCl, 50 ml distile suda çözülmüştür.

1M Glukoz: 9.008 gr glukoz, 50 ml distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

3.1.4 Primerler

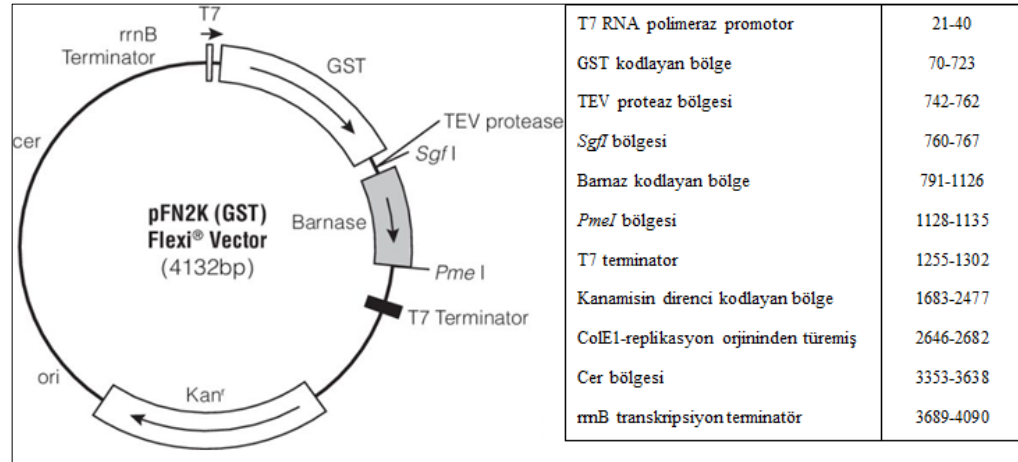
Çalışmada biyoinformatik araçlarla tasarlanan primerler PCR reaksiyonları, klonlama ve dizilemede kullanılmak üzere tez kapsamında dizayn edilmiştir (Çizelge 3.3) Tasarlanan bu ileri (Dr_2238_F) ve geri (Dr_2238_R) primer çifti, *D. radiodurans* R1'in Genbank'taki (AE000513.1), 795 bç.'lik karbonik anhidraz enzimini kodlayan DrCA gen dizisi temel alınarak oluşturulmuştur.

Çizelge 3.3 Kullanılan primerler

Primer	Baz Sırası	Tm	% GC	Dra Genomunda bağlandığı bazlar
Dr_2238_F	5'GCGTGCGATCGCCATGGGGCG3'	75	74	2232061-2232081
Dr_2238_R	5'CGAGGTTTAAACTTAGAGTGC3'	74.2	57	2232830-2232855

3.1.5 Plazmid Vektörü

Çalışmada drCA genini klonlamak ve proteinin ekspresyonunu gerçekleştirebilmek için Flexi vektör sistemine ait pFN2K (GST) vektörü (Flexi Vector Systems, Promega, C8820) kullanılmıştır. Vektörün gen haritası şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 PFN2K (GST) Flexi Vektörün Genetik Haritası ve Nükleotid Dizi içeriği

3.1.6 Kullanılan çözelti ve tamponların hazırlanışları

3.1.6.1 Agaroz jel elektroforezi

5x TBE(Tris-Borik Asit-EDTA) Tamponu: 50 gr Trizma base (Sigma T1503), 27.5 gr borik asit (Sigma B6768), 20 ml 0.5 M EDTA (Sigma E5134), 1 L distile su (pH:8.0)

5x Jel Yükleme Tamponu: 0,25gr bromfenol mavisi, 3 ml saf gliserol, 7 ml distile su

% 0,7-1 Jel: 0,7-1 gr agaroz (Sigma A9539) tartılarak, 100 ml TBE içerisinde çözülmüş ve jel sıcaklığı 60°C'nin altına düştüğünde 2 µl Etidyum Bromür (10 mg/ml) ilave edilerek, jel tank tepsisine dökülüp katılması sağlanmıştır.

3.1.6.2 Lizis tamponları

3.1.6.2.1 DrCA gDNA saflaştırması sırasında kullanılan lizis tamponu

80 ml ultra saf su içerisinde 0.302 g Trizma-base (Sigma T1503) çözülmüştür. Çözeltiye 0.093 g EDTA (Sigma E5134) ilave edildikten sonra, çözülmüştür. pH 0,1 M HCl ile 8.0'a ayarlanmıştır. 1 ml Triton X-100 (T8787) ilave edilerek homojen hale gelmesi beklenmiş ve son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. Lizozim konsantrasyonu 2 mg/µl olacak şekilde istenilen miktarda hazırlanan tampona çalışmadan hemen önce lizozim eklenmiştir.

3.1.6.2.2 Hücrelerin homojenizasyonu için kullanılan lizis tamponu

50 ml distile su içerisinde 8 gr/L NaCl (Sigma 13423), 0.2 gr/L KCl (Sigma 12636), 1,44 gr/L Na₂HPO₄ (Sigma 30427), 0.24 gr/L KH₂PO₄ (Sigma 04243) sırasıyla ilave edilip çözülmüştür. Çözeltiye DMSO'da (Sigma D2650) hazırlanmış 1 mM PMSF, %87'lik gliserolden (Sigma 15524) 11.494 ml, 0.0943 ml Triton-X100 (Sigma T8787) ve 0.2 mg/ml lizozim eklenerek, son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3.1.6.3 Esteraz aktivitesi tayininde kullanılan tampon ve çözeltiler

9 mM p-nitrofenil asetat çözeltisi: 27 mg p-nitrofenil asetat, buz üzerine koyularak 2 ml aseton (Sigma 24201) içinde çözülmüş ve üzerine 48 ml ultra saf su eklenerek çok yavaş şekilde karıştırılmıştır. Çözelti günlük hazırlanmıştır.

50 mM Tris-SO₄ Tampon Çözeltisi (pH 7.4): 6.055gr (0.05 mol) Tris-SO₄, 950 ml distile suda çözülmüş ve 1M H₂SO₄ ile pH 7.4'e kadar titre edilmiştir. Toplam hacim distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

3.1.6.4 Hidrataz aktivitesi tayininde kullanılan tampon ve çözeltiler

0,025 M HEPES Tamponu (pH 8.8): 1M HEPES tamponu (Sigma 83264) 0.025 M'a seyreltilmiştir ve 1M NaOH ile pH'sı ayarlanmıştır.

%0,2 (w/v) Brom-Timol Mavisi: 0.2 gr brom timol mavisi (Sigma 114413), 100 ml %50 (v/v) etanol-su karışımında çözülerek hazırlanmıştır.

CO₂ Çözeltisi: Soğuk ortamda tutulan erlen içerisine 200 ml distile su eklenmiş ve ağzı folyo ile kapatılmıştır. Ardından su, 90 sn süreyle CO₂ ile doyurulmuştur.

3.1.6.5 Transformasyon için kompetent hücre hazırlama çözeltileri

Elektroporasyonda kullanılmak üzere hazırlanan kompetent hücreleri oluşturmak için %10'luk gliserol kullanılmıştır. Kimyasal transformasyonda kullanılan kompetent hücreleri oluşturmak amacıyla 100 mM CaCl₂ (Sigma 449709) kullanılmıştır. 100 ml CaCl₂ çözeltisi hazırlanırken 1.47 gr CaCl₂ distile suda çözülmüştür.

3.1.6.6 Lowry protein tayininde kullanılan tampon ve çözeltiler

CuSO₄.5H₂O (Sigma 8027), Na₃Sitrat, Na₂CO₃ (Sigma 13418), NaOH (Sigma 06203), Phenol-Folin-Ciocalteu (Sigma 9252) reaktifi kullanılmıştır.

Kullanılan reaktifler:

A reaktifi: 0.5 gr CuSO₄.5H₂O ve 1 gr Na₃Sitrat 100 mL distile suda çözülmüştür.

B reaktifi: 20.0 gr Na₂CO₃ ve 4 gr NaOH, 1 L distile suda çözülmüştür.

C reaktifi: Taze hazırlanmış 50.0 ml B çözeltisine, 1 ml A çözeltisi ilave edilerek numune sayısına göre hacim ayarlanmıştır.

D reaktifi: (Phenol-Folin-Ciocalteu reaktifi): D reaktifi numune sayısına göre her numuneye 250 µl olacak şekilde hesaplanarak ve v/v oranında distile su ile hazırlanmıştır. 20 numune için 20 x 0.25 ml = 5 ml D reaktifi sulandırılmıştır.

3.1.6.7 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde (SDS-PAGE) kullanılan tampon ve çözeltiler

SDS-PAGE’de kullanılan ayırma ve yığma jellerinin içeriği çizelge 3.4’de belirtilmiştir.

- 1- **1M Tris-HCl (pH:8.8):** 100 ml için 12.14 gr Tris 80 ml distile suda çözülmüş ve derişik HCl ile pH ayarlandıktan sonra, son hacim 100 ml’ye tamamlanmıştır.
- 2- **1M Tris-HCl (pH:6.8):** 100 ml için 12.14 gr Tris 80 ml distile suda çözülmüş ve derişik HCl ile pH ayarlandıktan sonra son hacim 100 ml’ye tamamlanmıştır.
- 3- **%10’luk SDS:** 90 ml distile suda 10 gr SDS çözülmüş ve son hacim 100 ml’ye tamamlanmıştır.
- 4- **%0.1’lik Brom timol Mavisi:** Cam tüp içerisinde 0.01 gr boya tartılarak, 10 ml distile suda çözülmüştür.
- 5- **% 5’lik Amonyum Persülfat (APS):** Cam tüp içerisinde 0,5 gr APS tartılarak, 10 ml distile suda çözülmüştür.
- 6- **Akrilamid (%30)+Bisakrilamid (%0,8) çözeltisi:** 100 ml için 30 gr Akrilamid, 0.8 gr Bisakrilamid tartılmış ve 100 ml distile suda çözülmüştür.
- 7- **%5’lik TEMED (Tetra Metil Etilen Diamin):** 50 µl TEMED üzerine 950 µl distile su ilave edilerek hazırlanmıştır.

Çizelge 3.4 SDS-PAGE’de kullanılan jellerin hazırlanışı

	Ayırma Jeli (%12)	Yığma Jeli (%8)
dH ₂ O	3.13 ml	2.45 ml
1M Tris HCl (pH: 6.8)	-	0.41 ml
1M Tris HCl (pH: 8.8)	5 ml	-
Akrilamid (%30)+Bisakrilamid (%0,8) çözeltisi	4.4 ml	0.44 ml
%0.1’lik SDS	0.2 ml	0.03 ml
%5’lik TEMED	0.13 ml	0.03 ml
%5’lik APS	0.27 ml	0.07 ml

Yürütme Tamponu: 3 gr Tris ve 14.4 gr Glisin 100 ml distile suda çözümlü, pH 8.8’e ayarlanmıştır. Üzerine 10 ml %10’luk SDS eklenerek distile su ile hacim 1 L’ye tamamlanmıştır.

Yükleme Tamponu (10x): 0.65 ml Tris HCl pH:6.8 tamponuna 1'er ml %10'luk SDS, %100'lük gliserol ve %0.1'lik brom timol mavisi eklenmiş ve karıştırılarak hacim 10 ml'ye tamamlanmıştır. Kullanılmadan önce bu çözeltilerden 950 µl alınarak içerisine 50 µl β-merkaptoetanol eklenmiştir.

Sabitleştirme Çözeltisi: % 50 izopropanol, % 10 TCA ve % 40 oranında distile su ile hazırlanmıştır.

Coomassie Brilliant Blue Boyama Çözeltisi: % 0.1'lik Coomassie Brilliant Blue, % 50 metanol, % 10 asetik asit ve % 40 oranında distile su ile hazırlanmıştır.

Boya Giderme Çözeltisi: % 50 metanol, % 10 asetik asit ve % 40 oranında distile su ile hazırlanmıştır.

3.1.6.8 Rekombinant proteinin saflaştırma aşamasında kullanılan çözelti ve tamponlar

Lizis Tamponu: Protein saflaştırma kitinde (Magne GST, Promega, V8603) bulunan lizis tamponuna, 25 mM Tris HCl'de hazırlanmış 10 mg/ml lizozim içeren çözeltilerden 1/10 oranında ilave edilmiştir.

Elüsyon Tamponu: 0.5 M glutatyondan 100 µl ve 0.5 M Tris tamponundan (pH 8.1) 100 µl alınarak hacim distile su ile 1 ml'ye tamamlanmıştır. Bu tampon, -20°C'de yaklaşık 1 ay saklanarak kullanılmıştır.

3.1.6.9 Stok inhibitör çözeltileri

5mM MgSO₄.7H₂O: 0.123 gr MgSO₄.7H₂O'dan tartılıp, hacim 100 ml olacak şekilde distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

5mM MnSO₄.H₂O: 0.0845 gr MnSO₄.H₂O'dan tartılıp, hacim 100 ml olacak şekilde distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

5mM CaCO₃: 0.5 gr CaCO₃'dan tartılıp, hacim 100 ml olacak şekilde distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

5mM ZnSO₄: 0.144 gr ZnSO₄'dan tartılıp, hacim 100 ml olacak şekilde distile suda

çözülerek hazırlanmıştır.

0,01 M Sülfonamid: 0.172 gr Sülfonamid'den tartılıp, hacim 100 ml olacak şekilde distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

3.1.6.10 Diğer çözeltiler

Kanamisin: 50 mg/ml olacak şekilde stok çözelti distile su ile hazırlandıktan sonra filtre ile steril edilmiştir. 100'er µl'lik hacimlere bölünerek kullanılıncaya kadar 20°C'de saklanmıştır.

X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-beta-D-galakto-piranozit): 20 mg/ml olacak şekilde DMSO'da ve soğuk ortamda hazırlanmıştır. Stok çözeltisi kullanılıncaya kadar 20°C'de saklanmıştır.

IPTG (İzopropil β-D-1-tiyogalaktopiranozit): 100 mM için, 0.238 g IPTG 10 ml distile suda hazırlanmıştır. Filtreden geçirilerek, küçük hacimlere bölünmüş ve -20°C'de saklanmıştır.

100 mM ZnSO₄: 1.614 gr ZnSO₄ 100 ml distile suda çözülerek hazırlandıktan sonra, son konsantrasyon 0.05 mM olacak şekilde besiyerine ilave edilmiştir.

100 mM DTT (Ditiyotreitil): 1.545 gr DTT 100 ml distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

3.2 Metod

3.2.1 Primer tasarımı ve biyoinformatik çalışmalar

D. radiodurans R1'in tüm genom dizilimlerindeki (GenBank aksesyon numarası: AE000513.1) β familyasına dahil karbonik anhidraz enzimine (drCA) ait DR_2238 kodlu genin, NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanındaki baz dizisine göre primer dizaynı yapılmıştır. Bu işlem için Flexi Vector Systems (Promega, C8820) çevirim içi programı olan *Flexi Vector Primer Design Tool* kullanılmıştır. Bu araçla tasarlanan primerler *BLAST* (Basic Local Alignment Search

Tool) ile *D. radiodurans* R1 genomu içerisinde araştırılmıştır. Ayrıca primer tasarımı sırasında şu hususlara dikkat edilmiştir:

- 1- Seçilen ileri ve geri primerlerin, hedef gen bölgesinin dışında ve genomdaki diğer dizilerle hiçbir benzerlik içermeyen dizilimde olmaları,
- 2- Dizayn edilen primerlerin 3' ucunun GC stabilitesi göstermesi (maksimum: 2 G veya C),
- 3- Primerlerin, toplam GC oranının %55'i geçmemesi,
- 4- Primerlerin son nükleotidinin G veya C olacak şekilde hazırlanması,
- 5- Primerlerin uzunluğunun minimum 17, maksimum 40 bç aralığında olması,
- 6- Primerlerin Tm (erime sıcaklığı) değerleri arasındaki farkın maksimum 5°C olması ve
- 7- Bağlanma sıcaklığı açısından, primerlerin Tm değerlerinin $Tm = 64.9 + 41 \times (yG + zC - 16.4) / (wA + xT + yG + zC)$ formülü ile hesaplanarak 67°C'yi geçmemesi (Rozen ve Skaletsky 1999).

3.2.2 *D. radiodurans* R1 suşunun geliştirilmesi

D. radiodurans R1, TGYA plaklarına ekildikten sonra 32°C'de 36 saat inkübe edilmiştir. Aktif kültürü ise aseptik koşullarda bu kültürlerden öze yardımıyla tek koloni alınarak 100 ml'lik erlen içerisindeki 50 ml TGYB besiyerine ekilmesi ve 32°C'de 175 rpm'de 10 saat süreyle inkübe edilmesi suretiyle hazırlanmıştır.

3.2.3 Karbonik anhidraz aktivite tayin metodları

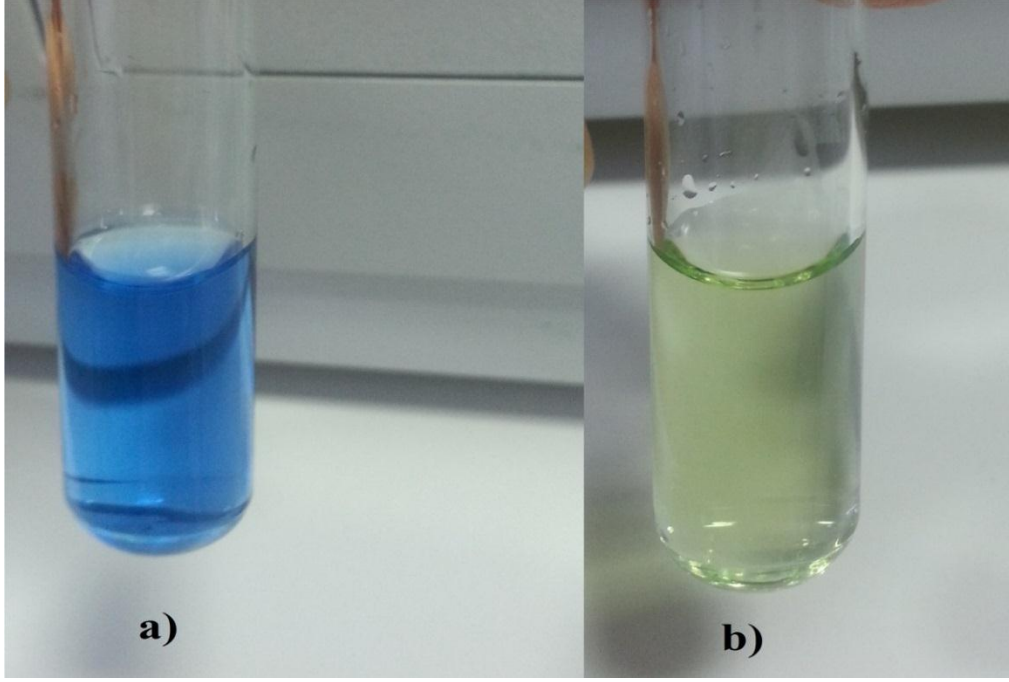
Aşağıda açıklanan enzim aktivitesi tayinleri üçer tekrarlı olarak yürütülmüştür.

3.2.3.1 CO₂-hidrataz aktivitesi

Klonlanan drCA geni organizmada bulunan karbonik anhidraz enzimlerinden β grubuna dahil olduğundan optimum sıcaklığın ve termal stabilitenin belirlenmesinde hidrataz aktivitesine bakılmıştır. Hidrataz aktivitesinde Wilbur-Anderson (1948) ve Maren (1967) metodları uygulanmıştır. Wilbur-Anderson yöntemi, CO₂'in hidratasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonu nedeniyle pH değerinin 9.0'dan 6.3'e düşmesi için geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanır. İndikatör olarak pH 7.4'te renk değişimi gösteren % 0.04'lük brom timol mavisi, tampon olarak pH 'sı 8.0-9.0 olan 0.025 M HEPES tamponu kullanılmıştır. Kör tüpüne sırasıyla 0.1 ml indikatör, 0.6 ml distile su ve 2.5 ml doymun CO₂ çözeltisi toplam hacim 4.2 ml olacak şekilde eklenmiştir. Daha sonra bir kronometre yardımıyla CO₂ çözeltisi katıldığı andan itibaren indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi için geçen süre belirlenmiştir (t₀). Reaksiyon tüpüne ise sudan 0.05 ml azaltarak bunun yerine enzim çözeltisi eklenmiş ve yine en son olarak CO₂ çözeltisi ilave edilir edilmez, indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi için geçen süre bir kronometre vasıtasıyla belirlenmiştir (t_c). Yönteme göre DrCA enzim aktivitesi için bir ünite (U) enzim olmaksızın kendiliğinden enzim meydana gelen CO₂ hidrasyonu süresini oda ısısında yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. (pH: 8.0-9.0, 25°C) Buna göre:

$$1 \text{ Ünite enzim (U/ml)} = (t_0) - (t_c) / (t_c)$$

formülü uygulanarak kullanılan enzim çözeltisi hacmine bağlı olarak CO₂ hidrataz enzim ünitesi değeri hesaplanmıştır (Maren 1967).



Şekil 3.1 Hidrataz aktivitesinde, CO₂ hidrasyonu sırasında reaksiyon tüplerindeki:
a. reaksiyon öncesi, b. reaksiyon sonrası görünüm

3.2.3.2 Esteraz aktivitesi

Bazı çalışmalarda; CA aktivitesi ölçümleri esteraz aktivitesine bakılarak da belirlenebilmektedir. Bu yöntemde CA enzimi, substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenil asetatı, *p*-nitrofenol ve *p*-nitrofenolata hidroliz eder. Bu son ürünler 348 nm dalga boyunda absorbans vermektedir (Şekil 3.2). Aktivite işleminde 1 ml'lik kuvarz küvetlere kör tüp için 700 µl Tris-SO₄ (pH 7.4) tamponu ve 300 µl substrat, enzim içeren küvete ise 600 µl Tris-SO₄ (pH 7.4) tamponu, 300 µl substrat ve 100 µl enzim çözeltisi koyulmasının ardından 3 dk süreyle, 25 °C'de 348 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır. Bir ünite (U/ml) karbonik anhidraz, dakikada 1 mmolar *p*-nitrofenolün, 348 nm de, 25°C'de ve pH 7.4'de, oluşumu için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Aktivite hesabı aşağıdaki formüle göre yapılmıştır (Verpoorte vd. 1967).

$$\text{Ünite /ml enzim} = (\Delta\text{OD} \times V_f \times D_f) / (E_{348\text{nm}} \times t \times b \times V_e)$$

OD = Optik yoğunluk

$\Delta\text{OD} = \text{OD}_{348\text{nm}}\text{Örnek} - \text{OD}_{348\text{nm}}\text{Kör}$

V_f = Tüpte hazırlanan toplam hacim (1 ml)

D_f = Dilüsyon faktörü (1)

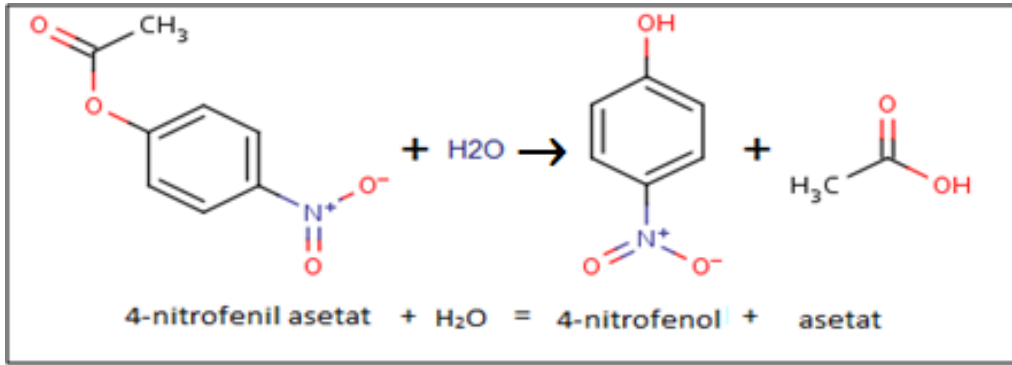
$E_{348\text{nm}}$ = *p*-nitrofenolün 348 nm'deki milimolar ekstinksiyon katsayısı (pH 7.4)*

t = Reaksiyon zamanı (3 dakika)

b = Küvetin ışık geçiş yolu (1 cm)

V_e = Küvette okutulan reaksiyon karışımındaki enzim hacmi (0.1 ml)

* Ekstinsiyon katsayısı, enzim aktivitesinde uygulanan sıcaklığa göre 0.2 L/mM.cm cinsinden hesaplanmıştır (Halvorson 1966).



Şekil 3.2 CA'nın *p*-nitroferol substratının kullanıldığı esteraz aktivitesi mekanizması

3.2.4 D. radiodurans R1 gelişim eğrisinin ve karbonik anhidraz aktivite eğrisinin oluşturulması

D. radiodurans R1 gelişme eğrisinin çıkarılması amacıyla, öncelikle stok kültürden alınan tek koloni, 5 ml TGYB besiyerinde aşılansak, 32°C, 30°'lik açı ile 175 rpm'de, 15 saat inkübe edilmiştir. Hazırlanan aktif kültür, 2 L'lik erlenlerde bulunan 795 ml TGYB steril besiyerine inoküle edilerek ve her saat başında spektrofotometrede (OD₆₀₀) hücre yoğunluğu ölçümü yapılmıştır. Ölçümler 72 saat süresince gerçekleştirilmiştir. Optik yoğunluğu (OD) okunan örneklerden ayrıca seyreltme plaka yöntemi ile TGYA katı besiyerine ekim yapılmış, 32°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra koloniler sayılmıştır. Oluşan koloniler, gözle ve görüntüleme cihazı ile sayılarak büyüme eğrisi oluşturulmuştur.

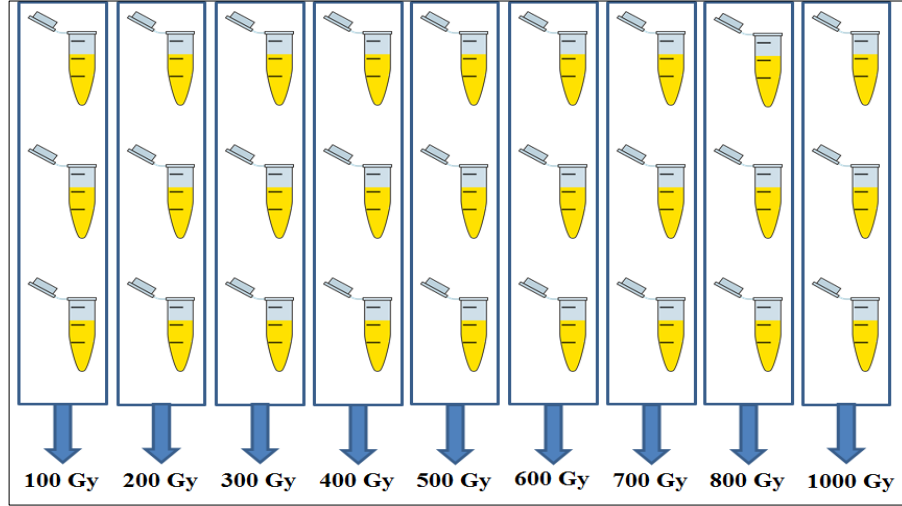
Bakteri gelişim eğrisi oluşturma aşamasında ölçüm yapılan her saatte (72 saat) aynı zamanda 1'er ml hücre kültürü alınarak, üç tekrarlı karbonik anhidraz aktivitesine bakılmıştır. Santrifüj yapılan örnekler içerisine %10'luk gliserolden 1 ml eklenmiş ve -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Aktivite çalışmasında, öncelikle örnekler santrifüj edilmiş ve süpernatant dökülüp, pelet içerisine 1 ml lizis tamponu ilave edilmiştir. 20 dk buz üzerinde inkübe edildikten sonra, ultrasonikatör ile hücreler parçalanmıştır. Sonikasyona %35-45 amplitude'de, 20 sn "on" 15 sn "off" şeklinde toplam 5 dk süreyle devam edilmiştir. Sonikasyondan sonra tekrar santrifüj yapıp, intraselüler enzim fraksiyonunu içeren süpernatant alınarak, spektrofotometre de 348 nm'de drCA hidrataz aktivitesi ölçümü yapılmış ve hücre büyüme eğrisine paralel olarak bir de drCA aktivite eğrisi oluşturulmuştur.

3.2.5 D. radiodurans'a radyasyon uygulanması ve sonrasında CA aktivitesi ölçümü

Tez kapsamında yapılan radyasyon deneyi Türkiye Atom Enerjisi Kurumu Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkez'inde gerçekleştirilmiştir. Tek koloni ekimi yapılmış 15 saatlik *D. radiodurans* R1 kültüründen alınan 1 ml kültür, 99 ml TGYB besiyerinde inokülasyona bırakılmış ve OD₆₀₀'si yaklaşık olarak 0.6 olana kadar 30°C, 175 rpm de inkübasyona devam edilmiştir.

Üreyen kültür 10 dakika buz içerisinde bekletilerek hücre üreme fazının sabit kalması sağlanmıştır. Steril eppendorf tüplerine 0.5 ml olacak şekilde bu kültürden aktarılmıştır. Ardından hemen buz içerisine yerleştirilen tüpler radyasyon uygulaması için gama radyasyon kaynağına götürülmüştür. Her defasında üçer tekrar olacak şekilde cihaza yerleştirilen tüplere, sırasıyla 100 Gy'dan başlayarak 100'er Gy artacak şekilde 1000 Gy'a kadar radyasyon dozları uygulanmıştır (Şekil 3.3). Dozların uygulanmasının ardından 20000 x g'de 10 dk santrifüj edilen tüplerdeki süpernatant dökülmüş ve hücreler üzerine %10'luk gliserolden 1 ml eklenmiş ve örnekler santrifüj edilmiştir. Süpernatant dökülerek pelet içerisine 1 ml lizis tamponu ilave edilmiştir. 20 dk buz üzerinde tutulan örnekler ultrasonikatör ile sonike edilmiştir. Sonikasyon yine % 35-45 amplitude'de 20 sn "on" 15 sn "off" şeklinde toplam 5 dk süreyle yapılmıştır.

Sonikasyondan sonra tekrar santrifüj edilip süpernatant alınarak drCA aktivitesi ölçümü gerçekleştirilmiş ve aktivite eğrisi oluşturulmuştur.



Şekil 3.3 D. radiodurans R1'e radyasyon uygulaması deney şeması

3.2.6 Farklı pH değerine sahip TGYB besiyerlerinde DrCA aktivitesinin belirlenmesi

Bu amaçla, pH değeri 0.25'er farklılıkla pH 5.0-9.0 olacak şekilde hazırlanan TGYB besiyerlerinde çoğaltılan *D. radiodurans* hücrelerinden 1., 3., 5. ve 24. Saatlerde üçer tekrarlı olacak şekilde örnek alınarak drCA aktivitesine bakılmış ve aktivite eğrisi oluşturulmuştur.

TGYB besiyerleri hazırlanırken pH asetat tamponu ile 5.00, 5.25 ve 5.50; sitrat ve karbonat tamponu ile: 5.75, 6.00, 6.25 ve 6.50; fosfat tamponu ile 6.75, 7.00, 7.25, 7.50 ve 7.75; Tris-HCl tamponu ile 8.00, 8.25, 8.50, 8.75 ve 9.00'a ayarlanmıştır. Bütün besiyerleri için; tamponlayıcı madde, tripton ve yeast ekstrakt, 30 ml distile suda karıştırılmış, pH istenilen seviyeye getirildikten sonra, hacim 38 ml'ye su ile tamamlanarak yeni bir erlene aktarılmıştır. Otoklavlanan besiyerine steril 1 M glukozdan 1.1 ml ilave edilerek karıştırılmıştır.

3.2.7 *D. radiodurans* R1'in genomik DNA'sının saflaştırılması

Saflaştırma işlemine başlamadan önce sıcak su banyosu 55 °C'ye, çalkalamalı inkübatör 37 °C'ye ayarlandı. Tek koloniden hazırlanmış gece kültüründen alınan 1 ml ile oda sıcaklığına gelmiş 99 ml TGYB (250 ml'lik erlen)'ye inokülasyon yapıldı ve OD₆₀₀'si yaklaşık olarak 0.2 olana kadar inkübe edildi (30°C, 175 rpm). Bu absorbansta *D. radiodurans* R1'in hücre konsantrasyonu yaklaşık 0.5x10⁹ CFU/ml dir. DNA saflaştırma için kullanılacak hücre miktarı 4 ml'de 2x10⁹ CFU/ml olarak ayarlanarak, 15000 rpm'de 5 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Hücre duvarının degradasyonu için lizozim parçalama tamponu kullanıldı. 4 ml hücre kültürü pelletine bu solüsyondan 180 µl eklendi ve karıştırıldı. Ardından 37 °C'de 30 dk çalkalamalı inkübatörde 100 rpm'de inkübasyon yapıldı. Süre sonunda 20 µl Proteinaz K (Sigma, P5056) ilave edildi ve 5 sn vortekslendi. Sonrasında genomik DNA izolasyonu için PureLink Genomic DNA izolasyon kiti (Thermo, K182002) kullanıldı ve kitte belirtildiği şekilde DNA izolasyonu yapıldı. Santrifüj tüpündeki saflaştırılmış DNA, steril PCR tüplerinde 1'er µL olacak şekilde mikrosantrifüj tüplerine ayrıldı ve kullanılmaya kadar -20 °C'de saklandı.

3.2.8 PCR ile gen izolasyonu

drCA geni için farklı sıcaklıklarda *Pfu* (Thermo, EP0501) ve *Taq* (Sigma, D186) polimeraz enzimleri kullanarak Gradient PCR yapılmıştır. PCR reaksiyon karışımı hazırlanırken ilk olarak ultra saf su eklenmiştir. Sonrasında sırasıyla çizelge 3.1 ve 3.2'de belirtilen miktarlarda diğer bileşenler (primerler ve enzimler hariç) pipetlenmiş, vortekslenerek, PCR tüplerine paylaştırılmıştır.

Son olarak her bir tüpe primerler ile DNA polimeraz eklenmiştir. Her bir örnek için son hacim 50 µl olacak şekilde hazırlanan PCR reaksiyonları, PCR cihazına yerleştirilerek, çizelge 3.3 ve 3.4'de açıklandığı üzere PCR programları yürütülmüştür.

Çizelge 3.1 DrCA geninin *Pfu* DNA polimeraz (Termo, EP0501) ile PCR reaksiyon karışımı protokolü

Bileşen	Miktar (µl)
Steril Ultra Saf Su	40.5
Tampon (Mg ⁺⁺ ilaveli)	5
dNTP mix (10 mM)	1
Kalıp DNA (< 1 µg)	1
İleri Primer (50 µM)	1
Geri Primer (50 µM)	1
<i>Pfu</i> DNA polimeraz (2.5 U/µl)	0.5
TOPLAM HACİM	50

Çizelge 3.2 DrCA geninin *Taq* DNA polimeraz (Sigma, D186) ile PCR reaksiyon karışımı protokolü

Bileşen	Miktar (µl)
Steril ultra safsu	32
5x Q-solution	10
Tampon (Mg ⁺⁺ ilaveli)	5
dNTP mix (10 mM)	1
Kalıp DNA (< 1 µg)	0.5
İleri Primer (50 µM)	0.5
Geri Primer (50 µM)	0.5
<i>taq</i> DNA polimeraz (5 U/µl)	0.5
TOPLAM HACİM	50

Çizelge 3.3 *Pfu* DNA polimeraz ile uygulanan PCR programı

Döngü Adı	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	3 dk	1
Denatürasyon	95 °C	30 sn	33
Bağlanma	52, 50.8, 49.4, 46.4, 45°C	30 sn	
Uzama	72 °C	2 dk	
Son Uzama	72 °C	15 dk	1
Bekleme	4 °C	∞	1

Çizelge 3.4 *Taq* DNA polimeraz ile uygulanan PCR programı

Döngü Adı	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	94 °C	3 dk	1
Denatürasyon	94 °C	30 sn	33
Bağlanma	52,54.8,57.5,60.9,63.6,65.2,66°C	30 sn	
Uzama	72 °C	1 dk	
Son Uzama	72 °C	10 dk	1
Bekleme	4 °C	∞	1

3.2.9 DNA konsantrasyonunun ve saflığının ölçülmesi

DNA konsantrasyonu ve saflık ölçümleri 2'şer µl DNA örneğinin Epoch Mikropilaka Okuyucuda (Biotek, Take 3) ölçülmesiyle yapılmıştır. DNA konsantrasyonu 260 nm'deki optik yoğunluğundan (OD), saflığı da 260 nm / 280 nm'deki absorbanlarından tespit edilmiştir. DNA konsantrasyonu ve saflığı aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.10 Agaroz jel elektroforezi

DNA agaroz jel elektroforezi yatay jel tankı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle TBE tamponu ile % 0.7'lik bir agaroz jeli hazırlanmıştır. Hazırlanan jel tanka döküldükten sonra, tarak takılmış ve katılaşması için yaklaşık 45 dk beklenmiştir. PCR ürünleri jel yükleme boyası ile karıştırılıp (1/5 boya/örnek), DNA kuyucuklara yüklenmiş ve 100 V'da 1.5 saat elektrik akımı uygulanarak DNA örneklerinin yürümesi sağlanmıştır. DNA bantları UV ışık altında incelenmiş ve görüntü, jel dökümantasyon sistemine kaydedilmiştir. İstenilen DNA bandına denk gelen PCR ürünü, GenElute PCR Clean-Up kitinden (Sigma NA1020) geçirilerek saflaştırıldıktan sonra -20°C saklanmıştır.

3.2.11 DrCA geninin pFN2K ekspresyon vektörüne klonlanması

Klonlamaya başlamadan önce kullanılan restriksiyon enzimlerinin (Flexi Enzyme Blend, SgfI&PmeI, Promega, C8820) kesimi ve ligasyonda kullanılan T4 DNA ligaz ile 2X Flexi ligaz (Promega, C8820) tamponunun aktivitesi test edilmiştir. Restriksiyon enzimlerinin vektördeki kesim desenlerinin doğrulanması için pFN2K Flexi Vektör (Promega, 8820) protokolünde belirtildiği üzere 100 ng/ μ l'lık Flexi vektörden 1 μ l ve 9 μ l restriksiyon enzim kompleksi karışımı 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Ligasyon etkinliğinin denenmesi için ise çizelge 3.5'de belirtilen ligasyon protokolüne göre önerilen kimyasal ve enzimler kullanılmıştır. Sonuçlar %1'lik agaroz jelde gösterilmiştir.

Çizelge 3.5 Ligasyon kontrol protokolü

Reaktant	Miktar (μ l)
Steril Ultra Saf Su	4 μ l
2X Flexi [®] Ligase Buffer	10 μ l
Kesilmiş PFN2K Flexi [®] Vector (50ng)	5 μ l
T4 DNA Ligaz (20 U/ μ l)	1 μ l
Son Hacim	20 μ l

Pfu DNA polimeraz ile PCR reaksiyonunun ardından jelde görüntülenen PCR ürününün miktarı nanodrop ile ölçüldükten ve saflığı kontrol edildikten sonra vektör ile PCR ürünü *SgfI* & *PmeI* restriksiyon enzimleriyle kesime uğratılmıştır. Reaktifler çizelge 3.6 ve 3.7 de belirtilen şekilde sırayla PCR tüpüne ilave edilmiştir. Tüm çalışmalar buzun üzerinde gerçekleştirilmiş ve reaksiyona enzim en son eklenmiştir. Ardından tüpler 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında, restriksiyon enzimleri 65°C'de 20 dakika süresince inaktive edilmiştir. Ligasyon yapılanaya kadar kesimi yapılmış PCR ürünü ve vektör buz içerisinde bekletilmiştir. Kesimi yapılan PCR ürününün miktarı nanodrop cihazı ile ölçülmüş ve kesilen PCR ürünü ve vektör çizelge 3.8 de belirtildiği şekilde ligasyona tabi tutulmuştur. 25°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Gen Elute PCR Clean-Up (Sigma, NA1020) kitinden geçirildikten sonra elektroporasyon veya transformasyonda kullanılacağı zamana kadar – 20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.6 Vektör kesim protokolü

Reaktant	Miktar (µl)
Steril Ultra Saf Su	12µl
5 X Flexi [®] Digest Buffer	4µl
PFN2K Flexi [®] Vektör (200ng)	2µl
Flexi [®] Enzyme Blend (SgfI & PmeI)	2µl
Son Hacim	20µl

Çizelge 3.7 PCR ürünü Kesim Protokolü

Reaktant	Miktar (µl)
Steril Ultra Saf Su	7µl
5 X Flexi [®] Digest Buffer	4µl
Saflaştırılmış PCR ürünü (≥ 500ng)	5µl
Flexi [®] Enzyme Blend (SgfI & PmeI)	4µl
Son Hacim	20µl

Çizelge 3.8 Ligasyon Protokolü

Reaktant	Miktar (µl)
Steril Ultra Saf Su	1µl
2X Flexi [®] Ligase Buffer	10µl
Kesilmiş PFN2K Flexi [®] Vector (50ng)	5µl
Kesilmiş PCR ürünü (yaklaşık 100ng)	3µl
T4 DNA Ligaz (20 U/µl)	1µl
Son Hacim	20µl

3.2.12 Transformasyon için kompetent hücre hazırlanması

DrCA geni insert edilen plazmid vektörün klonlanması için öncelikle plazmid stabilitesi yüksek *E. coli* DH5α konağı kullanılmış ve vektör sonrasında, rekombinant protein ekspresyonundaki başarısı bilinen ikinci bir *E. coli* BL21 (DE3) konağına aktarılmıştır. Böylece bir sub-klonlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.12.1 Elektrokompotent hücre hazırlanması

Klonlamada kullanılan *E. coli* DH5α ve ekspresyonda kullanılan *E. coli* BL21(DE3) konaklarını elektrokompotent hale getirmek için aktif LBA kültürlerinden 5 ml'lik LB

sıvı besiyerine tek koloni ekimi yapılarak, 37°C’de, 300 rpm’de bir gece boyunca üremeye bırakılmıştır.

Süre sonunda 99 ml LB besiyerine, gece kültüründen 1 ml aşılacaktır. Yine 37°C’ de, 300 rpm’de inkübe edilmiştir. Hücrenin logaritmik fazı ve yoğunluğu elektrokompone hücre hazırlamada önemli olduğundan, bakteri yoğunluğu OD₆₀₀ 0.5-0.7 olduğunda (yaklaşık 4-5x10⁷ hücre/ml), bu hücreler 20 dk buz içerisinde (0°C’de) bekletilmiştir. 4 adet 25’er ml steril santrifüj tüpünde, 0°C’de 4000 g’de 15 dk santrifüj edilip süpernatant dökülmüştür. Her tüpe 25’şer ml %10’luk soğuk gliserol ilave edilip, 4000 g’de 15 dk 0°C’de santrifüj sonrası üst faz dökülmüştür. Ardından her tüpe 12.5 ml %10’luk soğuk gliserol ilave edilip, tüp sayısı ikiye indirilmiş ve 4000 g’de 15 dk 0°C’de santrifüj sonrası süpernatant dökülmüştür. Son olarak yine her iki tüpe ikişer ml %10’luk soğuk gliserol ilave edilip, tüp sayısı teke düşürülmüştür. 4000 g’de 15 dk 0°C’de santrifüj edilip üst faz dökülmüştür. Son aşamadan sonra tüpün dibinde oluşan pelete 400 µl %10’luk soğuk gliserol ilave edilip yeniden süspansiyon edilmiştir. Süspansiyon 50 µl olacak şekilde toplam 8 tüpe bölünmüştür. Böylece hücrelerin son konsantrasyonu 4-5x10¹⁰ hücre/ml olacak şekilde 10³ kat konsantre edilmiştir.

3.2.12.2 Kimyasal kompetent hücre hazırlanması

Steril 100 mM CaCl₂ hazırlanmış ve +4 °C’ de saklanmıştır. Tek koloniden *E. coli* DH5α ve *E. coli* BL21(DE3) aktif kültürleri (37°C’de 300 rpm) hazırlanarak, OD₆₀₀ 0.1 olacak şekilde 30 ml LB’ye aşılacaktır. OD₆₀₀ 0.4-0.5 aralığında oluncaya kadar geliştirilen hücreler sonrasında 10 dk buzda bekletilmiştir. Ardından +4°C de, 4000 rpm de 5 dk çöktürülmüştür. Sonra pelet 10 ml CaCl₂ de çözülmüş ve 30 dk buzda bekletilerek, tekrar 4000 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. Sonrasında pelet 2 ml CaCl₂ de çözülmüş ve 200 µl’lik tüplere bölüştürülerek, -80 °C’de bir gece muhafaza edilmiştir. Bu protokol sonrasında hücrelerin kompetentlikleri artırılabilmiştir.

3.2.13 Klonlama amacıyla DrCA geninin *E. coli* DH5α konağına transformasyonu

3.2.13.1 Elektroporasyon

Çalışmaların tamamı soğuk, buzlu ortamda yapılmıştır. SOC besiyeri hariç diğer tüm malzemeler +4°C’de tutulmuştur. Soğuk ortamda, 2 µl rekombinant plazmid ile 40 µl *E. coli* DH5α kompetent hücre mikrosantrifüj tüpünde nazıkçe karıştırılmış ve 15 dk buzda inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda karışım soğukta bekleyen küvete dökülmüştür. Kontrol amacıyla yine 40 µl kompetent *E. coli* DH5α ile 2 µl distile su mikrosantrifüj tüpünde karıştırıldıktan sonra, soğukta bekleyen küvete koyulmuştur. Ardından hemen elektroporasyon ile 2.5 kV akım verilmiş ve kültüre hızlı bir şekilde oda sıcaklığına getirilmiş 1 ml SOC medium ilave edilip yavaşça pipetleme yapılmıştır. Sonra küvet içerisindeki hücrelerin tamamı alınıp cam tüpe aktarılmıştır. 37°C’de çalkalamalı inkübatörde 1 saat inkübe edilmiştir. Süre sonuna hem plazmid aktarılmış hem de kontrol grubu hücreleri, bir gün önceden hazırlanmış Xgal, IPTG ve 50 µg/ml kanamisin içeren LBA besiyerine ekilmiş ve plakalar 37°C’de 15-18 saat inkübe edilmiştir.

3.2.13.2 Kimyasal transformasyon

Çalışmaların tamamı soğuk, buzlu ortamda yapılmıştır. SOC besiyeri hariç diğer tüm malzemeler +4 °C’de tutulmuştur. 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüpünün içerisine 2 µl ligasyon ürünü ve buz içerisinde çözünmüş kompetent hücreden 50 µl eklenmiştir. Kontrol için ligasyon ürünü yerine steril distile su kullanılmıştır. DNA ve hücre karışımı 20 dk süreyle buzda bekletilmiştir. Süre sonunda 42°C’lik su banyosunda 45 sn süreyle karıştırmaksızın tutulmuş ve hemen buz üzerine alınarak 2 dk buzda bekletilmiştir. Ardından üzerine 950 µl SOC besiyeri eklenmiş ve 37°C’de 150 rpm de çalkalayıcı inkübatörde 1.5 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda hem plazmid aktarılmış hem de kontrol grubu hücreleri, bir gün önceden hazırlanmış Xgal, IPTG ve 50 µg/ml kanamisin içeren LBA besiyerine ekildikten sonra, plaklar 37⁰C’de 15-18 saat inkübe edilmiştir.

3.2.14 Plazmid DNA izolasyonu

Transformasyon sonrasında Xgal, IPTG ve 50 µg/ml kanamisin içeren LBA besiyerinde gelişen uygun koloniler seçilerek 5 ml'lik LB'ye tek koloni ekimi yapılmıştır. İnkübasyon sonrasında elektroporasyon sonucu plazmit aktarımı yapılan direk ekim petrilerinde gözlenen mavi kolonilerden 50 µg/ml kanamisin içeren 5 ml'lik LB'ye tek koloni ekimi yapılmıştır ve 15 saat çalkalayıcılı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde Plazmid DNA İzolasyon Kiti (Gen Elute HP Plazmid Miniprep Kit, Sigma NA0150) kullanılarak *E. coli* DH5α plazmid DNA'lar saflaştırılmıştır. Saflaştırılan plazmid DNA gen ekspresyonu için *E. coli* BL21(DE3) hücresine aktarılmadan önce drCA genini içerip içermediğini kontrol etmek amacıyla *SgfI* & *PmeI* restriksiyon enzimleriyle kesime uğratılıp agaroz jelde görüntülenmiştir.

3.2.15 *E. coli* DH5α'dan izole edilen plazmid DNA'nın kesimi ve kontrolü

E. coli DH5α'dan izole edilen plazmid DNA'nın kesimi ve kontrolü için öncelikle çizelge 3.9'de belirtildiği şekilde bir karışım hazırlanmıştır. Üzerine 5 µl (200-500 ng) plazmid DNA eklenmiştir. 37°C'de 2 saat ve 65°C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. %1'lik agaroz jelde yürütülüp görüntülenmiştir

Çizelge 3.9 SgfI ve pmeI ile klonları tarama protokolü

Reaktant	Miktar (µl)
Steril Ultra Saf Su	10.5µl
5 X Flexi [®] Digest Buffer	4µl
10x Flexi [®] EnzymeBlend (<i>SgfI</i> & <i>PmeI</i>)	0.5µl
Son Hacim	15µl

3.2.16 Dizi analizi

E. coli DH5α hücresine aktarılmış olan ve hücreden plazmid DNA saflaştırma kiti ile saflaştırılan rekombinant plazmid vektör, klonlamanın başarılı olup olmadığını belirlemek amacıyla hizmet alımı (Medsantek Ltd. Şir.) yoluyla DNA dizi analizine

gönderilmiştir. Dizi analizinde, klonlama çalışmalarında da kullanılan drCA genine özel F:5'-GCGTGCATCGCCATGGGGCGCAGGCTAGCGCGT-3' ileri ve R:5'CGAGGT TAAACTTAGAGTGCGAGGTCGTCCTCGTCCA-3' geri primerleri kullanılmıştır.

3.2.17 Ekspresyon amacıyla *E. coli* DH5 α 'dan izole edilen plazmid DNA'nın *E. coli* BL21 (DE3)'e transformasyonu

Rekombinant proteinin ekspresyonu için *E. coli* DH5 α 'dan izole edilen plazmid DNA, *E. coli* BL21 (DE3) konağına aktarılmıştır. Bu aşamada daha önce *E. coli* DH5 α konağına aktarılan plazmid DNA'nın transformasyon sürecinde (Bölüm 3.2.13.1 ve 3.2.13.2) yürütülen çalışmalar tekrarlanmıştır. *E. coli* BL21 (DE3) konağına hem elektroporasyon hem de kimyasal transformasyon yöntemiyle plazmid DNA aktarımı yapılmıştır.

3.2.18 Rekombinant protein ekspresyonu

3.2.18.1 IPTG kullanılarak drCA geninin indüklenmesi

50 μ g/ml kanamisin içeren LBA besiyerinde üreyen *E. coli* BL21 (DE3) konağına ait rekombinant mavi koloniler seçilip aynı konsantrasyonda kanamisin içeren 5 ml'lik LB sıvı besiyerlerine ekilmiştir. 37 °C'de 200 rpm'de 15 saat süreyle geliştirilen hücreler, 99 ml'lik LB sıvı besiyerine 1 ml olacak şekilde aşılacaktır. 37°C'de geliştirilen hücrelerin 600 nm'deki optik yoğunlukları 0.6 olduğunda, drCA geninin en iyi ekspre edildiği IPTG konsantrasyonunu ve sıcaklığını belirlemek için farklı sıcaklık ve IPTG konsantrasyonlarında indüksiyon denemeleri yapılmıştır. İndüksiyondan önce besiyerleri yaklaşık 5 dk kadar buzda bekletildi ve indüksiyon sıcaklığına gelmesi sağlandı. Ardından 0.05 mM, 0.6 mM ve 2 mM konsantrasyonlarda IPTG ile 20°C, 25°C ve 30°C'lerde gen indüksiyonu denenmiştir (Çizelge 3.10). IPTG ile birlikte besiyerine, son konsantrasyonu 0.05 mM olacak şekilde ZnSO₄ eklenmiştir. İndüksiyon süresi sonunda her bir hücre kültüründen 3'er örnek alındıktan sonra, drCA enziminin spesifik aktivite ölçümü ve SDS-PAGE analizi yapılmak üzere -20°C de muhafaza edilmiştir.

3.2.18.2 Magic Media *E. coli* ekspresyon besiyeri kullanılarak drCA geninin ifadesi

E. coli BL21 (DE3) klonlarının bulunduğu petriden bir koloni alınıp 1 ml Magic Media (Invitrogen, V8603) içeren 15 ml'lik cam tüplere inokülasyon yapılmış ve 30°C ve 37°C'lerde 18 ve 24 saat inkübe edilmiş, süre sonunda 3'er adet 1 ml'lik örnek alınmıştır. Böylece bu besiyeri ortamında IPTG kullanılmadan, doğrudan genin indüksiyonu besiyeri araçlığıyla yapılabilmektedir.

3.2.19 DrCA enziminin spesifik aktivitesinin belirlenmesi

IPTG kullanılarak drCA geninin indüksiyonundan sonra alınan 1 ml'lik örneklerden 500 µl'si bir kısmı öncelikle % 0.9 NaCl çözeltisi ile üç kez yıkanmıştır. Sonrasında lizozim içermeyen PBS tamponu ile muamale edilip homojenize edilmiştir. Ardından Lowry yöntemi (Lowry vd. 1951) ile protein miktarı belirlenmiştir (Çizelge 3.10). Örneklerin kalan 250 µl'lik kısmı 10.000 g'de 5 dk santrifüj edilmiş ve üst faz atılmıştır. Pelet üzerine lizis tamponu eklenerek, %35-45 amplitud'de 20 sn "on" 40 sn "off" şeklinde buz üzerinde toplam 5 dk süreyle sonikasyon yapılmıştır. Sonikasyon sırasında köpük oluşmamasına dikkat edilmiştir. Sonikasyonun başarısı mikroskopla da gözlemlenmiştir. Sonike edilen ve intraselüler hücre içeriğini kapsayan örnekler 0°C'de 15.000 rpm de 60 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Nihai olarak kullanılarak süpernatant intraselüler drCA hidrataz ve esteraz enzim aktivite ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen drCA aktivitesi (U/ml) ve protein miktarı (mg/ml) verilerinden yararlanılarak enzimin spesifik aktivitesi (U/mg) hesaplanmıştır.

Çizelge 3.10 Uygulanan farklı sıcaklıklar ve IPTG konsantrasyonları

Sıcaklık (°C)	IPTG Konsantrasyonu	İndüksiyon Süresi
20 °C	0.05 mM	15 saat
	0.6 mM	
	2 mM	
25 °C	0.05 mM	15 saat
	0.6 mM	
	2 mM	
30 °C	0.05 mM	10 saat
	0.6 mM	
	2 mM	

3.2.20 IPTG ile indüksiyon sonrası alınan örneklerin SDS-PAGE analizi

IPTG kullanılarak drCA geninin indüksiyonundan sonra alınan 1 ml'lik örneklerden (Bölüm 3.2.16) 15.000 g de 5 dk santrifüjden sonra elde edilen 250 µl'lik kısım, PMSF (Fenil Metil Sülfonil Florid) ve lizozim içeren lizis tamponu ile muamele edilmiş ve buz üzerinde 30 dk süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Ardından buz içerisinde %35-45 amplitude'de 20 sn "on" 40 sn "off" şeklinde toplam 5 dk süreyle köpük oluşmasına dikkat edilerek sonike edilmiştir. Sonike edilen örnekler 0°C'de 15.000 rpm de 60 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra hücre içi enzim içeren süpernatant SDS-PAGE ile analiz incelenmiştir.

Laemmli 1970'e göre yapılan SDS-PAGE'de %8'lik yığıma jeli ve %12'lik ayırma jeli kullanılmıştır. Enzim örnekleri, toplam hacim 100 µl olacak şekilde 1:1 oranında örnek tamponuyla karıştırılmıştır. Jele yüklenecek numuneler 5 dakika süreyle kuru ısı (100°C'de) bloğunda bekletilmiştir. Soğuyan numuneler mikropipet yardımıyla kuyucuklara 20 µl olacak şekilde yüklenmiştir. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak sırası ile 80 V ve 120 V da elektroforez işlemi yapılmıştır. 2 saat süreyle yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir.

Ardından jel oda sıcaklığında, 20 dk süreyle sabitleştirme çözeltisinde bekletilmiştir. Sonrasında 2 saat süreyle Coomassie Brilliant Blue boya çözeltisiyle boyanmıştır. Süre sonunda jel, boya giderme çözeltisine alınarak çözeltiyi belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde 30 dakika çalkalanmıştır. Son olarak bu çözeltiden çıkarılan jel fotoğrafları görüntüleme cihazıyla fotoğraflanmıştır.

3.2.21 Rekombinant proteinin saflaştırılması

3.2.21.1 Magne GST Protein Saflaştırma Sistemi ile rekombinant proteinin saflaştırılması

3.2.21.1.1 Hücre lizisi

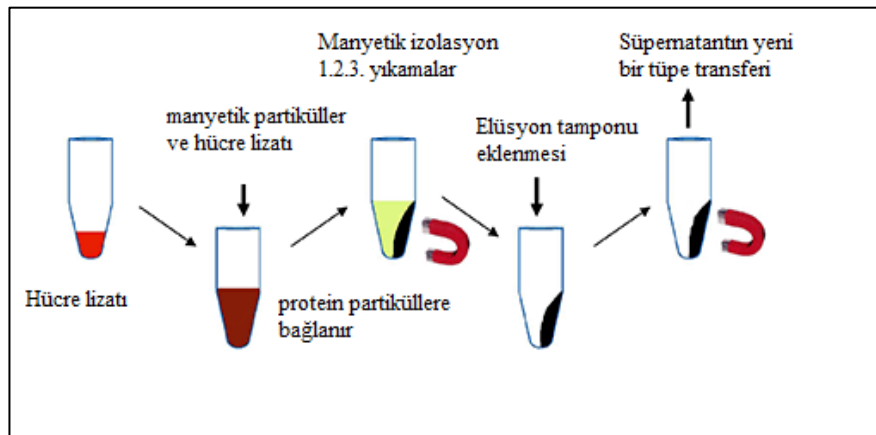
Hem Magic Medium hem de IPTG indüksiyonu sonrası sonike edilen numunelerden rekombinant proteinin saflaştırma işlemi MagneGST Protein Saflaştırma Sistem kiti (Promega, V8603) kullanılarak yapılmıştır. Bu sistem Glutasyon-S-Transferaz (GST) füzyon proteinlerinin kolay ve hızlı bir şekilde saflaştırılması için tasarlanmıştır. Hareketsiz glutasyon paramagnetik partiküller (MagneGST™ Particles) ve manyetik bir destek aracılığıyla, GST-tag proteinin sonikattan doğrudan izole edilmesi sağlanmıştır (Şekil 3.4-3.5).

Saflaştırma sürecinde öncelikle ekspresyon sonrası alınan örnekler öncelikle 15.000 g de 5 dk santrifüj edilmiştir. 1ml'lik kültürden elde edilmiş hücre peleti protein saflaştırma kitinde bulunan MagneGST lizis tamponu (25 Mm Tris HCl'de hazırlanmış 10 mg/ml lizozim çözeltisi) ile muamele edilmiştir. MagneGST lizis tamponu miktarı hücrenin OD₆₀₀ değerine bakılarak belirlenmiştir. OD₆₀₀=1.000 için 100 µl lizis tamponu, OD₆₀₀=3.000 için 300 µl lizis tamponu ilave edilmiştir. Ardından nazikçe pipetaj yapılarak karıştırılmıştır. Sonra RNAz içermeyen DNAz'dan 2 µl eklenmiştir. Viskozitesi azalan ve daha çözünür hale gelen numunenin GST-füzyon proteinlerinin saflaştırılması kolaylaştırılmıştır.

Örnek oda sıcaklığında 30 dk süreyle çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra buz içerisinde %35-45 amplitude'de 20 sn “on” 40 sn “off” şeklinde toplam 5 dk süreyle sonikasyon yapılmıştır. Sonike edilen örnekler 0°C’de 15.000 rpm de 60 dk süreyle santrifüj edilmiş ve süpernatantın 20 µl’si SDS-PAGE için ayrılmıştır. Geriye kalan yaklaşık 200 µl örnek, protein saflaştırma işlemi için kullanılmıştır.

3.2.21.1.2 Partikül dengeleme

MagneGST partikülleri tamamen karıştırılmış ve homojen hale getirilmiştir. 1.5 µl’lik santrifüj tüpüne 100 µl partikül koyulduktan sonra tüp, manyetik desteğe yerleştirilmiş ve birkaç sn beklenmiştir. Destekte yer alan mıknatısın etkisiyle manyetik partiküller, tampondan uzaklaştırılmış ve partikülün içinde bulunan süpernatant, mikropipet ile dikkatli bir şekilde tüpten uzaklaştırılmıştır. Sonrasında tüp, manyetik destekten ayrılmıştır. Partiküllerin üzerine 250 µl MagneGST bağlama ve yıkama tamponu (4.2 mM Na₂HPO₄, 2 mM K₂HPO₄, 140 mM NaCl, 10 mM KCl) eklenmiş ve bu tamponla 3 defa yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha önce belirtildiği üzere bu aşamada destekte bulunan mıknatısın manyetik partikülleri çekme gücünden yararlanılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 MagneGST Protein Saflaştırma kitindeki (Promega V8603) manyetik partiküller ile protein saflaştırma basamakları

3.2.21.1.3 Bağlanma

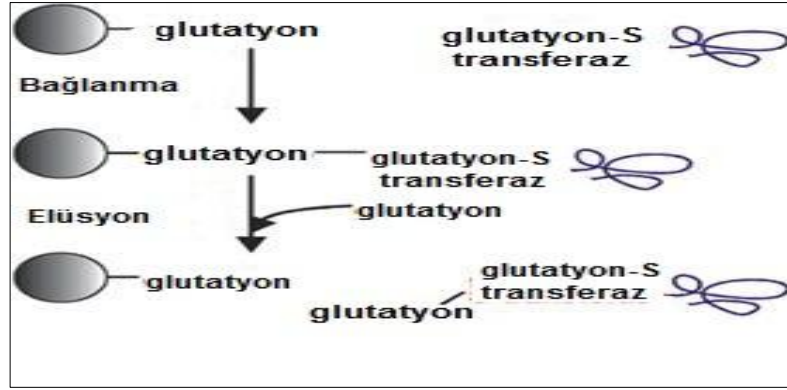
Yıkamadan sonra, yıkama tamponundan 100 µl'si alınıp partiküller dikkatlice karıştırılmıştır. Daha önce hazırlanmış olan hücre lizatından 200 µl partiküllerin üzerine eklenmiş ve karışması sağlanmıştır. Hücre lizatı ve partikül hacmi, toplam hacim 300 µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan karışım çalkalayıcıda, +4°C'de 30 dk süreyle inkübe edilerek, çalkalama sırasında partiküllerin tüpün dibine çökmesine engel olunmuştur. Böylece proteinin bağlanma etkinliği arttırılmıştır.

3.2.21.1.4 Yıkama

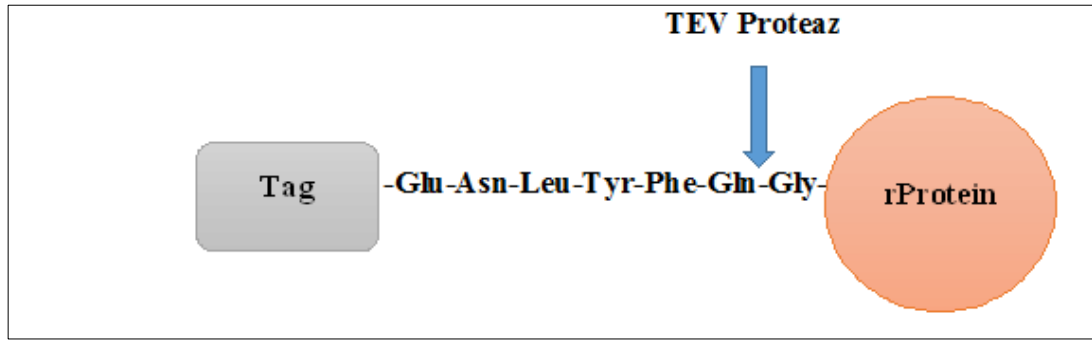
İnkübasyondan sonra tüpler manyetik desteğe yerleştirilmiş ve süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.4). Süpernatant SDS-PAGE için -20°C'de saklanmıştır. Ardından tüp destekten alınıp içerisine 250 µl yıkama tamponu eklenip, oda sıcaklığında 5 dk alt üst edilerek inkübe edilmiştir. Tüp tekrar manyetik desteğe yerleştirilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Süpernatant SDS-PAGE için -20°C'de saklanmıştır. Tüp tekrar destekten alınıp, içerisine 250 µl yıkama tamponu eklenmiştir. Dikkatlice pipetleme yapıp inkübasyon yapılmadan manyetik desteğe yerleştirilip, süpernatant yeniden uzaklaştırılmış ve toplamda 3 kez yıkama işlemi yapılmıştır.

3.2.21.1.5 Proteinin elüsyonu

Son yıkamadan sonra partikül bulunan tüpe 200 µl elüsyon tamponu eklenmiştir. Karışım çalkalayıcıda, +4°C'de 15 dk süreyle inkübe edilmiştir. Tüp manyetik desteğe yerleştirilip, partiküllerin uzaklaştığını görünceye kadar burada tutulmuştur. Sonra süpernatant dikkatle temiz bir tüpe alınmıştır. Bu GST-füzyon proteinini içeren örneğe elüsyon işlemi iki kez tekrarlanmıştır.



Şekil 3.5 GST-tag içeren füzyon proteininin saflaştırılması sırasında gerçekleşen olayların şematik görünümü



Şekil 3.6 Rekombinant proteini, tag kısmına bağlayan 7 amino asitlik dizisi ve bu füzyon proteinde TEV proteazın etki ettiği yer gösterilmektedir.

3.2.21.2 GST-tag'ın Pro-Tev Proteaz ile füzyon proteininden ayrılması

Klonlanan enzimin ileri karakterizasyon çalışmalarının yapılabilmesi için enzimin GST-tag kuyuksuz haline ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sebeple GST füzyon proteini şeklinde bulunan drCA enziminin GST-tag kuyruğu, Pro-TEV Plus proteaz enzimi kullanılarak koparılmıştır. Pro-TEV Plus proteaz enzimi, (Promega V6101, 10.000 U/mg), ENLYFQG amino asit dizisinde yer alan glutamin ve glisin veya serin arasındaki bağa yüksek seviyede afinite gösteren proteolitik bir enzimdir (Dougherty ve Parks 1991, Carrington vd. 1993). Çalışmada kullanılan Flexi™ vektör, klonlama bölgesinin yukarı yer alan ve saflaştırma basamaklarında önemli olan bu kesim bölgesini ve GST dizisini içerecek şekilde tasarlanmıştır (Şekil 3.6).

Çizelge 3.11 ProTEV plus füzyon proteini-tag koparma protokolü

Reaktant	Miktar ($\mu\text{l}/\mu\text{g}$)
Nükleazsız Ultra Saf Su	92 μl
Pro TEV Tampon, 20X	5 μl
100 mM DTT	1 μl
Füzyon Protein	20 μg
ProTEV Plus Enzim (10U)	2 μl
Son Hacim	100 μl

Füzyon proteininin kesimi amacıyla çizelge 3.11'deki gibi hazırlanan reaksiyon karışımı 30°C'de 2 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra reaksiyon örneğinden GST-tag kuruğundan uzaklaştırılmak üzere MagneGST kitinde anlatıldığı şekliyle, Bölüm 3.2.21.1.2-3.2.21.1.5 kısımları arasındaki yıkama ve elüsyon işlemlerine tabi tutulmuştur. Böylece tamamen saflaştırılan enzim, daha sonraki SDS-PAGE ve kısmi karakterizasyon çalışmaları yapılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

3.2.22 Saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin optimum pH, optimum sıcaklık ve termostabilite isteğinin belirlenmesi

pH'nın DrCA enzimi üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla hidrataz aktivitesinde kullanılan HEPES tamponu pH 8.0, pH 8.5, pH 9.0, pH 9.5, pH 10.0, pH 10.5 ve pH 11.0 şeklinde ayarlanmış ve hidrataz enzim aktivitesi ölçümü yapılmıştır. Sıcaklığın DrCA enzimi üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla 0-70°C aralığında sıcaklık değerleri 10'ar derece arttırılarak hidrataz aktivite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. İstenilen sıcaklıklar, oda sıcaklığının altında ise buzdolabında (+4°C ve +8°C), buz banyosunda (0°C), oda sıcaklığının üstünde ise ısıtıcı ve sirkülatörlü su banyosu kullanılarak (20°C-70°C) uygun sıcaklıklara ayarlanmıştır. Enzimin stabilitesini belirlemek amacıyla; saf enzim çözeltisi 30-70°C aralığında, sıcaklık değerleri 5'er derece farklılık içerecek şekilde bekletilmiş ve bu numunelerden 7 saat süresince, saat başı örnek alınmıştır. Bu süre zarfında aktivitelerdeki değişim oransal olarak hesaplanmıştır. Hiç sıcaklıkla muamele edilmemiş örnek %100 olarak kabul edilmiştir. Deneyler üç tekrarlı olarak yürütülmüştür.

3.2.23 Bazı metal iyonlarının ve Sülfonamid'in saf DrCA üzerine etkisi

Bazı metal iyonlarının ve Sülfonamid'in DrCA enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ca^{+2} , Zn^{+2} iyonlarının ve sülfonamidin farklı konsantrasyonlarda çözeltileri kullanılarak enzimin hidrataz aktiviteleri belirlenmiştir. % Aktivite grafiği çizilerek eğri denkleminde IC_{50} (enzimin %50'sinin inhibe olduğu konsantrasyon) değerleri hesaplanmıştır.

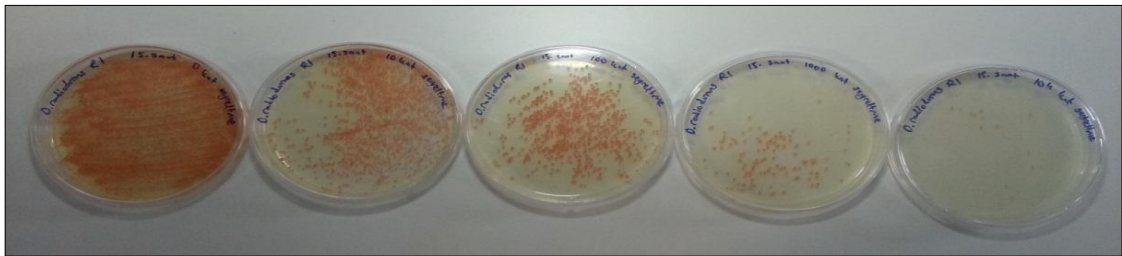
Çizelge 3.12 Kullanılan metal iyonlarının ve sülfonamidin çözelti konsantrasyonları

Madde	Stok Çözelti Konsantrasyonu
Mg^{+2}	5mM
Mn^{+2}	5mM
Ca^{+2}	5mM
Zn^{+2}	5mM
Sülfonamid	10 mM

4. BULGULAR

4.1 *D. radiodurans* R1 Gelişim Eğrisi ve DrCA Enzim Üretimi Arasındaki İlişkiye Dair Sonuçlar

D. radiodurans R1'in hücre gelişim eğrisini belirlemek amacıyla 72 saat süresince her saat başı alınan örneklerden OD₆₀₀'de bulanıklık ölçümü ve seyreltme plaka yöntemiyle koloni sayımı yapılmıştır. 29. saat sonrasında ölüm fazına geçiş tam olarak gözlemlendiğinden seyreltme plaka ile hücre sayımı sonlandırılmıştır (Şekil 4.1 ve Çizelge 4.1). Şekil 4.3 hücre büyüme grafiğine bakıldığında lag, log, durağan üreme fazları gözlemlenebilmektedir. Hücrelerin 4. saate kadar lag fazında, 10. saatte log fazı ve devamında ise durağan faza geçtiği görülmektedir. OD₆₀₀ değerleri ile hücre sayıları arasında durağan faza kadar bir korelasyon görülmekle birlikte, sonrasında OD₆₀₀ değerinde sürekli bir artış izlenmiştir. Bu durum ölüm fazına giren hücrelerde, hücrelerin parçalanması, hücre içeriğinde bulunan karatenoidlerin dışarı çıkması ve açığa çıkan karatenoidlerin OD₆₀₀'de sürekli bir absorbans artışına neden olabileceği düşünülmüştür. Şekil 4.2 hücrenin TGY broth besiyerindeki 0. saat görüntüsü ve 66. saat sonrasında karatenoidlerin açığa çıkmasıyla besiyerinde oluşan görüntü görülmektedir. Bulanıklık ölçümü ile elde edilen bu sonuçlar, koloni sayım sonuçları ile de paralellik göstermiştir (Çizelge 4.1). İlk 4 saatlik log fazından sonra, koloni sayısı iki katına ulaşacak şekilde 10 saate kadar 285×10^6 Cfu/ml değerine ulaşmıştır. En yüksek koloni sayım sonucu, 14-17. (510×10^6 Cfu/ml) saatler arasında görülmüştür. 26. saatten sonrasında ise canlı hücre sayısında önemli bir düşüş saptanmıştır.



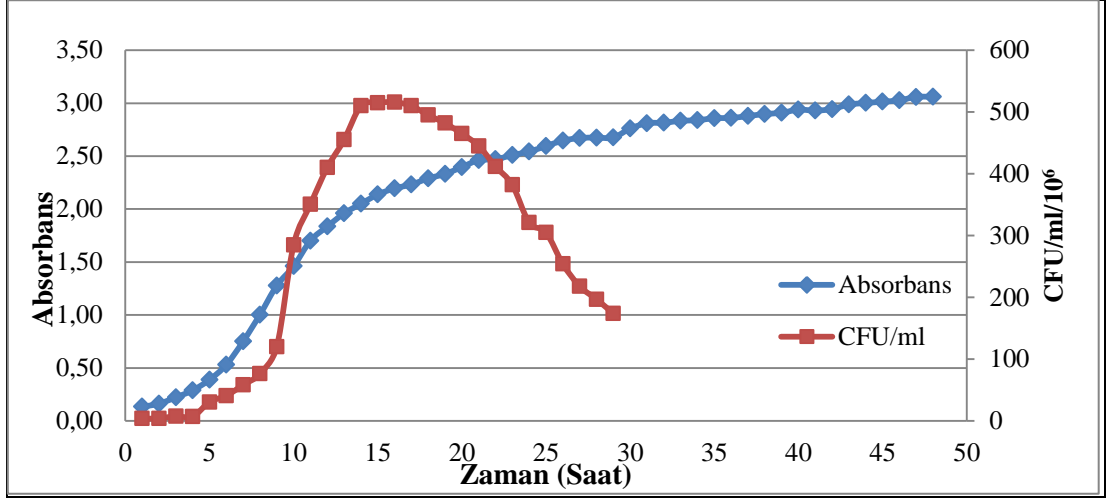
Şekil 4.1 *D. radiodurans* R1'in 15. Saatlik gelişimindeki seyreltme plaka ile koloni sayımında kullanılan petri görüntüleri



Şekil 4.2 TGY broth besiyerine ekilen *D.radiodurans*'ın sırasıyla 0. ve 72. saatlerde elde edilen sıvı kültürleri

Çizelge 4.1 *D. radiodurans*'a ait OD₆₀₀ nm'deki absorbans değerleri, koloni sayımı ve DrCA hidrataz aktivitesi sonuçları (pH 9.0, 25°C)

Saat	Absorbans	CFU/ml (x10 ⁶)	U/ml	Saat	Absorbans	CFU/ml (x10 ⁶)	U/ml
1	0.134	3.85	0.0026	25	2.595	305	0.0120
2	0.163	4.3	0.0030	26	2.646	254	0.0118
3	0.223	7.705	0.0036	27	2.671	218	0.0116
4	0.289	7.21	0.0042	28	2.675	197	0.0114
5	0.389	30.6	0.0046	29	2.676	174	0.0114
6	0.531	41	0.0050	30	2.760		0.0116
7	0.751	58.3	0.0056	31	2.811		0.0118
8	1.004	76.4	0.0062	32	2.815		0.0116
9	1.278	120	0.0068	33	2.834		0.0114
10	1.461	285	0.0074	34	2.839		0.0110
11	1.702	350.5	0.0080	35	2.858		0.0108
12	1.836	410	0.0100	36	2.861		0.0104
13	1.960	455	0.0108	37	2.878		0.0100
14	2.050	510	0.0112	38	2.898		0.0098
15	2.138	515	0.0112	39	2.909		0.0098
16	2.196	516	0.0122	40	2.939		0.0096
17	2.232	510	0.0122	41	2.930		0.0094
18	2.290	495	0.0124	42	2.944		0.0094
19	2.332	482	0.0126	43	2.987		0.0096
20	2.397	465	0.0128	44	3.002		0.0094
21	2.462	445	0.0128	45	3.014		0.0096
22	2.470	412	0.0128	46	3.027		0.0094
23	2.510	382	0.0128	47	3.059		0.0092
24	2.543	321	0.0126	48	3.061		0.009



Şekil 4.3 *D. radiodurans* R1'in zamana bağlı seyreltme plaka ve bulanıklık ölçümü ile oluşturulmuş gelişme eğrisi grafiği.

Elde edilen koloni sayım sonuçları kullanılarak *D. radiodurans* R1'in hücre sayısının iki katına ulaşması için geçen süre aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Bu formülde 15 ve 9. saatlerde ölçülen; koloni sayım sonuçları (CFU/ml) kullanılmıştır.

μ ; büyüme hızının bir ölçüsüdür.

N_1 ve N_0 ; Logaritmik faz içerisinde seçilen iki noktadaki hücre sayıları

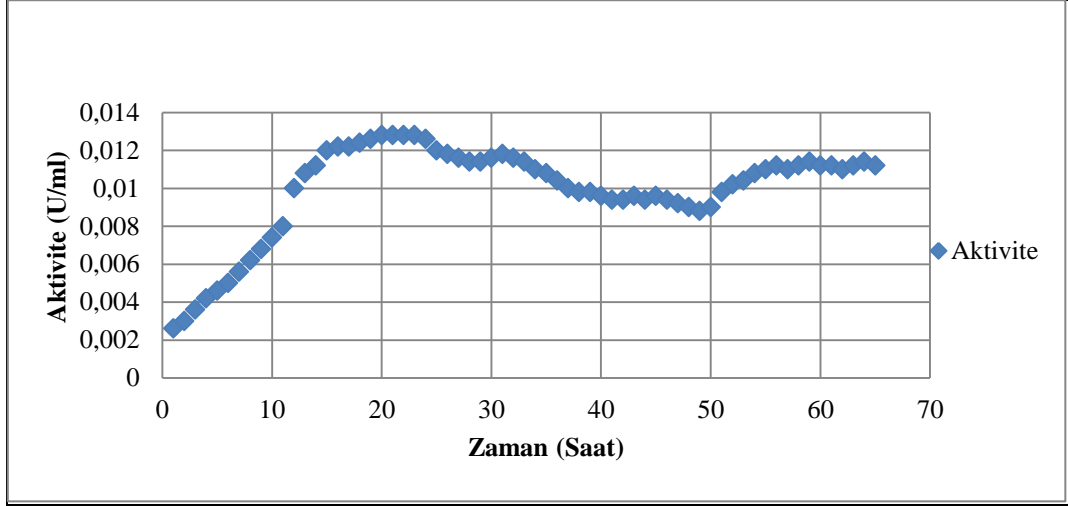
t_1 ; N_1 hücre sayısına ulaşılan saat

t_0 ; N_0 hücre sayısına ulaşılan saat

t_D ; Hücre sayısının iki katına ulaşması için geçen süre

$$\begin{aligned} \ln N_1 - \ln N_0 &= \mu \times (t_1 - t_0) \\ \ln(515 \times 10^6) - \ln(120 \times 10^6) &= \mu \times (15 - 9) \\ 1,46 &= \mu \times 6 \\ \mu &= 0,243 \text{ saat}^{-1} \\ t_D &= \frac{\ln 2}{\mu} \\ t_D &= \frac{0,693}{0,243 \text{ saat}^{-1}} \\ t_D &= 2,85 \text{ saat} \end{aligned}$$

Bu hesaplamalara göre, *D. radiodurans* R1'in TGY sıvı besiyerinde (32°C, pH 7.4) hücre sayısının iki katına ulaşması için gereken süre, koloni sayım sonuçlarına göre 2,85 saat olarak hesaplanmıştır.



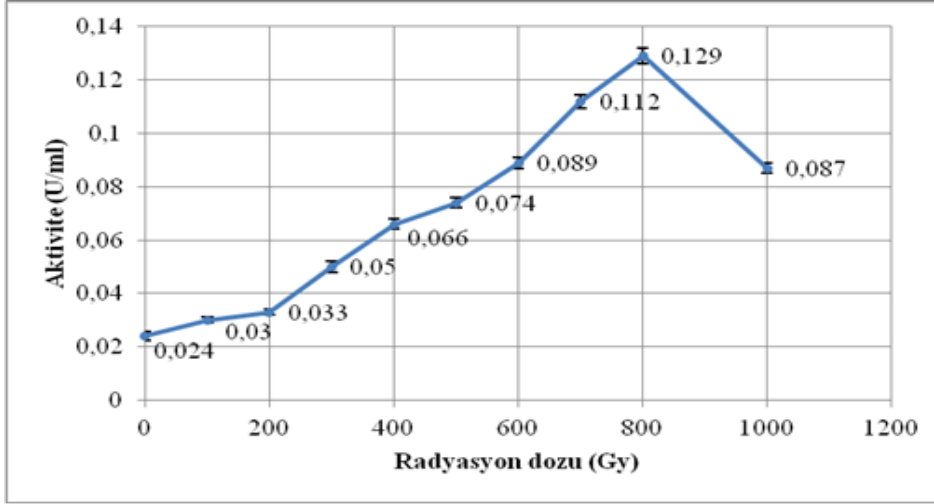
Şekil 4.4 *D. radiodurans* R1'in zamana bağlı olarak (pH 9.0, 25°C) ölçülen intraselüler aktivitesi

Hücre büyüme eğrisi oluşturulması aşamasında 72 saat süresince alınan numunelerden bakılan drCA hidrataz aktivitesi sonuçları çizelge 4.1 ve şekil 4.4'de görülmektedir. Bu grafiğe bakıldığında, DrCA aktivitesi ilk 10 saat logaritmik olarak hücre içinde birikmektedir. drCA aktivitesi hücre yoğunluğu ile doğru orantılı olarak ilk 20 saate kadar artmaktadır. En yüksek enzim aktivitesi 20-23. saatlerde 0.0128 (U/ml) olarak ölçülmüştür. Bölünme hızında yavaşlamanın başladığı 25. saatten itibaren ve buna bağlı olarak aktivitede bir miktar durağanlık ve sonrasında bir miktar azalma görülmektedir. 50. saatten sonra enzim aktivitesinde bir artış görülmektedir.

4.2 *D. radiodurans*'a Radyasyon Uygulaması Sonrasında Ölçülen CA Aktivite Miktarları

D. radiodurans R1 hücre kültürüne gama kaynağı ile 100 Gy'dan başlayarak 100'er Gy artacak şekilde 1000 Gy'a kadar radyasyon dozları uygulanmıştır. Üç tekrarlı yapılan deneyde radyasyon sonrası DrCA hidrataz enzim aktivitesi belirlenmiştir. Şekil 4.5'de uygulanan dozlar (Gy) ve enzim aktivitesi (U/ml) sonuçları görülmektedir. 800 Gy'a kadar enzim aktivitesi sürekli artmakta; ancak bu noktadan sonra aktivitede hızlı bir düşüş gözlenmektedir. 1000 Gy'lık radyasyon dozu ile muamele sonrası DrCA enziminin aktivitesinde azalma gözlenmiştir. *D. radiodurans* R1'in hiç radyasyon dozu uygulanmayan kontrol grubunda hidrataz aktivitesi 0.024 U/ml bulunurken, 800 Gy

radyasyon dozu ile muamele edilen grupta enzimatik aktivite artışı bu değerin 5.4 katına (0.129 U/ml) ulaşmıştır.



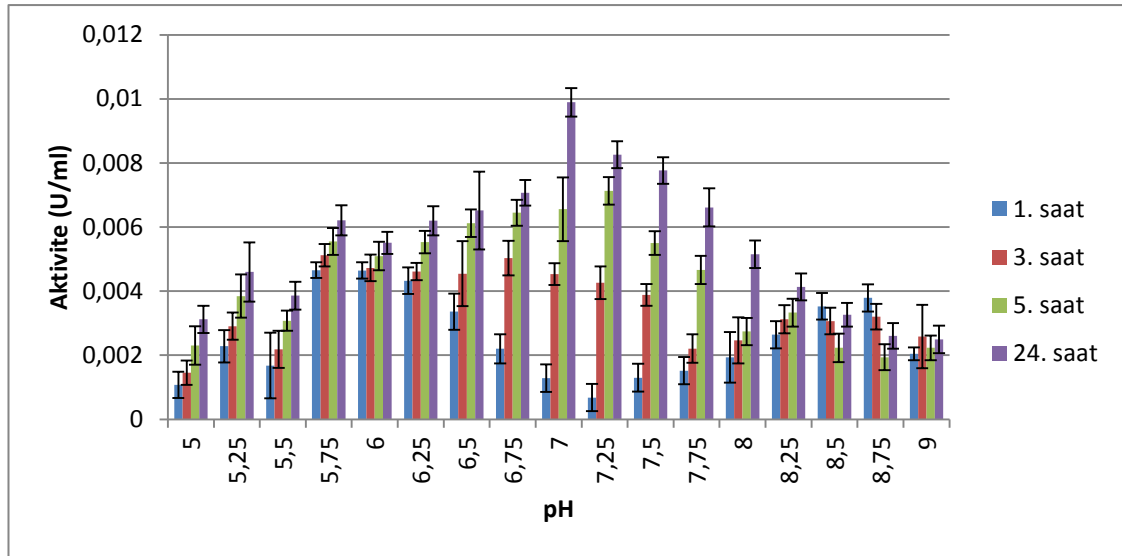
Şekil 4.5 *D. radiodurans* hücresine uygulanan radyasyon dozuna (Gy) bağlı olarak (pH 9.0, 25°C) ürettiği DrCA hidrataz aktivite grafiği

4.3 Farklı pH Değerine Sahip TGYB Besiyerlerinde DrCA Aktivitesi Sonuçları

pH 5.0-9.0 aralığında değişen TGYB besiyerinde gelişen *D. radiodurans* kültüründen 1., 3., 5. ve 24. saatlerde alınan kültürlerden hem bulanıklık ölçümü (Çizelge 4.2) hem de sonikasyon sonrası DrCA hidrataz aktivitesi ölçümü yapılmıştır (Şekil 4.6). Çizelge 4.2'ye bakıldığında hücre yoğunluğunun en fazla olduğu değerler pH 6.75-7.75 arasındadır. Bu sonuca göre şekil 4.6'ya bakıldığında pH 6.75-7.75 aralığında DrCA aktivitesi sürekli artmakta, özellikle 24. saatte diğer pH değerlerine göre en yüksek değere ulaşmaktadır. Ortam şartları bakterinin geliştiği optimum pH'dan uzaklaştıkça enzim aktivitesinin arttığı, optimum pH'ya yakın aralıkta ise, aktivitenin düşük olduğu görülmektedir. Sonuç olarak, *D. radiodurans* R1 suşunun geliştirdiği pH aralığı 6.75-7.75 aralığında olup, bakteri 32°C'de optimum geliştiği pH 7.0'de TGYB besiyerinde 24 saat geliştirildiğinde 0.0098 U/ml olacak şekilde maksimum DrCA hidrataz enzim aktivitesi göstermiştir.

Çizelge 4.2 *D. radiodurans* R1'in farklı pH'lardaki gelişimine ait bulanıklık ölçümü ile DrCA hidrataz aktivitesi değerleri (pH 9.0, 25°C)

OD ₆₀₀ absorbans ve DrCA hidrataz aktivitesi değerleri								
pH	1. saat	U/ml	3. saat	U/ml	5. saat	U/ml	24. saat	U/ml
5.00	0.078	0.00107	0.079	0.00146	0.080	0.00230	0.086	0.00312
5.25	0.073	0.00228	0.075	0.00290	0.077	0.00384	0.083	0.00460
5.50	0.073	0.00167	0.075	0.00218	0.076	0.00307	0.082	0.00386
5.75	0.075	0.00465	0.073	0.00512	0.075	0.00555	0.081	0.00621
6.00	0.075	0.00464	0.073	0.00472	0.071	0.00509	0.080	0.00550
6.25	0.073	0.00432	0.074	0.00461	0.073	0.00553	0.084	0.00620
6.50	0.075	0.00336	0.072	0.00454	0.077	0.00612	0.085	0.00652
6.75	0.084	0.00220	0.103	0.00503	0.146	0.00644	1.608	0.00706
7.00	0.085	0.00128	0.101	0.00453	0.124	0.00656	1.610	0.00989
7.25	0.084	0.00068	0.097	0.00426	0.115	0.00713	1.428	0.00826
7.50	0.087	0.001300	0.094	0.00388	0.104	0.00550	1.296	0.00776
7.75	0.086	0.001520	0.093	0.00220	0.109	0.00466	1.006	0.00661
8.00	0.079	0.001933	0.079	0.00246	0.081	0.00274	0.086	0.00515
8.25	0.078	0.002640	0.082	0.00312	0.082	0.00333	0.084	0.00413
8.50	0.077	0.003527	0.084	0.00306	0.081	0.00223	0.084	0.00326
8.75	0.076	0.003789	0.081	0.00320	0.083	0.00194	0.087	0.00260
9.00	0.083	0.002047	0.084	0.00258	0.084	0.00223	0.085	0.00249



Şekil 4.6 *D. radiodurans* R1'in farklı pH'lardaki TGYB besiyerinde üremesine bağlı olarak (pH 9.0, 25°C) oluşturduğu DrCA hidrataz aktivitesi grafiği

4.4 Primer Tasarımı ve Biyoinformatik Çalışma Sonuçları

D. radiodurans R1 bakterisinin β -CA familyasına ait karbonik anhidraz enziminin (DrCA) DR_2238 kodlu geni, NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanındaki (GenBank aksesyon numarası: AE000513.1) dizilimi temel alınarak primer tasarımı yapılmıştır. Tasarlanan primerler *BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool) tarama motoru ile genom içerisinde karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Böylelikle tasarlanan primerlerin genomun içerisinde spesifik olmayan herhangi bir bölgeye tutunmadığı belirlenmiştir. Şekil 4.7’de sırasıyla ileri ve geri primerlerin *BLAST*’da arama sonucu gösterilmektedir. Klonlama yapılacak hedef DrCA geni, *D. radiodurans* R1’de 795 bp uzunluğundadır. Tasarlanan ileri primer (F:5’-GCGTGCGATCGCCATGGGGCGCAGGCTAGCGCGT-3’) bu genin 2232061-2232081 bazları, geri primeri (R: 5’CGAGGTTTAAACTTAGAGTGCGAGGTCGTCCTCGTCCA-3’) ise 2232830-2232855. bazları ile baz eşleşmesi yapmaktadır. Seçilen primerler ile drCA geninin kromozom-1’de bulunduğu pozisyon olan 2232061. bazdan, 2232855. baza kadar %100 doğrulukta çoğaltılabileceği belirlenmiştir. İleri primer expect değeri 4×10^{-6} , geri primerin expect değeri ise 5×10^{-9} olarak hesaplanmıştır. Bu da drCA geninin çoğaltılması için seçilen primerin yüksek spesifikte bağlanabileceğine dair ön bir bilgi vermiştir.

Download ▾ GenBank Graphics Sort by: E value

Deinococcus radiodurans R1 chromosome 1, complete sequence
Sequence ID: [gb|AE000513.1](#) Length: 2648638 Number of Matches: 3712

Range 1: 2232060 to 2232081 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
44.1 bits(22)	4e-06	22/22(100%)	0/22(0%)	Plus/Plus

Query 13 CATGGGGCGCAGGCTAGCGCT 34
Sbjct 2232060 CATGGGGCGCAGGCTAGCGCT 2232081

Range 2: 1383785 to 1383799 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
30.2 bits(15)	0.055	15/15(100%)	0/15(0%)	Plus/Minus

Query 14 ATGGGGCGCAGGCTA 28
Sbjct 1383799 ATGGGGCGCAGGCTA 1383785

Range 3: 1328825 to 1328842 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
28.2 bits(14)	0.22	17/18(94%)	0/18(0%)	Plus/Plus

Query 13 CATGGGGCGCAGGCTAGC 30
Sbjct 1328825 CATGGGGCGCAGGCTAGC 1328842

Download ▾ GenBank Graphics Sort by: E value

Deinococcus radiodurans R1 chromosome 1, complete sequence
Sequence ID: [gb|AE000513.1](#) Length: 2648638 Number of Matches: 3335

Range 1: 2232830 to 2232856 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
54.0 bits(27)	5e-09	27/27(100%)	0/27(0%)	Plus/Minus

Query 12 CTTAGAGTGCAGGTCGTCCTCGTCCA 38
Sbjct 2232856 CTTAGAGTGCAGGTCGTCCTCGTCCA 2232830

Range 2: 460330 to 460343 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
28.2 bits(14)	0.26	14/14(100%)	0/14(0%)	Plus/Plus

Query 22 GAGGTCGTCCTCGT 35
Sbjct 460330 GAGGTCGTCCTCGT 460343

Range 3: 1996985 to 1996998 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
28.2 bits(14)	0.26	14/14(100%)	0/14(0%)	Plus/Plus

Query 25 GTCGTCCTCGTCCA 38
Sbjct 1996985 GTCGTCCTCGTCCA 1996998

Range 4: 62554 to 62570 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
26.3 bits(13)	1.0	16/17(94%)	0/17(0%)	Plus/Minus

Query 20 GCGAGGTCGTCCTCGTC 36
Sbjct 62570 GCGAGGTCGTCCTCGTC 62554

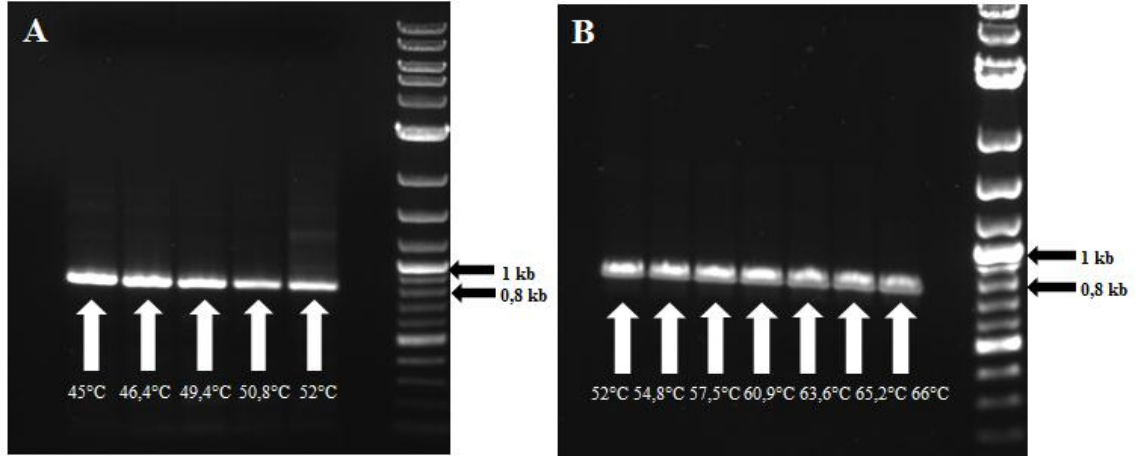
Range 5: 1005558 to 1005570 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Şekil 4.7 Tasarlanan ileri ve geri primerlerin *D. radiodurans* R1 genomundaki olası bağlanma bölgelerinin belirlenmesi için yapılan BLAST'daki tarama sonucu

4.5 PCR ile Gen İzolasyonu

D. radiodurans R1'in genomik DNA'sından tasarlanan primerler kullanılarak DrCA geni PCR reaksiyonu ile çoğaltılmıştır.

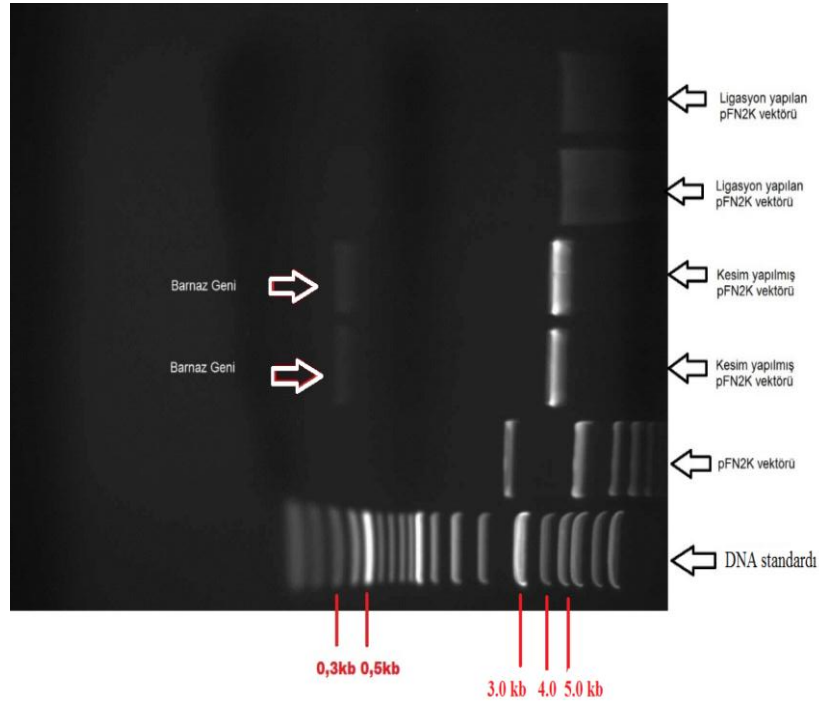
Klonlanan drCA geninin boyutu 795 bp'dir. Ancak PCR ile amplifiye edilen genin boyutu 820 bp'dir. Bunun nedeni ileri-geri primerler ve restriksiyon kesim bölgeleri eklendiğinde genin boyut olarak artmasındandır. Hem *Pfu* hem de *Taq* DNA polimeraz ile yürütülen Gradient PCR sonuçlarının agaroz jel görüntüleri şekil 4.8'de görülmektedir. Her iki şekilde de amplifikasyon ürünlerinin oluşturduğu bantların tamamı yaklaşık olarak 0.8-0.9 kb aralığına denk gelmektedir. *Pfu* enzimi için en parlak bant 45 °C'de, *Taq* enzimi için ise 60.9 °C'de seçilmiştir. Sonraki çalışmalar için *Pfu* enzim ürünü kullanılmıştır. Nedeni, *Pfu* DNA polimerazın, *Taq* DNA polimeraza göre daha hızlı ve daha yüksek doğrulukta sentez yapması ile amplifikasyon sırasında ekzonükleaz aktivitesi göstermesidir. Dolayısıyla, *Pfu* DNA Polimeraz ile 45 °C'de PCR ürünü oluşturulmuş ve amplicon Gen Elute PCR Clean-Up kitinden geçirildikten sonra klonlama işlemi için kullanılmıştır.



Şekil 4.8 *Pfu* (A) ve *Taq* (B) DNA Polimeraz ile yapılan Gradient PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü (DNA standardı; NEB, N3200S)

4.6 DrCA geninin pFN2K (GST) Flexi Vektörüne Klonlanması

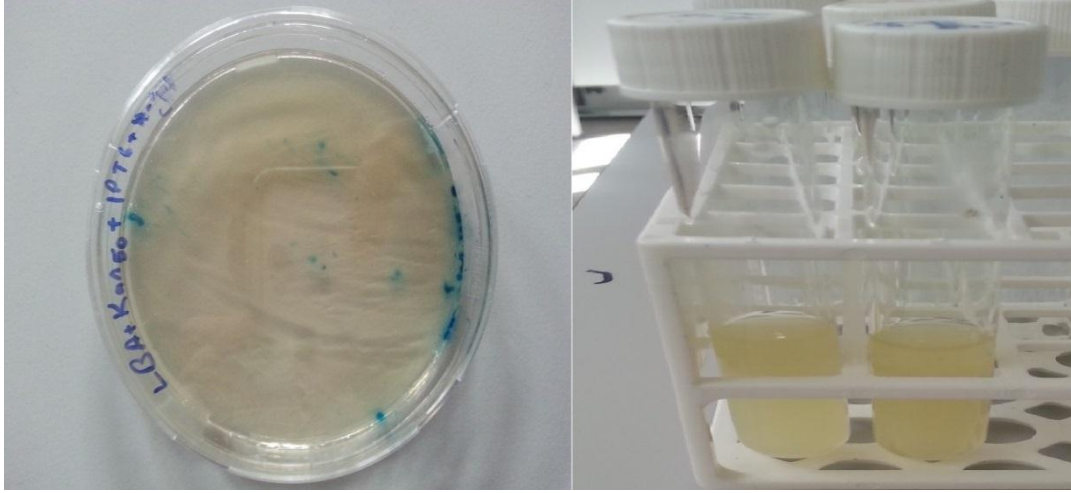
Klonlamada kullanılan restriksiyon enzimlerinin (*SgfI*&*PmeI*) kesimi ve ligasyonda kullanılan T4 DNA ligaz ile 2X Flexi ligaz tamponunun aktivitesi öncelikle test edilmiştir. Şekil 4.9'deki agaroz jel görüntüsünde pFN2K vektörünün *SgfI*&*PmeI* enzimleriyle kesime uğratılması sonucunda, DrCA geninin vektöre aktarılacağı yer olan barnaz (335 bç) geninin bulunduğu bölgeden kesilip uzaklaştırıldığı görülmektedir. Ligasyon sonucunda ise barnaz geninin, vektörde bulunan yerine tekrar bağlandığı net bir şekilde görülmektedir. Bu sonuçlarla restriksiyon enzimleri, T4 DNA ligaz ve 2X Flexi ligaz tamponunun aktivitesinde herhangi bir sorun olmadığı teyit edilmiştir.



Şekil 4.9 Vektörün kesim ve ligasyon kontrolü sonrası agaroz jel görüntüsü (DNA Standardı; NEB, N3200S)

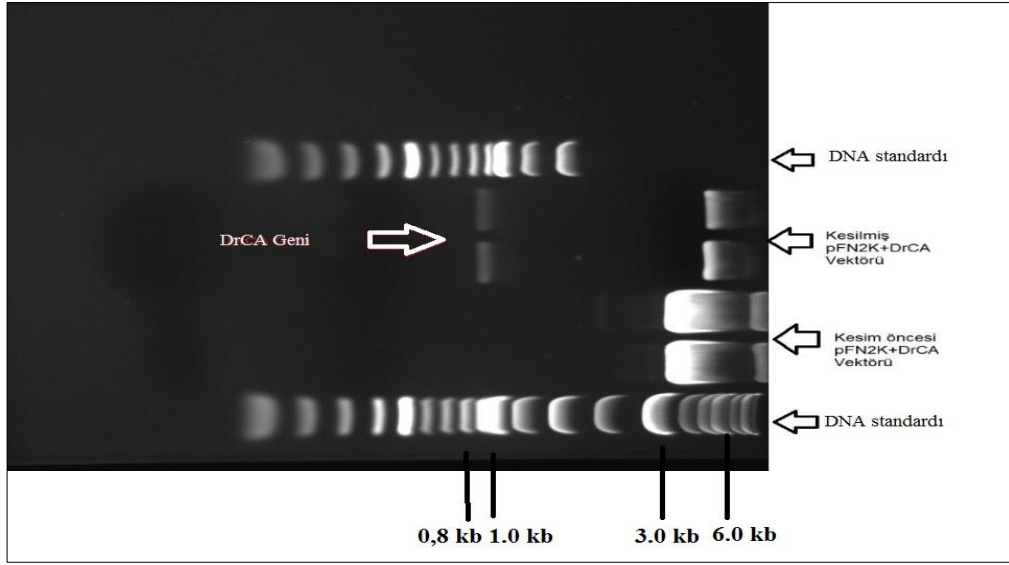
Pfu DNA polimeraz ile yapılan PCR sonucuna göre belirlenen PCR ürünü, *SgfI*&*PmeI* restriksiyon enzimleriyle kesime uğratıldıktan sonra, ligasyon yapılmış ve hem elektroporasyon hem de kimyasal transformasyon yolu ile kompetent *E. coli* DH5 α konağına aktarılmıştır. Ardından IPTG, Xgal ve 50 μ g/ml kanamisin içeren LBA petrilinde inkübe edilmiştir. Gerek kimyasal transformasyon gerekse

elektroporasyonla aktarım denense de, sadece elektroporasyon sonucu plazmid DNA aktarımı yapılan besiyerlerinde koloni oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.10). Mavi renkli insert DNA'yı aldığı düşünülen kolonilerden 3 tanesi seçilerek 50 µg/ml kanamisin içeren 5 ml'lik LB'lere tek koloni ekimi yapılmış ve 15 saat çalkalayıcılı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 4.10 *E. coli* DH5α klonlarının sırasıyla LBA'da ve LB'de görünümü

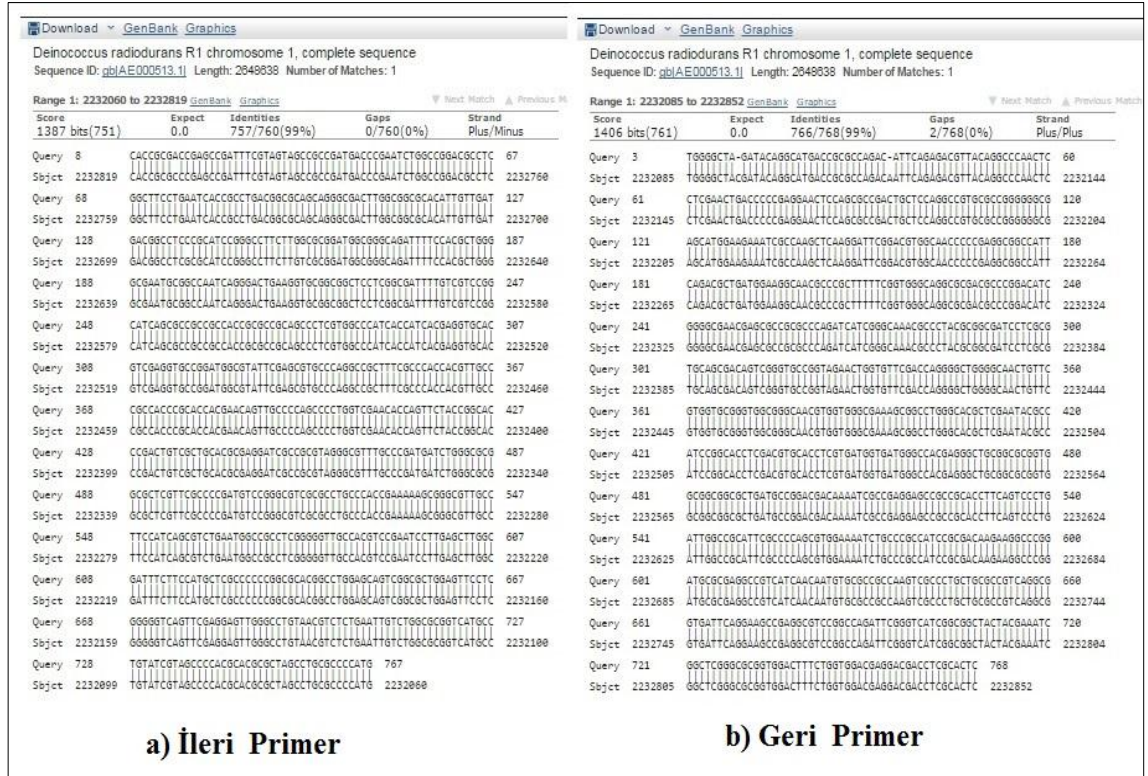
Bu *E. coli* DH5α klon kültürlerinden saflaştırılan plazmid DNA'lar, gen ekspresyonu için *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine aktarılmadan önce, drCA genini içerip içermediklerini kontrol etmek amacıyla restriksiyon enzimleriyle kesime uğratılmış ve sonuçlar şekil 4.11 agaroz jelde görüntülenmiştir. Şekil 4.11'e bakıldığında, 335 bç'lik barnaz geni yerine insert edilen 820 bç'lik (restriksiyon enzim kesim bölgeleri dahil) drCA genini taşıyan plazmid vektörün kesilmemiş hali ile *SgfI/PmeI* restriksiyon enzimleriyle kesime uğratıldıktan sonraki vektörün ve drCA geninin ayrı ayrı olan bantları görülmektedir. Restriksiyon enzimleriyle kesim sonrasında plazmid vektörün barnaz geni yerine DrCA genini içerdiği ve böylece transformasyonun başarılı olduğu ispatlanabilmiştir. Böylece DrCA geni içeren vektör ilk konağı olan *E. coli* DH5α konağına klonlanabilmiştir.



Şekil 4.11 *E. coli* DH5 α 'dan izole edilen plazmid DNA'nın restriksiyon kesim sonrası jel görüntüsü (DNA standardı NEB, N3200S)

4.7 Dizi Analizi

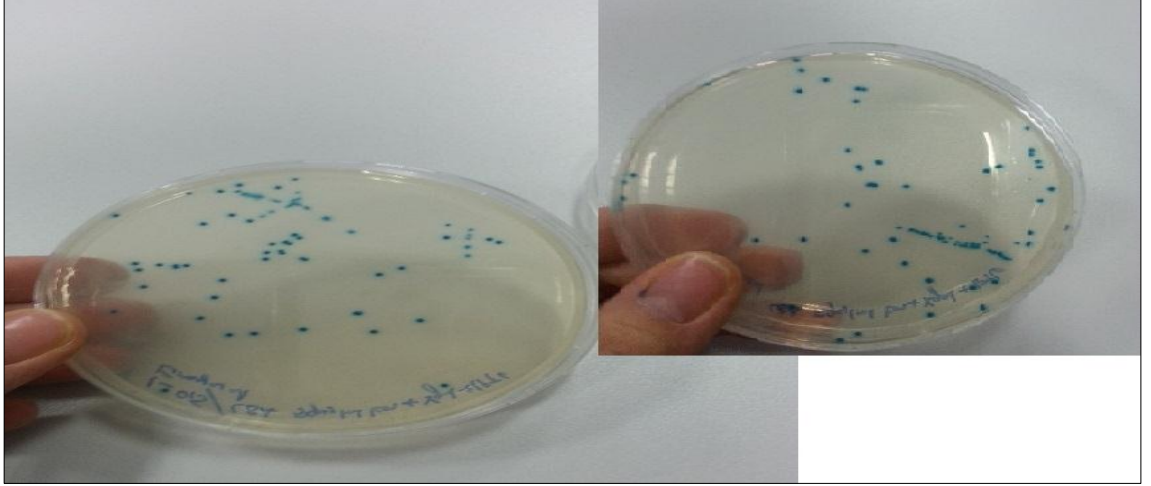
Klonlamanın başarılı ve doğru bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek amacıyla, *E. coli* DH5 α 'dan izole edilen plazmid DNA'ya, dizi analizi (Medsantek Ltd. Şirk.) yaptırılmıştır. Her ne kadar spesifik primerler kullanılsa da, PCR'a dayalı amplifikasyonlarda yanlış hibridizasyonlar olabileceğinden ve daha sonraki ekspresyon çalışmalarında kullanılacak olan Açık Okuma Çerçevesinde (ORF) DNA polimeraz kaynaklı oluşabilecek tesadüfî mutasyonların varlığının kontrol edilmesi adına, dizileme aşaması önem arz etmektedir. Elde edilen DNA dizi analizi sonuçları, NCBI (National Center for Biotechnology Information)'a ait internet adresi kullanılarak biyoinformatik çalışmalarla incelenmiştir. Dizi analizinden elde edilen genin büyüklüğü, restriksiyon kesim bölgeleri de dâhil orijinal drCA genine benzer şekilde 820 bp olarak belirlenmiştir. Ayrıca, PCR'a dayalı olarak herhangi bir mutasyon oluşmadığı, klonlanan genin *D. radiodurans* R1 genomundaki orijinal DrCA genine % 99'un üzerinde dizi benzerliği gösterdiği teyit edilmiştir (Şekil 4.12). Ayrıca Blast sonucu ek 1'de verilmiştir.



Şekil 4.12 DNA dizi analizi sonucu elde edilen dizinin sırasıyla **a)** ileri ve **b)** geri primerlerle okunması sonrası *D. radiodurans* R1 genomu ile yapılan karşılaştırmalı NCBI BLAST tarama sonucu

4.8 *E. coli* DH5 α 'dan İzole Edilen Plazmidin *E. coli* BL21 (DE3) Konağına Aktarımı

Tezin ana hedefi olan enzimin saflaştırılması aşamasında kullanılacak olan ve klonlamada ekspresyon konağı olarak bilinen *E. coli* BL21 (DE3) suşunun plazmid stabilitesi düşük olduğundan, bir sub-klonlamaya ihtiyaç duyulmuştur. Bu nedenle *E. coli* DH5 α hücresinden izole edilen rekombinant plazmid vektör, protein ekspresyonunda daha başarılı olduğu bilinen *E. coli* BL21 (DE3) konağına ikinci kez klonlanmıştır. *E. coli* BL21 (DE3) konağına hem elektroporasyon hem de kimyasal transformasyon yöntemiyle plazmid vektörün aktarımı yapılmıştır. IPTG, Xgal ve 50 μ g/ml kanamisin içeren LBA petrilinde inkübasyon sonrasında, *E. coli* DH5 α 'da yürütülen klonlamanın aksine, bu sefer kimyasal transformasyonla plazmid DNA aktarımı yapılan besiyerlerinde mavi renkli rekombinant geni içeren koloniler gözlenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 *E. coli* BL21 (DE3) klonlarının LBA'daki görüntüsü

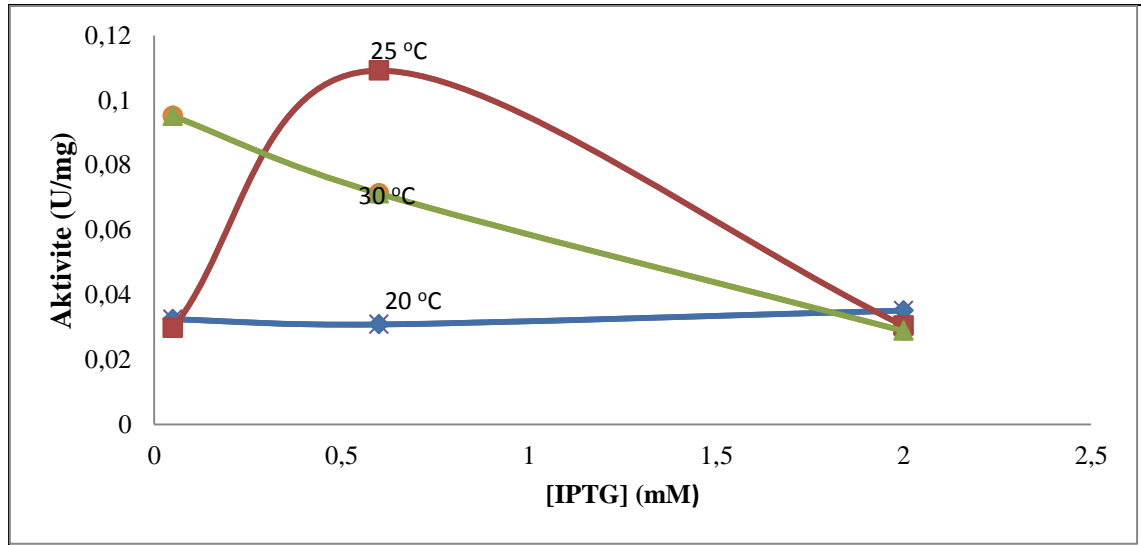
4.9 Rekombinant DrCA Enziminin Spesifik Hidrataz Aktivitesinin Belirlenmesi

Rekombinat plazmidin vektörün *E.coli* BL21 (DE3) hücrelerine aktarılmasından, drCA geninin en iyi ifade edildiği IPTG konsantrasyonunu ve sıcaklığını belirlemek için, *E. coli* BL21 (DE3)'le farklı sıcaklık ve IPTG konsantrasyonlarında induksiyon yapılmıştır. İndüksiyon süresi sonunda 3 tekrarlı çalışılan örneklerin spesifik hidrataz aktivitesi belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3'de sunulduğu üzere, 3 farklı sıcaklık ve IPTG konsantrasyonunda drCA enziminin spesifik hidrataz aktivite sonuçları görülmektedir. Sonuçlar ayrıca şekil 4.14'de grafik halinde sunulmuştur. Bu sonuçlara göre en iyi aktivite 25°C'de ve 0.6 mM IPTG konsantrasyonunda görülmektedir. Aktivite sonuçlarına bakıldığında, belirlenen bu sıcaklık ve süredeki induksiyonun (0.109 U/mg), kontrole kıyasla (0.036 U/mg) çok yüksek enzim üretimine sebep olduğu belirlenmiştir. 20°C'de yeterli ekspresyonun sağlanamadığı ve buna bağlı olarak düşük bir aktivite görüldüğü, 30°C'de ise IPTG konsantrasyonunun artmasıyla birlikte hücreler üzerinde toksik etki oluşturabileceği ve bunun da aktivitede bir düşüşe neden olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.3 Sıcaklık ve IPTG konsantrasyonlarına bağlı olarak (pH 9.0, 25°C) ölçülen pFN2K: DrCA'nın Spesifik hidretaz enzimin Aktivite Sonuçları

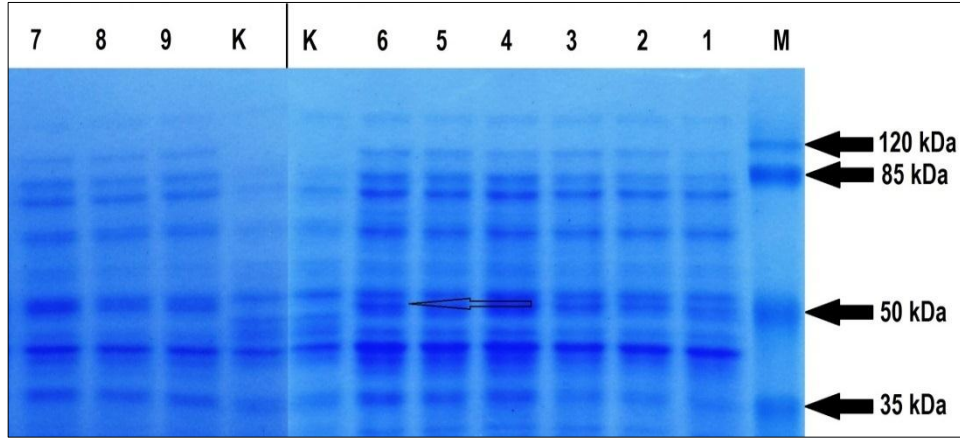
İnkübasyon Sıcaklığı	IPTG konsantrasyonu (mM)	Hidrataz Aktivitesi (U/ml)	Spesifik Hidrataz Aktivite (U/mg)
20 ° C	0.05	0.024	0.033
	0.6	0.026	0.031
	2	0.03	0.035
25 ° C	0.05	0.03	0.030
	0.6	0.094	0.109
	2	0.026	0.030
30 ° C	0.05	0.076	0.095
	0.6	0.048	0.071
	2	0.024	0.029
Kontrol	0	0.022	0.036



Şekil 4.14 pFN2K: DrCA Ekspresyonunun Optimizasyonu için farklı sıcaklık ve IPTG konsantrasyonlarında (pH 9, 25°C) ölçülen DrCA hidrataz aktivitesi değerleri

IPTG ile induksiyon sonrası enzim aktivitesi ölçülen numuneler aynı zamanda SDS-PAGE ile de analiz edilmiştir (Şekil 4.15). Klonlanan drCA geni, GST-tag ile birlikte bulunduğundan sentezlenen protein de bir füzyon proteinidir. Proteinin toplam molekül ağırlığı 54 kDa'dır. (drCA; 28 kDa, GST-tag; 26 kDa). Bu çalışma da, kontrol olarak rekombinant plazmid aktarılmamış yabancıl tip *E.coli* BL21 (DE3)'ün protein profili kullanılmıştır (Hat K). Protein standardında, 50 kDa olan protein bandıyla yaklaşık

olarak aynı hızda bulunduğu düşünülen görülen protein bandının, kontrol örneğinde bulunmadığı görülmüştür (Şekil 4.15). Yine en koyu ve yoğun bantlar 25 °C’de yapılan induksiyonlara ait örneklerde (Hat 4, 5 ve 6) görülmektedir. Elde edilen bu sonuçlarla spesifik enzim aktivitesi sonuçları arasında bir korelasyon olduğu görülmektedir.



Şekil 4.15 IPTG induksiyonu sonrası numunelerin SDS-PAGE görüntüsü

Hat 1-9: 20 °C-0.05mM IPTG, 20 °C-0.6 mM IPTG, 20 °C-2 mM IPTG, 25 °C-0.05 mM IPTG, 25 °C-0.6 mM IPTG, 25 °C-2 mM IPTG, 30 °C-0.05 mM IPTG, 30 °C-0.6 mM IPTG, 30 °C-2 mM IPTG, **K:** Kontrol, klonlama yapılmamış yabancı tip *E. coli* BL21 (DE3) konağı, **M: Protein Standardı:** (Thermofisher, 26616)

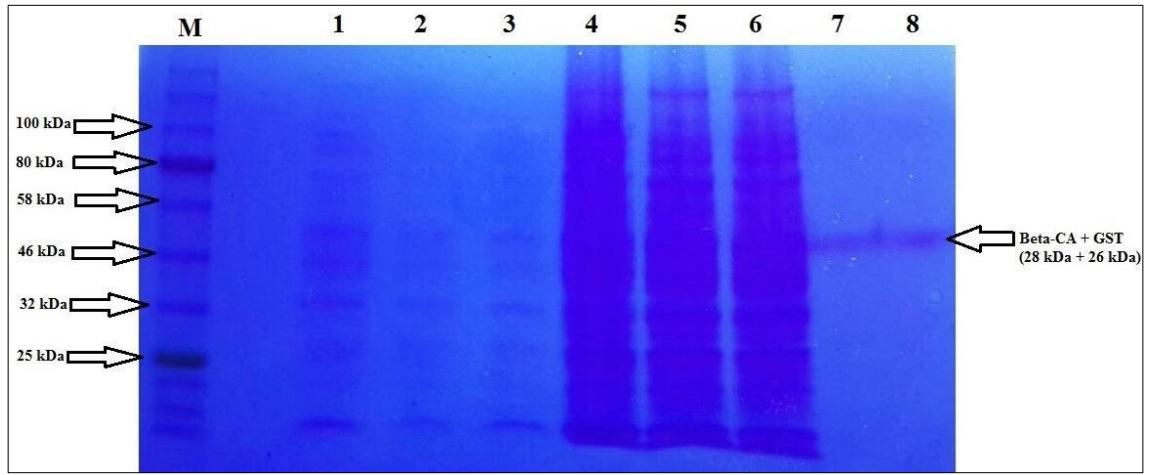
4.10 Rekombinant Proteinin DrCA Enziminin Analizi

Bölüm 4.10’da anlatıldığı üzere rekombinant *E. coli* BL21 (DE3) konağı LB besiyerinde 25°C’de, 0.6 mM IPTG varlığında indüklenerek en yüksek enzim aktivitesi değeri göstermektedir. Magic Media besiyerinde 30°C’de 18 saat geliştirildiğinde, rekombinant konak hiçbir induksiyona ihtiyaç duymadan DrCA enzimini üretebilmektedir. Bu sebeple, rekombinant enzim saflaştırılmadan önce LB induksiyon yapılmadan doğrudan besiyerinde Magic Media besiyerinde 30°C’de 18 saat geliştirildikten sonra saflaştırılmıştır.

4.10.1 MagneGST ile rekombinant proteinin saflaştırılması

MagneGST protein saflaştırma sistemi ile saflaştırılan rekombinant DrCA enziminin, saflaştırma sonucu elde edilen örneklerinin SDS-PAGE analizleri yapılmıştır. Daha

önce de belirtildiği üzere, klonlanan DrCA geni, GST-tag ile birlikte bir füzyon proteini şeklinde bulunmaktadır. Proteinin toplam ağırlığı 54 kDa'dur. (drCA; 28 kDa, GST-tag; 26 kDa). Şekil 4.16'da SDS-PAGE jel görüntüsü görülmektedir. Buna göre protein standardından sonra gelen ilk üç bant, saflaştırma sırasında yıkama aşamalarına ait örneklerdir. 4, 5 ve 6. hatlar, protein lizatlarına ait bantlar, 7 ve 8. hatlar ise nihai elüsyon örnekleridir. Beklenildiği üzere saf enzim tek bir protein bandı vermiştir ve bu da, GST-tag kuyruğu ile kombine 54 kDa'lık DrCA füzyon proteininin bilinen moleküler ağırlığı ile eşit molekül ağırlığına sahiptir.



Şekil 4.16 Magic besiyeri kullanılarak 30°C'de 18 saat geliştirilen rekombinant *E. coli* BL21 (DE3)'e ait DrCA'nın saflaştırılması sırasında elde edilen örneklerin SDS-PAGE görüntüsü

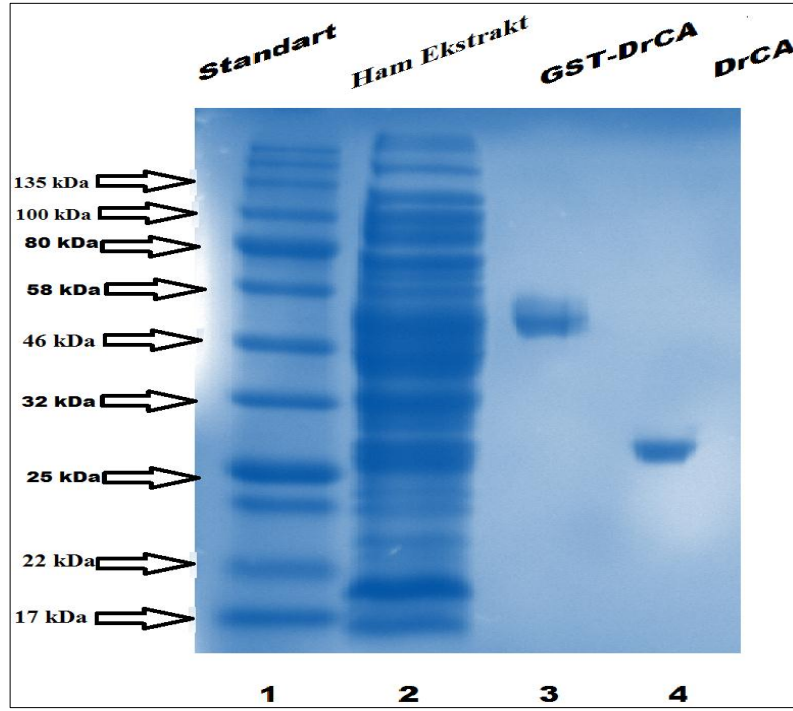
Hat 1-3: Yıkama örnekleri **4-6:** Lizatlar **7-8:** Elüsyon örnekleri, **M:** Standart (New England Biolabs, P7712S).

4.10.2 GST-tag Pro-Tev Proteaz ile DrCA'nın füzyon proteininden ayrılması

GST füzyon proteini şeklinde bulunan DrCA enziminin GST-tag kuyruğu, Pro-TEV Plus proteaz enzimi kullanılarak koparılmış ve reaksiyon örneği yeniden MagneGST'ye tabi tutulmuştur. Saflaştırma işleminde daha önce 3.2.21'de ayrıntılı bir şekilde açıklanan protokol aynen uygulanmış ve GST-tag kuyruğu uzaklaştırılmış enzim saf halde elde edilmiştir. Bu işlem sonrası yapılan SDS-PAGE analizi sonucunda, protein standardından sonra gelen 2. hattaki, ilk indüksiyon sonrası ekstraktan elde edilen

proteinlerin tamamı görülmektedir. 3. hatta GST-tag ile birlikte bulunmakta olan DrCA füzyon proteini görülmektedir.

Bu füzyon proteinin toplam molekül ağırlığı 54 kDa'dur (drCA; 28 kDa, GST-tag; 26 kDa). 4. hatta ise GST-tag'ın Pro-TEV Plus proteaz enzimi kullanılarak koparılmasının ardından MagneGST ile muamele edilen reaksiyon örneğinin elüsyonundan sonra elde edilen saf DrCA proteini (DrCA; 28 kDa) görülmektedir (Şekil 4.17). Saflaştırılan bu son protein fraksiyonundaki hidrataz aktivitesi ise (pH 9.0, 25°C) 0.089 U/ml olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.17 GST-tag füzyon proteini ve GST-kuyruğun Pro-TEV proteaz ile kesimini takiben yapılan MagneGST saflaştırması sonucu elde edilen saf DrCA proteininin SDS-PAGE görüntüsü

1: Protein Standartı (New England Biolabs, P7712S), **2:** Ham ekstrakt, **3:** GST-Tag-DrCA füzyon proteini, **4:** Saf DrCA enzimi

4.10.3 İntraselüler rekombinant DrCA enziminin saflaştırılma çalışmasına ait sonuçlar

Hücre içi rekombinant DrCA enziminin MagneGST saflaştırma kiti kullanılarak elde edilen her saflaştırma basamağından alınan numunelerin saflaştırma verimi ve katsayısına ait değerler çizelge 4.4’de sunulmuştur.

Rekombinant DrCA enzimi son elüsyon neticesinde, % 94.68 verimle 494.5 kat saflaştırılabilmektedir. 25°C’de 0.6 mM IPTG konsantrasyonunda geliştirilen *E. coli* BL21 konağının ham ekstraktındaki spesifik hidrataz aktivitesi 0.109 U/mg olarak hesaplanırken, saflaştırılan enzimin spesifik hidrataz aktivitesi değeri 0.539 U/mg olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4). Bu sonucu göre de ekspresyon için kullanılan ikinci *E. coli* BL21 konağının hedef enzimi indüksiyon sonucunda yüksek oranda ifade ettiği ve klonlamanın başarılı olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.4 DrCA enziminin saflaştırma basamakları

Numune türü	Hidrataz Aktivitesi (U/ml)	Toplam hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite	Spesifik hidrataz aktivitesi (U/mg)	% verim	Saflaştırma katsayısı
Ham Ekstrakt	0.094	0.200	0.861	0.1722	0.0188	0.109	100	1.0
1. yıkama	0.011	0.250	0.544	0.136	0.00275	0.0202	-	-
2. yıkama	0.004	0.250	0.010	0.0025	0.001	0.4	-	-
3. yıkama	0	0.250	0	0	0	0	-	-
Elüsyon	0.089	0.200	0.165	0.033	0.0178	0.539	94.68	494.5

NOT: Saflaştırma basamakları aşağıda verilen formüllere göre hesaplanmıştır.

Toplam protein (mg) = Protein (mg/ml) x Hacim (ml)

Toplam aktivite (U) = Enzim aktivitesi (U/ml/min) x Hacim (ml)

Spesifik aktivite (U/mg) = Toplam aktivite/Toplam protein

Verim (%) = Toplam aktivite/Ham ekstraktın toplam aktivitesi

Saflaştırma katsayısı = Spesifik aktivite/Ham ekstraktın spesifik aktivitesi

4.10.4 Saflaştırılan DrCA enziminin hidrataz aktivitesinin optimum pH, optimum sıcaklık ve termostabilite değerlerinin belirlenmesi

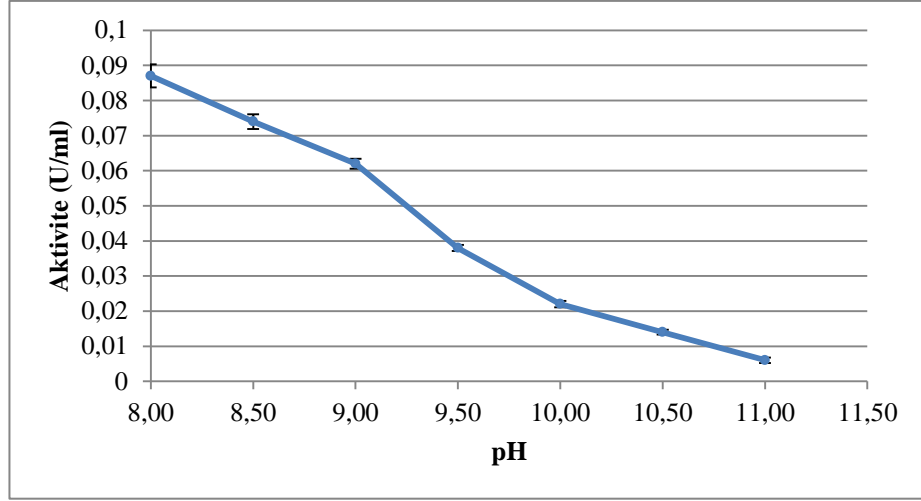
pH’nın DrCA enzimi üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla hidrataz aktivitesinde kullanılan HEPES tamponu pH 8.0, pH 8.5, pH 9.0, pH 9.5, pH 10.0, pH 10.5 ve pH

11.0 şeklinde ayarlanmış ve hidrataz enzim aktivitesi ölçümü yapılmış ve sonuçlar grafik halinde şekil 4.18'de sunulmuştur. Buna göre saf enzim pH 8.0'de, 30°C'de 0.087 U/ml olacak şekilde en yüksek hidrataz aktivitesi göstermiştir. Enzim pH 9.5 ve sonrasındaki değerlerde ise göreceli olarak aktivitesinin %50'sini kaybetmeye başlamıştır.

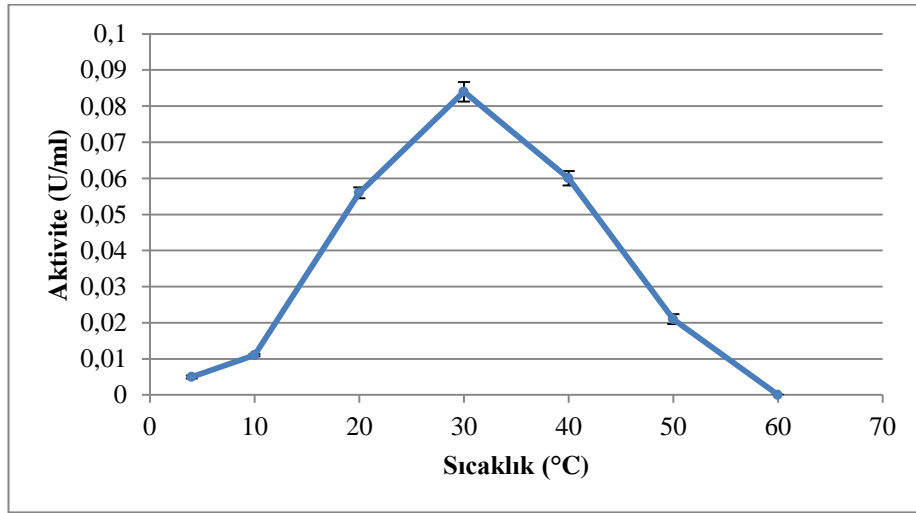
Sıcaklığın saf DrCA enzimi üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla 0-70°C aralığındaki sıcaklıklar ve termostabilite çalışmalarında ise 30-70°C aralığındaki sıcaklık değerleri kullanılmış olup bu sonuçlarla ilişkili grafikler şekil 4.19 ve 4.20'de sunulmuştur. Enzimin aktivite gösterebildiği sıcaklık değerleri 10 ile 55°C arasında bulunmuştur ve yine şekil 4.19'a bakıldığında enzimin optimum sıcaklığının 30°C olduğu (0.084 U/ml), bu sıcaklığın üzerindeki ve altındaki sıcaklıklarda enzim aktivitesinin düştüğü görülmektedir.

Sıcaklığın artmasıyla birlikte enzimin üç boyutlu yapısında meydana gelen denatürasyon enzimi yine inaktif hale getirmektedir. Termostabilite çalışmasının sunulduğu şekil 4.20'ye bakıldığında ise, farklı sıcaklıklarda 7 saat süresince tutulan enzimin aktivitesinde meydana gelen değişim bağıl aktivite cinsinden (%) sunulmuştur.

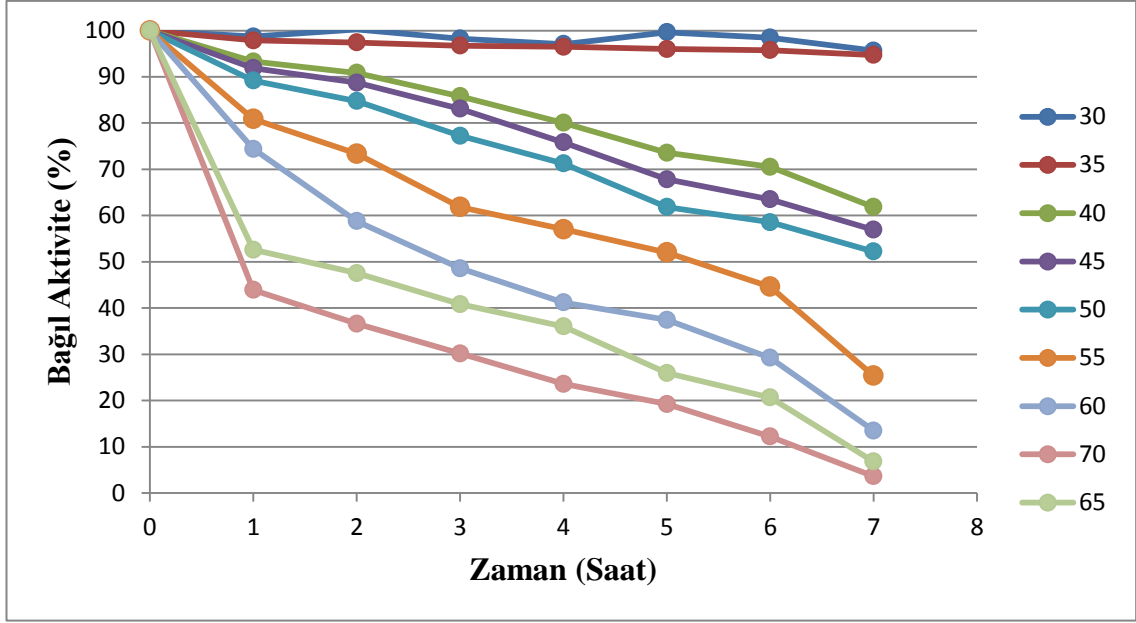
Hiç sıcaklıkla muamele edilmemiş enzim aktivitesi %100 olarak kabul edildiğinde, en az değişimin olduğu sıcaklık, 30°C olarak belirlenmiştir. Yani enzimin, 7 saat süresince aktivitesini en iyi koruduğu sıcaklık 30°C'dir. Aktivitenin en fazla değişime uğrayarak aktivite düşüşünün en yüksek olduğu sıcaklık ise 70°C olarak belirlenmiştir. Ayrıca enzimin 50°C'de 7 saat tutulduğunda aktivitesinin %50'sini kaybettiği görülmüştür. Sonuç olarak rekombinant DrCA enzimi 30 ila 50 °C arasında stabilitesini korumuştur.



Şekil 4.18 Rekombinant DrCA enziminin farklı pHdeğerlerinde gösterdiği hidrataz aktivitesi grafiği



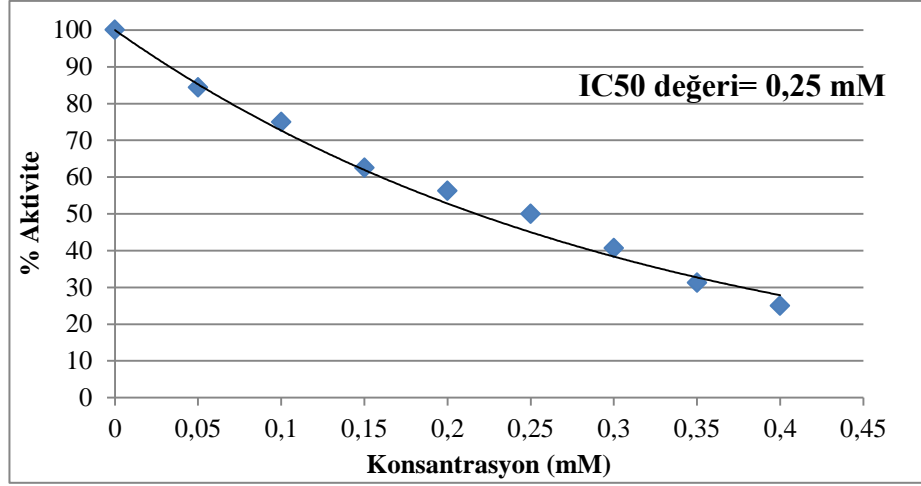
Şekil 4.19 Rekombinant DrCA enziminin farklı sıcaklık değerlerinde (pH 9.0, 25°C) gösterdiği hidrataz aktivitesi grafiği



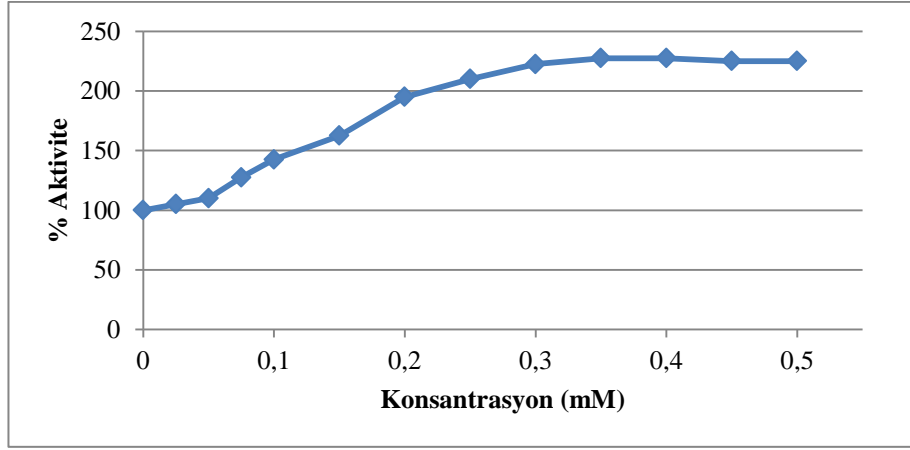
Şekil 4.20 Rekombinant DrCA enziminin (pH 9.0, 25°C) farklı sıcaklık değerlerinde termostabilitesini gösteren hidrataz aktivitesi grafiği

4.11 Bazı metal iyonlarının ve Sülfonamid'in saf DrCA üzerine etkisi

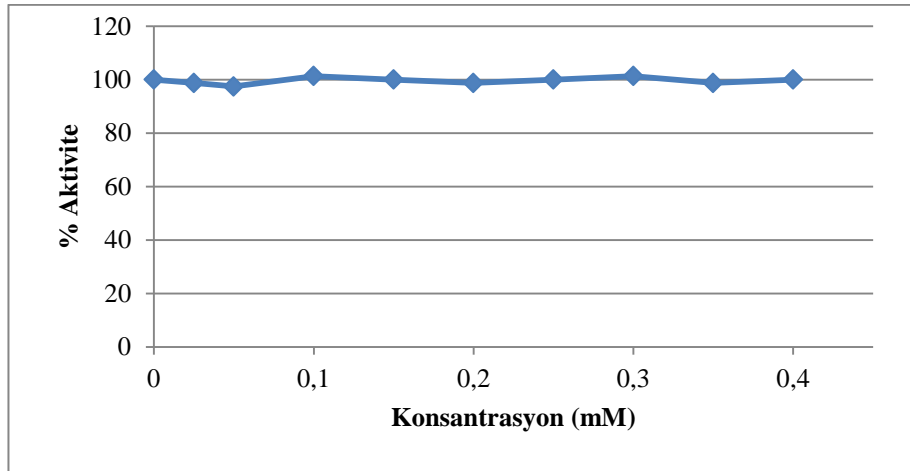
Bazı metal iyonlarının ve Sülfonamid'in DrCA enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ca^{+2} , Zn^{+2} iyonlarının ve sülfonamidin farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri kullanılmış ve rekombinant DrCA enzimi üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Sonuçlar şekil 4.21-4.25'de % aktivite grafiği halinde sunulmuştur. Artan konsantrasyonlardaki sülfonamidin hidrataz aktivitesini kademeli olarak düşürdüğü ve bir inhibitör olarak davrandığı görülmüştür (Şekil 4.21). Sülfonamid konsantrasyonlarına bağlı olarak azalan eğri denkleminde sülfonamidin IC_{50} değeri 0.25 mM olarak hesaplanmıştır. 0.40 mM sülfonamidin enzim aktivitesini % 75 oranında düşürdüğü saptanmıştır. Ayrıca, şekil 4.23-4.25 arasındaki grafiklerde gözlendiği üzere, Mg^{+2} , Mn^{+2} ve Ca^{+2} iyonları hidrataz aktivitesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamış, fakat 0.3 mM ve üzerindeki Zn^{+2} 'nin hidrataz aktivitesini arttırdığı görülmüştür (Şekil 4.22). Buna göre en yüksek aktivite artışı, 0.45-0.5 mM Zn^{+2} varlığında % 125 oranında belirlenmiştir.



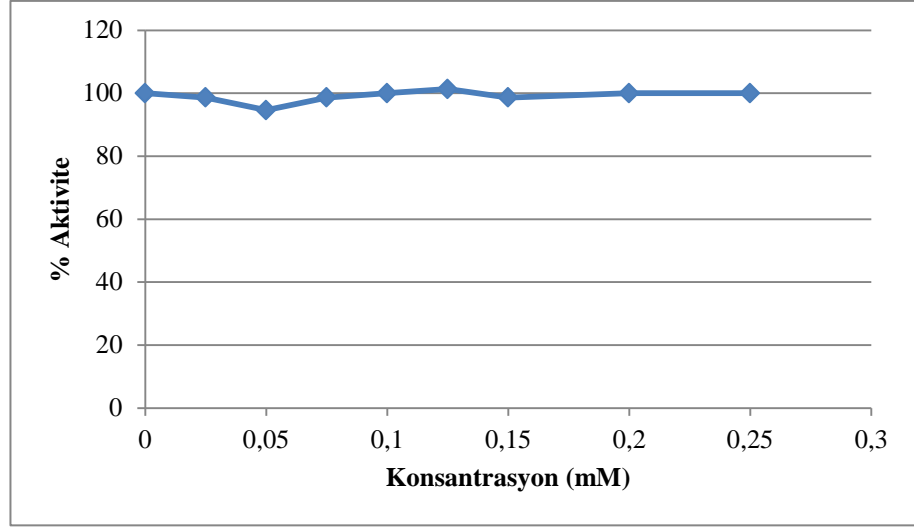
Şekil 4.21 Sülfonamidin DrCA enzimi üzerindeki inhibitör etkisi



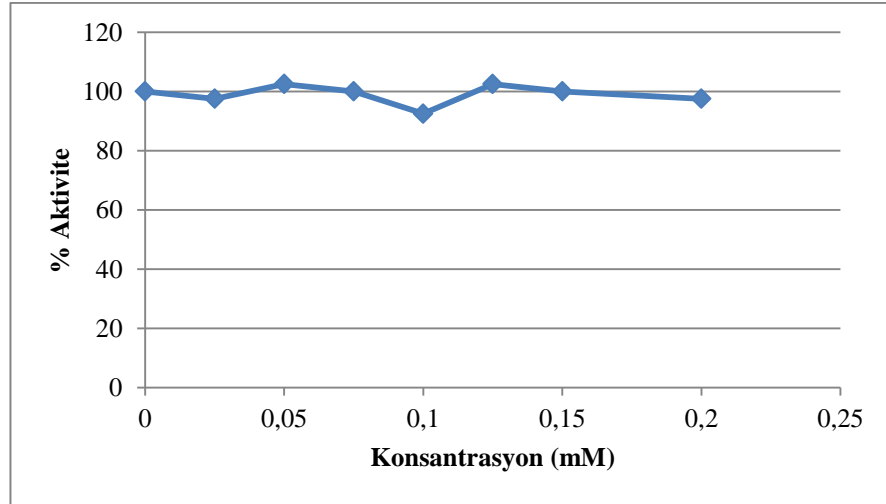
Şekil 4.22 Zn⁺² İyonunun DrCA enzimi üzerindeki etkisi



Şekil 4.23 Mg⁺² İyonunun DrCA enzimi üzerindeki etkisi



Şekil 4.24 Mn⁺² iyonunun DrCA enzimi üzerindeki etkisi



Şekil 4.25 Ca⁺² iyonunun DrCA enzimi üzerindeki etkisi

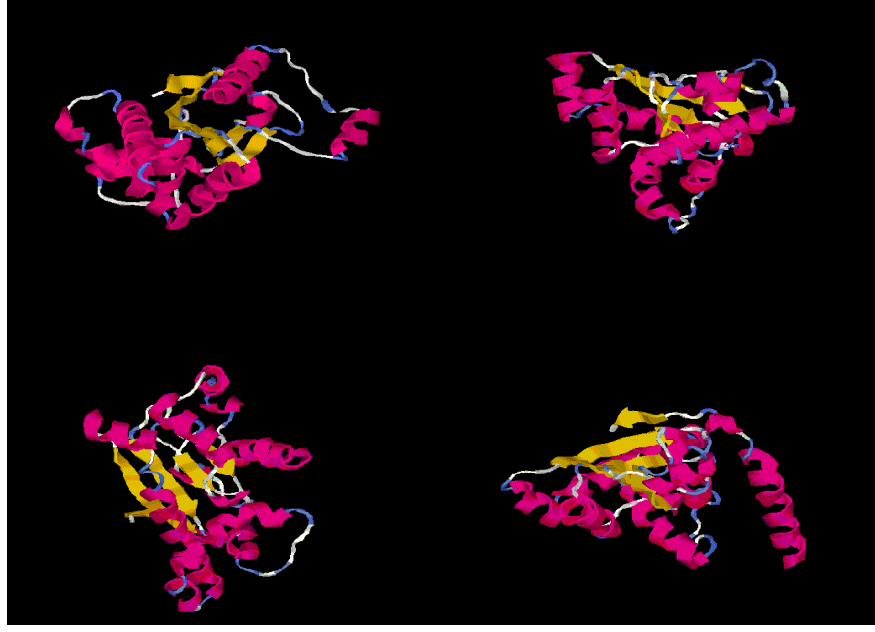
4.12 Klonlama ve Saflaştırmanın *D. radiodurans* R1'deki DrCA Aktivitesi ile Kıyaslanması

Çizelge 4.5'e bakıldığında *D. radiodurans* R1'in hücre kültüründen alınan 22. saat örneğinde hidrataz aktivitesinin (pH 9.0, 25°C) en yüksek değeri 0,0128 U/ml iken, safılaştırdığımız DrCA enziminin aktivitesi 0,089 U/ml (pH 9.0, 25°C) olarak tespit edilmiştir. DrCA geninin *E.coli* BL21 (DE3) hücresinde klonlanması ve 0.6 mM IPTG ile indüksiyon sonrası hesaplanan CA'nın en yüksek spesifik hidrataz aktivitesi 0.109 U/mg (0.094 U/ml) (pH 9.0, 25°C) iken, saf DrCA'nın spesifik hidrataz aktivitesi 0.539

U/mg (0.089 U/ml) (pH 9.0, 25°C) olarak belirlenmiştir. Rekombinant hücre ile saf enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında, enzim aktivitesinde bir artış ve yine spesifik hidrataz aktivitesinde yaklaşık 5 katı kadar önemli bir artış gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre klonlama başarısı hakkında önemli bir veri elde edilmiştir. Diğer taraftan, *D. radiodurans* R1 suşunda *p*-nitrofenol asetat substratı ile bakılan esteraz aktivitesi 25°C'de, pH 7.4'de 0,0128 U/ml olarak ölçülürken, saflaştırılan DrCA enziminin esteraz aktivitesi, β-CA familyasına dahil olması sebebiyle beklendiği üzere, 0.0002 U/ml olacak kadar eser miktarda ölçülebilmştir. Ayrıca, şekil 4.26'da DrCA'nın <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER> biyoinformatik arayüzü kullanılarak elde edilmiş olası üç boyutlu yapısı sunulmuştur.

Çizelge 4.5 DrCA geninin izole edildiği *D. radiodurans* R1 bakterisinin aktarım öncesi ve sonrası *E. coli* BL21 konağının ve saflaştırılan DrCA enziminin hidrataz aktiviteleri arasındaki farklar

Bakteri	DrCA Enzim Aktivitesi (U/ml)	DrCA Enziminin Spesifik Aktivitesi (U/mg)	Bakteri Gelişim Ortamı	Ölçümünün Yapıldığı pH/Sıcaklık
<i>D. radiodurans</i> R1	0.0128	-	TGYB 7.4/ 32°C	9.0/ 25°C
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) konağı	0.022	0.036	LB 7.0/ 37°C	9.0/ 25°C
Rekombinant <i>E. coli</i> BL21 (DE3) konağı	0.094	0.109	LB (50 µg/ml kanamisin içeren) 7.0/ 25°C	9.0/ 25°C
Saf DrCA enzimi	0.089	0.539	-	9.0/ 25°C



Şekil 4.26 DrCA'nın <http://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER> adresinden olası üç boyutlu yapısı

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Özellikle Dünya’da son yıllarda sera etkisine bağlı olarak yeryüzüne ulaşan iyonize radyasyon miktarının giderek artması, radyasyona dirençli mikroorganizmaların çalışılmasını cazip hale getirmektedir. Ekstremofil olarak bilinen bu canlıların direnç mekanizmalarının biyolojik, genetik ve moleküler seviyede aydınlatılması, yaşamın sınırlarının daha iyi anlaşılmasında temeldir ve diğer gezegenlerde ekstrem koşullarda yaşamın olup olmadığı sorusunu cevaplamamıza yardımcı olabilecektir. Bu koşullarda hayatta kalmaya adapte olan mikroorganizmaların evrimleşmeleriyle ilişkili bilgiler, evrim sürecini ve ekstrem ortamların genetik sonuçlarını daha iyi anlamamızı kolaylaştıracaktır. Bu bakımdan özellikle bu tür organizmaların yüksek evrimsel potansiyellerinin ve direnç fizyolojisinin aydınlatılması, radyasyonun etkisine karşı alınabilecek önlemlere bir katkı sağlayabilmesi bakımından önem arz etmektedir.

Bir metalloenzim sınıfında yer alan karbonik anhidraz enzimi, çok basit ama oldukça önemli bir fizyolojik reaksiyon olan CO_2 ’nin HCO_3^- ’e ve H^+ ’a hidrolizini hızlı bir şekilde katalizler. Karbondioksit, bikarbonat ve proton, yaşayan üç domainde de (*Bacteria*, *Archaea* ve *Eukarya*) birçok önemli fizyolojik işlemde temel moleküller veya iyonlar olduklarından ve bu organizmaların farklı doku veya hücrelerinde görece yüksek miktarlarda bulunmalarından dolayı hayati öneme sahiptir. CA enzimi; solunumda gaz değişimi, asit-baz homeostasisi, elektrolit salgısı, üreogenez, glukoneojenez, yağ asidi sentezi, iyon taşınımı, omurgalılarda kas kasılması ve bitki-alglerde fotosentez gibi çok temel fonksiyonu olan, farklı fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerde merkezi rol oynayan önemli bir enzimdir. Bunların yanısıra, siyanatın karbamik aside veya siyanamidin üreye hidrasyonu, gem-diollere aldehit hidrasyonu, karboksilik ve sülfonik esterlerin hidrolizi gibi çok sayıda reaksiyonu katalizlemektedir. CA’nın, CO_2 hidrasyonu gibi temel fizyolojik öneme sahip esansiyel rolünün yanısıra, yukarıya belirtilen pek çok metabolik sürece katkı sağladığı bilinmektedir (Smith ve Ferry 2000, Supuran ve Scozzaava 2007, Vullo vd. 2015).

Son zamanlarda prokaryot fizyolojisinde de önemli bir yeri olduğu düşünülen CA’nın üzerinde yoğunlaşan çalışmalar, bu enzimin yeni fonksiyonlarının belirlenmesi

bakımından önemlidir. Ayrıca, yeni CA izozimlerinin ve sınıflarının saflaştırılması, katalitik etkinlikleri ve mekanizmalarının araştırıldığı her çalışma bu konudaki bilgi açığının kapatılmasına katkı sağlayacaktır. Özellikle enzim saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmalarında, bol miktarda saf enzime ihtiyaç duyulduğundan, artık günümüzde daha yüksek bir verimle enzim üretimi yapabilecek farklı konaklara hedef genin klonlaması ve ekspresyonu çalışmaları ön plana çıkmaktadır. Ayrı bir çalışma olarak *D. radiodurans* 5.0-9.0 gibi farklı pH değerine sahip TGYB besiyerlerinde 32°C’de geliştirilmiş ve 1., 3., 5., ve 24. saatlerde alınan örneklerden DrCA aktivitesine bakılmıştır. Optimal gelişim, pH 7.25’de gözlemlenmiş ve zamana bağlı olarak ortam pH’sında meydana gelen değişim nedeniyle DrCA aktivitesinde sürekli bir artış gözlenmiştir. Artışın en yüksek görüldüğü pH aralığı 6.75-7.75 arasındadır. Bunun nedeni, bu aralığın hücrenin optimum gelişim pH’sına yakın olması ile açıklanabilir. Hücre yoğunluğu bu noktada fazla olduğundan DrCA aktivitesindeki değişim, buna bağlı olarak artış göstermiştir. Bu aralıkta DrCA aktivitesinin özellikle 1. saatte düşük olması, ortam pH’sının hücrenin optimum pH’sına yakın oluşundan ve karbonik anhidraza ihtiyacın düşük olmasından ileri geldiği düşünülebilir. 24 saatte aktivitede ciddi bir artışın meydana gelmesinin nedeni olarak hücre yoğunluğunun artışı ile birlikte ortamda biriken atık maddeler, serbest radikallerin artışı ve buna bağlı olarak hücre içi pH seviyesini istenilen seviyeye getirme isteği ve DrCA’ya olan ihtiyacın arttırmasıdır.

Tez çalışması kapsamında, yüksek seviyede (15,000 Gy>) radyasyon altında hayatta kalabilen ve bu denli yüksek radyasyona karşı koyabilmek gibi ekstrem bir yeteneğe sahip bakterilerden biri olan *D. radiodurans*’ın, direnç fizyolojisinde önemli olduğunu düşündüğümüz karbonik anhidraz enziminin klonlanması, ekspresyonu, saflaştırılması ve kısmi karakterizasyonu yapılmıştır.

Öncelikle *D. radiodurans*’ın oluşturulan gelişim eğrisine paralel olarak ölçülen DrCA enziminin hidrataz aktivite ölçümü yapılmıştır. Çizelge 4.1 ve şekil 4.4’e bakıldığında en yüksek enzim aktivitesi 20-23. saatlerde 0.0128 (U/ml) olarak ölçülmüştür. Bölünme hızında yavaşlamanın başladığı 26. saatten itibaren, DrCA aktivitesinde bir miktar durağanlık ve sonrasında bir miktar azalma görülmektedir. 50. saatten sonra enzim aktivitesinde bir artış görülmesinin nedeni; metabolizma artıklarının ve toksik

maddelerin birikmesi, ozmotik basıncın ve yüzey geriliminin değişmesi, oksijenin azalması, besiyerinde bulunan fermente olabilir karbonhidratların ayrışması sonucu oluşan çeşitli organik asitlerin, süperoksit radikallerinin ortamın pH 'sını değiştirmesi, vs. gibi faktörler nedeniyle olduğu düşünülmektedir.

β grubu CA üzerinde yapılan çalışmalarda *E.coli* CA'nın pH 9.0'da 25 °C'de kcat değeri 1.1×10^6 (Chirica vd. 1997), *H. pylori* CA'nın pH 8.3'de 20 °C'de kcat değeri 7.1×10^5 (s^{-1}) (Nishimori vd. 2007), *H. influenzae* CA'nın pH 8.0'de 20 °C'de kcat değeri 82 ± 19 ms^{-1} (Hoffmann vd. 2011), *S. enterica* CA 1 ve CA 2'nin pH 8.3'de 20 °C'de kcat değeri sırasıyla 1×10^6 kcat (s^{-1}) ve 7.9×10^5 kcat (s^{-1}) (Vullo vd. 2001), *S. pneumoniae* CA'nın pH 8.4'de 20 °C'de kcat değeri 7.4×10^5 (s^{-1}), *M. Tuberculosis* CA'nın pH 8.4'de 25 °C'de aktivitesi 0.04 U/ml bulunmuştur. Bu çalışmada ise yine pH 8.0'de 25 °C'de enzim aktivitesi 0,089 U/ml, spesifik aktivite ise 0,539 U/mg olarak bulunmuştur.

D. radiodurans R1 suşunun tüm genom dizisi çıkarılmıştır (White vd. 1999). *D. radiodurans*'ın tüm genom dizisinin temel alındığı bu araştırmada öncelikle biyoinformatik çalışmalar sonucu primer tasarımı yaptığımız ve β grubuna dâhil olduğunu bildiğimiz karbonik anhidraz enzimine ait DrCA geni PCR çalışmalarıyla çoğaltılmıştır. Ardından klonlama amacıyla henüz yeni kullanılmaya başlanan subklonlamada ikinci bir vektöre ihtiyaç duymaksızın tek bir vektör ile hem klonlamanın hem de ekspresyon çalışmalarının yapılmasına olanak sağlayan, pFN2K (GST) Flexi vektör sistemi kullanılmıştır. Bu vektör sistemi sayesinde hem klonlama kolaylıkla yapılabilmiş hem de sahip olduğu GST-tag kuyruk bölgesi sayesinde rekombinant protein kolayca saflaştırılabilmektedir. Literatürdeki farklı çalışmalarda PCR ürünü olan genleri klonlamak için değişik vektörler kullanılmıştır; Maya CA geni önce pGEM-T klonlama vektörüne, daha sonra da ekspresyon amacı ile pET21a vektörüne klonlanmış, *Aspergillus flavus* CA geni önce pGEM-T klonlama vektörüne, sonra pET30a (+) ekspresyon vektörüne, bir siyanobakteri olan *Nostoc commune*'nin γ CA geni pET15-b vektörüne klonlanmıştır. *D. radiodurans*'ın RNA polimeraz geni pET28 vektörü içerisine klonlanmıştır. Yine *D. radiodurans*'ın termostabil lipaz genlerini klonlamak için pMD-18T vektörü ve ekspresyon için pET-28a(+) vektörü kullanılmıştır

(Işık 2008, Ceylan 2013, Esyunina ve Kulbachinskiy 2015, Vullo vd. 2015). Ancak, şu ana kadar hiçbir çalışmada *D. radiodurans* karbonik anhidraz geninin klonlanması ve saflaştırılması yapılmamıştır.

DrCA genini alan vektör öncelikle RecA1 (RekombinazA1) ve EndA1 (EndonükleazA1) mutasyonlarına sahip olan ve bu sayede insert stabilitesi yüksek olduğu bilinen ve klonlamada kullanılmak üzere tasarlanmış *E. coli* DH5 α konağına aktarılmıştır. Ardından çoğalan hücrelerden rekombinant plazmid vektör izole edilmiş ve rekombinant vektörün dizi analizi yapılmıştır. Dizi analizi sonuçları biyoinformatik olarak değerlendirildiğinde (Şekil 4.12), klonlamanın başarılı olduğu sonucuna varılmıştır. Sub-klonlamanın ikinci ayağında ise, rekombinant proteinin ekspresyonu için yaygın olarak tercih edilen ve bu amaç için tasarlanmış *E. coli* BL-21 mutant konağı kullanılmıştır. *E. coli* BL-21 bazı proteazlardan yoksun olduğunda, rekombinant proteini daha az sindirebilir. Ayrıca, T7 RNA polimeraz genine sahip olup, IPTG ile induksiyona açıktır. Bu nedenle rekombinant protein ekspresyonu için IPTG ile induksiyon denemeleri yapılmış; ancak saflaştırmadan önceki enzim üretimi ise IPTG induksiyonunu ihtiyacını ortadan kaldıran Magic Medium kullanılarak yürütülmüştür.

E. coli BL21 konağına aktarılan DrCA geninin, farklı sıcaklık ve konsantrasyonlarda uygulanan IPTG varlığındaki ekspresyon seviyeleri, gerek enzimatik aktivite ölçümü, gerekse SDS-PAGE analizi ile kıyaslanmış olup, 25°C'de 0.6 mM IPTG varlığında enzim üretiminin indüklendiği ve negatif kontrol ile kıyaslandığında, aktarılan DrCA geninin moleküler ağırlığına eşdeğer bir protein bandının ekspresyonunda önemli bir artışın olduğu görülmüştür. Ayrıca induksiyon sırasında metal iyonu yönünden fakir olan LB sıvı besiyeri ortamına 0.05 mM konsantrasyonda ZnSO $_4$ ilave edilmiştir. CA enzimi çinko bağımlı bir metallo enzim olduğundan, özellikle bu enzimlerin rekombinant ekspresyonunda, mid-log fazda gerekli metalin eklenmesi, seçici induksiyon, up-regülasyon ve bunların sonucunda da daha yüksek bir ifade sağlamakta ayrıca protein katlanmasını kolaylaştırdığı için stabiliteyi artırmaktadır.

Literatürdeki farklı çalışmalarda, saflaştırma basamaklarında, jel filtrasyon kromatografisi, His-Select HF nikel afinite jel metodu, Ni-NTA saflaştırma sistemi,

Glutasyon-Sefaroz-4B afinite kromotografisi gibi metodlar kullanılmıştır (Adak vd. 2002, Emond vd. 2008, Işık 2008). İncert edilen DrCA geni GST-tag kuyruğuyla beraber bir füzyon proteini halinde olup, bu füzyon proteininin, kolayca saflaşmasına olanak sağlayan MagneGST™ adlı bir protein saflaştırma sistemi kullanılmıştır. Rekombinant *E. coli* BL21 konağından saflaştırılan DrCA enzimi, %94.68 verimle ve 494.5 gibi yüksek bir saflaştırma katsayısı ile saflaştırılabilmektedir. Bu sonuca göre, saflaştırma yöntemi olarak kullanılan MagneGST'nin etkinliğinin yüksek olduğu ve yıkamalar sırasında protein kaybını minimize ettiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca afinite kolonları ile yapılan protein saflaştırmaları yöntemleri gibi diğer birçok metoda göre daha duyarlı ve verimli olduğu söylenebilir. Afinite kromotografisi temel alınarak tasarlanmış bu sistemde, manyetik partiküller kullanılarak basit, hızlı ve güvenilir bir şekilde, madde kaybını minimize ederek bir saflaştırma gerçekleştirilebilmiştir. Manyetik partikül içermeyen GST saflaştırma matrisleri ile hem az miktardaki protein saflaştırılmakta hem de zamandan tasarruf edilmektedir. Paramanyetik partiküllerin kullanımı, birkaç santrifüj basamağını ve fazla tüp ihtiyacını elemine etmektedir. Ayrıca çalışmamızda kullanılan bu saflaştırma yönteminin çok yeni bir yöntem olması ve başarılı sonuç alınması ileride yapılacak olan çalışmalara öncülük yapması bakımından değerlidir.

Karakterizasyon çalışmaları için enzimin doğal formuna ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sebeple saflaştırılan DrCA-GST füzyon proteini, SDS-PAGE ile görüntüledikten sonra Pro-TEV proteaz aracılığıyla GST-tag kuyruğundan kurtarılmıştır. Enzimin SDS-PAGE analizlerinde GST-tag kuyruğundan ayrılan DrCA enziminin 28 kDa ağırlığında tek bir protein bandı verdiği görülmüştür. Saflaştırılan rekombinant enzimin farklı pH değerlerinde (8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11) hidrataz aktivite ölçümleri yapılmıştır. Şekil 4.18'de pH'ya bağlı aktivite grafiğine bakıldığında en yüksek aktivitenin pH 8.0'de, 0.087 U/ml olduğu ve bu noktadan sonra pH arttıkça aktivitenin düştüğü görülmektedir. Saflaştırılan rekombinant enzimin farklı sıcaklık değerlerinde aktivite ölçümlerinin yanı sıra termostabilite ile ilişkili deneyler yürütülmüştür. Enzimin aktivite gösterebildiği sıcaklık değerleri 10 ile 55°C arasında bulunmuştur ve enzimin optimum sıcaklığının 30°C olduğu (0.084 U/ml) bu sıcaklığın üzerindeki ve altındaki sıcaklıklarda enzim aktivitesinin düştüğü görülmektedir. Sıcaklığın artmasıyla birlikte

enzimin üç boyutlu yapısında meydana gelen denatürasyon, enzimi inaktif hale getirmektedir (Şekil 4.19).

Termostabilite çalışmasında (Şekil 4.20), farklı sıcaklıklarda 7 saat süresince tutulan enzimin aktivitesinde en az değişimin olduğu sıcaklık, 30°C olarak belirlenmiştir. Aktivitenin en fazla değişime uğradığı ve aktivite kaybının en yüksek olduğu sıcaklık ise 70°C olarak belirlenmiştir. Ayrıca enzimin 50°C’de 7 saat tutulduğunda aktivitesinin %50’sini kaybettiği görülmüştür. Klonlanan saf enzimin *p*-nitrofenol asetat substratı ile esteraz aktivitesi de eser miktarda 0,0002 U/ml olarak ölçülmüştür.

D. radiodurans’ın hücre kültüründen alınan 22. saat örneğinde DrCA aktivitesinin en yüksek değeri 0.0128 U/ml iken (Şekil 4.5), saflaştırdığımız DrCA enziminin aktivitesi 0.089 U/ml olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.3-4.5). DrCA geninin *E. coli* BL21 (DE3) hücresinde klonlanması ve 0,6 mM IPTG ile indüksiyon sonrası hesaplanan CA’nın en yüksek aktivitesi 0.094 U/ml (spesifik aktivite 0.109 U/mg) bulunmuşken (Çizelge 4.3-4.5), saflaştırılan DrCA’nın spesifik aktivitesi 0.539 U/mg olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3-4.5). Bu sonuçlara göre rekombinant hücre ile saf enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında, spesifik enzim aktivitesinde yaklaşık 5 katı kadar bir artış gözlenmiştir. Ve bu sonuçla klonlamanın başarılı olduğu sonucuna varılabilir. Ayrıca, *E. coli* BL21 (DE3) konağına aktarılan DrCA enziminin aktivitesiyle gen kaynağı *D. radiodurans* R1’in aktivitesi arasında da anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

Bazı metallerin ve sülfonamidin DrCA enzimi üzerinde inhibitör etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada; Ca^{+2} , Mg^{+2} ve Mn^{+2} gibi divalent katyonların karbonik anhidrazın kofaktörü olan Zn^{+2} ile yarışmalı olarak inhibisyon etkisi incelenmiştir. İnhibisyon etkisi incelenen bu maddelerin farklı konsantrasyonlarda hazırlanan stok çözeltileri çizelge 3.12’de belirtildiği şekildedir. Maddelerin DrCA enzimi üzerindeki etkinliğini belirlemek için hidrataz enzim aktivitesine bakılıp, % aktivite grafiği oluşturulmuştur. Denenen metal iyonlarından Zn^{+2} iyonu CA enziminin kofaktörü olması nedeniyle, ortama eklenen Zn^{+2} bir süre aktiviteyi artırmış, ardından kofaktörün 0.3 mM’dan sonra ortamda doygun duruma gelmesiyle birlikte aktivite stabil hale gelmiştir (Şekil 4.22). 0.45-0.5 mM Zn^{+2} iyonu enzimde %125 oranında aktivite artışına

neden olmuştur. Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ca^{+2} iyonlarının aktivite üzerinde herhangi bir etkisi gözlenmemiştir (Şekil 4.23 - 4.25). DrCA aktivitesinin %50'sini inhibe etmek için gerekli Sülfonamid konsantrasyonu (IC_{50} değeri), 0.25mM olarak bulunmuş ve sülfonamid beklenildiği üzere enzimde yüksek bir inhibitör etki göstermiştir (Şekil 4.21).

Tez kapsamında yürütülen radyasyon çalışmasında farklı dozlarda (100-1000 Gy) iyonize radyasyona maruz bırakılan hücrelerde DrCA enzim aktivitesine bakılmıştır. Aktivite ilk 800 Gy'a kadar sürekli artış göstermiş bu noktadan sonra 1000 Gy'lık radyasyonun uygulanmasının ardından enzim aktivitesinde hızlı bir düşüş görülmüştür (Şekil 4.5) Hiç radyasyon uygulanmamış kontrol *D. radiodurans* R1 grubundaki enzim aktivitesi 0.024 U/ml, 800-1000 Gy radyasyon uygulanan örneklerde ise sırasıyla 0.129 ve 0.087 U/ml hidrataz aktivitesi ölçülmüştür. Bu da kontrol grubu ile 800 Gy radyasyon uygulanmış örnekteki enzim aktivitesi farkının 5.4 kat kadar arttığını göstermektedir. Kuzucu'nun 2016 yılında yaptığı çalışmada, farklı dozlarda (100-1000 Gy) iyonize radyasyon uygulanmış *D. radiodurans* R1 hücresinde, DrCA geninin ekspresyonu seviyesi çalışılmıştır. Ekspresyon sonuçları artan radyasyon dozuna bağlı olarak 800 Gy'a kadar sürekli artmış (sırasıyla $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri; 6.18, 6.36, 8.11, 8.28, 8.63, 8.85, 9.38, 10.34, 7.89) bu noktadan sonra bir düşüş görülmüştür (Kuzucu 2016). Yürütülen bu tez çalışması kapsamında, ölçülen DrCA enzim aktivitesi ile söz edilen ekspresyon seviyesinin ölçüldüğü transkriptom çalışması arasında bir korelasyon görülmüştür. 1000 Gy'lık bir radyasyon dozunun verilmesinin ardından hem ekspresyon seviyesinde hem de DrCA enzim aktivitesinde meydana gelen bu düşüşün nedeni olarak, *D. radiodurans* bakterisinin, radyasyonun öldürücü etkisine karşı koymak için daha hayati olan, DNA onarım genlerinin ekspresyonunu artırdığı ve hücre enerjisini o noktaya kanalize ettiği düşünülmektedir. Bu sonuçlar karbonik anhidraz enziminin radyasyon direnci ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, CO_2 hidrasyonu ile bikarbonat oluşumu gibi canlılar için hayati öneme sahip çok önemli bir fonksiyonu yerine getiren CA enzimi, bakteri yaşamı için de kritik öneme sahiptir. *D. radiodurans*'ın radyasyon direnci ile DrCA enzimi arasında bir ilişki olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılan bu çalışmada, yürütülen klonlama

saflaştırma ve kısmi enzim karakterizasyonu çalışmaları, ileri de yapılacak olan kinetik çalışmalarına öncülük etmesi bakımından önemlidir. Ayrıca, farklı prokaryolarda özellikle ekstremofilik özellik gösteren mikroorganizmalarda CA enziminin çalışılması direnç fizyolojisinin aydınlatılmasına yardımcı olacaktır. Kinetik çalışmalarda, CA aktivitesinin tayini için esteraz aktivitesi ölçümü yapılmaktadır. Ancak bu yöntem, karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. DrCA enziminin β grubuna dâhil olması ve esteraz aktivitesinin çok düşük olması nedeniyle enzimin ileri karakterizasyon için hidrataz aktivitesine uygun olarak kinetik çalışmaların yapıldığı Stopped-Flow spektrofotometresine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışma kapsamında, saf halde elde edilen DrCA enziminin, bundan sonraki araştırmalarda Stopped-Flow spektrofotometresi ile daha ileri karakterizasyonunun yapılması hedeflenmektedir. Ayrıca elde ettiğimiz sonuçlara göre pH homeostasisinde önemli yeri olduğunu düşündüğümüz DrCA enziminin, *H. pylori*'de olduğu gibi üreaz enzimi ile ilişkisini belirlenmesi, direnç fizyolojisinin aydınlatılmasına yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abuaita, B.H. and Withey, J.H. 2009. Bicarbonate induces *Vibrio cholerae* virulence gene expression by enhancing ToxT activity. *Infection and Immunity*. 77, 4111–4120.
- Adak, S., Bilwes, A.M., Panda, K., Hosfield, D., Aulak, K.S., McDonald, J.F., Tainer, J.A., Getzoff, E.D., Crane, B.R. and Stuehr, D.J. 2002. Cloning, expression, and characterization of a nitric oxide synthase protein from *Deinococcus radiodurans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(1), 107-112.
- Adewoye, A.B., Lindsay, S.J., Dubrova, Y.E. and Hurles, M.E. 2015. The genome-wide effects of ionizing radiation on mutation induction in the mammalian germline. *Nature communications*, 6(12), 123-142.
- Adler, L., Brundell, J., Falkbring, S.O. and Nyman, P.O. (1972). Carbonic anhydrase from *Neisseria sicca*, strain 6021. I. Bacterial growth and purification of the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta* 284, 298–310.
- Agapov, A. and Kulbachinskiy, A. 2015. Mechanisms of stress resistance and gene regulation in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Biochemistry (Moscow)*, 80(10), 1201-1216.
- Aguilar, A. 1996. Extremophile research in the European Union: from fundamental aspects to industrial expectations. *FEMS microbiology reviews*, 18(2- 3), 89-92.
- Alber, B.E. and Ferry, J.G. 1994. A carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(15), 6909-6913.
- Albers, S.V., Vossenbergh, J. L., Driessen, A.J. and Konings, W. N. 2001. Bioenergetics and solute uptake under extreme conditions. *Extremophiles*, 5(5), 285-294.
- Amieva, M. and El-Omar, E. 2008. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*, 134(1), 306-323.
- Anderson, A., Nordan, H., Cain, R., Parrish, G. and Duggan, D. 1956. Studies on a radio-resistant *Micrococcus*. 1. Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. *Food technology*, 10(12), 575-578.
- Anonymous 2013. Web Sitesi <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/>, Erişim Tarihi 2.12.2016
- Anonymous 2016. Web Sitesi <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>, Erişim Tarihi 4.12.2016
- Anonymous 2015. Web Sitesi www.bacterio.net, Erişim Tarihi 28.11.2016

- Anonymous 2013. Web Sitesi <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Erişim Tarihi 28.11.2016
- Anonymous 2016. Web Sitesi, <http://www.straininfo.net/> Erişim Tarihi 10.11.2016
- Anonymous 2006. Web Sitesi, <https://swissmodel.expasy.org/> Erişim Tarihi 10.11.2016
- Athar, M., Abdulla, M., Sultana, S., Favier, A. and Pero, R. 1993. Free radicals and trace elements. *The Journal of trace elements in experimental medicine*, 6(2), 65-73.
- Battista, J.R. 1997. Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. *Annual Reviews in Microbiology*, 51(1), 203-224.
- Battistuzzi, F.U., Feijao, A. and Hedges, S.B. 2004. A genomic timescale of prokaryote evolution: insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land. *BMC Evolutionary Biology*, 4(1), 1-14
- Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Özmen, İ., Okuroğlu, M.E.B. and Özdemir, H. 2000. Effects of some medical drugs on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo. *Pharmacological research*, 42(2), 187-191.
- Blasius, M., Hübscher, U. and Sommer, S. 2008. *Deinococcus radiodurans*: what belongs to the survival kit? *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 43(3), 221-238.
- Booth, I. R. 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiological reviews*, 49(4), 359.
- Brooks, B. and Murray, R. 1981. Nomenclature for “*Micrococcus radiodurans*” and other radiation-resistant cocci: *Deinococcaceae* fam. nov. and *Deinococcus* gen. nov., including five species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 31(3), 353-360.
- Burghout, P., Cron, L.E., Gradstedt, H., Quintero, B., Simonetti, E., Bijlsma, J.J., Bootsma, H.J. and Hermans, P.W. (2010). Carbonic anhydrase is essential for *Streptococcus pneumoniae* growth in environmental ambient air. *Journal Bacteriology*. 192, 4054–4062.
- Burghout, P., Vullo, D., Scozzafava, A., Hermans, P.W.M. and Supuran, C.T. 2011. Inhibition of the β -carbonic anhydrase from *Streptococcus pneumoniae* by inorganic anions and small molecules: towards innovative drug design of anti-infectives? *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 19, 243–248.
- Bury-Moné, S., Mendz, G.L., Ball, G.E., Thibonnier, M., Stingl, K., Ecobichon, C., Avé, P., Huerre, M., Labigne, A. and Thiberge, J.-M. 2008. Roles of α and β carbonic anhydrases of *Helicobacter pylori* in the urease-dependent response to acidity and in colonization of the murine gastric mucosa. *Infection and immunity*, 76(2), 497-509.

- Carrington, J.C., Haldeman, R., Dolja, V.V. and Restrepo-Hartwig, M. 1993. Internal cleavage and trans-proteolytic activities of the VPg-proteinase (NIa) of tobacco etch potyvirus in vivo. *Journal of Virology*, 67(12), 6995-7000.
- Carroll, J. D., Daly, M.J. and Minton, K. W. 1996. Expression of recA in *Deinococcus radiodurans*. *Journal of bacteriology*, 178(1), 130-135.
- Carta, F., Maresca, A., Covarrubias, A.S., Mowbray, S.L., Jones, T.A. and Supuran, C. T. 2009. Carbonic anhydrase inhibitors. Characterization and inhibition studies of the most active β -carbonic anhydrase from *Mycobacterium tuberculosis*, Rv3588c. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(23), 6649-6654.
- Chirică, L.C., Elleby, B., Jonsson, B.H. and Lindskog, S. 1997. The complete sequence, expression in *Escherichia coli*, purification and some properties of carbonic anhydrase from *Neisseria gonorrhoeae*. *European journal of biochemistry*, 244(3), 755-760.
- Chirica, L.C., Petersson, C., Hurtig, M., Jonsson, B.H., Borén, T. and Lindskog, S. (2002). Expression and localization of alpha-and beta- carbonic anhydrase in *Helicobacter pylori*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1601, 192–199.
- Cronk, J.D., Rowlett, R.S., Zhang, K.Y., Tu, C., Endrizzi, J.A., Lee, J., Gareiss, P.C. and Preiss, J.R. (2006). Identification of a novel noncatalytic bicarbonate binding site in eubacterial β -carbonic anhydrase. *Biochemistry* 45, 4351–4361.
- Cox, J.C, Nicholls, D.G. and Ingledew, W. 1979. Transmembrane electrical potential and transmembrane pH gradient in the acidophile *Thiobacillus ferro-oxidans*. *Biochemical Journal*, 178(1), 195-200.
- Cox, M.M., Keck, J.L. and Battista, J.R. 2010. Rising from the Ashes: DNA Repair in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS Genet*, 6(1), e1000815.
- Cox, M.M. and Battista, J.R. 2005. *Deinococcus radiodurans*—the consummate survivor. *Nature Reviews Microbiology*, 3(11), 882-892.
- Daly, M.J., Gaidamakova, E.K., Matrosova, V., Vasilenko, A., Zhai, M., Venkateswaran, A., Hess, M., Omelchenko, M., Kostandarithes, H.M. and Makarova, K. 2004. Accumulation of Mn (II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance. *Science*, 306(5698), 1025-1028.
- Daly, M.J., Gaidamakova, E. K., Matrosova, V.Y., Kiang, J. G., Fukumoto, R., Lee, D.-Y., Wehr, N. B., Viteri, G. A., Berlett, B. S. and Levine, R. L. 2010. Small-molecule antioxidant proteome-shields in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS One*, 5(9), e12570.
- Daly, M.J. and Minton, K.W. 1996. An alternative pathway of recombination of chromosomal fragments precedes recA-dependent recombination in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Journal of bacteriology*, 178(15), 4461-4471.

- Davis, R.A., Hofmann, A., Osman, A., Hall, R.A., Mühlshlegel, F.A., Vullo, D., Innocenti, A., Supuran, C.T. and Poulsen, S.A. (2011). Natural product based phenols as novel probes for Mycobacterial and fungal carbonic anhydrases. *Journal Medicinal Chemistry*, 54, 1682–1692.
- Deitmer, J.W., Theparambil, S.M., Ruminot, I. and Becker, H.M. 2015. The role of membrane acid/base transporters and carbonic anhydrases for cellular pH and metabolic processes. *Glycolysis at 75: Is it Time to Tweak the First Elucidated Metabolic Pathway in History?*, 68.
- Demirjian, D.C., Morís-Varas, F. and Cassidy, C.S. 2001. Enzymes from extremophiles. *Current opinion in chemical biology*, 5(2), 144-151.
- Donato, M.M. and Seleiro, E.A. 1990. Polar lipid and fatty acid composition of strains of the genus *Thermus*. *Systematic and Applied Microbiology*, 13(3), 234-239.
- Dose, K., Bieger-Dose, A., Ernst, B., Feister, U., Gómez-Silva, B., Klein, A., Risi, S. and Stridde, C. 2001. Survival of microorganisms under the extreme conditions of the Atacama Desert. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 31(3), 287-303.
- Dougherty, W.G. and Parks, T.D. 1991. Post-translational processing of the tobacco etch virus 49-kDa small nuclear inclusion polyprotein: identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains. *Virology*, 183(2), 449-456.
- Driedger, A. 1970. The DNA content of single cells of *Micrococcus radiodurans*. *Canadian Journal of Microbiology*, 16(11), 1136-1137.
- Elleby, B., Chirica, L.C., Tu, C., Zeppezauer, M. and Lindskog, S. 2001. Characterization of carbonic anhydrase from *Neisseria gonorrhoeae*. *Eur.J.Biochem.* 268, 1613–1619.
- Emond, S., Mondeil, S., Jaziri, K., André, I., Monsan, P., Remaud-Siméon, M. and Potocki-Véronèse, G. 2008. Cloning, purification and characterization of a thermostable amylosucrase from *Deinococcus geothermalis*. *FEMS microbiology letters*, 285(1), 25-32.
- Englander, J., Klein, E., Brumfeld, V., Sharma, A.K., Doherty, A.J. and Minsky, A. 2004. DNA toroids: framework for DNA repair in *Deinococcus radiodurans* and in germinating bacterial spores. *Journal of bacteriology*, 186(18), 5973-5977.
- Eriksson, M., Karlsson, J., Ramazanov, Z., Gardeström, P. and Samuelsson, G. 1996. Discovery of an algal mitochondrial carbonic anhydrase: molecular cloning and characterization of a low-CO₂-induced polypeptide in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(21), 12031-12034.

- Farci, D., Bowler, M.W., Kirkpatrick, J., McSweeney, S., Tramontano, E. and Piano, D. 2014. New features of the cell wall of the radio-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1838(7), 1978-1984.
- Ferradini, C. and Jay-Gerin, J.P. 2000. The effect of pH on water radiolysis: a still open question-a minireview. *Research on Chemical Intermediates*, 26(6), 549-565.
- Gabani, P. and Singh, O.V. 2013. Radiation-resistant extremophiles and their potential in biotechnology and therapeutics. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(3), 993-1004.
- Gerard, E., Jolivet, E., Prieur, D. and Forterre, P. 2001. DNA protection mechanisms are not involved in the radioresistance of the hyperthermophilic archaea *Pyrococcus abyssi* and *P. furiosus*. *Molecular Genetics and Genomics*, 266(1), 72-78.
- Ghosal, D., Omelchenko, M.V., Gaidamakova, E.K., Matrosova, V.Y., Vasilenko, A., Venkateswaran, A., Zhai, M., Kostandarithes, H. M., Brim, H. and Makarova, K. S. 2005. How radiation kills cells: survival of *Deinococcus radiodurans* and *Shewanella oneidensis* under oxidative stress. *FEMS microbiology reviews*, 29(2), 361-375.
- Girard, A. 1971. A comparative study of the fatty acids of some micrococci. *Canadian Journal of Microbiology*, 17(12), 1503-1508.
- Götz, R., Gnann, A. and ve Zimmermann, F.K. 1999. Deletion of the carbonic anhydrase- like gene NCE103 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* causes an oxygen- sensitive growth defect. *Yeast*, 15(10A), 855-864.
- Graham, D., Reed, M.L., Patterson, B.D., Hockley, D.G. and Dwyer, M.R. 1984. Chemical properties, distribution, and physiology of plant and algal carbonic anhydrases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 429(1), 222-237.
- Gürbüz, E.D. ve Yılmaz, Ö. 2011. *Helicobacter pylori*'nin Yaşam Stratejisi. *Helicobacter*, 41(2), 049-056.
- Güzel, Ö., Maresca, A., Scozzafava, A., Salman, A., Balaban, A.T., ve Supuran, C.T. (2009). Discovery of low nanomolar and subnanomolar inhibitors of the mycobacterial β -carbonic anhydrases Rv1284 ve Rv3273. *Journal Medicinal Chemistry*. 52, 4063–4067.
- Haber, JE. 2000. Partners and pathways: repairing a double-strand break. *Trends in Genetics*, 16(6), 259-264.
- Halvorson, H. 1966. [96] α -Glucosidase from yeast. *Methods in enzymology*, 8(559-562).

- Harris, D.R., Tanaka, M., Saveliev, S.V., Jolivet, E., Earl, A.M., Cox, M.M. and Battista, J.R. 2004. Preserving genome integrity: the DdrA protein of *Deinococcus radiodurans* R1. PLoS Biol, 2(10), e304.
- Hawiger, J. and Jeljaszewicz, J. 1967. Antibiotic sensitivity of *Micrococcus radiodurans*. Applied microbiology, 15(2), 304-306.
- He, Y. 2009. High cell density production of *Deinococcus radiodurans* under optimized conditions. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 36(4), 539-546.
- Henne, A., Brüggemann, H., Raasch, C., Wiezer, A., Hartsch, T., Liesegang, H., Johann, A., Lienard, T., Gohl, O. and Martinez-Arias, R. 2004. The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. Nature biotechnology, 22(5), 547-553.
- Henry, R.P., Gilmour, K.M., Wood, C.M. and Perry, S.F. 1997. Extracellular carbonic anhydrase activity and carbonic anhydrase inhibitors in the circulatory system of fish. Physiological and Biochemical Zoology, 70(6), 650-659.
- Hensel, R., Demharter, W., Kandler, O., Kroppenstedt, R.M. and Stackebrandt, E. 1986. Chemotaxonomic and molecular-genetic studies of the genus *Thermus*: evidence for a phylogenetic relationship of *Thermus aquaticus* and *Thermus ruber* to the genus *Deinococcus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 36(3), 444-453.
- Hewett-Emmett, D. and Tashian, R. E. 1996. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the α -, β -, and γ -carbonic anhydrase gene families. Molecular phylogenetics and evolution, 5(1), 50-77.
- Hoffmann, K.M., Samardzic, D., Heever, K.V. and Rowlett, R. S. (2011). Co(II)-substituted *Haemophilus influenzae* β -carbonic anhydrase: spectral evidence for allosteric regulation by pH and bicarbonate ion. Archives of Biochemistry Biophysics. 511, 80–87.
- Işık, S. 2008. Maya karbonik anhidrazinin ekspresyonu, saflaştırılması, elektroforetik ve kinetik özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı, 113, Balıkesir.
- Johansson, I. M. ve Forsman, C. 1993. Kinetic studies of pea carbonic anhydrase. European journal of biochemistry, 218(2), 439-446.
- Joseph, P., Turtaut, F., Ouahrani- Bettache, S., Montero, J.L., Nishi mori, I., Minakuchi, T., Vullo, D., Scozzafava, A., Köhler, S., Winum, J.Y. and Supuran, C.T. (2010). Cloning, characterization and inhibition studies of a β -carbonic anhydrase from *Brucella suis*. Journal Medicinal Chemistry 53, 2277–2285.
- Joseph, P., Ouahrani-Bettache, S., Montero, J.L., Nishimori, I., Vullo, D., Scozzafava, A., Winum, J.Y., Köhler, S. and Supuran, C.T. 2011. A new *Brucella suis* β -carbonic anhydrase, bsCAII: inhibition of bsCAI and II with sulfonamides and

sulfamates inhibits the pathogen growth. *Bioorganic Medicinal Chemistry* 19,1172–1178

- Karaağaç, S. ve Dönmez, S. 2004. Ekstrem Termofil Bakterilerin Protein Yapıları ve Termostabilizasyon Mekanizmaları. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 2(4), 19-33.
- Kaya, A. 2002. İyonize radyasyonun biyolojik etkileri. *Dicle tıp dergisi (journal of medical school)*, 100(29), 65-75
- Khan, S. and ve Macnab, R. M. 1980. Proton chemical potential, proton electrical potential and bacterial motility. *Journal of molecular biology*, 138(3), 599-614.
- Kim, J.I. and Cox, M. M. 2002. The RecA proteins of *Deinococcus radiodurans* and *Escherichia coli* promote DNA strand exchange via inverse pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(12), 7917-7921.
- Kimber, M. S. and Pai, E. F. 2000. The active site architecture of *Pisum sativum* β -carbonic anhydrase is a mirror image of that of α -carbonic anhydrases. *The EMBO journal*, 19(7), 1407-1418.
- Kitayama, S. and Matsuyama, A. 1981. Genome multiplicity and radiation resistance in *Micrococcus radiodurans*. *Journal of biochemistry*, 90(3), 877-880.
- Knivett, V., Cullen, J. and Jackson, M. 1965. Odd-numbered fatty acids in *Micrococcus radiodurans*. *Biochemical Journal*, 96(1), 2C-3C.
- Krasin, F. and Hutchinson, F. 1977. Repair of DNA double-strand breaks in *Escherichia coli*, which requires recA function and the presence of a duplicate genome. *Journal of molecular biology*, 116(1), 81-98.
- Kovacikova, G., Lin, W. and Skorupski, K 2010. The LysR-type virulence activator AphB regulates the expression of genes in *Vibrio cholerae* in response to low pH and anaerobiosis. *Journal of Bacteriology* 192, 4181–4191
- Kuzucu, M. 2016. *Deinococcus radiodurans*'ın Hücre içi pH dengelenmesinde görevli bazı genlerin ifade düzeylerinin RT-qPCR yöntemi ile incelenmesi. Doktora Tezi (Basılmamış), Erzincan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Erzincan.
- Kübler, O. and Baumeister, W. 1978. The structure of a periodic cell wall component (HPI-layer of *Micrococcus radiodurans*). *Cytobiologie*, 17(1), 1-9.
- Lancy Jr, P. and Murray, R. 1978. The envelope of *Micrococcus radiodurans*: isolation, purification, and preliminary analysis of the wall layers. *Canadian Journal of Microbiology*, 24(2), 162-176.
- Lara, P.C., López-Peñalver, J. J., de Araújo Farias, V., Ruiz-Ruiz, M. C., Oliver, F.J. and de Almodóvar, J. M. R. 2015. Direct and bystander radiation effects: A biophysical model and clinical perspectives. *Cancer letters*, 356(1), 5-16.

- Lecoite, F., Shevelev, I.V., Bailone, A., Sommer, S. and Hübscher, U. 2004. Involvement of an X family DNA polymerase in double-stranded break repair in the radioresistant organism *Deinococcus radiodurans*. *Molecular microbiology*, 53(6), 1721-1730.
- Levin-Zaidman, S., Englander, J., Shimoni, E., Sharma, A.K., Minton, K.W. and Minsky, A. 2003. Ringlike structure of the *Deinococcus radiodurans* genome: a key to radioresistance? *Science*, 299(5604), 254-256.
- Li, X. and Lu, A.L. 2001. Molecular cloning and functional analysis of the MutY homolog of *Deinococcus radiodurans*. *Journal of bacteriology*, 183(21), 6151-6158.
- Lindskog, S. 1997. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacology & therapeutics*, 74(1), 1-20.
- Liu, Y., Zhou, J., Omelchenko, M.V., Beliaev, A.S., Venkateswaran, A., Stair, J., Wu, L., Thompson, D. K., Xu, D. and Rogozin, I. B. 2003. Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 4191-4196.
- Lopez, M., Vu, H., Wang, C.K., Wolf, M.G., Groenhof, G., Innocenti, A., Supuran, C. T. and Poulsen, S.A. 2011. Promiscuity of carbonic anhydrase II. Unexpected ester hydrolysis of carbohydrate-based sulfamate inhibitors. *Journal of the American Chemical Society*, 133(45), 18452-18462.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.
- Machlin, L.J. and Bendich, A. 1987. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB Journal*, 1(6), 441-445.
- Madigan, M. and Martinko, J. 2010. *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi*. Çökmüş C, Palme Yayınevi, 28-29, Ankara.
- Makarova, K.S., Aravind, L., Wolf, Y.I., Tatusov, R.L., Minton, K.W., Koonin, E.V. and Daly, M.J. 2001. Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(1), 44-79.
- Makarova, K.S., Omelchenko, M.V., Gaidamakova, E.K., Matrosova, V.Y., Vasilenko, A., Zhai, M., Lapidus, A., Copeland, A., Kim, E. and Land, M. 2007. *Deinococcus geothermalis*: the pool of extreme radiation resistance genes shrinks. *PLoS One*, 2(9), e955.
- Marcus, E.A., Moshfegh, A.P., Sachs, G. and Scott, D.R. (2005). The periplasmic alpha-carbonic anhydrase activity of *Helicobacter pylori* is essential for acid acclimation. *Journal of Bacteriology* 187, 729-738.

- Maren, T.H. 1967. Carbonic anhydrase: chemistry, physiology, and inhibition. *Physiological Reviews*, 47(4), 595-781.
- Mattimore, V. and Battista, J.R. 1996. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *Journal of bacteriology*, 178(3), 633-637.
- McColl, N., Auvinen, A., Kesminiene, A., Espina, C., Erdmann, F., de Vries, E., Greinert, R., Harrison, J. and Schüz, J. 2015. European Code against Cancer 4th Edition: Ionising and non-ionising radiation and cancer. *Cancer epidemiology*, 39(93-100).
- Meldrum, N.U. and Roughton, F.J.W. 1933. Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. *The Journal of physiology*, 80(2), 113.
- Minakuchi, T., Nishimori, I., Vullo, D., Scozzafava, A., and Supuran, C.T. 2009. Molecular cloning, characterization and inhibition studies of the Rv1284 β -carbonic anhydrase from *Mycobacterium tuberculosis* with sulfonamides and a sulfamate. *Journal Medicinal Chemistry*.52, 2226–2232.
- Minton, K.W. 1994. DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Molecular microbiology*, 13(1), 9-15.
- Minton, K.W. 1996. Repair of ionizing-radiation damage in the radiation resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mutation Research/DNA Repair*, 363(1), 1-7.
- Misra, H., Rajpurohit, Y. and Kota, S. 2013. Physiological and molecular basis of extreme radioresistance in *Deinococcus radiodurans*. *Current Science (Bangalore)*, 104(2), 194-205.
- Mitsuhashi, S., Mizushima, T., Yamashita, E., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Moriyama, H., Ueki, T., Miyachi, S. and Tsukihara, T. 2000. X-ray structure of β -carbonic anhydrase from the red alga, *Porphyridium purpureum*, reveals a novel catalytic site for CO₂ hydration. *Journal of biological chemistry*, 275(8), 5521-5526.
- Mortimer, R.K. 1958. Radiobiological and genetic studies on a polyploid series (haploid to hexaploid) of *Saccharomyces cerevisiae*. *Radiation research*, 9(3), 312-326.
- Moseley, M.A. 1971. Repair of irradiated transforming deoxyribonucleic acid in wild type and a radiation-sensitive mutant of *Micrococcus radiodurans*. *Journal of bacteriology*, 105(3), 976-983.
- Moseley, B. and Setlow, J. K. 1968. Transformation in *Micrococcus radiodurans* and the ultraviolet sensitivity of its transforming DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 61(1), 176-183.
- Murray, R.G. 1992. The family *Deinococcaceae*. Springer, 3732-3744,

- Narumi, I., Satoh, K., Cui, S., Funayama, T., Kitayama, S. and Watanabe, H. 2004. PprA: a novel protein from *Deinococcus radiodurans* that stimulates DNA ligation. *Molecular microbiology*, 54(1), 278-285.
- Neish, A.C. 1939. Studies on chloroplasts: Their chemical composition and the distribution of certain metabolites between the chloroplasts and the remainder of the leaf. *Biochemical Journal*, 33(3), 300.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M. and ve Antranikian, G. 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied microbiology and biotechnology*, 51(6), 711-729.
- Nishimori, I., Minakuchi, T., Morimoto, K., Sano, S., Onishi, S., Takeuchi, H., Vullo, D., Scozzafava, A. and Supuran, C.T. (2006). Carbonic anhydrase inhibitors: DNA cloning and inhibition studies of the alpha-carbonic anhydrase from *Helicobacter pylori*, a new target for developing sulfonamide and sulfamate gastric drugs. *Journal Medicinal Chemistry*.49,2117–2126.
- Nishimori, I., Minakuchi, T., Kohsaki, T., Onishi, S., Takeuchi, H., Vullo, D., Scozzafava, A. and Supuran, C.T. (2007). Carbonic anhydrase inhibitors. The β -carbonic anhydrase from *Helicobacter pylori* is a new target for sulfonamide and sulfamate inhibitors. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters* 17,3585–3594
- Nishimori, I., Minakuchi, T., Vullo, D., Scozzafava, A., Innocenti, A. and Supuran, C.T. (2009). Carbonic anhydrase inhibitors cloning, characterization, and inhibition studies of a new β -carbonic anhydrase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal Medicinal Chemistry*. 52, 3116–3120.
- Nishimori, I., Minakuchi, T., Maresca, A., Carta, F., Scozzafava, A. and Supuran, C.T. (2010). The β - carbonic anhydrases from *Mycobacterium tuberculosis* as drug targets. *Current Pharmaceutical Desing* 16, 3300–3309.
- Omelchenko, M.V., Wolf, Y.I., Gaidamakova, E.K., Matrosova, V.Y., Vasilenko, A., Zhai, M., Daly, M. J., Koonin, E.V. and Makarova, K. S. 2005. Comparative genomics of *Thermus thermophilus* and *Deinococcus radiodurans*: divergent routes of adaptation to thermophily and radiation resistance. *BMC Evolutionary Biology*, 5(1), 1.
- Padan, Etana, Bibi, E., Ito, M. and ve Krulwich, T.A. 2005. Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1717(2), 67-88.
- Pask-Hughes, R. and ve Williams, R. 1978. Cell envelope components of strains belonging to the genus *Thermus*. *Microbiology*, 107(1), 65-72.
- Raj, H.D., Duryee, F.L., Deeney, A.M., Wang, C. H., Anderson, A.W. and Elliker, P.R. 1960. Utilization of carbohydrates and amino acids by *Micrococcus radiodurans*. *Canadian Journal of Microbiology*, 6(3), 289-298.

- Ravanat, J.L., Douki, T. and Cadet, J. 2001. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63(1), 88-102.
- Richard, Hope and Foster, J.W. 2004. *Escherichia coli* glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. *Journal of bacteriology*, 186(18), 6032-6041.
- Roadcap, G.S., Sanford, R.A., Jin, Q., Pardinas, J. R. and Bethke, C.M. 2006. Extremely alkaline (pH>12) ground water hosts diverse microbial community. *Ground Water*, 44(4), 511-517.
- Roberts, S.B., Lane, T.W. and Morel, F.M. 1997. Carbonic anhydrase in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 33(5), 845-850.
- Rothschild, L.J. and Mancinelli, R.L. 2001. Life in extreme environments. *Nature*, 409 (6823), 1092-1101.
- Rowlett, R.S. 2010. Structure and catalytic mechanism of the β -carbonic anhydrases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1804(2), 362-373.
- Rozen, S. and Skaletsky, H. 1999. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics methods and protocols*, 365-386.
- Sachs, George, Weeks, D.L., Wen, Y., Marcus, E.A., Scott, D.R. and Melchers, K. 2005. Acid acclimation by *Helicobacter pylori*. *Physiology*, 20(6), 429-438.
- Salmond, C.V., Kroll, R.G. ve Booth, I.R. 1984. The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 130 (11), 2845-2850.
- Sanders, E. 1967. Use of sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors in treatment of meningococcal carriers: rationale and report of a clinical trial of ethoxzolamide. *The American Journal of the Medical Sciences* 254,709–716.
- Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A. ve Supuran, C.T. 2006. Carbonic anhydrase inhibitors and activators and their use in therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 16(12), 1627-1664.
- Shahidzadeh, R., Opekun, A., Shiotani, A. and Graham, D.Y. 2005. Effect of the carbonic anhydrase inhibitor, acetazolamide, on *Helicobacter pylori* infection in vivo: a pilot study. *Helicobacter Pylori* 10, 136–138.
- Shioi, J., Matsuura, S. and ve Imae, Y. 1980. Quantitative measurements of proton motive force and motility in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 144(3), 891-897.

- Sjöblom, B., Polentarutti, M. and Djinović-Carugo, K. 2009. Structural study of X-ray induced activation of carbonic anhydrase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(26), 10609-10613.
- Slade, D. and ve Radman, M. 2011. Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1), 133-191.
- Slonczewski, J. L., Fujisawa, M., Dopson, M. and Krulwich, T.A. 2009. Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea. *Advances in microbial physiology*, 55(1-317).
- Sly, W.S. and Hu, P. Y. 1995. Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annual review of biochemistry*, 64(1), 375-401.
- Smith, S.K. and Ferry, J. G. 2000. Prokaryotic carbonic anhydrases. *FEMS microbiology reviews*, 24(4), 335-366.
- Smith, S.K., Jakubzick, C., Whittam, T.S. and Ferry, J.G. 1999a. Carbonic anhydrase is an ancient enzyme widespread in prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(26), 15184-15189.
- Smith, S.K., Cosper, N.J., Stalhandske, C., Scott, R.A. and Ferry, J.G. 2000. Structural and kinetic characterization of an archaeal β -class carbonic anhydrase. *Journal of bacteriology*, 182(23), 6605-6613.
- Smith, S.K. and Ferry, J.G. 1999b. A plant-type (β -class) carbonic anhydrase in the thermophilic methanoarchaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Journal of bacteriology*, 181(20), 6247-6253.
- Smith, M.D., Lennon, E., McNEIL, L.B. and Minton, K. W. 1988. Duplication insertion of drug resistance determinants in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Journal of bacteriology*, 170(5), 2126-2135.
- Soltes-Rak, E., Mulligan, M.E. and Coleman, J.R. 1997. Identification and characterization of a gene encoding a vertebrate-type carbonic anhydrase in cyanobacteria. *Journal of bacteriology*, 179(3), 769-774.
- Stadie, W. C. and O'Brien, H. 1933. The catalysis of the hydration of carbon dioxide and dehydration of carbonic acid by an enzyme isolated from red blood cells. *Journal of biological chemistry*, 103(2), 521-529.
- Stams, T., Chen, Y., Christianson, D. W., Boriack-Sjodin, P., Hurt, J.D., Laipis, P., Silverman, D.N., Liao, J., May, J. A. and Dean, T. 1998. Structures of murine carbonic anhydrase IV and human carbonic anhydrase II complexed with brinzolamide: Molecular basis of isozyme-drug discrimination. *Protein science*, 7(3), 556-563.
- Strop, P., Smith, K.S., Iverson, T.M., Ferry, J.G. and Rees, D.C. 2001. Crystal structure of the "cab"-type β class carbonic anhydrase from the archaeon

- Methanobacterium thermoautotrophicum*. Journal of biological chemistry, 276(13), 10299-10305.
- Suarez Covarrubias, A., Larsson, A.M., Hogbom, M., Lindberg, J., Bergfors, T., Bjorkelid, C., Mowbray, S.L., Unge, T. and Jones, T.A. (2005). Structure and function of carbonic anhydrases from *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Biological Chemistry 280, 18782–18789.
- Suarez Covarrubias, A., Bergfors, T., Jones, T.A. and ve Hogbom, M. (2006). Structural mechanics of the pH dependent activity of the β -carbonic anhydrase from *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Biological Chemistry 281, 4993-4999.
- Supuran, T.C. and Scozzaava, A. 2007. Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. Bioorganic & medicinal chemistry, 15(13), 4336-4350.
- Supuran, T.C. and Scozzafava, A. 2001. Carbonic anhydrase inhibitors. Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine & Metabolic Agents, 1(1), 61-97.
- Supuran, T.C. 2008. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. Nature reviews Drug discovery, 7(2), 168-181.
- Supuran, T.C., Scozzafava, A. and Casini, A. 2003. Carbonic anhydrase inhibitors. Medicinal research reviews, 23(2), 146-189.
- Swiatla-Wojcik, D. 2008. Computation of the effect of pH on spur chemistry in water radiolysis at elevated temperatures. Nukleonika, 53(1), 31-37.
- Swietach, P., Vaughan-Jones, R.D. and Harris, A.L. 2007. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. Cancer and Metastasis Reviews, 26(2), 299-310.
- Tanaka, M., Earl, A.M., Howell, H.A., Park, M.J., Eisen, J.A., Peterson, S.N. and ve Battista, J. R. 2004. Analysis of *Deinococcus radiodurans*'s transcriptional response to ionizing radiation and desiccation reveals novel proteins that contribute to extreme radioresistance. Genetics, 168(1), 21-33.
- Thompson, B., Murray, R. and Boyce, J. 1982. The association of the surface array and the outer membrane of *Deinococcus radiodurans*. Canadian Journal of Microbiology, 28(9), 1081-1088.
- Thornley, M.J., Horne, R. and Glauert, A.M. 1965. The fine structure of *Micrococcus radiodurans*. Archiv für Mikrobiologie, 51(3), 267-289.
- Thorslund, A. and Lindskog, S. 1967. Studies of the esterase activity and the anion inhibition of bovine zinc and cobalt carbonic anhydrases. European journal of biochemistry, 3(1), 117-123.

- Tian, B., Sun, Z., Shen, S., Wang, H., Jiao, J., Wang, L., Hu, Y. and Hua, Y. 2009. Effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* on protein oxidation. *Letters in applied microbiology*, 49(6), 689-694.
- Tian, B., Xu, Z., Sun, Z., Lin, J. and Hua, Y. 2007. Evaluation of the antioxidant effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* through targeted mutagenesis, chemiluminescence, and DNA damage analyses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1770(6), 902-911.
- Tirgari, S. and Moseley, B. 1980. Transformation in *Micrococcus radiodurans*: measurement of various parameters and evidence for multiple, independently segregating genomes per cell. *Microbiology*, 119(2), 287-296.
- Tripp, B. C., Smith, K. and Ferry, J. G. 2001. Carbonic anhydrase: new insights for an ancient enzyme. *Journal of biological chemistry*, 276(52), 48615-48618.
- Veitch, F. and Blankenship, L. 1963. Carbonic anhydrase in bacteria. *Nature*, 197, 76-77.
- Verpoorte, J.A., Mehta, S. and ve Edsall, J.T. 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrases β and γ *Journal of biological chemistry*, 242(18), 4221-4229.
- Vorgias, C.E. and Antranikian, G. 2002. *Glycosyl hydrolases from extremophiles*. Springer, 313-340,
- Wan, P., Yue, Z., Xie, Z., Gao, Q., Yu, M., Yang, Z. and Huang, J. 2013. Mechanisms of radiation resistance in *Deinococcus radiodurans* R1 revealed by the reconstruction of gene regulatory network using bayesian network approach. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, 6(7).
- Weisburg, W. G., Giovannoni, S. J. and Woese, C. R. 1989. The *Deinococcus-Thermus* phylum and the effect of rRNA composition on phylogenetic tree construction. *Systematic and Applied Microbiology*, 11(2), 128-134.
- Weiss, J., Kumar, K., Walden, T., Neta, R., Landauer, M. and Clark, E. 1990. Advances in radioprotection through the use of combined agent regimens. *International journal of radiation biology*, 57(4), 709-722.
- White, O., Jonathan A. Eisen, J.F. Heidelberg, E.K. Hickey, J.D. Peterson, R.J. Dodson, D.H. Haft, M.L. Gwinn, W.C. Nelson, D.L. Richardson, K.S. Moffat, H., Qin, L.J, Wanda, P., Marie, C., Mian, S., Jessica, J., Vamathevan, P.L., Lisa, Mc.D., Terry, U., Celeste, Z., Kira, S., Makarova, L., Aravind, M.J., Daly, K.W. Minton, R.D., Fleischmann, KA., Ketchum, K.E., Nelson, S.S, Hamilton, O.. Smith, J., Craig, V. and Claire, M.F. 1999. Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science*, 286(5444), 1571-1577.

- White, S., Tuttle, F., Blankenhorn, D., Dosch, D. and Slonczewski, J. 1992. pH dependence and gene structure of *inaA* in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 174(5), 1537-1543.
- Wilks, J.C. and Slonczewski, J.L. 2007. pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*: rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry. *Journal of Bacteriology*, 189(15), 5601-5607.
- Winum, J.Y., Kohler, S. and Supuran, C.T. (2010). *Brucella* carbonic anhydrases: new targets for designing anti-infective agents. *Current Pharmaceutical Design* 16, 3310–3316.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological reviews*, 51(2), 221
- Wolf, Y.I., Rogozin, I.B., Grishin, N.V., Tatusov, R.L. and Koonin, E.V. 2001. Genome trees constructed using five different approaches suggest new major bacterial clades. *BMC Evolutionary Biology*, 1(8).
- Work, E. 1964. Chemical structure of bacterial cell walls: amino-acids of walls of *Micrococcus radiodurans*. *Nature*, 201, 1107-1109.
- Work, E. ve Griffiths, H. 1968. Morphology and chemistry of cell walls of *Micrococcus radiodurans*. *Journal of bacteriology*, 95(2), 641-657.
- Vullo, D., Nishimori, I., Scozzafava, A., Köhler, S., Winum, J.Y. and Supuran, C.T. (2010). Inhibition studies of a β -carbonic anhydrase from *Brucella suis* with a series of water soluble glycosyl sulfanilamides. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters* 20, 2178–2182.
- Vullo, D., Nishimori, I., Minakuchi, T., Scozzafava, A. and Supuran, C.T. (2011). Inhibition studies with anions and small molecules of two novel β -carbonic anhydrases from the bacterial pathogen *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters* 21, 3591–3595.
- Yuan, M., Zhang, W., Dai, S., Wu, J., Wang, Y., Tao, T., Chen, M. and ve Lin, M. 2009a. *Deinococcus gobiensis* sp. nov., an extremely radiation-resistant bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(6), 1513-1517.
- Yuan, Y.V., Westcott, N.D., Hu, C. and Kitts, D.D. 2009b. Mycosporine-like amino acid composition of the edible red alga, *Palmaria palmata* (dulse) harvested from the west and east coasts of Grand Manan Island, New Brunswick. *Food Chemistry*, 112(2), 321-328.
- Zhang, Y.T., Zhang, L., Chen, H.L. and Zhang, H.M. 2010. Selective separation of low concentration CO₂ using hydrogel immobilized CA enzyme based hollow fiber membrane reactors. *Chemical Engineering Science*, 65(10), 3199-3207.
- Zimmerman, J.M. and Battista, J.R. 2005. A ring-like nucleoid is not necessary for radioresistance in the *Deinococcaceae*. *BMC microbiology*, 5(17).

EK 1 Klonlanan DrCA geninin, *Deinococcus radiodurans* R1 bakterisindeki NC_001263.1 aksiyon numaralı DrCA geni ile NCBI-Blast tarama motorundaki dizi benzerliği

DrCA F-İleri primer dizisi ile benzerliği

Benzerlik oranı 757/760 (%99)

```

Query 8          CACCGCGACCGAGCCGATTTCTAGTAGCCGCGGATGACCCGAATCTGGCCGGACGCTC
67
      |||
Sbjct 2232819   CACCGCGCCCGAGCCGATTTCTAGTAGCCGCGGATGACCCGAATCTGGCCGGACGCTC
2232760

Query 68         GGCTTCCTGAATCACCGCCTGACGGCGCAGCAGGGCGACTTGGCGGCGCACATTGTTGAT
127
      |||
Sbjct 2232759   GGCTTCCTGAATCACCGCCTGACGGCGCAGCAGGGCGACTTGGCGGCGCACATTGTTGAT
2232700

Query 128        GACGGCCTCCCGCATCCGGGCCTTCTTGGCGCGGATGGCGGGCAGATTTCCACGCTGGG
187
      |||
Sbjct 2232699   GACGGCCTCCCGCATCCGGGCCTTCTTGTGCGGATGGCGGGCAGATTTCCACGCTGGG
2232640

Query 188        GCGAATGCGGCCAATCAGGGACTGAAGGTGCGGCGGCTCCTCGGCGATTTTGTGCTCCGG
247
      |||
Sbjct 2232639   GCGAATGCGGCCAATCAGGGACTGAAGGTGCGGCGGCTCCTCGGCGATTTTGTGCTCCGG
2232580

Query 248        CATCAGCGCCGCGCCACCGCGCCGAGCCCTCGTGGCCCATCACCATCACGAGGTGCAC
307
      |||
Sbjct 2232579   CATCAGCGCCGCGCCACCGCGCCGAGCCCTCGTGGCCCATCACCATCACGAGGTGCAC
2232520

Query 308        GTCGAGGTGCCGGATGGCGTATTCGAGCGTGCCAGGCCGCTTTCGCCCACCACGTTGCC
367
      |||
Sbjct 2232519   GTCGAGGTGCCGGATGGCGTATTCGAGCGTGCCAGGCCGCTTTCGCCCACCACGTTGCC
2232460

Query 368        CGCCACCCGCACCACGAACAGTTGCCCCAGCCCTGGTTCGAACACCAGTTCTACCGGCAC
427
      |||
Sbjct 2232459   CGCCACCCGCACCACGAACAGTTGCCCCAGCCCTGGTTCGAACACCAGTTCTACCGGCAC
2232400

Query 428        CCGACTGTCGCTGCACGCGAGGATCGCCGCGTAGGGCGTTTGCCCGATGATCTGGGCGCG
487
      |||
Sbjct 2232399   CCGACTGTCGCTGCACGCGAGGATCGCCGCGTAGGGCGTTTGCCCGATGATCTGGGCGCG
2232340

Query 488        GCGCTCGTTCGCCCCGATGTCCGGGCGTCGCGCTGCCACCGAAAAAGCGGGCGTTGCC
547
      |||
Sbjct 2232339   GCGCTCGTTCGCCCCGATGTCCGGGCGTCGCGCTGCCACCGAAAAAGCGGGCGTTGCC
2232280

```

Query 548 TTCCATCAGCGTCTGAATGGCCGCTCGGGGGTTGCCACGTCCGAATCCTTGAGCTTGGC
607
|||||
Sbjct 2232279 TTCCATCAGCGTCTGAATGGCCGCTCGGGGGTTGCCACGTCCGAATCCTTGAGCTTGGC
2232220

Query 608 GATTTCTTCCATGCTCGCCCCCGGCGCACGGCCTGGAGCAGTCGGCGCTGGAGTTCCTC
667
|||||
Sbjct 2232219 GATTTCTTCCATGCTCGCCCCCGGCGCACGGCCTGGAGCAGTCGGCGCTGGAGTTCCTC
2232160

Query 668 GGGGGTCAGTTCGAGGAGTTGGGCTGTAACGTCTCTGAATTGTCTGGCGCGGTCATGCC
727
|||||
Sbjct 2232159 GGGGGTCAGTTCGAGGAGTTGGGCTGTAACGTCTCTGAATTGTCTGGCGCGGTCATGCC
2232100

Query 728 TGTATCGTAGCCCCACGCACGCGCTAGCCTGCGCCCCATG 767
|||||
Sbjct 2232099 TGTATCGTAGCCCCACGCACGCGCTAGCCTGCGCCCCATG
2232060

DrCA R-Geri primer dizisi ile benzerliği

Benzerlik Oranı 766/768 (%99)

Query 9 CGAT-CAGGCATGA-CGCG-CAGAC-ATTCAGAGACGTTACAGGCCAACTCCTCGAACT
64
|||||
Sbjct 492671 CGATACAGGCATGACCGCGCCAGACAATTCAGAGACGTTACAGGCCAACTCCTCGAACT
492612

Query 65 GACCCCCGAGGAACTCCAGCGCCGACTGCTCCAGGCCGTGCGCCGGGGGGCGAGCATGGA
124
|||||
Sbjct 492611 GACCCCCGAGGAACTCCAGCGCCGACTGCTCCAGGCCGTGCGCCGGGGGGCGAGCATGGA
492552

Query 125 AGAAATCGCCAAGCTCAAGGATTCGGACGTGGCAACCCCCGAGGCGGCCATTTCAGACGCT
184
|||||
Sbjct 492551 AGAAATCGCCAAGCTCAAGGATTCGGACGTGGCAACCCCCGAGGCGGCCATTTCAGACGCT
492492

Query 185 GATGGAAGGCAACGCCCGCTTTTTTCGGTGGGCAGGCGCGACGCCCGGACATCGGGGCGAA
244
|||||
Sbjct 492491 GATGGAAGGCAACGCCCGCTTTTTTCGGTGGGCAGGCGCGACGCCCGGACATCGGGGCGAA
492432

Query 245 CGAGCGCCGCGCCAGATCATCGGGCAAACGCCCTACGCGGCGATCCTCGCGTGCAGCGA
304
|||||
Sbjct 492431 CGAGCGCCGCGCCAGATCATCGGGCAAACGCCCTACGCGGCGATCCTCGCGTGCAGCGA
492372

Query 305 CAGTCGGGTGCCGGTAGAACTGGTGTTCGACCAGGGGCTGGGGCAACTGTTTCGTGGTGGC
364
|||||
Sbjct 492371 CAGTCGGGTGCCGGTAGAACTGGTGTTCGACCAGGGGCTGGGGCAACTGTTTCGTGGTGGC
492312

```

Query 365      GGTGGCGGGCAACGTGGTGGGCGAAAAGCGGCCTGGGCACGCTCGAATACGCCATCCGGCA
424
Sbjct 492311   GGTGGCGGGCAACGTGGTGGGCGAAAAGCGGCCTGGGCACGCTCGAATACGCCATCCGGCA
492252
Query 425      CCTCGACGTGCACCTCGTGATGGTGATGGGCCACGAGGGCTGCGGCGCGGTGGCGGCGGC
484
Sbjct 492251   CCTCGACGTGCACCTCGTGATGGTGATGGGCCACGAGGGCTGCGGCGCGGTGGCGGCGGC
492192
Query 485      GCTGATGCCGGACGACAAAATCGCCGAGGAGCCCGCCACCTTCAGTCCCTGATTGGCCG
544
Sbjct 492191   GCTGATGCCGGACGACAAAATCGCCGAGGAGCCCGCCACCTTCAGTCCCTGATTGGCCG
492132
Query 545      CATTCGCCCCAGCGTGGAATAATCTGCCCGCCATCCGCGACAAGAAGGCCCGGATGCGCGA
604
Sbjct 492131   CATTCGCCCCAGCGTGGAATAATCTGCCCGCCATCCGCGACAAGAAGGCCCGGATGCGCGA
492072
Query 605      GGCCGTCATCAACAATGTGCGCCGCCAAGTCGCCCTGCTGCGCCGTCAGGCGGTGATTCA
664
Sbjct 492071   GGCCGTCATCAACAATGTGCGCCGCCAAGTCGCCCTGCTGCGCCGTCAGGCGGTGATTCA
492012
Query 665      GGAAGCCGAGGCGTCCGGCCAGATTCGGGTCATCGGCGGCTACTACGAAATCGGCTCGGG
724
Sbjct 492011   GGAAGCCGAGGCGTCCGGCCAGATTCGGGTCATCGGCGGCTACTACGAAATCGGCTCGGG
491952
Query 725      CGCGGTGGACTTTCTGGTGGACGAGGACGACCTCGCACTC   764
Sbjct 491951   CGCGGTGGACTTTCTGGTGGACGAGGACGACCTCGCACTC   491912

```

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ayşe Hümeyra TAŞKIN KAFA

Doğum Yeri : Sivas

Doğum Tarihi : 07/08/1985

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Anadolu Lisesi (2003)

Lisans : Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
(2008)

Yüksek Lisans: Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ABD
(2012)

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl

Karamanoğlu Mehmet Bey Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (Araştırma Görevlisi) (2009-2010)

Erzincan Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (Araştırma Görevlisi)
(2010-2012)

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (Araştırma Görevlisi) (2012-2014)

Erzincan Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (Araştırma Görevlisi)
(2014-halen)

SCI Yayınları

Arslan Nayki Ü., Onk D., Balci M.G., Onk O.A., Çankaya M., Taşkin **Kafa A.H.**, Kuzucu M. "The effect of melatonin on oxidative stress and apoptosis in experimental diabetes mellitus-related ovarian injury", *Gynecological Endocrinology*, pp.1-6, 2016

Özçiçek F., Çankaya M., Cimen F.K., Taşkin **Kafa A.H.**, Nalkiran H.S., Süleyman B., Altuner D., Çetin N. "Effects of nimesulide on oxidative mucosal injury induced by cisplatin in rat duodenum and jejunum", *Latin American Journal of Pharmacy*, vol.35, pp.1110-1115, 2016

Kuyrukliyildiz U., Binici O., Çetin N., Balci M.G., Onk D., Çankaya M., Taşkın **Kafa A.H.**, Altuner D., Yılmaz A. "Liv-52; prophylactic or therapeutic agent against desflurane-induced hepatotoxicity in rats", *Latin American Journal of Pharmacy*, vol.35, pp.1169-1176, 2016