

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

**DOKTORA TEZİ**

***DEINOCOCCUS RADIODURANS*'IN HÜCRE İÇİ pH  
HOMEOSTASİSİNDE GÖREVLİ BAZI GENLERİNİN İFADE  
DÜZEYLERİNE GAMA IŞINI VE pH ETKİSİNİN RT-QPCR  
YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ**

**Mehmet KUZUCU**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ERZİNCAN  
2016**

**Her Hakkı Saklıdır**

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

**Adı-Soyadı:** Mehmet KUZUCU


**İmza**



“*Deinococcus radiodurans*’ın Hücre İçi pH Homeostasisinde Görevli Bazı Genlerinin İfade Düzeylerine Gama Işını ve pH Etkisinin RT-qPCR Yöntemi ile İncelenmesi” adlı Doktora tezi, Erzincan Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.






  
Mehmet KUZUCU  
Tezi Hazırlayan

  
Doç. Dr. Murat ÇANKAYA  
Danışman

  
Prof. Dr. Salih DOĞAN  
Anabilim Dalı Başkanı



Doç. Dr. Murat ÇANKAYA danışmanlığında, Mehmet KUZUCU tarafından hazırlanan bu çalışma 9 Aralık 2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR	İmza: 
Üye	: Prof. Dr. T. Abdulkadir ÇOBAN	İmza: 
Üye	: Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ	İmza: 
Üye	: Doç. Dr. Murat ÇANKAYA	İmza: 
Üye	: Doç. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN	İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

9.12.2016



Prof. Dr. Ali SÜLÜN  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

Doktora Tezi

### *DEINOCOCCUS RADIODURANS*'IN HÜCRE İÇİ pH HOMEOSTASİSİNDE GÖREVLİ BAZI GENLERİNİN İFADE DÜZEYLERİNE GAMA IŞINI VE pH ETKİSİNİN RT- QPCR YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ

Mehmet KUZUCU

Erzincan Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Murat ÇANKAYA

*D. radiodurans* spor oluşturmeyen, hareketsiz, küresel yapılı, aerob ve gram-pozitif bir bakteridir. Dünya'nın radyasyona en dayanıklı oksijenli solunum yapan canlısı olarak Guinness rekorlar kitabına giren *D. radiodurans*, iyonize radyasyonun yanı sıra; düşük nem, UV-C ışınları, yüksek konsantrasyonda reaktif oksijen türevleri ve mitomisin C gibi genotoksik ajanlara da direnç gösterebilmektedir.

Tez çalışmasında *D. radiodurans*'ın farklı pH şartlarında inkübasyon ve radyasyon uygulamasıyla pH regülasyonunda rolü olduğu düşünülen bazı genlerinin etkinliği RT-qPCR yöntemi ile incelenmiştir. Çalışmada referans geni olarak gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz kullanılmıştır. Araştırmada,  $\beta$ -karbonik anhidraz, hidrojenaz (HypA ve HypB genleri),  $H^+/Na^+$ -glutamat simport membran kanal proteini, katyon değiştirici membran kanal proteini, arginin dekarboksilaz, glutamat sentaz büyük altbirimi, V-tip ATP sentaz altbirim-C, sitokrom C oksidaz altbirim-I, süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi, NADH dehidrogenaz altbirim-B ve üreaz yardımcı protein (UreE ve UreG genleri) genlerinin ifade düzeyleri incelenmiştir. Ayrıca *D. radiodurans*'ın farklı pH'larda ki besiyerlerinde pH regülasyonunu nasıl gerçekleştirdiğini pH-duyarlı bir prob olan pHrodo® floresan boyası yardımıyla floresan ışık mikroskobu kullanılarak incelenmiştir.

Yapılan denemelerde, farklı pH'larda inkübe edildiğinde farklı zamanlarda, izlenen bazı genlerin ifade düzeylerinde anlamlı değişimler belirlendi. Radyasyon uygulanan kültürlerde en yüksek ifade düzeyi 884,65 kat değişimle UreE geninde tespit edilmiştir. Ayrıca V-tip ATPaz'da referans genine göre ifade düzeyinin 546,33 kat arttığı belirlenmiştir.

**2016, 198 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** *D. radiodurans*, pH regülasyonu, radyasyon, RT-qPCR

**ABSTRACT**

Doctoral Thesis

INVESTIGATION THE EFFECTS OF GAMA RADITAION AND pH ON THE  
EXPERSSION LEVELS OF SOME GENES INCLUDED IN THE CELL pH  
HOMEOSTASIS OF *DEINOCOCCUS RADIODURANS* BY RT-QPCR METHOD

Mehmet KUZUCU

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Murat ÇANKAYA

*D. radiodurans* is a non-spore forming, non-motile, spherical shaped, aerobic and gram-positive bacteria. *D. radiodurans*, which entered into the Guinness records book as the world's most resistant aerobic organism to radiation also resistant to low moisture, UV-C rays, high amounts of reactive oxygen species, and genotoxic agents such as mitomycin C.

In the thesis study, the efficacy of *D. radiodurans* genes thought to play a role in pH regulation in response to incubation and radiation application of different pH conditions was examined by RT-qPCR method. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene was used as reference gene in the study. In the research, expression levels of  $\beta$ -carbonic anhydrase, hydrogenase (HypA and HypB genes),  $H^+/Na^+$  -glutamate symport membrane channel protein, cation exchange membrane channel protein, arginine decarboxylase, glutamate synthase major subunit, V-type ATP synthase subunit-C, succinate dehydrogenase cytochrome subunit, NADH dehydrogenase subunit-B, and urease accessory protein (UreE and UreG) genes were examined. In addition, how *D. radiodurans* performed in pH regulation in different pHs mediums was examined by using fluorescence light microscopy with a pH-sensitive probe, pHrodo<sup>®</sup> fluorescent dye.

Significant changes in expression levels of certain genes were observed at different times when incubated at different pHs. The highest expression level fold, 884,65-fold was detected in the UreE gene treated with radiation culture. It was also found that the V-type ATPase level 546,33-fold more compared to the reference gene.

**2016, 198 pages****Keywords:** *D. radiodurans*, pH regulation, radiation, RT-qPCR

## TEŞEKKÜR

Çalışmamda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, tezimin her aşamasında her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım değerli hocam Sayın Doç. Dr. Murat ÇANKAYA'ya sonsuz teşekkürler ederim. Çalışmam boyunca eşsiz katkılarından dolayı değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR ve Prof. Dr. T. Abdulkadir ÇOBAN'a tüm içtenliklerimle teşekkürlerimi sunarım. Doktora dönemim boyunca her türlü yardımı esirgemeyen Erzincan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Salih DOĞAN'a teşekkür ederim.

Akademik kariyerimin şekillenmesini sağlayan, bana bilimsel çalışmanın alfabesini öğreten çok kıymetli hocam Sayın Doç. Dr. Alper AKKAYA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım boyunca benden yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. A. Hümeysra TAŞKIN KAFA, Uğur DURMUŞ, Hasan Can TÜRK, Oğuzhan BAYRAK ve Yakup ÖZALP'e teşekkür ederim.

Ayrıca eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen anneme, babama ve ablama derin minnet ve şükranlarımı sunarım. Tez boyunca verdiği manevi destek ve gösterdiği sabır için eşim Hüma KUZUCU'ya sonsuz teşekkür ederim.

FEN-A-080715-0153 no'lu proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Erzincan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri yönetimine teşekkür ederim.

Mehmet KUZUCU

Aralık, 2016

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR .....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	xii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER.....</b>	<b>5</b>
2.1. <i>Deinococcus radiodurans</i> .....	5
2.1.1. Sistematikteki yeri .....	6
2.1.2. Habitatı ve morfolojisi.....	9
2.1.3. Genom yapısı.....	11
2.1.4. Poliektremofilik özellikleri .....	13
2.1.5. <i>D. radiodurans</i> 'ın iyonize radyasyona direnç mekanizması.....	17
2.2. Radyoaktivite .....	22
2.2.1. İyonize olmayan radyasyon .....	23
2.2.2. İyonize radyasyon.....	24
2.3. İyonize Radyasyonun Canlılar Üzerinde Etkisi .....	25
2.3.1. Doğrudan etki .....	29
2.3.2. Dolaylı etki .....	30
2.4. Hücre İçi pH Dengesi .....	34
2.4.1. Proton hareket gücü .....	35
2.5. Bakterilerde pH Dengeleme Sistemleri.....	36
2.5.1. Pasif sistemler.....	38
2.5.2. Aktif sistemler .....	38
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>50</b>
3.1. Materyal .....	50
3.1.1. Mikroorganizma .....	50
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	51



3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler .....	52
3.2. Yöntem .....	54
3.2.1. Besiyerlerinin hazırlanması ve <i>D. radiodurans</i> 'ın inokülasyonu .....	54
3.2.2. <i>D. radiodurans</i> R1'in büyüme kinetiği .....	56
3.2.3. Primer dizaynı .....	57
3.2.4. DNA saflaştırma .....	61
3.2.5. Gradient PCR .....	62
3.2.6. Agaroz jel elektroforezi .....	63
3.2.7. Uygun tampon madde seçimi .....	65
3.2.8. Farklı pH'larda inkübasyon .....	66
3.2.9. Radyasyon uygulaması .....	66
3.2.10. Total RNA saflaştırılması .....	67
3.2.11. Total RNA ve DNA konsantrasyonunun ve saflığının belirlenmesi .....	69
3.2.12. RT-qPCR ile gen ifade düzeylerinin belirlenmesi .....	70
3.2.13. İstatistiksel hesaplamalar .....	72
3.2.14. Floresan boya ile hücre içi pH'nın incelenmesi .....	72
4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....	75
4.1. Hücre Büyüme Eğrisinin Oluşturulması .....	75
4.2. Uygun Tampon Madde Seçimi .....	77
4.3. <i>D. radiodurans</i> 'ın Farklı pH'larda Büyüme Kabiliyeti .....	79
4.4. Primer Dizaynı .....	81
4.5. Gradient PCR .....	90
4.6. Uzun Süreli İnkübasyon Sonrası Gen İfade Düzeyleri .....	92
4.7. Kısa Süreli İnkübasyon Sonrası Gen İfade Düzeyleri .....	106
4.8. Radyasyon Uygulama Sonrası Gen İfade Düzeyleri .....	131
4.9. Floresan Boya ile Hücre İçi pH Ölçümü .....	150
5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	151
KAYNAKLAR .....	164
EKLER .....	179
EK 1. DR_1343 Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz .....	179
EK 2. DR_2238 $\beta$ -Karbonik anhidraz .....	180
EK 3. DR_A0316 Hidrojenaz HypA .....	181

EK 4. DR_A0315 Hidrojenaz HypB.....	182
EK 5. DR_0656 H <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> -glutamat simport membran kanal proteini.....	183
EK 6. DR_0373 Katyon değiştirici membran kanal proteini .....	184
EK 7. DR_0243 Arginin dekarboksilaz .....	185
EK 8. DR_0183 Glutamat sentaz büyük altbirimi .....	187
EK 9. DR_0698 V-tip ATP sentaz altbirim-C .....	191
EK 10. DR_2620 Sitokrom C oksidaz altbirim-I.....	192
EK 11. DR_0954 Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi.....	194
EK 12. DR_1505 NADH dehidrogenaz altbirim-B .....	195
EK 13. DR_A0314 Üreaz yardımcı protein UreE.....	196
EK 14. DR_A0312 Üreaz yardımcı protein UreG .....	197
ÖZGEÇMİŞ .....	198

**SİMGELER ve KISALTMALAR****Simgeler**

A	Adenin
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
bp	Baz çifti
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
Da	Dalton
$\Delta$	Delta
Tm	Erime sıcaklığı
$\gamma$	Gama
Gy	Gray
G	Guanin
pH	H <sup>+</sup> iyon konsantrasyonunun eksi logaritması
t <sub>d</sub>	İkilenme süresi
$\mu$	Mikro
m	Mili
M	Molarite
nm	Nanometre
n	Örnek sayısı
rad	Rad
$\delta$	Sigma
C	Sitozin
S	Standart sapma
T	Timin
U	Urasil
V	Volt
g	Yerçekimi ivmesi
%	Yüzde

**Kısaltmalar**

ATP	Adenozin trifosfat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
DNA	Deoksiribonükleik asit
Ct	Eşik değeri
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
mRNA	Haberci RNA
CFU	Koloni oluşum birimi
cDNA	Komplementer DNA
UV	Mor ötesi ışın
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
NTP	Nükleotid trifosfat
OD	Optik dansite
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
SANAEM	Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezinde
SEM	Taramalı elektron mikroskobu (Scanning electron microscopy)
RT-qPCR	Ters transkriptaz-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAEK	Türkiye Atom Enerjisi Kurumu

## TABLOLAR LİSTESİ

	Sayfa
<b>Tablo 2.1.</b> <i>Deinococcus</i> cinsine dahil türler .....	7
<b>Tablo 2.2.</b> <i>D. radiodurans</i> 'ın genomunun bazı özellikleri .....	12
<b>Tablo 2.3.</b> <i>D. radiodurans</i> ve bazı bakterilerin genomlarındaki IS ve SNRs elementleri .....	13
<b>Tablo 3.1.</b> Taq DNA polimeraz ile PCR karışım içeriği .....	62
<b>Tablo 3.2.</b> Gradient PCR için sıcaklık döngü protokolü .....	63
<b>Tablo 3.3.</b> Total RNA saflaştırmada kullanılan çözeltilerin miktarları .....	68
<b>Tablo 3.4.</b> RT-qPCR karışımını hazırlama protokolü .....	71
<b>Tablo 3.5.</b> RT-qPCR için sıcaklık döngü protokolü .....	71
<b>Tablo 4.1.</b> <i>D. radiodurans</i> 'a ait absorbans değerleri ve hücre sayıları .....	75
<b>Tablo 4.2.</b> Tampon maddelerin hücre büyümesine etkisi .....	77
<b>Tablo 4.3.</b> 50 mM tampon maddelerin otoklav sonrası pH değerleri .....	78
<b>Tablo 4.4.</b> 75 mM tampon maddelerin otoklav sonrası pH değerleri .....	79
<b>Tablo 4.5.</b> <i>D. radiodurans</i> 'ın farklı pH'larda OD <sub>600</sub> değerleri .....	80
<b>Tablo 4.6.</b> Farklı pH'larda inkübe edilen <i>D. radiodurans</i> 'ın hücre sayısı .....	81
<b>Tablo 4.7.</b> Dizayn edilen primerlerin bazı parametreleri .....	82
<b>Tablo 4.8.</b> Gradient PCR sıcaklık kodlaması .....	92
<b>Tablo 4.9.</b> Uzun süreli inkübasyon sonrası RNA konsantrasyonları .....	93
<b>Tablo 4.10.</b> β-karbonik anhidraz'ın 2 <sup>-ΔΔCt</sup> değerleri .....	98
<b>Tablo 4.11.</b> Hidrojenaz HypA'nın 2 <sup>-ΔΔCt</sup> değerleri .....	98
<b>Tablo 4.12.</b> Hidrojenaz HypB'nin 2 <sup>-ΔΔCt</sup> değerleri .....	99
<b>Tablo 4.13.</b> H <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> -glutamat membran kanal proteini'nin 2 <sup>-ΔΔCt</sup> değerleri .....	100
<b>Tablo 4.14.</b> Katyon değiştirici membran proteini'nin 2 <sup>-ΔΔCt</sup> değerleri .....	100
<b>Tablo 4.15.</b> Arginin dekarboksilaz'ın 2 <sup>-ΔΔCt</sup> değerleri .....	101

<b>Tablo 4.16.</b> Glutamat sentaz büyük altbirimi'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	102
<b>Tablo 4.17.</b> V-tip ATP sentaz altbirim-C'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	102
<b>Tablo 4.18.</b> Sitokrom C oksidaz altbirim-I'in $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri .....	103
<b>Tablo 4.19.</b> Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	104
<b>Tablo 4.20.</b> NADH dehidrogenaz altbirim-B'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri .....	104
<b>Tablo 4.21.</b> Üreaz yardımcı protein UreE'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	105
<b>Tablo 4.22.</b> Üreaz yardımcı protein UreG'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri .....	106
<b>Tablo 4.23.</b> Örneklerin agaroz jeldeki pozisyonları .....	115
<b>Tablo 4.24.</b> $\beta$ -karbonik anhidraz'ın $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	123
<b>Tablo 4.25.</b> Hidrojenaz HypA'nın $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	123
<b>Tablo 4.26.</b> Hidrojenaz HypB'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	124
<b>Tablo 4.27.</b> $H^+/Na^+$ -glutamat membran proteini'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	125
<b>Tablo 4.28.</b> Katyon değiştirici membran proteini'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	125
<b>Tablo 4.29.</b> Arginin dekarboksilaz'ın $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	126
<b>Tablo 4.30.</b> Glutamat sentaz büyük altbirimi'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	127
<b>Tablo 4.31.</b> V-tip ATP sentaz altbirim-C'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	127
<b>Tablo 4.32.</b> Sitokrom C oksidaz altbirim-I'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri .....	128
<b>Tablo 4.33.</b> Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	129
<b>Tablo 4.34.</b> NADH dehidrogenaz altbirim-B'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri .....	129
<b>Tablo 4.35.</b> Üreaz yardımcı protein UreE'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	130
<b>Tablo 4.36.</b> Üreaz yardımcı protein UreG'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri .....	131
<b>Tablo 4.37.</b> Radyasyon uygulanan örneklerin RNA konsantrasyonları .....	132
<b>Tablo 4.38.</b> Örneklerin agaroz jeldeki pozisyonları .....	135
<b>Tablo 4.39.</b> Agaroz jel elektroforezindeki genlere ait kodlamalar .....	135
<b>Tablo 4.40.</b> $\beta$ -karbonik anhidraz'ın $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	138

<b>Tablo 4.41.</b> Hidrojenaz HypA 'ın $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	139
<b>Tablo 4.42.</b> Hidrojenaz HypB 'ın $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri .....	139
<b>Tablo 4.43.</b> $H^+/Na^+$ -glutamat membran proteini'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	140
<b>Tablo 4.44.</b> Katyon değiştirici membran proteini'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri .....	141
<b>Tablo 4.45.</b> Arginin dekarboksilaz'ın $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	142
<b>Tablo 4.46.</b> Glutamat sentaz büyük altbirimi'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	143
<b>Tablo 4.47.</b> V-tip ATP sentaz altbirim-C'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	144
<b>Tablo 4.48.</b> Sitokrom C oksidaz altbirim-I'in $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri .....	145
<b>Tablo 4.49.</b> Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	146
<b>Tablo 4.50.</b> NADH dehidrogenaz altbirim-B'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri .....	147
<b>Tablo 4.51.</b> reaz yardımcı protein UreE'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	148
<b>Tablo 4.52.</b> reaz yardımcı protein UreG'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri .....	149

## ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1. <i>D. radiodurans</i> 'ın SEM görüntüleri .....	5
Şekil 2.2. 2016 itibariyle <i>Deinococcus</i> cinsine dahil 16S rRNA analizleri yapılmış türlerin filogenetik diyagramı .....	8
Şekil 2.3. <i>Deinococcus radiodurans</i> 'ın sınıflandırılması .....	8
Şekil 2.4. <i>D. radiodurans</i> R1 kolonileri .....	10
Şekil 2.5. <i>D. radiodurans</i> 'ın hücre duvarının elektron mikroskobu görüntüsü.....	11
Şekil 2.6. Mitomisin C'nin kimyasal yapısı .....	15
Şekil 2.7. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları arasındaki bağlantı .....	17
Şekil 2.8. <i>D. radiodurans</i> 'ın çift DNA kırıklarının onarım mekanizmaları .....	20
Şekil 2.9. <i>D. radiodurans</i> 'ta bulunan Mn <sup>+2</sup> temelli antioksidan kompleksleri.....	21
Şekil 2.10. Suyun radyolizisi ile meydana gelen reaksiyon kaskatı .....	27
Şekil 2.11. Suyun radyolizis reaksiyonu sonu meydana gelen ürünler.....	28
Şekil 2.12. Hidrojenaz enziminin katalizlediği reaksiyon .....	40
Şekil 2.13. Piridoksal fosfat bağımlı amino asit dekarboksilasyonu şeması .....	41
Şekil 2.14. Glutamat sentaz enziminin reaksiyon şeması .....	42
Şekil 2.15. Karbonik anhidraz enziminin reaksiyon şeması .....	42
Şekil 2.16. Üreaz enziminin reaksiyon şeması .....	43
Şekil 2.17. Karbonik anhidraz ve üreazın pH homeostasisindeki rolü .....	44
Şekil 2.18. Bakterilerde Elektron taşıma sistemine ait reaksiyon şeması.....	45
Şekil 2.19. Sitokrom bc <sub>1</sub> kompleksinde Q-çevrimi modeli.....	46
Şekil 2.20. Kemiozmotik teoriye göre ATP sentezine ait reaksiyon eşitliği .....	47
Şekil 2.21. V-tip ATPaz'ın yapısal şekli ve reaksiyon mekanizması .....	47
Şekil 2.22. V-tip ATPaz ve F-tip ATPaz'ın yapısı ve karşılaştırması.....	48
Şekil 2.23. Hücre membran taşıma sistemleri .....	49



<b>Şekil 3.1.</b> <i>D. radiodurans</i> 'a ait Leibniz-Institut DSMZ GmbH.'den alınan belge ....	50
<b>Şekil 3.2.</b> Steril kabinde inokülasyon .....	55
<b>Şekil 3.3.</b> NCBI veritabanından <i>D. radiodurans</i> 'in ilgili gen sekansının taranması .	58
<b>Şekil 3.4.</b> Gen dizisinin FASTA formatında açılması .....	58
<b>Şekil 3.5.</b> FASTA formatında açılan dizi içinden primer dizaynına geçiş .....	59
<b>Şekil 3.6.</b> Primer dizaynı ve genomu ile BLAST'lama için parametrelerin sisteme girilmesi .....	59
<b>Şekil 3.7.</b> Program tarafından belirlenen primerlerin gen üzerinde ampikon bölgelerin haritalanması .....	60
<b>Şekil 3.8.</b> Program tarafından belirlenen primer çiftlerinin bazı parametreleri.....	60
<b>Şekil 3.9.</b> Agaroz jel elektroforez düzeneği.....	64
<b>Şekil 3.10.</b> Görüntüleme cihazı.....	64
<b>Şekil 3.11.</b> pHrodo Green AM ve pHrodo Red AM boyalarının farklı pH'lardaki görüntüleri.....	73
<b>Şekil 3.12.</b> Farklı pH'larda <i>D. radiodurans</i> 'ın floresan boya ile boyama protokolü	73
<b>Şekil 4.1.</b> <i>D. radiodurans</i> R1'e ait büyüme grafiği .....	76
<b>Şekil 4.2.</b> 15. saat seyreltme plaka ile hücre sayımında petri kültürü.....	76
<b>Şekil 4.3.</b> 100 mM tampon madde ilavesiyle <i>D. radiodurans</i> 'ın gelişimi.....	78
<b>Şekil 4.4.</b> Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz geni için seçilen primer çiftinin bazı parametreleri .....	83
<b>Şekil 4.5.</b> $\beta$ -karbonik anhidraz geni için seçilen primer çiftinin bazı parametreleri..	83
<b>Şekil 4.6.</b> Hidrojenaz HypA geni için seçilen primer çiftinin bazı parametreleri.....	83
<b>Şekil 4.7.</b> Hidrojenaz HypB geni için seçilen primer çiftinin bazı parametreleri.....	83
<b>Şekil 4.8.</b> $H^+/Na^+$ -glutamat simport membran kanal proteini geni için seçilen primer çiftinin bazı parametreleri .....	83
<b>Şekil 4.9.</b> Katyon değiştirici membran kanal proteini geni için seçilen primer çiftinin bazı parametreleri.....	83
<b>Şekil 4.10.</b> Arginin dekarboksilaz geni için seçilen primer çiftinin bazı parametreleri .....	84

<b>Şekil 4.11.</b> Glutamat sentaz büyük altbirimi geni için seçilen primer çiftinin bazı parametreleri .....	84
<b>Şekil 4.12.</b> V-tip ATP sentaz altbirim-C geni için seçilen primer çiftinin bazı parametreleri .....	84
<b>Şekil 4.13.</b> Sitokrom C oksidaz altbirim-I geni için seçilen primer çiftinin bazı parametreleri .....	84
<b>Şekil 4.14.</b> Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi geni için seçilen primer çiftinin bazı parametreleri.....	84
<b>Şekil 4.15.</b> NADH dehidrogenaz altbirim-B geni için seçilen primer çiftinin bazı parametreleri .....	84
<b>Şekil 4.16.</b> Üreaz yardımcı protein UreE geni için seçilen primer çiftinin bazı parametreleri .....	85
<b>Şekil 4.17.</b> Üreaz yardımcı protein UreG geni için seçilen primer çiftinin bazı parametreleri .....	85
<b>Şekil 4.18.</b> Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz geni için seçilen primer çiftinin oluşturduğu amplikon bölge.....	85
<b>Şekil 4.19.</b> $\beta$ -karbonik anhidraz geni için seçilen primer çiftinin oluşturduğu amplikon bölge.....	86
<b>Şekil 4.20.</b> Hidrojenaz HypA geni için seçilen primer çiftinin oluşturduğu amplikon bölge.....	86
<b>Şekil 4.21.</b> Hidrojenaz HypB geni için seçilen primer çiftinin oluşturduğu amplikon bölge.....	86
<b>Şekil 4.22.</b> $H^+/Na^+$ -glutamat simport membran kanal proteini geni için seçilen primer çiftinin oluşturduğu amplikon bölge .....	87
<b>Şekil 4.23.</b> Katyon değiştirici membran kanal proteini geni için seçilen primer çiftinin oluşturduğu amplikon bölge .....	87
<b>Şekil 4.24.</b> Arginin dekarboksilaz geni için seçilen primer çiftinin oluşturduğu amplikon bölge.....	87
<b>Şekil 4.25.</b> Glutamat sentaz büyük altbirimi geni için seçilen primer çiftinin oluşturduğu amplikon bölge.....	88
<b>Şekil 4.26.</b> V-tip ATP sentaz altbirim-C geni için seçilen primer çiftinin oluşturduğu amplikon bölge.....	88

<b>Şekil 4.27.</b> Sitokrom C oksidaz altbirim-I geni için seçilen primer çiftinin oluşturduğu amplikon bölge.....	88
<b>Şekil 4.28.</b> Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi geni için seçilen primer çiftinin oluşturduğu amplikon bölge.....	89
<b>Şekil 4.29.</b> NADH dehidrogenaz altbirim-B geni için seçilen primer çiftinin oluşturduğu amplikon bölge.....	89
<b>Şekil 4.30.</b> Üreaz yardımcı protein UreE geni için seçilen primer çiftinin oluşturduğu amplikon bölge.....	89
<b>Şekil 4.31.</b> Üreaz yardımcı protein UreG geni için seçilen primer çiftinin oluşturduğu amplikon bölge.....	90
<b>Şekil 4.32.</b> Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz, $\beta$ -karbonik anhidraz, Hidrojenaz HypA ait agaroz jel görüntüleri.....	90
<b>Şekil 4.33.</b> Hidrojenaz HypB, $H^+/Na^+$ -glutamat simport membran kanal proteini, Katyon değiştirici membran kanal proteini ait agaroz jel görüntüleri .....	91
<b>Şekil 4.34.</b> Arginin dekarboksilaz, Glutamat sentaz büyük altbirimi, V-tip ATP sentaz altbirim-C ait agaroz jel görüntüleri.....	91
<b>Şekil 4.35.</b> Sitokrom C oksidaz altbirim-I, Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi, NADH dehidrogenaz altbirim-B ait agaroz jel görüntüleri.....	91
<b>Şekil 4.36.</b> Üreaz yardımcı protein UreE, Üreaz yardımcı protein UreG ait agaroz jel görüntüleri.....	92
<b>Şekil 4.37.</b> 1. saat örneklerine ait birinci tekrar amplifikasyon grafiği.....	93
<b>Şekil 4.38.</b> 1. saat örneklerine ait birinci tekrar standart grafiği.....	94
<b>Şekil 4.39.</b> 1. saat örneklerine ait birinci tekrar erime eğrisi .....	94
<b>Şekil 4.40.</b> 3. saat örneklerine ait birinci tekrar amplifikasyon grafiği.....	94
<b>Şekil 4.41.</b> 3. saat örneklerine ait birinci tekrar standart grafiği.....	95
<b>Şekil 4.42.</b> 1. saat örneklerine ait birinci tekrar erime eğrisi .....	95
<b>Şekil 4.43.</b> 5. saat örneklerine ait birinci tekrar amplifikasyon grafiği.....	95
<b>Şekil 4.44.</b> 5. saat örneklerine ait birinci tekrar standart grafiği.....	96
<b>Şekil 4.45.</b> 1. saat örneklerine ait birinci tekrar erime eğrisi .....	96
<b>Şekil 4.46.</b> 24. saat örneklerine ait birinci tekrar amplifikasyon grafiği.....	96

<b>Şekil 4.47.</b> 24. saat örneklerine ait birinci tekrar standart grafiği.....	97
<b>Şekil 4.48.</b> 1. saat örneklerine ait birinci tekrar erime eğrisi .....	97
<b>Şekil 4.49.</b> $\beta$ -karbonik anhidraz tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri .....	98
<b>Şekil 4.50.</b> Hidrojenaz HypA tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri .....	99
<b>Şekil 4.51.</b> Hidrojenaz HypB tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri .....	99
<b>Şekil 4.52.</b> $H^+/Na^+$ -glutamat simport membran kanal proteini tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri.....	100
<b>Şekil 4.53.</b> Katyon değiştirici membran kanal proteini tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri.....	101
<b>Şekil 4.54.</b> Arginin dekarboksilaz tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri .....	101
<b>Şekil 4.55.</b> Glutamat sentaz büyük altbirimi tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri.....	102
<b>Şekil 4.56.</b> V-tip ATP sentaz tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri.....	103
<b>Şekil 4.57.</b> Sitokrom C oksidaz tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri .....	103
<b>Şekil 4.58.</b> Süksinat dehidrogenaz tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri .....	104
<b>Şekil 4.59.</b> NADH dehidrogenaz tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri.....	105
<b>Şekil 4.60.</b> Üreaz UreE tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri.....	105
<b>Şekil 4.61.</b> Üreaz UreG tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri .....	106
<b>Şekil 4.62.</b> Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz ve $\beta$ -Karbonik anhidraz genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika amplifikasyon grafiği.....	107
<b>Şekil 4.63.</b> Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz ve $\beta$ -Karbonik anhidraz genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika standart grafiği .....	107
<b>Şekil 4.64.</b> Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz ve $\beta$ -Karbonik anhidraz genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika erime eğrisi .....	108
<b>Şekil 4.65.</b> Hidrojenaz HypA ve Hidrojenaz HypB genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika amplifikasyon grafiği .....	108
<b>Şekil 4.66.</b> Hidrojenaz HypA ve Hidrojenaz HypB genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika standart grafiği.....	108
<b>Şekil 4.67.</b> Hidrojenaz HypA ve Hidrojenaz HypB genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika erime eğrisi .....	109

- Şekil 4.68.**  $H^+/Na^+$ -glutamat membran proteini ve Katyon değiştirici membran kanal proteini genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika amplifikasyon grafiği ..... 109
- Şekil 4.69.**  $H^+/Na^+$ -glutamat membran proteini ve Katyon değiştirici membran kanal proteini genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika standart grafiği..... 109
- Şekil 4.70.**  $H^+/Na^+$ -glutamat membran proteini ve Katyon değiştirici membran kanal proteini genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika erime eğrisi..... 110
- Şekil 4.71.** Arginin dekarboksilaz ve Glutamat sentaz büyük altbirimi genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika amplifikasyon grafiği..... 110
- Şekil 4.72.** Arginin dekarboksilaz ve Glutamat sentaz büyük altbirimi genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika standart grafiği ..... 110
- Şekil 4.73.** Arginin dekarboksilaz ve Glutamat sentaz büyük altbirimi genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika erime eğrisi ..... 111
- Şekil 4.74.** V-tip ATP sentaz altbirim-C ve Sitokrom C oksidaz altbirim-I genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika amplifikasyon grafiği..... 111
- Şekil 4.75.** V-tip ATP sentaz altbirim-C ve Sitokrom C oksidaz altbirim-I genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika standart grafiği ..... 111
- Şekil 4.76.** V-tip ATP sentaz altbirim-C ve Sitokrom C oksidaz altbirim-I genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika erime eğrisi ..... 112
- Şekil 4.77.** Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi ve NADH dehidrogenaz altbirim-B genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika amplifikasyon grafiği ..... 112
- Şekil 4.78.** Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi ve NADH dehidrogenaz altbirim-B genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika standart grafiği ..... 112
- Şekil 4.79.** Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi ve NADH dehidrogenaz altbirim-B genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika erime eğrisi..... 113
- Şekil 4.80.** Üreaz yardımcı protein UreE ve Üreaz yardımcı protein UreG genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika amplifikasyon grafiği..... 113
- Şekil 4.81.** Üreaz yardımcı protein UreE ve Üreaz yardımcı protein UreG genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika standart grafiği ..... 113
- Şekil 4.82.** Üreaz yardımcı protein UreE ve Üreaz yardımcı protein UreG genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika erime eğrisi ..... 114
- Şekil 4.83.** Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü..... 115
- Şekil 4.84.**  $\beta$ -Karbonik anhidraz geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü .. 116

<b>Şekil 4.85.</b> Hidrojenaz HypA geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü.....	116
<b>Şekil 4.86.</b> Hidrojenaz HypB geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü.....	117
<b>Şekil 4.87.</b> $H^+/Na^+$ -glutamat simport membran kanal proteini geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü.....	117
<b>Şekil 4.88.</b> Katyon değiştirici membran kanal proteini geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü .....	118
<b>Şekil 4.89.</b> Arginin dekarboksilaz geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü	118
<b>Şekil 4.90.</b> Glutamat sentaz büyük altbirimi geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü.....	119
<b>Şekil 4.91.</b> V-tip ATP sentaz altbirim-C geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü.....	119
<b>Şekil 4.92.</b> Sitokrom C oksidaz altbirim-I geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü.....	120
<b>Şekil 4.93.</b> Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü .....	120
<b>Şekil 4.94.</b> NADH dehidrogenaz altbirim-B geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü.....	121
<b>Şekil 4.95.</b> Üreaz yardımcı protein UreE geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü.....	121
<b>Şekil 4.96.</b> Üreaz yardımcı protein UreG geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü.....	122
<b>Şekil 4.97.</b> $\beta$ -karbonik anhidraz tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri .....	123
<b>Şekil 4.98.</b> Hidrojenaz HypA tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri .....	124
<b>Şekil 4.99.</b> Hidrojenaz HypB tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri .....	124
<b>Şekil 4.100.</b> $H^+/Na^+$ -glutamat simport membran kanal proteini tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri .....	125
<b>Şekil 4.101.</b> Katyon değiştirici membran kanal proteini tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri.....	126
<b>Şekil 4.102.</b> Arginin dekarboksilaz tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri ....	126
<b>Şekil 4.103.</b> Glutamat sentaz büyük altbirimi tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri.....	127

<b>Şekil 4.104.</b> V-tip ATP sentaz tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri.....	128
<b>Şekil 4.105.</b> Sitokrom C oksidaz altbirim-I tüm pH'larda zamana bağlı ifade.....	128
<b>Şekil 4.106.</b> Süksinat dehidrogenaz tüm pH'larda zamana bağlı ifade .....	129
<b>Şekil 4.107.</b> NADH dehidrogenaz altbirim-B tüm pH'larda zamana bağlı ifade ....	130
<b>Şekil 4.108.</b> Üreaz yardımcı protein UreE tüm pH'larda zamana bağlı ifade .....	130
<b>Şekil 4.109.</b> Üreaz yardımcı protein UreG tüm pH'larda zamana bağlı ifade.....	131
<b>Şekil 4.110.</b> 1. Grup genlerine ait 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 ve 1000 Gy dozlanmış örneklerin amplifikasyon grafiği .....	133
<b>Şekil 4.111.</b> 1. Grup genlerine ait 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 ve 1000 Gy dozlanmış örneklerin standart grafiği.....	133
<b>Şekil 4.112.</b> 1. Grup genlerine ait 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 ve 1000 Gy dozlanmış örneklerin erime eğrisi.....	133
<b>Şekil 4.113.</b> 2. Grup genlerine ait 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 ve 1000 Gy dozlanmış örneklerin amplifikasyon grafiği .....	134
<b>Şekil 4.114.</b> 2. Grup genlerine ait 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 ve 1000 Gy dozlanmış örneklerin standart grafiği.....	134
<b>Şekil 4.115.</b> 2. Grup genlerine ait 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 ve 1000 Gy dozlanmış örneklerin erime eğrisi.....	134
<b>Şekil 4.116.</b> Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz ve $\beta$ -Karbonik anhidraz geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü .....	136
<b>Şekil 4.117.</b> Hidrojenaz HypA ve Hidrojenaz HypB geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü .....	136
<b>Şekil 4.118.</b> $H^+/Na^+$ -glutamat simport membran kanal proteini ve Katyon değiştirici membran kanal proteini geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü.....	136
<b>Şekil 4.119.</b> Arginin dekarboksilaz ve Glutamat sentaz büyük altbirimi geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü .....	136
<b>Şekil 4.120.</b> V-tip ATP sentaz altbirim-C ve Sitokrom C oksidaz altbirim-I geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü.....	136
<b>Şekil 4.121.</b> Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi ve NADH dehidrogenaz altbirim-B geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü .....	137
<b>Şekil 4.122.</b> Üreaz yardımcı protein UreE ve Üreaz yardımcı protein UreG geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü.....	137

<b>Şekil 4.123.</b> $\beta$ -karbonik anhidrazın tüm radyasyon dozlarında ifade düzeyleri .....	138
<b>Şekil 4.124.</b> Hidrojenaz HypA tüm radyasyon dozlarında ifade düzeyleri .....	139
<b>Şekil 4.125.</b> Hidrojenaz HypB tüm radyasyon dozlarında ifade düzeyleri.....	140
<b>Şekil 4.126.</b> $H^+/Na^+$ -glutamat simport membran kanal proteini tüm radyasyon dozlarında ifade düzeyleri .....	141
<b>Şekil 4.127.</b> Katyon değiştirici membran kanal proteini radyasyon dozlarında ifade düzeyleri.....	142
<b>Şekil 4.128.</b> Arginin dekarboksilaz radyasyon dozlarında ifade düzeyleri .....	143
<b>Şekil 4.129.</b> Glutamat sentaz radyasyon dozlarında ifade düzeyleri .....	144
<b>Şekil 4.130.</b> V-tip ATP sentaz radyasyon dozlarında ifade düzeyleri .....	145
<b>Şekil 4.131.</b> Sitokrom C oksidaz radyasyon dozlarında ifade düzeyleri .....	146
<b>Şekil 4.132.</b> Süksinat dehidrogenaz radyasyon dozlarında ifade düzeyleri.....	147
<b>Şekil 4.133.</b> NADH dehidrogenaz radyasyon dozlarında ifade düzeyleri .....	148
<b>Şekil 4.134.</b> Üreaz yardımcı protein UreE radyasyon dozlarında ifade düzeyleri...	149
<b>Şekil 4.135.</b> Üreaz yardımcı protein UreG radyasyon dozlarında ifade düzeyleri ..	150
<b>Şekil 4.136.</b> <i>D. radiodurans</i> 'ın floresan boya ile farklı pH'lardaki görüntüleri.....	150



## 1. GİRİŞ

Lambda-CDM uyumluluk modeline göre  $13,798 \pm 0,037$  milyar ( $13,798 \pm 0,037 \times 10^9$ ) yıl yaşında olan kâinatımız Büyük Patlamanın ardından birçok olağanüstü atmosferik ve iklimsel değişikliklere sahne olmuştur (Ade vd., 2014).

Kâinatın doğuşundan bu güne canlılık; yüksek sıcaklık, yüksek basınç, düşük su miktarları, değişken atmosfer kompozisyonu ve yüksek radyasyon gibi birçok zorlayıcı fiziksel ve kimyasal koşul altında direnç göstermeye çalışmıştır. Bu zorlu şartlar altında yaşamını devam ettirmeyi becerebilen canlılar bir sonraki nesillerine bu yaşam tecrübelerini genetik yapılarıyla aktarmış ve günümüze kadar gelerek bize dayanıklılıklarının sırlarını sunmuşlardır.

Günümüzde, önemli bir kısmı insan kaynaklı çevresel hatalar ile yeniden yaşamı olumsuz yönde etkileyen bazı şartların oluştuğunu görmekteyiz. İnsan kaynaklı doğal süreçleri bozan en önemli etken radyoaktivite kullanımının artışıdır. Gelişen teknolojinin toplumların yaşamlarına yönelik yaptığı buluşlar ile artan enerji talebi, sağlık alanında kullanılan bazı yöntemler, nükleer savaşlar, bina yapı malzemelerinde bulunan radyoaktif elementler ve nükleer kazalar gibi farklı kaynaklar ile doğal olmayan etkenlerden dolayı toplam alınan radyasyon dozu gün geçtikçe canlılar üzerinde olumsuz sonuçlar doğurmaktadır (Greinert vd., 2015; McColl vd., 2015; Radiation, 2015).

Canlıların tümünü etkileyen radyoaktivite artışı akut ve kronik bazı sorunlara yol açabilmektedir. Radyasyonu tolere yeteneği canlılar arasında birbirlerinden farklı olmakla birlikte, etkinin hangi biyomoleküller üzerinde yoğunlaştığına göre de zararın derecesi değişmektedir.

İyonize ışınların hücrelerde yol açtığı etkilerin; fiziksel değişimlerin metabolizma bütünlüğüne etkisine değin büyüyen bir karmaşada gözlemlenmesi gerekmektedir. Bu incelemeler öncelikle, iyonize ışının bir hücredeki fiziksel şartları değiştirme olgusunun üzerinden yapılan değerlendirmeler ile ölçek büyütülerek; fizikokimyasal değişimler, kimyasal değişimler ve biyolojik değişimler gözlemlenmesi sırasına dayanmaktadır.

Hücredeki fiziksel değişimler  $10^{-15}$  saniyede meydana gelirken, metabolik sonuçlar daha uzun vadede ortaya çıkabilmektedir. Bu sonuçlar DNA'daki bir mutasyon, bu mutasyonun kansere yol açması veya hasarın otolize sebep olması gibi farklı ihtimallerin ortaya çıkması ile meydana gelebilmektedir (McColl vd., 2015).

Canlılarda bu etkinin oluşması iyonize radyasyonun soğurulmasıyla başlamaktadır. Dozun miktarı, süresi, periyodu, hızı ve dağılımı hücrelerdeki etkisinin nitel ve nicel sonuçları açısından önemli parametrelerdir.

Radyoaktif enerjinin hücreler tarafından soğurulmasıyla biyomoleküllerde doğrudan veya dolaylı olarak hasarlar oluşmaktadır. Biyomoleküllerde alınan enerji sonucu atom iyonizasyonu ile yapı bütünlüğünün bozulmasına doğrudan etki denilmektedir. DNA, RNA, proteinler, lipidler, karbohidratlar ile bunların yapısal ve fonksiyonel bütün konjugelerinde ki kovalent bağların iyonizasyonu şeklinde görülen doğrudan etki, en yıkıcı sonuçlarını DNA üzerinde göstermektedir (McColl vd., 2015; Keha ve Küfrevioğlu, 2015).

Bu yüksek enerji ile DNA'nın; fosfat omurgası, riboz şekeri veya nükleobazlar ve bunlar arasındaki tüm kovalent bağların yıkımı gerçekleşebilmektedir. Bu bağ kopmaları ile biyomoleküller ya aktivitelerini tamamen kaybetmekte ya da metabolik bozukluklara sebep olan fonksiyon değişikliklerine uğramaktadırlar (McColl vd., 2015; Keha ve Küfrevioğlu, 2015).

Radyasyon ile hücre içerisinde toplam enerji artışı sonucu oluşan serbest radikallerden dolayı biyomoleküllerin hasara uğramasına ise dolaylı etki adı verilmektedir. Dolaylı etkide iyonize radyasyonun hücre içerisinde en bol bulunan molekül olan su ile etkileşimi sonucu serbest oksijen radikallerinde artış olmaktadır. Oluşan reaktifler metabolizma içerisinde reaksiyonların tamamen inhibisyonuna, istenmeyen ürün oluşumuna veya yavaşlamasına sebep olmaktadır.

Özetle serbest oksijen radikalleri; karbohidratların okzaloaldehitlere dönüşmesini, lipidlerin peroksidasyonunu, proteinlerin yapılarının bozulmasını ve nükleik asitlerde farklı lezyonların oluşumunu indüklemektedirler.

İyonize radyasyon hücrede en çok su molekülleriyle karşılaşmaktadır. Bu karşılaşma ile su radyolizise uğrayarak pH dengesizlikleri oluşturmaktadır. Suyun radyolizisi ile fizikokimyasal olarak  $10^{-15}$ - $10^{-12}$  saniyede gerçekleşen ara reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan bu denge kaybı yaşamı olumsuz etkilemektedir (Le Caër, 2011).

Hücrede meydana gelen bu pH dengesizliği, metabolizmanın tamamında katalitik rol oynayan enzimlerin aktivitelerinin azalmasına hatta tamamen inhibisyonuna sebep olmaktadır (Keha ve Küfrevioğlu, 2015).

İyonize radyasyonun en önemli litik etkisini DNA üzerinde gösterdiği ve bu hasarların tamirinde görev alan birçok enzim olduğu bilinmektedir. İyonize radyasyondan dolayı oluşan hasarların tamir edilmesinde görev alan tüm enzimatik reaksiyonların inhibe olması bu paradoksun önemli bir sorusunu akla getirmektedir. Üzerinde yoğunlaşmış çalışmalara rağmen *D. radiodurans*'ın yüksek oksidasyonun ölümcül etkilerine karşı korunmak için kullandığı enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalar bütünüyle anlaşılammıştır (Daly vd., 2004; Agapov ve Kulbachinskiy, 2015).

*Deinococcus radiodurans* gibi radyotolerant canlılar çift DNA kırıkları gibi kısa zamanda onarılması gereken önemli hasarları, bilindiği kadarıyla optimum pH'sı yaklaşık 7,4 olan enzimleri ile 1-1000 femtosaniye de nasıl tamir etmektedir? Hücrenin karşılaştığı ilk sorun olan pH dengesizliğini giderebilmek için hangi enzim veya sistemleri kullanmaktadır?

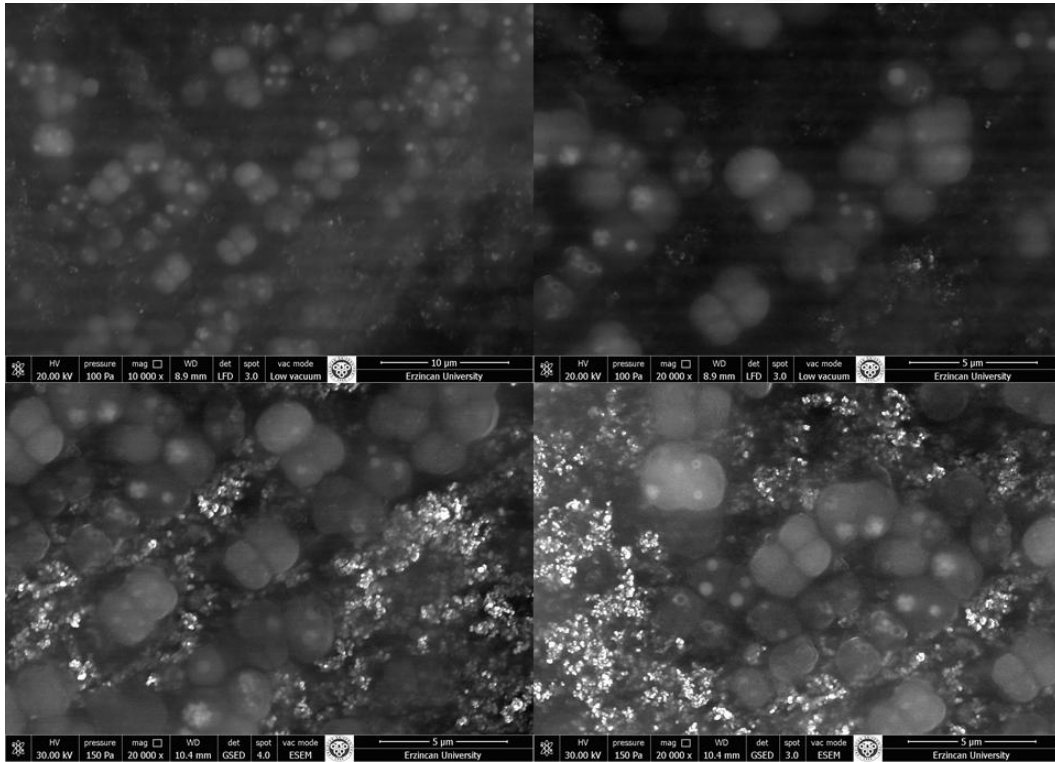
Tez çalışmasında *D. radiodurans*'ın pH dengesini sağlamak için hangi sistemlerini kullandığı; RT-qPCR yöntemi ile incelenmiştir. Çalışmada referans geni olarak Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz kullanılmıştır. Farklı deney setlerinde,  $\beta$ -karbonik anhidraz, hidrojenaz (HypA ve HypB genleri),  $H^+/Na^+$ -glutamat simport membran kanal proteini, katyon değiştirici membran kanal proteini, arginin dekarboksilaz, glutamat sentaz, V-tip ATP sentaz, sitokrom C oksidaz, süksinat dehidrogenaz, NADH dehidrogenaz ve üreaz (UreE ve UreG genleri ile) gibi pH homeostasisinde görev aldığı düşünölen genlerin ifade düzeyleri incelenerek olası metabolik senaryolar oluşturulmuştur.

Ayrıca *D. radiodurans*'ın farklı pH'larda ki besiyerlerinde pH regölasyonunu nasıl gerçekteştirdiğini pH-duyarlı bir indikatör olan pHrodo<sup>®</sup> floresan boyası yardımıyla floresan ışık mikroskobu kullanılarak incelenmiştir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. *Deinococcus radiodurans*

*Deinococcus radiodurans* ilk olarak 1956 yılında Amerika Birleşik Devletleri, Oregon State Üniversitesi, Oregon Tarımsal Deneyler Tesisinde konserve etlerin kullanım süresini uzatmak için gama ışını ile sterilizasyon denemelerinde Arthur W. Anderson tarafından tespit edilmiştir. Yapılan bu denemede 4000 Gy gama ışını uygulanmış konserve etlerin bozulduğunu gözlemleyen Anderson kırmızı pigmentli bu bakteriyi izole etmiştir. İlk olarak *Micrococcus* cinsinde sınıflandırılan bakteriye radyasyona dayanıklılığından dolayı “*radiodurans*” tür ismi verilmiştir. 1986 yılında başlayan moleküler sistematik alanındaki çalışmalar ile anlamı Yunancada “müthiş tanecik”, “korkunç tanecik” olan “*Deinococcus*” cinsi oluşturularak yeniden sınıflandırılmıştır (Murray, 1986).



Şekil 2.1. *Deinococcus radiodurans*'ın SEM görüntüleri

*D. radiodurans* spor oluşturmeyen, hareketsiz küresel yapılı, aerob ve hücre duvarının kimyasal kompozisyonu her ne kadar Gram-negatiflere benzesede Gram-pozitif bir bakteridir (Şekil 2.1). Patojen olmayan *D. radiodurans*, katalaz-pozitif ve mezofilik bir canlıdır. Boyutları 0,5-3,5 µm arasında değişen bu proteolitik bakteri küresel yapıda olup sıvı kültürde tekli hücreler halinde, katı besiyerinde ve sıvı besiyerinde geç stasyoner fazda tetratlar olarak bulunmaktadır (Murray, 1986; Makarova vd., 2007).

30 °C’de TGY (% 0,5 tripton, % 0,1 glukoz, % 0,3 maya özütü) besiyerinde ikilenme zamanı yaklaşık olarak 2 saat olan *D. radiodurans* dünya’nın radyasyona en dayanıklı oksijenli solunum yapan canlısı olarak Guinness rekorlar kitabına girmiştir (White vd., 1999).

*D. radiodurans* iyonize radyasyonun yanı sıra; düşük nem, UV-C ışınları, yüksek miktardaki reaktif oksijen türevleri ve mitomisin C gibi genotoksik ajanlara direnç gösterebilmektedir (Thornley vd., 1965; Murray, 1992; White vd., 1999). Buna karşın bazı fosfolipid sentezi, translasyon ve transkripsiyon inhibitörlerine karşı duyarlı olduğu bilinmektedir (Hawiger ve Jeljaszewicz, 1967).

*D. radiodurans*’ın olağanüstü şartlara dayanıklılığından dolayı özellikle karşılaştırmalı metabolik çalışmalarında ve radyoaktif atıklar ile kontamine olmuş bölgelerin biyoremediasyonu konusunda popüleritesi gittikçe artmaktadır (White vd., 1999; Makarova vd., 2001).

### 2.1.1. Sistematikteki yeri

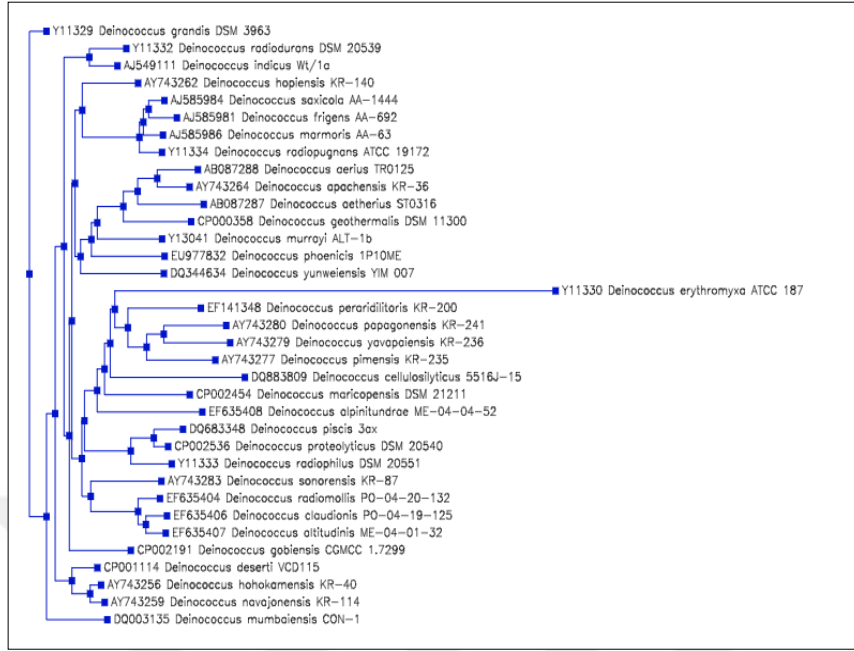
Deinococcus cinsinde 2016 itibariyle NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanına kayıtlı, isimlendirme yapılmış 60 tür bulunmaktadır (Tablo 2.1). *Deinococcus radiodurans* ilk olarak morfolojik ve fizyolojik yapısından dolayı *Micrococcus radiodurans* olarak adlandırıldı. Daha sonra moleküler sistematığın gelişmesiyle 1980’lerde yapılan farklı çalışmalarda 16S ve 5S rRNA dizi analizleri

sonucu bu canlının *Thermus* cinsiyle benzerliği olan farklı bir grup altında sınıflandırılması gerektiği belirlendi (Şekil 2.2) (Brooks ve Murray, 1981; Bakeeva vd., 1986; Hensel vd., 1986; Woese, 1987; Weisburg vd., 1989).

**Tablo 2.1.** *Deinococcus* cinsine dahil türler

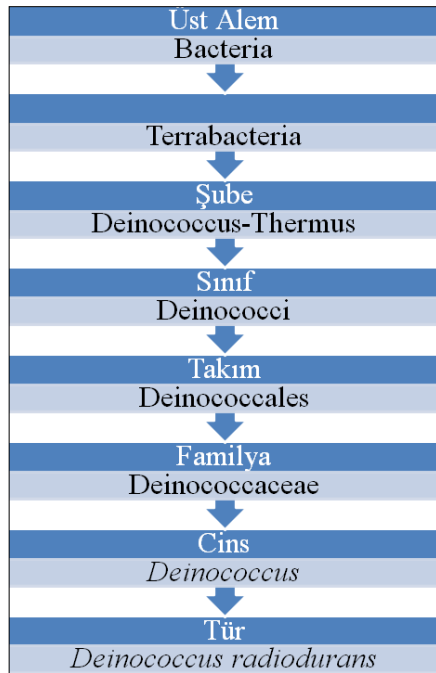
Türler		
<i>Deinococcus soli</i>	<i>Deinococcus depolymerans</i>	<i>Deinococcus phoenicis</i>
<i>Deinococcus actinosclerus</i>	<i>Deinococcus deserti</i>	<i>Deinococcus pimensis</i>
<i>Deinococcus aeria</i>	<i>Deinococcus enclensis</i>	<i>Deinococcus piscis</i>
<i>Deinococcus aerius</i>	<i>Deinococcus ficus</i>	<i>Deinococcus proteolyticus</i>
<i>Deinococcus aerolatus</i>	<i>Deinococcus frigens</i>	<i>Deinococcus puniceus</i>
<i>Deinococcus aerophilus</i>	<i>Deinococcus geothermalis</i>	<i>Deinococcus radiodurans</i>
<i>Deinococcus aetherius</i>	<i>Deinococcus gobiensis</i>	<i>Deinococcus radiomollis</i>
<i>Deinococcus alpinitundrae</i>	<i>Deinococcus grandis</i>	<i>Deinococcus radiophilus</i>
<i>Deinococcus altitudinis</i>	<i>Deinococcus hohokamensis</i>	<i>Deinococcus radiopugnans</i>
<i>Deinococcus antarcticus</i>	<i>Deinococcus hopiensis</i>	<i>Deinococcus radiotolerans</i>
<i>Deinococcus apachensis</i>	<i>Deinococcus humi</i>	<i>Deinococcus reticulitermitis</i>
<i>Deinococcus aquaticus</i>	<i>Deinococcus indicus</i>	<i>Deinococcus roseus</i>
<i>Deinococcus aquatilis</i>	<i>Deinococcus maricopensis</i>	<i>Deinococcus sahariensis</i>
<i>Deinococcus aquiradiocola</i>	<i>Deinococcus marmoris</i>	<i>Deinococcus saxicola</i>
<i>Deinococcus aquivivus</i>	<i>Deinococcus metalli</i>	<i>Deinococcus sonorensis</i>
<i>Deinococcus caeni</i>	<i>Deinococcus misasensis</i>	<i>Deinococcus swuensis</i>
<i>Deinococcus cellulosityticus</i>	<i>Deinococcus murrayi</i>	<i>Deinococcus wulumuqiensis</i>
<i>Deinococcus citri</i>	<i>Deinococcus navajonensis</i>	<i>Deinococcus xinjiangensis</i>
<i>Deinococcus claudionis</i>	<i>Deinococcus papagonensis</i>	<i>Deinococcus yavapaiensis</i>
<i>Deinococcus daejeonensis</i>	<i>Deinococcus peraridilitoris</i>	<i>Deinococcus yunweiensis</i>

*Deinococcus*, *Thermus* şubesi ile çok yakın özelliklere sahip olup her ikisinin de erken-evrimsel süreçte aynı atadan türedikleri düşünülmektedir (Gupta, 1998; Omelchenko vd., 2005). Filogenetik araştırmaların ardından bu benzerlikler iki şubenin birleştirilmesine sebep olmuştur. *D. radiodurans*, bu şubedeki *Thermus thermophilus* ile genomlarındaki GC içeriği, karatenoid bulundurmaları, oksijenli solunum yapmaları, katalaz pozitif olmaları ve her ikisinin de peptidoglikan tabakalarında A3  $\beta$ -murein kemo-tip bulunmasından dolayı sistematik olarak yakın ilişkili görülmüştür (Makarova vd., 2001; Omelchenko vd., 2005).



Şekil 2.2. 2016 itibariyle *Deinococcus* cinsine dahil 16S rRNA analizleri yapılmış türlerin filogenetik diyagramı (strainfo)

Eubacteria âlemi içerisinde bulunan *D. radiodurans*, günümüzde *Deinococcus-Thermus* şubesi içerisinde sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. *Deinococcus radiodurans*'ın sınıflandırılması

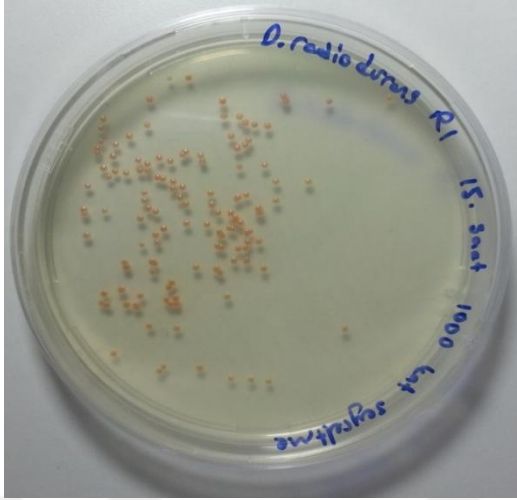


### 2.1.2. Habitatı ve morfolojisi

*D. radiodurans* dünyanın farklı bölgelerinde; topraktan, organik besin yönünden zengin; hayvan dışkılarından, işlenmiş et ürünlerinden, bunun yanı sıra besin yönünden fakir ve düşük nem seviyesine sahip; hava ile temas halindeki granit yüzeylerinden, Antarktik kuru vadilerden, kurak çöl topraklarından, ev tozundan, radyasyona maruz bırakılmış medikal aletlerden izole edilmiştir. *D. radiodurans* yüksek neme dayanıklı bir canlı değildir (Counsell ve Murray, 1986; Masters vd., 1991; Battista, 1997; White vd., 1999; Dose vd., 2001; Rainey vd., 2005).

*Deinococcus* cinsine mensup termofilik ve psikrofilik türlerde olmasına karşın *D. radiodurans*'ın uygun yaşam sıcaklığı 30°C olup mezofilik bir bakteridir. Canlının büyüme hızında 37°C'ye kadar herhangi bir problem gözlemlenmezken, 45°C'de büyümede ve çoğalmada durma daha yüksek sıcaklıklarda yaşama kabiliyetinin kaybolması söz konusu olmaktadır (Battista, 1997; Dose vd., 2001; Blasius vd., 2008).

*D. radiodurans* proteolitik bir bakteri olduğundan tipik olarak % 0,5 tripton, % 0,3 maya özütü ve % 0,1 glukoz içeren besiyerinde, oksijence zengin koşullarda yaklaşık iki saatte durağan faza geçebilmekte ve mililitrede yaklaşık  $1 \times 10^8$  CFU hücre yoğunluğuna ulaşabilmektedir. Karbon ve enerji kaynağı olarak öncelikle amino asitleri kullanan *D. radiodurans*, mangan ve nikotinik asit yönünden zengin besiyerlerinde daha iyi gelişim gösterebilmektedir (Earl, 2003; He, 2009).

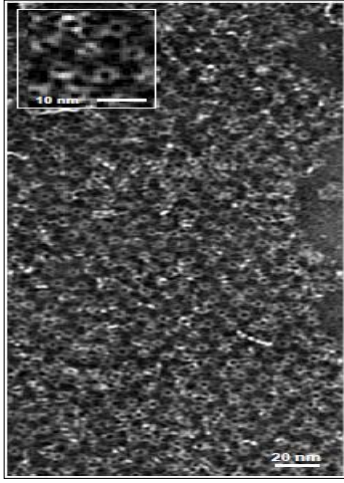


**Şekil 2.4.** *D. radiodurans* R1 kolonileri

*D. radiodurans* morfolojik olarak incelendiğinde bulunduğu faza ve besiyerine göre değişebilen 0,5-3,5  $\mu\text{m}$ 'lik  $\text{çap}$  aralığına sahip küresel bir yapıya sahiptir (Murray, 1992).

Gram pozitif olması rağmen gram negatif bakterilerin hücre duvarı içeriğine sahiptir. Kolonileri hücre duvarında bulunan karotenoidlerden dolayı kırmızı-turuncu renkli ve düz kenarlı yapıya sahiptir (Şekil 2.4). *D. radiodurans*; Eubacteria ve Arkealarda karakteristik olan protein ve glikoprotein yapılı parakristalin dizilenmesi içeren 50-60 nm'lik benzersiz bir hücre duvarı yapısına sahiptir (Messner ve Sleytr, 1991; Sleytr vd., 1993; Bahl vd., 1997; Tian ve Hua, 2010).

Alışılmadık yapısı sebebiyle çokça araştırılmış bu hekzagonal parakristalin yapı en dıştaki konumu sebebiyle S-tabaka (surface=yüzey) olarak adlandırılmıştır (Müller vd., 1996; Sleytr ve Sára, 1997; Pavkov-Keller vd., 2011).



**Şekil 2.5.** *D. radiodurans*'ın hücre duvarının elektron mikroskobu görüntüsü (Farcir vd., 2014)

Pigmentasyon özelliği bulunan diğer bakterilerde karotenoid sitozole dağılmış vaziyette bulunurken *D. radiodurans*'da S-tabakanın hegzagonal parakristalin yapısı içerisinde yerleşmiştir. S-tabaka'nın içeriğindeki polisakkaritler genel olarak glukoz ve galaktoz birimlerinden oluşurken mannoz ve ramnoz'da az miktarda tespit edilmiştir. Elektron mikroskobu incelemeleriyle tespit edilmiş altı katmandan oluşan bu hücre duvarı yapısında plazma zarının hemen üzerinde delikli bir morfolojiye sahip peptidoglikan yapılı Holey-Tabaka bulunmaktadır (Şekil 2.5). Ornitin amino asidi yönünden zengin Holey-Tabakanın Fizyolojik önemi tam olarak anlaşılammış fakat hücre bölünmesi esnasında septum oluşumuna dahil olduğu tespit edilmiştir (Thompson vd., 1980; Anderson ve Hansen, 1985; Carbonneau vd., 1989; Makarova vd., 2001; Tian ve Hua, 2010).

### 2.1.3. Genom yapısı

*D. radiodurans*'ın genomu Kasım 1999'da Genomik Araştırma Enstitüsü (TIGR) tarafından Science dergisinde yayınlandı. Claire M. Fraser ve arkadaşlarının çalışması ile *D. radiodurans*'ın genomunun; 2,65 Mbp, 0,412 Mbp büyüklüğünde olan iki kromozom, 0,18 Mb'lık bir mega plazmit ve 0,045 Mb boyutunda bir plazmitten oluştuğu belirlenmiştir (White vd., 1999).

Toplamı 3,28 Mbp olan genom içerisinde 3187 ORFs bulunmaktadır. Her hücrede bulunduğu faza bağlı olarak genomdan 1:1:1:1 oranında 4-10 kopya bulunmaktadır ve bunun çift DNA tamirinde önemli bir yolak olan homolog rekombinasyonda önemli olduğu düşünülmektedir (Tablo 2.2) (Hansen, 1978; Kitayama ve Matsuyama, 1981).

**Tablo 2.2.** *D. radiodurans*'ın genomunun bazı özellikleri (White vd., 1999)

	Uzunluk (bp)	Ortalama ORF uzunluğu (bp)	Protein kodlama bölgeleri	GC içeriği	Tekrar içeriği
Kromozom-1	2648638	913	% 90,8	% 67,0	% 1,8
Kromozom-2	412348	1044	% 93,5	% 66,7	% 1,4
Megaplazmit	177466	1100	% 90,4	% 63,2	% 9,2
Plazmit	45704	928	% 80,9	% 56,1	% 13,0
<b>Toplam</b>	<b>3284156</b>	<b>937</b>	<b>% 90,9</b>	<b>% 66,6</b>	<b>% 3,8</b>

*D. radiodurans* diğer tüm bakteri ve arkealarda olduğu gibi horizontal gen transferiyle birçok canlıdan farklı genler almıştır. Bu genlerden en dikkat çekenleri ökaryotlardan transfer olmuşlardır. Örneğin Topoizomeraz IB virüsler yoluyla ökaryotlardan *D. radiodurans*'a geçiş yapmış olduğu düşünülen bir gen dir. Ökaryotların dışında; LEA14-benzeri nem kaybı uyarıcı protein, RIO1 protein ailesinden Protein kinaz, Tungsten formilmetanofuran dehidrogenaz gibi arkealardan horizontal gen transferi ile edinildiği düşünülen proteinler bulunmaktadır. Ayrıca yüksek protein homolojilerinden dolayı; *Craterostigma plantagineum* bitkisinden ve *Polyporaceae* cinsi mantarlardan da horizontal gen transferiyle bazı genlerin aktarıldığı düşünülmektedir (Senkevich vd., 1997; Cheng vd., 1998; Green vd., 1998).

*D. radiodurans* genomunda fazlaca mobil genetik element bulundurması homolog rekombinasyonel tamir mekanizmasında önemli olduğu bulunmuştur. Mobil genetik element olarak; inteinler, insersiyon dizileri (IS), kodlanmayan küçük tekrarlar (SNRs) ve profajlar içermektedir (Makarova vd., 2001). Bu elementlerden protein yarıma (splicing) prosesini sağlayan iki dizi bulunmuştur. Bu diziler; ribonükleotid redüktazda ve SWI2/SNF2 ailesi ATPaz'ı P-loop motif ile Mg<sup>+2</sup>-bağlanma motifi arasında bulunmaktadır (Petrokovski, 1998).

*D. radiodurans* her 1000 gende 16,3 IS elementi içermektedir. Bu oran *E. coli*'de 8,4 olarak bulunmuştur (Tablo 2.3). Bu durum *D. radiodurans*'ın genomunun tekrar düzenlenme yeteneğinin daha fazla olmasıyla ilişkilendirilebilmektedir. *D. radiodurans*'da 52 IS tespit edilmiş, bunlardan en çok bulunanlar; 13 kopya ile IS4\_DR, 11 kopya ile IS2621\_DR ve 8 kopya ile IS200\_DR'dir (Makarova vd., 2001).

**Tablo 2.3.** *D. radiodurans* ve bazı bakterilerin genomlarındaki IS ve SNRs elementleri (White, O vd., 1999)

Türler	Genom Büyüküğü (Mb)	IS sayısı	SNRs sayısı
<i>D. radiodurans</i>	3,3	52	295
<i>B. subtilis</i>	4,2	0	36
<i>E. coli</i>	4,6	37	263
<i>M. tuberculosis</i>	4,4	32	252
<i>Synechocystis spp.</i>	3,6	-	118
<i>A. fulgidus</i>	2,2	13	-

*D. radiodurans*'ın genomunda 316 bölgede 60-215 bp arasında değişen büyüklüklerde SRE, SMR1, SMR2, SMR4, SMR5, SMR7, SMR8, SMR9 ve SMR10 olarak kodlanmış tekrar bölgeleri bulunmaktadır (White vd., 1999).

*D. radiodurans*'ın genomunda; kromozom-1'de (518499-547679 konumunda) ve diğeri kromozom-2'de (80554- 113236 konumunda) olmak üzere iki adet birbiriyle ilgisi olmayan profaj dizileri bulunmaktadır (White vd., 1999).

#### 2.1.4. Poliektremofilik özellikleri

Poliektremofilikler, birden fazla olağanüstü şartlara adapte olabilen, yaşamını sürdürebilen canlılardır (Madigan ve Martinko, 2005). *D. radiodurans* iyonize radyasyonun, düşük nem, UV-C ışınları, yüksek miktardaki reaktif oksijen türevleri ve mitomisin C gibi genotoksik ajanlara direnç gösterebilmesiyle poliektremofil grubu içindedir (Thornley vd., 1965; Murray, 1992).

#### 2.1.4.1. İyonize radyasyon

*D. radiodurans* iyonize radyasyona en dayanıklı aerob canlıdır. Canlılık faaliyetlerinden hiçbir şey kaybetmeden 5000 Gy (500000 rad) iyonize radyasyona dayanıklılık gösterebilmektedir. Bunun yanında eksponansiyel fazda 15000 Gy iyonize radyasyon uygulandığında popülasyonun % 37 yaşamını sürdürebilmektedir. 6,000 Gy dozda yaklaşık 200 çift zincir kırığı (DSBs), 3000'in üzerinde tek zincir kırığı ve 1000 baz hasarı oluşmaktadır. Bu hasarların direk ve dolaylı etkileri yaklaşık 3 saat içerisinde tamamen hatasız bir şekilde tamir edilmektedir (Burrell vd., 1971; Moseley ve Mattingly, 1971; Smith vd., 1991).

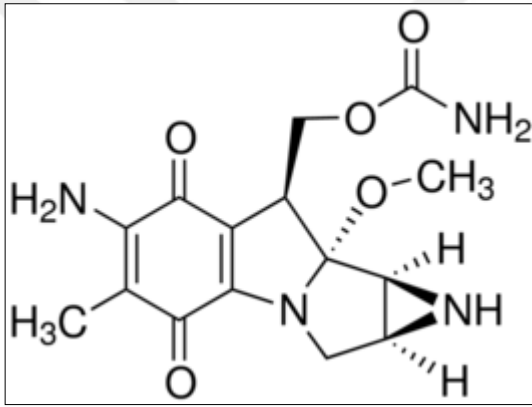
*E. coli* ile yapılan bir karşılaştırma çalışmasında her iki bakteriye de vejetatif formlarındayken  $D_{37}$  ( $D_{37}$ : popülasyonun %63'ünü öldüren doz miktarı) miktarlarında iyonize radyasyon verildiğinde; *D. radiodurans*'da lezyon aralıkları 10000 bp olmak üzere yaklaşık 275 çift zincir kırığı, *E. coli*'de ise 530000 bp aralıklarla 8-9 çift zincir kırığı olduğu gözlemlenmiştir. Bu deney ile *D. radiodurans*'ın iyonize radyasyona koruması olmadığı, oluşan hasarların tamirinde yetenekli olduğu gösterilmiştir (Cox ve Battista, 2005).

#### 2.1.4.2. UV-C ışınları

Ultraviyole ışınları dalga boylarına göre üç kategoriye ayrılmıştır. Dalga boyu büyüklüğü ile ışının enerjisi arasında ters bir orantı vardır. En küçük dalga boyu aralığına sahip UV-C (190-280nm) ışınları en yüksek iyonizan enerjiye sahip ve hücrelere en zararlı olan ultraviyole türüdür. *D. radiodurans* UV-C ışınlarına maruz kaldığında oluşan pirimidin hasarları (dimerleşme ve bipirimidin ürünleri), lipid peroksidasyonu, DNA-protein çapraz bağlanmaları ve çift DNA kırıklarını onarabilmektedir. *D. radiodurans* UV-C (254 nm) ışımına *E. coli*'den yaklaşık 23 kat daha dayanıklı olduğu bildirilmiştir. *E. coli*'nin UV-C ışınları için  $D_{10}$  değeri ~ 40  $J/m^2$  iken *D. radiodurans*'ın  $D_{10}$  değeri ~ 910  $J/m^2$  dir (Agapov ve Kulbachinskiy, 2015).

### 2.1.4.3. Mitomisin C

Mitomisin C; deoksiguanine tek grup bağlanması, aynı zincir içinde guanin-guanin dimerleşmesi, karşı zincirler arasında guanin-guanin dimerleşmesi gibi lezyonlara sebep olan bir ajandır (Şekil 2.6). Günümüzde kemoterapi ilacı olarak kullanılmakta olup yüksek etkili bir sitotoksindir (Weng vd., 2010; Xu vd., 2010). Transkripsiyona engel olan bu lezyonların ekzisyon tamirinde çift DNA kırıkları oluşabilmektedir (Kitayama vd., 1983).



Şekil 2.6. Mitomisin C'nin kimyasal yapısı

*D. radiodurans*, *E. coli* için öldürücü dozun yaklaşık dört katı konsantrasyona dayanıklıdır (Sweet ve Moseley, 1976). *D. radiodurans* 60 ng/ml mitomisin C içeren katı kültürde büyüebilmekte hatta 20 µg/ml konsantrasyonda 10 dakika boyunca popülasyonda azalma olmadan, 30 dk. sonrasında popülasyonun yalnızca % 10'u azalma ile DNA'sın da ki tüm lezyonları onarabilmektedir. 20 µg/ml mitomisin C içeren ortamda 10 dakika inkübasyonun ardından her genom kopyasında yaklaşık 100 DNA çapraz bağlanma lezyonu olduğu bildirilmiştir (Kitayama vd., 1983). *recA* ve *uvrA* mutantlarının mitomisin C duyarlı olduğu bulunarak; oluşan lezyonların hem baz-nükleotid ekzisyon tamir mekanizması hem de homolog rekombinasyon ile bir arada onarımına katıldığı düşünülmektedir (Moseley ve Evans, 1983; Gutman vd., 1994).

#### 2.1.4.4. Düşük nem

Düşük nem çoğu canlı için DNA hasarı, reaktif oksijen miktarında artış, protein denatürasyonu ve metabolik faaliyetlerin sonlanması anlamına gelmektedir. *D. radiodurans* uzun süreli kuruluğa oldukça dayanıklı olmasıyla da bilinmektedir. Bu kabiliyetin dünya'nın ilksel evrelerinde çöllerde uzun süren kuraklık sonucu fenotiplerine geçtiği düşünülmektedir. *D. radiodurans* 6 hafta boyunca % 5 relatif nemden daha düşük şartlarda inkübe edildiğinde yaşamsal faaliyetlerinin yaklaşık % 15'ini kaybettiği bildirilmiştir. Buna karşın *E. coli* % 5 relatif nem içeren ortamda 2 gün boyunca inkübe edildiğinde popülasyonunun % 0,1'inden daha azının canlılığını koruyabildiği gözlemlenmiştir (Asada vd., 1979; Dose vd., 1991; Dose vd., 1992; Slade ve Radman, 2011).

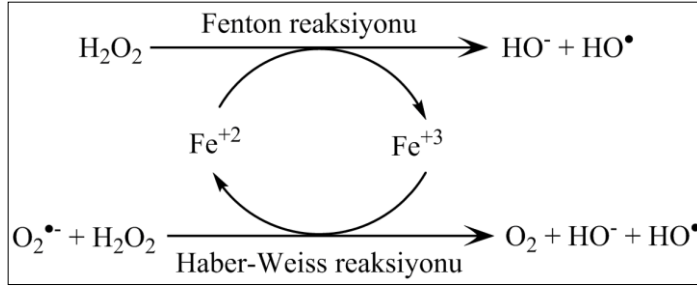
Bir başka çalışmada sporulasyon yeteneği olmayan bir bakteri için anormal olarak 6 yıl kurutulmuş halde bekletilen kültürün % 10'unun yaşama kabiliyetine sahip olduğu gözlemlenmiştir (Murray, 1992).

#### 2.1.4.5. Hidrojen peroksit

Suyun radyolizisi ile ortaya çıkan radikaller iyonize radyasyonun verdiği ikincil zararları da beraberinde getirmektedir. Bu radikallerin bir dizi reaksiyonla hidrojen peroksit oluşumunu indüklemesiyle karbohidratlar, lipidler, proteinler ve en önemlisi DNA önemli şekilde hasara uğramaktadır (Imlay, 2003; Halliwell ve Gutteridge, 2015).

$H_2O_2$ ,  $Fe^{+2}$  varlığında Fenton reaksiyonu ile Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidroksil radikalleri oluşumuna sebep olarak zararın artmasını olumsuz yönde beslemektedir (Şekil 2.7) (Imlay, 2006).





**Şekil 2.7.** Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları arasındaki bağlantı

*D. radiodurans* tüm oksidatif stres elemanlarına karşı oldukça dayanıklı bir metabolizmaya sahiptir (Agapov ve Kulbachinskiy, 2015).

Bir saat boyunca 40 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  bulunan bir besiyerinde inkübasyonu sonucu popülasyonun % 90 yaşamını sürdürebilmektedir. Şayet besiyerinde düşük dozlarla kademeli olarak başlatılarak  $\text{H}_2\text{O}_2$  konsantrasyonu arttırılırsa adaptasyon daha iyi olabilmektedir. Hatta kademeli arttırılmış  $\text{H}_2\text{O}_2$  uygulaması ile *D. radiodurans*'ın iyonize radyasyona verdiği onarım cevabı daha hızlı olmaktadır (Wang ve Schellhorn, 1995).

### 2.1.5. *D. radiodurans*'ın iyonize radyasyona direnç mekanizması

*D. radiodurans*, farklı koşullara alışılmadık dayanıklılık göstermesinden dolayı, mikrobiyolojide, moleküler biyolojide, biyokimyada ve hatta astronomi gibi diğer bilim dallarında güncelliğini koruyan önemli bir aerob bakteridir. Bilim insanları bu canlı üzerinde gözlemlerini yaptıklarında; karotenoid içermesi, Mn/Fe oranının değişkenliği, DNA tamir mekanizmasında bir farklılığın var olup olmaması, hücre duvarının alışılmadık yapıda ve içerikte olması gibi farklı tezler ile açıklamalar bulmaya çalışmışlardır. Yapılan bütün çalışmalara daha geniş bir perspektiften bakıldığında, rolü olduğu düşünülenlerin yanı sıra daha açıklanmayı bekleyen farklı özelliklerinde ilavesiyle bu dayanıklılığın çoklu-etki ile meydana geldiği söylemi ağır basmaktadır (Buob, 2009; Tian ve Hua, 2010).

*D. radiodurans* radyasyonun dolaylı ve direkt etkileri karşısında enzimatik ve enzimatik olmayan yollarla hasarın giderilmesinde çok etkili bir organizasyona sahiptir. Radyoaktivite, düşük nem ve bazı toksik maddelerin oluşturduğu karbohidrat, lipid ve protein hasarları tolere edilebilmekte, DNA hasarları için diğer canlılara benzer onarım mekanizmaları bulunmaktadır. Bunlar; nükleotid ekzision tamiri, baz ekzision tamiri, yanlış baz eşleşmesi tamiri ve homolog rekombinasyonel tamir mekanizmasıdır (Cox ve Battista, 2005; Blasius vd., 2008; Daly, 2009; Agapov ve Kulbachinskiy, 2015).

Diğer taraftan fotolizaz aktivitesi, deoksiadenozin metilaz (DAM-metilaz) ve SOS onarım mekanizmaları bulunmamaktadır (Makarova vd., 2001; Menecier vd., 2004)

Radyasyon ile oluşan çift DNA kırıkları, tek zincir kırıklarının onarımına göre daha karmaşık bir mekanizma ile gerçekleşmektedir. *D. radiodurans* iyonize radyasyon ile oluşan çift zincir kırıkların tamirinde sağlam genom kopyalarından kalıp olarak faydalanmaktadır (Slade vd., 2009; Sukhi vd., 2009).

Genom sekansının ardından yapılan çalışmalarda araştırmacılar yeni bir onarım geni için araştırmalarını yoğunlaştırsalar da birkaç bilinmeyen proteinin dışında diğer canlılardan farklı bir enzim veya proteine rastlamadılar. Günümüzdeki en yaygın kabule göre *D. radiodurans* diğer bakterilerde var olan enzim sistemlerini daha etkin kullanabilmektedir (Misra vd., 2013; Agapov ve Kulbachinskiy, 2015).

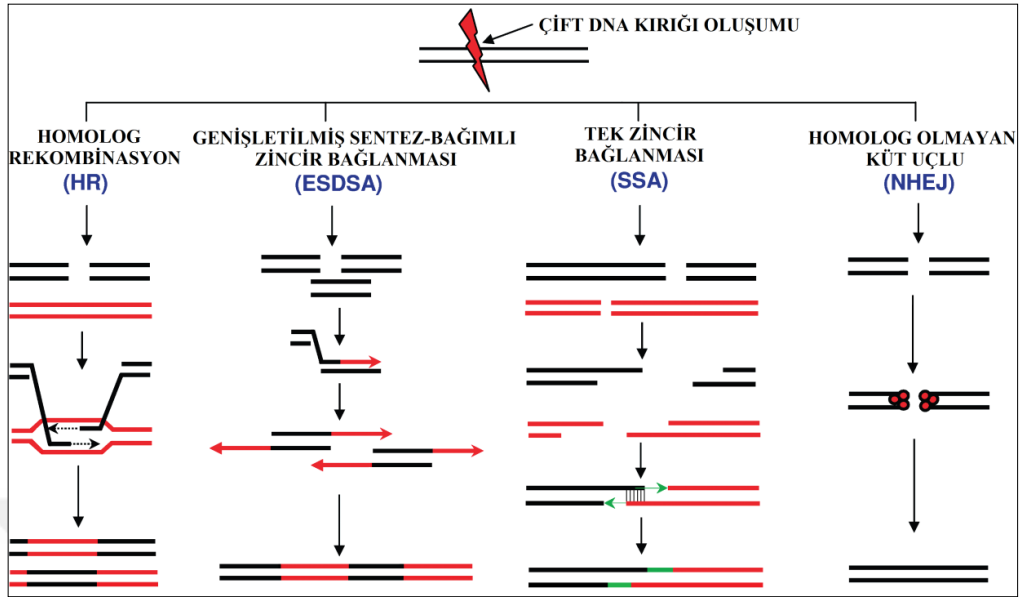
Yani kullanılan enzim sistemleri ve proteinler benzer olsalar da mekanizmalarının daha verimli olduğu düşünülmektedir. *D. radiodurans* onarım mekanizmalarının ve fizyolojik özelliklerinin benzer olduğu başka canlılar bulunmasına rağmen radyasyondan kaynaklanan DNA lezyonlarını 3 saat gibi kısa bir sürede tamamen onarabilmektedir. Onarımın hızlı olmasında kırık zincirlere kalıplık yapan genom kopya sayısının 8-10 olmasının avantajı olduğu bilinmektedir. Fakat *E. coli* gibi radyasyona dayanıklılığı bulunamayan bir canlının da genomunun çoklu-kopya içermesi bu özelliğinde tek başına bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

*D. radiodurans* genomunun halka benzeri sıkı bir paketlenme ile bir bölgede yoğunlaşması hasar görmüş zincirlerin hücrenin başka yerlerine difüze olup uzaklaşmadan tamirin rahat gerçekleşmesini sağlamaktadır. Bu durum kırık zincirlerin homolog kalıplarından uzaklaşmasını engelleyerek rekombinasyonel tamirin verimini arttırmaktadır. Genom yoğunlaşmasını sağlayan nükleoid-bağlayıcı histon-benzeri HU proteini mutantlarının yaşama kabiliyetlerini yitirdikleri bildirilmiştir (Nguyen vd., 2009).

İyonize radyasyona maruz kalmış *D. radiodurans* öncelikle hasar görmüş DNA parçaları hücre dışına atılmaktadır. Böylelikle kırık ve mutasyona uğramış DNA parçalarının tekrar genoma entegre olması engellenmiş olmaktadır (Battista, 1997).

Hasarlı DNA parçaları atıldıktan sonra DNA'nın çift zincir kırıklarının onarımında dört farklı mekanizma kullanılmaktadır. Bunlar; homolog rekombinasyon, tek zincir bağlanması ile onarım, homolog olmayan küt uçlu onarım ve Genişletilmiş sentez-bağımlı zincir bağlanması ile onarımdır (Şekil 2.8) (Battista, 1997; Melanie vd., 2008).

Bu tamir yollarından genişletilmiş sentez-bağımlı zincir bağlanması [Extended Synthesis-Dependent Strand Annealing (ESDSA)] ile onarımın *D. radiodurans*'ın dayanıklılığında önemli bir mekanizma olduğu gösterilmiştir. ESDSA mekanizmasında DNA polimeraz I ve III enzimleri ile Rekombinaz A (RecA) ve RadA proteinlerinin katılımlarıyla gerçekleşmektedir. Mekanizma; oluşan kırık üzerinde 3'hidroksil uçlarından RecJ enzimi ile parça çıkarma işlemi gerçekleşmektedir. Ardından RecA ve RadA katılımıyla açılan çentiklerin homolog kalıp ile komplementer zincire bağlanması ve sonunda DNA polimeraz I ve III aktivitesiyle hasarın onarımı gerçekleştirilmektedir (Zahradka vd., 2006; Buob, 2009; Slade vd., 2009).



Şekil 2.8. *D. radiodurans*'ın çift DNA kırıklarının onarım mekanizmaları (Featherstone ve Jackson, 1999; Zahradka vd., 2006; Bauermeister vd., 2009)

*D. radiodurans*, DNA hasar tamirinin yanı sıra radyasyonun dolaylı etkisi olan suyun radyolizisi ile meydana gelen; süperoksit, hidroksil ve hidrojen peroksit radikallerine karşı güçlü enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemlere sahiptir. Enzimatik antioksidanlardan; katalaz, süperoksit dismutaz ve peroksidaz enzimlerinin aktivitelerinin iyonize radyasyonun ardından belirgin şekilde yükseldiği bildirilmiştir (Markillie vd., 1999; Battista vd., 2000; Özbey, 2009).

Bunun yanı sıra DNA'yı sararak nükleoid konsantrasyonunu destekleyen ve  $Fe^{+2}$ 'yi şelatlayarak Fenton ve Haber-Weiss mekanizmasını inhibe eden, böylelikle DNA'yı oksidatif hasarlara karşı koruyan dimerik Dps (DNA protection during starvation proteins) proteini antioksidan olarak görev almaktadır (Almiron vd., 1992; Martinez ve Kolter, 1997; Grove ve Wilkinson, 2005).

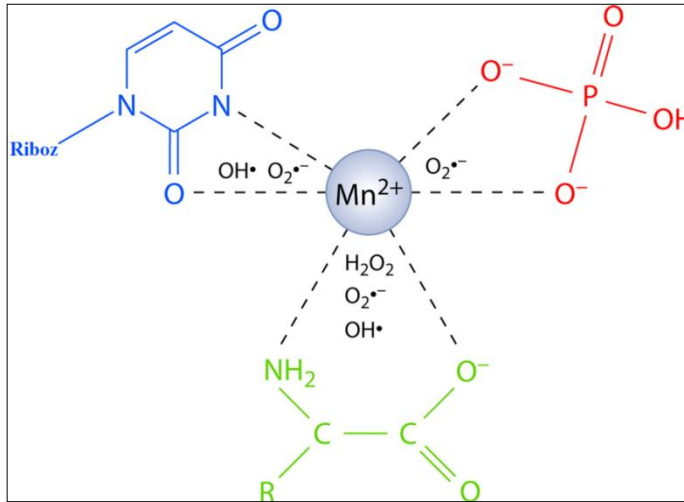
*D. radiodurans*'da S-tabakanın hegzagonal parakristalin yapısı içerisinde yerleşmiş bulunan karotenoid iyi bir antioksidan moleküldür. Özellikle singlet oksijen ( $^1O_2$ ) ve peroksil radikallerine karşı iyi bir antioksidan olan karotenoidler DNA'yı oksidasyondan, proteinleri karbonilasyondan ve membran lipidlerini peroksidasyondan korumaktadır (Tatsuzawa vd., 2000; Zhang ve Omaye, 2000; Tian ve Hua, 2010).

*D. radiodurans* genomunda karotenoid senteziyle ilgili 13 gen bulunmaktadır (Makarova vd., 2001). Deinoksantin karotenoid sentez mekanizmasının en önemli ürünüdür (Lemee vd., 1997). Deinoksantin, likopen ve karotenden daha güçlü bir hidrojen peroksit ve singlet oksijen söndürücüdür (Tian vd., 2009).

*In vitro* yapılan deneylerdeki bu üstün antioksidan özellik *in vivo* çalışmalarda karotenoidlerin iyonize radyasyonun dolaylı etkilerinin giderilmesinde tek başına etkili olmadığını göstermektedir (Zhang vd., 2007; Tian ve Hua, 2010).

Bir diğer önemli antioksidan ise *D. radiodurans*'ın sitozölünde bol miktarda bulunan  $Mn^{+2}$  iyonlarının (0,2 - 4 mM)  $H_2O_2$ , bikarbonat, amino asitler, nükleozitler ve fosfat gruplarıyla yaptıkları Mn-ortofosfat, Mn-pirofosfat ve Mn-polifosfat kompleksleridir (Şekil 2.9) (Berlett vd., 1990).

Mn-ortofosfat ve Mn-polifosfat kompleksleri süperoksitler üzerinde antioksidan etki gösterirken, Mn-pirofosfatlar sitokiyometrik oksidanlar üzerinde etkilidir (Daly vd., 2004; Daly vd., 2007; Daly vd., 2010).



Şekil 2.9. *D. radiodurans*'ta bulunan  $Mn^{+2}$  temelli antioksidan kompleksleri (Daly vd., 2010)

## 2.2. Radyoaktivite

Kâinatta tüm atomların kararlı hallerinde proton ve nötron sayıları kendilerine özgü şekliyle sabittir. Dışarıdan bir etki ile veya doğal olarak atom çekirdeğinde nötron sayısındaki artış kütle ve enerjide büyük bir kararsızlık oluşturmaktadır. Bu kararsızlık sonucu proton ve nötronları bir arada tutan enerji dalga veya parçacık şeklinde açığa çıkmaktadır. Radyasyon; parçacık radyasyonu (alfa, beta ve nötron), elektromanyetik radyasyon (gama-ışınları, radyo dalgaları, görünür ışık, X-ışınları), akustik radyasyon (ultra-ses dalgaları, ses dalgaları ve sismik dalgalar), kütle-çekimsel dalga radyasyonu olarak sınıflandırılmaktadır (Gopal, 1978).

Proton ve nötron sayıları değişen çekirdeklerden farklı kütle numaralı atomlar oluşmakta ayrıca; alfa, beta ve nötron gibi enerjileri değişken parçacıklar etrafa saçılım göstermektedirler. Bir parçacık şeklinde çevreye yayılan enerjiye radyoaktif enerji veya radyasyon, çekirdeği parçalanan maddelere ise radyoaktif madde adı verilmektedir. Parçacık şeklinde çevreye aktarılan radyasyon tipinin kütlesi ve enerjisi varken, dalga şeklinde ortaya çıkan radyasyonun kütlesi bulunmamaktadır (Ferradini ve Jay-Gerin, 2000; Zerquera vd., 2006; Ünlü, 2011).

Radyoaktivite, “iyonize” ve “iyonize olmayan” radyasyon şeklinde ikiye ayrılmaktadır. İyonize radyasyon, 10 eV'dan fazla yük içeren moleküllerdeki tüm kimyasal bağların yıkımına sebep olabilen radyasyon çeşididir. Parçacık ile yayılan iyonize radyasyonun dalga boyu oldukça küçüktür (Çelik, 2013).

Alfa ve beta radyasyon nesnenin hacim sınırında moleküller ile karşılaştığında kısa bir mesafede iyonizasyon gerçekleştirirler. Gama radyasyon is nesnelerin derinlerine kadar absorblanarak (Compton olayı) daha fazla molekülün iyonizasyonunu gerçekleştirir (Çelik, 2013).

Radyasyon canlıların hücrelerinden geçerken yolları üzerindeki tüm moleküler bağları yıkıma uğratarak ölümcül etkiler oluşturur. Şüphesiz bu etkinin ölümcül olabilmesinin en büyük nedeni DNA'ya verdiği hasardır.

Radyasyon dozu, birim kütle tarafından belirli bir sürede alınan radyasyon miktarı olarak tanımlanmaktadır. Canlı bir nesneye radyoaktif enerji aktarımı Uluslararası Birim Sistemine (SI) göre Gray ve rad birimleriyle ölçülmektedir. Gray (Gy), 1 kg canlı nesnenin enerjisini 1 joule arttırabilen radyasyon miktarına verilen birimdir ve 1Gray, 100 rad'a eşittir. Canlıların radyasyona olan direncini belirtmek için popülasyon üzerindeki yüzdece öldürme etkisi kullanılır. Popülasyon üzerine uygulanan etkenin öldürücü gücü birey sayısının yüzdesiyle belirlenir ve bu değer letal doz (LD) olarak sembolize edilir. Bu değer dışında hayatta kalan bireylerin yüzdesini ifade eden (D) sembolü radyasyonun canlılar üzerindeki letal etkisinin ölçütüdür (Rothschild ve Mancinelli, 2001; Cox ve Battista, 2005; Hussein, 2013).

### **2.2.1. İyonize olmayan radyasyon**

İyonize olmayan radyasyon, bir molekül veya atomdan elektron koparacak enerjiye sahip olmayan elektromanyetik radyasyon türüdür. Bu tanım genel olarak “enerjisi 10 eV'dan daha az radyasyon tipi” şeklinde de genişletilebilmektedir. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı'nın Mayıs, 2011 tarihinden yayınladığı makaleye göre iyonize olmayan radyasyon türlerinin insan sağlığı üzerine olumsuz etkilerinin olabileceği bildirilmiştir. Bu etkinin ısısal veya devamlı alınan enerji toplamının verdiği zarardan kaynaklandığı tahmin edilmektedir (Cancer, 2011).

İyonize olmayan radyasyon tipleri; yakın ultraviyole radyasyon, görünür ışık fotonları, kızılötesi ışık, mikrodalga, radyo dalgaları, çok düşük frekanslı spektrumlar, aşırı düşük frekanslı spektrumlar, ısısal radyasyon ve siyah cisim ışımasıdır (Ng, 2003; Leszczynski, 2013).

### 2.2.2. İyonize radyasyon

Karşılaştığı moleküllerden elektron kopararak onları iyonlaştırabilecek enerjiye sahip parçacık veya dalga formundaki radyasyon türlerine iyonize radyasyon denilmektedir (Gopal, 1978; Sherer vd., 2014). Parçacık halinde radyasyonlar genel olarak; alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gama ( $\gamma$ ), nötron ve X-ışınlarıdır. İyonize radyasyon bir molekülle etkileşime girdiğinde sahip olduğu enerjiye bağlı olarak; fotoelektrik, Compton ve çift oluşum olayları meydana gelmektedir. Fotoelektrik olayı 0,5 MeV'dan daha küçük enerjili parçacıkların karşılaştığı moleküllerdeki elektronları koparmasıyla meydana gelir. Compton olayı; enerjisi 0,5-10 MeV olan parçacık radyasyonunun atomların en dış yörüngesinde bulunan elektronları kopartarak kalan enerjisi ile farklı bir açıda yoluna devam etmesi olayıdır. Kopan elektrona Compton elektronu adı verilmektedir. Çift oluşumu olayı nadir görülmekle birlikte enerjisi en az 1,02 MeV olan fotonun karşılaştığı atomun, çekirdek enerji alanına yaklaşp orada bir pozitron-elektron çifti oluşturarak iyonizasyon oluşturması durumudur (Compton, 1923; L'Annunziata, 2012; Hüfner, 2013).

Radyoaktif bir atomda oluşan kararsızlık sonucu ortaya çıkan alfa ve beta ışınları genellikle enerjinin tamamını oluşturmaz. Arta kalan atom enerjisi dalga boyu 10 pikometreden az, enerjisi 100 keV'dan fazla ve frekansı 10 ekzahertz'den fazla olan gama ışını şeklinde yayılmaktadır. Elektrik ve manyetik alandan herhangi bir sapma olmaksızın geçen bu ışın, giricilik ve iyonlaştırma özellikleri bakımından alfa ve beta parçacıklarından daha kabiliyetlidir (Attix, 2008).

Çekirdek dışı tepkimeyle oluşan yüksüz bir iyonize radyasyon türü olan X-ışınları, atomların enerji ile uyarılmaları sonucu iç yörüngelerdeki elektronların kopması ile oluşur. Kopan elektronların yerine ondan daha yüksek enerjili elektronlar geçerek atom içinde bir enerji fazlalığı oluşturur. Bu enerji X-ışını şeklinde ortama yayılır. Röntgen ışını olarak da bilinen X-ışınları 0.01-10 nm dalga boyunda, 30 petahertz-30 ekzahertz frekans aralında ve enerjisi 100 eV'un üzerinde olan bir iyonize radyasyon çeşididir (Attwood, 2007; L'Annunziata, 2012).



Atom numarası büyük olan radyoaktif atomlarda görülen alfa radyasyon ( $\alpha$ ), pozitif yüklü, iki nötron ve iki protondan oluşmuş bir helyum ( ${}^4_2\text{He}^{+2}$ ) çekirdeğidir. Sahip oldukları yükten dolayı bir kâğıt ile durdurulabilen alfa parçacığı, 3-7 MeV enerjiye sahiptir (Weisstein, 2004; L'Annunziata, 2012).

Bir atom çekirdeğinin uyarılmasıyla oluşabilen bir diğer ışımaya türü de beta elektronlarıdır. Beta elektronları çekirdekdeki proton veya nötron fazlalığına göre farklı karakterde çıkabilen tek parçacıklı, alfa'dan daha girici ve hızlı partiküllerdir. Bir beta ışımalarının sebebi çekirdekdeki proton fazlalığı ise; pozitif yüklü pozitron bozunması ( $\beta^+$ ), nötron fazlalığı ise; negatif yüklü  $\beta^-$  bozunması ismi verilmektedir. Bu iyonize radyasyon türü ise birkaç milimetre olan alüminyum ile durdurulabilmektedir (Ng, 2003; L'Annunziata, 2012; Hüfner, 2013).

Nükleer füzyon veya fisyon olayları ile ortaya çıkan nötron radyasyonu; yüksüz ve gama ışımından daha yüksek girici kabiliyetlidir. Direkt olarak etkisi olmayan nötron ışınması, alfa, beta, gama ve X ışımalarına sebep olarak dolaylı iyonize radyasyondur. Kütlesi kısmen protona eşit olan nötron radyasyonu parafin, su ve kalınlığı yüksek beton tarafından durdurulabilmektedir (Crawford, 1982).

### 2.3. İyonize Radyasyonun Canlılar Üzerinde Etkisi

Herhangi bir hücre iyonize radyasyona maruz kaldığında bir femto saniye içerisinde gelişen iyonizasyon etkisi karşısında hiçbir koruyucu biyolojik aktivite gerçekleştiremez. İyonize radyasyonun hücre içerisinden geçiş hızı tipine bağlı olarak değişse de metabolik tepki hızından oldukça büyüktür. İyonize radyasyonun geçiş güzergâhında bulunan tüm moleküller radyolizise uğrayarak faaliyet gösteremeyecek kadar zarara uğrar. Bu moleküller hücre içindeki anorganik moleküller, organik moleküller ve daha büyük olan biyomoleküller olabilmektedir. Metabolizma, hasarın onarımında bu molekül gruplarına özgü biyolojik tepkiler oluşmaktadır (Hall ve Giaccia, 2006; Bentzen vd., 2007).

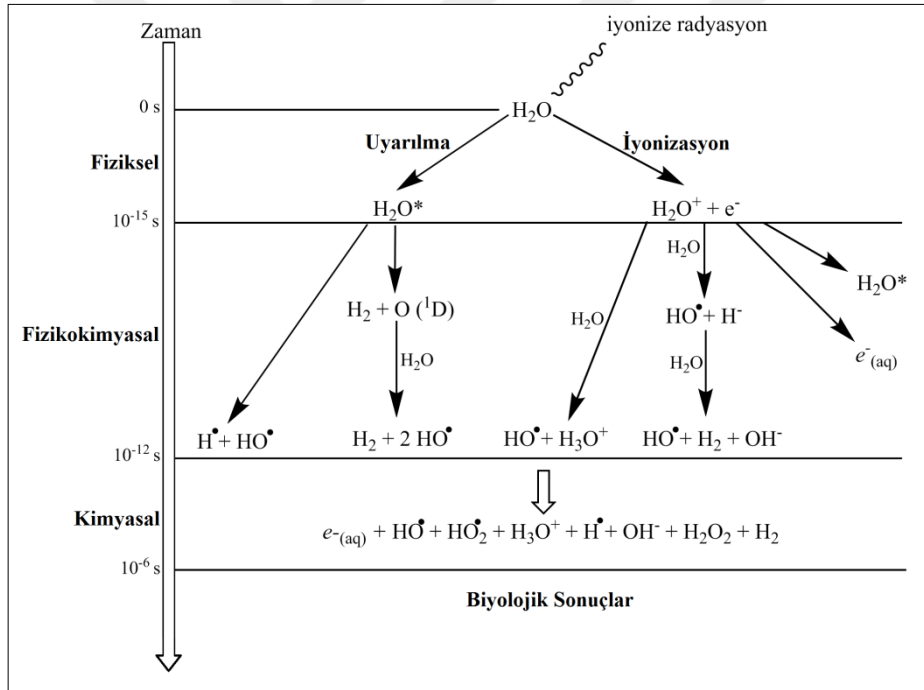
İyonize radyasyonun oluşturduğu hasarın onarımı canlı tipine göre değişmekle birlikte alınan doza bağlı olarak kimi zaman mümkün kimi zamanda imkânsız olabilmektedir (Leszczynski, 2013; Havaki vd., 2015).

Radyasyonun hücre üzerindeki etkisi; fiziksel, fizikokimyasal, kimyasal ve biyokimyasal olarak dört kademeli şekilde incelenebilmektedir (Şekil 2.10). Fiziksel etki iyonize radyasyonun  $0-10^{-15}$  saniyede hücrede karşılaştığı tüm moleküllerin iyonizasyonu ile son bulmaktadır. Hücreler yüzdeleri değişken olmakla birlikte büyük oranda su moleküllerinden oluşmuştur. Bu durumda maruz kalınan radyasyonun enerjisinin en fazla su moleküllerine aktarılması anlamına gelmektedir (Şekil 2.11) (Nias, 1998).

Fiziksel aşamada hücre içerisindeki su hidrolizlenir ( $H_2O^+$ ) ve uyarılarak ( $H_2O^*$ ) kararsız hale gelerek ortama elektron verir. Fizikokimyasal aşama  $10^{-15}-10^{-12}$ .saniye içerisinde gerçekleşir. Bu kademede; iyon-molekül reaksiyonları, disosiyatif gevşeme, otoiyonizasyon, elektronların alt-uyarılması ile ısı artışı ve difüzyon akım deliklerinin oluşması gibi birçok reaksiyon oluşmaktadır. Kimyasal aşamada gerçekleşen difüzyon ile tamamıyla homojen hale gelmeye başlayan kararsızlık etrafındaki tüm molekülleri etkileyerek zincirleme bir hasar oluşumuna sebep olmaktadır. Bu düzensiz uyarılmış moleküller ve serbest radikaller tüm biyokimyasal prosesin olumsuz yönde etkilenmesine neden olmaktadır. Yaklaşık olarak radyolizis sonrasında  $10^{-6}$  saniye içerisinde başlayan bu biyolojik etki yıllar içerisinde gelişen önemli problemler meydana getirebilmektedir. Ortaya çıkan tabloda biyomoleküllerde oluşan hasara direkt etki, hücre içerisinde suyun radyolizisi ile ortaya çıkan reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hasara ise dolaylı etki adı verilmektedir (Ferradini ve Jay-Gerin, 2000; Swiatla-Wojcik, 2008; Carlos Lara vd., 2015).

Hücreler uygulanan radyasyon dozunun öldürücü etkisi, dozlama periyodu ile ilişkilidir. Bir hücre için öldürücü doz farklı zaman aralıklarında, bölünerek verildiğinde aynı etkiyi göstermemektedir (Nias, 1998).

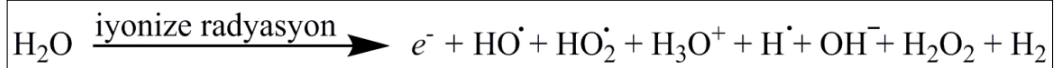
Öldürücü dozun altında bir miktarda alınan iyonize radyasyonun doğrudan ve dolaylı etkisi karşısında organizmaya göre değişiklik gösteren bir onarım toleransı bulunmaktadır. İyonize radyasyona maruz kalmış hücre; G<sub>1</sub> evresinden S evresine geçişte, S evresinden G<sub>2</sub> evresine geçişte ve G<sub>2</sub> evresinden M evresine geçişte genomundaki hata varlığını siklin-bağımlı kinazlar vasıtasıyla kontrol eder. Bu kontrolde şayet hasar tamir edilebilirse hücre döngüsü engellenir ve DNA onarımı gerçekleştirilir. Tamir edilemeyecek bir hasarda hücre otolize uğrar. Yüksek organizasyonlu canlılarda bazen DNA hasarı hatalı bir şekilde tamir edilir ve kanserleşme meydana gelebilir (Ravanat vd., 2001; Kreuzer, 2013; Jonas, 2014; Carlos Lara vd., 2015).



**Şekil 2.10.** Suyun radyolizisi ile meydana gelen reaksiyon kaskadı

Radyasyonun doğrudan etkisi karbohidratlar, lipidler veya proteinler üzerinde olduğunda, hücre bu sekonder gen ürünlerini tekrar üretebilmekte veya onarabilmektedir. Buna karşın DNA'da meydana gelen bir hasarın onarımı hücrenin faaliyetlerinin devamı için elzemdir (Leszczynski, 2013; Sherer vd., 2014).

Dolaylı veya doğrudan sebepler ile DNA'nın yapı bütünlüğünde oluşan hasarlar nükleotid sıralamalarında hatalara, baz kayıpları veya baz modifikasyonlarına hatta fosfat omurgasında oluşan çift DNA kırıklarına sebep olmaktadır. Bu hasarlar sonucu gen işlevini kaybetmekte veya transkripte edilen protein veya RNA'ların fonksiyonlarında anormallikler oluşmaktadır (McColl vd., 2015; Radiation, 2015).



**Şekil 2.11.** Suyun radyolizis reaksiyonu sonu meydana gelen ürünler

İyonize radyasyonun dolaylı etkisi oksijenin bol bulunduğu ortamda daha yıkıcı olmaktadır. Bunun sebebi suyun radyolizisi ile oluşan serbest radikaller ortamda bulunan oksijenle reaksiyona girerek bazı biyomoleküllerin peroksidasyonuna sebep olmasıdır. Hücrenin mitotik aktiviteye sahip canlılar bu aşamada radyasyona maruz kaldıklarında bu yeteneklerini kaybederek reproduktif ölüm adı verilen duruma girerler. Reproduktif ölüm tanımı, insan kanser hücrelerine uygulanan ışın tedavisi sonucu gerçekleşen durumda da kullanılmaktadır (Nias, 1998). Letal dozun tamamının bir defada alınmasıyla hücrelerin yaşamını yitirmesine ise mitotik olmayan ya da interfaz ölümü ismi verilmektedir. Dolayısıyla canlıların yüksek mitotik aktiviteye sahip olması yaşam şanslarını arttırmakta, diğer taraftan kanser tedavisinde bu artış insan sağlığı açısından bir dezavantaj oluşturmaktadır (Bentzen vd., 2007; Batar, 2013; Ahn vd., 2015).

İyonize radyasyonun oluşturduğu doğrudan ve dolaylı etkilere karşı hücre homeostasisini korumak veya organizasyonu korumak amacıyla; DNA hasar onarımı, pH regülasyonu, programlanmış hücre ölümü, oksidatif stres giderimi ve hücresel sinyalizasyon gibi birçok metabolik tepki ile karşılık vermektedir (Lewanski ve Gullick, 2001; Zhang vd., 2010).

### 2.3.1. Doğrudan etki

İyonize radyasyonun, biyomoleküller üzerindeki kimyasal bağların kopmasına yetecek enerjiyi doğrudan aktarmasıdır. Bu etki, hücrede bulunan karbohidratların, proteinlerin, nükleik asitlerin ve lipidlerin kovalent bağlarının yıkımı ile birçok fonksiyon kayıpları veya bozulmaları oluşmaktadır. Biyomoleküllerin polimerik yapılarında bozunmalar, istenmeyen izomerik formlara dönüşüm, konformasyonel kararsızlık ve istenmeyen bağ oluşumları gibi fonksiyon bozukluklarına sebep olan yüksek enerjili fotonlar özellikle DNA mutasyonlarına sebep olarak ani letal etki gösterebilir (Mukherjee vd., 2014). Bir femto saniyede gerçekleşen bu iyonizasyon hücrenin tolerasyon aralığının üzerinde olduğunda akut letal etki göstermektedir. Doğrudan etkide en kritik hasar DNA'da meydana gelmektedir. Doğrudan etkinin sebep olduğu DNA hasarı biyomoleküllerde meydana gelenin yaklaşık % 33'üne tekabül etmektedir (Hall ve Giaccia, 2006; Close vd., 2013; Feinendegen, 2014).

İyonize radyasyonun en çok zarar verdiği biyomoleküller hücrede en bol bulunan ve hacim olarak hücreye yayılma oranıyla doğru orantılıdır (Kempner, 2011). Dolayısıyla kalıtım materyalinin hacmini yüksek olduğu durumlarda iyonize radyasyonun DNA üzerindeki hasarı daha fazla olmaktadır.

Karbohidratlar, iyonize radyasyon ile karbon iskeletindeki kırılmalar sonucu daha küçük çeşitlerine parçalanabilmektedirler. Bu iyonizasyon ile hücre için tehlikeli keton ve aldehitler meydana geldiği gibi arabinoz veya ksiloz gibi ürünler ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca iyonize radyasyon sonucu parçalanmış karbohidratlardan (L) formunda oluşan bazı bileşikler mutajenik ve sitotoksik etkileriyle metabolizmayı tümüyle inhibe edebilmektedir (Wolfrom vd., 1959).

İyonize radyasyon suda çözünmüş ve liyofilize haldeki proteinlerle etkileştiğinde, çözünürlükte düşüş, agregasyon ve fragmentasyon meydana gelmektedir. Bu etki DNA'nın hasar durumuna göre geri dönüşümü olabilmektedir (Bowes ve Moss, 1962; De Loecker vd., 1975; Michnik vd., 2013).

Lipid türevlerinin iyonize radyasyona doğrudan etkisi ile reaktif aldehit türevleri oluşumu, izomerizasyon ve degradasyon ürünlerinin istenmeyen biçimde diğer biyomoleküller ile konjugasyonu meydana gelmektedir. Ayrıca membran lipitlerinin doğrudan iyonize olmasıyla hücresel bütünlüğün bozulması ve membran geçirgenliğinin değişimi gibi hasarlarda oluşabilmektedir (Afify vd., 2013; Reisz vd., 2014).

### 2.3.2. Dolaylı etki

İyonize radyasyonun aktardığı enerjinin molekülleri yüksek elektrofilik özellikte eşleşmemiş elektron çifti içeren reaktif türlerine dönüştürmesi durumu ile oluşan hasar etkisine dolaylı etki denir. İyonize radyasyonun ölümcül etkisinin % 67'si dolaylı etki ile oluşmaktadır (Nias, 1998).

Hücrede en çok bulunan su bu etkinin oluşumunda en büyük pay sahibidir. Radyoaktif enerjinin su tarafından absorblanmasıyla radyolizis gerçekleşir. Su molekülleri radyoaktif enerjiyi emerek en dış yörüngesinde eşleşmemiş elektronları bulunan radikallere parçalanır (Carlos Lara vd., 2015).

Serbest radikaller en dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektron bulunduran yüksüz ve reaktif serbest atom veya moleküllerdir. İyonize ışınların enerjisi su tarafından emildiğinde su molekülünden elektron kopararak onu pozitif yüklü hale getirir. Bu elektron bir başka su molekülüne rastladığında onu negatif yükler. Pozitif ve negatif yüklü su molekülleri reaksiyonu sonucu ortaya  $H^{\bullet}$  ve  $OH^{\bullet}$  çıkar (Ravanat vd., 2001; Havaki vd., 2015).

Bu reaksiyonlar özellikle oksijenin bol bulunduğu şartlarda daha fazla gelişir. Bu bağlamda oksijenli solunum yapan canlıların anaerobiklere göre daha dezavantajının olduğunu söylemek mümkündür (Slade ve Radman, 2011; Elçi, 2013).

Serbest radikallerin oksijen ile tepkimesi sonucu hücrede toksik olan reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. Uyarılmamış bir oksijenin valans yörüngesinde iki eşleşmemiş elektron bulunur. Bu elektronlardan her seferinde birisi reaktif iken uyarılma durumunda yörünge değişimi ve tekil oksijen oluşumu meydana gelir. Tekil oksijen türleri dengeli konsantrasyonlarda metabolizmada hücrel iletişiminde ve ara metabolit olarak işlev görse de iyonize radyasyon etkisiyle miktarındaki artış toksik etkiye sebebiyet vermektedir (Ng, 2003; Nelson ve Cox, 2013; Reisz vd., 2014; Cadet vd., 2015).

Serbest radikal artışı  $^1\text{O}_2$  (singlet oksijen),  $\cdot\text{OH}$  (hidroksil),  $\text{O}_2^-$  (süperoksit),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (hidrojen peroksit),  $\text{HOCl}$  (hipokloröz asit),  $\text{ROO}\cdot$  (peroksil) ve  $\text{RO}\cdot$  (alkoksil) gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Bu serbest radikallerin metabolizma içine girişim kapasitesi yüksektir. DNA'da çift veya tek zincir kırıklarına, lipid peroksidasyonuna ve protein (özellikle enzimler üzerinde) oksidasyonuna sebep olan bu etkenler hücrelerde özelleşmiş enzimatik veya enzimatik olmayan sistemler ile belirli tolerans düzeylerinde engellenirler (Apel ve Hirt, 2004; Weidinger ve Kozlov, 2015).

Serbest radikallerin hücrede serbest olarak bulunan veya yapıya katılmış karbohidratlar üzerinde oksidatif etkileri bulunmaktadır. Karbohidratların oksidasyonu sonucu oluşan  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve peroksitler metabolizmaya genel olarak zarar verirken, aldehit türevleri ise nükleik asitler ve proteinlerle kovalent bağlanarak fonksiyon eksilmelerine veya tümüyle kaybolmasına sebep olmaktadır. Özellikle oluşan okzaloaldehit türevleri oksijen varlığında hücre bölünmesini inhibe etmektedir. Bu etki sebebiyle karbohidratlar üzerindeki iyonize radyasyonun dolaylı etkileri hücrel yaşlanmaya ve kanserleşmeye neden olabilmektedir (Riley, 1994; Özbey, 2009; Reisz vd., 2014; Weidinger ve Kozlov, 2015).

İyonize radyasyonun sebep olduğu reaktif oksijen türlerindeki artış lipidler üzerinden elektron kopararak peroksidasyona sebep olmaktadır. Özellikle hücre membranının ve organel zarlarının ana yapısını oluşturan çoklu doymamış yağ asitleri ihtiva eden fosfolipidlerin malonaldehit oluşumuna götüren serbest radikaller seçici geçirgenlik yapıyı bozmaktadır. Serbest radikaller ayrıca hücre zarında bulunan kolesterollerin oksidasyonuna sebep olarak membran rijitliğinde bozarak taşıma sistemleri, hücre sel tanıma ve mobilitede olumsuz etkiler oluşturmaktadır (Riley, 1994; Reisz vd., 2014).

Proteinler hücrede birçok önemli role sahip, hücre içi iyonik ve pH dengesine karşı hassas bir biyomoleküldür. Hücre sel yapıya katılan, kataliz mekanizmasının neredeyse tamamını oluşturan ve metabolik düzenleyiciler olan proteinler iyonize radyasyonun oluşturduğu artan serbest radikal ortamında çok kolay bir şekilde aktif formunu kaybederek önemli aksaklıklara sebep olmaktadır. Serbest radikallere doymamış yağ asitlerinden daha dayanıklı olan proteinlerin amino asit kompozisyonunda önemli bir etkendir. İçeriğinde kükürt ihtiva eden metiyonin ve sistein veya çift bağ içeren fenilalanin, tirozin, triptofan ve histidin gibi amino asitler bulunan proteinler reaktif oksijen türlerine karşı daha duyarlı olmaktadır (Riley, 1994; Apel ve Hirt, 2004; Weidinger ve Kozlov, 2015).

Özellikle düşük miktarlarda hidroksil ve alkoksil türleri proteinlerin kuaterner yapısını bozarken, metabolik süreç içerisindeki konsantrasyonlarda süperoksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri yüksek inhibisyona sahip değillerdir. Reaktif oksijen türleri proteinlerin fonksiyonelliği için elzem olan üç boyutlu yapısını amino asit rezidülerine oluşturdukları oksidatif baskı ile yok ederler. Bu durumda gerçekleşen reaksiyonlar sonucu keton aldehit ve karbonil bileşikleri oluşur (De Loecker vd., 1975; Kim ve Cox, 2002; Eggington vd., 2004).



Nükleik asit hasarları, hücrede herhangi bir zararlı etkenin öldürücü olmasında en önemli hedefdir. DNA hücrenin tüm bilgisinin bulunduğu nükleotid dizisi olup bu kaynağın hasara uğraması RNA'dan daha ölümcüldür. İyonize radyasyonun doğrudan verdiği hasarın yanı sıra oluşturduğu anormal elektron akışı sebebiyle DNA'nın yapı ve fonksiyonunda değişimler olabilmektedir. Bu değişiklikler canlıların tolerasyon özelliklerine bağlı tamir edilebilmektedir. Reaktif oksijen türlerinin artışına veya oluşturduğu DNA hasarlarına karşı mukavemetli olan hücreler metabolik düzenin geçici kaybolmasının ardından yaşamına öldürücü olmayan mutasyonlarla veya herhangi bir diziliş hatası olmaksızın devam edebilmektedirler (Kozmin vd., 2009; Close vd., 2013; Cadet vd., 2015).

İyonize radyasyonun sebep olduğu serbest radikaller ve artan reaktif oksijen türleri tek zincir üzerinde yahut her iki zincirde birden lezyonlara sebep olmaktadır. Genel olarak reaktif oksijen türleri; tek veya çift zincir kırıklarına, nükleobaz modifikasyonlarına, abazik bölgelere ve deoksiriboz şekerinde bozulmalara neden olabilmektedir. Bu etkilerin yanında DNA-Protein çapraz bağlanmalarına sebep olan reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu hasarlar canlılara göre farklılık arz eden mekanizmalar ile onarılmakta veya ölümlerle sonuçlanmaktadır (Nelson ve Cox, 2013; Havaki vd., 2015).

Nükleobazlar oksidatif etkenlerle seksenden fazla farklı tautomerik formlara dönüşebilmektedir. Bu durum zincirler arasında ki hidrojen bağının kopmasına veya zayıflamasına yol açarak transkripsiyonu ve hasarın tamirini zorlaştırmaktadır. Hücrelerin logaritmik fazda olması iyonize radyasyonun dolaylı ve doğrudan etkilerinin artmasına neden olmaktadır. Mitoz geçirmeyen hücrelerin daha dayanıklı olması DNA'nın yardımcı proteinlerle sıkıca paketlenmesinin oluşturduğu koruma ve iyonize radyasyonun doğrudan temas alanında bulunma ihtimalinin hacimsel olarak az olması şeklinde açıklanabilmektedir (Riley, 1994; Bjelland ve Seeberg, 2003; Ng, 2003; Weidinger ve Kozlov, 2015).

DNA'da en çok hasara sebep olan dolaylı iyonize radyasyon etkeni  $\cdot\text{OH}$ 'dir. DNA'nın çift zincirli yapısını oluşturan hidrojen bağlarının yıkılmasına neden olmaktadır. Özellikle nükleotidlerin deoksiribozun ve nükleobazların üzerindeki oksidatif etkileri dolayısıyla DNA'da lezyonlara sebebiyet vermektedir.  $\text{Cu}^{+2}$  iyonlarının en yoğun bulunduğu guanin ve sitozin nükleotidleri en çok oksidatif hasara maruz kalan dizilerdir (Kasai, 1997; Marnett, 2000; Cooke vd., 2003).

İyonize radyasyonun su molekülüne tesiriyle zincirleme reaksiyon kaskatlarını takiben oluşan bu dolaylı etkide en dikkat çeken suyun radyolizisinin hücre içi pH'ya etkisidir. Yapılan çalışmalar sonucu tam olarak anlaşılamamış bu durum iyonize radyasyonun canlılar için önemli dolaylı etkileri arasındadır (Ferradini ve Jay-Gerin, 2000; Swiatla-Wojcik, 2008; Le Caër, 2011). Nitekim hücre içi pH'sının değişmesi dolaylı olarak tüm enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonu olumsuz yönde etkileyerek oluşan hasarların tamirini güçleştirmektedir.

#### **2.4. Hücre İçi pH Dengesi**

Tüm canlılar için kendilerine özgü hücre içi pH'nın sabit tutulması elzemdir. Metabolik reaksiyonların tümü belirli pH'larda gerçekleşirken bu dengenin bozulması canlılığın kaybolmasına giden birçok olumsuz tabloyu tetikleyebilmektedir. Metabolizma hızında çok küçük pH değişimlerinde bile büyük değişimler meydana gelir. Bu durum sadece  $\text{H}^+$  iyonunun doğrudan katıldığı tepkimelerde değildir (Booth, 1985; Boron, 2004; Krulwich vd., 2011; Nelson ve Cox, 2013; Boron, 2015).

Hücre sel reaksiyonların katalizini sağlayan enzimlerin ve substratlarının özgül  $\text{pK}_a$  değerlerine sahip iyonlaşabilen grupları bulunmaktadır. Enzimlerin amino asitlerinin karboksil ve amino gruplarının iyonik durumu buldukları pH ile belirlenir. Bu iyonik durum enzimin aktif formunun oluşmasında en önemli etkindir (Booth, 1985; Boron, 2004; Krulwich vd., 2011).

Ayrıca hücresel faaliyetlerin devamı için gerekli olan enzimatik reaksiyonlarda substrat veya ürün olarak bulunan nükleik asitler, karbohidratlar ve lipidlerde pH değişiminden doğrudan etkilenmektedir (Nelson ve Cox, 2013; Boron, 2015).

Canlıların enerjilerinin temininde ve hücresel taşıma olaylarında da ortam  $H^+$  konsantrasyonunun etkisi bulunmaktadır. Oksijenli solunum yapan bakterilerin mezozomunda ve ökaryotik canlıların mitokondrilerinde bulunan elektron taşıma sistemi elemanları membranlar arasında bir  $H^+$  gradienti oluşturarak Adenozin trifosfat (ATP) üretmektedir. Böylelikle hücrelerin enerji ihtiyacı karşılanırken,  $H^+$  yardımcılığında simport ve antiport taşıma ile hücresel taşıma fonksiyonları gerçekleşmektedir (Booth, 1985; Boron, 2004; Krulwich vd., 2011; Nelson ve Cox, 2013; Boron, 2015).

#### **2.4.1. Proton hareket gücü**

Hücresel membranlarda porlardan geçebilecek kadar küçük moleküller kontrollü bir şekilde konsantrasyonun yüksek olduğu yerden az olduğu yere doğru geçiş yaparlar. Difüzyon denilen bu olay, eğer herhangi bir denetimli engelleme yok ise herhangi bir enerji harcanmadan gerçekleşmektedir. Şayet hücre biyoenerjetik olarak incelenirse bu olayın serbest halinden farklı olarak tersine de işlediği gözlemlenmektedir.

Kemiozmotik teoride mitokondri ve tilakoidlerin iç kısmından veya bir bakterinin sitozolünden dış kısma doğru  $H^+$  iyonları pompalanarak bir gradient oluşturulmakta sonrasında bu gradientten faydalanarak ATP-sentaz adenozin difosfat üzerine bir fosfat grubu aktarımıyla ATP sentezi gerçekleşmektedir.  $H^+$  iyonlarının zarlar arasındaki hareketinde; iyon konsantrasyon farkından oluşan difüzyon kuvveti ve iyonun elektriksel potansiyel farkından oluşan kuvveti etkindir. Özellikle monovalent katyonlar elektriksel potansiyeli azaltma eğiliminde davranış gösterirler. Membranlar arasında oluşan  $H^+$  konsantrasyon farkı ( $\Delta pH$ ) ve iyonik potansiyel farkı ( $\Delta \psi$ ) kuvvetlerinin birleşimi olan elektrokimyasal gradyan güce proton hareket gücü veya

proton itici güç adı verilir (PMF=proton motive force) (Booth, 1985; Boron, 2004; Baker-Austin ve Dopson, 2007; Krulwich vd., 2011; Boron, 2015).

Hücrelerde PMF bazı membran proteinlerinin katalizlediği redoks tepkimeleriyle oluşan Gibbs serbest enerjisi ile  $H^+$  iyonunun dışarı atılmasıyla meydana gelmektedir. Bu potansiyel enerjinin ATP-sentaz tarafından tekrar membran içerisine alınması belirli bir  $\Delta pH$  ve  $\Delta \psi$  ile meydana gelir ki bu PMF'un hesaplanmasıyla tespit edilebilir. ATP üretimi için gerekli olan  $\Delta \psi$ , yaklaşık  $-170$  mV civarında olup bu durumda hesaplanacak PMF değeri  $50$  kJoule/mol çıkmaktadır (Mitchell, 1961; Rottenberg, 1979; Kashket, 1985).

PMF değeri Gibbs serbest enerjisinden yola çıkılarak;  $PMF (mV) = \Delta \psi - (2,3.R.T) / (F.\Delta pH)$ , şeklinde formülize edilebilmektedir. Burada;  $\Delta pH = pH_{iç} - pH_{dış}$ , ve  $\Delta \psi = \psi_{iç} - \psi_{dış}$ , olmaktadır. Ayrıca, R; ideal gaz sabiti, T; mutlak sıcaklık, F ise Faraday sabitini ifade etmektedir (Rottenberg, 1979; Kashket, 1985; Slonczewski vd., 2009; Krulwich vd., 2011).

## 2.5. Bakterilerde pH Dengeleme Sistemleri

Bütün canlılar gibi bakteriler çeşitlerine göre, fiziksel ve kimyasal parametrelerin belirli aralıklarında yaşamlarını sürdürmektedirler. Bu parametrelerden olan hidrojen konsantrasyonu metabolik faaliyetlerin normal işleyişi için çok önem arz etmektedir. Bakteriler yaşadıkları pH aralığına göre; asidofilikler, alkalofilikler ve nötrofilikler olarak sınıflandırılmaktadır. Nötrofilikler yaklaşık pH'sı  $7,00$  olan ortamda, alkalofilikler  $8,50-11,00$  arasında ve asidofilikler ise pH'sı  $2,00$  ve altında olan şartlarda yaşamını sürdürebilmektedirler. Daha asidik ve alkalofilik ortamlarda yaşayabilen ekstrem asidofilikler pH'sı  $1,00$  ve ekstrem alkalofilik bakteriler pH'sı  $13,00$  olan ortamlara adapte olabilmıştır. Ekstrem asidofilikler sülfat anyonu bakımından zengin toprak, madenler ve jeotermal alanlardan izole edilmişlerdir (Rothschild ve Mancinelli, 2001; Casey vd., 2010; Nelson ve Cox, 2013).

Ekstrem alkalofilik bakteriler bazı böceklerin sindirim sisteminin son kısımlarındaki yüksek pH'lı bölgelerde, soda göllerinde, özellikle indigo boyalar ihtiva eden endüstriyel atıklarda, kentsel atık tesislerinde ve ekstrem jeokimyasal içeriğe sahip yüzey sularında yaşamlarını sürdürebilmektedirler (Rothschild ve Mancinelli, 2001; Casey vd., 2010; Nelson ve Cox, 2013).

Yüksek organizasyonlu ökaryotik canlılarda genel olarak hücre içi pH ( $pH_i$ ) yaklaşık 7,30 iken hücre dışı pH ( $pH_d$ ) 7,40 olarak sabit olduğu şartlarda yaşam devam etmektedir. Nötrofilik bakteriler ise  $pH_d$  yaklaşık olarak 5,50-9,00 olduğunda rahatlıkla büyüme ve çoğalma fonksiyonlarını yerine getirebilmektedirler ve  $pH_i$  genellikle 7,50-7,70 arasında dengelenmektedir. Bu  $pH_d$  değerlerinin dışında hücre türe göre farklılık arz eden tolerans aralıklarında asit ve alkali şoklarına karşı farklı stratejiler geliştirerek hayatta kalabilmeyi başarabilmektedirler. Nötrofilik bir bakteri optimum koşulların dışındaki tolerans aralığında asidik veya bazik bir şoka maruz kaldığında bazal metabolizma altında morfolojik değişimler ile hücresel taşıma faaliyetlerini sınırlandırarak belirli bir süre yaşayabilmektedirler (Padan vd., 2005; Slonczewski vd., 2009; Casey vd., 2010).

Bakteriler optimum yaşam koşullarına göre farklı pH'lara karşı direnç gösterebilirler de hemen hemen bütün homeostasis mekanizmaları aynıdır. Çok yüksek veya çok düşük pH'larda yaşayabilen ekstrem canlıların bu özellikleri var olan proteinlerin gen ifadelerindeki ve proteinlerin amino asit kompozisyonundaki farklılıklarla açıklanabilmektedir. Ekstrem pH'larda yaşayabilen canlıların proteinlerinin genel olarak karbohidratlar ve lipitlerle konjugelerinin çok görülmesi, aynı zamanda amino asit karakterlerinin nötrofiliklere nazaran daha asidik veya bazik karakterli olması dayanıklılıklarına açıklama getirebilmektedir (Rothschild ve Mancinelli, 2001; Krulwich vd., 2011).

### 2.5.1. Pasif sistemler

Pasif pH dengeleyici unsurlardan her ne kadar sitoplazmik pH ile korelatif bir değerde olmasa da bakterilerde hücre içi pH ( $pH_i$ )'nın dengelenmesinde aktif sistemlere yardımcı olan en önemli faktör tampon sistemlerdir. Sitoplazmada; proteinlerin yan grupları, serbest amino asitler, fosfat grupları ve bikarbonat iyonları tamponlamada görev alan önemli moleküllerdir. Özellikle hücrenin sitoplazmasında yoğun bir şekilde bulunan proteinlerin asidik ve bazik amino asit içerikleriyle tamponlamada etkin bir işlevi bulunmaktadır. Bakterilerin optimum hücre içi pH'sına uygun olarak proteinlerin amino asit kompozisyonu şekillenebilmektedir. Örneğin nötral pH aralığında yaşayan bir bakteri için proteinlerindeki histidin rezidüsü önemli bir tamponlama gücü oluşturmaktadır (Booth, 1985).

Bakterilerin yaşamı için uygun pH'larda işlevselliği olan proteinlere sahip olabilmesi gerekmektedir. Proteinlerin izoelektrik noktaları asidofiliklerde yüksek olurken alkalofiliklerde daha düşük olmaktadır. Özellikle membran proteinlerinin hücre dışına bakan kısımlarındaki amino asit rezidülerinin pK değerleri bakterilerin hangi pH değerinde yaşamaya elverişli oldukları hakkında fikir sahibi olmamızı sağlamaktadır. Asidofiliklerin ve alkalofiliklerin membran proteinlerindeki iyonlaşabilen rezidüler sayesinde hücre yüzeyinde pasif bir koruma oluşturduğu düşünülmektedir. Ayrıca membran lipidlerinin ve porinlerin hücre içine olabilecek proton kaçaklarını önlemede etkisi olduğu bilinmektedir (Kim vd., 2005; Hayes vd., 2006).

### 2.5.2. Aktif sistemler

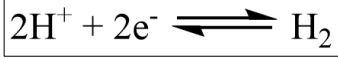
pH dengesinin sağlanmasında hücrelerde en önemli rolü aktif sistemler oynamaktadır.  $H^+$ 'nin hücre içine alımı ve hücre dışına atılmasında membran taşıma sistemlerinin ve bazı enzimlerin fonksiyonu metabolizmadaki en önemli mekanizmalardır (Casey vd., 2010; Krulwich vd., 2011).

Hücrede en önemli proton pompaları; redoks potansiyeline bağımlı (solunum zinciri elemanları), ışık varlığına bağımlı (bakteriorodopsin) ve bağ enerjisine bağımlı (ATPaz) pompa sistemleridir. Bunların dışında flajel gibi bazı yapılarda bol miktarda bulunan ATP sentaz da hareketin sağlanması anında aktif proton transferini sağlamaktadır. Bu sistemlerden hücre içi pH dengelenmesinde en çok etkin olanları solunum zincirinde bulunan redoks bağımlı proton pompalarının ATPaz ile ortak çalışması ve önemli bir membran kanalı olan katyon/proton değiştiricilerdir. Metabolizma içerisinde bazı enzimlerde  $[H^+]$  dengelenmesinde görev almaktadır. Hidrojenazlar, üreaz, karbonik anhidraz ve amino asit dekarboksilazlar gibi enzimler ile  $H^+$  harcayarak veya üreterek ortam pH'sını dengelemektedirler (Casey vd., 2010; Krulwich vd., 2011).

#### **2.5.2.1. Enzimatik**

Metabolizmada reaksiyonlar birbirleriyle bağlantılıdır. Bu bağlantılar sayesinde bir reaksiyonun ürünü bir başka reaksiyonun substratı olabilmektedir. Hücre içerisindeki bu döngü sayesinde oluşturulan mekanizma ile tüm yaşamsal faaliyetler gerçekleştirilmektedir. Hücre içerisindeki bazı reaksiyonlarda  $H^+$  harcanırken bazılarında ise üretilmektedir. Genel olarak bir denge içerisindeki bu reaksiyonların yönü fizyolojik duruma göre değişebilmektedir. Ortam pH'sının düştüğü bir durumda reaksiyon  $H^+$ 'yı harcama yönündeyken alkali koşulda  $H^+$  üretimi şeklinde gelişerek pH dengesi korunmaktadır (Booth, 1985; Boron, 2004).

Bakterilerde fizyolojik pH'nın dengelenmesinde rol alan önemli enzimler; hidrojenazlar, amino asit dekarboksilazlar, karbonik anhidraz ve üreazdır. Bunların dışında dehidrogenazlar, oksidazlar ve glutamat sentaz (NADPH) gibi enzimlerinde etkinliği bilinmektedir (Booth, 1985; Boron, 2004; Krulwich vd., 2011).



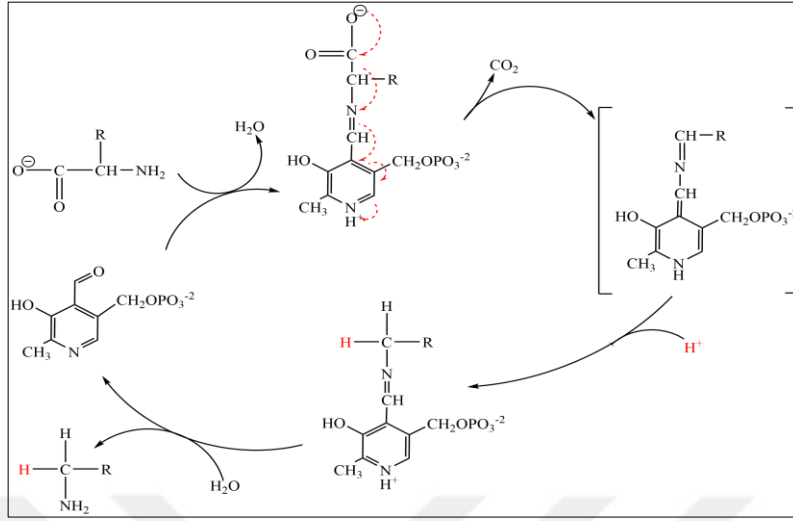
**Şekil 2.12.** Hidrojenaz enziminin katalizlediği reaksiyon

Hidrojenazlar aktif merkezinde nikel ve demir içeren geri dönüşümlü olarak hidrojen gazının oksidasyonunu sağlayan enzimdir (Şekil 2.12). Yapısında iki demir atomu olan [FeFe] hidrojenaz ve bir demir bir nikel olan [NiFe] hidrojenaz türleri bulunmaktadır. Reaksiyon yönü enzim ile etkileşimde olan bileşenlerin redoks potansiyeline bağlıdır (Hayes vd., 2006; De lacey vd., 2007).

Bir elektron alıcısı varlığında ortam pH'sını düşüren hidrojenazlar, elektron vericisinin olduğu şartlarda ortam pH'sını yükseltmektedir. Hücrede oksijen (O<sub>2</sub>), nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), demir (III) (Fe<sup>+2</sup>), mangan (Mn), sülfat (SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>) ve karbondioksit (CO<sub>2</sub>) varlığında reaksiyon H<sup>+</sup> yönüne kayarak pH'nın düşmesine sebep olmaktadır (Hayes vd., 2006; De lacey vd., 2007).

Amino asit dekarboksilaz amino asit üzerindeki karboksil grubunun karbondioksit şeklinde ayrılmasını katalizlemektedir. Piridoksal fosfatın koenzim olarak görev aldığı reaksiyonda biyojen aminler oluşmaktadır (Şekil 2.13). Dört aşamada gerçekleşen reaksiyonda amino grubuna bağlanan piridoksal fosfat ile oluşan Schiff bazından karbondioksit çıkışının ardından bir mol H<sup>+</sup> ile biyojen amin oluşmaktadır. Ortam pH'sının düştüğü şartlarda bakteri hücrelerinde arginin dekarboksilaz ve glutamat dekarboksilaz ifade düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (Booth, 1985; Krulwich vd., 2011).

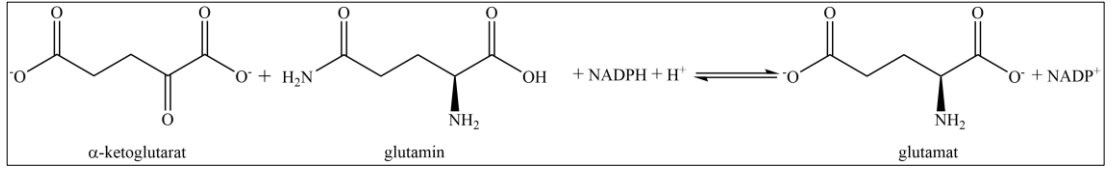




**Şekil 2.13.** Piridoksal fosfat bağımlı amino asit dekarboksilasyonu şeması

Glutamat sentaz kofaktor olarak FAD, FMN, Fe<sup>+3</sup>, kükürt ve kükürt-demir komplekslerini kullanarak bir mol L-glutamin üzerindeki  $\gamma$ -amino grubunun bir mol 2-okzoglutarata ( $\alpha$ -ketoglutarat) aktarımı ile iki mol L-glutamat oluşumunu katalizleyen enzimdir (Şekil 2.14). Oksidoredüktaz sınıfı enzim olan glutamat sentaz katalizinde gerçekleşen reaksiyonda elektron alıcısı NAD<sup>+</sup> veya NADP<sup>+</sup>, elektron vericisi ise amino grubudur (Padan vd., 2005; Baker-Austin ve Dopson, 2007; Nelson ve Cox, 2013).

Reaksiyonda ortamdan bir mol H<sup>+</sup> harcanır. Glutamat transaminasyon ve deaminasyon reaksiyonlarında amino grup taşıyıcısı olarak görev yapan önemli bir amino asit türevidir. Bu sebeple ortam pH'sının dengelenmesinde önemi olan bu enzim aynı zamanda hücredeki amino grup transferinde önemli olan bu amino asitin sentezlenmesini de sağlamaktadır. Reaksiyon incelendiğinde ortam pH'sının düşük olduğu şartlarda reaksiyon yönü hücre için en önemli tampon sistemini teşkil eden amino asit sentezine kaymaktadır. *E.coli* için pH'nın 6.4-9 olduğu aralıkta aktivite gösterebilen glutamat sentaz H<sup>+</sup> homeostasisi için kritik öneme sahiptir (Padan vd., 2005; Baker-Austin ve Dopson, 2007; Nelson ve Cox, 2013).



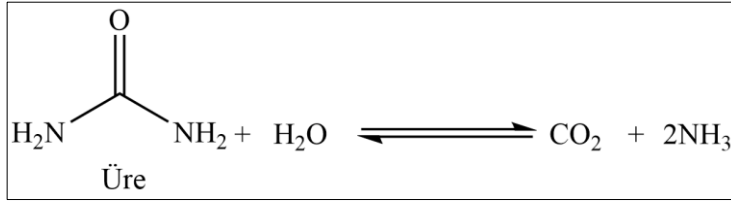
**Şekil 2.14.** Glutamat sentaz enziminin reaksiyon şeması

Karbonik anhidraz (CA) aktif merkezinde çinko atomu içeren hücrede  $\text{CO}_2$ 'in geri dönüşümlü hidrasyonunu katalizleyen bir metaloenzimdir (Şekil 2.15). Birçok bakteriden izole edilerek karakterizasyonu yapılmış karbonik anhidrazın sekanslarında homolojileri olmayan alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) ve gama ( $\gamma$ ) olarak enzim aileleri şeklinde sınıflandırılmıştır.  $\alpha$ -CA'da  $\text{Zn}^{+2}$ ; histidin 119, 96, 94 rezidüleri ve bir su molekülü ile koordinasyon halinde iken prokaryotlarda bol bulunan  $\beta$ -CA'da sistein 32 ve 90, histidin 87, aspartat 34 ve arginin 36 rezidüleri ile koordine edilmiştir (Smith ve Ferry, 2000). Karbonik anhidraz genel olarak solunumda,  $\text{CO}_2$  taşınmasında, siyanat metabolizmasında ve siyanobakterilerde fotosentezde rol almaktadır (Badger ve Price, 1994).



**Şekil 2.15.** Karbonik anhidraz enziminin reaksiyon şeması

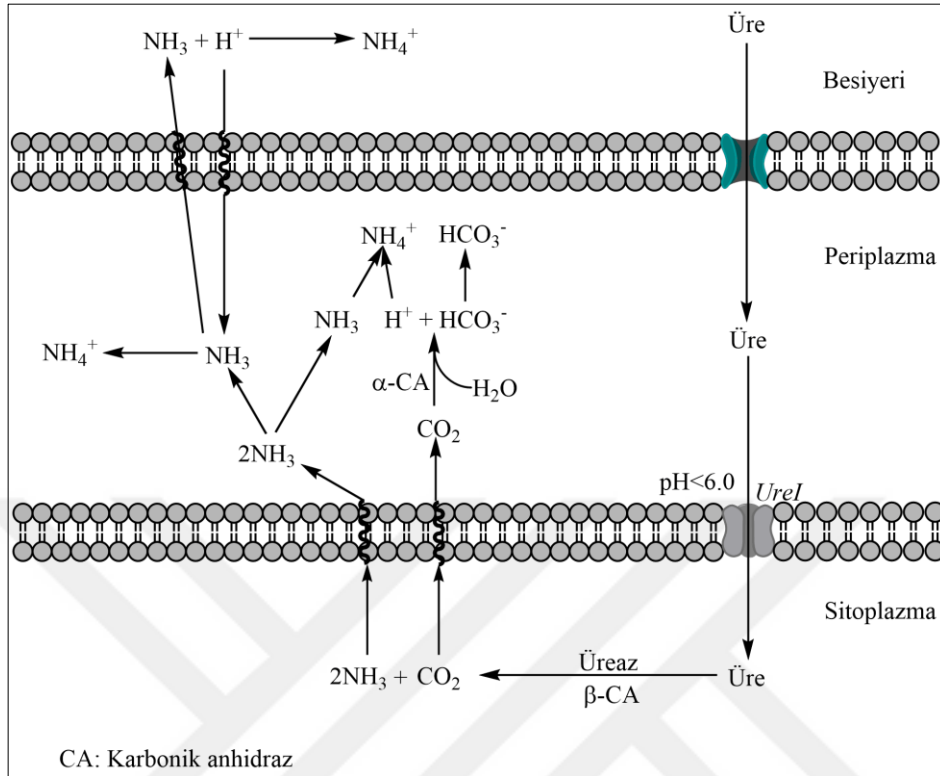
Üreaz  $\text{H}_2\text{O}$  varlığında ürenin geri dönüşümlü olarak hidrolizlenmesini sağlayarak  $\text{CO}_2$  ve  $\text{NH}_4$  oluşumunu katalizleyen aktif merkezinde  $\text{Ni}^{+2}$  içeren önemli bir pH regülasyon enzimidir. Reaksiyonun ilk aşamasında üre hidrolizlenerek  $\text{NH}_3$  (amonyak) ve  $\text{NH}_2\text{COOH}$  (karbamat) oluşmaktadır. Daha sonra  $\text{NH}_2\text{COOH}$  kendiliğinden  $\text{NH}_3$  ve  $\text{H}_2\text{CO}_3$  (karbonik asit)'e ayrılmaktadır. Üreazın bakterilerin periplazmik pH homeostasisindeki önemi *Helicobacter pylori* üzerinde yapılmış çalışmalar ile gösterilmiştir. Hidroksiüre ve üreye spesifik katalitik aktivitesi mevcut olan üreaz ökaryotik canlılarda yalnızca sitoplazmik pH dengesine katkıda bulunurken bakterilerde hem sitoplazmik hem de periplazmik pH dengesinde rolü bulunmaktadır (Krulwich vd., 2011; Fong vd., 2013).



**Şekil 2.16.** Üreaz enziminin reaksiyon şeması

Üreaz gen kümesi yedi farklı genden oluşmaktadır. Bu genlerden *ureA* ve *ureB*; üreazın apoenzim kısmını, *ureE*, *ureG*, *ureF* ve *ureH*; üreazın aktif merkezinde  $\text{Ni}^{+2}$ 'nin aktivite için konumlanmasını, *ureI*; hücre membranında pH bağımlı üre geçişini sağlayan bir kanal proteindir (Cussac vd., 1992).

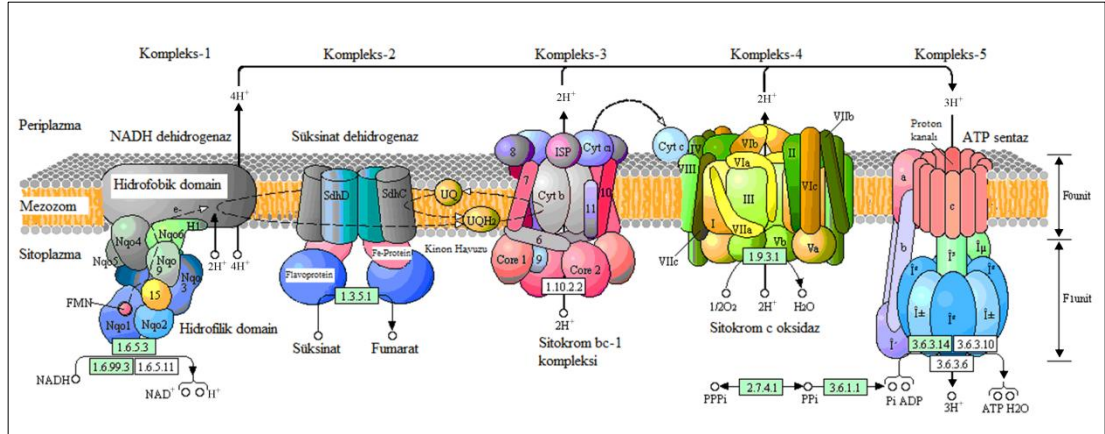
Asidik şartlarda ( $\text{pH} < 6,00$ ) *ureI* üre geçişini kolaylaştırırken hücre içinde üreazın aktivitesi ile  $\text{NH}_3$  ve  $\text{H}_2\text{CO}_3$  konsantrasyonunda artış olmaktadır. Bu durumda oluşan  $\text{NH}_3$  ortamdaki  $\text{H}^+$  iyonu alarak  $\text{NH}_4^+$  iyonuna dönüşerek fizyolojik pH'da tampon oluşturur (Şekil 2.16). Fakat bu tampon çok zayıf bir etkiye sahiptir. Çünkü pKa değeri 9,23 olması sebebiyle pH'nın genel olarak 7,4 olduğu şartlarda tamponlama gücü yoktur. Sitoplazmik  $\beta$ -karbonik anhidraz ortamda artan  $\text{H}_2\text{CO}_3$ 'i  $\text{CO}_2$ 'e dönüştürmesi ile  $\text{CO}_2$  periplazmik boşluğa geçerek hücre zarına bağlı  $\alpha$ -karbonik anhidraz tarafından  $\text{HCO}_3^-$  ve  $\text{H}^+$ ya dönüştürülür. Periplazmik boşlukta  $\alpha$ -karbonik anhidraz'ın oluşturduğu  $\text{H}^+$  iyonu sitoplazmik üreaz tarafından üretilip periplazmaya verilen  $\text{NH}_3$  ile nötralize edilir. Böylelikle periplazmik tamponda oluşan  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  dengesi pH'nın düşmesi sağlayarak dengelenmeyi sağlamaktadır (Şekil 2.17) (Krulwich vd., 2011).



Şekil 2.17. Karbonik anhidraz ve üreazın pH homeostasisindeki rolü

### 2.5.2.2. Membran kanalları ve elektron taşıma sistemi

Bakterilerin sitoplazmik pH'sının dengelenmesinde en önemli unsur iç membranda bulunan aktif proton pompalarıdır. Bu  $H^+$  aktarıcılar; solunumda görev alan elektron taşıma sisteminde bulunan ATPaz'lar ve diğer Elektron taşıma sistemi elemanları bakterilerin mezozom adı verilen iç membranın sitozöle doğru kıvrılmış kısımlarında bulunmaktadır. Mezozomda periplazmik bölgeye proton pompalayarak ATP sentezlenmesi sağlayan bu sistem  $H^+$  iyonu dengesinde de rol almaktadır (Şekil 2.18) (Booth, 1985; Kashket, 1985).



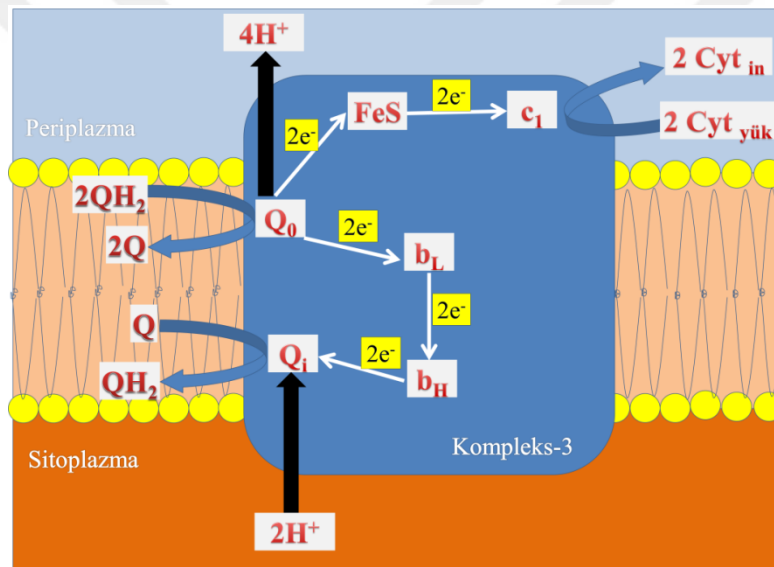
**Şekil 2.18.** Bakterilerde Elektron taşıma sistemine ait reaksiyon şeması (İnternet: KEGG, 2016)

Elektron taşıma sisteminde bulunan NADH dehidrogenaz (=NADH:ubikinon oksidoredüktaz) altı Fe-S protein kompleksi ve FMN koenzimliğinde flavoprotein içeren 14 alt birimden oluşan membrana entegre bir enzimdir. Mezozomda membrana gömülü hidrofobik kısmının konformasyonundan dolayı “L” şeklinde olan bu enzim elektron taşıma sisteminde kompleks-1 olarak adlandırılmıştır. Kompleks-1’de iki tepkime gerçekleşmektedir. Birinci tepkime NADH’dan bir  $H^-$  ve sitoplazmadan bir  $H^+$  iyonunu egzergonik olarak ubikinona aktarır. İkinci reaksiyon ise elektron aktarımından oluşan enerji ile sitoplazmadan periplazmaya dört  $H^+$  aktarımıdır. Bu aktivitesi ile tek başına sitoplazmik pH’yı yükseltirken ubikinol ( $QH_2$ ) kompleks-3’e difüze edilir (Nelson ve Cox, 2013; Keha ve Küfrevioğlu, 2015).

Kompleks-2’de FAD ve Fe-S yapılarının prostetik grup olarak görev aldığı dört alt birimden oluşan sitrik asit döngüsünde görevli tek membrana bağlı enzimdir. Bu enzimin aktivitesindeki artış oksidatif fosforilasyon kaskadının ATP üretimi yönünde olduğunun bir göstergesidir (Slonczewskivd., 2009; Nelson ve Cox, 2013).

Sitokrom  $bc_1$  veya ubikinon:sitokrom  $c$  oksidoredüktaz olarak adlandırılmış kompleks-3, kompleks-1’den difüze olan ubikinolden sitokrom  $c$ ’ye elektronların aktarımı ile protonların periplazmaya vektörel taşınımını gerçekleştirmektedir. Elektronların kompleks-3 içerisinden geçişiyle proton pompalanmasını açıklamak için Q-çevirimi modeli ileri sürülmüştür (Şekil 2.19) (Schäfer ve Penefsky, 2008).

Bu model; tek elektron taşıma kapasitesi olan sitokrom  $b_{562}$ ,  $b_{566}$ ,  $c_1$  ve  $c$  ile iki elektron taşıyan ubikinon arasındaki değişim sayesinde dört protonun periplazmaya pompalanmasını kapsamaktadır. Böylelikle sitokrom  $c$ 'ye aktarılan bir elektron çifti başına dört proton aktarılarak sitoplazma pH'sı yükselmektedir. Sitokrom  $c$  periplazmada çözünür halde bulunan hem prostetik grubu içeren bir proteindir. Hem grubu kompleks-3'den bir elektron alarak iki bakır atomu içeren merkeze sahip kompleks-4'e doğru hareket etmektedir (Schäfer ve Penefsky, 2008; Nelson ve Cox, 2013).

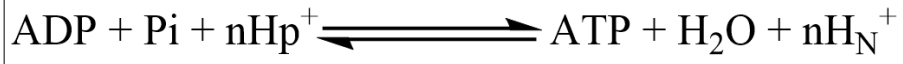


**Şekil 2.19.** Sitokrom  $bc_1$  kompleksinde Q-çevrimi modeli

Sitokrom  $c$  oksidaz olarak isimlendirilen kompleks-4 bakterilerde 3-4 alt birimden oluşan bir yapıya sahiptir. Sitokrom  $c$  üzerindeki elektronların moleküler oksijene ( $O_2$ ) aktarımını sağlayarak suya indirger. Hem elektronların aktarımını sağlayan bu kompleks aynı zamanda periplazmaya her bir elektronda iki proton pompalanmasını katalizlemektedir (Nelson ve Cox, 2013, Keha ve Küfrevioğlu, 2015).

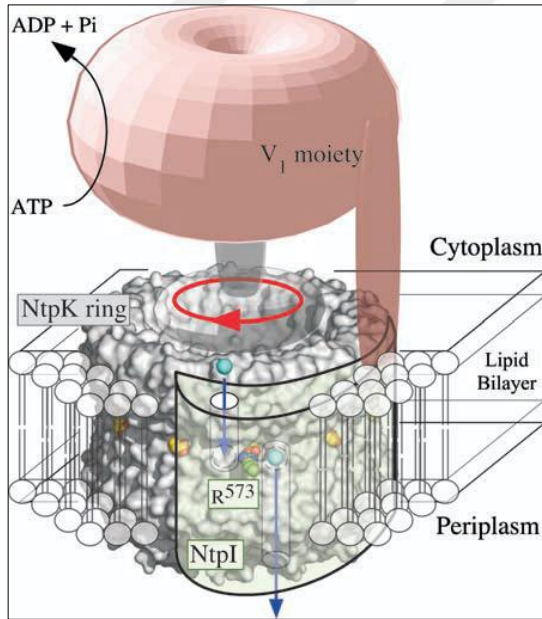
Periplazmada  $H^+$  konsantrasyonunda oluşan yükselme sonucu PMF doğru orantılı olarak artar. Bu kuvvet ile oluşan potansiyel ATP sentezinde kullanılmaktadır. Kemiozmotik teoriye göre periplazmada oluşan bu  $H^+$ 'lar ATP sentaz kompleksine ait proton kanalından geçerken oluşan hareket kuvvetiyle ADP fosforillenir.

Kemiozmotik teorinin mimarı Peter Mitchell bu olayı “kimyasal bir tepkime ve bir taşıma süreci” olarak tanımlamıştır (Şekil 2.20) (Mitchell, 1961).



**Şekil 2.20.** Kemiozmotik teoriye göre ATP sentezine ait reaksiyon eşitliği

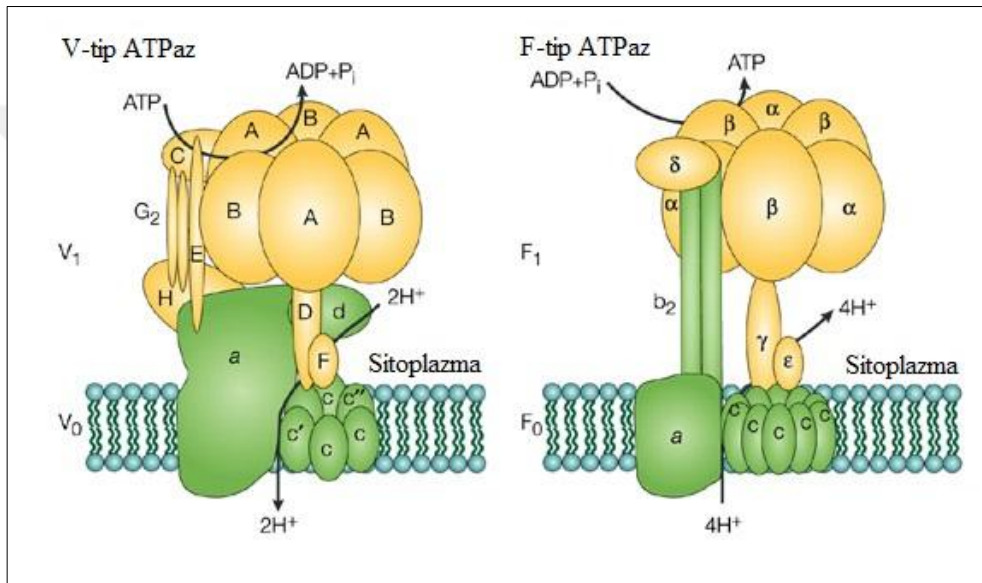
ATP sentazlar buldukları organizmalara, görevlerine ve yapılarına göre; V, F, A, P ve E tip olarak sınıflandırılırlar. F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP sentazlar (ATPaz) ökaryotik canlılarda ve prokaryotik canlılarda ATP sentezinde görev almaktadır. Ayrıca *E. coli* gibi bazı bakterilerde hücre içindeki fazla H<sup>+</sup> iyonunu ATP enerjisi harcayarak dışa doğru atma reaksiyonunu da katalizleyebilmektedirler (Nishi ve Forgac, 2002; Murata vd., 2005).



**Şekil 2.21.** V-tip ATPaz'ın yapısal şekli ve reaksiyon mekanizması

Fazla protonların sitoplazmadan uzaklaştırılmasını sağlamak için bazı arkealarda A<sub>0</sub>A<sub>1</sub> tip ATPaz'larda aynı işlevi yapabilmektedir. F-tip ATPaz'lar ile yapısal benzerlik gösteren V-tip (Vakuol tip) ATPaz'lar ökaryotik canlılarda endozom, lizozom ve sekresyon organelleri gibi yapıların membranlarında bulunan mekanizması tam açıklanamamış olmakla birlikte H<sup>+</sup> homeostasisini sağlayan bir

enzim kompleksidir (Şekil 2.21). Günümüzde V-tip ATPaz'ların *E.coli* ve *E. hirae* gibi bakterilerde de var olduğu bildirilmiştir. Bu ATPaz çeşidi bakterilerde mezozom yapılarında bulunmaktadır. F-tip ATPaz'larda olduğu gibi ATP sentezinde rol almazlar ve  $\text{Na}^+$  bağımlı aktiviteye sahiptirler. Hücre dışına  $\text{H}^+$  iyonu aktararak hücre içinde düşen pH'nın yükseltilerek dengelenmesini katalizlemektedirler (Şekil 2.22) (White vd., 1999; Nishi ve Forgac, 2002; Murata vd., 2005; Nelson ve Cox, 2013).

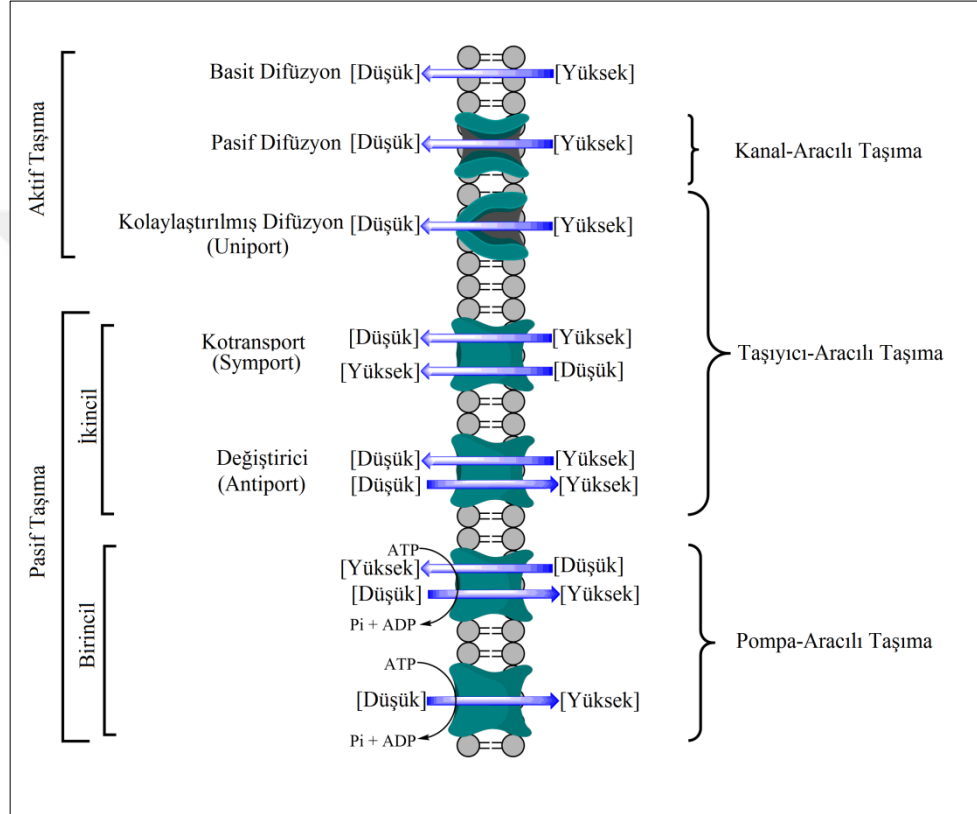


**Şekil 2.22.** V-tip ATPaz ve F-tip ATPaz'ın yapısı ve karşılaştırması (Nishi ve Forgac, 2002)

Hücre membranında bulunan bazı proteinler dış ortam ile sitoplazma arasındaki madde geçişlerini sağlamaktadır. Bu taşıyıcı kanalların bazıları enerji kullanarak madde geçişlerini sağlarken diğerleri ise difüzyon ile geçişleri düzenlemektedir. Membrandan enerji harcanarak gerçekleştirilen aktarıma aktif taşıma, enerji gereksinimi olmadan yapılan aktarıma pasif taşıma adı verilmektedir. Pasif taşıma içerisinde basit ve kolaylaştırılmış difüzyon şeklinde sınıflandırma yapmak mümkündür. Ayrıca aktif taşıma ise Membran kanalları işlev olarak taşınan maddenin tek çeşit ve tek yönlü olması durumu; uniport, taşınan maddelerinin aynı yönlü ve iki çeşit olması durumu; simport, taşınan maddelerin zıt yönlü ve iki çeşit olması durumu; antiport şeklinde kategorize edilebilmektedir. Sitoplazma pH'sının sabit kalmasını sağlayan en önemli ikici proton pompaları katyon/ $\text{H}^+$  değiştirici



membran kanal proteinleridir. pH homeostasisinde görev alan katyon/ $H^+$  değiştirici kanal proteinleri simport veya antiport şeklinde olabilmektedir (şekil 2.23). Bu kanal proteinleri içerisinde en etkili olanlar  $Na^+/H^+$  ve  $K^+/H^+$  değiştiricilerdir (Nishi ve Forgac, 2002; Krulwich vd., 2011).



**şekil 2.23.** Hücre membran taşıma sistemleri

*D. radiodurans*'ın çoklu altbirimli  $Na^+/H^+$  antiport kanal proteininin DR0880'den DR0886'ya kadar olanları bazı termofilikler ve alkali şartlarda yaşayabilen bakterilerde karakteristik olarak bulunmaktadır. Bu membran proteininin *D. radiodurans*'ın alkali şartlarda büyüebilmesine yardımcı olduğu düşünölmektedir (Hiramatsu vd., 1998; Makarova vd., 2001).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

Tez kapsamında yapılan radyasyon deneyi Türkiye Atom Enerjisi Kurumu, Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezinde gerçekleştirildi. Diğer tüm deneyler Erzincan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında ve Erzincan Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezinde gerçekleştirildi.

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Mikroorganizma

Tezde kullanılan *D. radiodurans* R1 (DSM 20539) suşu Leibniz-Institut DSMZ GmbH.'den liyofilize formda satın alınmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *D. radiodurans*'a ait Leibniz-Institut DSMZ GmbH.'den alınan belge

### 3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Real-time PCR cihazı	: Qiagen Rotor Gene 6flex
Gama ışını kaynağı	: Izotop Ob-Servo Ignis
PCR cihazı	: Bio-Rad C1000 Touch
Floresans mikroskobu	: Olympus BX63
Işık mikroskobu	: Leica DM 4000B
Çalkalamalı inkübatör (8-60 °C)	: Shellab SSI5
Soğutmalı santrifüj	: Hanil Smart R17
Spektrofotometre	: Perkin Elmer Lambda 35 UV-vis
pH metre	: Radiometer meterlab PHM 210
Elektroforez tankı	: Thermo Owl Easycast B2-BP
Vorteks	: Heidolph Reaxtop
Hassas terazi	: Shimadzu ATX 120
Otomatik pipet	: Eppendorf Research Plus
Magnetik karıştırıcı	: Heidolph MR Hei-Standart
Saf su cihazı	: Nüve
Kar makinesi	: Scotsman AF-20
Güç kaynağı	: Thermo EC 300 XL
Buzdolapları	: Arçelik
Derin dondurucu (-30 °C):	: Haier
Ultra-low dondurucu (-85 °C)	: Haier, New Brunswick U410
Mikrodalga fırın	: Arzum
Otoklav	: Sümer SM3
Jel görüntüleme cihazı	: Vilber Lourmat Quantum ST5
Ultrasonikatör VCX750	: Sonics Vibra Cell

### 3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

#### 3.1.3.1. Çözeltiler ve besiyerleri için kullanılan kimyasal maddeler

Çözeltilerin ve besiyerlerinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar Sigma-Aldrich, Oxoid ve Merck firmalarından tedarik edildi.

**TGYB (Tryptone Glucose Yeast extract Broth):** İçerik olarak; 10 g/L tripton ve 5 g/L maya özütü hazırlanacak miktara göre tartılarak sırayla saf su içerisinde çözüldürüldü. Otoklav ile sterilizasyonun (121 °C'de 20 dk.) ardından son konsantrasyon 5 g/L olacak şekilde glukoz saf su içerisinde hazırlandı ve 0,22 µm steril filtreden geçirilerek ilave edildi.

**TGYA (Tryptone Glucose Yeast extract Agar):** Gerekli hacimde hazırlanan TGYB besiyeri içerisine 15 g/L olacak şekilde agar ilave edildikten sonra otoklav ile sterilizasyonun ardından 9 cm'lik petrilere yaklaşık 12,5 ml olacak şekilde dağıtılarak hazırlandı.

**Stok çözeltisi:** Çözelti *D.radiodurans*'ın uzun süreli -80 °C'de stoklanması için kullanılmıştır. Çözelti için 22,5 ml ultra saf su içerisine 1 M MgSO<sub>4</sub>'den 10 ml, 1M Tris'den 2,5 ml ve 65 ml %99'luk gliserol ilave edilerek homojen oluncaya dek karıştırıldı. Aseptik koşullarda 0,22 µm'lik steril filtreden geçirilerek karyotüplere 0,5 ml paylaştırıldı. Stoklama işleminde OD<sub>600</sub>= ~0,6 hücre kültüründen 0,5 ml bu steril stok solüsyonuna aseptik koşullarda aktarılarak homojen olana kadar pipetaj yapıldı ve -80 °C'de 6 aya kadar muhafaza edildi.

**1x TBE (Tris-Borat-EDTA) tamponu:** Stok TBE tamponu 10 kat konsantre (10x) olarak hazırlanmıştır. 10x TBE için 108 gr Tris, 55 gr borik asit 750 ml distile suda çözülerek saf HCL ile pH= 8,0'a titre edildikten sonra, 4,65 gr EDTA eklendi ve toplam hacim distile su ile 1 lt'ye tamamlandı.

**Etidyum bromür çözeltisi:** Mutajen etkisinden dolayı hazırlanırken eldiven ile çeker ocakta hazırlandı. 10 mg etidyum bromür eppendorf tüp içerisinde dikkatlice tartıldıktan sonra üzerine 1 ml ultra saf su ilave edilerek homojen oluncaya kadar karıştırıldı. Karanlık ortamda oda sıcaklığında muhafaza edildi.

**1M MgSO<sub>4</sub>:** 50 ml 1M MgSO<sub>4</sub> çözeltisi için 12,324 gr MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O alındı ve 30 ml ultra saf suda çözüldü. Hacim balonjojede 50 ml'ye tamamlandı.

**1M Glukoz:** 50 ml 1 M glukoz çözeltisi hazırlamak için 9,008 gr saf glukoz alındı ve ultra saf suda çözüldü. Hacim balonjojede 50 ml'ye tamamlandı.

**5x Agaroz elektroforezi yükleme çözeltisi:** saf su içerisinde % 0,25 bromfenol mavisi, % 0,25 ksilen siyanol ve % 40 oranında sükröz ilave edilerek homojen olana kadar karıştırıldı. Kullanıma kadar +4 °C'de stoklanmıştır.

**DNA saflaştırma işleminde kullanılan liziz tamponu:** 80 ml ultra saf suya 0,302 g tris tartılarak koyuldu ve tamamen çözünmesi beklendi. Daha sonra 0,093 g EDTA-Na<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O ilave edilerek pH'sı 8,0'e ayarlandı. Stok olarak kullanılacak şekliyle son olarak % 1 Triton X-100 eklenerek yavaşça homojen oluncaya kadar karıştırılarak +4 °C'de muhafaza edildi. Deney anında kullanılacak hacme göre 20 mg/ml olacak şekilde ayarlanarak lizozim ilave edilerek kullanıldı.

### 3.1.3.2. RNA izolasyonunda kullanılan kimyasal maddeler

*D. radiodurans* R1'in ön homojenizasyonu için Sigma-Aldrich firmasından tedarik edilen lizozim (Ürün kodu: 62971) ve Qiagen firmasından tedarik edilen Proteinaz K (Ürün kodu: 19133) kullanılmıştır. *D. radiodurans* R1'in mRNA kompozisyonunun stabilizasyonu için Qiagen RNAprotect Bacteria Reagent (Ürün kodu: 76506), RNA saflaştırma için Qiagen RNeasy Mini Kit® (Ürün kodu: 74106) kullanılmıştır.

### 3.1.3.3. Gen ifade analizi için kullanılan kimyasal maddeler

Dizayn edilen primerler İontek firmasından 100 µM konsantrasyonda olacak şekilde sentez ettirilerek tedarik edilmiştir. Gen ifade düzeylerinin tespit edilmesi için Qiagen QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Ürün kodu: 204245) kullanılmıştır.

### 3.1.3.4. Hücre içi pH'nın incelenmesi için kullanılan kimyasal maddeler

Hücrelerin pH durumuna ait floresan görüntülemeyi daha berrak yapabilmek için ön hazırlık aşamasında kullanılan Live Cell Imaging Solution (Ürün kodu: A14291DJ) Thermo-Fisher Scientific firmasından temin edilmiştir. Hücre içi pH'nın floresan boya ile kalitatif tespiti için Thermo-Fisher Scientific firmasından temin edilen pHrodo™ Green AM Intracellular pH Indicator kiti (Ürün kodu: P35373) kullanılmıştır.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Besiyerlerinin hazırlanması ve *D. radiodurans*'ın inokülasyonu

Besiyerleri hazırlanırken bileşenler tartılarak saf su içerisinde manyetik bar ile çözüldürüldü. Ardından besiyerlerinin pH'ları ve hacimleri ayarlanarak otoklavda 121 °C'de, 20 dakika sterilize edildi. Sterile edilen besiyeri şayet agarlı ise; sıcaklığı 60-70 °C'ye düşene kadar manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak soğutuldu ve aseptik koşullarda yaklaşık 12,5 ml olacak şekilde gama steril petrilere paylaştırıldı. Sıvı besiyerleri erlenlere uygun miktarlarda dağıtılarak tıkaçlar ile otoklavda sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi.

Besiyeri olarak *D. radiodurans* R1 için tanımlanmış olan TGY besiyerinin içeriğinde; 10 g/l tripton, 5 g/l maya özütü ve 5 g/l glukoz bulunmaktadır (Kitayama vd., 1983). Maillard reaksiyonu sebebiyle glukoz diğer bileşenlerden ayrı otoklavın ardından aseptik şartlarda 0,22 µm por çapına sahip filtre ile sterilizasyon yapıldıktan sonra ilave edildi (Maillard, 1912). TGYA hazırlanırken ayrıca 15 g/l agar ilave edildi.

-80 °C'de stoklanan *D. radiodurans*, TGYA petrilere ekimi yapılarak 32 °C sıcaklıkta 48 saat inkübe edildi. Daha sonra aseptik koşullarda bu kültürlerden bir koloni öze yardımıyla alınarak 100ml'lik erlen içerisindeki 50 ml TGYB besiyerine aktarıldı ve 32 °C, 175 rpm'de 10 saat inkübe edildi. Yarı-katı besiyeri kullanılacağı güne kadar 4 °C sıcaklıkta muhafaza edildi. Aktarımlar ve ekimler UV-C ile sterilize edilmiş, HEPA filtrelili hava perdesi ile dış kontaminantlardan korunan A2 Class II tip steril kabinde yapıldı. Tüm hücre aktarım işlemleri kabin içinde bek alevinin 10 cm<sup>3</sup>'lük alanı içerisinde aseptik koşullarda yapıldı (Şekil 3.2).



**Şekil 3.2.** Steril kabinde inokülasyon

Katı kültürden sıvı kültüre geçiş için koloni aseptik koşullarda öze yardımıyla alınarak sıvı besiyeri içerisine daldırıldı. Koloni homojen bir şekilde sıvı besiyerine dağılına kadar öze, parmak ile mikser hareketi yapılarak çevirildi. Bu ekim yöntemi sadece inokülasyon kültürü oluşturmak için kullanıldı.

### 3.2.2. *D. radiodurans* R1'in büyüme kinetiği

Literatürde yapılan benzer çalışmalar baz alınarak gen ifadelerinin belirlenmesinde orta-logaritmik faz hücrelerinin kullanılmasının uygun olacağına karar verildi. Bunun sebebi bu fazda bulunan hücrelerin mitotik evreye yatkın olması ve bundan dolayı genom kopyası bakımından daha zengin olmasıdır. Farklı pH'daki besiyerlerine inoküle edilme uygulamalarında kullanılacak *D. radiodurans* R1'in hangi fazda olduğunu belirlemek amacıyla seyreltme plaka yöntemi ile hücre sayımını takiben 600 nm'de optik dansitelerine bakılmıştır.

Hücre sayımı çalışmasında, öncelikle saat 17.00'de 5 ml TGY besiyerine tek koloni ile inokülasyon yapıldı ve 32°C, 30°'lik açı ile 175 rpm'de ertesi gün sabah saat 8.00'a kadar inkübe edildi. Bu şekilde hazırlanan başlatıcı (over night=O/N, starter) kültürü, 2 L'lik erlenlerde bulunan 795 ml TGY steril besiyerine inoküle edildi ve her saat spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda absorbans okuması yapıldı. Optik dansitesi okunan örneklerden ayrıca seyreltme plaka yöntemi ile koloniler gözle ve görüntüleme cihazı ile sayılarak büyüme eğrisi oluşturuldu. Seyreltme plaka yönteminde her saat alınan örnekten 100 µl, 900 µl steril fizyolojik su ile 10 kat, 10 kat seyreltme yapılan tüpten 100 µl alınıp tekrar üzerine 900 µl steril fizyolojik su ilave edilerek 10<sup>2</sup> kat seyreltme yapıldı. Bu şekilde aseptik koşullarda sırayla 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> ve 10<sup>6</sup> kat dilüsyonlar hazırlandı. Her seyreltmede pipetaj yapıldı ve her birinden ayrı ayrı 100 µl alınarak TGYA petrilere drigalski özesi ile yayma işlemi yapıldı. Her saat örnek için yapılan seyreltmeler 32°C 24 saat inkübe edildikten sonra koloniler sayılmıştır. Koloni sayısı 80-300 arasında olan petrilere seyreltme faktörü ile çarpılarak grafik için kullanılmıştır.



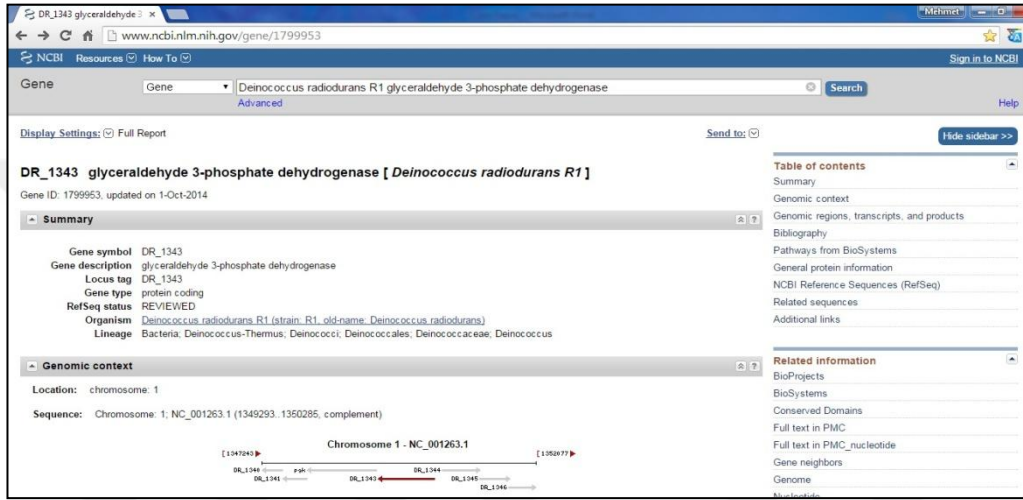
### 3.2.3. Primer dizaynı

mRNA ifade analizi yapılan bakterilerde hücre içi pH'nın dengelenmesinde rol aldığı düşünülen;  $\beta$ -karbonik anhidraz, hidrojenaz (HypA ve HypB genleri),  $H^+/Na^+$ -glutamat simport membran kanal proteini, katyon değiştirici membran kanal proteini, arginin dekarboksilaz, glutamat sentaz, V-tip ATP sentaz, sitokrom C oksidaz, süksinat dehidrogenaz, NADH dehidrogenaz, üreaz (UreE ve UreG genleri ile) ve kontrol geni (housekeeping) olarak kullanılan gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz genlerinin *Deinococcus radiodurans* R1'in NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBANK veritabanındaki dizilimlerine göre primer dizaynı yapıldı. Primer dizaynında şu hususlara dikkat edildi;

- Seçilecek forward ve reverse primerler hedef gen bölgesinin dışında, genomun diğer sekanslarıyla hiçbir benzerlik içermeyen dizilimde olmasına,
- Real-time PCR'da çoğaltılacak bölge maksimum 250 bp olmasına,
- Dizayn edilen primerlerin 3' ucunda GC stabilitesine (max: 2 G veya C),
- Primerler, toplam GC oranı %55'i geçmeyecek bir şekilde olmasına,
- Primerlerin son nükleotidi -eğer mümkünse- G veya C'nin olmasına,
- Primerlerin uzunluğu minimum 17, maksimum 30 bp olmasına,
- Primerlerin Tm (erime sıcaklığı) değerleri arasında maksimum 5 °C olmasına dikkat edildi.

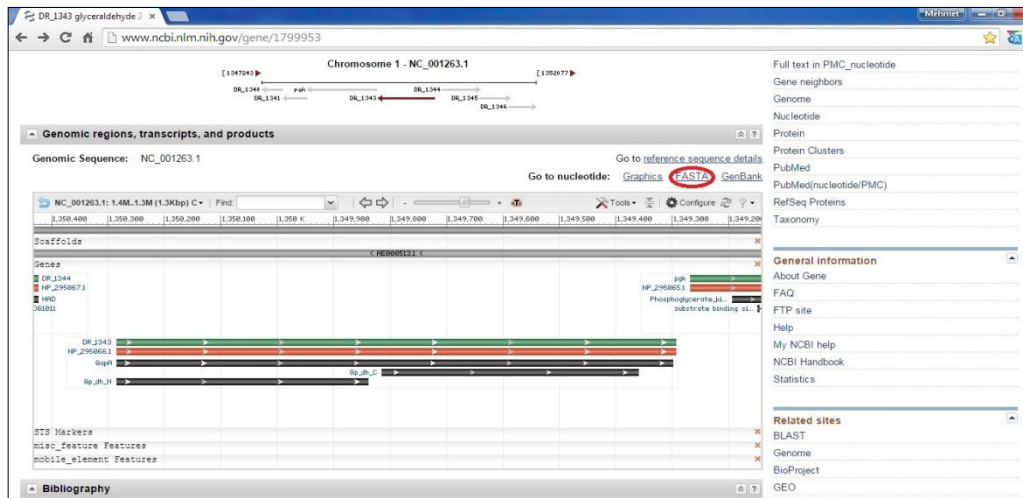
Bağlanma sıcaklığı açısından, primerlerin Tm değerleri;  $T_m = 64.9 + 41x(yG+zC-16.4)/(wA+xT+yG+zC)$  formülü ile hesaplanarak 67 °C 'yi geçmeyecek şekilde dizayn edildi (Rozen ve Skaletsky, 1999).

Primerler, NCBI veritabanında primer BLAST çevrimiçi programı ile genomun herhangi bir bölgesine spesifik olmaması için karşılaştırıldı. Öncelikle NCBI veritabanının arama sekmesinden “gene” seçilerek aranacak kelimeler kısmına “*Deinococcus radiodurans* R1” ve primer dizaynı yapılacak genin ismi yazıldı ve “Search” tuşuna basıldı (Şekil 3.3).



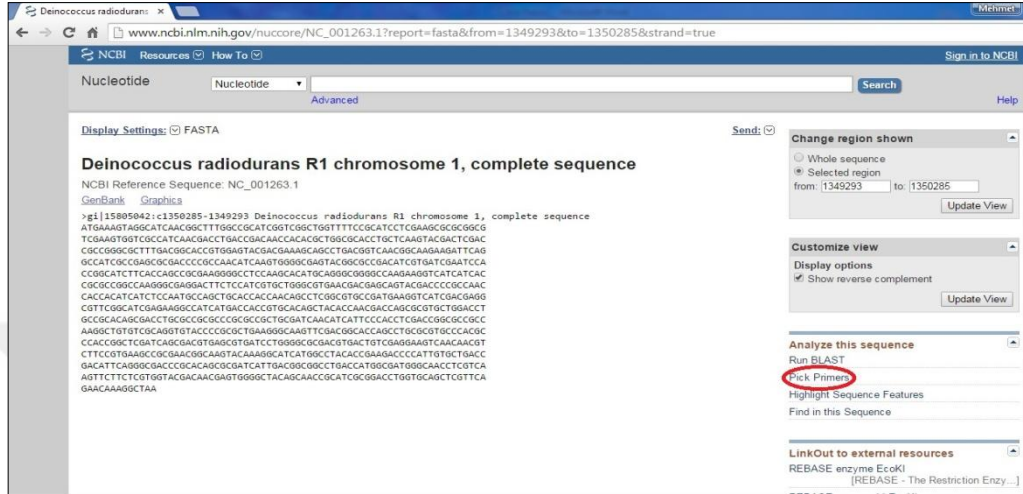
Şekil 3.3. NCBI veritabanından *Deinococcus radiodurans* R1’in ilgili genin sekansının taranması

Sonrasında sekansa ulaşmak için FASTA formatında gen dizisi açıldı (Şekil 3.4).



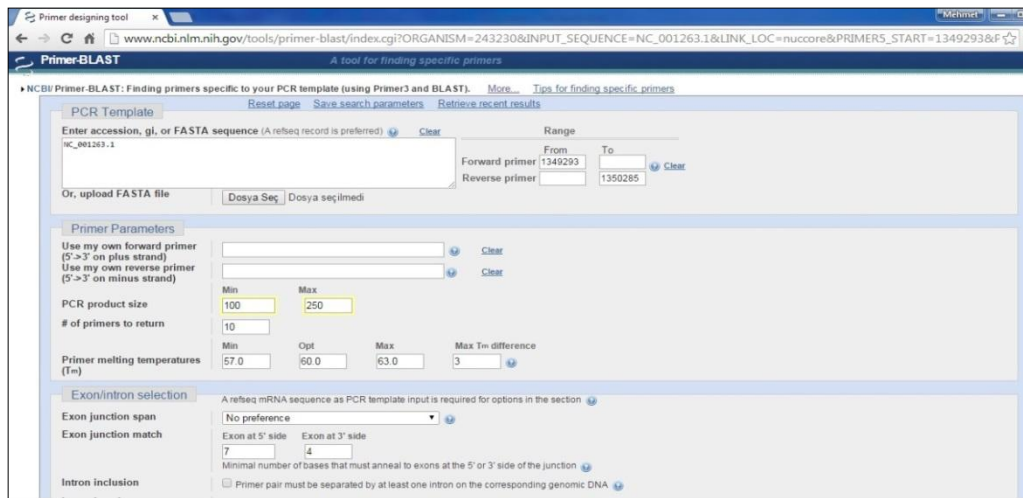
Şekil 3.4. Gen dizisinin FASTA formatında açılması

FASTA formatında açılan dizi içerisinde primerleri dizayn etmek için “Pick Primers” butonuna tıklanıldı (Şekil 3.5).



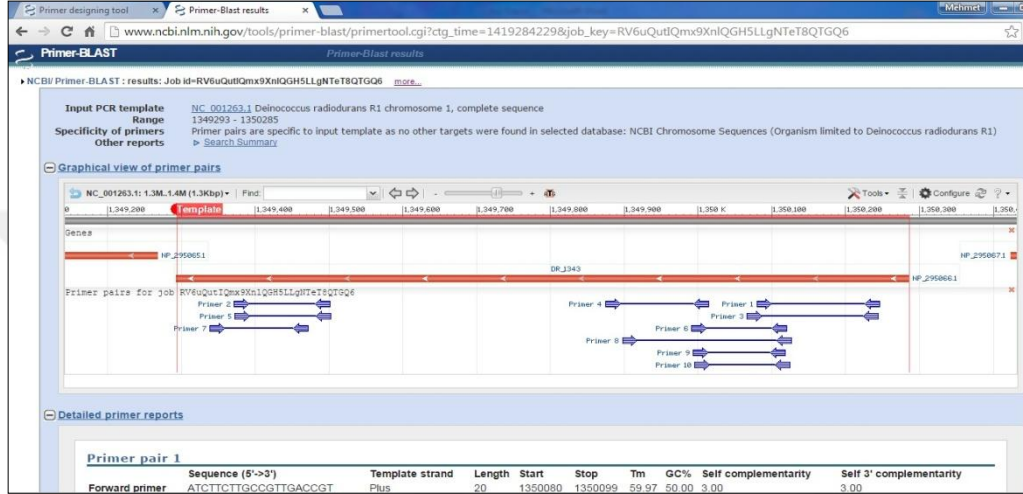
Şekil 3.5. FASTA formatında açılan dizi içinden primer dizaynına geçiş

Primer BLAST sayfasında dizayn edilmek istenen primerin maksimum ve minimum kaç bazdan oluşacağı bilgileri sayısal olarak girildi. Ayrıca erime sıcaklığı ve *Deinococcus radiodurans* R1 genomunda diğer dizilere primerimizin bağlanmasının maksimum olasılıkları da ilgili kısımlara girilerek sayfanın en altındaki “Search Primer” butonuna tıklanıldı (Şekil 3.6).



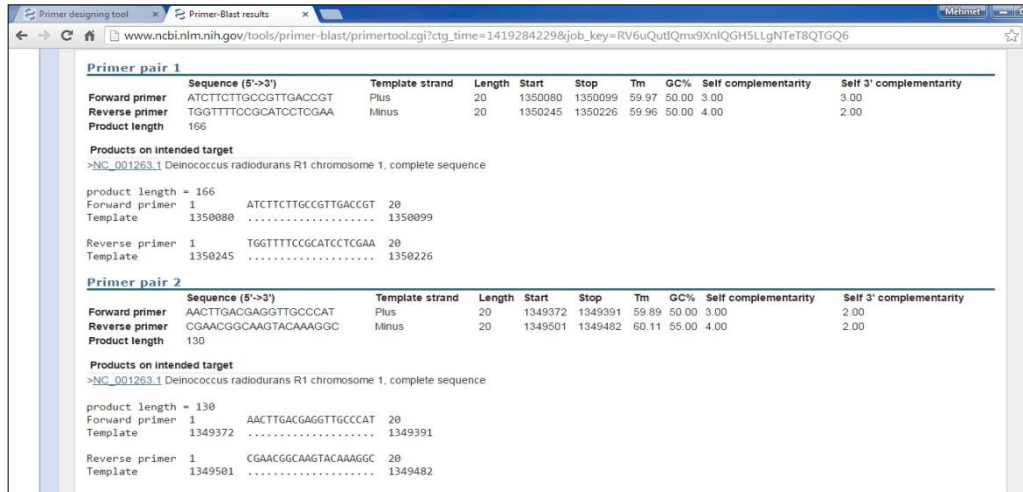
Şekil 3.6. Primer dizaynı ve genomu ile BLAST'lama için parametrelerin sisteme girilmesi

Seçilen parametreler ile gen üzerinde spesifik amplifikasyon yapabilecek primerler program tarafından sunuldu. Program tarafından sonuçlar iki kısım halinde verildi. Birinci kısımda sistem tarafından belirlenen primerlerin gen haritası üzerinde hangi kısmı çoğaltacağını göstermektedir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Program tarafından belirlenen primerlerin gen üzerinde ampikon bölgelerin haritalanması

İkinci kısımda tavsiye edilen primerlerin dizisi, uzunluğu, oluşturacağı ürün uzunluğu, saç tokası formu oluşturma ihtimali, GC oranı, 3' ucunun stabilitesi,  $T_m$  değerleri ve genin hangi bazında başlayıp hangi bazında bittiği bilgileri bulunmaktadır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Program tarafından belirlenen primer çiftlerinin bazı parametreleri

Böylelikle sistem tarafından önerilen primerler uygunluk ve spesifiklikleri kıyaslanmış ayrıca bütün genomda taranarak başka bölgelere bağlanma ihtimali en düşük olanlar seçilmiştir.

#### 3.2.4. DNA saflaştırma

Saflaştırma işlemi için Invitrogen PureLink® Genomic DNA Kit kullanılmıştır. *D. radiodurans* R1'den petri kültüründen tek koloni ile 5ml'lik TGY besiyerine inokülasyon yapıldı. 15 saat 32 °C'de 200 rpm'de 30 açılı ile inkübe edilen kültürden 1 ml (~10<sup>9</sup> CFU/ml) steril eppendorf tüpüne aseptik koşullarda alındı. 10000 xg'de 10 dk. 25 °C'de santrifüjün ardından süpernetant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti steril % 0,9 NaCl ile aseptik koşullarda resüspanse edildi. Tekrar 10000 xg'de 10 dk. 25 °C'de santrifüj edilen örneğin süpernetant kısmı atıldı. Liziz tamponu olarak hazırlanan, pH'sı 8,0'e ayarlanmış 25 mM Tris-HCl, 2,5 mM EDTA ve 1% Triton X-100 çözeltisine kullanım anında 20 mg/ml olacak şekilde lizozim ilave edildi. Hazırlanan bu çözeltiden 200 µl hücre pelletine ilave edilerek tamamen resüspanse olana kadar pipetaj yapıldı ve 37°C' de 45 dk. inkübe edildi.

İnkübasyon bittikten sonra 20 µl proteinaz-K eklendi ve vortekslendi. Üzerine 200 µl genomik liziz bağlanma tamponu koyuldu ve 55 °C'de 30 dk. Su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 200 µl saf etanol koyuldu ve vortekslenerek homojen hale getirildi. Lizat spin kolonun içerisine aktarıldı ( ~700 µl). 10000 xg'de 1 dk. 25°C'de santrifüj yapıldı ve toplama tüpü atıldı. Spin kolon yeni bir toplama tüpüne takıldı. Spin kolon içerisine 500 µl yıkama tamponu-1 konuldu ve 10000 xg'de 1 dk. santrifüj edildi. Toplama tüpü atılarak kolon yenisine yerleştirildi. Spin kolon içerisine 500 µl yıkama tamponu-2 konuldu ve 15000 xg'de 3 dk. santrifüj yapıldı. Toplama tüpü içerisindeki dökülerek tekrar takıldı. Herhangi bir tampon koymadan yıkama tamponunu tamamen gidermek için 21000 xg'de 3 dk. santrifüj yapıldı ve toplama tüpü atılarak kolon steril eppendorf tüpüne yerleştirildi.

Kolon materyaline tam denk gelecek şekilde 200 µl elüsyon tamponu aktarıldı ve 1 dk. 25°C inkübe edildi. Kolon 21000 xg'de 1 dk. santrifüj yapılarak saf DNA elde edildi. Saflık kontrolü, agaroz jel elektroforezi ve mikrohacim spektrofotometre ile tayin edildi. Saflaştırılan DNA primerlerin spesifik bağlanma sıcaklığının tespitinde gradient PCR yapmak için kalıp olarak kullanıldı.

### 3.2.5. Gradient PCR

Genlerin ifade düzeylerinin tespit edilmesi için kullanılacak primerlerin hangi sıcaklıkta spesifik bağlanma oluşturduğu gradient PCR ile belirlendi. Sıcaklık gradienti 45.0, 45.9, 46.6, 48.6, 50.8, 53.0, 54.0, 55.9, 57.6, 59.1, 59.5 ve 60.0 °C olarak ayarlandı.

**Tablo 3.1.** Taq DNA polimeraz ile PCR karışım içeriği

Bileşen	Miktar (µl)
Steril ultra saf su	65,5
5x Q-solusyonu	20
Tampon (Mg ilaveli)	10
dNTP karışımı (10 mM)	2
Kalıp DNA (< 1 µg)	1
Forward Primer (50 µM)	0,5
Reverse Primer (50 µM)	0,5
taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0,5
<b>TOPLAM HACİM</b>	<b>100</b>

Tablo 3.1'de gösterildiği şekilde hazırlanan reaksiyon karışımı 45.9, 48.6, 53.0, 55.9 ve 59.5 °C'lik kolonlara ikiyeşerli kontrollü olarak yerleştirildi. Reaksiyon protokolü Tablo 3.2'de olduğu gibi ayarlanarak PCR sonrası agaroz jel elektroforezi ile hangi sıcaklıkta daha spesifik bağlanmanın gerçekleştiği belirlendi.

**Tablo 3.2.** Gradient PCR için sıcaklık döngü protokolü

Döngü Adı	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	94 °C	3 dk.	1
Denatürasyon	94 °C	30 sn.	
Bağlanma	45-60 °C	30 sn.	33
Uzama	72 °C	1 dk.	
Son Uzama	72 °C	10 dk.	1
Bekleme	4 °C	∞	1

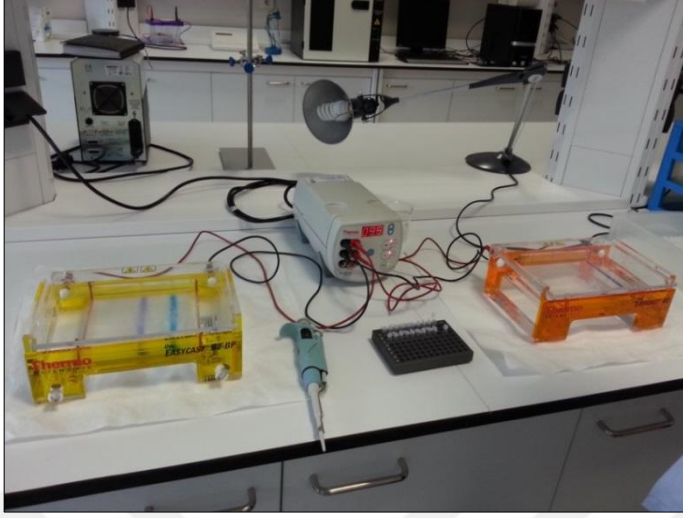
### 3.2.6. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezinde tampon olarak tris-borat-EDTA (TBE) tamponu kullanıldı. Tampon 10 kat (10X) konsantre halde hazırlanarak stoklandı. 10X TBE Tamponu, 108 gr/L Tris, 55 gr/L Borik asit, 4.65 gr/L EDTA ve pH'sı 8,0 olacak şekilde ayarlanarak steril saf su ile hazırlandı.

10X TBE stok tamponundan 10 ml ölçülerek 90 ml saf su ilavesiyle 1X TBE elde edildi. 1 gr agaroz tartılarak ısıya dayanıklı vida kapaklı erlene aktarıldı ve hazırlanan 100 ml 1X TBE ilave edildi. Çalkalanmadan mikrodalga fırınında yerleştirilerek agarozun tamamen çözünmesi sağlandı. Agarozun çözünmesinin ardından çıkartılarak 55-60 °C'ye kadar soğuması beklendi. Soğuduktan sonra 1 µl 10 mg/ml etidyum bromürden ilave edilerek yavaşça karıştırıldı. Elektroforez tankına doldurma pozisyonunda döküldü. Dökme esnasında hava kabarcığı olmamasına dikkat edildi. Jel döküldükten hemen sonra temiz ve kuru bir şekilde tarak yerleştirildi. Bir saat beklenilerek tamamen polimerize olup katılaşması sağlandı ve tarak dikkatlice çıkarıldı (Şekil 3.9). Jel yürütme pozisyonuna getirildi ve hazırlanan 600 ml 1X TBE tanka dolduruldu. Jele yüklemek için numuneler ve markırlar şu şekilde hazırlandı;

Marker: 1 µl yükleme solüsyonu + 5 µl markır

Örnek: 5 µl yükleme solüsyonu + 10 µl numune.



**Şekil 3.9.** Agaroz jel elektroforez düzeneği

Yükleme solüsyonu olarak saf su içerisinde % 0,25 bromfenol mavisi, % 0,25 ksilen siyanol ve % 40 oranında sükröz kullanılmıştır. Numuneler ve markır birkaç defa pipetaj yapılarak yavaş bir şekilde kuyucuklara otomatik pipet yardımıyla aktarıldı. 100 V ‘ da 120-150 dk. yürütülen örnekler görüntüleme cihazında 256 nm ultra viyole ışık altında görüntülendi (Şekil 3.10).



**Şekil 3.10.** Görüntüleme cihazı



### 3.2.7. Uygun tampon madde seçimi

*D. radiodurans* R1'in farklı pH'lardaki fizyolojisinin incelenmesinde besiyerlerine ilave edilecek tampon maddelerin seçimi için denemeler gerçekleştirildi. Öncelikle farklı tampon maddelerden 50 mM, 75mM ve 100 mM konsantrasyonlarda pH'ları 7,25 olan besiyerlerine aynı miktarda hücre ile inokülasyon yapıldı.

Denemede bir gün boyunca 200 rpm'de 32 °C'de inkübe edilen kültürlerden 24. saat örneklerinden seyreltme plaka yöntemi ile hücre sayıları incelendi. Bu denemedeki amaç aynı pH'da denemede kullanılacak tampon maddelerin toksik etkilerinin olup olmadığını belirlemektir.

Farklı pH'lara sahip besiyerlerindeki gen ifade profilini görebilmek için hazırlanan besiyerleri 100 ml erlen içerisine 38 ml olacak şekilde hazırlandı. Besiyerlerinin pH'ları farklı tamponlama aralıklarında ve farklı konsantrasyonlarda (50-75-100 mM) denenerek besiyerlerinin otoklavlanması sonucu hangi tampon maddenin daha iyi olduğu belirlendi.

Bütün besiyerleri için; Tamponlayıcı madde, Tripton ve maya özütü 30 ml saf suda karıştırıldı, pH istenilen seviyeye getirildi, sonra 38 ml'ye su ile tamamlanarak erlene aktarıldı. Otoklavlanan besiyerine steril 1M glukozdan 1,1 ml ilave edilerek karıştırıldı.

Besiyerlerinin pH'ları 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 ayarlandı. Tüm pH'lar için denemeler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

### 3.2.8. Farklı pH'larda inkübasyon

*D. radiodurans*'ın farklı pH koşullarında ilgili genlerin ifade düzeylerinin belirlenmesi için uzun süreli ve kısa süreli inkübasyonlarla belirli zaman aralıklarında örnekler alındı.

Uzun süreli inkübasyonda pH'sı 6.75, 7.00, 7.25, 7.50 ve 7.75 olarak ayarlanmış 40 ml TGY besiyeri aseptik koşullarda OD<sub>600</sub>'si yaklaşık 0,6 olan hücre kültürüyle inoküle edildi. İnokülasyon anı 0. dk. kabul edilerek 1., 3., 5. ve 24. saatlerde örnekler alınarak RNA'ları saflaştırılarak RT-qPCR ile genlerin ifade düzeyleri belirlendi.

Kısa süreli inkübasyon denemesinde pH'sı 6.75, 7.00, 7.25, 7.50 ve 7.75 olarak ayarlanmış 40 ml TGY besiyeri aseptik koşullarda OD<sub>600</sub>'si yaklaşık 0,6 olan hücre kültürüyle inoküle edildi. İnokülasyon anı 0. dk. kabul edilerek 10., 20., 30., 40. ve 60. dk.'larda örnekler alınarak RNA'ları saflaştırılarak RT-qPCR ile genlerin ifade düzeyleri belirlendi.

### 3.2.9. Radyasyon uygulaması

TAEK'in Ankara Kazan'da bulunan Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezinde bulunan İzotop marka Ob-Servo Ignis model gama ışın kaynağı kullanılarak denemeler gerçekleştirildi. *Deinococcus radiodurans* R1 stok petrisinden alınan bir koloni ile O/N kültür hazırlandı ve uygun koşullarda inkübe edilerek bu kültürün 1 ml ile ertesi gün 99 ml'lik besiyeri içeren 250 ml'lik erlene inokülasyon yapıldı. Her saat optik dansitesi takip edilen kültür yaklaşık olarak 0,6 abs ulaştığında erlen 10 dakika buz içerisinde bekletilerek hücre fazının sabit kalması sağlandı.

Daha önce otoklavlanarak steril edilmiş DNaz ve RNaz içermeyen eppendorf tüplerine steril şartlarda 0,5'er ml bu kültürden aktarıldı. Ardından hemen buz içerisine yerleştirilen tüpler radyasyon uygulaması için gama kaynağına götürüldü.

Cihaz her defasında verilecek doz miktarına ayarlanarak buz içerisinde bekletilen üç eppendorf tüpüne uygulama yapıldı. 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 ve 1000 Gy dozlamalarının ardından 3 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 1'er ml Qiagen RNA Protect Solution® ilave edilerek tekrar 5 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. Tüm tüpler inkübasyonun ardından 20000 xg'de 10 dk. santrifüj edildikten sonra süpernetant dökülerek RNA saflaştırması yapıldı.

### **3.2.10. Total RNA saflaştırılması**

Total RNA saflaştırılması yapılacak hücreler öncelikle 10000 xg'de +4 °C'de 5 dakika santrifüjlenerek hemen buz içerisine alındı. RNA kompozisyonunun sabit kalması için hızlı bir şekilde her birine RNA protect Bacteria Reagent® ilave edildi. Vorteks yapılan pelletler -20 °C'de 2 hafta, -70 °C'de 4 hafta saklanabildi. Radyasyon deneyleri haricinde (Bu deneyde numuneler; Ankara, Kazan, SANAEM'den Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü laboratuvarına kadar yaklaşık 90 dk. boyunca katı karbondioksitte taşınmıştır) diğerlerinde numuneler bekletilmeden saflaştırma aşamasına geçildi.

Her saflaştırmada orta-logaritmik fazda en fazla  $2 \times 10^8$  CFU/ml hücre kullanıldı. Hücre kültürünün hangi fazda olduğu ve hücre sayısı büyüme eğrisinden yola çıkarak optik dansite yöntemiyle belirlendi. Saflaştırma için kullanılacak Tris-EDTA tamponu (TE); 30 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH'sı 8,0 olacak şekilde hazırlandı ve kullanım anında taze bir şekilde 15 mg/ml lizozim ilave edildi. Saflaştırmada kullanılacak 1 ml RLT tamponu içerisine 10 µl β-merkaptoetanol ilave edildi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı. Bu karışım 1 ay boyunca stabil kalmıştır (Tablo 3.3). Saflaştırma basamakları şu şekildedir;

- Steril eppendorf tüpünde santrifüjlenerek süpernetantı atılmış hücre pelletinin içerisinde alınan kültür hacminin iki katı RNAprotect Bacteria Reagent® ilave edildi ve 5 saniye vortekslendi.
- Tüpler 5 dakika 25 °C’de inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından örnekler 25°C’de 5000 x g’de 10 dakika santrifüjlendi.
- Süpernetant aseptik koşullarda dikkatlice döküldü. Tüp 10 saniye boyunca kurutma kâğıdının üzerinde ters çevrilerek süpernetanttan olabildiğince arındırılmaya çalışıldı.
- Pellet içerisine hücre miktarına göre lizozim ilave edilmiş TE tamponu ve 20 µl Proteinaz K ilave edilerek birkaç kez yavaş bir şekilde pipetaj ile resüspanse edildi. 25°C’de 10 dakika çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi.

**Tablo 3.3.** Total RNA saflaştırmada kullanılan çözeltilerin miktarları

Bakteri Sayısı (CFU/ml)	TE Tamponu (µl)	RLT Tamponu (µl)	Etanol (% 96-100) (µl)
< 1x10 <sup>8</sup>	100	350	250
1x10 <sup>8</sup> – 2.5x10 <sup>8</sup>	200	700	500

- 350 µl Buffer RLT ilave edildi ve tamamen homojen olana dek vortekslendi. 5 dakika 5000 xg’de santrifüj yapılarak süpernetant ayrı steril bir eppendorf tüpüne aktarıldı.
- 250 µl %100 Etanol ilave edildi ve pipetajlandı.
- Her defasında 700 µl lizat RNeasy Mini spin column® içerisine aktarıldı.
- Oda sıcaklığında 15 saniye 10000 x g’de santrifüj yapıldı.
- Alt tüpe toplanan sıvı döküldü ve tekrar kolon yerleştirildi.
- Kolonun içerisine 700 µl Buffer RW1 aktarıldı.
- Oda sıcaklığında 15 saniye 10000 x g’de santrifüj yapıldı.
- Alt tüp tamamen atıldı. Kolon yeni toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
- Kolonun içerisine 500 µl Buffer RPE aktarıldı.
- Oda sıcaklığında 15 saniye 10000 x g’de santrifüj yapıldı.
- Alt tüpe toplanan sıvı döküldü ve tekrar kolon yerleştirildi.
- Kolonun içerisine 500 µl Buffer RPE aktarıldı.

- Oda sıcaklığında 2 dakika 10000 x g'de santrifüj yapıldı.
- Kolon 1,5 ml toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
- 50 µl RNase'dan arındırılmış steril ultra saf su direkt olarak kolon membranına pipet ucunu değdirmeden aktarıldı.
- Oda sıcaklığında 1 dakika 10000 x g'de santrifüj yapıldı.

Elde edilen RNA örnekleri konsantrasyonları ve saflığı belirlendikten sonra en fazla bir hafta içerisinde kullanılmak üzere -80 °C'de muhafaza edildi.

### 3.2.11. Total RNA ve DNA konsantrasyonunun ve saflığının belirlenmesi

RNA ve DNA konsantrasyonunu ve saflığını belirlemek üzere Biotek markasına ait Epoch mikroplate okuyucu kullanılmıştır. Take3 mikro-hacim okuyucuda tüm örnekler ikişer defa köre karşı 260, 280 ve 320 nm'lerde okumalar yapılmıştır. RNA ve DNA konsantrasyonları 260 nm'deki absorbans değerleri ( $OD_{260}$ ) üzerinden şu formül kullanılarak hesaplanmıştır;

$$\text{RNA konsantrasyonu (ng/}\mu\text{l)} = OD_{260} \times (\text{Seyreltme faktörü}) \times 40$$

$$\text{DNA konsantrasyonu (ng/}\mu\text{l)} = OD_{260} \times (\text{Seyreltme faktörü}) \times 50$$

Ayrıca 280 nm'deki absorbans değeri ile protein safsızlıkları ve 320 nm'deki absorbans değeri ile partikül varlığı değerlendirilerek aşağıdaki skala yardımıyla saflıkları değerlendirilmiştir;

$$\text{Saf RNA; } OD_{260} / OD_{280} \geq 2,0$$

$$\text{Saf DNA; } OD_{260} / OD_{280} = \sim 1,8$$

### 3.2.12. RT-qPCR ile gen ifade düzeylerinin belirlenmesi

RNA virüslerinden elde edilen ters transkriptaz (reverse transkriptaz) enzimi kullanarak PCR cihazında uygun döngüler ile RNA'dan cDNA sentezlemek mümkündür. Bu tekniğe kısaca RT-PCR adı verilmiştir. Bazı floresan özellikli sadece çift DNA'ya bağlanabilme yeteneğine sahip boyalar yardımıyla real-time PCR cihazında hedeflenen genlerin konsantrasyon düzeyleri belirlenebilmektedir. Bu iki teknik birbirlerini tamamlayarak total RNA'dan hedeflenen gene özgü primerler ile kantitatif gen ifade düzeylerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu tekniğe RT-qPCR ismi verilmiştir.

Bu işlemin gerçekleştirilmesi için iki çeşit teknik kullanılmaktadır. Bu tekniklerden biri; ters transkriptaz reaksiyonu ve Hot-Start Taq DNA polimeraz reaksiyonunun aynı tüpde gerçekleşmesi, diğeri ise ters transkriptaz ile cDNA'ları ayrı bir reaksiyonla sentezledikten sonra gen kantitasyonunun gerçekleştirilmesidir. İkinci yöntemde daha hassas bir sonuç elde edilmesine karşın RNaz kontaminasyonunun riski artmaktadır.

Deneylelerimizde tek aşamada RT-qPCR tekniği seçilmiştir. Saflaştırılan RNA'lar ile her bir olgu için reaksiyon karışımı hazırlanarak Tablo 3.5'de belirtilen protokol ile gen ifade düzeyleri belirlenmiştir. Gen ifade düzeylerinin belirlenmesi şu aşamalar ile gerçekleştirilmiştir;

a. Bütün işlemler steril kabinde, kısa cDNA oluşumunu önlemek amacıyla buz üzerinde yapıldı.

b. RT-qPCR karışımı hazırlığından önce Real Time PCR sıcaklık siklus protokolü girilerek önceden hazır hale getirildi (Tablo 3.5).

c. 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix<sup>®</sup>, Kalıp RNA, Primerler ve RNase-free su çözündürüldü. 5'er saniye vortekslenen reaktantlar; 30 saniye, 3000 xg, 0 °C'de santrifüjlendi ve tekrar buza yerleştirildi.

d. Reaktantlardan QuantiTect RT Mix<sup>®</sup> kullanılacağı zaman -20 °C'den çıkarılıp kullanımın ardından hemen tekrar -20 °C'ye yerleştirildi.

Her gen için steril eppendorf tüplere master karışım hazırlandı (Tablo 3.4). Karışım şu sıraya göre ilave edildi;

- RNase-free water
- QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix<sup>®</sup>
- Primerler
- QuantiTect RT Mix<sup>®</sup>
- Kaç olgu incelenecekse 1 fazlası pipetlendi. Kapılara ayrıldıktan sonra saflaştırılmış (kalıp) RNA'lar ilave edildi.

**Tablo 3.4.** RT-qPCR karışımını hazırlama protokolü

Bileşen	Miktar (µl)	Master karışım (µl)
RNase free water	6,8	68
2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix	10	100
Forward Primer (500 nM)	1	10
Reverse Primer (500 nM)	1	10
QuantiTect RT Mix	0,2	2
Kalıp RNA (≤500 ng/reak.)	1	
<b>Toplam Hacim</b>	<b>20</b>	<b>200</b>

Hazırlanan karışımlar aşağıdaki siklus protokolüne göre RT-qPCR işlemi yapıldıktan son veriler değerlendirildi (Tablo 3.5).

**Tablo 3.5.** RT-qPCR için sıcaklık döngü protokolü

Döngü Adı	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Reverse Transkripsiyon	50 °C	30 dk.	1
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	15 dk.	1
Denatürasyon	94 °C	15 sn.	
Bağlanma (Tüm genler için aynı)	53 °C	30 sn.	45
Uzama (Fluoresans tayin)	72 °C	30 sn.	
Bekleme	4 °C	∞	1

Denemelerde RT-qPCR tekniği kullanılarak;

- Uzun süreli inkübasyon sonucu gen ifade düzeyleri
- Kısa süreli inkübasyon sonucu gen ifade düzeyleri
- Gama radyasyon uygulaması ile gen ifade düzeyleri tespit edilmiştir.

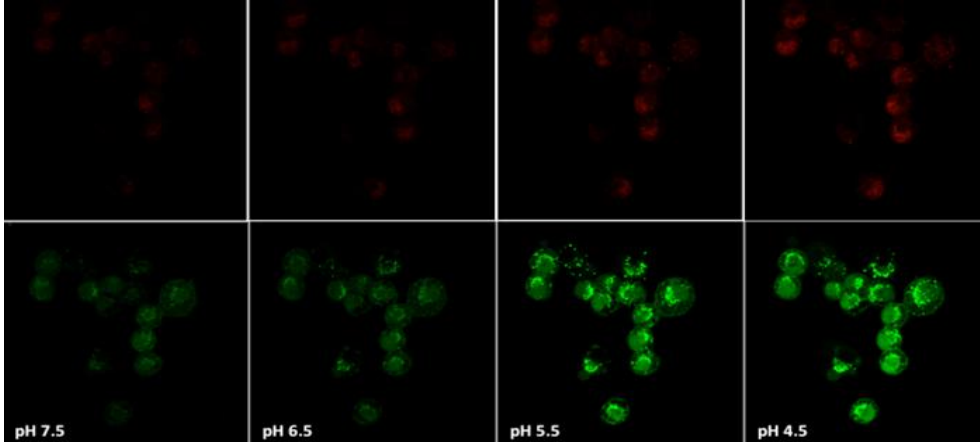
### 3.2.13. İstatistiksel hesaplamalar

Gen ifade düzeylerinin birincil normalizasyonu Livak ve Schmittgen'e ait  $2^{-\Delta\Delta CT}$  yöntemine göre yapılmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001). İkincil normalizasyon her genin ifade düzeylerinin gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz enzimine ait aynı olgudaki ifade düzeylerinin karşılaştırılması ile tespit edilmiştir.

### 3.2.14. Floresan boya ile hücre içi pH'nın incelenmesi

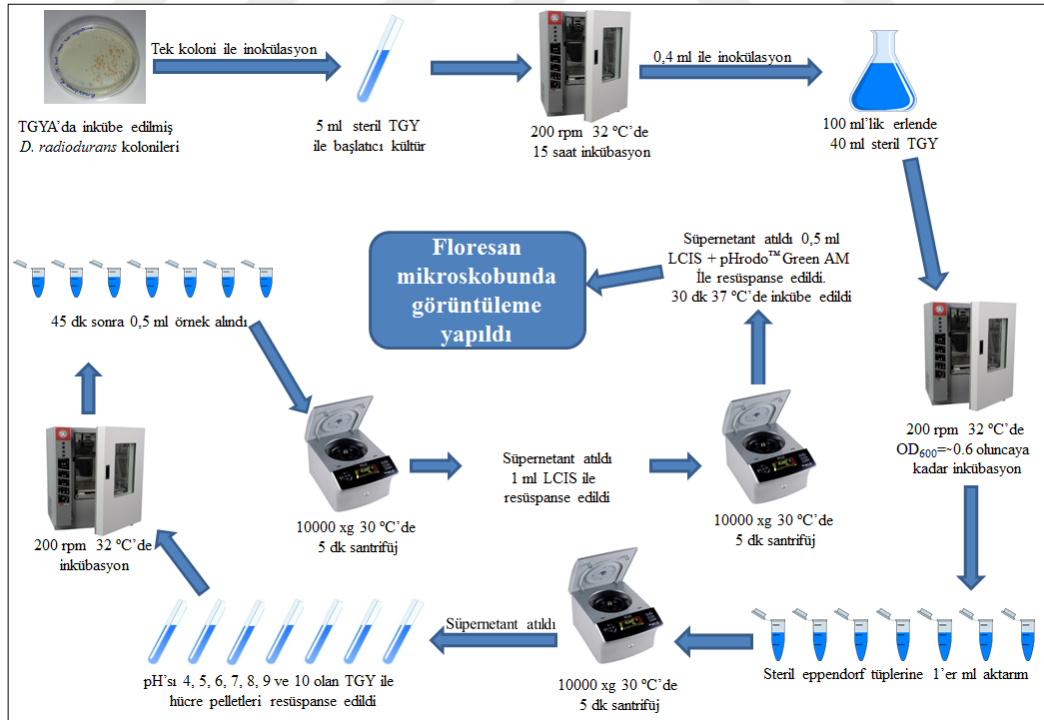
*D. radiodurans*'ın hücre içi pH'sının farklı pH şartlarında nasıl dengelendiğini ve ne kadar hızda gerçekleştiğini belirlemek için pH indikatörü olarak kullanılan floresan boya olan pHrodo™ Green AM kullanılmıştır. Denemeye başlamadan önce 1000 kat konsantre pHrodo™ Green AM'den 15 µl steril 25 ml'lik falkon tüpüne aktarıldı. Üzerine 150 µL PowerLoad™ ilave edilerek yavaşça pipetaj yapıldı. Karışıma 15 ml Live Cell Imaging Solution (LCIS) pipetlenerek vorteks yardımıyla iyice karışması sağlandı. LCIS ve LCIS+pHrodo™ Green AM solüsyonları oda sıcaklığına ulaşınca kadar bekletildi. pHrodo Green AM ve pHrodo Red AM H<sup>+</sup> konsantrasyonu arttığında daha parlak görünmektedir (Şekil 3.11).





Şekil 3.11. pHrodo Green AM ve pHrodo Red AM boyaının farklı pH'lardaki görüntüleri

Denemede gliserol stokdan yeni canlandırılmış kültür kullanıldı. TGYA besiyerine ekimi gerçekleştirilen hücreler 32 °C'de 48 saat inkübe edildi. Bu kültürden bir koloni alınarak, 5 ml'lik 2X TGY besiyerine steril koşullarda inokülasyon yapıldı.



Şekil 3.12. Farklı pH'larda *D. radiodurans*'in floresan boya ile boyama protokolü

Bir gece boyunca (saat 17:00'den ertesi gün saat 8:00'a kadar) 30°'lik açı ile 200 rpm'de çalkalamalı inkübatörde bekletilen başlatıcı kültürden 0,4 ml alınarak 100 ml'lik erlende steril olarak hazırlanan 40 ml'lik TGY besiyerine aseptik koşullarda aktarıldı. OD<sub>600</sub> yaklaşık olarak 0,6 olduğunda buz içerisine yerleştirilerek 15 dk. bekletildi.

Buzda bekletilen kültürden 7 steril eppendorf tüpüne 1'er ml aktarıldı. 10000 xg'de 4 °C'de 5 dk. santrifüj yapıldı. Süpernetant kısmı uzaklaştırılan hücre pelletleri daha önce hazırlanmış pH'sı 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 olan 5'er ml steril TGY içeren 10 ml'lik deney tüplerine steril koşullarda aktarıldı (her pellet eppendorf tüpleri içerisinde pH'ları ayarlanmış TGY'de çözündürülerek aktarılmıştır).

TGY içeren farklı pH'lardaki bu steril deney tüpleri inokülasyonun hemen ardından 30°'lik açı ile 200 rpm'de inkübasyona bırakıldı ve dakika tutuldu. 45 dk. sonrasında tüplerden 0,5 ml örnek alınarak 10000 xg'de 30 °C'de 5 dk. santrifüj yapıldı. Süpernetantları uzaklaştırıldıktan sonra her birine 1'er ml LCIS aktararak pipetajlandı ve 10000 xg'de 30 °C'de 5 dk. santrifüj yapıldı. Ardından tekrar süpernetant uzaklaştırılarak hücre pelleti LCIS+pHrodo™ Green AM solüsyonu ile homojen hale getirildi. 30 dk. 37 °C'de inkübe edilerek floresan mikroskobunda görüntüleme yapıldı (Şekil 3.12).

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

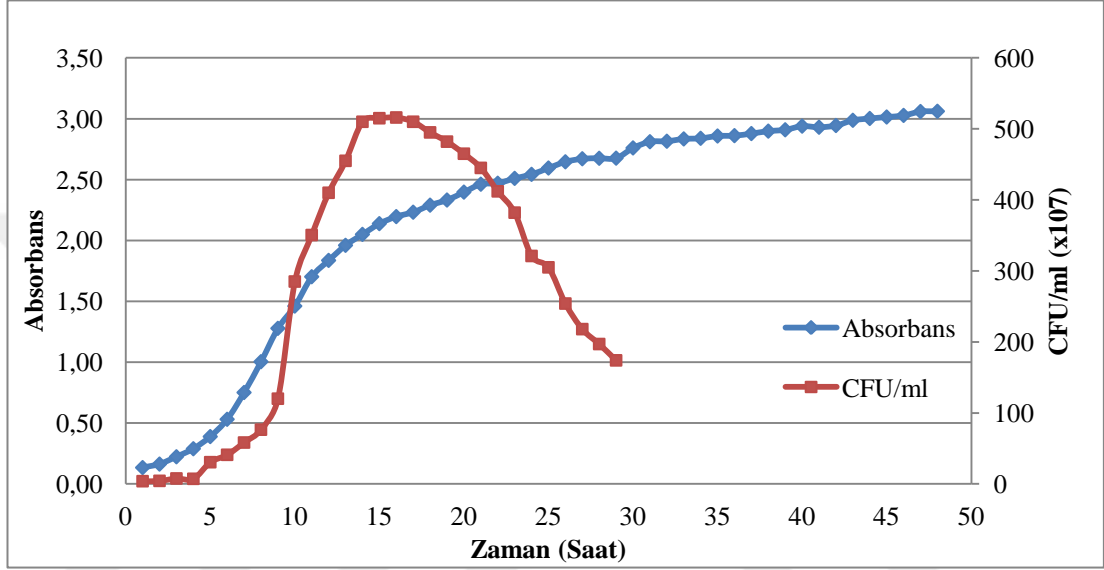
##### 4.1. Hücre Büyüme Eğrisinin Oluşturulması

*D. radiodurans* R1'in büyüme kinetiğini belirleyebilmek için her saat alınan örneklerden 600 nm'de absorbans ölçümü ve seyreltme plaka yöntemiyle hücre sayımı yapıldı (Şekil 4.2). Seyreltme plaka ile hücre sayımı 29. saat sonrasında ölüm fazına geçiş tam olarak gözlemlendiğinden sonlandırıldı. 30. saat ve sonrasında yalnızca 600 nm'de optik dansite takip edildi (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1.** *D. radiodurans*'a ait absorbans değerleri ve hücre sayıları

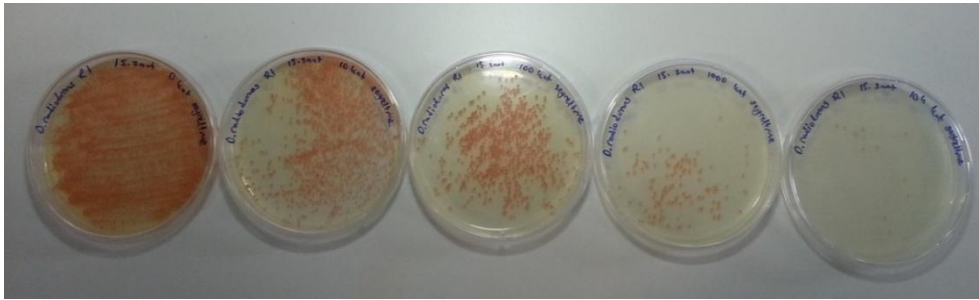
Saat	Absorbans	CFU/ml (x10 <sup>7</sup> )	Saat	Absorbans	CFU/ml (x10 <sup>7</sup> )
1	0,134	3,85	25	2,595	305
2	0,163	4,3	26	2,646	254
3	0,223	7,705	27	2,671	218
4	0,289	7,21	28	2,675	197
5	0,389	30,6	29	2,676	174
6	0,531	41	30	2,760	
7	0,751	58,3	31	2,811	
8	1,004	76,4	32	2,815	
9	1,278	120	33	2,834	
10	1,461	285	34	2,839	
11	1,702	350,5	35	2,858	
12	1,836	410	36	2,861	
13	1,960	455	37	2,878	
14	2,050	510	38	2,898	
15	2,138	515	39	2,909	
16	2,196	516	40	2,939	
17	2,232	510	41	2,930	
18	2,290	495	42	2,944	
19	2,332	482	43	2,987	
20	2,397	465	44	3,002	
21	2,462	445	45	3,014	
22	2,470	412	46	3,027	
23	2,510	382	47	3,059	
24	2,543	321	48	3,061	

Hücre sayımlarında 4. saate kadar lag fazda olduğu belirlendi. Denemelerde logaritmik fazda bulunan hücreler kullanılmıştır. Büyüme eğrisinden hücrelerin yaklaşık olarak 6. ve 7. saat aralığında bu hacimdeki bir kültür ortamında istenilen hücre fazına ulaştıkları gözlemlenmiştir.



Şekil 4.1. *D. radiodurans* R1'e ait büyüme grafiği

OD<sub>600</sub> değerleri ile hücre sayıları arasında stasyoner faza kadar bir korelasyon görülmekle birlikte daha sonrasında absorbans değerlerinin devamlı artış içerisinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.2. 15. saat seyreltme plaka ile hücre sayımında petri kültürü

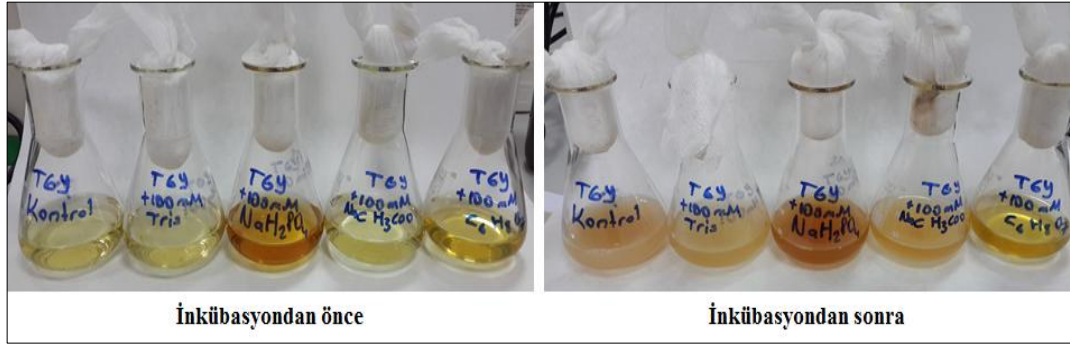
#### 4.2. Uygun Tampon Madde Seçimi

Farklı konsantrasyonlarda tampon maddelerin aynı pH'daki hücre büyümesine etkisinin incelenmesi sonucu 24. saat sonrası yapılan canlı hücre sayımı Tablo 4.2'de verildiği şekildedir. Yapılan üç tekrarlı deneme sonucu karbonatın artan konsantrasyonlarının *D. radiodurans*'ın büyümesini inhibe ettiği görüldüğünden 5.75, 6.00, 6.25 ve 6.50 aralığındaki pH ayarlamaları için sitrat seçilmiştir. 100 mM'ın hücrede inhibisyon etkisi oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3). 50 ve 75 mM konsantrasyonlarında hücre sayıları kısmen birbirlerine yakın değerlerde olduğu gözlemlenmiştir.

**Tablo 4.2.** Tampon maddelerin hücre büyümesine etkisi

Tampon madde	Konsantrasyon (mM)	Hücre sayısı (CFU/ml) ( $\times 10^6$ )
Asetat	50	211
	75	220
	100	201
Sitrat	50	268
	75	234
	100	127
Karbonat	50	257
	75	197
	100	127
Fosfat	50	214
	75	228
	100	209
Tris	50	227
	75	241
	100	217

Tampon maddelerin otoklav sonrası pH'larının stabilizasyonu için hazırlanan deney setlerinde elde edilen sonuçlar Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'de verildiği şekildedir. Bu denemede belirtilen şekilde hazırlanan besiyerlerinin pH'ları otoklav ile sterilizasyonun ardından ölçülmüştür. Çıkan sonuçlar ile hangi tampon maddede hangi konsantrasyonun seçileceği belirlenmiştir.



Şekil 4.3. 100 mM tampon madde ilavesiyle *D. radiodurans*'ın gelişimi

Tablo 4.3. 50 mM tampon maddelerin otoklav sonrası pH değerleri

Tamponlama pH'sı	Tampon madde	Konsantrasyon (mM)	Otoklav sonrası pH
5.00	Asetat	50	5.08
5.25		50	5.33
5.50		50	5.54
5.75	Karbonat	50	7.45
6.00		50	8.17
6.25		50	8.75
6.50		50	9.05
5.75	Sitrat	50	5.78
6.00		50	6.01
6.25		50	6.29
6.50		50	6.55
6.75	Fosfat	50	6.70
7.00		50	6.89
7.25		50	7.01
7.50		50	7.16
7.75		50	7.26
8.00	Tris	50	7.35
8.25		50	8.14
8.50		50	8.37
8.75		50	8.54
9.00		50	8.66

Elde edilen sonuçlara bakılarak karbonatın otoklav ile sterilizasyona dayanıklı olmadığı gözlemlendiğinden sonraki deneyler için kullanılmayacağına karar verildi. Otoklav ile sterilizasyonun ardından 75 mM konsantrasyonda tampon madde içeren besiyerlerinde pH değişimleri  $\pm 0,03$  olduğundan bu hata aralığı ihmal edilmiştir.

Sonraki aşamalarda kullanılan besiyerlerine 75 mM konsantrasyonlarda tampon madde ilave edilerek deneyler gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan besiyerleri maksimum 1 hafta içerisinde kullanılmıştır.

**Tablo 4.4.** 75 mM tampon maddelerin otoklav sonrası pH değerleri

Tamponlama pH'sı	Tampon madde	Konsantrasyon (mM)	Otoklav sonrası pH
5.00	Asetat	75	5.03
5.25		75	5.24
5.50		75	5.51
5.75	Karbonat	75	7.22
6.00		75	8.35
6.25		75	8.84
6.50	Sitrat	75	9.10
5.75		75	5.78
6.00		75	6.01
6.25		75	6.27
6.50	Fosfat	75	6.49
6.75		75	6.74
7.00		75	7.02
7.25		75	7.22
7.50		75	7.53
7.75	Tris	75	7.78
8.00		75	8.02
8.25		75	8.24
8.50		75	8.47
8.75		75	8.76
9.00		75	9.03

#### 4.3. D. radiodurans'ın Farklı pH'larda Büyüme Kabiliyeti

*D. radiodurans*'ın farklı pH'larda tamponlanmış besiyerlerinde 24 saat boyunca inkübasyonu ile hücre sayımı ve 600 nm'de absorbans değerleri incelenmiştir. İnkübasyon süresince 1., 3., 5. ve 24. saat alınan örneklerin OD<sub>600</sub> ve hücre sayıları incelendiğinde Tablo 4.5'deki sonuçlar elde edilmiştir.

**Tablo 4.5.** *D. radiodurans*'ın farklı pH'larda OD<sub>600</sub> değerleri

pH	OD <sub>600</sub> absorbans değerleri			
	1. saat	3. saat	5. saat	24. saat
5.00	0.078	0.079	0.080	0.086
5.25	0.073	0.075	0.077	0.083
5.50	0.073	0.075	0.076	0.082
5.75	0.075	0.073	0.075	0.081
6.00	0.075	0.073	0.071	0.080
6.25	0.073	0.074	0.073	0.084
6.50	0.075	0.072	0.077	0.085
<b>6.75</b>	<b>0.084</b>	<b>0.097</b>	<b>0.115</b>	<b>1.428</b>
<b>7.00</b>	<b>0.084</b>	<b>0.103</b>	<b>0.146</b>	<b>1.608</b>
<b>7.25</b>	<b>0.085</b>	<b>0.101</b>	<b>0.124</b>	<b>1.610</b>
<b>7.50</b>	<b>0.087</b>	<b>0.094</b>	<b>0.104</b>	<b>1.296</b>
<b>7.75</b>	<b>0.086</b>	<b>0.093</b>	<b>0.109</b>	<b>1.006</b>
8.00	0.079	0.079	0.081	0.086
8.25	0.078	0.082	0.082	0.084
8.50	0.077	0.084	0.081	0.084
8.75	0.076	0.081	0.083	0.087
9.00	0.083	0.084	0.084	0.085

Deney sonucuna göre hücre içi pH'nın hangi gen(ler) tarafından dengelendiğini tespit amaçlı yapılacak ifade düzeyi taramalarında pH; 6.75, 7.00, 7.25, 7.50 ve 7.75 değerleri seçildi. Bu pH değerlerine sahip erlenlerden üç kontrollü olmak üzere RNA saflaştırılması için örnek alındı ve 1., 3., 5. ve 24. saat gen ifade düzeyleri belirlendi.

Seçiminin yapılmasının sebebi bu pH'lardaki besiyerlerinde hücrelerin daha iyi çoğalabiliyor olması ve hücre sayısının mRNA saflaştırılması için yeterli olmasıdır. Diğer pH'larda hücreler yaşamını devam ettirmiş fakat çoğalamamıştır. Tüm erlenlerden örnekler alınarak son olarak yapılan TGYA geçişinde en az başlangıç sayısında hücre bulunduğu belirlenmiştir (Tablo 4.6).



**Tablo 4.6.** Farklı pH'larda inkübe edilen *D. radiodurans*'ın hücre sayısı

Besiyeri pH'sı	24. saat sonunda hücre sayısı (CFU/ml)
5.00	5,8x10 <sup>6</sup>
5.25	5,4 x10 <sup>6</sup>
5.50	6,2 x10 <sup>6</sup>
5.75	6,7 x10 <sup>6</sup>
6.00	6,0 x10 <sup>6</sup>
6.25	6,9 x10 <sup>6</sup>
6.50	7,3 x10 <sup>6</sup>
<b>6.75</b>	<b>232 x10<sup>6</sup></b>
<b>7.00</b>	<b>432 x10<sup>6</sup></b>
<b>7.25</b>	<b>480x10<sup>6</sup></b>
<b>7.50</b>	<b>94x10<sup>6</sup></b>
<b>7.75</b>	<b>84x10<sup>6</sup></b>
8.00	8 x10 <sup>6</sup>
8.25	7,1 x10 <sup>6</sup>
8.50	6,5 x10 <sup>6</sup>
8.75	6,2 x10 <sup>6</sup>
9.00	5,7 x10 <sup>6</sup>

#### 4.4. Primer Dizaynı

NCBI veritabanına ait “Primer Blast” ve “Primer3” online programları ile dizaynı yapılan primerlerin bazı parametreleri Tablo 4.7’de gösterilmiştir. Amplikon bölgeleri EKLER kısmında verilmiştir.

**Tablo 4.7.** Dizayn edilen primerlerin bazı parametreleri

Gen		Uzunluk (bç)	T <sub>m</sub> (°C)	%GC	Amplikon (bç)
Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz	Forward	23	59,87	47,83	250
	Reverse	22	59,84	50,00	
β-Karbonik anhidraz	Forward	23	59,63	47,83	174
	Reverse	20	60,06	47,83	
Hidrojenaz HypA	Forward	23	60,73	47,83	215
	Reverse	18	62,36	66,67	
Hidrojenaz HypB	Forward	23	59,57	43,48	155
	Reverse	21	59,86	47,62	
H <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> -glutamat simport membran kanal proteini	Forward	23	60,06	43,48	207
	Reverse	23	60,31	47,83	
Katyon değiştirici membran kanal proteini	Forward	23	59,94	47,83	174
	Reverse	23	60,06	47,83	
Arginin dekarboksilaz	Forward	23	60,12	47,83	223
	Reverse	23	60,62	47,83	
Glutamat sentaz büyük altbirimi	Forward	23	59,74	39,13	186
	Reverse	23	59,73	43,48	
V-tip ATP sentaz altbirim-C	Forward	23	60,12	47,83	238
	Reverse	21	59,81	52,38	
Sitokrom C oksidaz altbirim-I	Forward	23	60,06	43,48	198
	Reverse	23	59,75	43,48	
Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi	Forward	24	59,65	45,83	153
	Reverse	22	60,36	54,55	
NADH dehidrogenaz altbirim-B	Forward	20	60,32	55,00	155
	Reverse	22	60,68	50,00	
Üreaz yardımcı protein UreE	Forward	21	61,60	57,14	195
	Reverse	20	60,04	55,00	
Üreaz yardımcı protein UreG	Forward	22	60,99	54,55	151
	Reverse	23	59,74	43,48	

Programlar tarafından önerilen primerler arasından uygunluk ve spesifiklikleri kıyaslanan primerler, *D. radiodurans*'ın tüm genomunda taranmış, bağlanma ihtimali en düşük olanlar seçilmiştir (Şekil 4.4-4.17).

Primer pair 1									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CATTGGAGATGATGTGGTGGTTG	Plus	23	1349847	1349869	59.87	47.83	3.00	0.00
Reverse primer	GTTCAACGGCAAGAAGATTCAGG	Minus	22	1350096	1350075	59.84	50.00	4.00	2.00
Product length	250								

Şekil 4.4. Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz geni için seçilen primer çiftinin bazı parametreleri

Primer pair 1									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GACAATTCAGAGACGTTACAGGC	Plus	23	2232115	2232137	59.63	47.83	4.00	2.00
Reverse primer	GTTGCCCTCCATCAGCGTCT	Minus	20	2232285	2232266	60.67	55.00	2.00	2.00
Product length	171								

Şekil 4.5.  $\beta$ -karbonik anhidraz geni için seçilen primer çiftinin bazı parametreleri

Primer pair 1									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTAATTCAGTTCGTCGCCTTGC	Plus	23	342094	342116	60.73	47.83	5.00	3.00
Reverse primer	GTCGAGCGTGGTGCCTGA	Minus	18	342308	342291	62.36	66.67	4.00	1.00
Product length	215								

Şekil 4.6. Hidrojenaz HypA geni için seçilen primer çiftinin bazı parametreleri

Primer pair 1									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ATTTTCGTAATCACCACCACGTC	Plus	23	341545	341567	59.57	43.48	4.00	2.00
Reverse primer	TTTCTGGAAAACGTGGGCAAC	Minus	21	341699	341679	59.86	47.62	6.00	3.00
Product length	155								

Şekil 4.7. Hidrojenaz HypB geni için seçilen primer çiftinin bazı parametreleri

Primer pair 1									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GAAAAACACCCGGAAGAAGATGA	Plus	23	668044	668066	60.06	43.48	4.00	1.00
Reverse primer	CTGCTGATGGGTAACCTCTTTCA	Minus	23	668250	668228	60.31	47.83	5.00	3.00
Product length	207								

Şekil 4.8.  $H^+/Na^+$ -glutamat simport membran kanal proteini geni için seçilen primer çiftinin bazı parametreleri

Primer pair 1									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CGTTTTCTCGGGGATTATCGTG	Plus	23	374036	374058	59.94	47.83	5.00	0.00
Reverse primer	TCAGGTAGGAAATCAGAACCAGC	Minus	23	374209	374187	60.06	47.83	3.00	2.00
Product length	174								

Şekil 4.9. Katyon değiştirici membran kanal proteini geni için seçilen primer çiftinin bazı parametreleri

Primer pair 1									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GTGTAGTTTCATGGAGCGTAGAA	Plus	23	239996	240018	60.12	47.83	4.00	0.00
Reverse primer	TCAAGGAAGAGAACATGCTCGAC	Minus	23	240218	240196	60.62	47.83	6.00	2.00
Product length	223								

Şekil 4.10. Arginin dekarboksilaz geni için seçilen primer çiftinin bazı parametreleri

Primer pair 1									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGTTGCCGATGATGATGTTGTTT	Plus	23	183661	183683	59.74	39.13	4.00	0.00
Reverse primer	TGTTTATCCAGATGGAAGGCACT	Minus	23	183846	183824	59.73	43.48	6.00	2.00
Product length	186								

Şekil 4.11. Glutamat sentaz büyük altbirimi geni için seçilen primer çiftinin bazı parametreleri

Primer pair 1									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TAAGGTCGGAAAAGGACTGTATGC	Plus	23	713290	713312	60.12	47.83	3.00	2.00
Reverse primer	GTCGAAGAGGTTTTGCGACAG	Minus	21	713527	713507	59.81	52.38	6.00	1.00
Product length	238								

Şekil 4.12. V-tip ATP sentaz altbirim-C geni için seçilen primer çiftinin bazı parametreleri

Primer pair 1									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ATGATGACCACCGATCACAAGAA	Plus	23	2629409	2629431	60.06	43.48	4.00	0.00
Reverse primer	CGGAATCAGGAAGAAAACAGCA	Minus	23	2629606	2629584	59.75	43.48	3.00	0.00
Product length	198								

Şekil 4.13. Sitokrom C oksidaz altbirim-I geni için seçilen primer çiftinin bazı parametreleri

Primer pair 1									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCCAGTCCATAGACATGGTGAATA	Plus	24	967445	967468	59.65	45.83	8.00	2.00
Reverse primer	GTACAAAGGGAGAGAAAGGCGAG	Minus	22	967597	967576	60.36	54.55	4.00	1.00
Product length	153								

Şekil 4.14. Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi geni için seçilen primer çiftinin bazı parametreleri

Primer pair 1									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTCATCATCTCGATGGCGCA	Plus	20	1521710	1521729	60.32	55.00	6.00	2.00
Reverse primer	ATGCCCTGAAAAGAACTCATCG	Minus	22	1521864	1521843	60.68	50.00	3.00	2.00
Product length	155								

Şekil 4.15. NADH dehidrogenaz altbirim-B geni için seçilen primer çiftinin bazı parametreleri

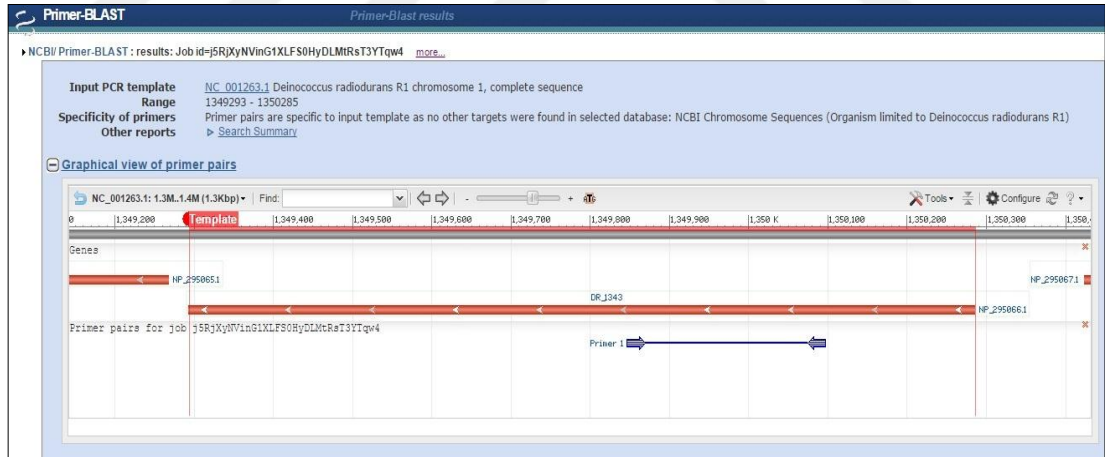
Primer pair 1									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCCTGCGTCTTCCACGAAATC	Plus	21	341050	341070	61.60	57.14	3.00	2.00
Reverse primer	GAGTTGCAGCTTGCCTTTCC	Minus	20	341244	341225	60.04	55.00	6.00	0.00
Product length	195								

Şekil 4.16. Üreaz yardımcı protein UreE geni için seçilen primer çiftinin bazı parametreleri

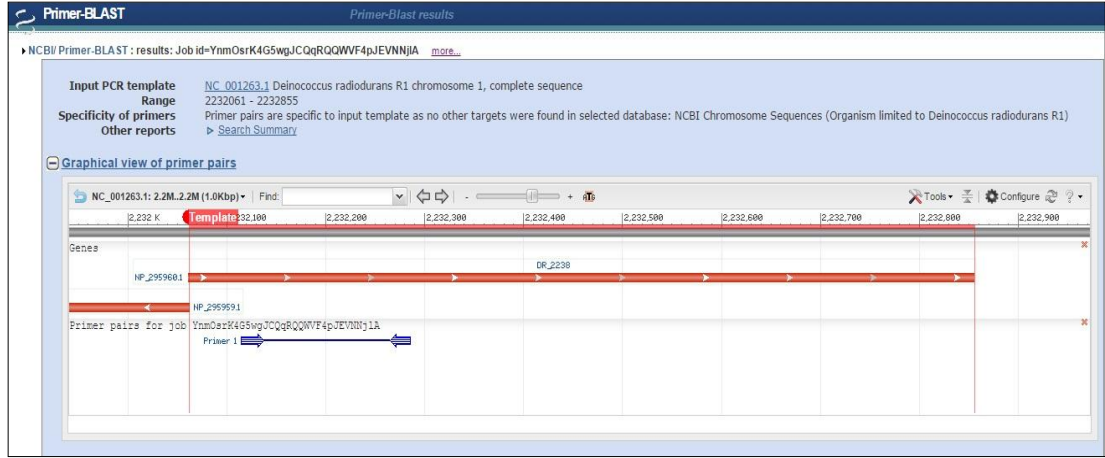
Primer pair 1									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCTCGACGGTTTCTGATTGAG	Plus	22	340019	340040	60.99	54.55	4.00	3.00
Reverse primer	ATCACCACGACATCTACACCTT	Minus	23	340169	340147	59.74	43.48	2.00	0.00
Product length	151								

Şekil 4.17. Üreaz yardımcı protein UreG geni için seçilen primer çiftinin bazı parametreleri

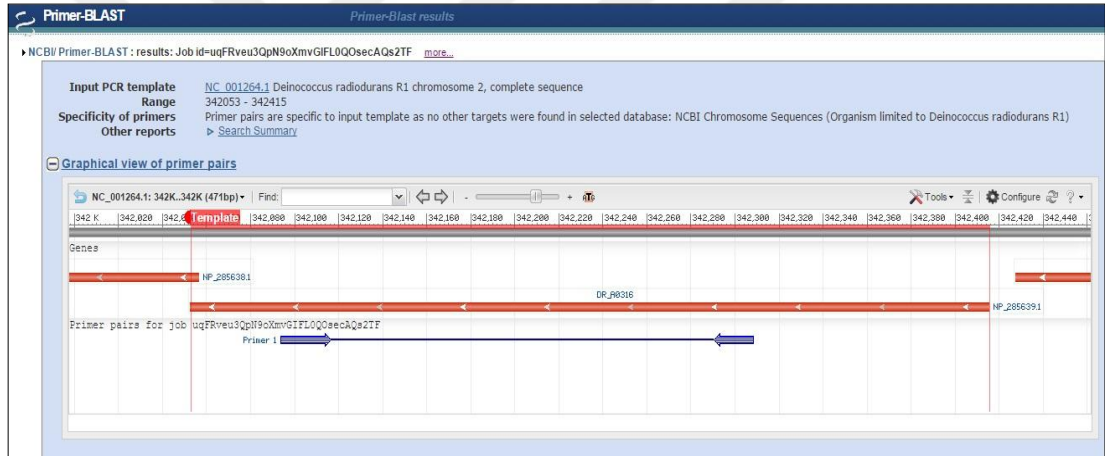
Seçilen primer çiftlerinin amplifikasyon yapacağı bölgeler gen haritası üzerinde Şekil 4.18-4.31'da gösterildiği şekilde olmuştur. Amplikon bölgelerin gen üzerinde sekans gösterimi EKLER bölümünde verilmiştir.



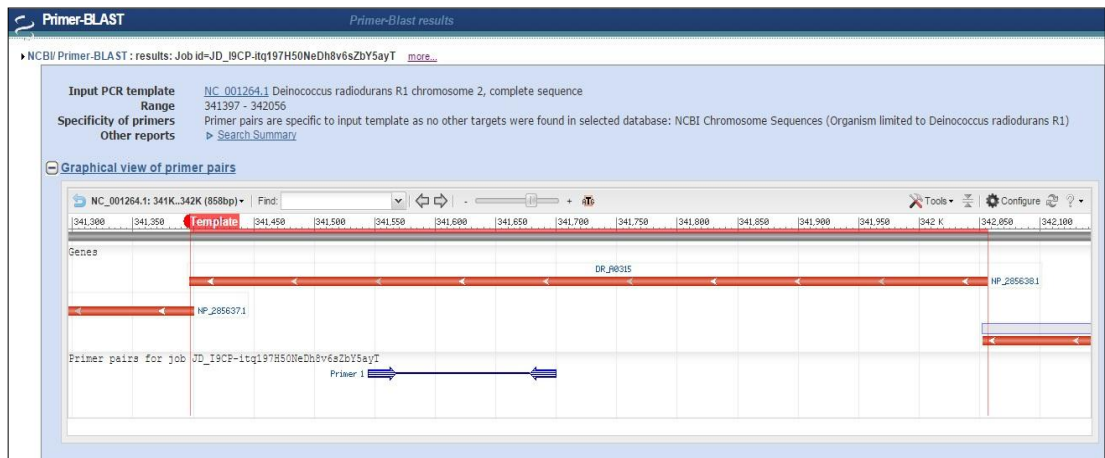
Şekil 4.18. Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz geni için seçilen primer çiftinin oluşturduğu amplikon bölge



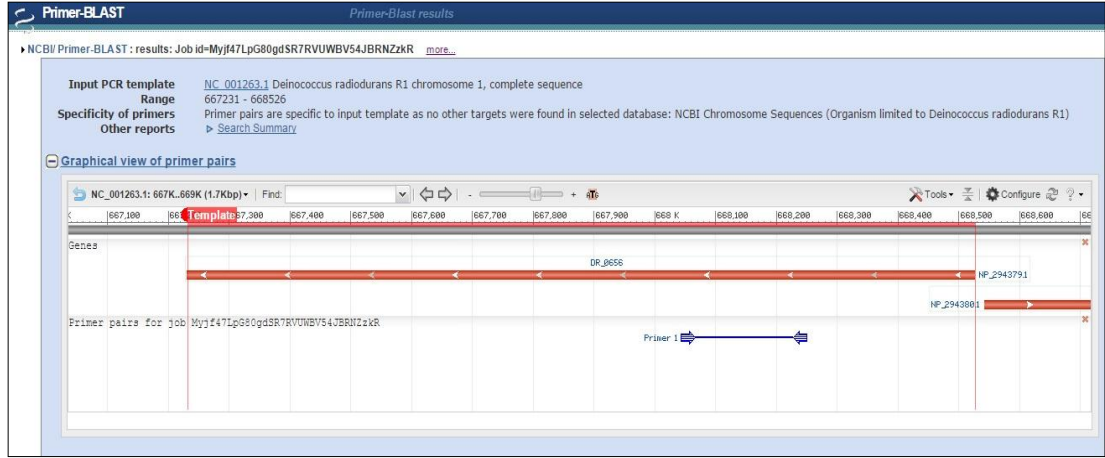
Şekil 4.19.  $\beta$ -karbonik anhidraz geni için seçilen primer çiftinin oluşturduğu ampikon bölge



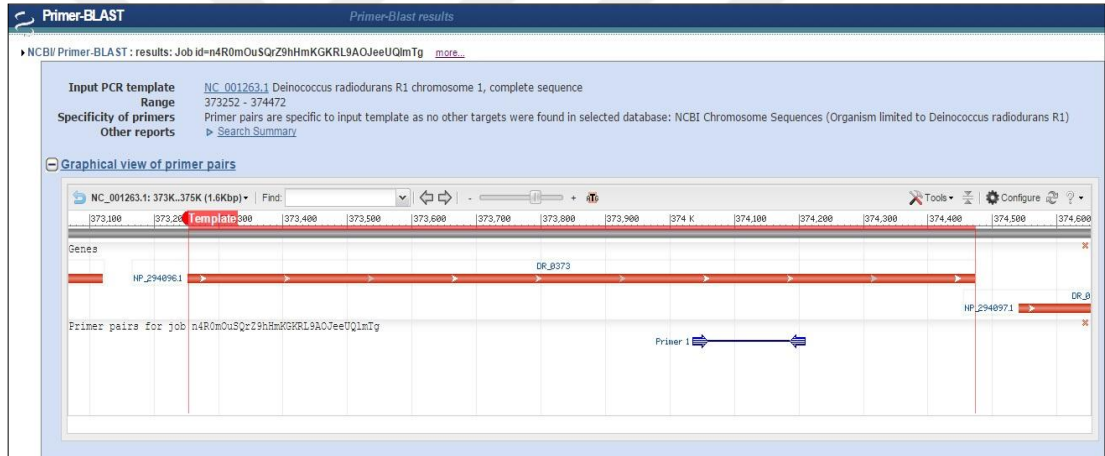
Şekil 4.20. Hidrojenaz HypA geni için seçilen primer çiftinin oluşturduğu ampikon bölge



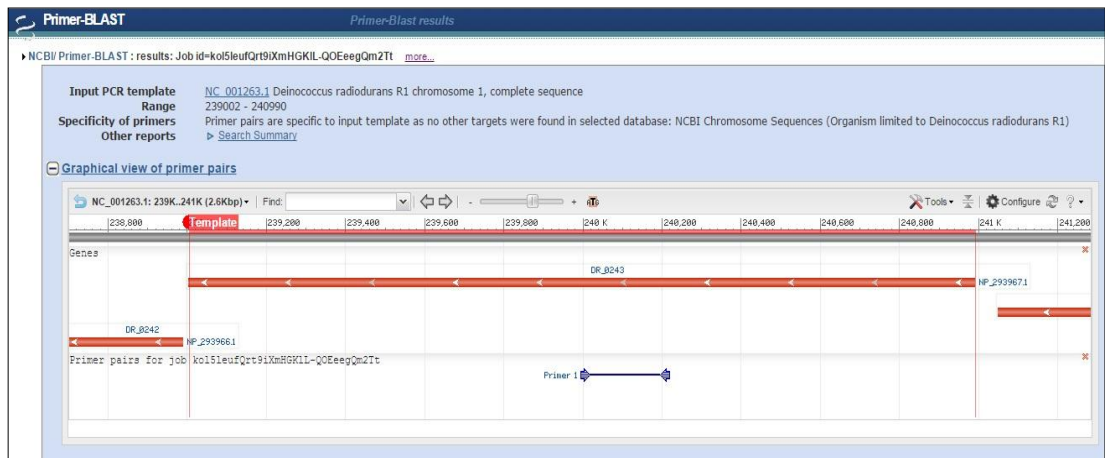
Şekil 4.21. Hidrojenaz HypB geni için seçilen primer çiftinin oluşturduğu ampikon bölge



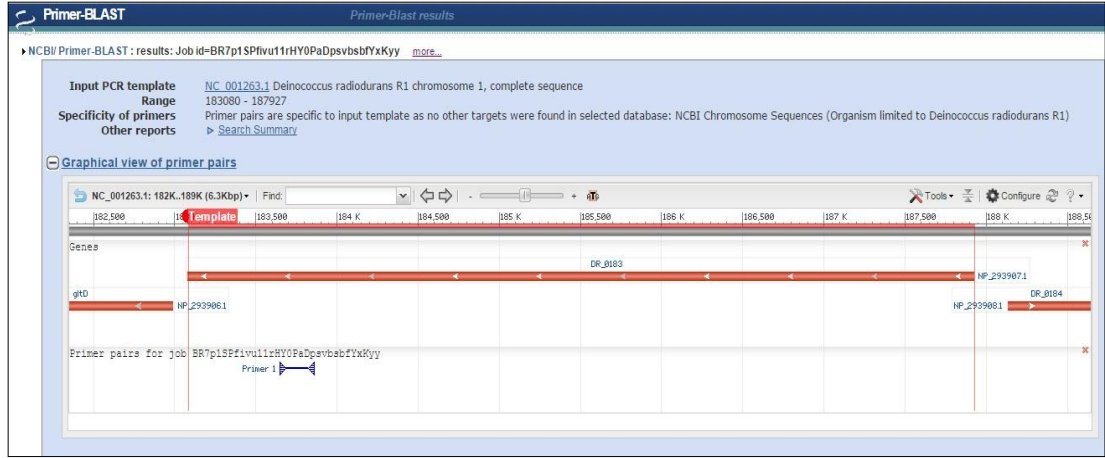
Şekil 4.22.  $H^+/Na^+$ -glutamat simport membran kanal proteini geni için seçilen primer çiftinin oluşturduğu ampikon bölge



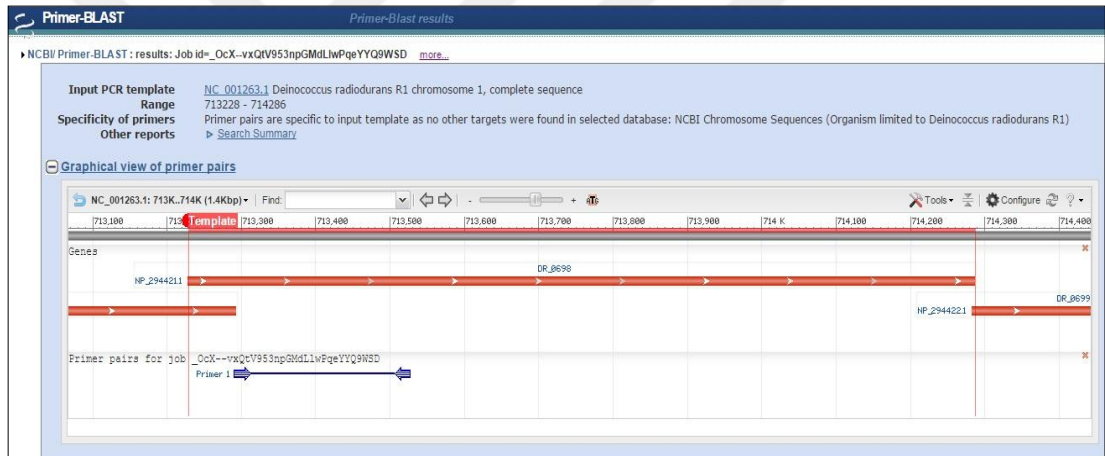
Şekil 4.23. Katyon değiştirici membran kanal proteini geni için seçilen primer çiftinin oluşturduğu ampikon bölge



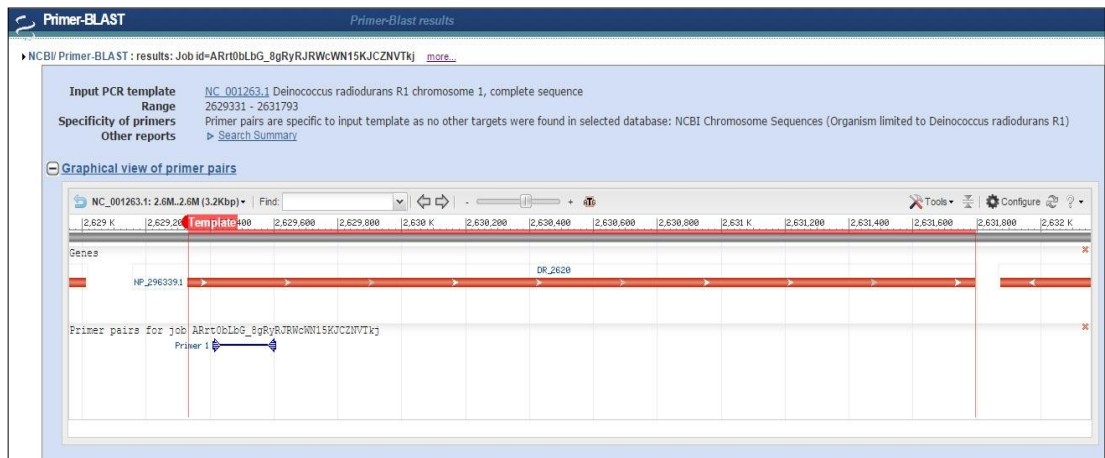
Şekil 4.24. Arginin dekarboksilaz geni için seçilen primer çiftinin oluşturduğu ampikon bölge



Şekil 4.25. Glutamat sentaz büyük altbirimi geni için seçilen primer çiftinin oluşturduğu ampikon bölge

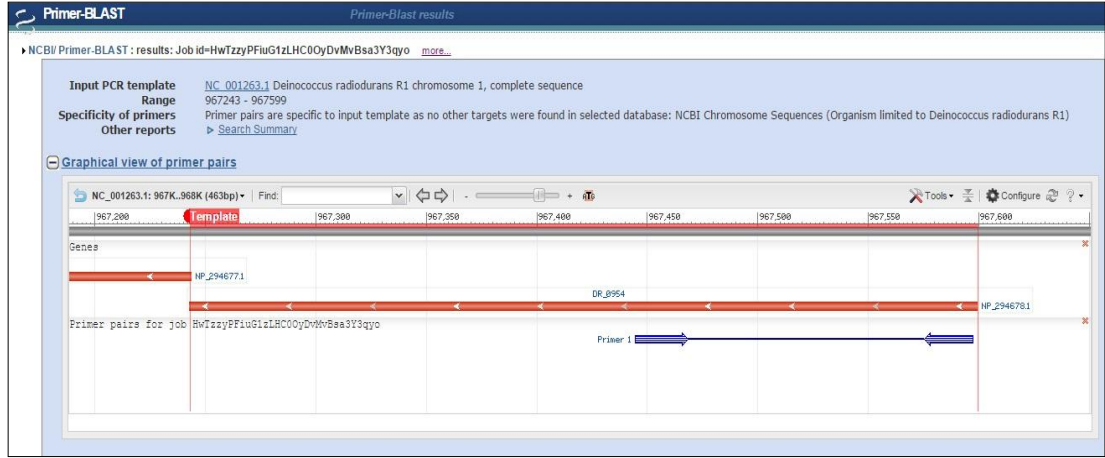


Şekil 4.26. V-tip ATP sentaz altbirim-C geni için seçilen primer çiftinin oluşturduğu ampikon bölge

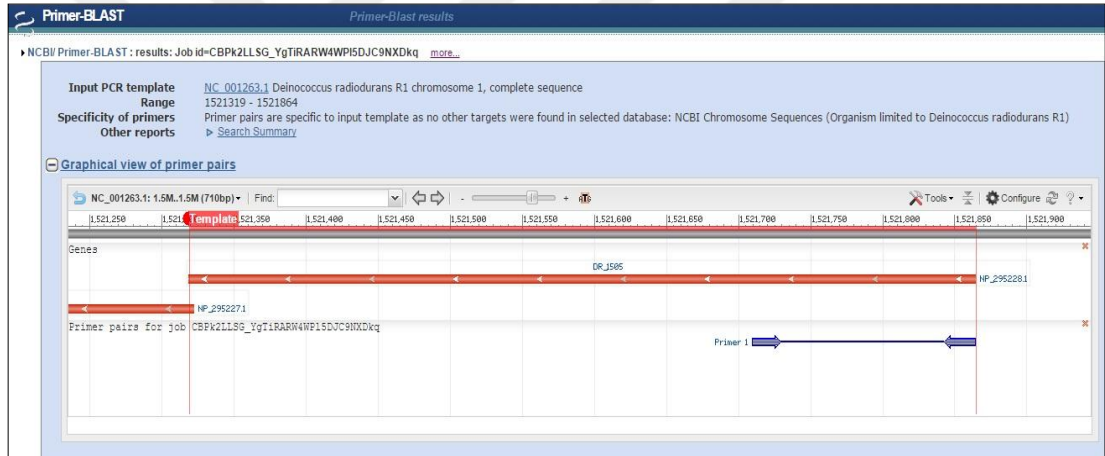


Şekil 4.27. Sitokrom C oksidaz altbirim-I geni için seçilen primer çiftinin oluşturduğu ampikon bölge

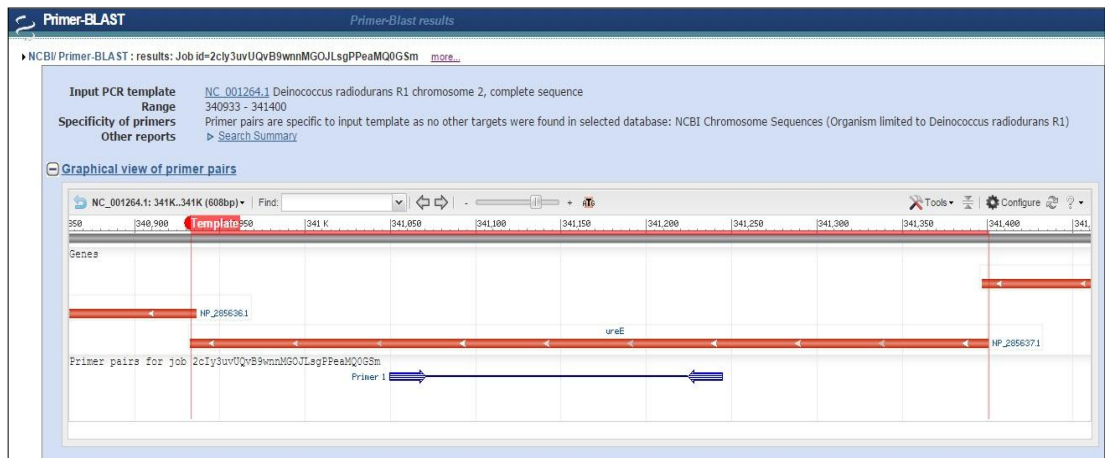




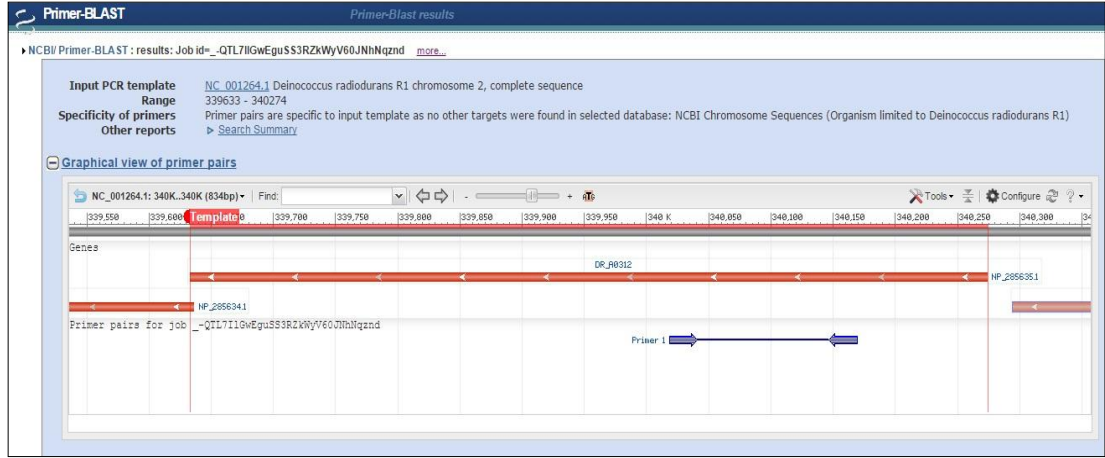
Şekil 4.28. Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi geni için seçilen primer çiftinin oluşturduğu amplicon bölge



Şekil 4.29. NADH dehidrogenaz altbirim-B geni için seçilen primer çiftinin oluşturduğu amplicon bölge



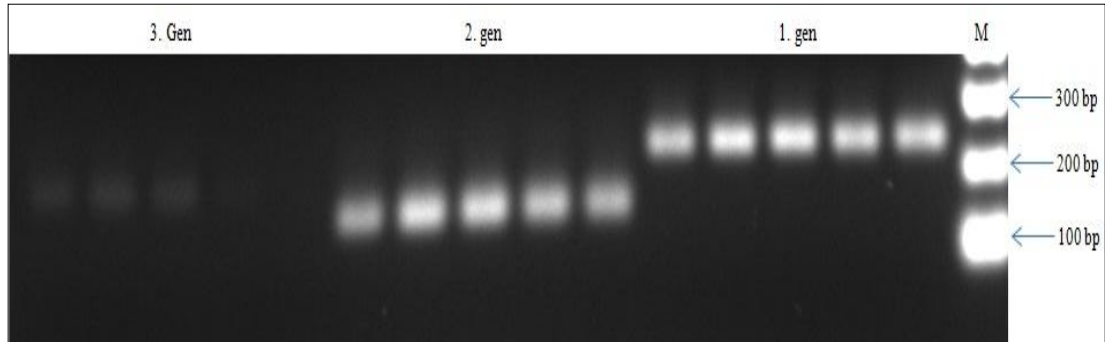
Şekil 4.30. Üreaz yardımcı protein UreE geni için seçilen primer çiftinin oluşturduğu amplicon bölge



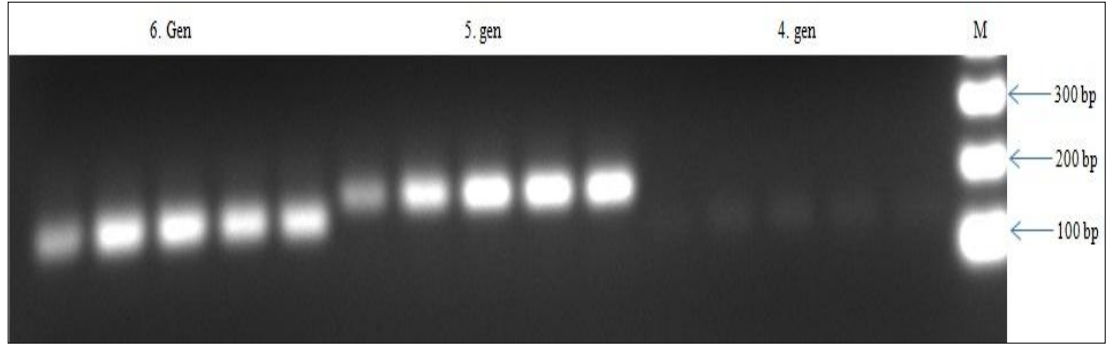
**Şekil 4.31.** Üreaz yardımcı protein UreG geni için seçilen primer çiftinin oluşturduğu amplicon bölge

#### 4.5. Gradient PCR

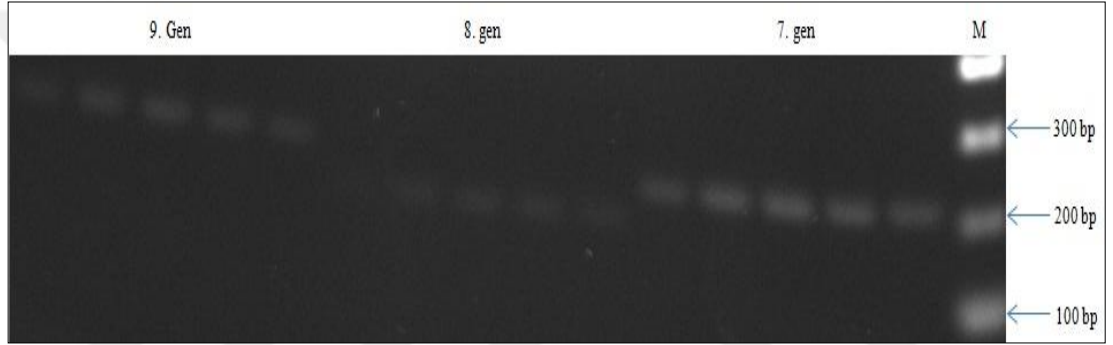
RT-qPCR çalışmalarında kullanılacak primerlerin gradient PCR ile bağlanma sıcaklığı optimizasyonu yapılmıştır. Reaksiyon sonunda %1'lik agaroz jel elektroforezi yapılarak band pozisyonu ve yoğunluğuna bakılarak RT-qPCR protokolünde kullanılacak bağlanma sıcaklığı belirlenmiştir (Şekil 4.32-4.36).



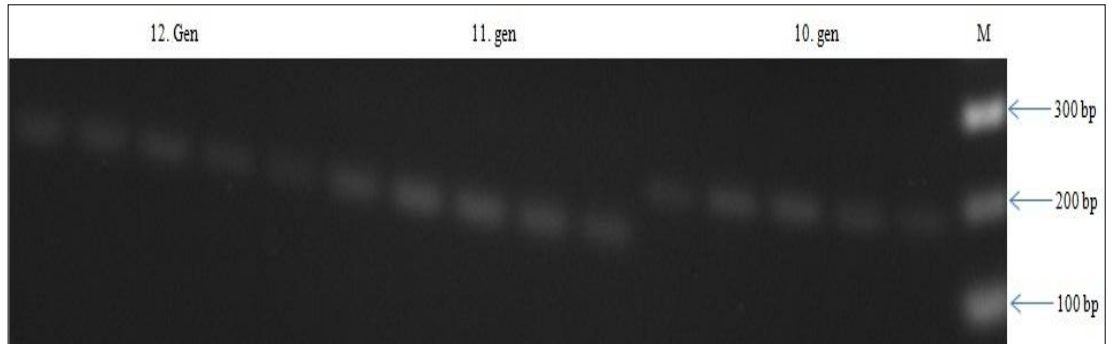
**Şekil 4.32.** Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (1),  $\beta$ -karbonik anhidraz (2), Hidrojenaz HypA (3) ait agaroz jel görüntüleri



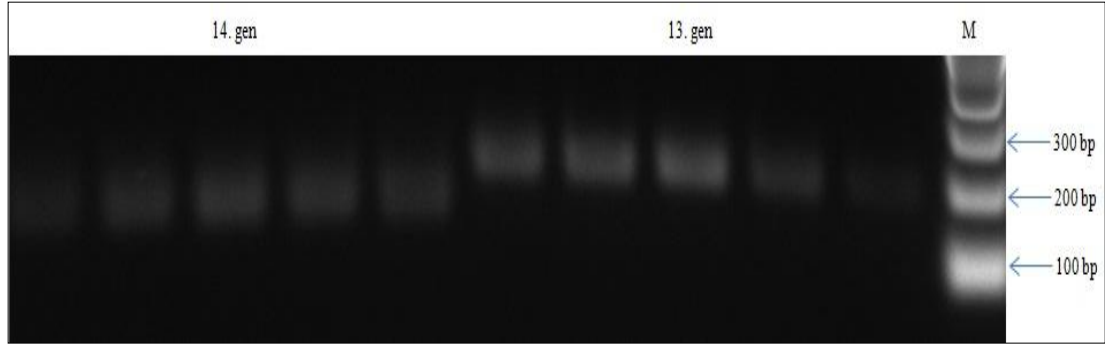
**Şekil 4.33.** Hidrojenaz HypB (4),  $H^+/Na^+$ -glutamat simport membran kanal proteini (5), Katyon değiştirici membran kanal proteini (6) ait agaroz jel görüntüleri



**Şekil 4.34.** Arginin dekarboksilaz (7), Glutamat sentaz büyük altbirimi (8), V-tip ATP sentaz altbirim-C (9) ait agaroz jel görüntüleri



**Şekil 4.35.** Sitokrom C oksidaz altbirim-I (10), Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi (11), NADH dehidrogenaz altbirim-B (12) ait agaroz jel görüntüleri



**Şekil 4.36.** Üreaz yardımcı protein UreE (13), Üreaz yardımcı protein UreG (14) ait agaroz jel görüntüleri.

Jel fotoğraflarında numuneler sağdan sola; Marker- (1. Sıcaklık) – (2. Sıcaklık) – (3. Sıcaklık) – (4. Sıcaklık) – (5. Sıcaklık) şeklinde yüklenmiştir. Sıcaklıklar kodlanarak daha pratik olması için deneylerde bu şekilde kullanılmıştır. Sıcaklık kodlaması Tablo 4.8’de gösterildiği şekildedir.

**Tablo 4.8.** Gradient PCR sıcaklık kodlaması

Bağlanma sıcaklığı (°C)	Deney Kodu
45.9	1
48.6	2
53.0	3
55.9	4
59.5	5

Agaroz jel görüntülerin incelenmesiyle bütün genlerde RT-qPCR protokolünde kullanılmak üzere 3. Sıcaklık olan 53,0 °C seçilmiştir.

#### 4.6. Uzun Süreli İnkübasyon Sonrası Gen İfade Düzeyleri

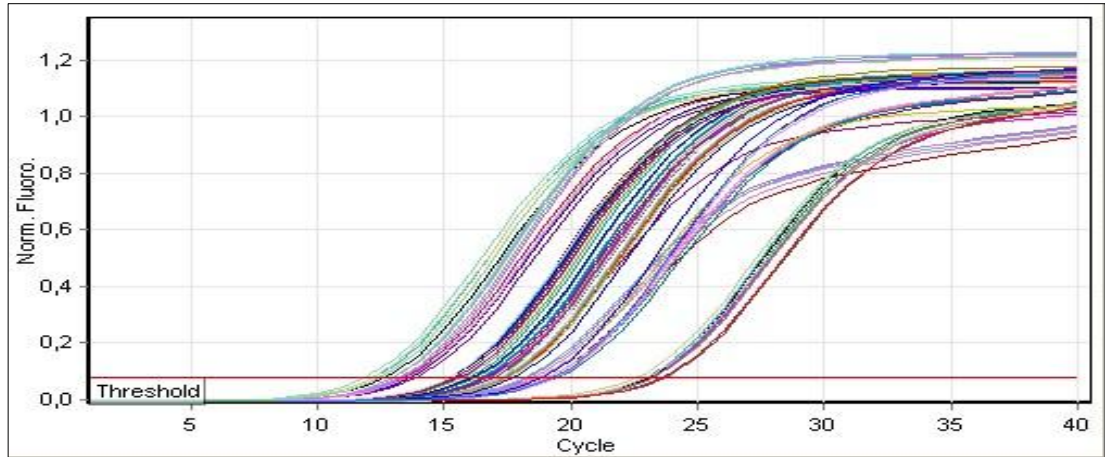
*D. radiodurans*'ın inkübe edildiği pH'sı 6.75, 7.00, 7.25, 7.50 ve 7.75 olan kültürlerden; 1., 3., 5. ve 24. saatlerinde RNA saflaştırılması için örnek alındı ve gen ifade düzeyleri belirlendi. Birinci tekrar amplifikasyon grafikleri Şekil 4.37, Şekil 4.40, Şekil 4.43 ve Şekil 4.46’de verildiği şekildedir. cDNA ve Syber Green 1 boyasına ait oluşturulmuş standart grafikleriyle gen konsantrasyonları kantitatif olarak belirlenmiştir (Şekil 4.38, Şekil 4.41, Şekil 4.44 ve Şekil 4.47).

Genlere ait erime eğrisi grafikleri ile ampikonların  $T_m$  değerleri üzerinden değerlendirme yapılarak hedef genlerin spesifik olarak çoğaltıldığı belirlenmiştir (Şekil 4.39, Şekil 4.42, Şekil 4.45, Şekil 4.48).

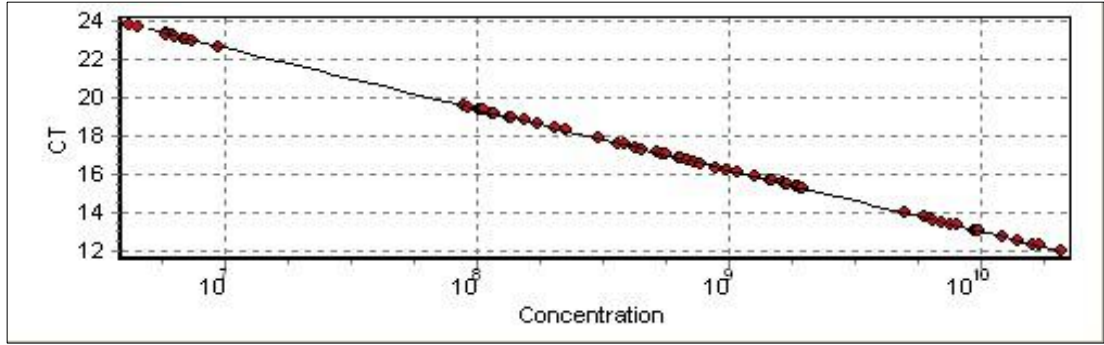
Total RNA'ları saflaştırılan hücrelerin öncelikle RNA konsantrasyonlarına bakıldı. RNA konsantrasyonları Tablo 4.9'de verildiği şekildedir. Bu konsantrasyonlara göre RT-qPCR master karışımları hazırlanarak her bir örnekten 3'er tekrarlı (n=3) 14 genin ifade düzeylerine bakıldı. Tablolarda verilen değerler ortalama değer ( $\pm$  standart sapma) şeklindedir.

**Tablo 4.9.** Uzun süreli inkübasyon sonrası alınan örneklerin ortalama RNA konsantrasyonları

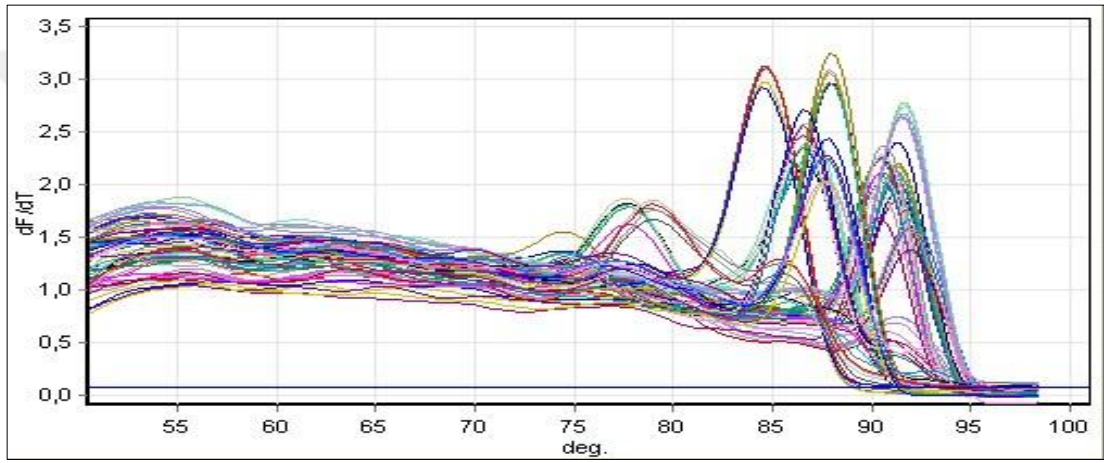
pH	RNA konsantrasyonları (ng/ $\mu$ l)			
	1	3	5	24
6.75	17,782( $\pm$ 1,254)	17,336( $\pm$ 2,045)	29,168( $\pm$ 2,411)	273,733( $\pm$ 10,231)
7.00	16,746( $\pm$ 1,755)	17,213( $\pm$ 1,775)	30,033( $\pm$ 2,456)	316,853( $\pm$ 5,714)
7.25	17,214( $\pm$ 0,997)	17,359( $\pm$ 2,455)	33,326( $\pm$ 1,857)	320,302( $\pm$ 9,718)
7.50	17,14( $\pm$ 1,554)	17,2( $\pm$ 0,978)	36,779( $\pm$ 1,025)	417,817( $\pm$ 8,459)
7.75	17,548( $\pm$ 1,284)	17,780( $\pm$ 0,824)	34,988( $\pm$ 2,984)	344,792( $\pm$ 10,244)



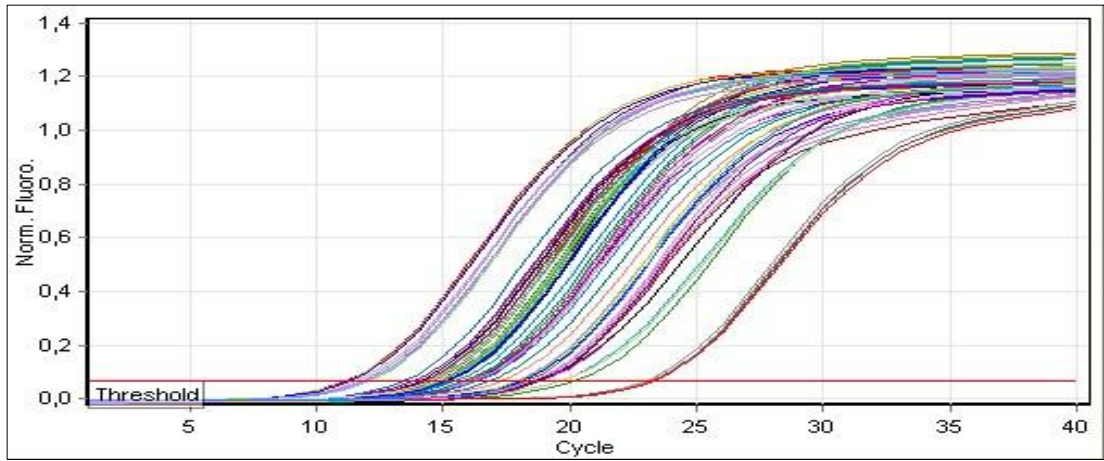
**Şekil 4.37.** 1. saat örneklerine ait birinci tekrar amplifikasyon grafiği



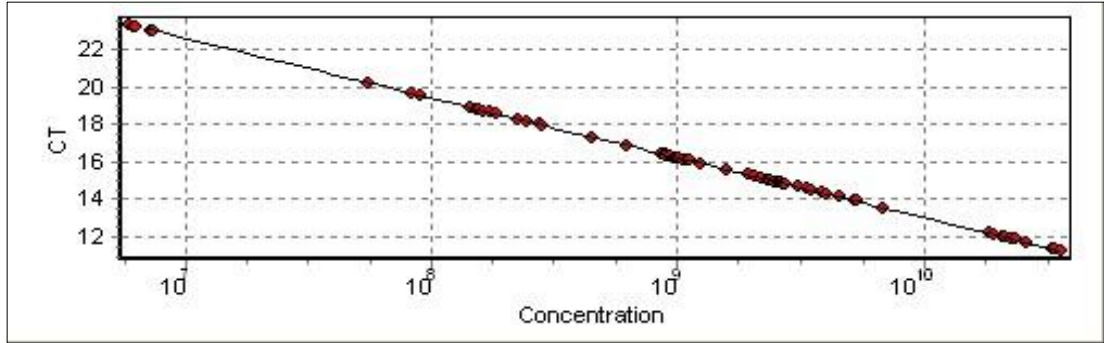
Şekil 4.38. 1. saat örneklerine ait birinci tekrar standart grafiği



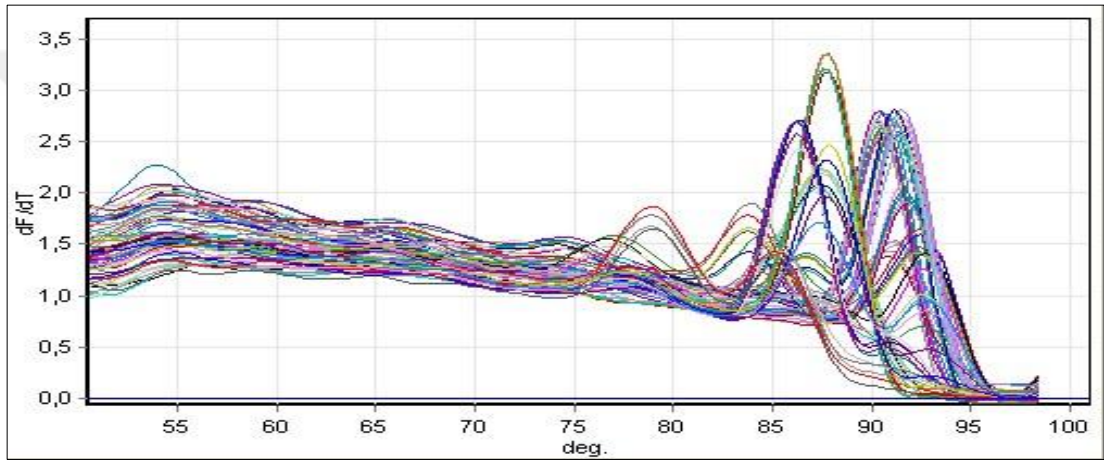
Şekil 4.39. 1. saat örneklerine ait birinci tekrar erime eğrisi



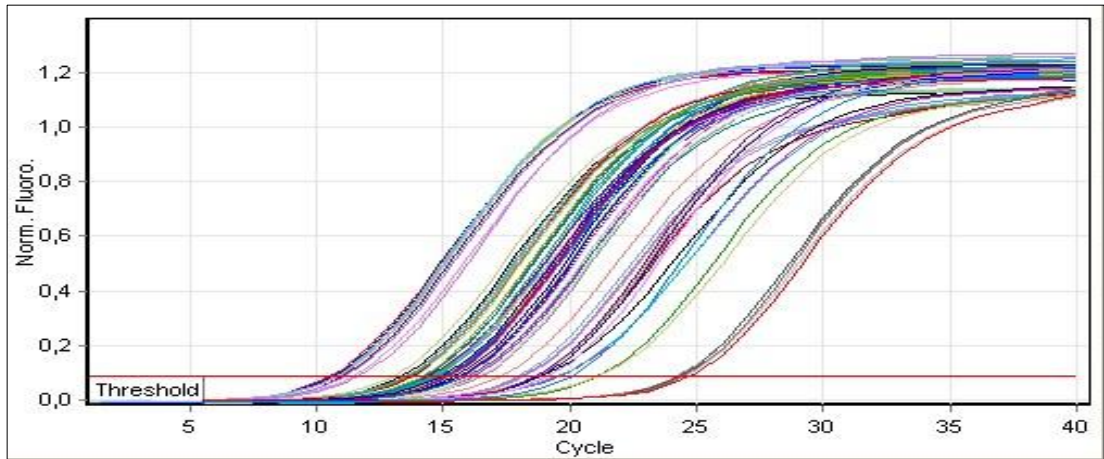
Şekil 4.40. 3. saat örneklerine ait birinci tekrar amplifikasyon grafiği



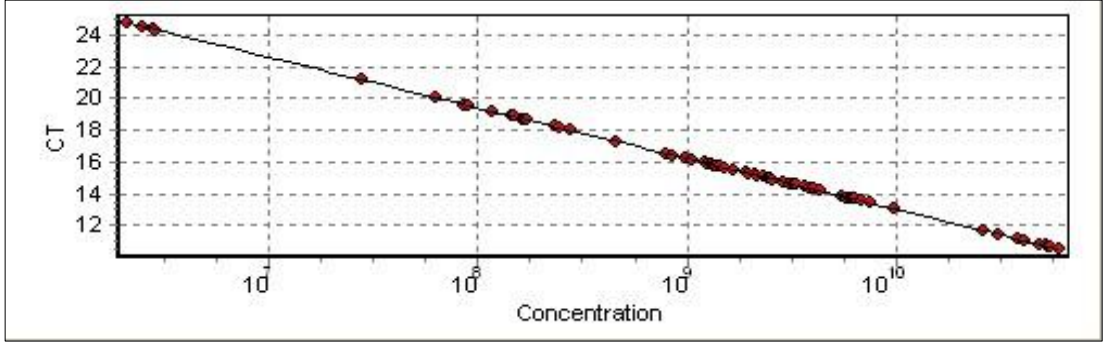
Şekil 4.41. 3. saat örneklerine ait birinci tekrar standart grafiği



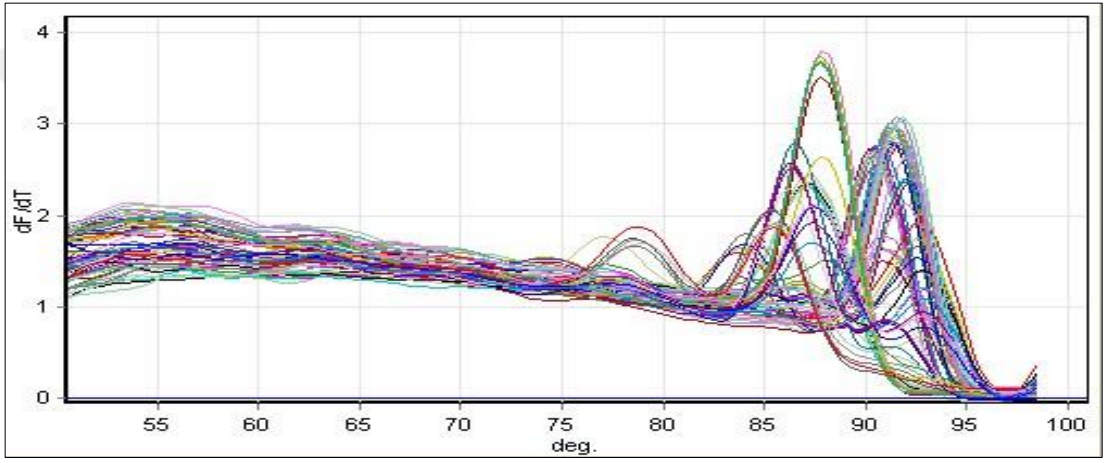
Şekil 4.42. 1. saat örneklerine ait birinci tekrar erime eğrisi



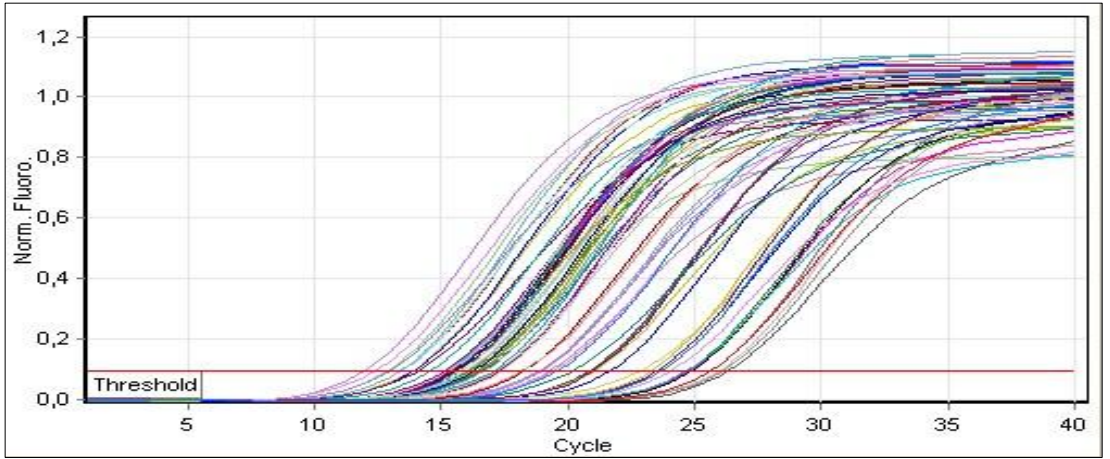
Şekil 4.43. 5. saat örneklerine ait birinci tekrar amplifikasyon grafiği



Şekil 4.44. 5. saat örneklerine ait birinci tekrar standart grafiği

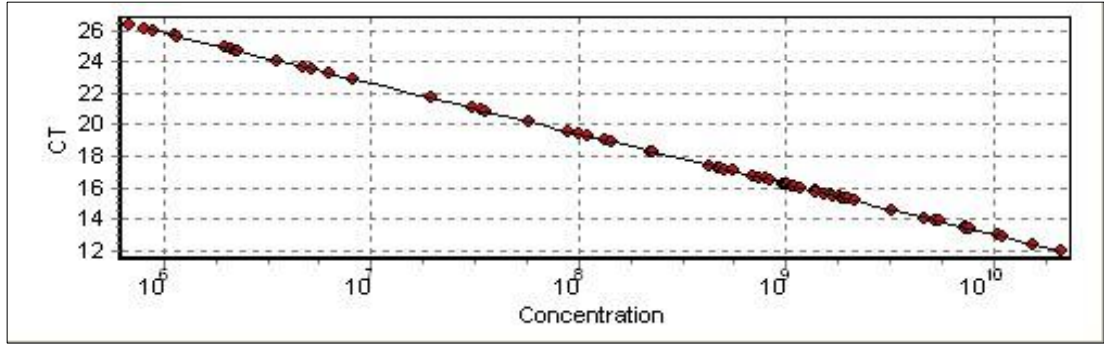


Şekil 4.45. 1. saat örneklerine ait birinci tekrar erime eğrisi

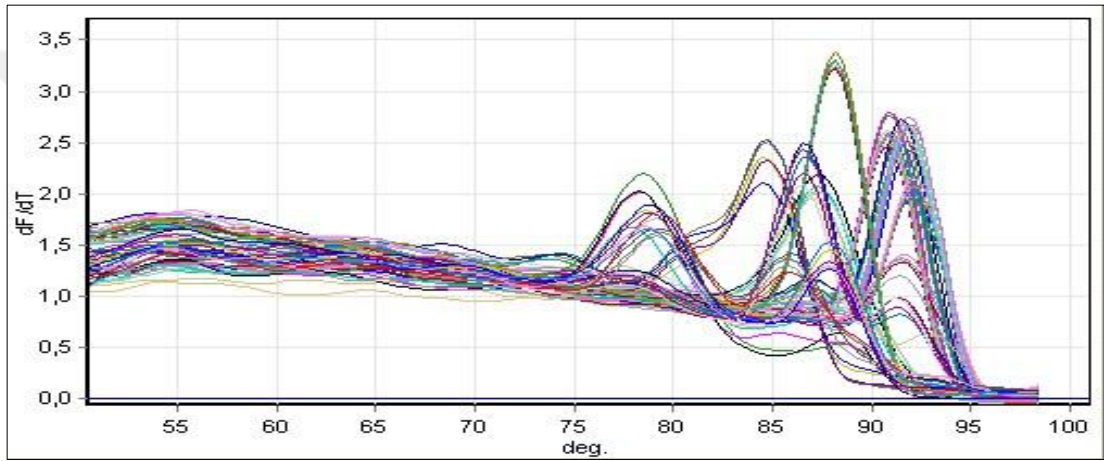


Şekil 4.46. 24. saat örneklerine ait birinci tekrar amplifikasyon grafiği





Şekil 4.47. 24. saat örneklerine ait birinci tekrar standart grafiği

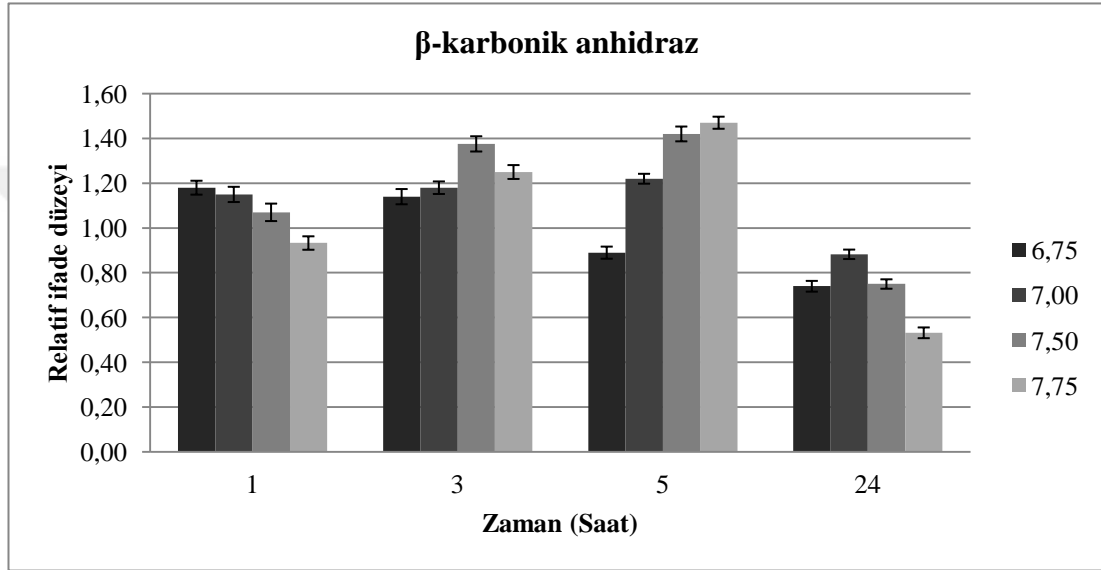


Şekil 4.48. 1. saat örneklerine ait birinci tekrar erime eğrisi

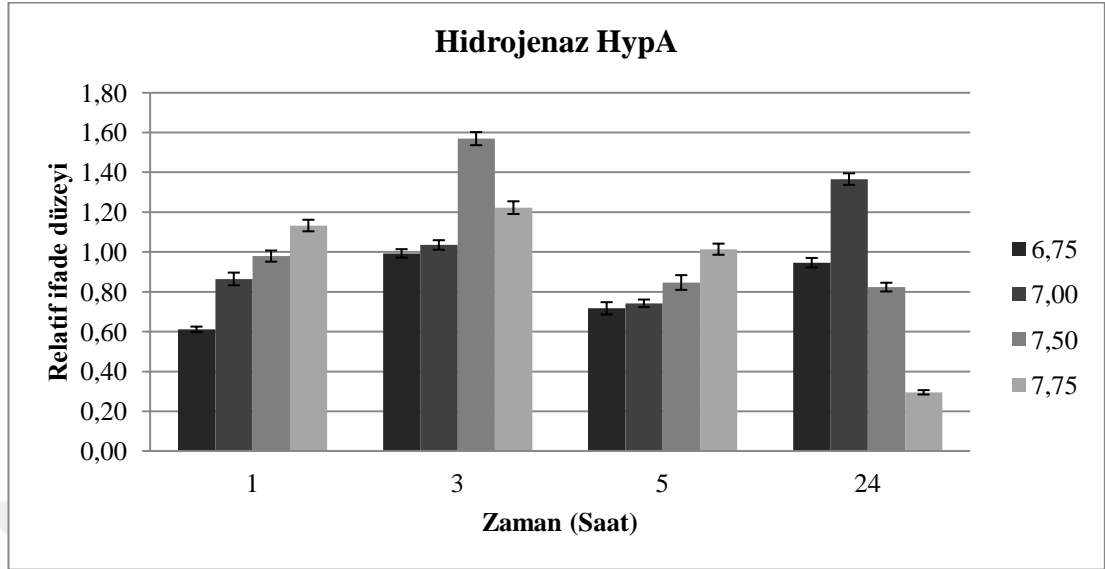
pH'sı 7.25 olan örnek kalibrasyon değeri için seçilerek diğer pH'larda normalizasyon için kullanıldı. Bunun sebebi *D. radiodurans*'ın gelişebilmesi için en uygun ortam pH'sınının 7.25 olmasıdır. Genlerin amplifikasyon grafiklerinde eşik değerleri belirlendi (Ct değerleri). İfade düzeyleri gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz referans alınarak Livak metoduna göre  $\Delta\Delta Ct$  değerinin hesaplanmasının ardından 2'nin negatif kuvveti şeklinde alınan ifade düzeyleri belirlendi ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) (Tablo 4.10-22). Üç tekrarlı gerçekleştirilen denemelerde elde edilen  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerlerinin standart sapmaları hesaplandı ve anlamlılık aralığı 0,05'den küçük ( $P < 0,05$ ) olacak şekilde değerlendirildi. Bu hesaplama ile çıkan relatif ifade düzeyleri o koşullar altında hedef genin, gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz genine göre kaç kat arttığı veya azaldığı belirlendi, hesaplanarak grafikler her gen için oluşturuldu (Şekil 4.49-61).

**Tablo 4.10.**  $\beta$ -karbonik anhidraz'ın  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

Besiyeri pH	$2^{-\Delta\Delta Ct}$			
	1. saat	3. saat	5. saat	24. saat
6,75	1,18 ( $\pm 0,031$ )	1,14 ( $\pm 0,034$ )	0,89 ( $\pm 0,027$ )	0,74 ( $\pm 0,024$ )
7,00	1,15 ( $\pm 0,034$ )	1,18 ( $\pm 0,028$ )	1,22 ( $\pm 0,022$ )	0,88 ( $\pm 0,021$ )
7,50	1,07 ( $\pm 0,039$ )	1,38 ( $\pm 0,034$ )	1,42 ( $\pm 0,033$ )	0,75 ( $\pm 0,021$ )
7,75	0,93 ( $\pm 0,030$ )	1,25 ( $\pm 0,031$ )	1,47 ( $\pm 0,027$ )	0,53 ( $\pm 0,024$ )

**Şekil 4.49.**  $\beta$ -karbonik anhidraz tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri**Tablo 4.11.** Hidrojenaz HypA'nın  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

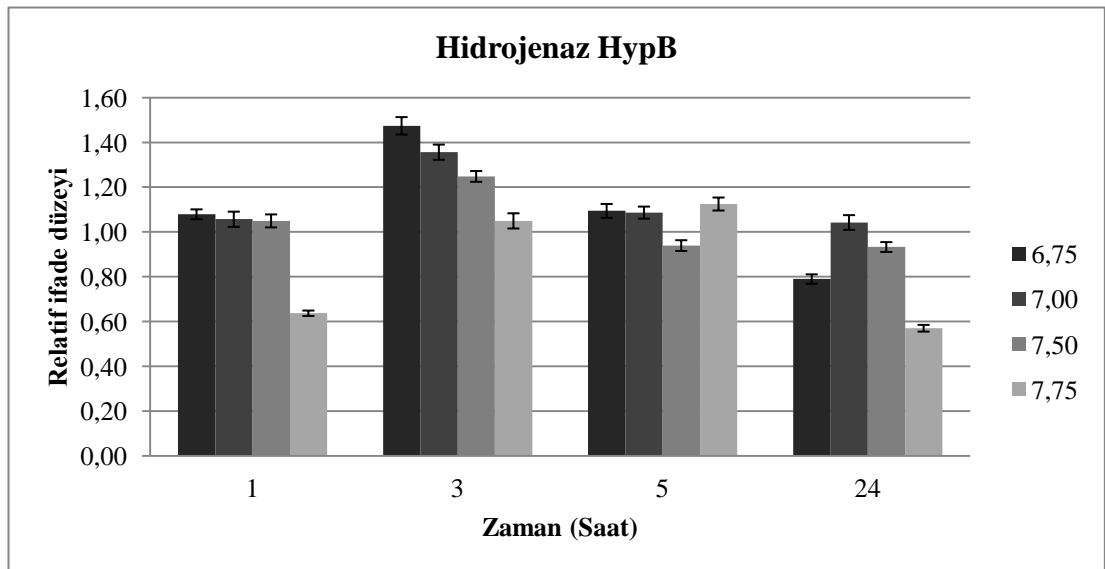
Besiyeri pH	$2^{-\Delta\Delta Ct}$			
	1. saat	3. saat	5. saat	24. saat
6,75	0,61 ( $\pm 0,014$ )	0,99 ( $\pm 0,021$ )	0,72 ( $\pm 0,031$ )	0,95 ( $\pm 0,024$ )
7,00	0,86 ( $\pm 0,032$ )	1,04 ( $\pm 0,024$ )	0,74 ( $\pm 0,019$ )	1,37 ( $\pm 0,029$ )
7,50	0,98 ( $\pm 0,028$ )	1,57 ( $\pm 0,033$ )	0,85 ( $\pm 0,037$ )	0,82 ( $\pm 0,022$ )
7,75	1,13 ( $\pm 0,029$ )	1,22 ( $\pm 0,032$ )	1,01 ( $\pm 0,028$ )	0,30 ( $\pm 0,009$ )



Şekil 4.50. Hidrojenaz HypA tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri

Tablo 4.12. Hidrojenaz HypB'nin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

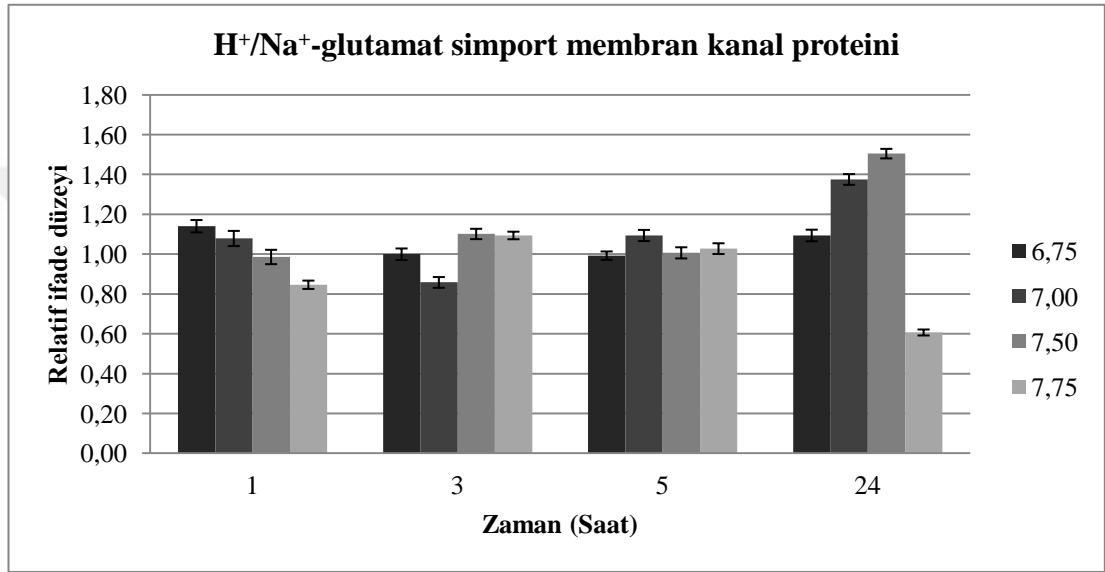
Besiyeri pH	$2^{-\Delta\Delta Ct}$			
	1. saat	3. saat	5. saat	24. saat
6,75	1,08 ( $\pm 0,022$ )	1,47 ( $\pm 0,039$ )	1,09 ( $\pm 0,031$ )	0,79 ( $\pm 0,021$ )
7,00	1,06 ( $\pm 0,034$ )	1,36 ( $\pm 0,034$ )	1,09 ( $\pm 0,027$ )	1,04 ( $\pm 0,033$ )
7,50	1,05 ( $\pm 0,029$ )	1,25 ( $\pm 0,024$ )	0,94 ( $\pm 0,024$ )	0,93 ( $\pm 0,022$ )
7,75	0,64 ( $\pm 0,012$ )	1,05 ( $\pm 0,034$ )	1,13 ( $\pm 0,029$ )	0,57 ( $\pm 0,014$ )



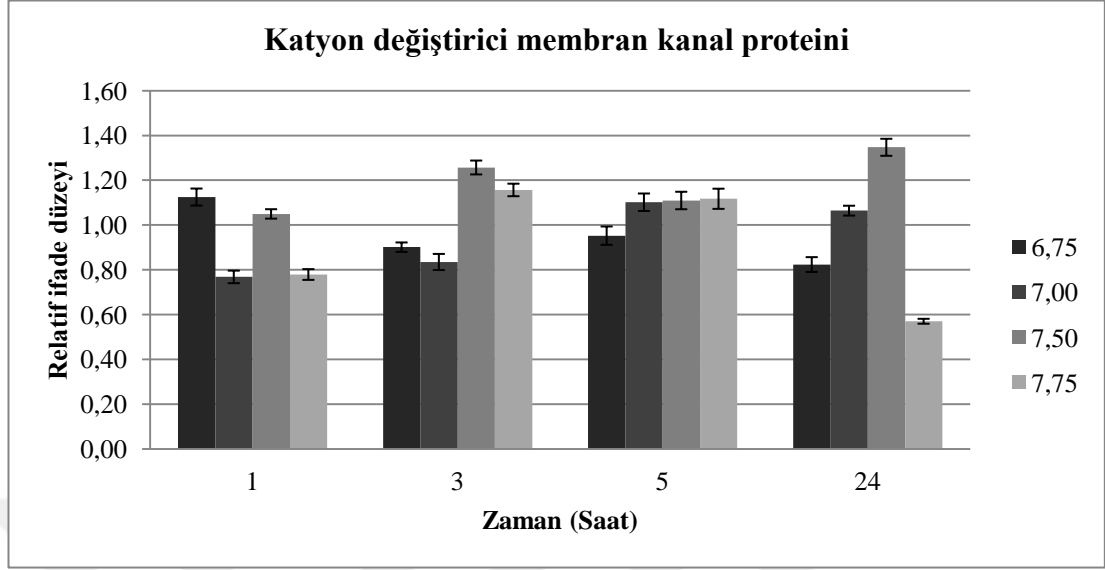
Şekil 4.51. Hidrojenaz HypB tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri

**Tablo 4.13.**  $H^+/Na^+$ -glutamat simport membran kanal proteini'nin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

Besiyeri pH	$2^{-\Delta\Delta Ct}$			
	1. saat	3. saat	5. saat	24. saat
6,75	1,14 ( $\pm 0,031$ )	1,00 ( $\pm 0,029$ )	0,99 ( $\pm 0,021$ )	1,09 ( $\pm 0,029$ )
7,00	1,08 ( $\pm 0,038$ )	0,86 ( $\pm 0,027$ )	1,09 ( $\pm 0,028$ )	1,38 ( $\pm 0,027$ )
7,50	0,99 ( $\pm 0,036$ )	1,10 ( $\pm 0,026$ )	1,01 ( $\pm 0,028$ )	1,51 ( $\pm 0,024$ )
7,75	0,85 ( $\pm 0,021$ )	1,09 ( $\pm 0,019$ )	1,03 ( $\pm 0,027$ )	0,61 ( $\pm 0,015$ )

**Şekil 4.52.**  $H^+/Na^+$ -glutamat simport membran kanal proteini tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri**Tablo 4.14.** Katyon değiştirici membran kanal proteini'nin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

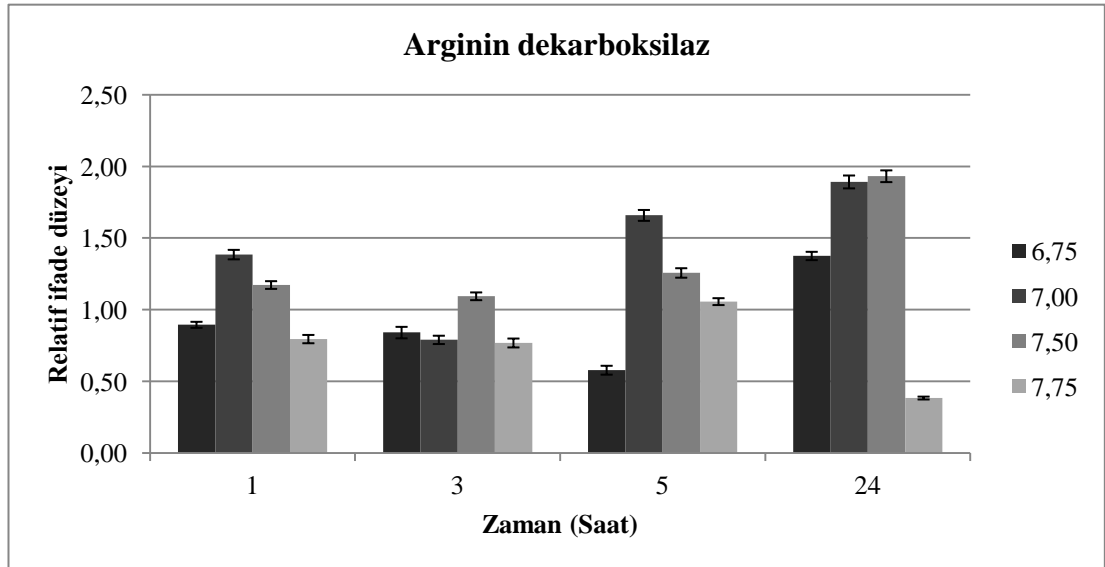
Besiyeri pH	$2^{-\Delta\Delta Ct}$			
	1. saat	3. saat	5. saat	24. saat
6,75	1,13 ( $\pm 0,038$ )	0,90 ( $\pm 0,021$ )	0,95 ( $\pm 0,041$ )	0,82 ( $\pm 0,033$ )
7,00	0,77 ( $\pm 0,028$ )	0,84 ( $\pm 0,036$ )	1,10 ( $\pm 0,039$ )	1,06 ( $\pm 0,022$ )
7,50	1,05 ( $\pm 0,021$ )	1,26 ( $\pm 0,031$ )	1,11 ( $\pm 0,039$ )	1,35 ( $\pm 0,038$ )
7,75	0,78 ( $\pm 0,024$ )	1,16 ( $\pm 0,028$ )	1,12 ( $\pm 0,045$ )	0,57 ( $\pm 0,011$ )



Şekil 4.53. Katyon değiştirici membran kanal proteini tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri

Tablo 4.15. Arginin dekarboksilaz'ın  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

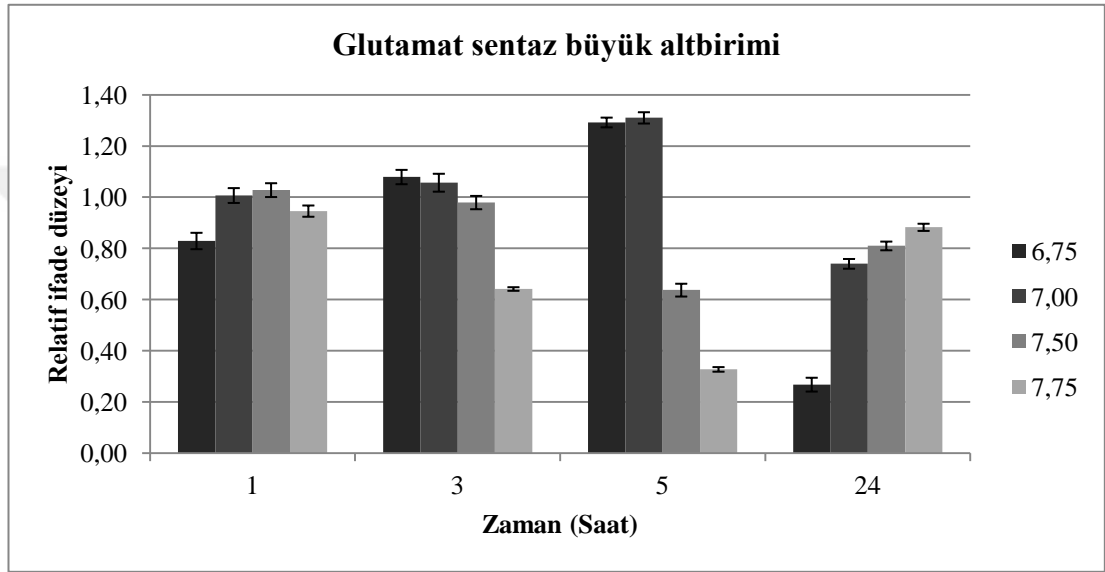
Besiyeri pH	$2^{-\Delta\Delta Ct}$			
	1. saat	3. saat	5. saat	24. saat
6,75	0,90 ( $\pm 0,021$ )	0,84 ( $\pm 0,040$ )	0,58 ( $\pm 0,031$ )	1,38 ( $\pm 0,029$ )
7,00	1,39 ( $\pm 0,033$ )	0,79 ( $\pm 0,029$ )	1,66 ( $\pm 0,038$ )	1,89 ( $\pm 0,045$ )
7,50	1,17 ( $\pm 0,027$ )	1,09 ( $\pm 0,027$ )	1,26 ( $\pm 0,033$ )	1,93 ( $\pm 0,041$ )
7,75	0,80 ( $\pm 0,029$ )	0,77 ( $\pm 0,031$ )	1,06 ( $\pm 0,024$ )	0,38 ( $\pm 0,010$ )



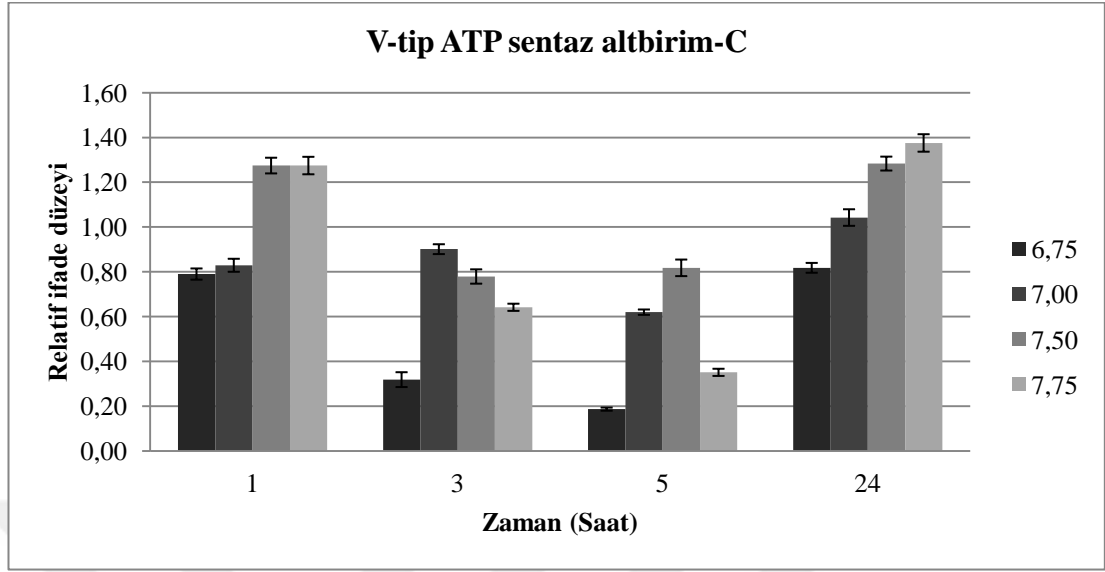
Şekil 4.54. Arginin dekarboksilaz tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri

**Tablo 4.16.** Glutamat sentaz büyük altbirimi'nin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

Besiyeri pH	$2^{-\Delta\Delta Ct}$			
	1. saat	3. saat	5. saat	24. saat
6,75	0,83 ( $\pm 0,032$ )	1,08 ( $\pm 0,028$ )	1,29 ( $\pm 0,019$ )	0,27 ( $\pm 0,027$ )
7,00	1,01 ( $\pm 0,029$ )	1,06 ( $\pm 0,035$ )	1,31 ( $\pm 0,022$ )	1,12 ( $\pm 0,019$ )
7,50	1,03 ( $\pm 0,027$ )	0,98 ( $\pm 0,026$ )	0,64 ( $\pm 0,025$ )	0,75 ( $\pm 0,017$ )
7,75	0,95 ( $\pm 0,022$ )	0,64 ( $\pm 0,007$ )	0,33 ( $\pm 0,009$ )	0,88 ( $\pm 0,014$ )

**Şekil 4.55.** Glutamat sentaz büyük altbirimi tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri**Tablo 4.17.** V-tip ATP sentaz altbirim-C'nin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

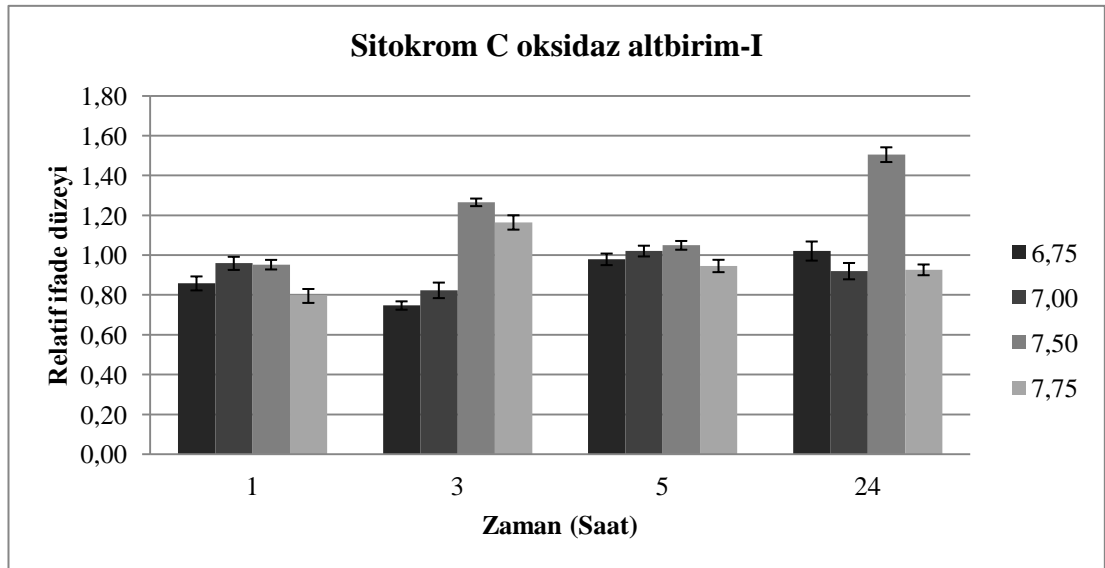
Besiyeri pH	$2^{-\Delta\Delta Ct}$			
	1. saat	3. saat	5. saat	24. saat
6,75	0,79 ( $\pm 0,025$ )	0,32 ( $\pm 0,033$ )	0,19 ( $\pm 0,007$ )	0,82 ( $\pm 0,022$ )
7,00	0,83 ( $\pm 0,029$ )	0,90 ( $\pm 0,022$ )	0,62 ( $\pm 0,012$ )	1,04 ( $\pm 0,037$ )
7,50	1,27 ( $\pm 0,035$ )	0,78 ( $\pm 0,032$ )	0,82 ( $\pm 0,037$ )	1,28 ( $\pm 0,031$ )
7,75	1,27 ( $\pm 0,039$ )	0,64 ( $\pm 0,016$ )	0,35 ( $\pm 0,016$ )	1,38 ( $\pm 0,039$ )



Şekil 4.56. V-tip ATP sentaz altbirim-C tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri

Tablo 4.18. Sitokrom C oksidaz altbirim-I'in  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

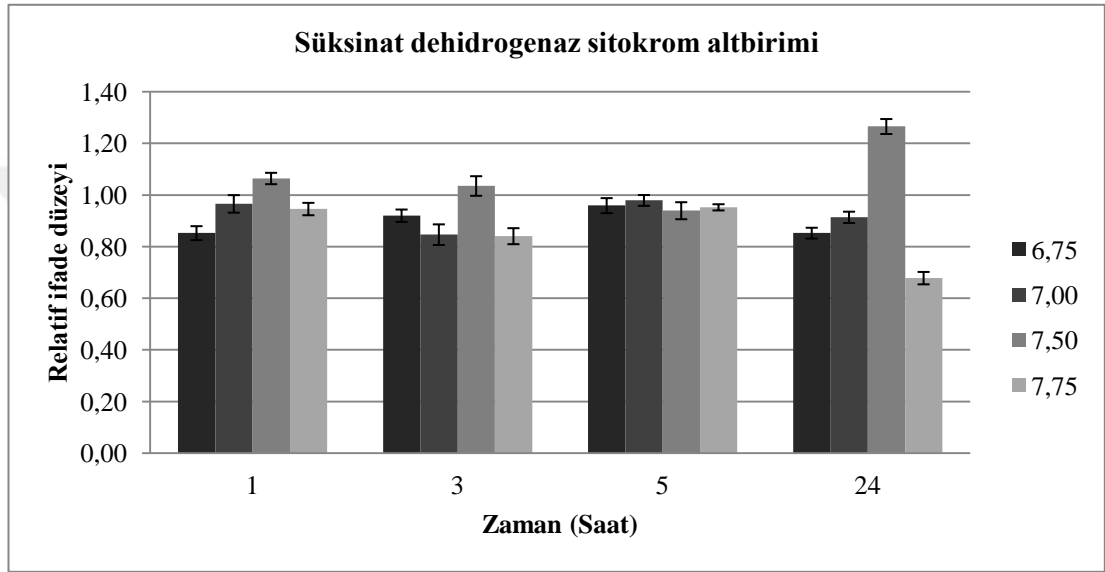
Besiyeri pH	$2^{-\Delta\Delta Ct}$			
	1. saat	3. saat	5. saat	24. saat
6,75	0,86 ( $\pm 0,035$ )	0,75 ( $\pm 0,021$ )	0,98 ( $\pm 0,029$ )	1,02 ( $\pm 0,048$ )
7,00	0,96 ( $\pm 0,033$ )	0,82 ( $\pm 0,039$ )	1,02 ( $\pm 0,027$ )	0,92 ( $\pm 0,041$ )
7,50	0,95 ( $\pm 0,024$ )	1,27 ( $\pm 0,019$ )	1,05 ( $\pm 0,022$ )	1,51 ( $\pm 0,037$ )
7,75	0,80 ( $\pm 0,035$ )	1,16 ( $\pm 0,036$ )	0,95 ( $\pm 0,031$ )	0,93 ( $\pm 0,027$ )



Şekil 4.57. Sitokrom C oksidaz altbirim-I tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri

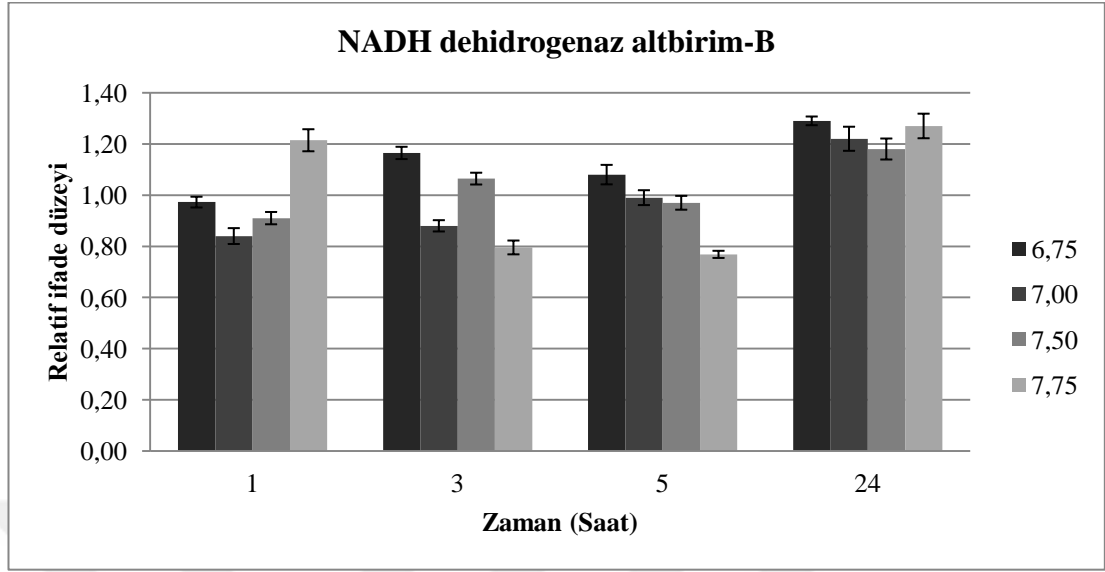
**Tablo 4.19.** Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi'nin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

Besiyeri pH	$2^{-\Delta\Delta Ct}$			
	1. saat	3. saat	5. saat	24. saat
6,75	0,85 ( $\pm 0,027$ )	0,92 ( $\pm 0,024$ )	0,96 ( $\pm 0,029$ )	0,85 ( $\pm 0,021$ )
7,00	0,97 ( $\pm 0,034$ )	0,85 ( $\pm 0,040$ )	0,98 ( $\pm 0,021$ )	0,91 ( $\pm 0,022$ )
7,50	1,06 ( $\pm 0,022$ )	1,04 ( $\pm 0,038$ )	0,94 ( $\pm 0,033$ )	1,27 ( $\pm 0,029$ )
7,75	0,95 ( $\pm 0,024$ )	0,84 ( $\pm 0,031$ )	0,95 ( $\pm 0,012$ )	0,68 ( $\pm 0,024$ )

**Şekil 4.58.** Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri**Tablo 4.20.** NADH dehidrogenaz altbirim-B'nin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

Besiyeri pH	$2^{-\Delta\Delta Ct}$			
	1. saat	3. saat	5. saat	24. saat
6,75	0,97 ( $\pm 0,021$ )	1,16 ( $\pm 0,024$ )	1,08 ( $\pm 0,038$ )	1,29 ( $\pm 0,017$ )
7,00	0,84 ( $\pm 0,031$ )	0,88 ( $\pm 0,022$ )	0,99 ( $\pm 0,029$ )	1,22 ( $\pm 0,047$ )
7,50	0,91 ( $\pm 0,024$ )	1,06 ( $\pm 0,023$ )	0,97 ( $\pm 0,027$ )	1,18 ( $\pm 0,041$ )
7,75	1,21 ( $\pm 0,043$ )	0,80 ( $\pm 0,027$ )	0,77 ( $\pm 0,014$ )	1,27 ( $\pm 0,048$ )

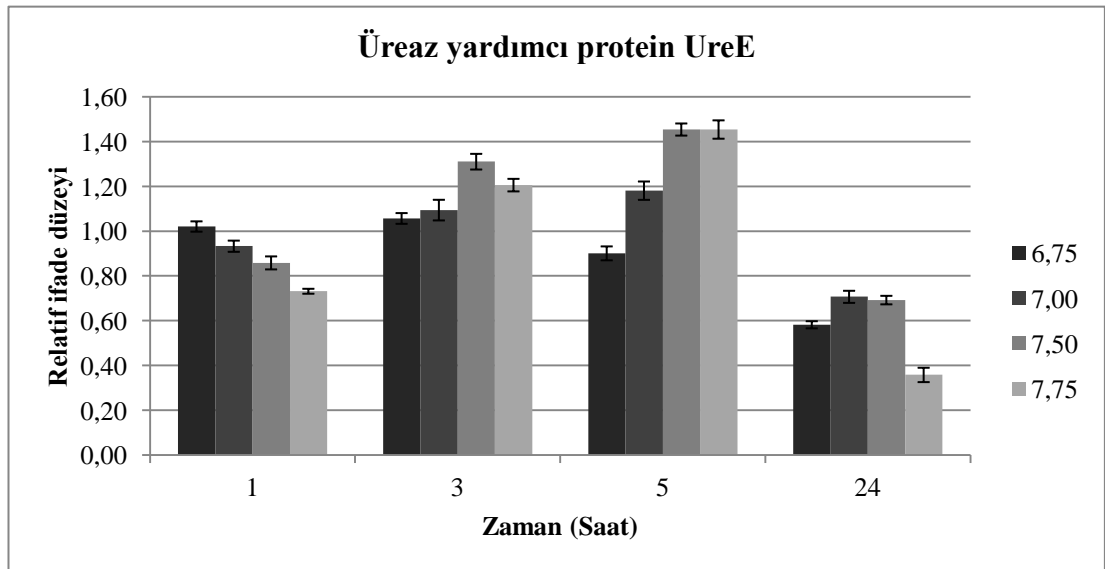




Şekil 4.59. NADH dehidrogenaz altbirim-B tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri

Tablo 4.21. Üreaz yardımcı protein UreE'nin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

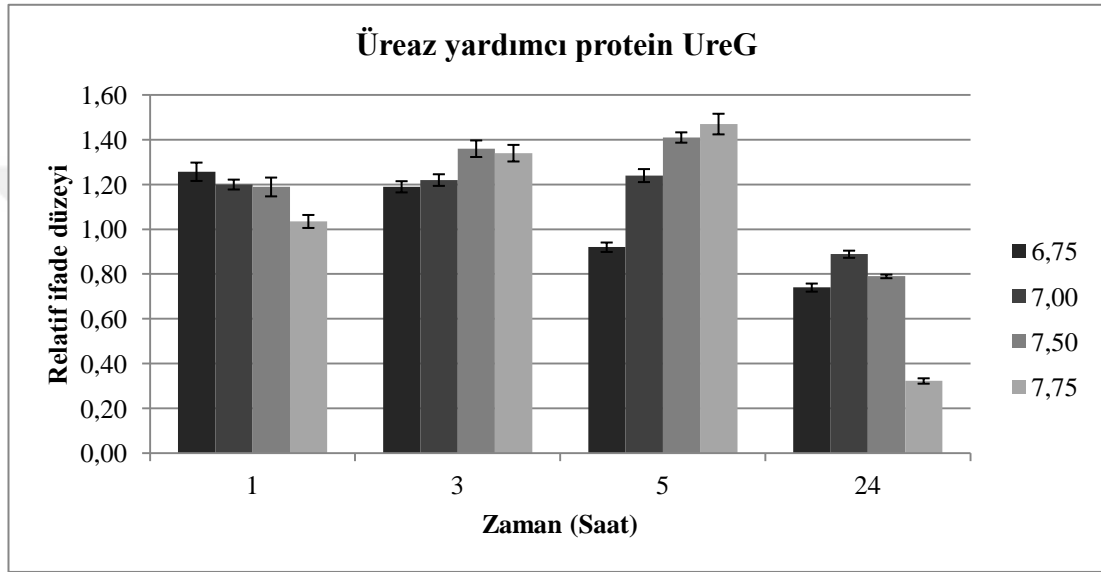
Besiyeri pH	$2^{-\Delta\Delta Ct}$			
	1. saat	3. saat	5. saat	24. saat
6,75	1,02 ( $\pm 0,023$ )	1,06 ( $\pm 0,024$ )	0,90 ( $\pm 0,031$ )	0,58 ( $\pm 0,016$ )
7,00	0,93 ( $\pm 0,025$ )	1,09 ( $\pm 0,046$ )	1,18 ( $\pm 0,041$ )	0,71 ( $\pm 0,027$ )
7,50	0,86 ( $\pm 0,029$ )	1,31 ( $\pm 0,035$ )	1,45 ( $\pm 0,027$ )	0,69 ( $\pm 0,019$ )
7,75	0,73 ( $\pm 0,011$ )	1,21 ( $\pm 0,028$ )	1,45 ( $\pm 0,041$ )	0,36 ( $\pm 0,032$ )



Şekil 4.60. Üreaz yardımcı protein UreE tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri

**Tablo 4.22.** Üreaz yardımcı protein UreG'nin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

Besiyeri pH	$2^{-\Delta\Delta Ct}$			
	1. saat	3. saat	5. saat	24. saat
6,75	1,26 ( $\pm 0,041$ )	1,19 ( $\pm 0,025$ )	0,92 ( $\pm 0,021$ )	0,74 ( $\pm 0,018$ )
7,00	1,20 ( $\pm 0,022$ )	1,22 ( $\pm 0,026$ )	1,24 ( $\pm 0,029$ )	0,89 ( $\pm 0,016$ )
7,50	1,19 ( $\pm 0,042$ )	1,36 ( $\pm 0,037$ )	1,41 ( $\pm 0,023$ )	0,79 ( $\pm 0,008$ )
7,75	1,04 ( $\pm 0,029$ )	1,34 ( $\pm 0,037$ )	1,47 ( $\pm 0,046$ )	0,32 ( $\pm 0,012$ )

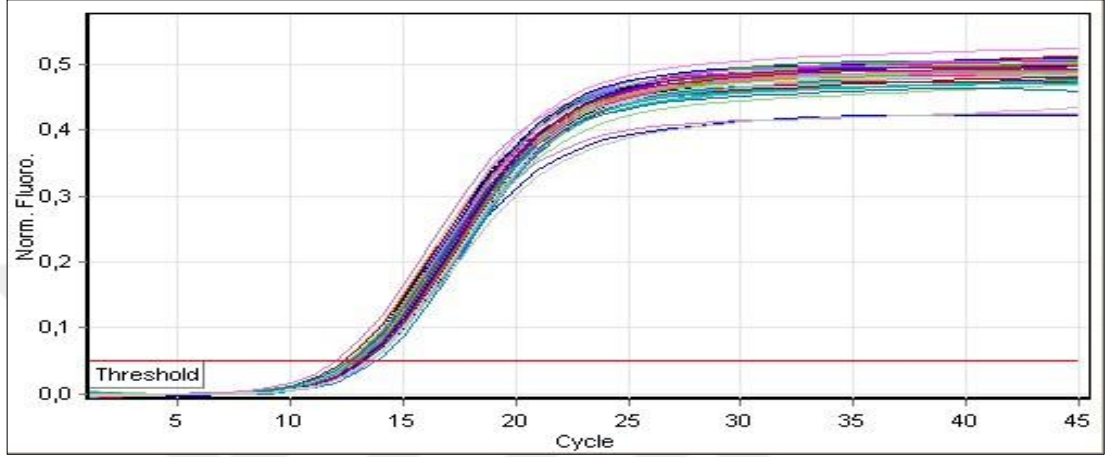
**Şekil 4.61.** Üreaz yardımcı protein UreG tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri

#### 4.7. Kısa Süreli İnkübasyon Sonrası Gen İfade Düzeyleri

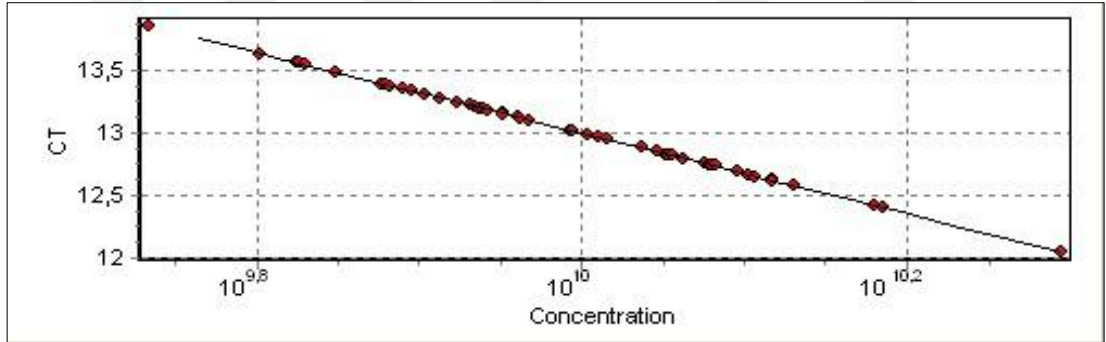
pH'ları 6.75, 7.00, 7.25, 7.50 ve 7.75'ye ayarlanmış 100 ml'lik erlenlerdeki 38 ml steril TGY besiyerlerine *D. radiodurans*'ın O/N kültüründen 0,4 ml ile inokülasyon yapılarak 200 rpm'de 32 °C'de 1 saat inkübe edildi. 10., 20., 30., 40. ve 60. dakikalarda üçerli örnek alınarak RNA saflaştırması yapıldı.

Bu örneklerden RT-qPCR yöntemi ile genlerin ifadelerine bakıldı. Birinci tekrar amplifikasyon grafikleri Şekil 4.62, Şekil 4.65, Şekil 4.68, Şekil 4.71, Şekil 4.74, Şekil 4.77 ve Şekil 4.80'da verildiği şekildedir. cDNA ve Syber Green 1 boyasına ait oluşturulmuş standart grafikleriyle gen konsantrasyonları kantitatif olarak belirlenmiştir (Şekil 4.63, Şekil 4.66, Şekil 4.69, Şekil 4.72, Şekil 4.75, Şekil 4.78, Şekil 4.81).

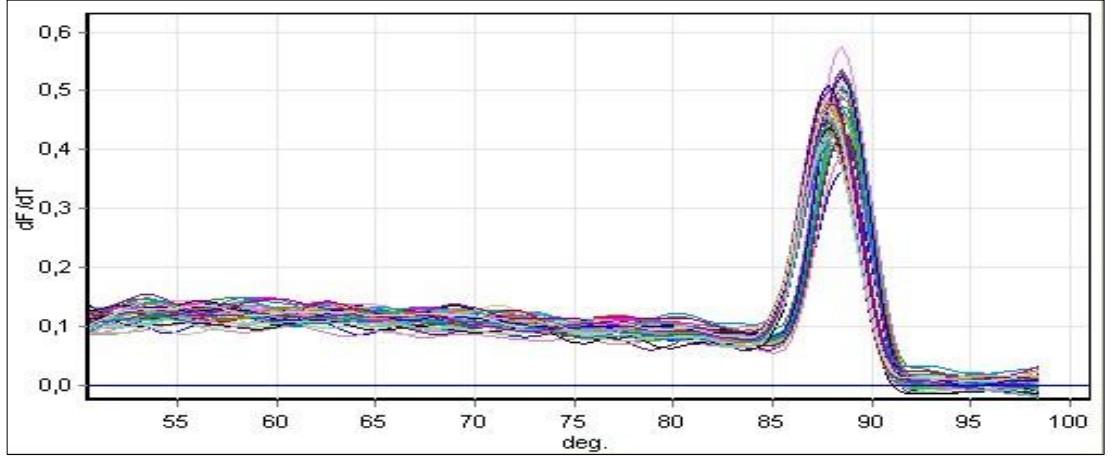
Genlere ait erime eğrisi grafikleri ile amplikonların  $T_m$  değerleri üzerinden değerlendirme yapılarak hedef genlerin spesifik olarak çoğaltıldığı belirlenmiştir (Şekil 4.64, Şekil 4.67, Şekil 4.70, Şekil 4.73, Şekil 4.76, Şekil 4.79, Şekil 4.82).



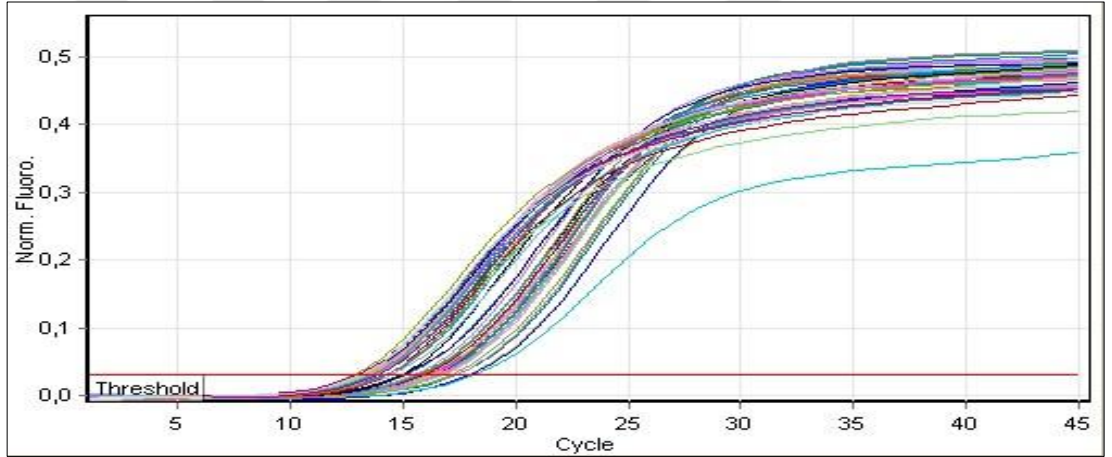
**Şekil 4.62.** Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz ve  $\beta$ -Karbonik anhidraz genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika amplifikasyon grafiği



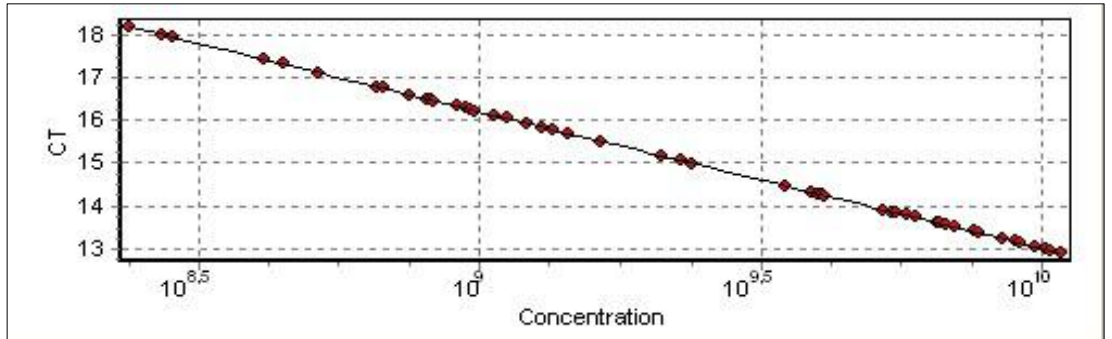
**Şekil 4.63.** Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz ve  $\beta$ -Karbonik anhidraz genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika standart grafiği



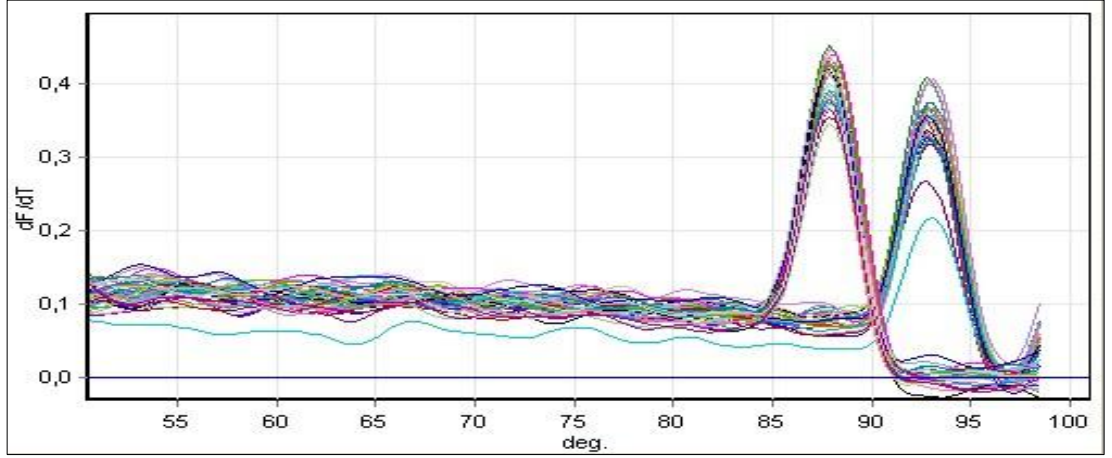
Şekil 4.64. Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz ve  $\beta$ -Karbonik anhidraz genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika erime eğrisi



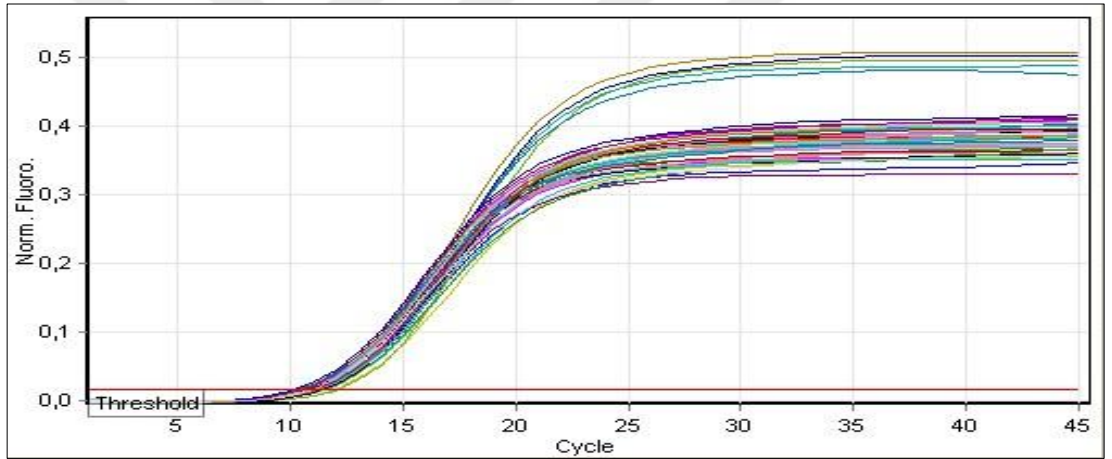
Şekil 4.65. Hidrojenaz HypA ve Hidrojenaz HypB genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika amplifikasyon grafiği



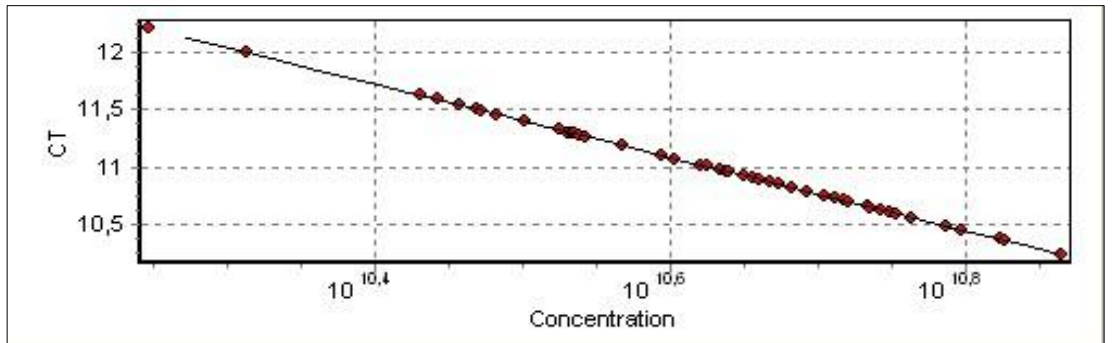
Şekil 4.66. Hidrojenaz HypA ve Hidrojenaz HypB genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika standart grafiği



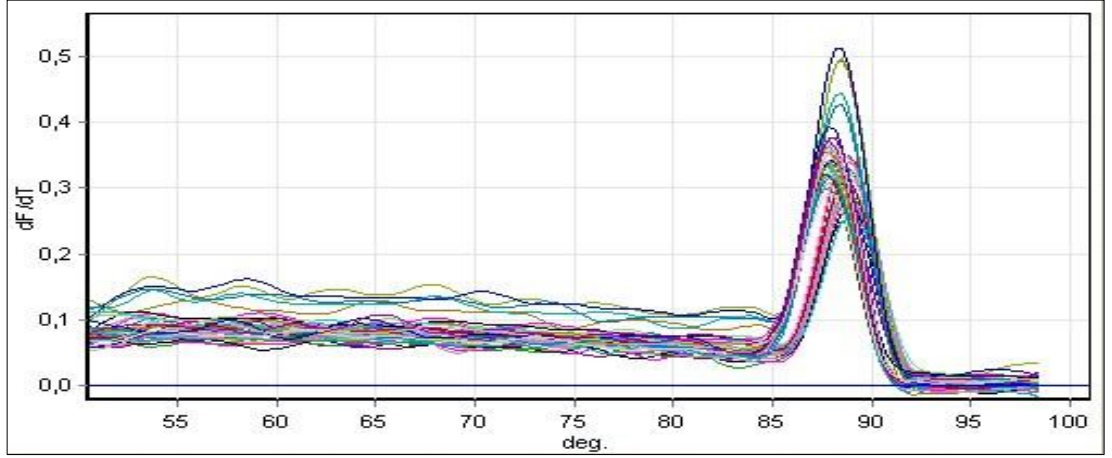
**Şekil 4.67.** Hidrojenaz HypA ve Hidrojenaz HypB genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika erime eğrisi



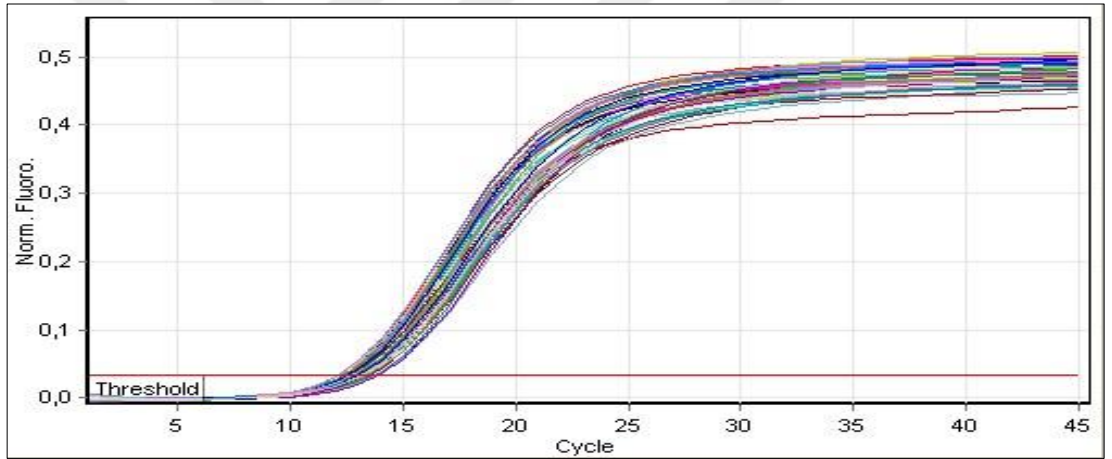
**Şekil 4.68.**  $H^+/Na^+$ -glutamat simport membran kanal proteini ve Katyon değiştirici membran kanal proteini genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika amplifikasyon grafiği



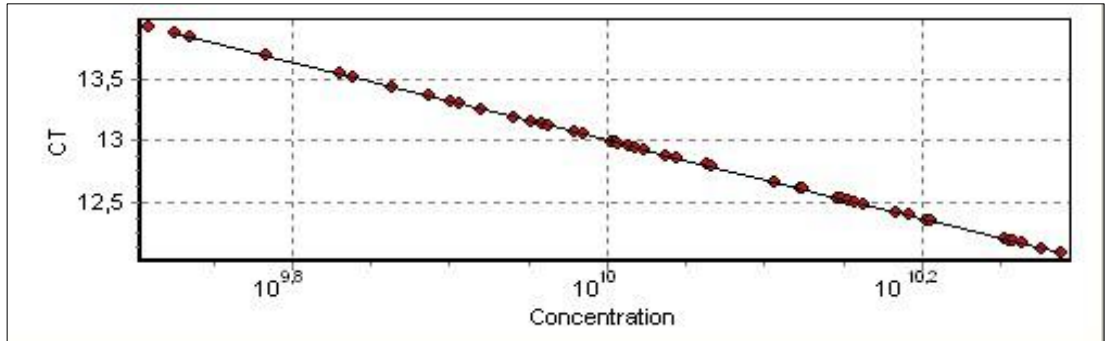
**Şekil 4.69.**  $H^+/Na^+$ -glutamat simport membran kanal proteini ve Katyon değiştirici membran kanal proteini genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika standart grafiği



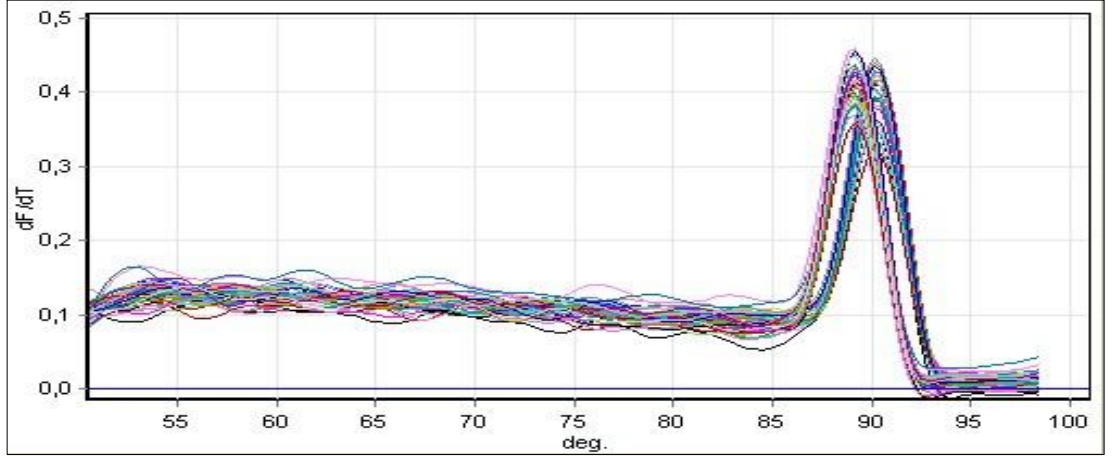
**Şekil 4.70.**  $H^+/Na^+$ -glutamat simport membran kanal proteini ve Katyon değiştirici membran kanal proteini genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika erime eğrisi



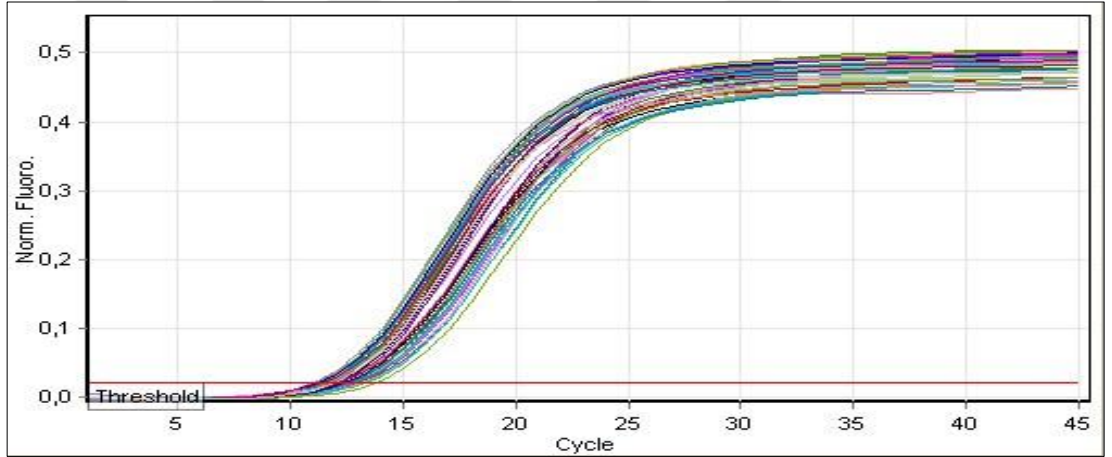
**Şekil 4.71.** Arginin dekarboksilaz ve Glutamat sentaz büyük altbirimi genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika amplifikasyon grafiği



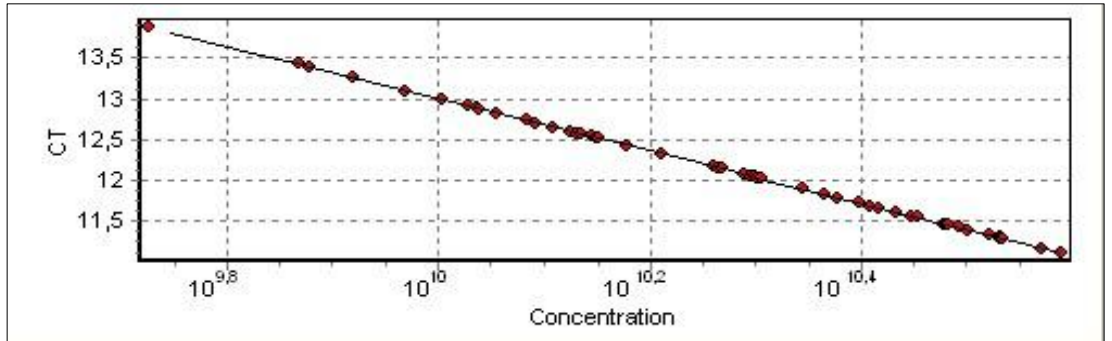
**Şekil 4.72.** Arginin dekarboksilaz ve Glutamat sentaz büyük altbirimi genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika standart grafiği



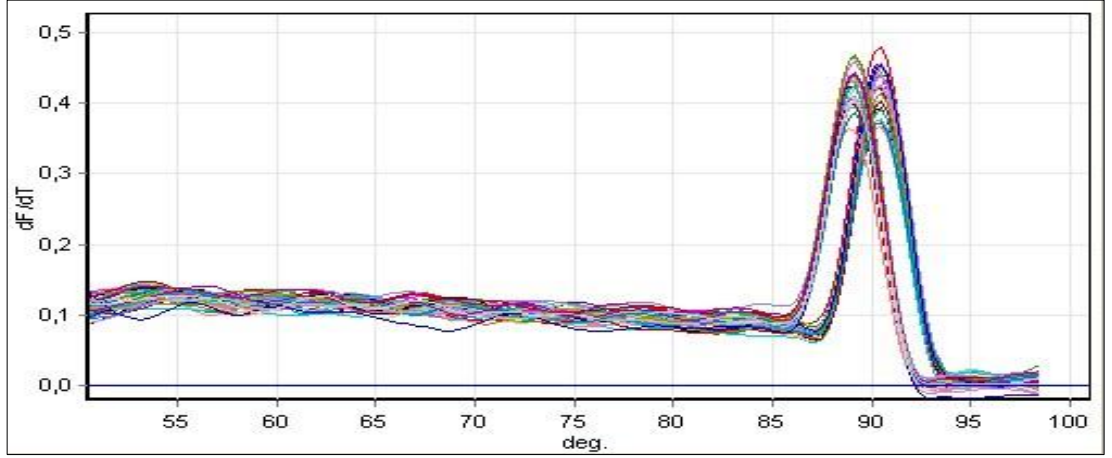
Şekil 4.73. Arginin dekarboksilaz ve Glutamat sentaz büyük altbirimi genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika erime eğrisi



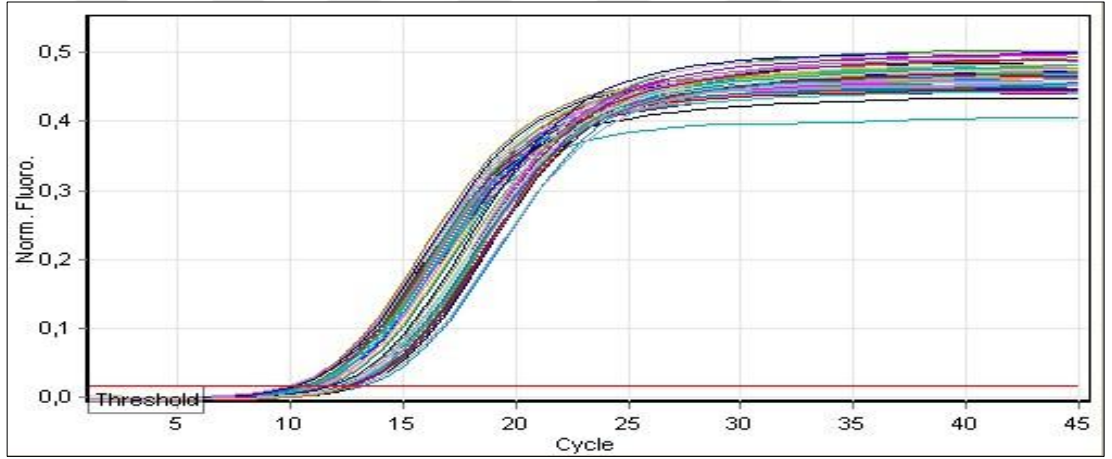
Şekil 4.74. V-tip ATP sentaz altbirim-C ve Sitokrom C oksidaz altbirim-I genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika amplifikasyon grafiği



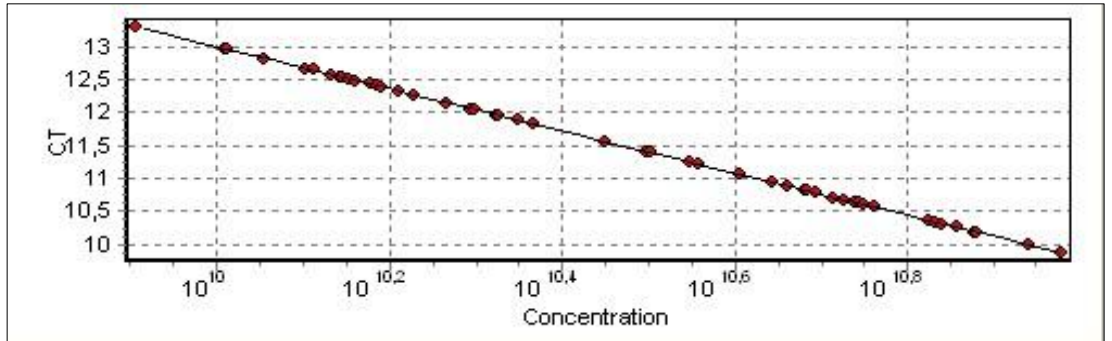
Şekil 4.75. V-tip ATP sentaz altbirim-C ve Sitokrom C oksidaz altbirim-I genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika standart grafiği



**Şekil 4.76.** V-tip ATP sentaz altbirim-C ve Sitokrom C oksidaz altbirim-I genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika erime eğrisi

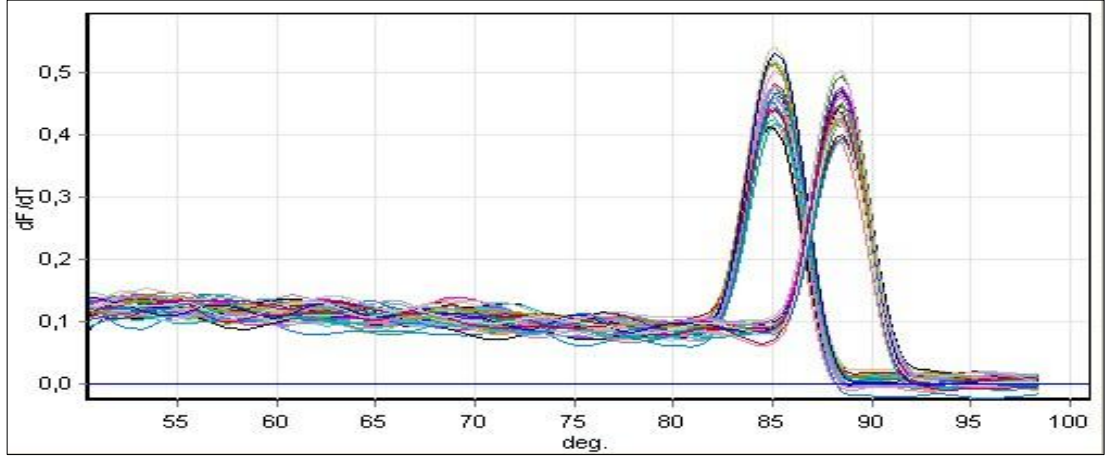


**Şekil 4.77.** Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi ve NADH dehidrogenaz altbirim-B genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika amplifikasyon grafiği

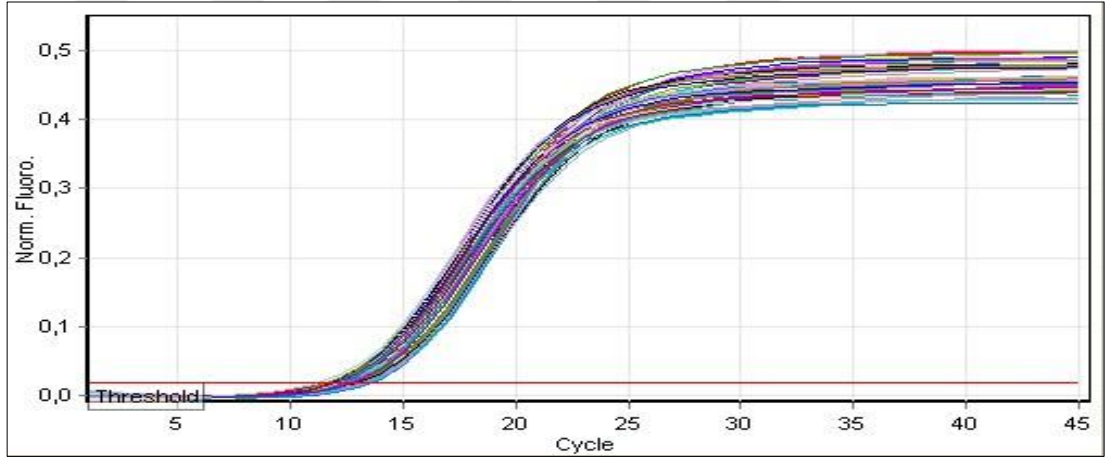


**Şekil 4.78.** Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi ve NADH dehidrogenaz altbirim-B genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika standart grafiği

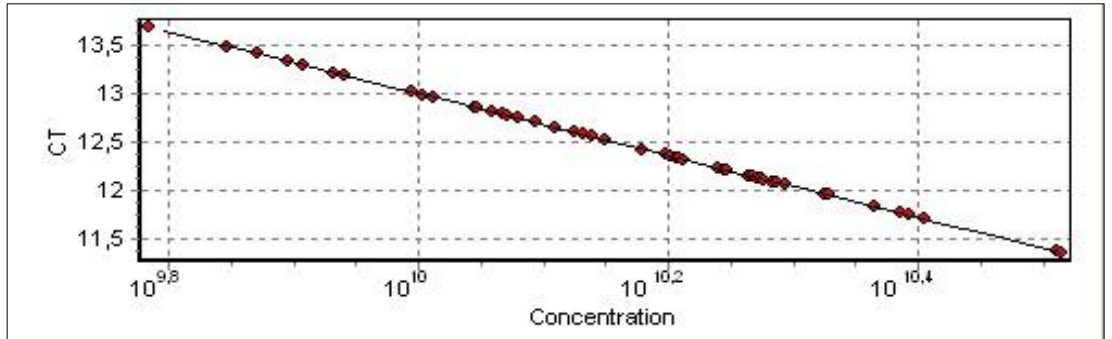




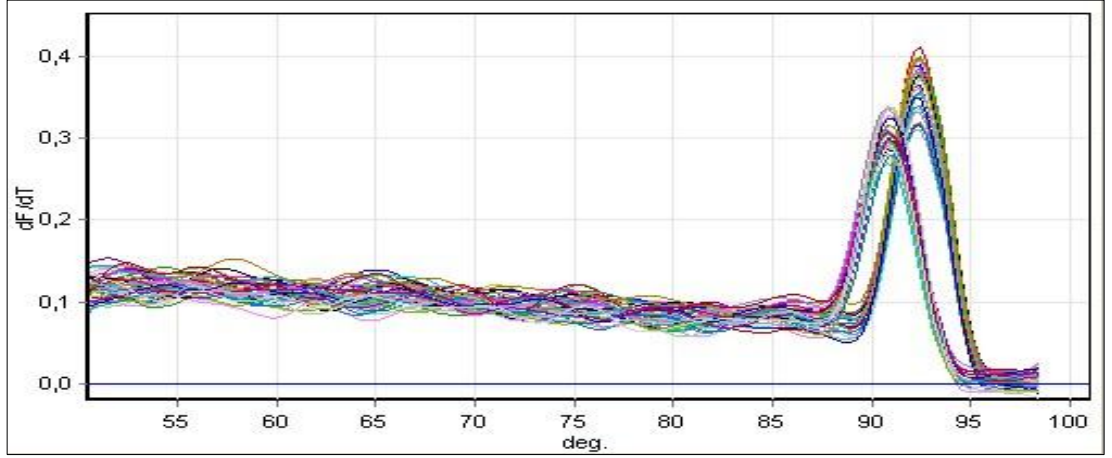
**Şekil 4.79.** Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi ve NADH dehidrogenaz altbirim-B genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika erime eğrisi



**Şekil 4.80.** Üreaz yardımcı protein UreE ve Üreaz yardımcı protein UreG genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika amplifikasyon grafiği



**Şekil 4.81.** Üreaz yardımcı protein UreE ve Üreaz yardımcı protein UreG genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika standart grafiği

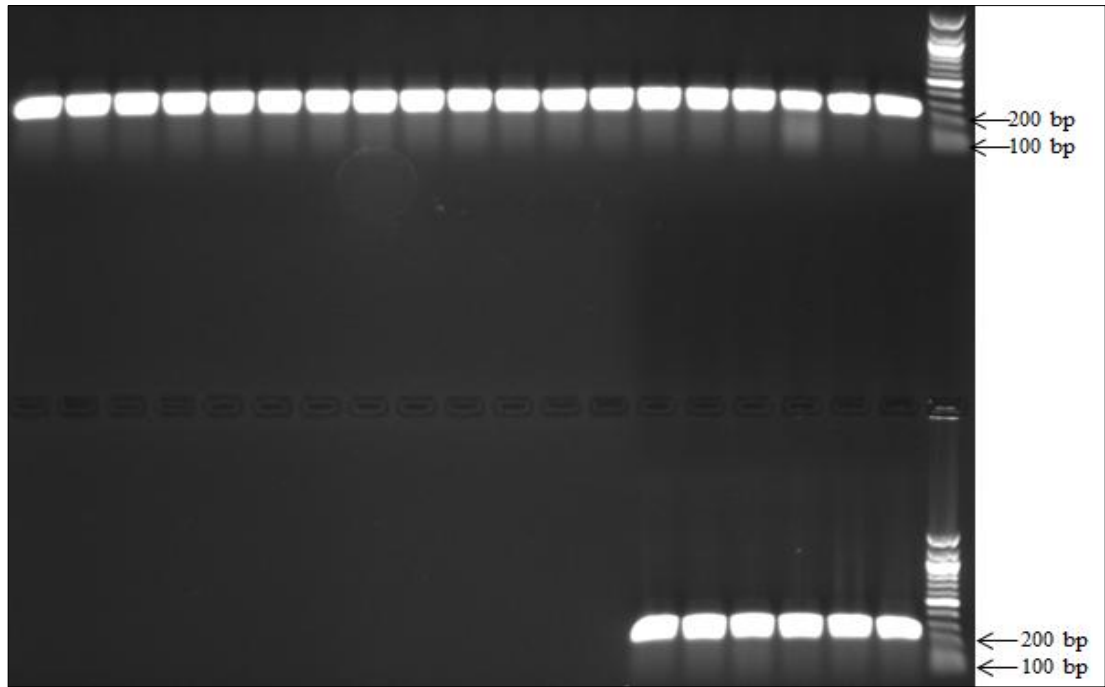


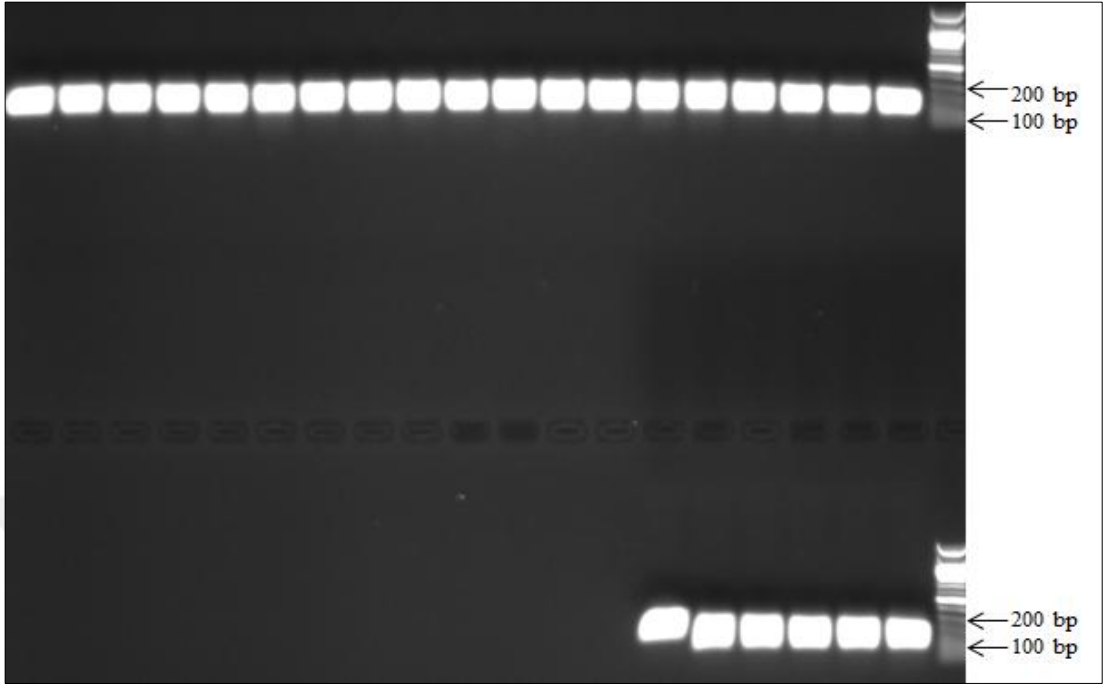
**Şekil 4.82.** Üreaz yardımcı protein UreE ve Üreaz yardımcı protein UreG genlerine ait 10., 20., 30., 40. ve 60. dakika erime eğrisi

RT-qPCR ile gen ifade düzeylerinin belirlenmesinin ardından spesifik amplifikasyon kontrolü için % 1'lik agaroz jel elektroforezi yapılmıştır (Şekil 4.83-96). Jel görüntülerinde üst-sağdan başlayarak sıralanışı Tablo 4.23'de verildiği şekildedir.

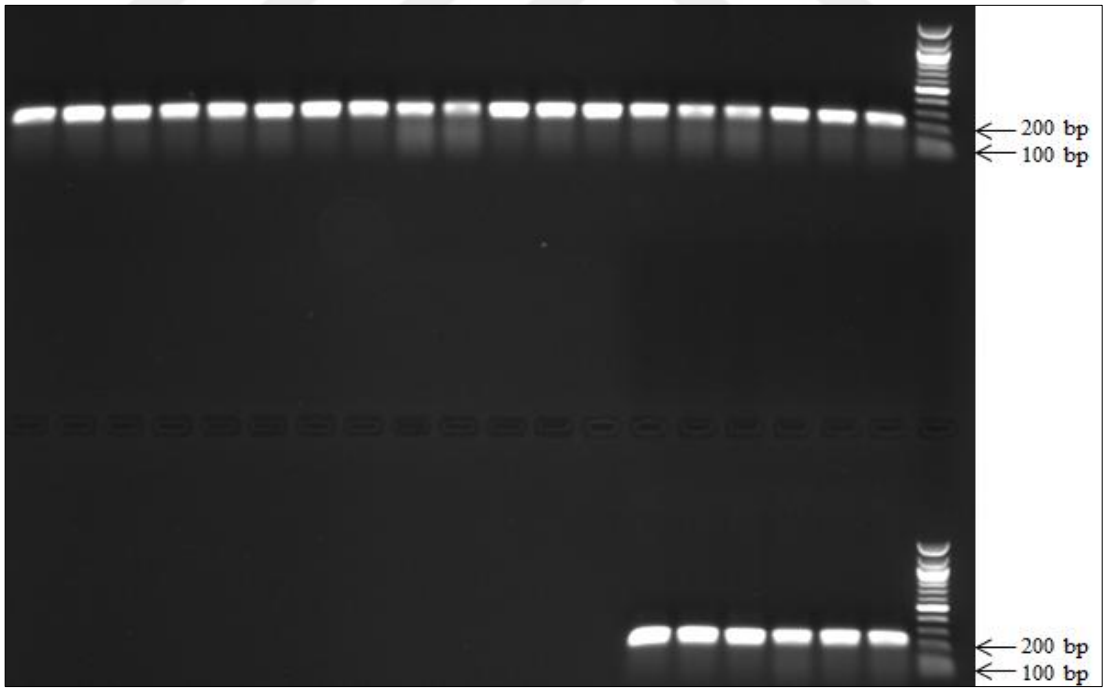
**Tablo 4.23.** Örneklerin agaroz jeldeki pozisyonları

Kuyucuk sırası (üst-sağdan başlayarak)	pH	Numune
1	-	Marker
2	6.75	10. dakika
3	6.75	20. dakika
4	6.75	30. dakika
5	6.75	40. dakika
6	6.75	60. dakika
7	7.00	10. dakika
8	7.00	20. dakika
9	7.00	30. dakika
10	7.00	40. dakika
11	7.00	60. dakika
12	7.25	10. dakika
13	7.25	20. dakika
14	7.25	30. dakika
15	7.25	40. dakika
16	7.25	60. dakika
17	7.50	10. dakika
18	7.50	20. dakika
19	7.50	30. dakika
20	7.50	40. dakika
21	-	Marker
22	7.50	60. dakika
23	7.75	10. dakika
24	7.75	20. dakika
25	7.75	30. dakika
26	7.75	40. dakika
27	7.75	60. dakika

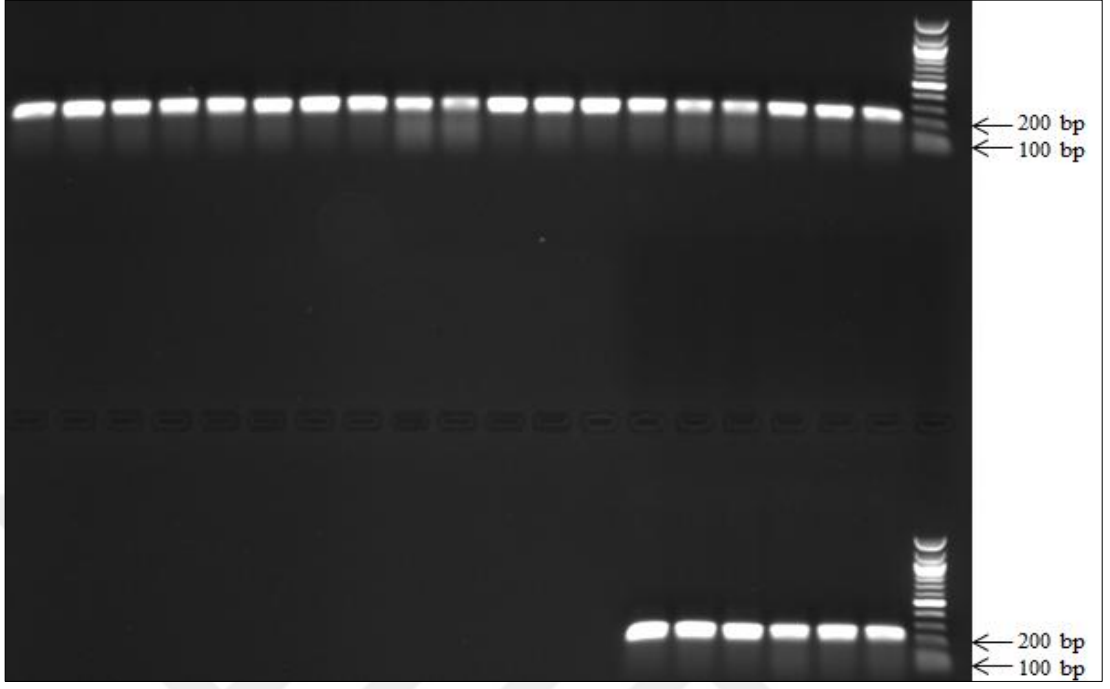
**Şekil 4.83.** Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü



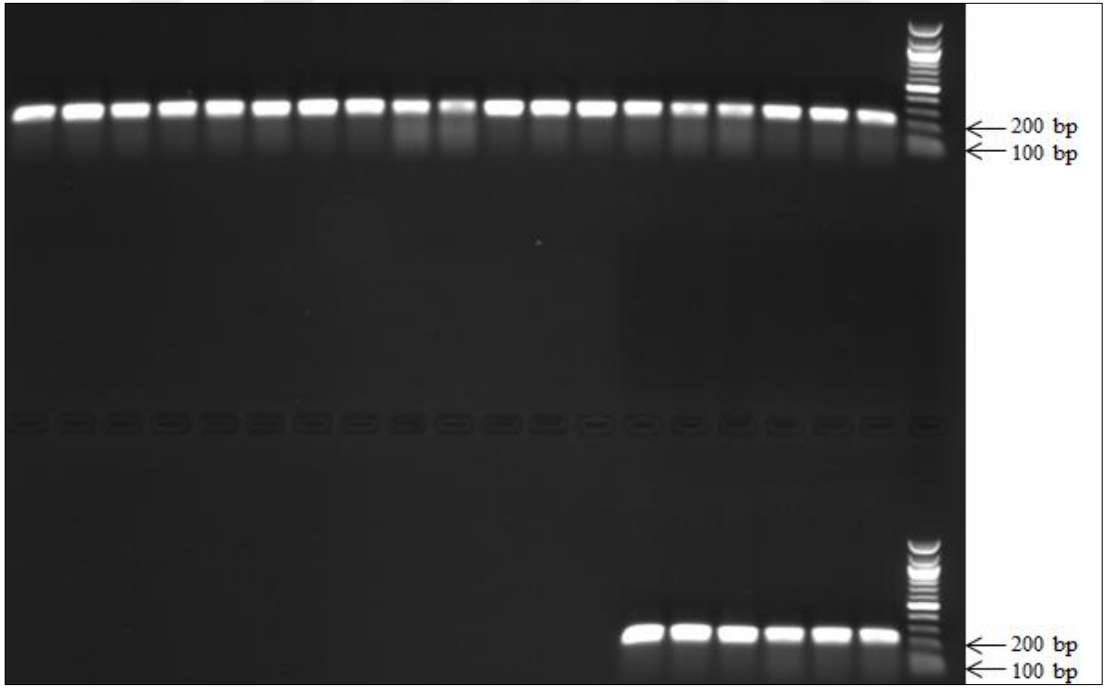
Şekil 4.84.  $\beta$ -Karbonik anhidraz geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü



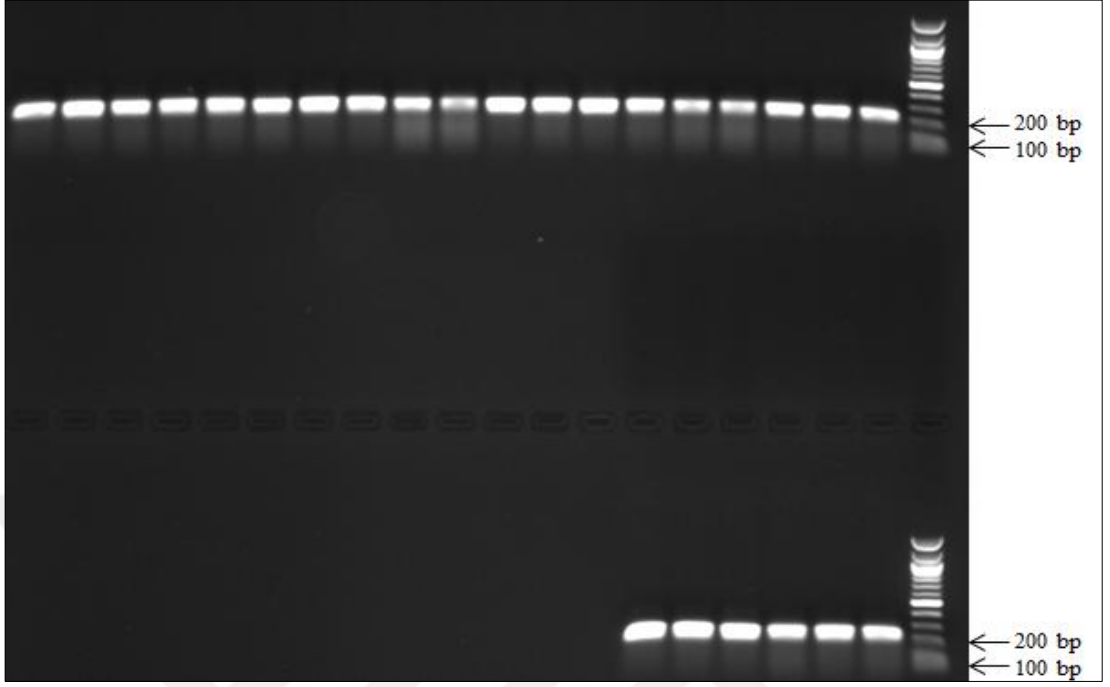
Şekil 4.85. Hidrojenaz HypA geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü



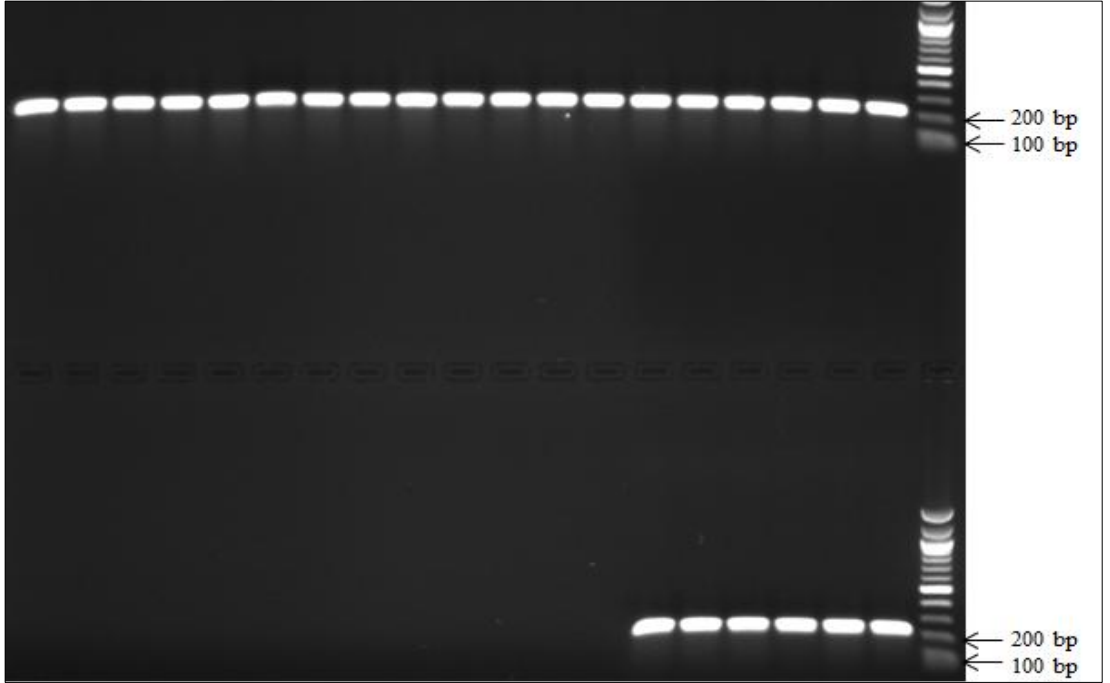
Şekil 4.86. Hidrojenaz HypB geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü



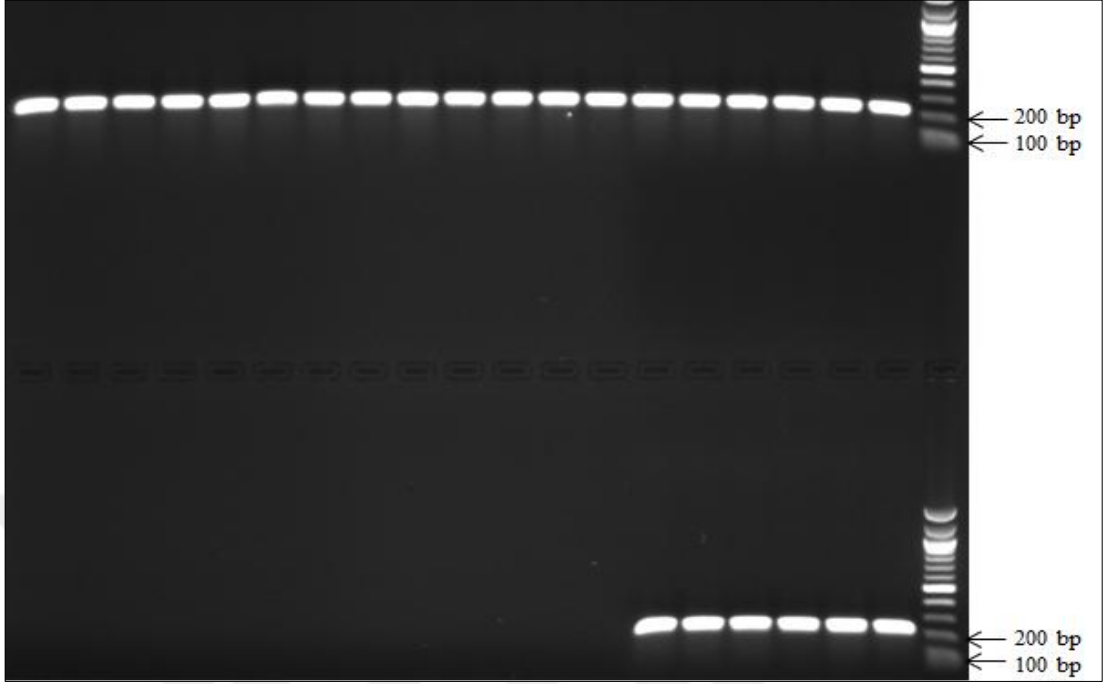
Şekil 4.87. H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-glutamat simport membran kanal proteini geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü



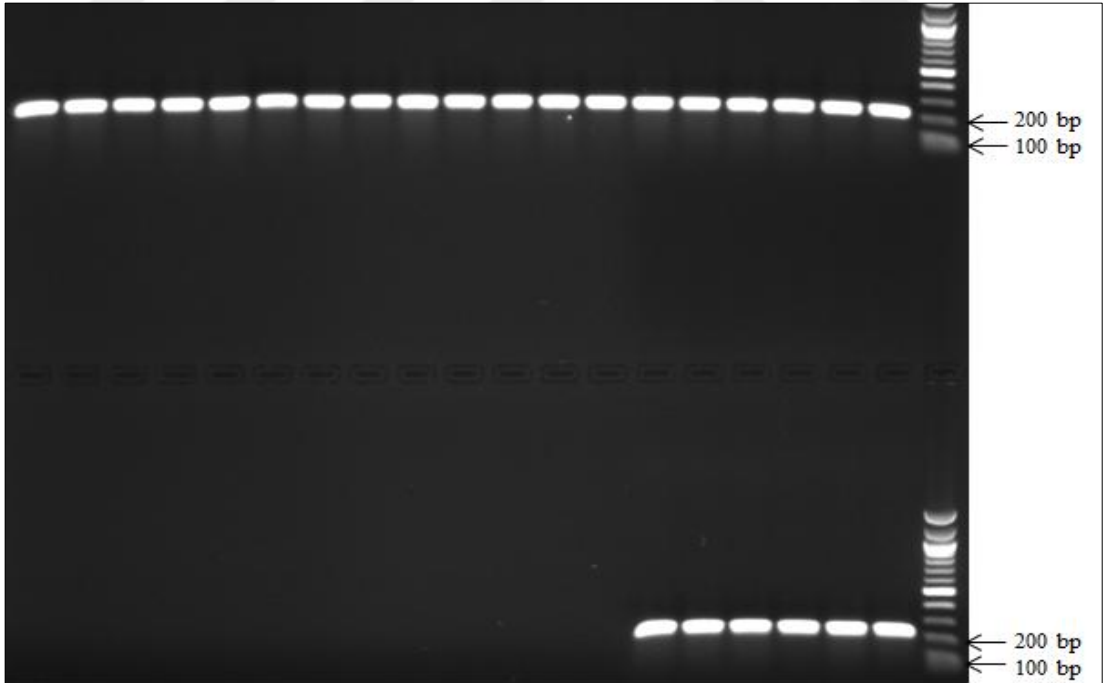
**Şekil 4.88.** Katyon değiştirici membran kanal proteini geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü



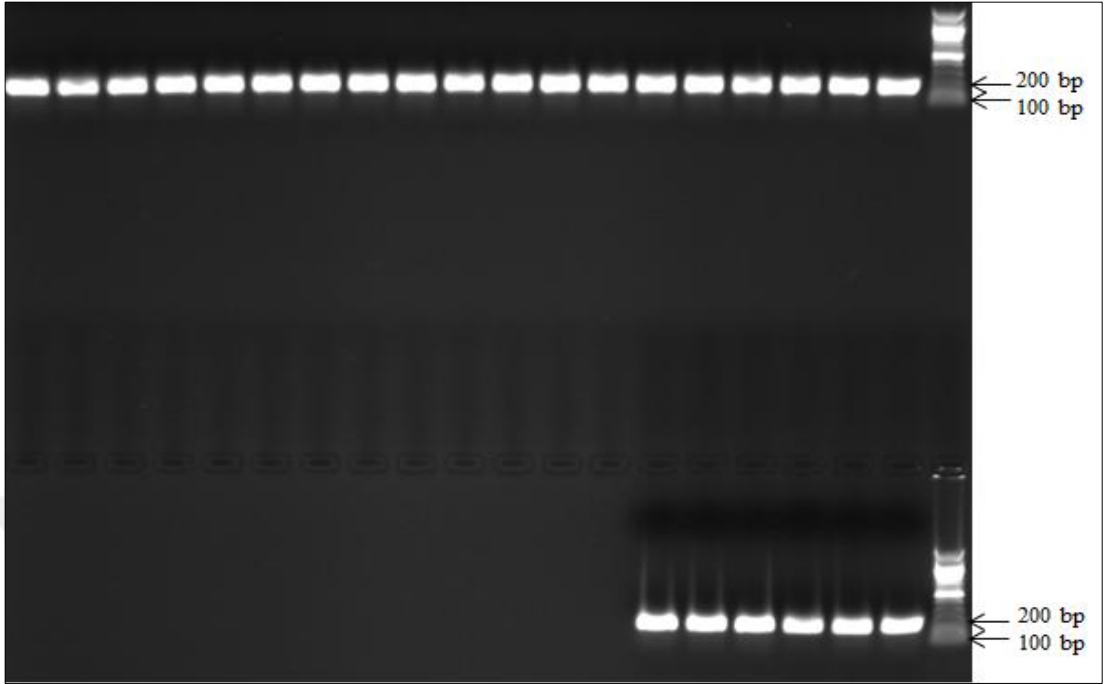
**Şekil 4.89.** Arginin dekarboksilaz geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü



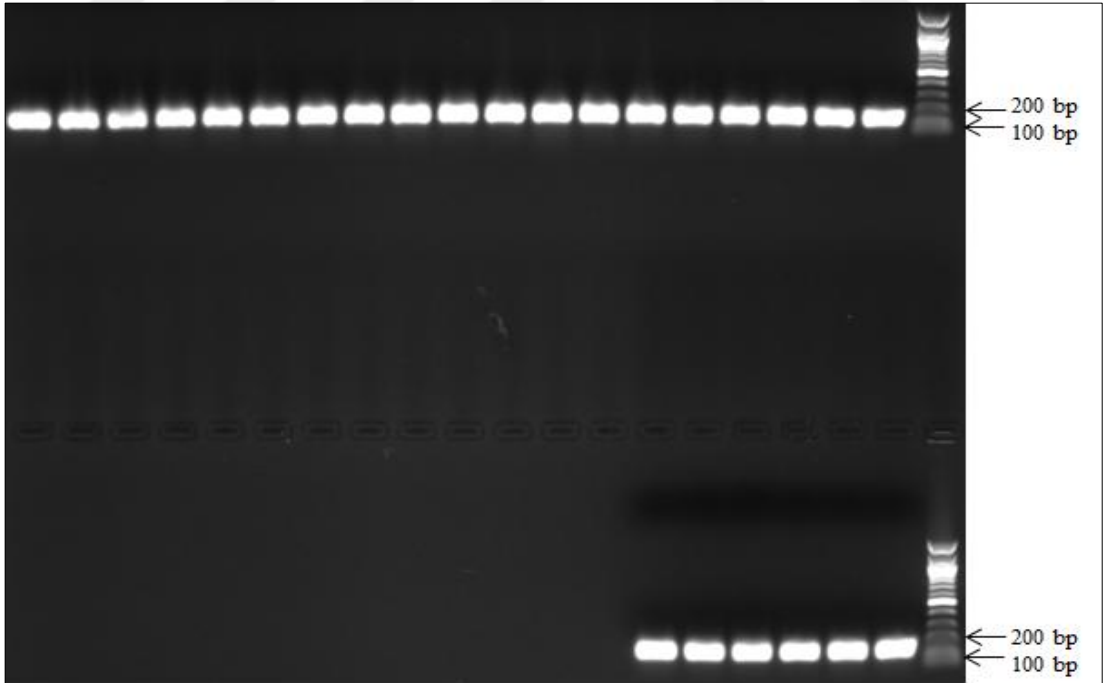
**Şekil 4.90.** Glutamat sentaz büyük altbirimi geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü



**Şekil 4.91.** V-tip ATP sentaz altbirim-C geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü



**Şekil 4.92.** Sitokrom C oksidaz altbirim-I geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü

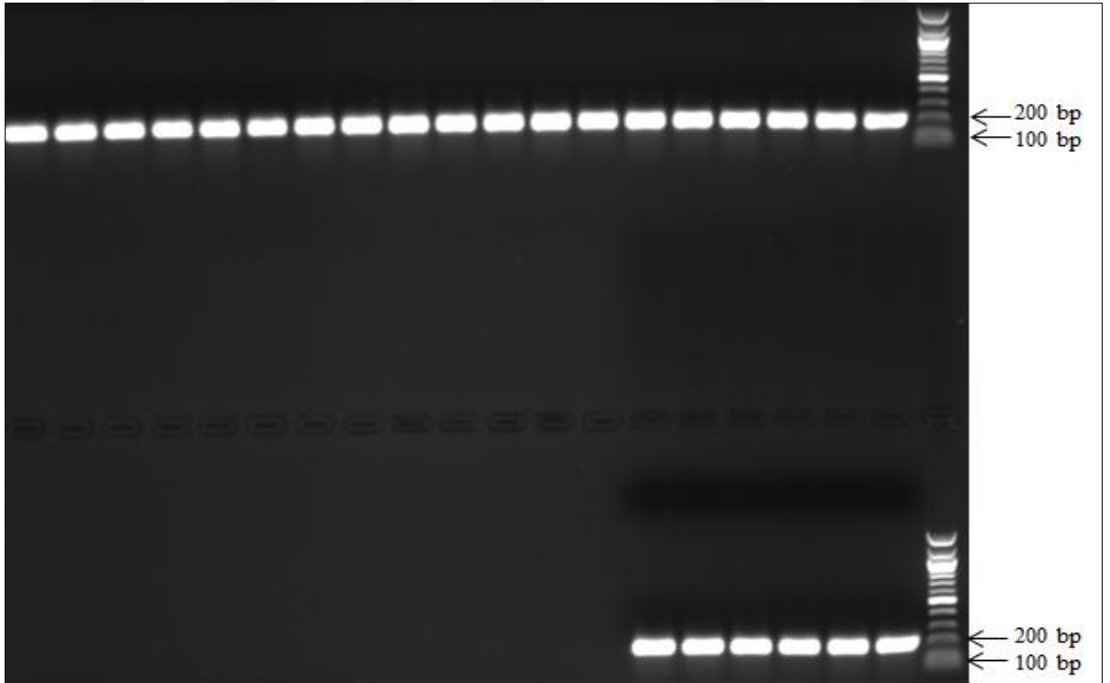


**Şekil 4.93.** Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü

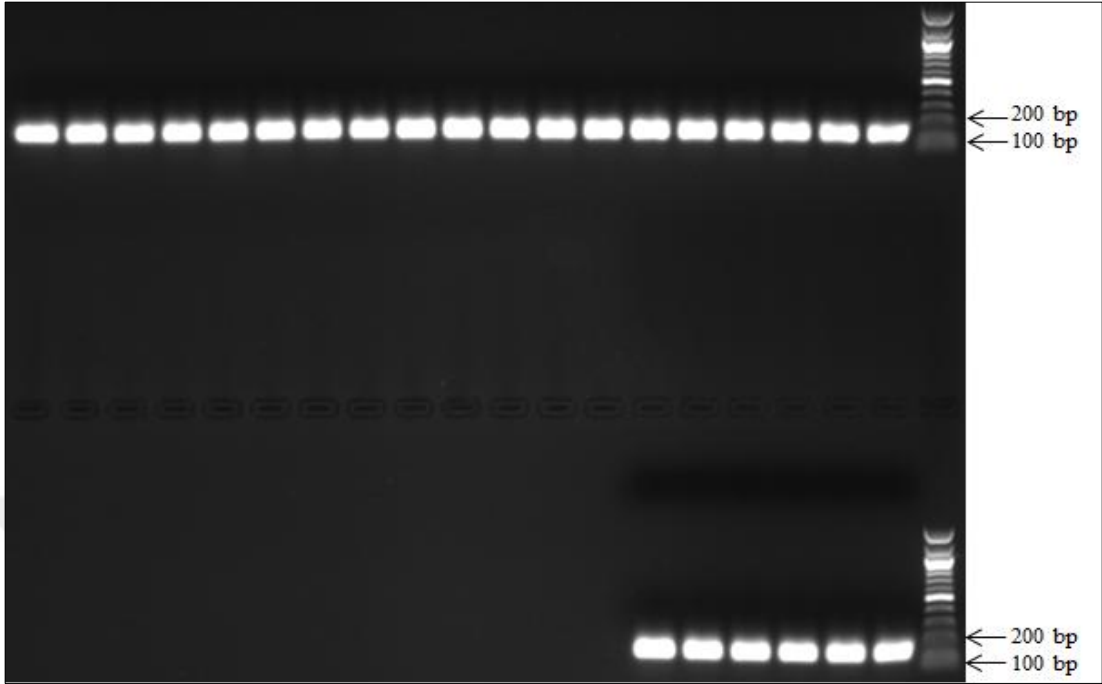




**Şekil 4.94.** NADH dehidrogenaz altbirim-B geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü



**Şekil 4.95.** Üreaz yardımcı protein UreE geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü

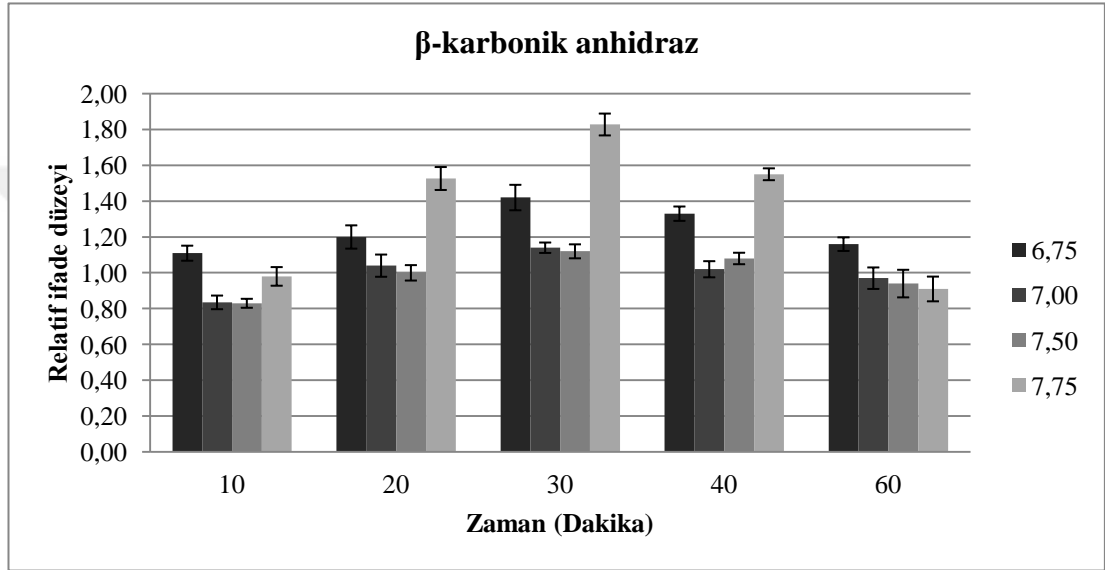


**Şekil 4.96.** Üreaz yardımcı protein UreG geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü

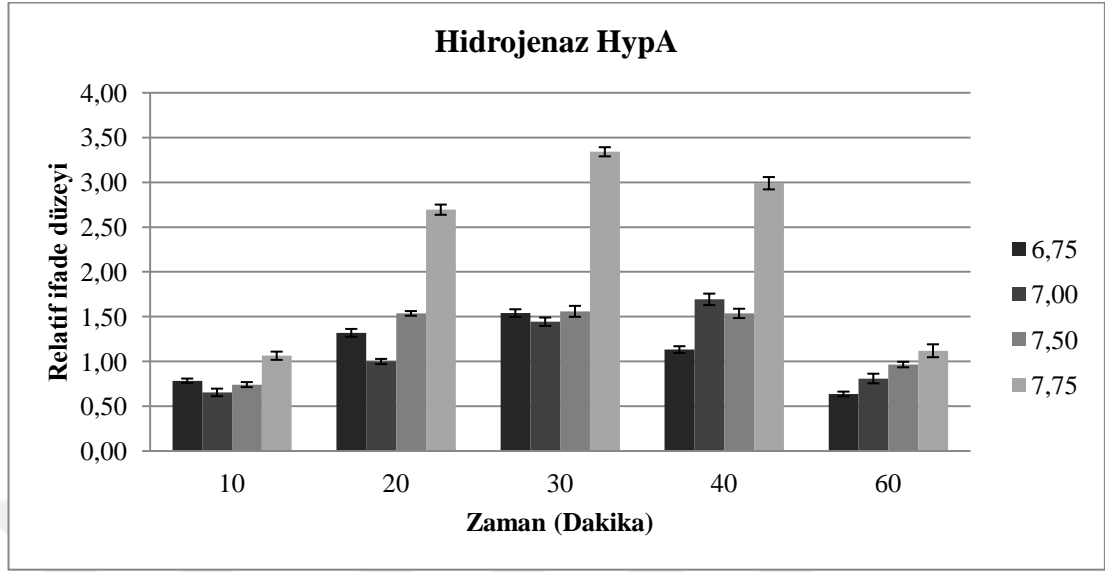
pH'sı 7,25 olan örnek kalibrasyon değeri için seçilerek diğer pH'larda normalizasyon için kullanıldı. Bunun sebebi *D. radiodurans*'ın gelişebilmesi için en uygun ortam pH'sının 7,25 olmasıdır. Genlerin amplifikasyon grafiklerinde eşik (treshold) değerleri belirlendi (Ct değerleri). İfade düzeyleri gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz referans alınarak Livak metoduna göre  $\Delta\Delta C_t$  değerinin hesaplanmasının ardından 2'nin negatif kuvveti şeklinde alınan ifade düzeyleri belirlendi ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) (Tablo 4.24-36). Tablolarda verilen değerler ortalama değer ( $\pm$  standart sapma) şeklindedir. Üç tekrarlı gerçekleştirilen denemelerde elde edilen  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  değerlerinin standart sapmaları hesaplandı ve anlamlılık aralığı 0,05'den küçük ( $P < 0,05$ ) olacak şekilde değerlendirildi. Bu hesaplama ile çıkan relatif ifade düzeyleri o koşullar altında hedef genin, gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz genine göre kaç kat arttığı veya azaldığı belirlendi hesaplanarak grafikler her gen için oluşturuldu (Şekil 4.97-109).

**Tablo 4.24.**  $\beta$ -karbonik anhidraz'ın  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

Besiyeri pH	$2^{-\Delta\Delta Ct}$				
	10. dakika	20. dakika	30. dakika	40. dakika	60. dakika
6,75	1,11 ( $\pm 0,042$ )	1,20 ( $\pm 0,065$ )	1,42 ( $\pm 0,071$ )	1,33 ( $\pm 0,04$ )	1,16 ( $\pm 0,038$ )
7,00	0,84 ( $\pm 0,038$ )	1,04 ( $\pm 0,062$ )	1,14 ( $\pm 0,029$ )	1,02 ( $\pm 0,045$ )	0,97 ( $\pm 0,06$ )
7,50	0,83 ( $\pm 0,025$ )	1,00 ( $\pm 0,043$ )	1,12 ( $\pm 0,039$ )	1,08 ( $\pm 0,032$ )	0,94 ( $\pm 0,077$ )
7,75	0,98 ( $\pm 0,052$ )	1,53 ( $\pm 0,064$ )	1,83 ( $\pm 0,061$ )	1,55 ( $\pm 0,033$ )	0,91 ( $\pm 0,069$ )

**Şekil 4.97.**  $\beta$ -karbonik anhidraz tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri**Tablo 4.25.** Hidrojenaz HypA'nın  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

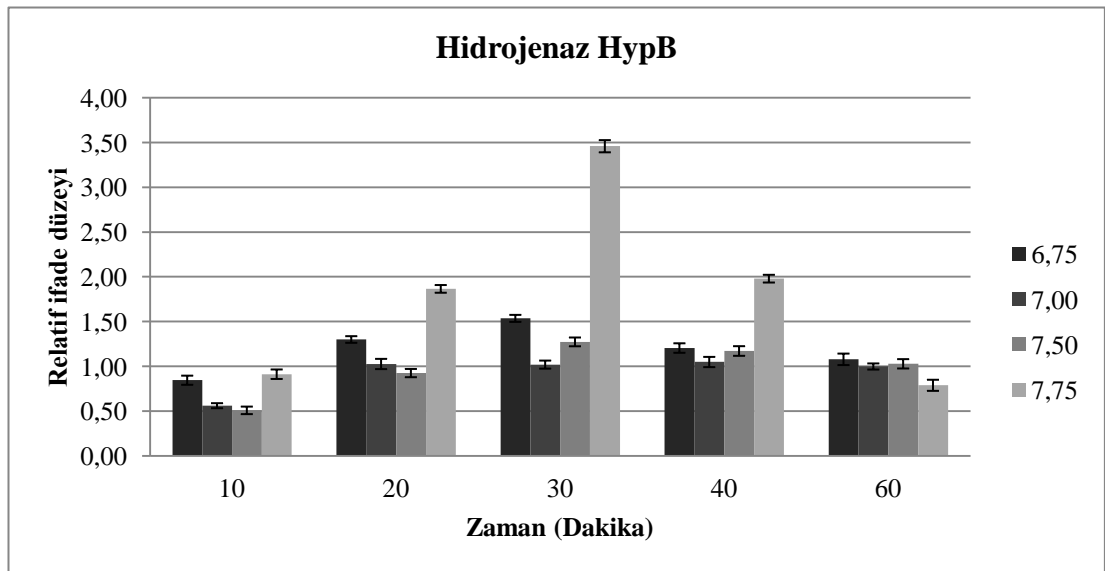
Besiyeri pH	$2^{-\Delta\Delta Ct}$				
	10. dakika	20. dakika	30. dakika	40. dakika	60. dakika
6,75	0,78 ( $\pm 0,025$ )	1,32 ( $\pm 0,044$ )	1,54 ( $\pm 0,043$ )	1,13 ( $\pm 0,038$ )	0,64 ( $\pm 0,027$ )
7,00	0,66 ( $\pm 0,042$ )	1,00 ( $\pm 0,029$ )	1,44 ( $\pm 0,047$ )	1,69 ( $\pm 0,064$ )	0,81 ( $\pm 0,054$ )
7,50	0,74 ( $\pm 0,028$ )	1,54 ( $\pm 0,026$ )	1,56 ( $\pm 0,061$ )	1,54 ( $\pm 0,052$ )	0,97 ( $\pm 0,031$ )
7,75	1,06 ( $\pm 0,046$ )	2,69 ( $\pm 0,057$ )	3,34 ( $\pm 0,051$ )	2,99 ( $\pm 0,069$ )	1,12 ( $\pm 0,072$ )



Şekil 4.98. Hidrojenaz HypA tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri

Tablo 4.26. Hidrojenaz HypB'nin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

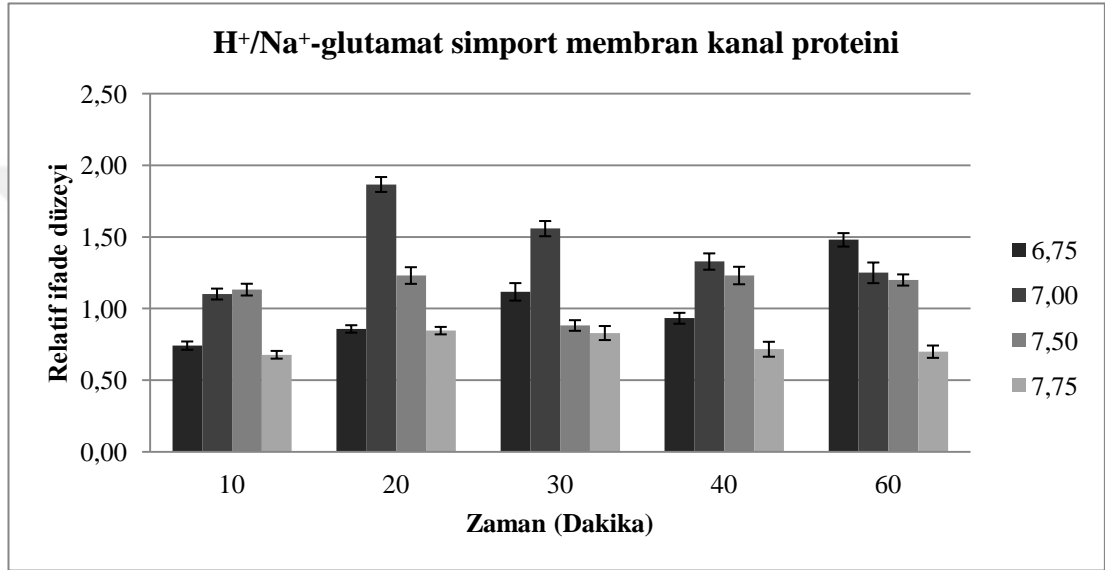
Besiyeri pH	$2^{-\Delta\Delta Ct}$				
	10. dakika	20. dakika	30. dakika	40. dakika	60. dakika
6,75	0,85 ( $\pm 0,051$ )	1,30 ( $\pm 0,037$ )	1,54 ( $\pm 0,039$ )	1,21 ( $\pm 0,053$ )	1,08 ( $\pm 0,064$ )
7,00	0,56 ( $\pm 0,028$ )	1,03 ( $\pm 0,057$ )	1,02 ( $\pm 0,045$ )	1,05 ( $\pm 0,057$ )	1,00 ( $\pm 0,034$ )
7,50	0,51 ( $\pm 0,042$ )	0,93 ( $\pm 0,046$ )	1,27 ( $\pm 0,049$ )	1,17 ( $\pm 0,054$ )	1,03 ( $\pm 0,052$ )
7,75	0,91 ( $\pm 0,053$ )	1,87 ( $\pm 0,043$ )	3,46 ( $\pm 0,068$ )	1,98 ( $\pm 0,043$ )	0,79 ( $\pm 0,062$ )



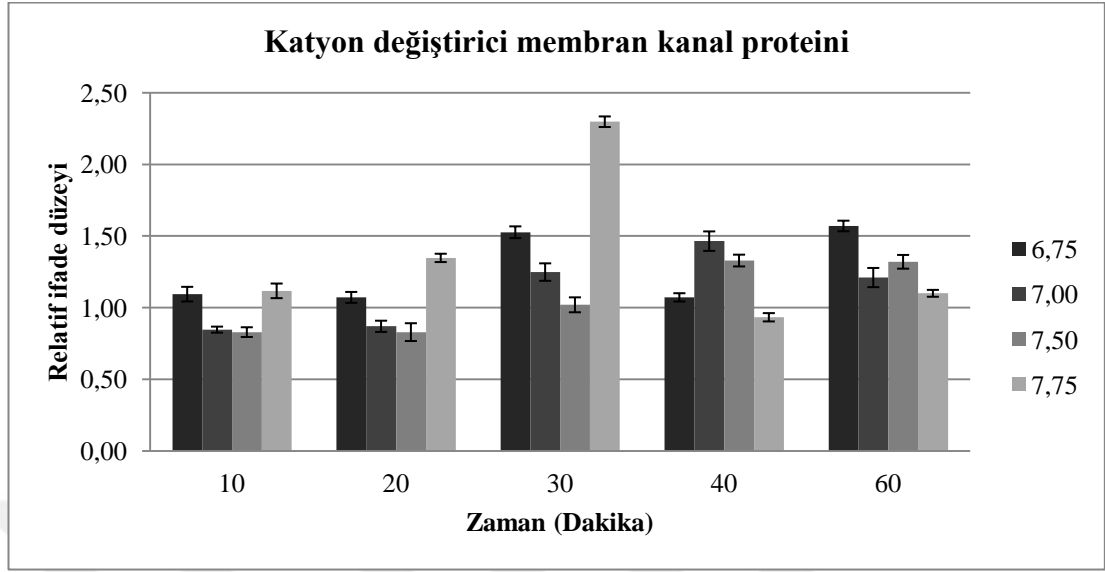
Şekil 4.99. Hidrojenaz HypB tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri

**Tablo 4.27.** H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-glutamat simport membran kanal proteini'nin 2<sup>-ΔΔCt</sup> değerleri

Besiyeri pH	2 <sup>-ΔΔCt</sup>				
	10. dakika	20. dakika	30. dakika	40. dakika	60. dakika
6,75	0,74 (±0,029)	0,86 (±0,026)	1,12 (±0,061)	0,93 (±0,038)	1,48 (±0,047)
7,00	1,10 (±0,038)	1,87 (±0,052)	1,56 (±0,053)	1,33 (±0,057)	1,25 (±0,072)
7,50	1,13 (±0,041)	1,23 (±0,058)	0,88 (±0,037)	1,23 (±0,061)	1,20 (±0,039)
7,75	0,68 (±0,027)	0,85 (±0,026)	0,83 (±0,049)	0,72 (±0,052)	0,70 (±0,043)

**Şekil 4.100.** H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-glutamat simport membran kanal proteini tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri**Tablo 4.28.** Katyon değiştirici membran kanal proteini'nin 2<sup>-ΔΔCt</sup> değerleri

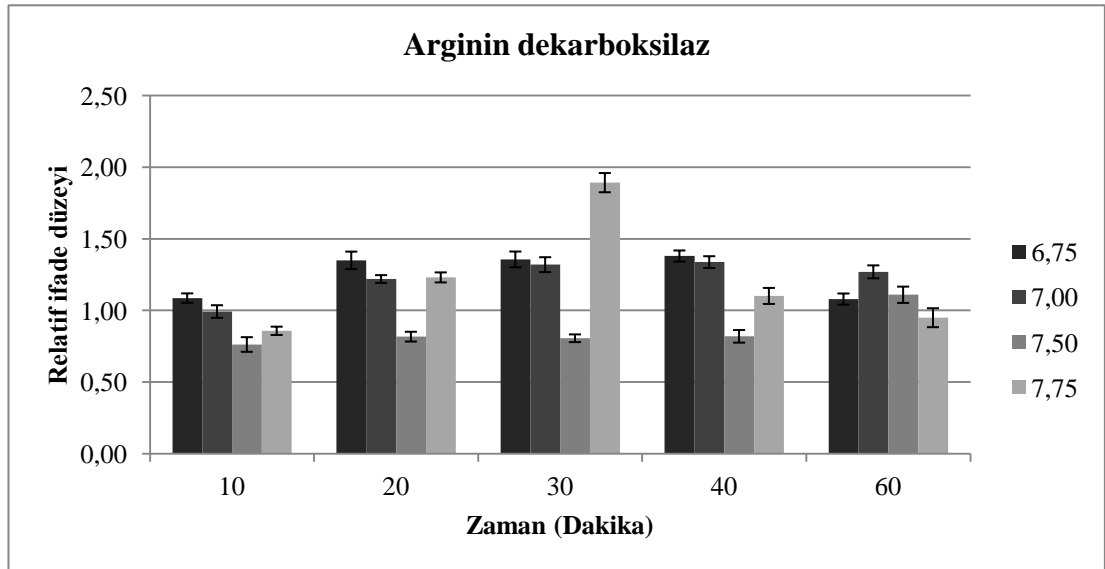
Besiyeri pH	2 <sup>-ΔΔCt</sup>				
	10. dakika	20. dakika	30. dakika	40. dakika	60. dakika
6,75	1,09 (±0,051)	1,07 (±0,038)	1,53 (±0,041)	1,07 (±0,029)	1,57 (±0,037)
7,00	0,85 (±0,021)	0,87 (±0,039)	1,25 (±0,061)	1,46 (±0,068)	1,21 (±0,067)
7,50	0,83 (±0,034)	0,83 (±0,062)	1,02 (±0,052)	1,33 (±0,041)	1,32 (±0,048)
7,75	1,12 (±0,051)	1,35 (±0,029)	2,30 (±0,037)	0,93 (±0,029)	1,10 (±0,024)



Şekil 4.101. Katyon değiştirici membran kanal proteini tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri

Tablo 4.29. Arginin dekarboksilaz'ın  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

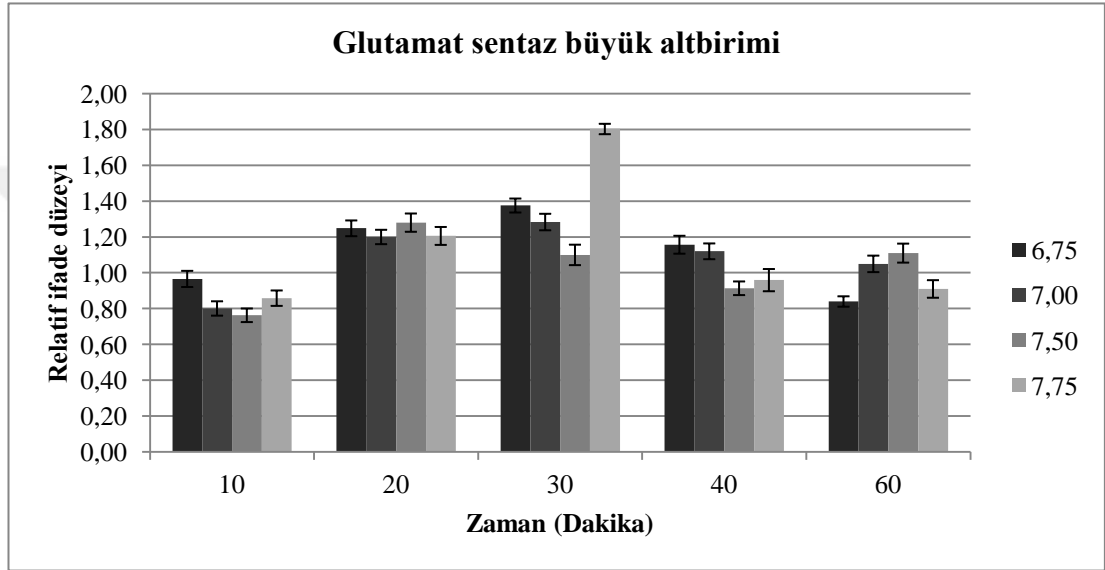
Besiyeri pH	$2^{-\Delta\Delta Ct}$				
	10. dakika	20. dakika	30. dakika	40. dakika	60. dakika
6,75	1,09 ( $\pm 0,033$ )	1,35 ( $\pm 0,061$ )	1,36 ( $\pm 0,055$ )	1,38 ( $\pm 0,039$ )	1,08 ( $\pm 0,039$ )
7,00	0,99 ( $\pm 0,044$ )	1,22 ( $\pm 0,027$ )	1,32 ( $\pm 0,052$ )	1,34 ( $\pm 0,041$ )	1,27 ( $\pm 0,045$ )
7,50	0,76 ( $\pm 0,051$ )	0,82 ( $\pm 0,034$ )	0,81 ( $\pm 0,027$ )	0,82 ( $\pm 0,044$ )	1,11 ( $\pm 0,057$ )
7,75	0,86 ( $\pm 0,029$ )	1,23 ( $\pm 0,035$ )	1,89 ( $\pm 0,067$ )	1,10 ( $\pm 0,056$ )	0,95 ( $\pm 0,066$ )



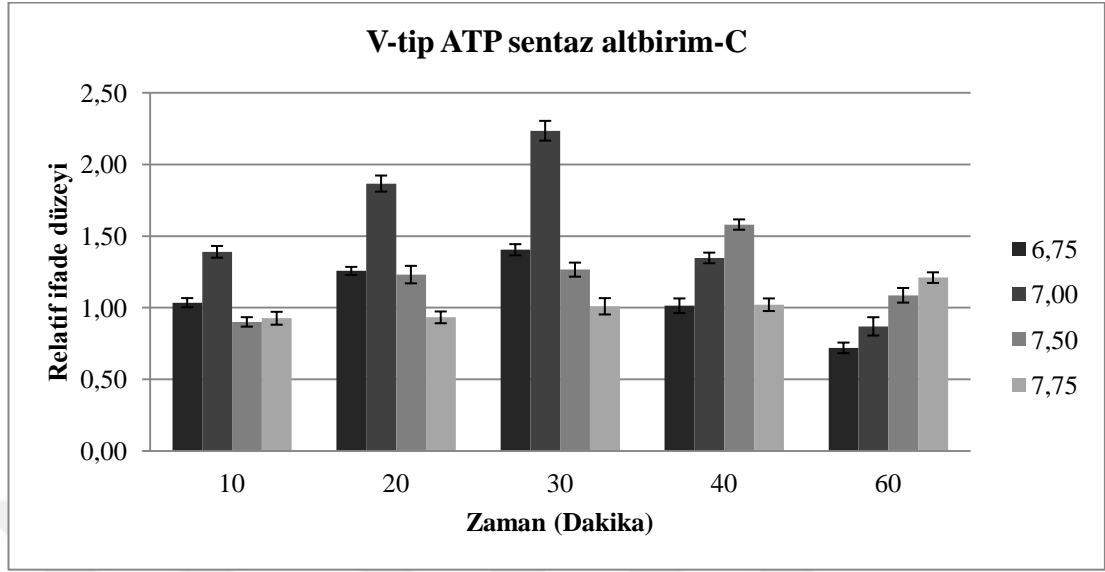
Şekil 4.102. Arginin dekarboksilaz tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri

**Tablo 4.30.** Glutamat sentaz büyük altbirimi'nin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

Besiyeri pH	$2^{-\Delta\Delta Ct}$				
	10. dakika	20. dakika	30. dakika	40. dakika	60. dakika
6,75	0,97 ( $\pm 0,045$ )	1,25 ( $\pm 0,044$ )	1,38 ( $\pm 0,039$ )	1,16 ( $\pm 0,05$ )	0,84 ( $\pm 0,029$ )
7,00	0,80 ( $\pm 0,04$ )	1,20 ( $\pm 0,04$ )	1,28 ( $\pm 0,046$ )	1,12 ( $\pm 0,044$ )	1,05 ( $\pm 0,046$ )
7,50	0,76 ( $\pm 0,038$ )	1,28 ( $\pm 0,051$ )	1,10 ( $\pm 0,057$ )	0,91 ( $\pm 0,038$ )	1,11 ( $\pm 0,053$ )
7,75	0,86 ( $\pm 0,043$ )	1,21 ( $\pm 0,05$ )	1,80 ( $\pm 0,029$ )	0,96 ( $\pm 0,062$ )	0,91 ( $\pm 0,049$ )

**Şekil 4.103.** Glutamat sentaz büyük altbirimi tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri**Tablo 4.31.** V-tip ATP sentaz altbirim-C'nin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

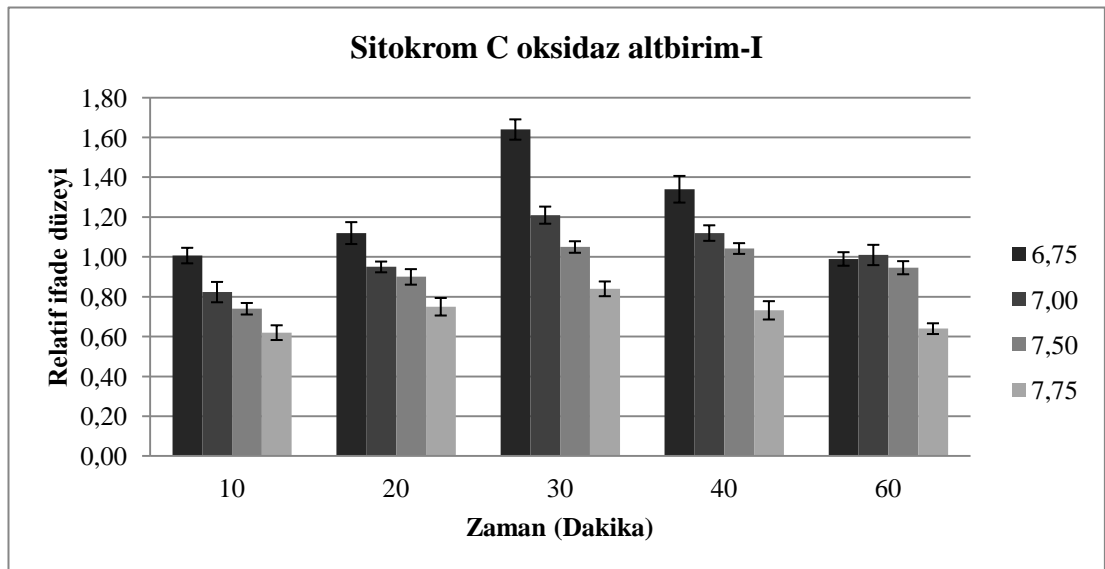
Besiyeri pH	$2^{-\Delta\Delta Ct}$				
	10. dakika	20. dakika	30. dakika	40. dakika	60. dakika
6,75	1,04 ( $\pm 0,032$ )	1,26 ( $\pm 0,028$ )	1,40 ( $\pm 0,039$ )	1,01 ( $\pm 0,051$ )	0,72 ( $\pm 0,037$ )
7,00	1,39 ( $\pm 0,041$ )	1,87 ( $\pm 0,056$ )	2,23 ( $\pm 0,069$ )	1,35 ( $\pm 0,037$ )	0,87 ( $\pm 0,064$ )
7,50	0,90 ( $\pm 0,033$ )	1,23 ( $\pm 0,061$ )	1,27 ( $\pm 0,049$ )	1,58 ( $\pm 0,036$ )	1,09 ( $\pm 0,051$ )
7,75	0,93 ( $\pm 0,045$ )	0,93 ( $\pm 0,041$ )	1,01 ( $\pm 0,057$ )	1,02 ( $\pm 0,044$ )	1,21 ( $\pm 0,037$ )



Şekil 4.104. V-tip ATP sentaz altbirim-C tüm pH'larda zamana bağlı ifade düzeyleri

Tablo 4.32. Sitokrom C oksidaz altbirim-I'in  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

Besiyeri pH	$2^{-\Delta\Delta Ct}$				
	10. dakika	20. dakika	30. dakika	40. dakika	60. dakika
6,75	1,01 ( $\pm 0,039$ )	1,12 ( $\pm 0,055$ )	1,64 ( $\pm 0,051$ )	1,34 ( $\pm 0,067$ )	0,99 ( $\pm 0,034$ )
7,00	0,82 ( $\pm 0,051$ )	0,95 ( $\pm 0,027$ )	1,21 ( $\pm 0,043$ )	1,12 ( $\pm 0,039$ )	1,01 ( $\pm 0,051$ )
7,50	0,74 ( $\pm 0,029$ )	0,90 ( $\pm 0,039$ )	1,05 ( $\pm 0,029$ )	1,04 ( $\pm 0,027$ )	0,95 ( $\pm 0,033$ )
7,75	0,62 ( $\pm 0,037$ )	0,75 ( $\pm 0,044$ )	0,84 ( $\pm 0,037$ )	0,73 ( $\pm 0,046$ )	0,64 ( $\pm 0,027$ )

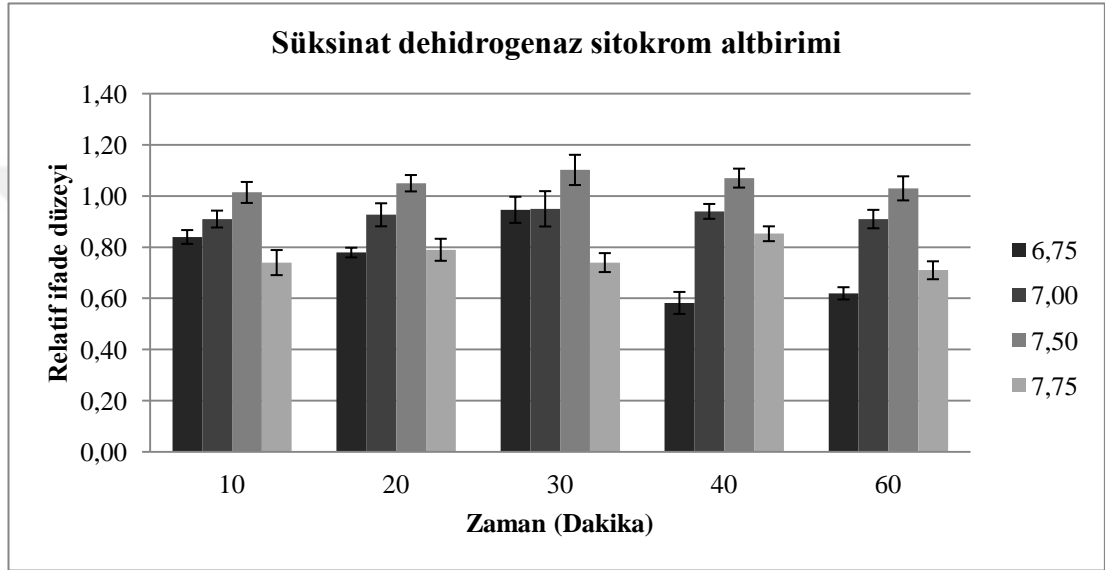


Şekil 4.105. Sitokrom C oksidaz altbirim-I tüm pH'larda zamana bağlı ifade

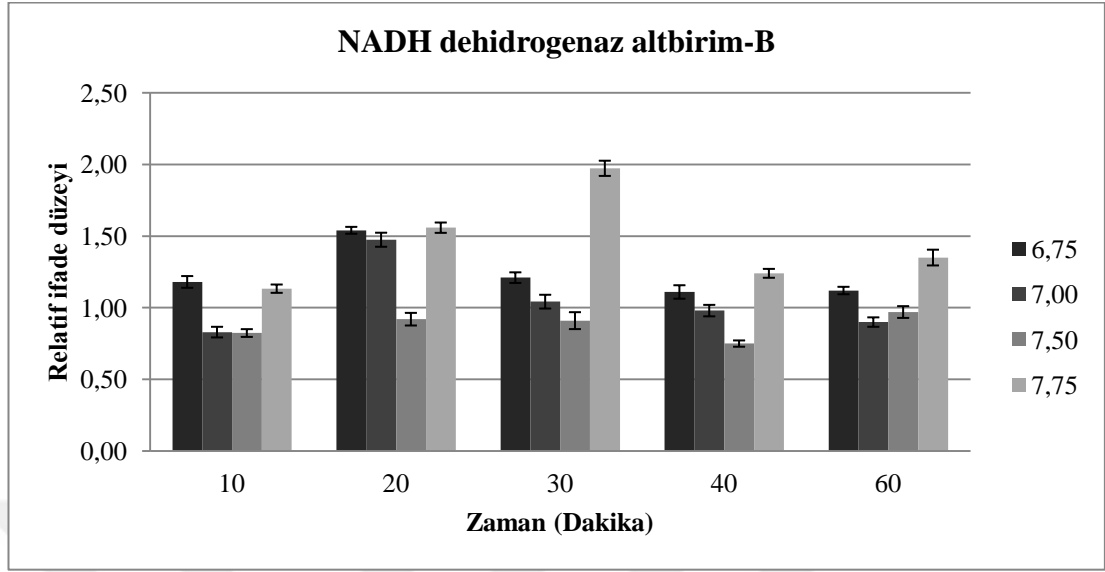


**Tablo 4.33.** Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi'nin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

Besiyeri pH	$2^{-\Delta\Delta Ct}$				
	10. dakika	20. dakika	30. dakika	40. dakika	60. dakika
6,75	0,84 ( $\pm 0,027$ )	0,78 ( $\pm 0,019$ )	0,95 ( $\pm 0,051$ )	0,58 ( $\pm 0,043$ )	0,62 ( $\pm 0,024$ )
7,00	0,91 ( $\pm 0,033$ )	0,93 ( $\pm 0,045$ )	0,95 ( $\pm 0,069$ )	0,94 ( $\pm 0,029$ )	0,91 ( $\pm 0,036$ )
7,50	1,01 ( $\pm 0,041$ )	1,05 ( $\pm 0,032$ )	1,10 ( $\pm 0,059$ )	1,07 ( $\pm 0,037$ )	1,03 ( $\pm 0,047$ )
7,75	0,74 ( $\pm 0,049$ )	0,79 ( $\pm 0,043$ )	0,74 ( $\pm 0,037$ )	0,85 ( $\pm 0,029$ )	0,71 ( $\pm 0,035$ )

**Şekil 4.106.** Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi tüm pH'larda zamana bağlı ifade**Tablo 4.34.** NADH dehidrogenaz altbirim-B'nin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

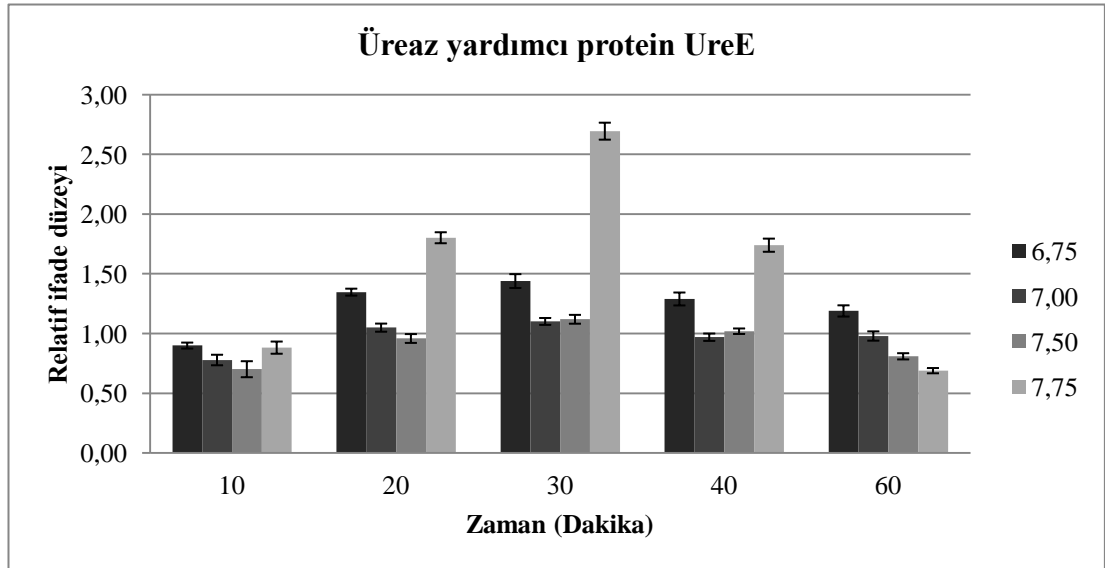
Besiyeri pH	$2^{-\Delta\Delta Ct}$				
	10. dakika	20. dakika	30. dakika	40. dakika	60. dakika
6,75	1,18 ( $\pm 0,041$ )	1,54 ( $\pm 0,024$ )	1,21 ( $\pm 0,037$ )	1,11 ( $\pm 0,047$ )	1,12 ( $\pm 0,026$ )
7,00	0,83 ( $\pm 0,037$ )	1,47 ( $\pm 0,049$ )	1,04 ( $\pm 0,048$ )	0,98 ( $\pm 0,04$ )	0,90 ( $\pm 0,033$ )
7,50	0,82 ( $\pm 0,027$ )	0,92 ( $\pm 0,044$ )	0,91 ( $\pm 0,059$ )	0,75 ( $\pm 0,022$ )	0,97 ( $\pm 0,041$ )
7,75	1,13 ( $\pm 0,029$ )	1,56 ( $\pm 0,036$ )	1,97 ( $\pm 0,053$ )	1,24 ( $\pm 0,031$ )	1,35 ( $\pm 0,055$ )



Şekil 4.107. NADH dehidrogenaz altbirim-B tüm pH'larda zamana bağlı ifade

Tablo 4.35. Üreaz yardımcı protein UreE'nin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

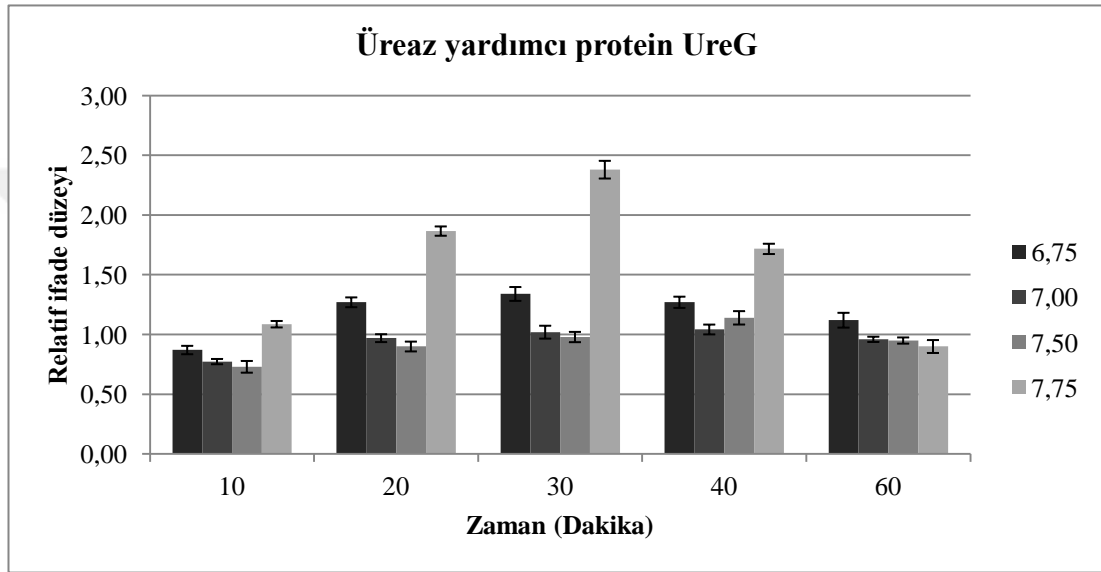
Besiyeri pH	$2^{-\Delta\Delta Ct}$				
	10. dakika	20. dakika	30. dakika	40. dakika	60. dakika
6,75	0,90 ( $\pm 0,025$ )	1,35 ( $\pm 0,029$ )	1,44 ( $\pm 0,058$ )	1,29 ( $\pm 0,054$ )	1,19 ( $\pm 0,047$ )
7,00	0,78 ( $\pm 0,044$ )	1,05 ( $\pm 0,034$ )	1,10 ( $\pm 0,029$ )	0,97 ( $\pm 0,031$ )	0,98 ( $\pm 0,039$ )
7,50	0,70 ( $\pm 0,067$ )	0,96 ( $\pm 0,037$ )	1,12 ( $\pm 0,037$ )	1,02 ( $\pm 0,023$ )	0,81 ( $\pm 0,026$ )
7,75	0,88 ( $\pm 0,051$ )	1,80 ( $\pm 0,046$ )	2,69 ( $\pm 0,071$ )	1,74 ( $\pm 0,055$ )	0,69 ( $\pm 0,022$ )



Şekil 4.108. Üreaz yardımcı protein UreE tüm pH'larda zamana bağlı ifade

**Tablo 4.36.** Üreaz yardımcı protein UreG'nin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

Besiyeri pH	$2^{-\Delta\Delta Ct}$				
	10. dakika	20. dakika	30. dakika	40. dakika	60. dakika
6,75	0,87 ( $\pm 0,035$ )	1,27 ( $\pm 0,041$ )	1,34 ( $\pm 0,058$ )	1,27 ( $\pm 0,047$ )	1,12 ( $\pm 0,062$ )
7,00	0,77 ( $\pm 0,022$ )	0,97 ( $\pm 0,033$ )	1,02 ( $\pm 0,054$ )	1,04 ( $\pm 0,041$ )	0,96 ( $\pm 0,022$ )
7,50	0,73 ( $\pm 0,049$ )	0,90 ( $\pm 0,041$ )	0,98 ( $\pm 0,043$ )	1,14 ( $\pm 0,056$ )	0,95 ( $\pm 0,026$ )
7,75	1,09 ( $\pm 0,027$ )	1,87 ( $\pm 0,039$ )	2,38 ( $\pm 0,074$ )	1,72 ( $\pm 0,043$ )	0,90 ( $\pm 0,054$ )

**Şekil 4.109.** Üreaz yardımcı protein UreG tüm pH'larda zamana bağlı ifade

#### 4.8. Radyasyon Uygulama Sonrası Gen İfade Düzeyleri

0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 ve 1000 Gy gama ışını ile dozlanan örneklerde gen ifade düzeyleri RT-qPCR yöntemi kullanılarak belirlendi. Radyasyon uygulanan hücrelerde yapılan saflaştırma işleminin ardından RNA konsantrasyonları Tablo 4.37'de verildiği şekildedir.

Birinci tekrar amplifikasyon grafikleri Şekil 4.110 ve Şekil 4.113'de belirtildiği gibidir. cDNA ve Syber Green 1 boyasına ait oluşturulmuş standart grafikleriyle gen konsantrasyonları kantitatif olarak belirlenmiştir (Şekil 4.111, Şekil 4.114).

Genlere ait erime eğrisi grafikleri ile ampikonların  $T_m$  değerleri üzerinden değerlendirme yapılarak hedef genlerin spesifik olarak çoğaltıldığı belirlenmiştir (Şekil 4.112, Şekil 4.115).

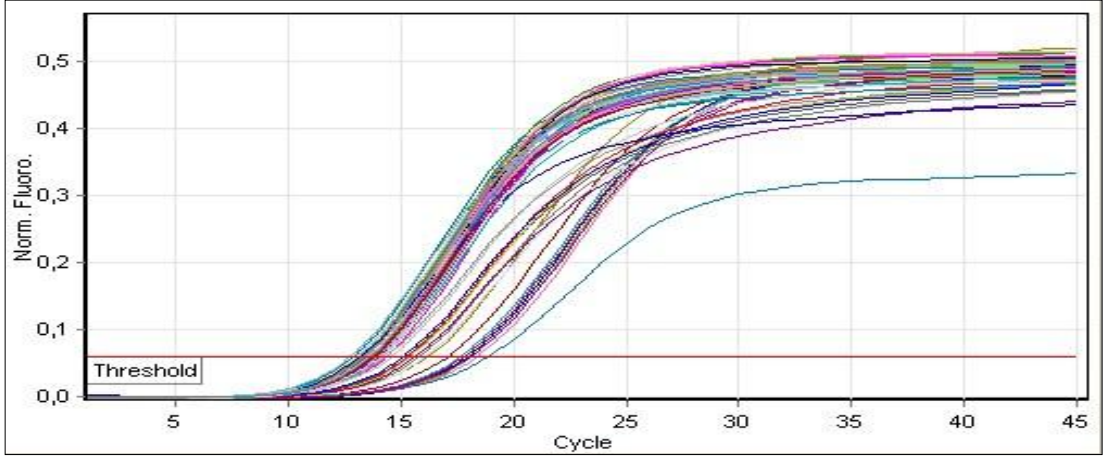
Denemede radyasyon uygulanan örneklerde gen ifade tespiti iki grup halinde belirlenmiştir.

**1. grupta;** Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz,  $\beta$ -Karbonik anhidraz, Hidrojenaz HypA, Hidrojenaz HypB,  $H^+/Na^+$ -glutamat simport membran kanal proteini, Katyon değiştirici membran kanal proteini ve Arginin dekarboksilaz,

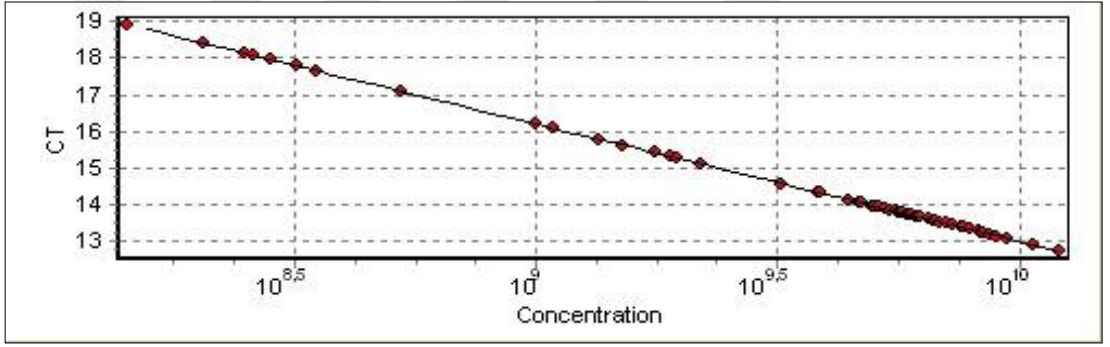
**2. grupta;** Glutamat sentaz büyük altbirimi, V-tip ATP sentaz altbirim-C, Sitokrom C oksidaz altbirim-I, Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi, NADH dehidrogenaz altbirim-B, Üreaz yardımcı protein UreE ve Üreaz yardımcı protein UreG genlerinin ifade düzeyleri tespit edilmiştir.

**Tablo 4.37.** Radyasyon uygulanan örneklerin RNA konsantrasyonları

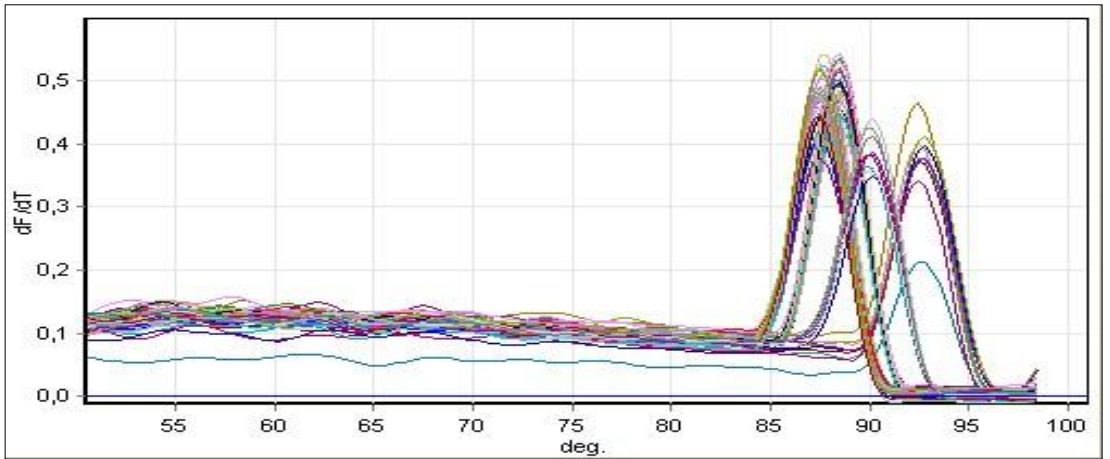
Doz (Gy)	RNA konsantrasyonları (ng/ $\mu$ l)		
	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
100	110,57	117,385	120,154
200	128,503	123,187	131,104
300	141,871	135,962	139,257
400	147,415	149,812	151,024
500	165,742	159,448	164,584
600	163,405	169,543	168,489
700	187,852	185,199	180,989
800	190,122	195,217	192,447
1000	214,968	222,904	218,676



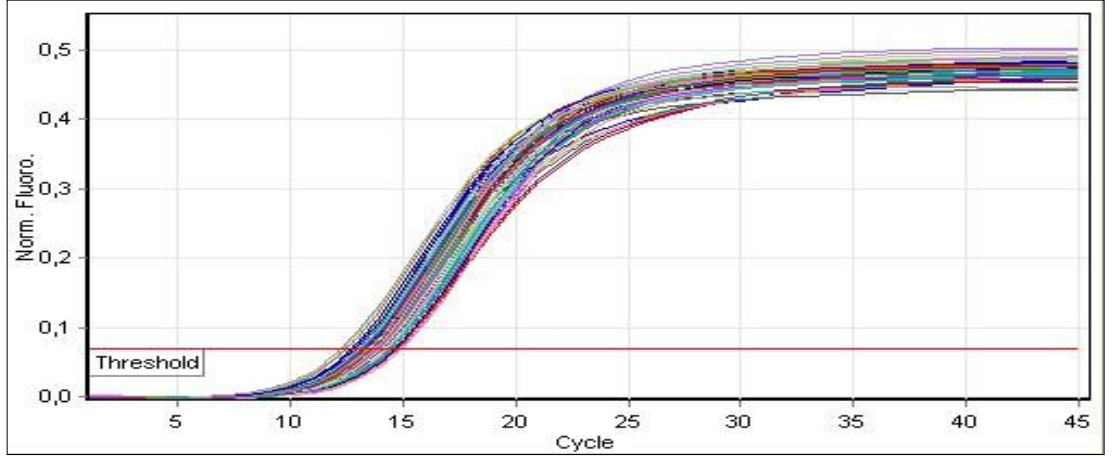
**Şekil 4.110.** 1. Grup genlerine ait 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 ve 1000 Gy dozlanmış örneklerin amplifikasyon grafiği



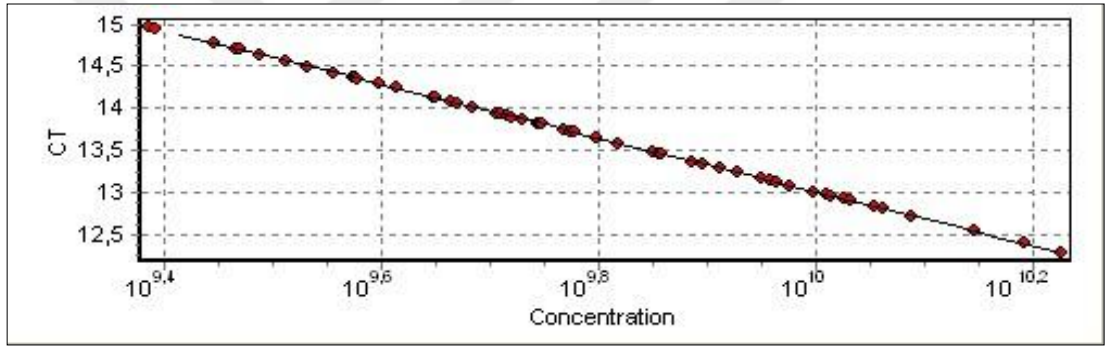
**Şekil 4.111.** 1. Grup genlerine ait 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 ve 1000 Gy dozlanmış örneklerin standart grafiği



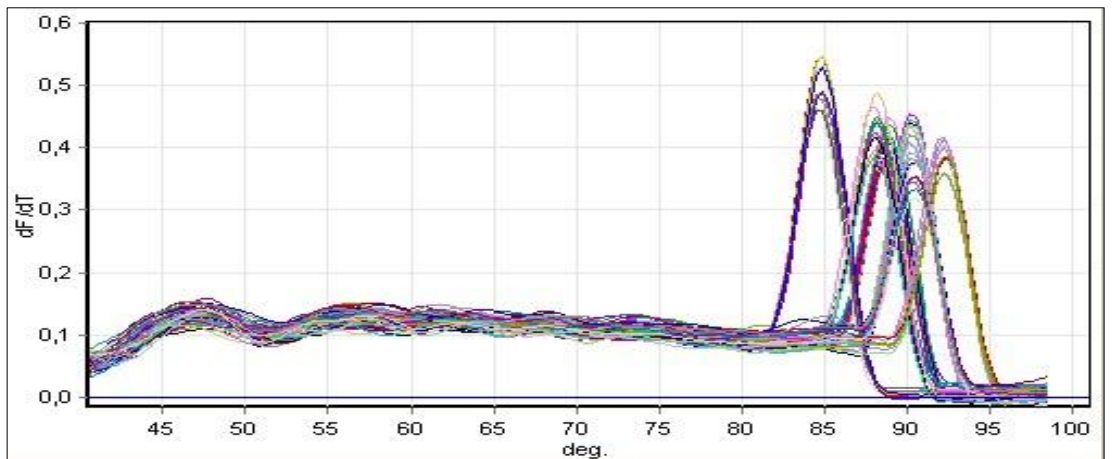
**Şekil 4.112.** 1. Grup genlerine ait 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 ve 1000 Gy dozlanmış örneklerin erime eğrisi



**Şekil 4.113.** 2. Grup genlerine ait 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 ve 1000 Gy dozlanmış örneklerin amplifikasyon grafiği



**Şekil 4.114.** 2. Grup genlerine ait 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 ve 1000 Gy dozlanmış örneklerin standart grafiği



**Şekil 4.115.** 2. Grup genlerine ait 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 ve 1000 Gy dozlanmış örneklerin erime eğrisi

RT-qPCR ile gen ifade düzeylerinin belirlenmesinin ardından spesifik amplifikasyon kontrolü için % 1'lik agaroz jel elektroforezi yapılmıştır (Şekil 4.116-122). Jel görüntülerinde üst-sağdan başlayarak sıralanışı Tablo 4.38'de verildiği şekildedir.

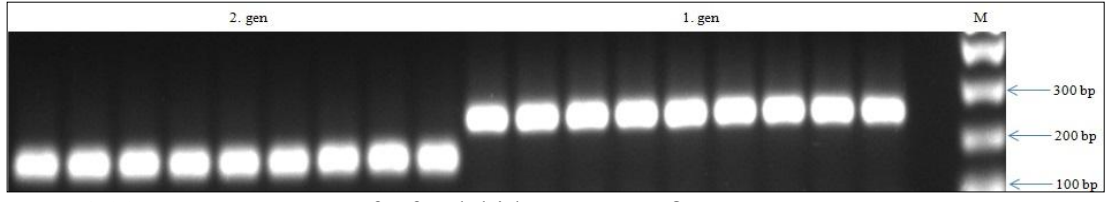
**Tablo 4.38.** Örneklerin agaroz jeldeki pozisyonları

Kuyucuk sırası (sağdan başlayarak)	Radyasyon dozu (Gy)	Kuyucuk sırası (sağdan başlayarak)	Radyasyon dozu (Gy)
1	Marker	11	1000
2	Boş	12	100
3	100	13	200
4	200	14	300
5	300	15	400
6	400	16	500
7	500	17	600
8	600	18	700
9	700	19	800
10	800	20	1000

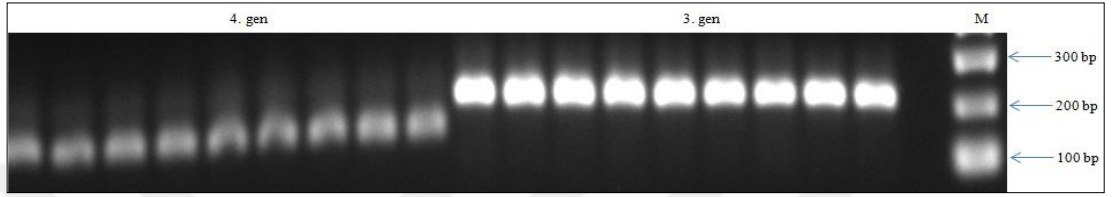
Agaroz jel elektroforezi uygulamasında her jele iki gene ait numune yüklenmiştir. Her gene kod verilerek jel görüntüsü düzenlenmiştir. Bu kodlar Tablo 4.39'da verildiği şekildedir.

**Tablo 4.39.** Agaroz jel elektroforezindeki genlere ait kodlamalar

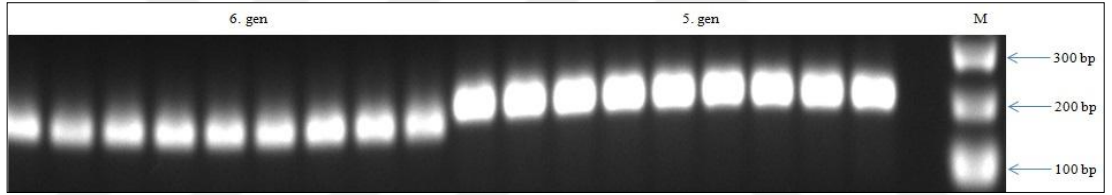
Deney kodu	Gen	Deney kodu	Gen
1	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz	8	Glutamat sentaz büyük altbirimi
2	$\beta$ -Karbonik anhidraz	9	V-tip ATP sentaz altbirim-C
3	Hidrojenaz HypA	10	Sitokrom C oksidaz altbirim-I
4	Hidrojenaz HypB	11	Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi
5	H <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> -glutamat simport membran kanal proteini	12	NADH dehidrogenaz altbirim-B
6	Katyon değiştirici membran kanal proteini geninin	13	Üreaz yardımcı protein UreE
7	Arginin dekarboksilaz	14	Üreaz yardımcı protein UreG



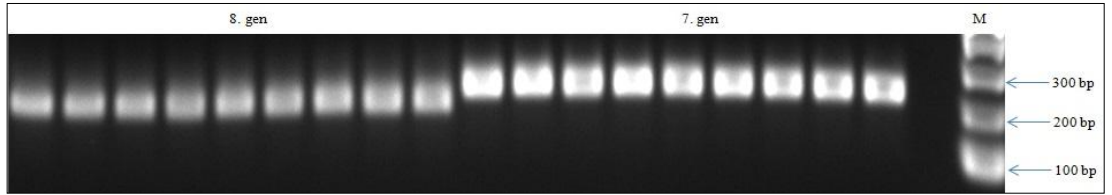
**Şekil 4.116.** Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz ve  $\beta$ -Karbonik anhidraz geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü



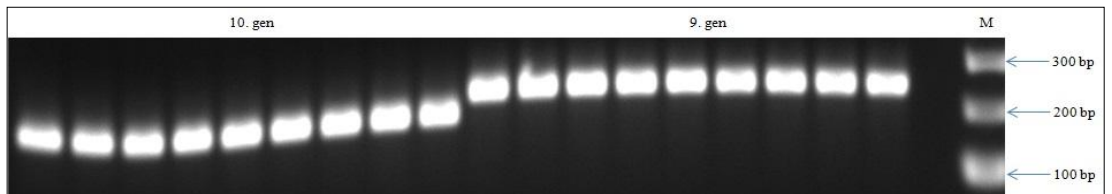
**Şekil 4.117.** Hidrojenaz HypA ve Hidrojenaz HypB geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü



**Şekil 4.118.**  $H^+/Na^+$ -glutamat simport membran kanal proteini ve Katyon değiştirici membran kanal proteini geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü

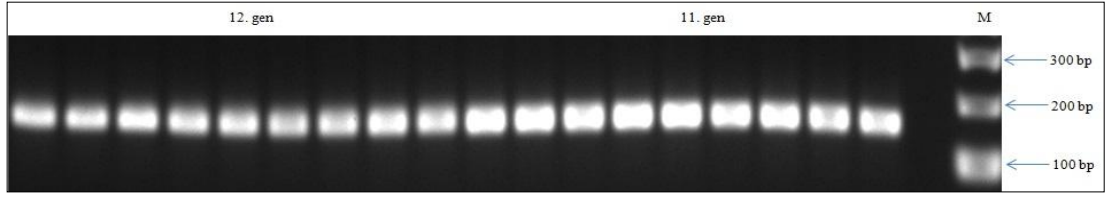


**Şekil 4.119.** Arginin dekarboksilaz ve Glutamat sentaz büyük altbirimi geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü

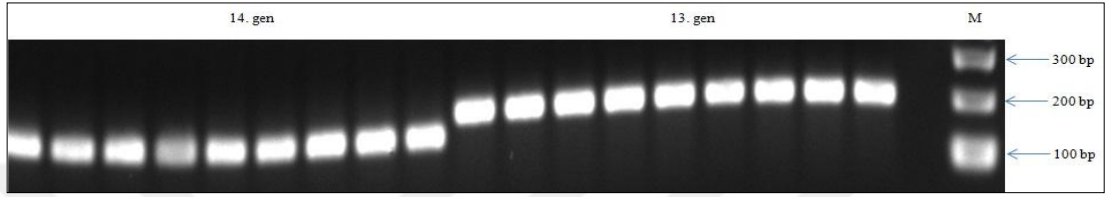


**Şekil 4.120.** V-tip ATP sentaz altbirim-C ve Sitokrom C oksidaz altbirim-I geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü





**Şekil 4.121.** Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi ve NADH dehidrogenaz altbirim-B geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü



**Şekil 4.122.** Üreaz yardımcı protein UreE ve Üreaz yardımcı protein UreG geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü

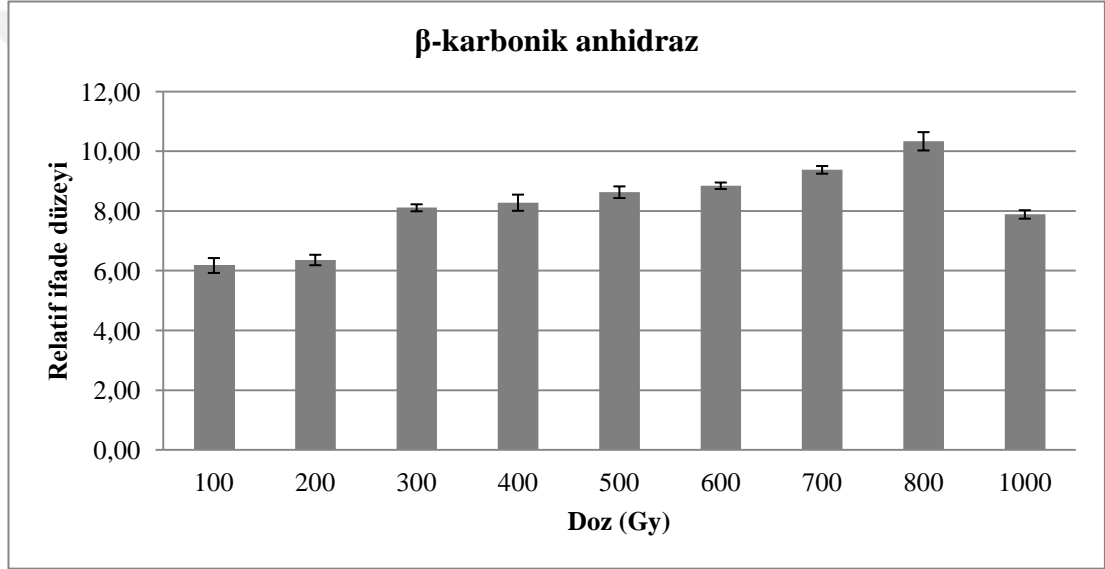
Radyasyon uygulanmayan örnek kalibrasyon değeri için seçilerek radyasyon uygulanmış örnekler normalizasyon için kullanıldı. Genlerin amplifikasyon grafiklerinde eşik (treshold) değerleri belirlendi (Ct değerleri).

İfade düzeyleri gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz referans alınarak anlamlılık aralığı 0,05'den küçük ( $P < 0,05$ ) olacak şekilde değerlendirildi. Livak metoduna göre  $\Delta\Delta C_t$  değerinin hesaplanmasının ardından 2'nin negatif kuvveti şeklinde alınan ifade düzeyleri hesaplandı ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) (Tablo 4.40-52).

Tekrarların  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  standart sapmaları hesaplandı ve grafiklerde ortalama değer ( $\pm$  standart sapma) şeklinde belirtildi. Bu hesaplama ile çıkan relatif ifade düzeyleri o koşullar altında hedef genin, gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz genine göre kaç kat arttığı veya azaldığı belirlendi, hesaplanarak grafikler her gen için oluşturuldu (Şekil 4.123-135).

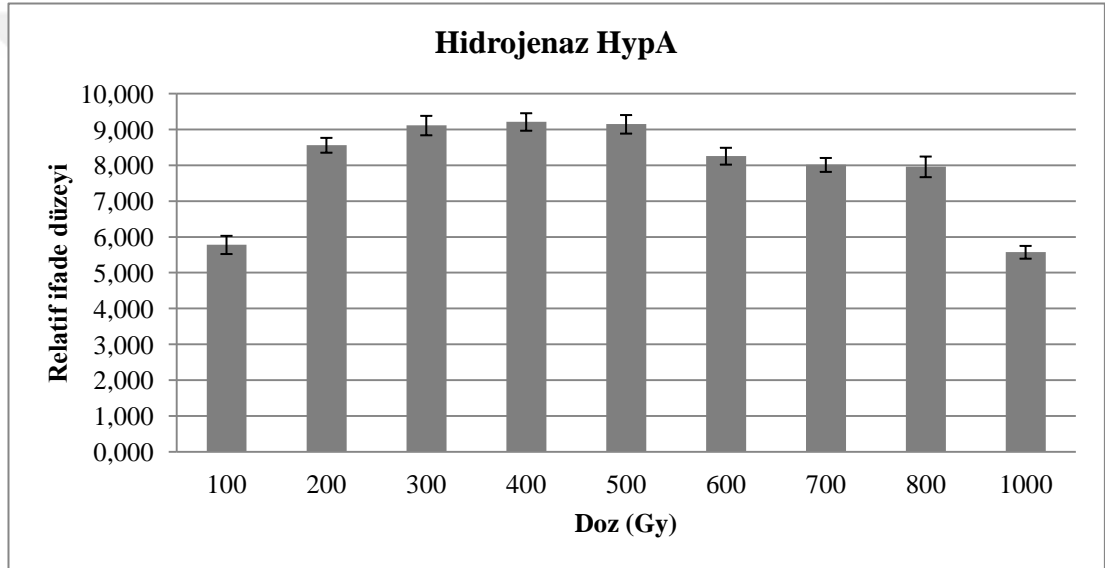
**Tablo 4.40.**  $\beta$ -karbonik anhidraz'ın  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

Radyasyon dozu (Gy)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
100	6,18 ( $\pm 0,249$ )
200	6,36 ( $\pm 0,175$ )
300	8,11 ( $\pm 0,117$ )
400	8,28 ( $\pm 0,271$ )
500	8,63 ( $\pm 0,195$ )
600	8,85 ( $\pm 0,109$ )
700	9,38 ( $\pm 0,128$ )
800	10,34 ( $\pm 0,307$ )
1000	7,89 ( $\pm 0,142$ )

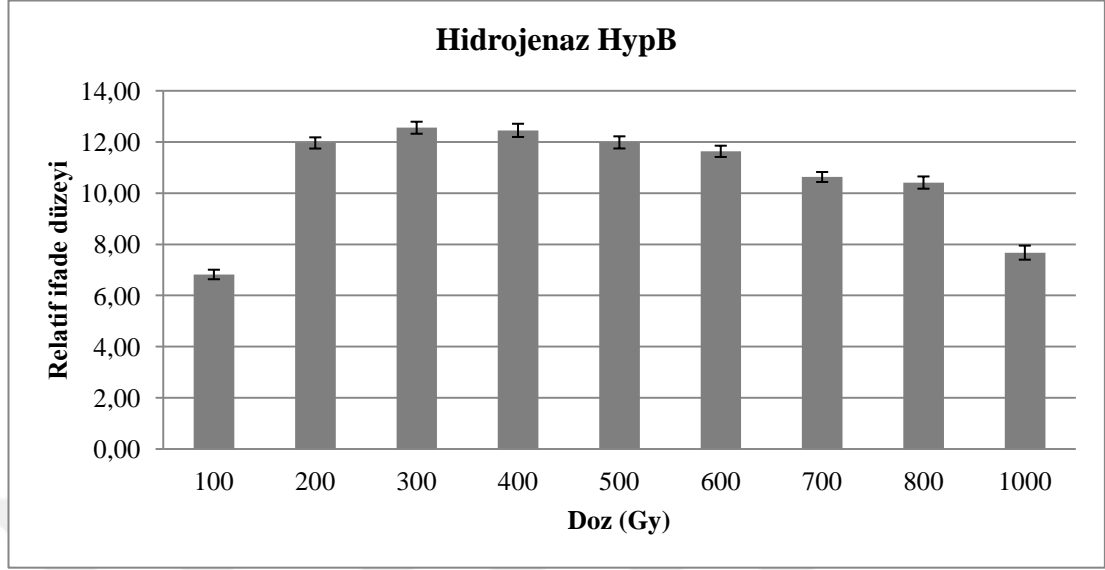
**Şekil 4.123.**  $\beta$ -karbonik anhidrazın tüm radyasyon dozlarında ifade düzeyleri

**Tablo 4.41.** Hidrojenaz HypA 'ın  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

Radyasyon dozu (Gy)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
100	5,780 ( $\pm 0,254$ )
200	8,560 ( $\pm 0,207$ )
300	9,110 ( $\pm 0,271$ )
400	9,210 ( $\pm 0,244$ )
500	9,145 ( $\pm 0,259$ )
600	8,255 ( $\pm 0,235$ )
700	8,012 ( $\pm 0,194$ )
800	7,958 ( $\pm 0,288$ )
1000	5,574 ( $\pm 0,178$ )

**Şekil 4.124.** Hidrojenaz HypA tüm radyasyon dozlarında ifade düzeyleri**Tablo 4.42.** Hidrojenaz HypB 'ın  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

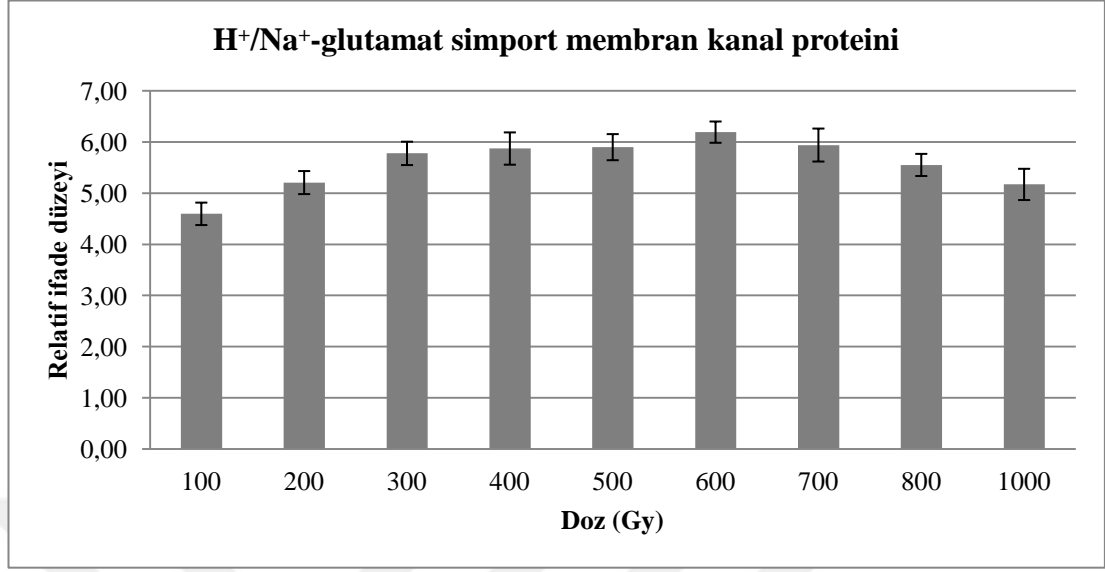
Radyasyon dozu (Gy)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
100	6,82 ( $\pm 0,186$ )
200	11,96 ( $\pm 0,219$ )
300	12,55 ( $\pm 0,235$ )
400	12,45 ( $\pm 0,258$ )
500	11,98 ( $\pm 0,237$ )
600	11,63 ( $\pm 0,220$ )
700	10,63 ( $\pm 0,195$ )
800	10,41 ( $\pm 0,239$ )
1000	7,67 ( $\pm 0,275$ )



**Şekil 4.125.** Hidrojenaz HypB tüm radyasyon dozlarında ifade düzeyleri

**Tablo 4.43.**  $H^+/Na^+$ -glutamat simport membran kanal proteini'nin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

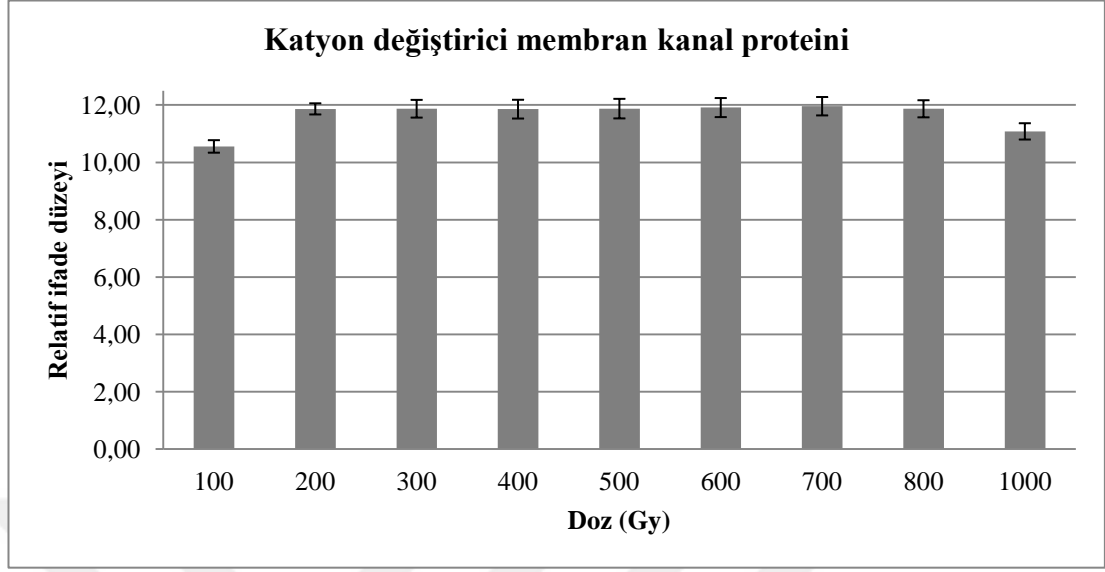
Radyasyon dozu (Gy)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
100	4,59 ( $\pm 0,219$ )
200	5,21 ( $\pm 0,225$ )
300	5,78 ( $\pm 0,228$ )
400	5,87 ( $\pm 0,315$ )
500	5,90 ( $\pm 0,255$ )
600	6,19 ( $\pm 0,208$ )
700	5,94 ( $\pm 0,322$ )
800	5,55 ( $\pm 0,216$ )
1000	5,17 ( $\pm 0,305$ )



**Şekil 4.126.** H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-glutamat simport membran kanal proteini tüm radyasyon dozlarında ifade düzeyleri

**Tablo 4.44.** Katyon değiştirici membran kanal proteini'nin 2<sup>-ΔΔCt</sup> değerleri

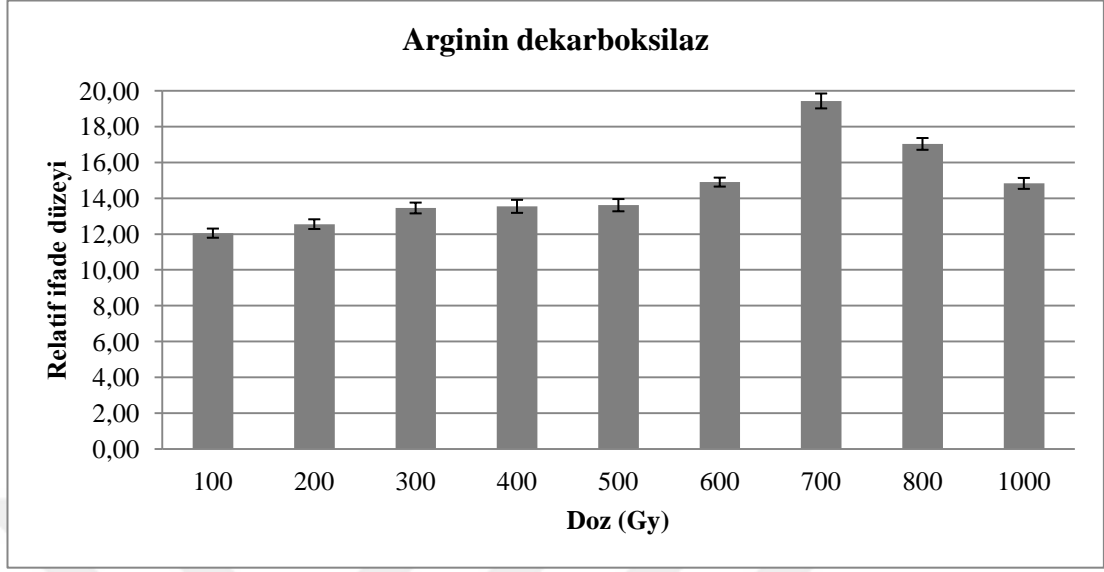
Radyasyon dozu (Gy)	2 <sup>-ΔΔCt</sup>
100	10,56 (±0,218)
200	11,87 (±0,194)
300	11,87 (±0,309)
400	11,86 (±0,327)
500	11,87 (±0,341)
600	11,91 (±0,332)
700	11,96 (±0,321)
800	11,87 (±0,298)
1000	11,08 (±0,284)



**şekil 4.127.** Kasyon değiştirici membran kanal proteini tüm radyasyon dozlarında ifade düzeyleri

**Tablo 4.45.** Arginin dekarboksilaz'ın  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

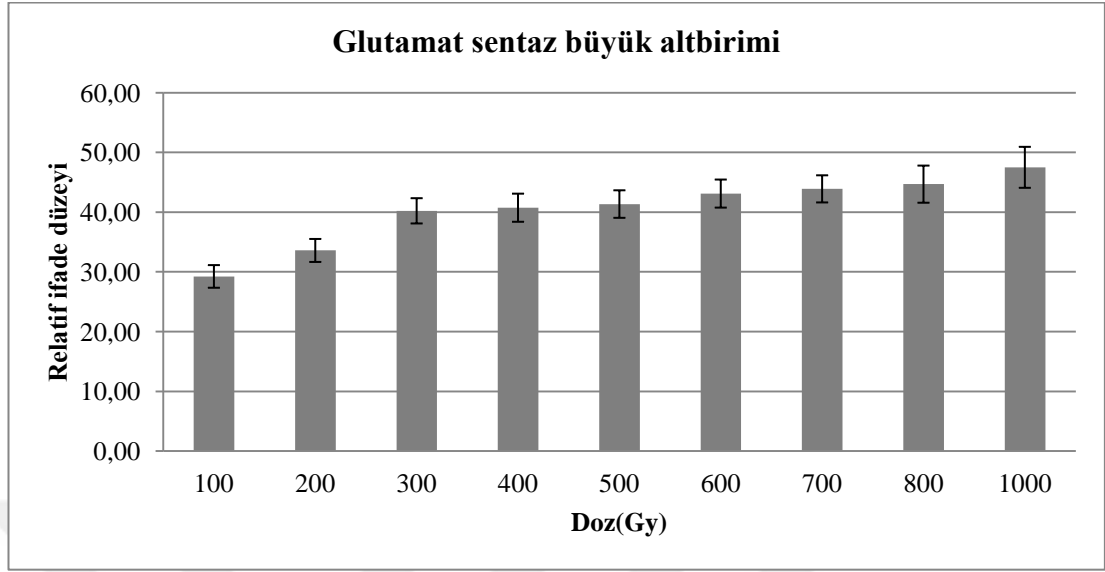
Radyasyon dozu (Gy)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
100	12,05 ( $\pm 0,256$ )
200	12,55 ( $\pm 0,271$ )
300	13,45 ( $\pm 0,301$ )
400	13,55 ( $\pm 0,363$ )
500	13,61 ( $\pm 0,342$ )
600	14,90 ( $\pm 0,250$ )
700	19,43 ( $\pm 0,416$ )
800	17,03 ( $\pm 0,329$ )
1000	14,83 ( $\pm 0,305$ )



**Şekil 4.128.** Arginin dekarboksilaz tüm radyasyon dozlarında ifade düzeyleri

**Tablo 4.46.** Glutamat sentaz büyük altbirimi'nin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

Radyasyon dozu (Gy)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
100	29,24 ( $\pm 1,895$ )
200	33,59 ( $\pm 1,924$ )
300	40,22 ( $\pm 2,116$ )
400	40,74 ( $\pm 2,354$ )
500	41,36 ( $\pm 2,305$ )
600	43,11 ( $\pm 2,349$ )
700	43,90 ( $\pm 2,271$ )
800	44,69 ( $\pm 3,107$ )
1000	47,50 ( $\pm 3,428$ )

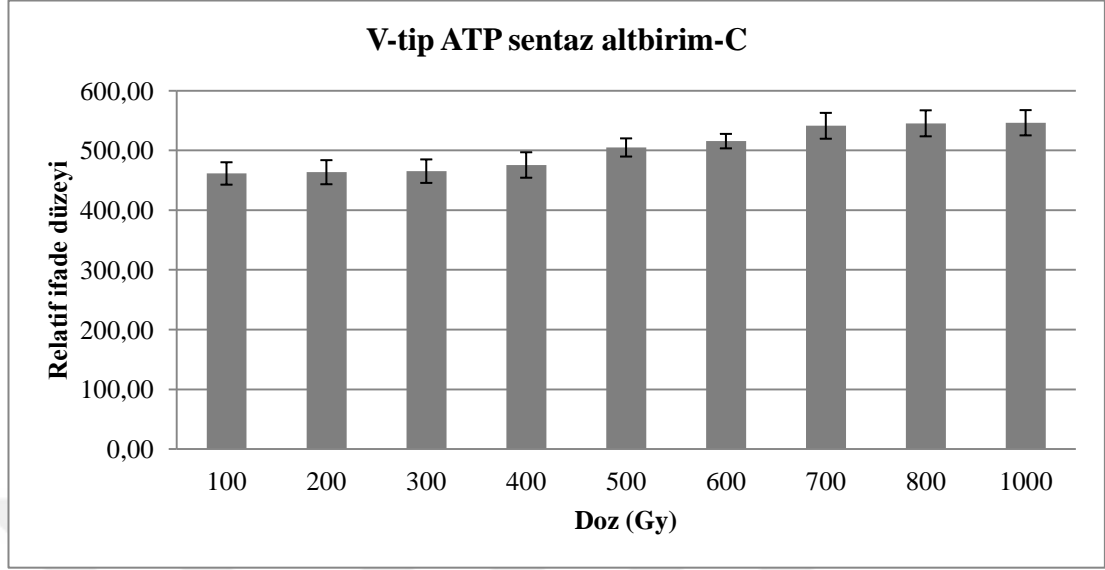


**Şekil 4.129.** Glutamat sentaz büyük altbirimi tüm radyasyon dozlarında ifade düzeyleri

**Tablo 4.47.** V-tip ATP sentaz altbirim-C'nin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

Radyasyon dozu (Gy)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
100	461,44 ( $\pm 18,746$ )
200	463,55 ( $\pm 20,154$ )
300	465,31 ( $\pm 19,672$ )
400	475,61 ( $\pm 21,334$ )
500	504,95 ( $\pm 15,218$ )
600	515,55 ( $\pm 12,108$ )
700	541,19 ( $\pm 21,642$ )
800	545,37 ( $\pm 21,784$ )
1000	546,33 ( $\pm 21,140$ )

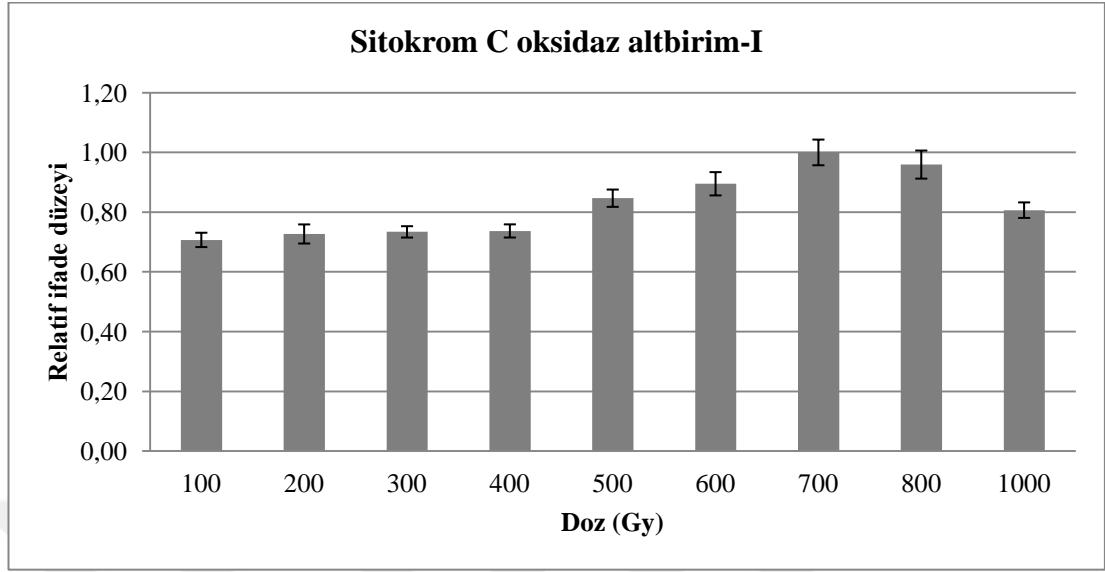




Şekil 4.130. V-tip ATP sentaz altbirim-C tüm radyasyon dozlarında ifade düzeyleri

Tablo 4.48. Sitokrom C oksidaz altbirim-I'in  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

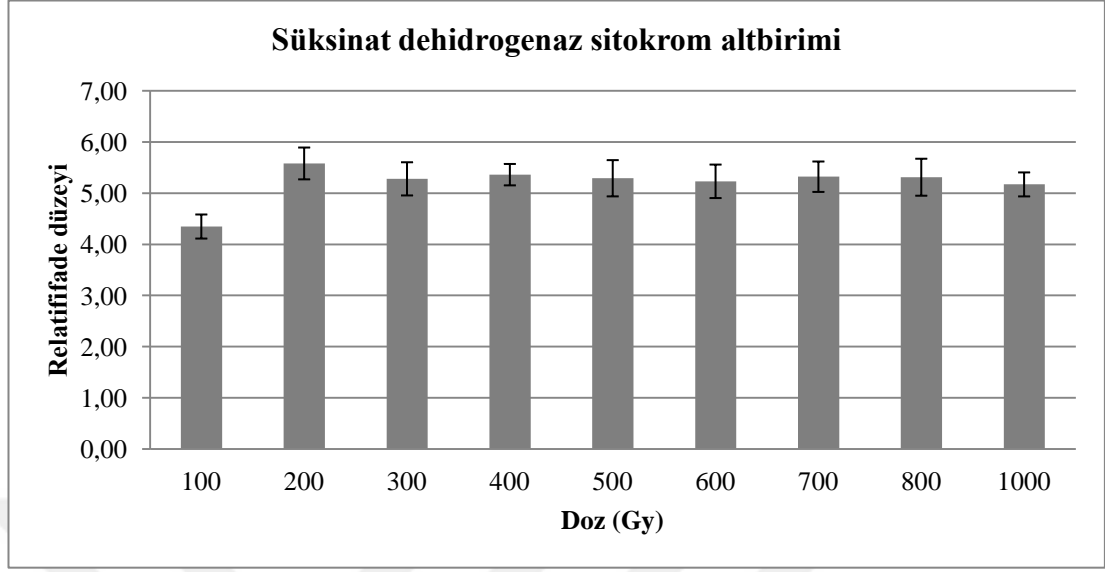
Radyasyon dozu (Gy)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
100	0,71 ( $\pm 0,024$ )
200	0,73 ( $\pm 0,032$ )
300	0,73 ( $\pm 0,019$ )
400	0,74 ( $\pm 0,022$ )
500	0,85 ( $\pm 0,029$ )
600	0,90 ( $\pm 0,039$ )
700	1,00 ( $\pm 0,043$ )
800	0,96 ( $\pm 0,047$ )
1000	0,81 ( $\pm 0,026$ )



**Şekil 4.131.** Sitokrom C oksidaz altbirim-I tüm radyasyon dozlarında ifade düzeyleri

**Tablo 4.49.** Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi'nin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

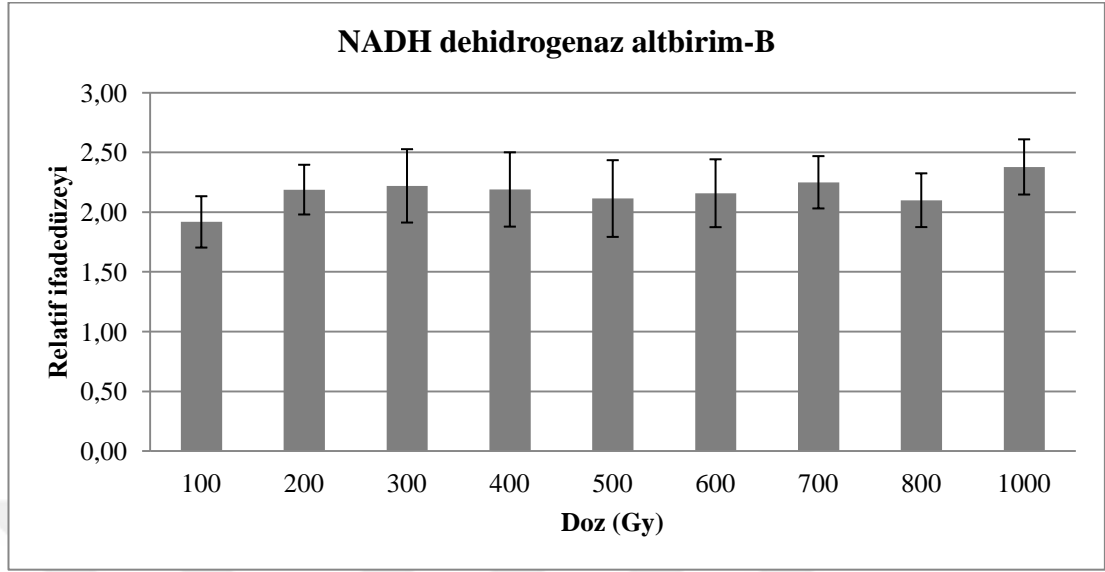
Radyasyon dozu (Gy)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
100	4,35 ( $\pm 0,235$ )
200	5,58 ( $\pm 0,311$ )
300	5,28 ( $\pm 0,324$ )
400	5,36 ( $\pm 0,209$ )
500	5,29 ( $\pm 0,354$ )
600	5,23 ( $\pm 0,327$ )
700	5,32 ( $\pm 0,297$ )
800	5,31 ( $\pm 0,361$ )
1000	5,17 ( $\pm 0,234$ )



**Şekil 4.132.** Süksinat dehidrogenaz sitokrom altbirimi tüm radyasyon dozlarında ifade düzeyleri

**Tablo 4.50.** NADH dehidrogenaz altbirim-B'nin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

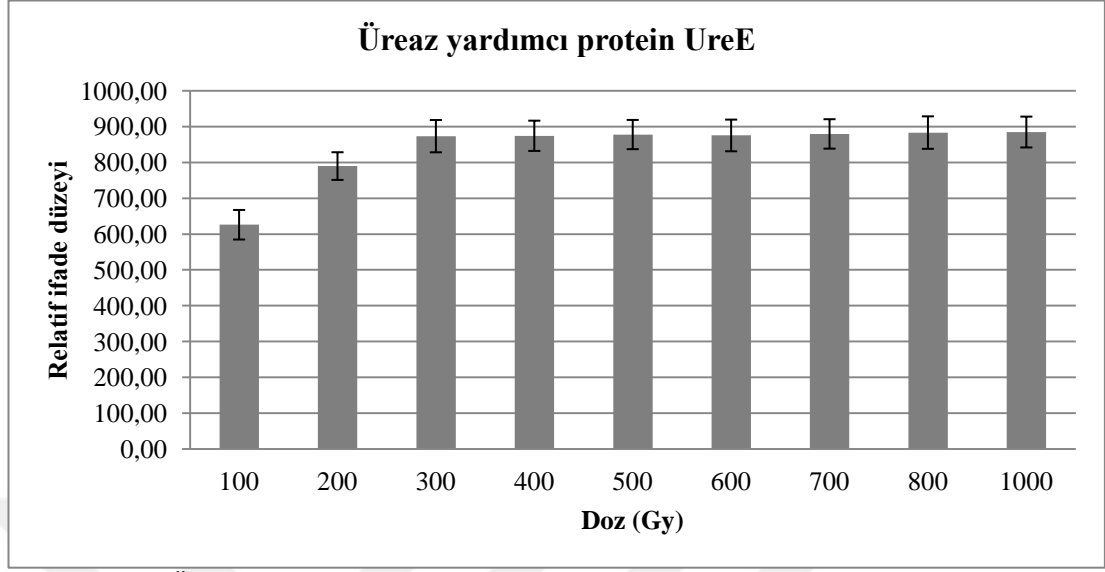
Radyasyon dozu (Gy)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
100	1,92 ( $\pm 0,215$ )
200	2,19 ( $\pm 0,208$ )
300	2,22 ( $\pm 0,307$ )
400	2,19 ( $\pm 0,311$ )
500	2,11 ( $\pm 0,321$ )
600	2,16 ( $\pm 0,284$ )
700	2,25 ( $\pm 0,219$ )
800	2,10 ( $\pm 0,225$ )
1000	2,38 ( $\pm 0,231$ )



**Şekil 4.133.** NADH dehidrogenaz altbirim-B tüm radyasyon dozlarında ifade düzeyleri

**Tablo 4.51.** Üreaz yardımcı protein UreE'nin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

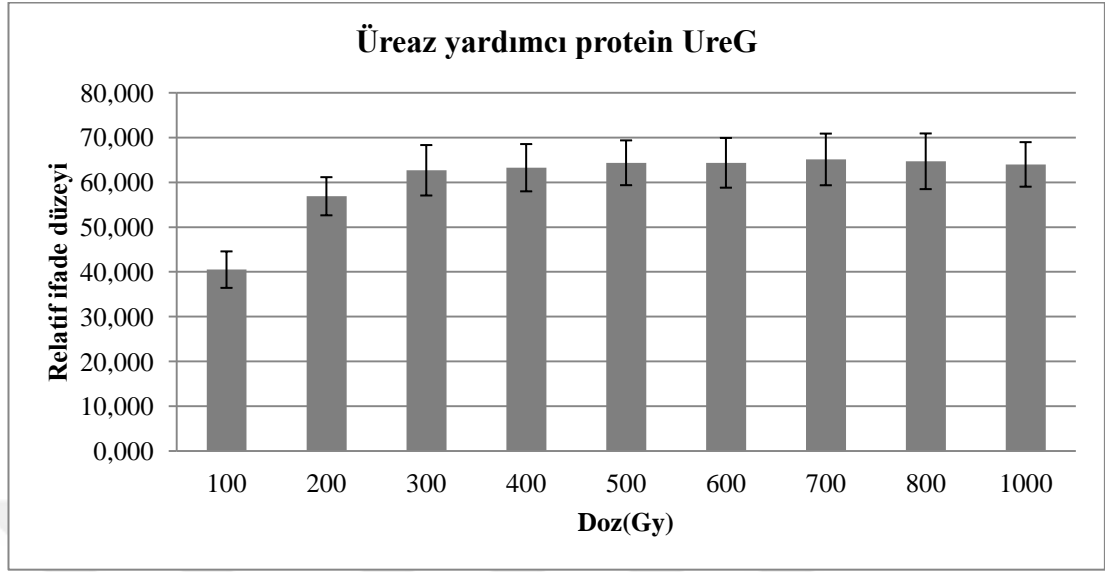
Radyasyon dozu (Gy)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
100	625,99 ( $\pm 41,215$ )
200	789,70 ( $\pm 38,63$ )
300	873,10 ( $\pm 45,03$ )
400	874,13 ( $\pm 42,21$ )
500	877,63 ( $\pm 40,81$ )
600	875,15 ( $\pm 44,21$ )
700	879,35 ( $\pm 41,06$ )
800	883,10 ( $\pm 45,33$ )
1000	884,65 ( $\pm 43,00$ )



**Şekil 4.134.** Üreaz yardımcı protein UreE tüm radyasyon dozlarında ifade düzeyleri

**Tablo 4.52.** Üreaz yardımcı protein UreG'nin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

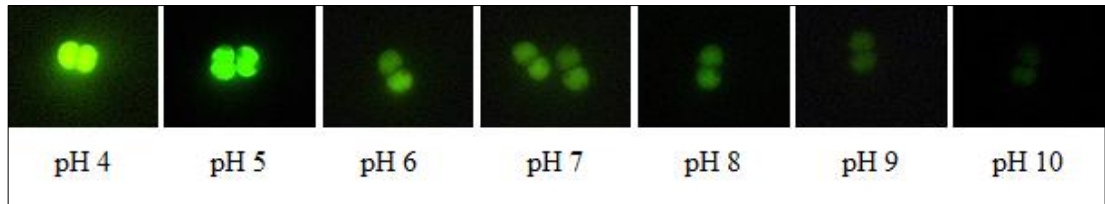
Radyasyon dozu (Gy)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
100	40,504 ( $\pm 4,073$ )
200	56,886 ( $\pm 4,257$ )
300	62,683 ( $\pm 5,629$ )
400	63,255 ( $\pm 5,276$ )
500	64,354 ( $\pm 4,998$ )
600	64,350 ( $\pm 5,552$ )
700	65,102 ( $\pm 5,765$ )
800	64,688 ( $\pm 6,213$ )
1000	63,987 ( $\pm 4,971$ )



Şekil 4.135. Üreaz yardımcı protein UreG tüm radyasyon dozlarında ifade düzeyleri

#### 4.9. Floresan Boya ile Hücre İçi pH Ölçümü

*D. radiodurans*, yöntem bölümünde belirtilen protokol ile pHrodo™ Green AM ile boyanarak farklı pH'lardaki besiyerlerinde 45 dk. sonrasında hücre içi pH'nın ne olduğu kalitatif olarak belirlendi (Şekil 4.136). pHrodo™ Green AM boyasının pH'sının düşük olduğu şartlarda daha parlak, pH'nın yüksek olduğu şartlarda daha zayıf bir ışımaya yapmaktadır.



Şekil 4.136. *D. radiodurans*'ın floresan boya ile farklı pH'lardaki görüntüleri

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hücre sel faaliyetlerin devamı için ortam pH'sının belirli aralıklarda sabit tutulması elzemdir. Özellikle hücre çeşitli çevresel streslere maruz kaldığında oluşan hasarların onarılması adına metabolik öncelikler fizyolojik homeostasisinin tekrar tesis edilmesi doğrultusunda gelişmektedir.

Canlıların radyasyona olan toleransı değişmekle birlikte özellikle hücrenin yönetici molekülü olan DNA hasarına karşı onarım mekanizmaları bulunmaktadır. Bu metabolik faaliyetlerin işlevselliğini sağlayabilmek için bozulan hidrojen konsantrasyonunu tekrar normal sınırlar içine almak hücre için en temel ihtiyaç olmaktadır. Radyasyona maruz kalan bir hücrenin, iyonize ışığın geçtiği tüm noktalarında radyolizis adı verilen kovalent bağların kopması meydana gelmektedir. Başlıca hasarlar; hücre membran bütünlüğünün bozulması, peptid bağlarının kopması, reaktif oksijen türlerinin artışı, DNA'da çift veya tek zincir kırıkları, nükleotidlerde anormal modifikasyonlar, pH dengesizliği ve karbohidratların toksik türevlerinin oluşumu şeklinde sıralanabilir. Bu hasarların giderilmesinde rol oynayan çeşitli antioksidan, biyomolekül sentez ve DNA onarım mekanizmalarının en iyi şekilde çalışabilmesi için pH dengeleyici aktif ve pasif sistemlerin işlevi önem arz etmektedir.

Tez çalışmasında üstün DNA onarım yeteneğine sahip *D. radiodurans*'ın farklı koşullar altında pH dengesini nasıl gerçekleştirdiği araştırıldı. Elde edilen bulgular ve literatürde yapılmış çalışmalar ışığında yorumlar yapıldı.

*D. radiodurans* hücre duvarında karotenoid bulunan bir gram pozitif bakteridir (Cox ve Battista, 2005). Büyüme eğrisinde hücrelerin 17. Saat sonrasında ölüm fazına girdiği tespit edildi. Canlı hücre sayısında bu saatten sonra azalma gözlemlendiği halde absorbandsdaki yükselmenin devam etmesinin nedeni; hücre ölümlerinden dolayı açığa çıkan serbest karotenoidlerin ve hücre içeriği miktarındaki artışın etkin olduğu şeklinde yorumlandı.

Büyüme eğrisinin  $\log_{10}[\text{CFU/ml}]$ -zaman grafiğinden logaritmik faza girdiği ve çıktığı saatlerdeki hücre sayıları ile büyüme hız sabiti ( $\mu$ ) aşağıda verildiği şekilde hesaplanmıştır.

$N_1$  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

$$\ln N_1 - \ln N_0 = \mu \times (t_1 - t_0)$$

$$\ln(51 \times 10^7) - \ln(12 \times 10^7) = \mu \times (14 - 9)$$

$$1,446 = \mu \times 5$$

$$\mu = 0,289 \text{ saat}^{-1}$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

$$t_d = \frac{0,693}{0,289 \text{ saat}^{-1}}$$

$$t_d = 2,398 \text{ saat}$$

*D. radiodurans*'ın yöntem kısmında belirtildiği şartlarda büyüme hız sabiti ( $\mu$ )  $0,289 \text{ saat}^{-1}$  ve ikilenme süresi ( $t_d$ , doubling time)  $2,398 \text{ saat}$  olarak belirlendi. Literatürde yapılmış farklı çalışmalarda ikilenme süresi  $1,5-3 \text{ saat}$  arasında bulunmuştur. Bu araştırmalarda elde edilen büyüme eğrileri ile karşılaştırmalar yapıldığında bulunan sonuçlar literatürle paralel değerlerde çıkmıştır (White vd., 1999; Holland vd., 2006).

*D. radiodurans* için en uygun yaşam pH'sı  $7,0-7,4$  olarak bildirilmiştir (Battista vd., 2000; Zhang vd., 2005; Blasius vd., 2008; Daly vd., 2010). Farklı pH'larda eşit miktarda inokülasyon ile yapılan  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de inkübasyon sonucu  $24 \text{ saat}$  hücre sayımında en yüksek hücre sayısı  $480 \times 10^6 \text{ CFU/ml}$  ile pH  $7,25$ 'de tespit edilmiştir. Ayrıca pH  $7,25 \pm 0,25$  değerlerine bakıldığında *D. radiodurans*'ın  $7,00$ 'da  $7,50$ 'ye göre daha fazla çoğalma olduğu gözlemlenmiştir. pH'nın  $7,75-6,75$  aralığı dışında



herhangi bir çoğalma görülmemesi canlının asidofilik veya alkalofilik olmadığını teyit etmiştir. Fakat 24. saatte pH 5’de hücre sayısının ( $5,8 \times 10^6$ ) hemen hemen ilk inokülasyon kültürü sayısı kadar olması *D. radiodurans*’ın asidik koşullarda bir miktar dayanıklılığının olduğunu göstermiştir. pH 5 olan kültürde 24. saat sonrası pH’nın 6,69 olmasının sebebinin hücre lizislerinden dolayı ortamın bazikleşmesi ve *D. radiodurans*’ın bulunduğu ortam koşullarını iyileştirmek için hücre dışına tampon maddeler vermesi olarak yorumlandı.

Optimum pH’ya eşit mesafelerdeki 6,75’den asidik ve 7,75’de bazik şartlarda yaklaşık olarak eşit çoğalma olduğu görülmektedir. Bu durum *D. radiodurans*’ın hem bazik hem de asidik koşullarda kısmi olarak hayatta kalabilme becerisinin olduğunu göstermektedir. Fakat deney koşullarında 75 mM tampon madde içeren besiyerlerinde çalışılması ve inkübasyonun kapalı kültür şartlarında yapılmasından ötürü biyoreaktörde gerçek zamanlı pH kontrollü şartlarda tekrarlanması gerekli görülmüştür.

Primer dizaynında tüm genlerin reverse ve forward primerlerinin Tm değerlerinin ortalaması 60,2 °C olarak hesaplanmış gradient PCR ile bağlanma sıcaklığı seçilirken bu değer göz önünde bulundurulmuştur. Her gen için yapılan gradient PCR numuneleri agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilerek 53 °C devam eden deneyler için bağlanma sıcaklığı olarak seçilmiştir.

Wen ve arkadaşlarının *Helicobacter pylori* üzerinde yaptıkları bir çalışmada pH’sı 7,4, 6,2, 5,5, ve 4,5 olan besiyerlerine 5 mM üre ilaveli ve ilavesiz olarak inkübe ettikleri hücrelerin gen ifade profillerini RT-qPCR ve mikro dizilim (microarray) yöntemleriyle belirlemişlerdir. Bunun yanı sıra aynı hücrelerin hücre içi pH durumlarını BCECF floresan boya kullanarak belirlemişlerdir. Sonuç olarak hidrojenaz (hypE), hidrojenaz (hypC), üreaz yardımcı protein (ureE), üreaz yardımcı protein (ureI) ve karbonik anhidraz genlerinin ifade düzeylerinde pH 7,4’ten 4,5’e doğru gidildikçe artış olduğu belirtilmiştir. Üre ilaveli besiyerlerinde ilavesizlere

nazaran daha düşük ifade düzeyleri rapor edilmiştir (Wen vd., 2003; Scott vd., 2007; Krulwich vd., 2011).

Çalışmamızda bu sonuçlara benzer olarak uzun süreli inkübasyon deneyinde;  $\beta$ -karbonik anhidraz, hidrojenaz hypB, üreaz yardımcı protein (ureE) ve üreaz yardımcı protein (ureG) genlerinin 1. saat gen ifade düzeylerinin asidik koşullarda daha yüksek olduğu belirlendi.

$\beta$ -karbonik anhidrazın 1. saat ifade düzeyleri incelendiğinde 6,75 de referans genine göre 1,18 kat fazla ifade olduğu tespit edildi. pH 6,75 kültüründe  $\beta$ -karbonik anhidrazın ifade düzeyinin zamanla azaldığı görüldü. Optimum pH'dan düşük ve yüksek durumlar karşılaştırıldığında asidik çevre şartlarında hücrenin daha hızlı transkripsiyonel tepki verdiği görülmüştür. Diğer taraftan bazik şartlarda ifade düzeyindeki tepki 5. saatte referans gene göre 1,47 kat artarak en yüksek fark olarak belirlenmiştir. Hücrelerin 24. saatte ölüm fazına girmesi ile ortam pH'sında ki değişiklikler, reaktif oksijen türlerinin ve toksik hücre atıklarının artmasından kaynaklanan zorlu yaşam şartlarında  $\beta$ -karbonik anhidrazın pH dengesindeki rolünün azalmış olma ihtimali vardır.

Kısa süreli inkübasyon sonuçlarına bakıldığında  $\beta$ -karbonik anhidrazın düşük ve yüksek pH'larda ifadesinin arttığı görüldü. Buna karşın ifade düzeyinde pH'sı 7.00 ve 7.50 olan besiyerlerinde 7.25'e göre 10. dk. sırasıyla 0,84 ve 0,83 kat azalma belirlendi. Ayrıca uzun süreli inkübasyon ile karşılaştırıldığında bazik çevre şartlarında daha düşük ivme ile ifade tepkisi açık bir şekilde tespit edildi. Kısa süreli inkübasyon deneyinde  $\beta$ -karbonik anhidrazın en yüksek ifade düzeyi 30.dk. pH 7,75'de 1,83 kat olarak hesaplandı. 10. dakika haricinde tüm zamanlarda en yüksek ifadenin pH 7,75'de olması, hücrenin bazik çevre şartlarında  $\beta$ -karbonik anhidraz katalizli reaksiyonun  $\text{HCO}_3^-$  ve  $\text{H}^+$  yönüne kaydığı şeklinde düşünülebilir. Hücre dışındaki yüksek  $[\text{H}^+]$  hücre duvarından periplazmik boşluğa difüze olduğunda ortam pH'sının dengelenmesi için reaksiyon  $\text{CO}_2$  ve  $\text{H}_2\text{O}$  yönünde gerçekleşmekte olduğu tahmin edilmiştir.

Ayrıca Bury-Moné ve arkadaşlarının *H. pylori* ile yaptığı çalışmada üreaz ile  $\beta$ -karbonik anhidraz enzimlerinin kooperatif reaksiyonlarıyla asidik şartlarda periplazmik pH'nın dengelenmesinde rol aldıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada karbonik anhidraz genleri susturulan suşların hücre pH homeostasisini sağlayamadıkları ve mide rahatsızlıklarına yol açamadıkları belirtilmiştir (Bury-Moné vd., 2008).

Casey ve arkadaşları asidik şartlarda üreaz yardımcı kanal protein olan UreI'nin pH'nın 6,00 düşük olduğu durumlarda hücre içine üre alımı için aktive olduğunu bildirmiştir. İçeri alınan ürenin alınmasıyla üreaz katalizinde  $\text{NH}_3$  ve  $\text{H}_2\text{CO}_3$  oluşumu artmaktadır. Bir başka çalışmada Cussac ve arkadaşları oluşan  $\text{H}_2\text{CO}_3$ 'ün  $\beta$ -karbonik anhidraz katalizi sonucu oluşan  $\text{CO}_2$ 'in periplazmik membrana difüze olduğunu burada da membrana bağlı  $\alpha$ -karbonik anhidraz enziminin yardımıyla  $\text{H}_2\text{O}$  ile  $\text{HCO}_3^-$  ve  $\text{H}^+$  oluşturduğunu ileri sürmüşlerdir. Oluşan  $\text{H}^+$  iyonunun üreaz kataliziyle oluşan ve periplazmaya difüze olan  $\text{NH}_3$  ile  $\text{NH}_4^+$  iyonu oluşumunu sağladığı bildirilmiştir (Bkz. Şekil 2.14) (Cussac vd., 1992; Casey vd., 2010). Denemelerde üreaz yardımcı protein UreE ve UreG'nin 20.dakikadan sonra hem 6,75'de hem de 7,75'de ifade düzeylerinin arttığı belirlenmiştir. En yüksek ifade düzeyi 2,69 ve 2,38 kat ifade düzeyiyle 30. dakikada pH 7,75'de tespit edilmiştir. 24. Saatte her iki geninde ifade düzeyi düşmüştür.

Radyasyon deneyinde  $\beta$ -karbonik anhidrazın ifade düzeyi 800 Gy dozda 10,34 kata kadar artmış sonrasında 1000 Gy'da % 23,7 oranında azalmıştır. Deneyde her radyasyon dozunda en az yaklaşık 6 katlık bir ifade düzeyinde artış görülmektedir. Ayrıca  $\beta$ -karbonik anhidraz ile beraber pH dengelenmesinde önemli rolü bulunan üreazın UreE ve UreG alt birimlerinin de ifade düzeylerinde her dozda çok belirgin bir şekilde artış vardır. UreE 300 Gy dan 1000 Gy'a kadar hemen hemen değişmeyen yüksek bir ifade düzeyinde izlenmiştir. UreE tüm genler içinde en yüksek ifade düzeyine sahip olarak 1000 Gy dozda 884,65 kat değişim göstermiştir. UreG ise en yüksek ifade değerine 65,102 kat ile 700 Gy'da ulaşmıştır. 700 Gy radyasyon sonrasında çok düşükte olsa azalma görülmüştür.

Hidrojenaz hypB, hidrojenaz kompleksinin oluşturulmasında önemli bir aktivite edici alt birimdir. Hidrojenaz hypB GTP'nin hidrolizini sağlayarak büyük alt birimin oluşmasını sağlamaktadır. Hidrojenaz hypA şelatladığı nikel atomunu hidrojenaz hypB aracılığıyla hidrojenaz yapısına aktarmaktadır (Hedderich, 2004; Hayes vd., 2006; De lacey vd., 2007). Denemelerde hidrojenaz hypA geninde 1. saatte asidik koşullarda daha düşük ifade düzeyleri (referans gen ifadesinin 0,61 katı) ortaya çıkmıştır. Buna karşın hidrojenaz hypB geninin 1. ve 3. saatlerde pH 6,75'de ki ifade düzeyleri pH 7,75'dekinden daha fazla olmuştur.

Besiyeri için kullandığımız TGY'de ilave olarak Nikel olmadığı için hypA'nın ifadesinin hypB'ye göre daha düşük olması beklenen bir durum olarak görülmüştür. TGY içeriğindeki maya ekstraktında eser miktarda bulunan nikelin hidrojenazın pH dengelemedeki rolünü sınırlandırıldığı düşünülmektedir. Buna rağmen kısa süreli inkübasyonda pH 7,75'de ifade düzeyi referans gene göre 3,34 kat artmıştır.

Ang ve arkadaşlarının *H.pylori* üzerinde pH 7,2 ve 5,5 olan besiyerinde yaptıkları çalışmada pH 5,5'de; hidrojenaz (hypB) (84,907 kat), Guinone-reaktif Ni-Fe hidrojenaz (hydD) (46,604 kat) ve kinon-reaktif Ni-Fe hidrojenaz (hydB) (96,464 kat) genlerinin ifade düzeylerinde artış olduğunu bildirmişlerdir (Ang vd., 2001).

Bu durumda *D. radiodurans*'ın hidrojenaz enzimini bazik şartlarda daha fazla kullandığı sonucundan hareketle çift yönlü katalizde reaksiyonun H<sup>+</sup> tarafına doğru işlevinin arttığı söylenebilir. Reaksiyonun ortam pH'sını yükseltecek şekilde H<sub>2</sub> yönünde gerçekleşmesi *H. pylori* için kullanılan bir durum olsa da *D. radiodurans* için hidrojenaz geninin bazik şartlarda daha aktif olduğu tespit edilmiştir. Radyasyon deneyinde her iki geninde korelatif artışlar gösterdiği tespit edilmiştir. 300, 400 ve 500 Gy dozlarında en yüksek değerleriyle bir plato oluşturan HypA ve HypB sonrasındaki dozlarda düşüşe geçmiştir. HypA en yüksek 400 Gy'da 9,21 kat, HypB ise 300 Gy'da 12,55 kat fazla ifade edilmişlerdir.

$H^+$ /  $Na^+$  glutamat simport kanal proteini hücre dışından hücre içine glutamat ile beraber  $H^+$  ve  $Na^+$  iyonlarının alınmasını sağlayan bir membran proteinidir. Aynı zamanda hücreye alınan  $Na^+$  iyonları ayrı bir antiport kanal proteiniyle dışarıya tekrar aktarılırken hücre içine  $H^+$  iyonunun alınmasını sağlamaktadır. Glutamat asit karakterli bir amino asittir. Tüm bu bilgiler ışığında çevresel şartların bazik olduğu durumda  $H^+$ /  $Na^+$  glutamat simport kanal proteini şayet ortamda glutamat var ise hücre içine  $H^+$  aktarmaya çalışarak periplazmadaki pH'yı düşürme yönünde eğilime sahip olacaktır (Tolner vd., 1992; Tolner vd., 1995a).

$H^+$ /  $Na^+$  glutamat simport kanal proteini benzeri işlevi olan fakat antiport şekilde  $Na^+$ ,  $K^+$  ve  $Ca^{+2}$  gibi katyonları hücre içine veya dışına aktararak tersi yönde  $H^+$  transferi gerçekleştiren katyon değiştirici membran kanal proteininin de hücre içi pH dengelenmesinden rolü bulunmaktadır (Booth, 1985; Boron, 2004; Boron, 2015).

*D. radiodurans*'ın çoklu altbirimli  $Na^+/H^+$  antiport kanal proteininin DR0880'den DR0886'ya kadar olanları bazı termofilikler ve alkali şartlarda yaşayabilen bakterilerde karakteristik olarak bulunmaktadır. Bu membran proteininin *D. radiodurans*'ın alkali şartlarda büyüebilmesine yardımcı olduğu düşünülmektedir (Hiramatsu vd., 1998; Makarova vd., 2001).

Kısa süreli inkübasyon denemesinin 10. dk'sında uygun pH şartlarının  $\pm 0,25$  olduğu durumlarda normale yakın ifade düzeyi gözlemlenmiştir. En yüksek ifade düzeyi pH 7,00'da 20. dk'da 1,87 kat olarak belirlendi. pH 7,75'de 3. ve 5. saatlerde 1,00 katın üzerine çıkan ifade düzeyi ölüm fazında tekrar düşmüştür. Buradan sonuçla  $H^+$ /  $Na^+$  glutamat simport kanal proteininin çevresel pH değişimlerine yüksek anlamlılıkta tepki göstermediği ayrıca pH'nın bazik olduğu durumda asidik şartlara göre daha az ifade edildiği tespitine varılabilir.

*E. coli* ve alkalofilik *Bacillus* türlerinde yapılan çalışmalarda  $H^+$ /  $Na^+$  glutamat simport kanal proteininin bazik şartlarda pH regülasyonunda rol aldığı bildirilmiştir.  $Na^+$  iyonunun az olduğu durumlarda katyon değiştirici kanal proteinlerin alternatif olarak görev aldığı bu çalışmalarla gösterilmiştir (Padan ve Schuldiner, 1994; Tolner

vd., 1995b; Padan vd., 2005). Kısa süreli inkübasyon denemesinde Katyon değiştirici kanal proteinin en yüksek ifadesi 2,30 kat olarak pH 7,75’de belirlendi. Optimum pH’nın  $\pm 0,25$  olduğu kültürlerde ifade düzeyi düşük olarak belirlenmiştir. 30. dk’ya kadar pH 6,75 ve 7,75’de artan ifade düzeyi durağan ve ölüm fazlarında yaklaşık olarak referans gen ile aynı miktarda gen aktifliğine sahip olmuştur. Radyasyon denemesinde  $H^+ / Na^+$  glutamat simport kanal proteini en yüksek ifade düzeyine 6,19 kat ile 600 Gy’da ulaşmıştır. 600 Gy’dan sonrasında ifade düzeyi düşmüştür. Katyon değiştirici membran kanal proteini 700 Gy’da 11, 96 kata kadar artan ifade düzeyine sahiptir. Fakat 700 Gy’dan sonrasında ifade düzeylerinde azalma gözlemlenmiştir.

Arginin dekarboksilaz gibi amino asit dekarboksilasyonu gerçekleştiren enzimler karboksil grubunu uzaklaştırarak  $CO_2$  şeklinde çıkışı ile agmatin oluşumunu katalizlemektedir (Fritz, 2012). Bakteriler amino asit dekarboksilasyonu ile ortamdaki  $H^+$  iyonu miktarını azaltabilirler. Bunun tersi reaksiyonla pH’nın yükselmesini de sağlayabildikleri bilinmektedir (Bkz. Şekil 2.10) (Foster, 2004; Abeyrathne vd., 2016). Deneylerde pH 7,75’de 1,89 kat artan gen ifade düzeyi 24. Saatte 7,00 (1,89 kat) ve 7,50 (1,93 kat)’de de yükselme göstermiştir.

Kısa süreli inkübasyon deneyinde pH 6,75’de 40. dk’ya kadar yükselen ifade uzun süreli inkübasyon deneyine bakıldığında 5. Saate kadar düşmüştür. 24. saatte tüm pH’larda 5. saate göre bir artış bulunmakta iken sadece 7,75’de düşüş olması *D. radiodurans*’ın ölüm fazında bazik ortam pH’sını dengeleyebilmek için dekarboksilasyon reaksiyonunu kullanmadığını göstermiştir. Radyasyon uygulamasında hücre değişen fizyolojik durumunda arginin dekarboksilaz geninin ifadesini 700 Gy’a kadar arttırmıştır. En yüksek ifade düzeyi referans gene göre 19,43 kat artarak 700 Gy’da belirlenmiştir.

Dekarboksilasyonda reaksiyon yönü agmatin yönünde ise oluşan  $CO_2$  bir paradoks oluşturmaktadır. Metabolizmada  $H^+$  konsantrasyonunu azaltmaya yönelik gerçekleşen bu reaksiyon aynı zamanda  $\beta$ -karbonik anhidrazında substratı olan  $CO_2$  miktarında artışa sebep olmaktadır. Dekarboksilasyon reaksiyonunda harcanan her mol  $H^+$  iyonu başına ortamda artan  $CO_2$ ’in  $\beta$ -karbonik anhidraz katalizörlüğünde

H<sub>2</sub>O ile bir mol H<sup>+</sup> oluşturmaktadır. Bu iki reaksiyonun birbiriyle bağlantıları ayrıca metabolomik çalışma gerektirmesi bakımından eldeki veriler ile kesin yorum yapmak mümkün gözükmemektedir.

Metabolizmada önemli fonksiyonlara sahip olan glutamat amino asidi birçok amino asidin sentezlenmesinde transaminasyon reaksiyonlarında amino grubu kaynağı olmaktadır (Bkz. Şekil 2.11). Metabolizmada farklı görevleri olan glutamat amino asidi bazı koenzimler ve nörotransmitterlerin prekürsörü olmasının yanında hücrel iletişiminde de rol almaktadır. H<sup>+</sup>/ Na<sup>+</sup> glutamat simport kanal proteini hücre içine ve dışına H<sup>+</sup> iyonu transfer ederken aynı zamanda glutamatta aktarmaktadır. Hücre içi pH'nın düşük olduğu durumlarda ortamda şayet yeterli miktarda glutamat var ise H<sup>+</sup> iyonu bu kanal proteinleriyle aktif taşıma gerçekleştirilerek hücre dışına atılır. Ayrıca hücrede glutaminin ve  $\alpha$ -ketoglutaratın varlığında glutamat sentaz reaksiyonuyla her iki mol glutamat oluşumunda bir mol H<sup>+</sup> iyonu harcanarak pH'nın yükselmesi sağlanmaktadır (Booth, 1985; Tolner vd., 1992).

Kısa süreli inkübasyon deneyinde pH 6,75'de glutamat sentaz ifadesi 30. dk'ya kadar yükselerek referans gene göre 1,38 kat fazla ölçülmüştür. Aynı zamanda pH 7,75'de en yüksek ifade düzeyi 1,80 kat ile 30. dk'da belirlenmiştir. pH 6,75'de 24. saatte en yüksek ifade (1,38) düzeyine göre % 53 oranında azalan bir değer hesaplanmıştır (0,74). Bunun sebebinin; asidik kültürde, ölüm fazında glutamat sentazın pH dengelenmesinde bir rolünün olmaması olarak yorumlanmıştır. Dış ortamdaki pH değişiminin glutamat sentazın ifade düzeyine etkisi çok belirgin olmamasına karşın radyasyon uygulamasında 29,24-47,50 kat aralığında 1000 Gy'a kadar sürekli artış hesaplanmıştır.

Vakuoler (V<sub>1</sub>V<sub>0</sub>) ATP sentazlar ökaryotik canlılarda endozom, lizozom ve sekresyon organelleri gibi yapıların membranlarında bulunan, aktif taşıma ile H<sup>+</sup> iyonu taşıyarak pH regülasyonunu sağlayan membran kanal proteindir. Bu ATPaz çeşidi bakterilerde mezozom yapılarında da bulunmaktadır. F-tip ATPaz'larda olduğu gibi ATP sentezinde rol almazlar ve Na<sup>+</sup> bağımlı aktiviteye sahiptirler. Hücre dışına H<sup>+</sup>

iyonu aktararak hücre içinde düşen pH'nın yükseltilecek dengelenmesini katalizlemektedirler (Murata vd., 2005; Beyenbach ve Wieczorek, 2006; Marshansky ve Futai, 2008; Rawson vd., 2015).

Yapılan çalışmalarla *Enterococcus hirae*'nin bazik şartlarda V-tip ATPaz ve Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> değiştirici kanal proteinlerinin besiyerinde yeterli Na<sup>+</sup> olduğu durumlarda pH regülasyonunda majör rol oynadığı bildirilmiştir (Waser vd., 1992; Kakinuma ve Igarashi, 1999).

Denemelerde V-tip ATPaz'ın ifade düzeylerinde yalnız pH 7,00 kültüründe 10., 20. ve 30. dk.'larda sırasıyla 1.39, 1.87 ve 2.23 kat artış gözlemlenmiştir. pH'sı 7,75 olan denemede ifade genel olarak referans gene yakın miktarlarda hesaplanmıştır. Uzun süreli inkübasyon deneyinde 24. saat verileri incelendiğinde asidik kültürden bazik kültüre doğru bir artış olduğu görülmektedir. Radyasyon uygulamasında V-tip ATPaz'ın en yüksek ikinci ifade seviyesine sahip olduğu belirlenmiştir. UreE'nin ifade düzeyi her ne kadar 13 genin içerisinde en yüksek olarak hesaplanmış olsa da UreG'nin değerlerinde aynı oranda yüksek olmayan ifade düzeylerinin üreaz aktivitesi için negatif bir baskı oluşturacağı olasıdır. Bu sebeple V-tip ATPaz'ın en yüksek ifade seviyesinin 546,33 olması ayrıca sürekli radyasyon dozuna göre bir artışın gözlemlenmesi pH regülasyonunda önemli genlerden birisinin olduğu yorumunu ortaya çıkarmaktadır.

Oksidatif fosforilasyon yapan bakterilerde hücre membranının sitozöl içine kıvrımlanmış yapıları olan mezozomlarda bulunan elektron taşıma sistemi elemanları periplazmik boşlukta oluşturdukları H<sup>+</sup> gradienti yoluyla ATP sentezini gerçekleştirmektedirler. *D. radiodurans* gibi Gram pozitif bakterilerin gram negatiflerde bulunan ikinci bir fosfolipid membran bulunmamaktadır. Hücre zarı ile peptidoglikan tabaka arasında bulunan bölgeye periplazmik boşluk adı verilmektedir. Bu boşluk gram pozitiflerde küçük, gram negatiflerde ise büyük hacimli bir bölgedir. Bakterilerin yaşadığı ortamın pH'sı periplazmik membrana H<sup>+</sup> ve OH<sup>-</sup> difüzyonu ile hücrenin ATP üretimine etki etmektedir. Bu sebeple elektron taşıma sisteminin



periplazmik boşlukta proton gradienti oluşturan elemanlarının ifade düzeyleri hücre içindeki pH şartlarına ışık tutmaktadır (Madigan ve Martinko, 2009; Nelson ve Cox, 2013; Keha ve Küfrevioğlu, 2015).

Elektron taşıma sisteminde bulunan NADH dehidrogenaz NADH'dan bir  $H^-$  ve sitoplazmadan bir  $H^+$  iyonunu egzergonik olarak ubikinona aktarır. İkinci reaksiyon ise elektron aktarımından oluşan enerji ile sitoplazmadan periplazmaya dört  $H^+$  aktarımıdır. Süksinat dehidrogenaz, FAD ve Fe-S yapılarının prostetik grup olarak görev aldığı dört alt birimden oluşan sitrik asit döngüsünde görevli tek membrana bağlı enzimdir. Bu enzimin aktivitesindeki artış oksidatif fosforilasyon kaskatının ATP üretimi yönünde olduğunun bir göstergesidir. Ayrıca süksinatın fumarata dönüşümüyle  $FAD^+$  üzerine aktarılan  $H^+$  iyonlarını ubikinon aracılığıyla sitokrom c oksidaza taşımamını katalizleyerek hücre içi pH'nın düşmesine katkı sağlamaktadır (Slonczewski vd., 2009; Nelson ve Cox, 2013).

Sitokrom c oksidaz bakterilerde 3-4 alt birimden oluşan bir yapıya sahiptir. Sitokrom c üzerindeki elektronların moleküler oksijene ( $O_2$ ) aktarımını sağlayarak suya indirir. Hem elektronların aktarımını sağlayan bu kompleks aynı zamanda periplazmaya her bir elektronda iki protonun pompalanmasını katalizlemektedir. (Nelson ve Cox, 2013; Keha ve Küfrevioğlu, 2015).

Ang ve arkadaşlarının *H. pylori* üzerinde yaptıkları bir çalışmada asidik pH'da (5,5) NADH dehidrogenazın (NADH-ubikinon oksidoredüktaz) referans gene göre 77,173 kat ifade düzeyinde artış bildirmişlerdir. Ayrıca Sitokrom c oksidazın farklı üç alt biriminin ifadelerinde; 63.728, 21.697, 53.777 gibi yüksek değerler tespit etmişlerdir (Ang vd., 2001).

*D. radiodurans*'ın elektron taşıma sisteminde en belirgin değişim NADH dehidrogenazda ve sitokrom c oksidazda belirlendi. NADH dehidrogenaz geninin ifade düzeyi en yüksek 30. dk.'da 1,97 kat değişmiştir. Özellikle sitokrom c oksidaz geni pH; 6,75 den 7,75'e doğru kısa süreli inkübasyonda azalan bir şekilde ifade

olmuştur. Sitokrom c oksidaz geni 30. dk.'da pH 6,75'de en yüksek ifade düzeyine ulaşarak 1,64 kata ulaşmıştır. Kısa süreli inkübasyonda en düşük ifade pH 7,75'de gözlemlenmiştir. Süksinat dehidrogenaz geninin pH  $\pm 0,25$  olduğu kültürlerde referans genine yaklaşık ifade olurken 6,75 ve 7,75'de normal seviyenin altında kalmıştır. Bu durum pH'nın  $\pm 0,25$  olduğu kültürlerde hücrenin yaklaşık olarak normal ATP üretiminin gerçekleştirdiği şekilde yorumlanabilir. Bu konuda daha ayrıntılı fikir sahibi olmak için ATP miktarlarındaki değişimler incelenmelidir.

Radyasyon denemesinde denemede araştırılan elektron taşıma sistemi unsurlarından en yüksek ifade seviyesi süksinat dehidrogenaz sitokrom alt biriminde tespit edilmiştir (5,58 kat-200 Gy). Sitokrom c oksidaz geninin ifade düzeyi genel itibariyle referans genine göre düşük seviyelerde kalmıştır. Bu durum oksidatif fosforilasyonun seviyesinde normal ve aşağısında aktivite olduğu ihtimalini doğurmaktadır. NADH dehidrogenaz ifadesinin en yüksek 2,38 kat ile 1000 Gy'da olması, ayrıca tüm dozlarda genel olarak 2 katın üzerinde seyretmesi süksinat dehidrogenazın yükselen ifade düzeyleriyle birleştirildiğinde indirgenmiş formdaki ubiquinon konsantrasyonunda artışın olabileceği yorumu yapılabilir. Bu durumda membran içi potansiyelin artması söz konusu olacaktır.

Floresan boya ile hücre içi pH ölçümü, farklı pH'lardaki ve radyasyon uygulamasındaki ifade düzeyleri geniş bir perspektiften incelendiğinde şu sonuçlara ulaşılmıştır;

- pHrodo floresan boyasıyla yapılan denemede görüldüğü üzere *D. radiodurans* yüksek ve düşük H<sup>+</sup> seviyelerinde periplazma pH'sında değişimler oluşmaktadır. Dolayısıyla bu durum proton hareket gücünü etkileyeceğinden ATP üretiminde normal seviyelerden sapmalar gözlemlenebilecektir.
- Farklı pH şartlarında en yüksek ifade düzeyi Hidrojenaz hypA geninde 30. dk. pH 7,75'de 3,46 kat olduğu belirlendi.

- Genel olarak pH 7,25 normalizasyon değerinden bazık olan hücre dışı şartlarında genlerin ifade düzeylerinde artış olduğu belirlendi. V-tip ATPaz 30.dk. pH 7,00'da 2,23 kat ifade artışı ile bu genellemenin dışında kalmıştır.
- *D. radiodurans* hücre dışı H<sup>+</sup> konsantrasyonunun optimum pH'nın dışında olduğu şartlarda genel olarak gen ifade seviyelerine bakıldığında 30. dk'da belirgin metabolik tepki gösterdiği söylenebilir.
- Araştırma yapılan genlerin içinde üreaz ve hidrojenaz alt birimlerine ait ifade düzeyleri incelendiğinde farklı pH'larda yapılan inkübasyon deneylerinde HypA ve HypB'nin uzun süreli inkübasyon denemesi hariç korelasyon görülmüştür.
- Radyasyon denemesinde en yüksek ifade seviyesi 1000 Gy doz uygulamasında 884,65 kat değişimle UreE geninde tespit edilmiştir. Bunun yanında UreG'nin ifade düzeyi UreE'nin 13,8 kat altında belirlenmiştir.
- Radyasyon uygulanmış kültürlerde ikinci yüksek ifade seviyesi V-tip ATPaz'da 546,33 olarak hesaplanmıştır. Bu gene ait diğer dozlarda incelendiğinde hücre içi pH dengelenmesinde etkin olduğunun düşünülmektedir.
- V-tip ATPaz tek yönlü olarak H<sup>+</sup> iyonunun hücre içinden periplazmik boşluğa aktarılması katalizlemektedir. Bu sayede radyasyon uygulanan hücrelerde pH düşüşünün olduğu yorumunu yapmak mümkündür.

*D. radiodurans* ve diğer poliekstremofiliklerin özelliklerinin belirlenmesi endüstriyel, çevre ve medikal biyoteknoloji başta olmak üzere tüm bilim alanlarına yenilikler getirilmesi açısından önemlidir. Yapılan tez çalışması uzun bir metabolomik çalışmanın başlangıcı niteliğinde olup *D. radiodurans*'ın uygun olmayan pH şartlarında nasıl regüle edildiğine dair önemli bulgular ortaya koymuştur. İlerleyen çalışmalarda biyoinformatik destekli olarak, bahsi geçen genler ve araştırma konusu dışında kalmış diğer ilgili genlerin biyokimyasal olarak incelenmesi pH regülasyonu ve radyasyona dayanıklılığın ilişkili metabolizmalarının anlaşılmasını kolaylaştıracaktır.

## KAYNAKLAR

Abeyrathne, P. D., Chami, M., Stahlberg, H., "Biochemical and biophysical approaches to study the structure and function of the chloride channel (ClC) family of proteins", *Biochimie*, 128 (129): 154-162 (2016).

Ade, P. A. R., Aghanim, N., Alves, M. I. R., Armitage-Caplan, C. I., Amaud, M., Ashdown, M., Atrio-Barandela, F., Aumont, J., Ausse, H., Baccigalupi, C. and others, "Planck 2013 results. I. Overview of products and scientific results", *Astronomy & Astrophysics*, 571(11): 1-48 (2014).

Afify, A., Rashed, M. M., Ebtesam, A., El-Beltagi, H., "Effect of gamma radiation on the lipid profiles of soybean, peanut and sesame seed oils", *Grasas y aceites*, 64 (4): 356-368 (2013).

Agapov, A. A., Kulbachinskiy, A. V., "Mechanisms of stress resistance and gene regulation in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*", *Biochemistry-Moscow*, 80 (10): 1201-1216 (2015).

Ahn, J., Carson, C., Jensen, M., Juraku, K., Nagasaki, S., Tanaka, S., "Reflections on the Fukushima Daiichi Nuclear Accident", *Springer International Publishing*, İsviçre, 21-30 (2015).

Almiron, M., Link, A. J., Furlong, D., Kolter, R., "A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*", *Genes & development*, 6 (12b): 2646-2654 (1992).

Anderson, R., Hansen, K., "Structure of a novel phosphoglycolipid from *Deinococcus radiodurans*", *Journal of Biological Chemistry*, 260 (22): 12219-12223 (1985).

Ang, S., Lee, C.-Z., Peck, K., Sindici, M., Matrubutham, U., Gleeson, M. A., Wang, J.-T., "Acid-induced gene expression in *Helicobacter pylori*: study in genomic scale by microarray", *Infection and immunity*, 69 (3): 1679-1686 (2001).

Apel, K., Hirt, H., "Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction", *Annual Review of Plant Biology*, 55 (1): 373-399 (2004).

Asada, S., Takano, M., Shibasaki, I., "Deoxyribonucleic acid strand breaks during drying of *Escherichia coli* on a hydrophobic filter membrane", *Applied and environmental microbiology*, 37 (2): 266-273 (1979).

Attix, F. H., "Introduction to radiological physics and radiation dosimetry", *Wiley*, Weinheim, 20-27 (2008).

Attwood, D., "Soft x-rays and extreme ultraviolet radiation: principles and applications", *Cambridge university press*, Cambridge, 1-5 (2007).

Badger, M. R., Price, G. D., "The role of carbonic anhydrase in photosynthesis", *Annual review of plant biology*, 45 (1): 369-392 (1994).

Bahl, H., Scholz, H., Bayan, N., Chami, M., Leblon, G., Gulik-Krzywicki, T., Shechter, E., Fouet, A., Mesnage, S., Tosi-Couture, E. and others, "Molecular biology of S-layers", *FEMS Microbiology Reviews*, 20 (1-2): 47-98 (1997).

Bakeeva, L., Chumakov, K., Drachev, A., Metlina, A., Skulachev, V., "The sodium cycle. III. *Vibrio alginolyticus* resembles *Vibrio cholerae* and some other vibrios by flagellar motor and ribosomal 5S-RNA structures", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 850 (3): 466-472 (1986).

Baker-Austin, C., Dopson, M., "Life in acid: pH homeostasis in acidophiles", *Trends in microbiology*, 15 (4): 165-171 (2007).

Batar, B., "Meme kanseri hastalarının normal dokularında radyasyon tedavisine bağlı olarak gelişen akut yan etkilerin DNA tamir gen ekspresyonu ve DNA hasarı ile ilişkisinin incelenmesi", Doktora, *İstanbul Üniversitesi*, İstanbul, 139 (2013).

Battista, J. R., "Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*", *Annual Reviews in Microbiology*, 51 (1): 203-224 (1997).

Battista, J. R., Earl, A. M., White, O., "The stress responses of *Deinococcus radiodurans*", *Bacterial Stress Responses*, 383-391 (2000).

Bauermeister, A., Bentchikou, E., Moeller, R., Rettberg, P., "Roles of PprA, IrrE, and RecA in the resistance of *Deinococcus radiodurans* to germicidal and environmentally relevant UV radiation", *Archives of microbiology*, 191 (12): 913-918 (2009).

Bentzen, S. M., Harari, P. M., Mackie, T. R., Mehta, M. P., "Radiation oncology advances", *Springer Science & Business Media*, New York, 66-74 (2007).

Berlett, B., Chock, P., Yim, M., Stadtman, E., "Manganese (II) catalyzes the bicarbonate-dependent oxidation of amino acids by hydrogen peroxide and the amino acid-facilitated dismutation of hydrogen peroxide", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87 (1): 389-393 (1990).

Beyenbach, K. W., Wieczorek, H., "The V-type H<sup>+</sup> ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation", *Journal of Experimental Biology*, 209 (4): 577-589 (2006).

Bjelland, S., Seeberg, E., "Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation", *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 531 (1): 37-80 (2003).

Blasius, M., Hübscher, U., Sommer, S., "*Deinococcus radiodurans*: what belongs to the survival kit?", *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 43 (3): 221-238 (2008).

Booth, I. R., "Regulation of cytoplasmic pH in bacteria", *Microbiological Reviews*, 49 (4): 359-378 (1985).

Boron, W. F., "Regulation of intracellular pH", *Advances in Physiology Education*, 28 (4): 160-179 (2004).

Boron, W. F., "Regulation of Intracellular pH: Role of Na plus-coupled HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Transporters", *Acta Physiologica*, 215 (3): 3 (2015).

Bowes, J. H., Moss, J. A., "The effect of gamma radiation on collagen", *Radiation Research*, 16 (3): 211-223 (1962).

Brooks, B., Murray, R., "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 (1981).

Buob, R., "DNA Repair Mechanisms in the Radioresistant Bacterium *Deinococcus radiodurans* and in Human", Doktora, *Zürich Üniversitesi*, Zürich, 109 (2009).

Burrell, A. D., Feldschreiber, P., Dean, C., "DNA-membrane association and the repair of double breaks in X-irradiated *Micrococcus radiodurans*", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 247 (1): 38-53 (1971).

Bury-Moné, S., Mendz, G. L., Ball, G. E., Thibonnier, M., Stingl, K., Ecobichon, C., Avé, P., Huerre, M., Labigne, A., Thiberge, J.-M., "Roles of  $\alpha$  and  $\beta$ -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 (2008).

Cadet, J., Douki, T., Ravanat, J.-L., "Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA radiation", *Photochemistry and Photobiology*, 91 (1): 140-155 (2015).

Cancer, I. A. F. R. O., "IARC classifies radiofrequency electromagnetic fields as possibly carcinogenic to humans", *World Health Organization*, 5 (208): 1-6 (2011).

Carbonneau, M., Melin, A., Perromat, A., Clerc, M., "The action of free radicals on *Deinococcus radiodurans* carotenoids", *Archives of biochemistry and biophysics*, 275 (1): 244-251 (1989).

Carlos Lara, P., Joaquin Lopez-Penalver, J., de Araujo Farias, V., Carmen Ruiz-Ruiz, M., Javier Oliver, F., Ruiz de Almodovar, J. M., "Direct and bystander radiation effects: A biophysical model and clinical perspectives", *Cancer Letters*, 356 (1): 5-16 (2015).

Casey, J. R., Grinstein, S., Orlowski, J., "Sensors and regulators of intracellular pH", *Nature reviews Molecular cell biology*, 11 (1): 50-61 (2010).

Cheng, C., Kussie, P., Pavletich, N., Shuman, S., "Conservation of structure and mechanism between eukaryotic topoisomerase I and site-specific recombinases", *Cell*, 92 (6): 841-850 (1998).

Close, D. M., Nelson, W. H., Bernhard, W. A., "DNA damage by the direct effect of ionizing radiation: products produced by two sequential one-electron oxidations", *The Journal of Physical Chemistry A*, 117 (47): 12608-12615 (2013).

Compton, A. H., "A quantum theory of the scattering of X-rays by light elements", *Physical review*, 21 (5): 483 (1923).

Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., Lunec, J., "Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease", *The FASEB Journal*, 17 (10): 1195-1214 (2003).

Counsell, T., Murray, R., "Polar lipid profiles of the genus *Deinococcus*", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36 (2): 202-206 (1986).

Cox, M. M., Battista, J. R., "*Deinococcus radiodurans* - The consummate survivor", *Nature Reviews Microbiology*, 3 (11): 882-892 (2005).

Crawford, J., "A review of neutron radiation damage on corundum crystals", *Journal of Nuclear Materials*, 108: 644-654 (1982).

Cussac, V., Ferrero, R. L., Labigne, A., "Expression of *Helicobacter pylori* urease genes in *Escherichia coli* grown under nitrogen-limiting conditions", *Journal of bacteriology*, 174 (8): 2466-2473 (1992).

Çelik, S., "Ankara Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü radyasyondan korunma programı ve radyasyondan korunma optimizasyonu", Yüksek Lisans *Ankara Üniversitesi*, Ankara, (2013).

Daly, M. J., "Opinion: A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*", *Nature Reviews Microbiology*, 7 (3): 237-245 (2009).

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., Levine, R. L., "Small-molecule antioxidant proteome-shields in *Deinococcus radiodurans*", *PLoS one*, 5 (9): e12570 (2010).

Daly, M. J., Gaidamakova, E. K., Matrosova, V. Y., Vasilenko, A., Zhai, M., Leapman, R. D., Lai, B., Ravel, B., Li, S.-M. W., Kemner, K. M., "Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance", *PLoS Biol*, 5 (4): 92 (2007).

Daly, M. J., Gaidamakova, E. K., Matrosova, V., Vasilenko, A., Zhai, M., Venkateswaran, A., Hess, M., Omelchenko, M., Kostandarithes, H. M., Makarova,

K., "Accumulation of Mn (II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance", *Science*, 306 (5698): 1025-1028 (2004).

De lacey, A. L., Fernandez, V. M., Rousset, M., Cammack, R., "Activation and inactivation of hydrogenase function and the catalytic cycle: spectroelectrochemical studies", *Chemical Reviews*, 107 (10): 4304-4330 (2007).

De Loecker, W., Doms, D., Stas, M. L., "The effect of ionizing radiation on protein metabolism in stored rat skin", *Radiation Research*, 61 (2): 216-229 (1975).

Dose, K., Bieger-Dose, A., Ernst, B., Feister, U., Gómez-Silva, B., Klein, A., Risi, S., Stridde, C., "Survival of microorganisms under the extreme conditions of the Atacama Desert", *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 31 (3): 287-303 (2001).

Dose, K., Bieger-Dose, A., Kerz, O., Gill, M., "DNA-strand breaks limit survival in extreme dryness", *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 21 (3): 177-187 (1991).

Dose, K., Bieger-Dose, A., Labusch, M., Gill, M., "Survival in extreme dryness and DNA-single-strand breaks", *Advances in Space Research*, 12 (4): 221-229 (1992).

Earl, A. M., "Global Expression Analysis of *Deinococcus radiodurans*' response to ionizing radiation: Irre is a novel regulator of this response", Doktora, *Louisiana State University*, Louisiana, 229 (2003).

Eggington, J. M., Haruta, N., Wood, E. A., Cox, M. M., "The single-stranded DNA-binding protein of *Deinococcus radiodurans*", *Bmc Microbiology*, 4 (2004).

Elçi, E. S., "İyonize radyasyonun otofaji yolağında bulunan bazı genlerin ekspresyonuna etkisinin araştırılması", Doktora, *Hacettepe Üniversitesi*, Ankara, 101 (2013).

Farci, D., Bowler, M. W., Kirkpatrick, J., McSweeney, S., Tramontano, E., Piano, D., "New features of the cell wall of the radio-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*", *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1838 (7): 1978-1984 (2014).

Featherstone, C., Jackson, S. P., "DNA double-strand break repair", *Current Biology*, 9 (20): 759-761 (1999).

Feinendegen, L., "Evidence for beneficial low level radiation effects and radiation hormesis", *The British journal of radiology*, 78 (925): 3-7 (2014).

Ferradini, C., Jay-Gerin, J. P., "The effect of pH on water radiolysis: a still open question - a minireview", *Res Chem Intermed*, 26 (6): 549-565 (2000).

Fong, Y. H., Wong, H. C., Yuen, M. H., Lau, P. H., Chen, Y. W., Wong, K.-B., "Structure of UreG/UreF/UreH complex reveals how urease accessory proteins



facilitate maturation of *Helicobacter pylori* urease", *PLoS Biol*, 11 (10): e1001678 (2013).

Foster, J. W., "Escherichia coli acid resistance: tales of an amateur acidophile", *Nat Rev Micro*, 2 (11): 898-907 (2004).

Fritz, G., "Strategies of bacterial gene expression: regulatory mechanisms and functional aspects", *Universitätsbibliothek der Ludwig-Maximilians-Universität*, Münih, 10, 11 (2012).

Gopal, N., "Radiation sterilization of pharmaceuticals and polymers", *Radiation Physics and Chemistry*, 12 (1): 35-50 (1978).

Green, C. D., Long, K. S., Shi, H., Wolin, S. L., "Binding of the 60-kDa Ro autoantigen to Y RNAs: evidence for recognition in the major groove of a conserved helix", *RNA*, 4 (7): 750-765 (1998).

Greinert, R., de Vries, E., Erdmann, F., Espina, C., Auvinen, A., Kesminiene, A., Schuz, J., "European code against cancer 4th edition: ultraviolet radiation and cancer", *Cancer Epidemiol*, 39 (1): 75-83 (2015).

Grove, A., Wilkinson, S. P., "Differential DNA binding and protection by dimeric and dodecameric forms of the ferritin homolog Dps from *Deinococcus radiodurans*", *Journal of molecular biology*, 347 (3): 495-508 (2005).

Gupta, R. S., "Protein phylogenies and signature sequences: a reappraisal of evolutionary relationships among archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (4): 1435-1491 (1998).

Gutman, P. D., Carroll, J. D., Ian Masters, C., Minton, K. W., "Sequencing, targeted mutagenesis and expression of a recA gene required for the extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans*", *Gene*, 141 (1): 31-37 (1994).

Hall, E. J., Giaccia, A. J., "Radiobiology for the radiologist, *Lippincott Williams & Wilkins*, Philadelphia, 5-30 (2006).

Halliwell, B., Gutteridge, J. M., "Free radicals in biology and medicine, *Oxford University Press*, New York, (2015).

Hansen, M. T., "Multiplicity of genome equivalents in the radiation-resistant bacterium *Micrococcus radiodurans*", *Journal of bacteriology*, 134 (1): 71-75 (1978).

Havaki, S., Kotsinas, A., Chronopoulos, E., Kletsas, D., Georgakilas, A., Gorgoulis, V. G., "The role of oxidative DNA damage in radiation induced bystander effect", *Cancer Letters*, 356 (1): 43-51 (2015).

Hawiger, J., Jeljaszewicz, J., "Antibiotic sensitivity of *Micrococcus radiodurans*", *Applied microbiology*, 15 (2): 304-306 (1967).

Hayes, E. T., Wilks, J. C., Sanfilippo, P., Yohannes, E., Tate, D. P., Jones, B. D., Radmacher, M. D., BonDurant, S. S., Slonczewski, J. L., "Oxygen limitation modulates pH regulation of catabolism and hydrogenases, multidrug transporters, and envelope composition in *Escherichia coli* K-12", ***BMC microbiology***, 6 (1): 1 (2006).

He, Y., "High cell density production of *Deinococcus radiodurans* under optimized conditions", ***Journal of industrial microbiology & biotechnology***, 36 (4): 539-546 (2009).

Hedderich, R., "Energy-converting NiFe hydrogenases from archaea and extremophiles: Ancestors of complex I", ***Journal of Bioenergetics and Biomembranes***, 36 (1): 65-75 (2004).

Hensel, R., Demharter, W., Kandler, O., Kroppenstedt, R. M., Stackebrandt, E., "Chemotaxonomic and molecular-genetic studies of the genus *Thermus*: evidence for a phylogenetic relationship of *Thermus aquaticus* and *Thermusruber* to the genus *Deinococcus*", ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, 36 (3): 444-453 (1986).

Hiramatsu, T., Kodama, K., Kuroda, T., Mizushima, T., Tsuchiya, T., "A Putative Multisubunit Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter from *Staphylococcus aureus*", ***Journal of bacteriology***, 180 (24): 6642-6648 (1998).

Holland, A. D., Rothfuss, H. M., Lidstrom, M. E., "Development of a defined medium supporting rapid growth for *Deinococcus radiodurans* and analysis of metabolic capacities", ***Applied microbiology and biotechnology***, 72 (5): 1074-1082 (2006).

Hussein, A., "Radyasyon uygulanan ratlarda d vitamininin asimetric dimetil arjinin(adma) ve cinko düzeyleri üzerine etkisinin araştırılması", Doktora, ***Gazi Üniversitesi***, Ankara, 95: (2013).

Hüfner, S., "Photoelectron spectroscopy: principles and applications, 3. baskı", ***Springer Science & Business Media***, Berlin, 1-50, 384, 616 (2013).

Imlay, J. A., "Pathways of oxidative damage", ***Annual Reviews in Microbiology***, 57 (1): 395-418 (2003).

Imlay, J. A., "Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen", ***Molecular microbiology***, 59 (4): 1073-1082 (2006).

İnternet: Kyoto genler ve genomlar ansiklopedisi (KEGG) "D. radiodurans oksidatif fosforilasyon metabolizması" [http://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight\\_pathway?scale=1.0&map=dra00190&keyword=](http://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=dra00190&keyword=) (2016).

Jonas, K., "To divide or not to divide: control of the bacterial cell cycle by environmental cues", ***Current opinion in microbiology***, 18 (4): 54-60 (2014).

Kakinuma, Y., Igarashi, K., "Isolation and properties of *Enterococcus hirae* mutants defective in the potassium/proton antiport system", *Journal of bacteriology*, 181 (13): 4103-4105 (1999).

Kasai, H., "Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis", *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 387 (3): 147-163 (1997).

Kashket, E. R., "The proton motive force in bacteria: a critical assessment of methods", *Annual reviews in microbiology*, 39 (1): 219-242 (1985).

Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ., "Biyokimya, 11. baskı", *Aktif yayınevi*, Erzurum, 113, 165, 245-266, 313-331 (2015).

Kempner, E. S., "Direct effects of ionizing radiation on macromolecules", *Journal of polymer science Part B, Polymer physics*, 49 (12): 827-831 (2011).

Kim, B. H., Kim, S., Kim, H. G., Lee, J., Lee, I. S., Park, Y. K., "The formation of cyclopropane fatty acids in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*", *Microbiology*, 151 (1): 209-218 (2005).

Kim, J. I., Cox, M. M., "The RecA proteins of *Deinococcus radiodurans* and *Escherichia coli* promote DNA strand exchange via inverse pathways", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (12): 7917-7921 (2002).

Kitayama, S., Asaka, S., Totsuka, K., "DNA double-strand breakage and removal of cross-links in *Deinococcus radiodurans*", *Journal of bacteriology*, 155 (3): 1200-1207 (1983).

Kitayama, S., Matsuyama, A., "Genome multiplicity and radiation resistance in *Micrococcus radiodurans*", *Journal of biochemistry*, 90 (3): 877-880 (1981).

Kozmin, S. G., Sedletska, Y., Reynaud-Angelin, A., Gasparutto, D., Sage, E., "The formation of double-strand breaks at multiply damaged sites is driven by the kinetics of excision/incision at base damage in eukaryotic cells", *Nucleic acids research*, 37 (6): 1767-1777 (2009).

Kreuzer, K. N., "DNA damage responses in prokaryotes: regulating gene expression, modulating growth patterns, and manipulating replication forks", *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5 (11): 1-17 (2013).

Krulwich, T. A., Sachs, G., Padan, E., "Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis", *Nature Reviews Microbiology*, 9 (5): 330-343 (2011).

L'Annunziata, M. F., "Handbook of radioactivity analysis, 3. baskı", *Academic Press of Elsevier*, Oxford, 58 (2012).

Le Caër, S., "Water radiolysis: influence of oxide surfaces on H<sub>2</sub> production under ionizing radiation", *Water*, 3 (4): 235-253 (2011).

Lemee, L., Peuchant, E., Clerc, M., Brunner, M., Pfander, H., "Deinoxanthin: a new carotenoid isolated from *Deinococcus radiodurans*", *Tetrahedron*, 53 (3): 919-926 (1997).

Leszczynski, D., "Radiation proteomics: the effects of ionizing and non-ionizing radiation on cells and tissues", *Springer Science & Business Media*, Helsinki, 16-128 (2013).

Lewanski, C. R., Gullick, W. J., "Radiotherapy and cellular signalling", *The Lancet Oncology*, 2 (6): 366-370 (2001).

Livak, K. J., Schmittgen, T. D., "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method", *methods*, 25 (4): 402-408 (2001).

Madigan, M., Martinko, J., "Brock biology of microorganisms, 11. baskı", Pearson Prentice Hall, Indiana, 524-548 (2005).

Maillard, L., "Action of amino acids on sugars. Formation of melanoidins in a methodical way", *Compt rend*, 154: 66 (1912).

Makarova, K. S., Aravind, L., Wolf, Y. I., Tatusov, R. L., Minton, K. W., Koonin, E. V., Daly, M. J., "Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics", *Microbiol Mol Biol Rev*, 65 (1): 44-79 (2001).

Makarova, K. S., Omelchenko, M. V., Gaidamakova, E. K., Matrosova, V. Y., Vasilenko, A., Zhai, M., Lapidus, A., Copeland, A., Kim, E., Land, M. and others, "*Deinococcus geothermali*s: The pool of extreme radiation resistance genes shrinks", *PLoS ONE*, 2 (9): 955 (2007).

Markillie, L. M., Varnum, S. M., Hradecky, P., Wong, K. K., "Targeted mutagenesis by duplication insertion in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*: radiation sensitivities of catalase (catA) and superoxide dismutase (sodA) mutants", *Journal of bacteriology*, 181 (2): 666-669 (1999).

Marnett, L. J., "Oxyradicals and DNA damage", *Carcinogenesis*, 21 (3): 361-370 (2000).

Marshansky, V., Futai, M., "The V-type H<sup>+</sup>-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function", *Current Opinion in Cell Biology*, 20 (4): 415-426 (2008).

Martinez, A., Kolter, R., "Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps", *Journal of bacteriology*, 179 (16): 5188-5194 (1997).

Masters, C. I., Murray, R. G., Moseley, B. E., Minton, K. W., "DNA polymorphisms in new isolates of '*Deinococcus radiopugnans*'", *Microbiology*, 137 (7): 1459-1469 (1991).

McColl, N., Auvinen, A., Kesminiene, A., Espina, C., Erdmann, F., de Vries, E., Greinert, R., Harrison, J., Schuez, J., "European code against cancer 4th edition: ionising and non-ionising radiation and cancer", *Cancer Epidemiology*, 39 (1): 93-100 (2015).

Menecier, S., Coste, G., Servant, P., Bailone, A., Sommer, S., "Mismatch repair ensures fidelity of replication and recombination in the radioresistant organism *Deinococcus radiodurans*", *Molecular Genetics and Genomics*, 272 (4): 460-469 (2004).

Messner, P., Sleytr, U. B., "Bacterial surface layer glycoproteins", *Glycobiology*, 1 (6): 545-551 (1991).

Michnik, A., Polaczek-Greluk, K., Leśniak, P., Drzazga, Z., "Effects of low-dose ionizing radiation on  $\alpha,\beta$ -globulins solutions studied by DSC", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 111 (3): 1845-1852 (2013).

Misra, H. S., Rajpurohit, Y. S., Kota, S., "Physiological and molecular basis of extreme radioresistance in *Deinococcus radiodurans*", *Current Science*, 104 (2): 194-205 (2013).

Mitchell, P., "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism", *Nature*, 191 (4784): 144-148 (1961).

Moseley, B., Evans, D. M., "Isolation and properties of strains of *Micrococcus (Deinococcus) radiodurans* unable to excise ultraviolet light-induced pyrimidine dimers from DNA: evidence for two excision pathways", *Microbiology*, 129 (8): 2437-2445 (1983).

Moseley, B., Mattingly, A., "Repair of irradiated transforming deoxyribonucleic acid in wild type and a radiation-sensitive mutant of *Micrococcus radiodurans*", *Journal of bacteriology*, 105 (3): 976-983 (1971).

Mukherjee, D., Coates, P. J., Lorimore, S. A., Wright, E. G., "Responses to ionizing radiation mediated by inflammatory mechanisms", *The Journal of pathology*, 232 (3): 289-299 (2014).

Murata, T., Yamato, I., Kakinuma, Y., Leslie, A. G. W., Walker, J. E., "Structure of the rotor of the v-type  $\text{Na}^+$ -ATPase from *Enterococcus hirae*", *Science*, 308 (5722): 654 (2005).

Murray, R., "Family II. *Deinococcaceae* Brooks and Murray 1981," *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2 1035-1043 (1986).

- Murray, R. G. E., "The Family *Deinococcaceae*", The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications, Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H., **Springer New York**, New York, NY, 3732-3744 (1992).
- Müller, D. J., Baumeister, W., Engel, A., "Conformational change of the hexagonally packed intermediate layer of *Deinococcus radiodurans* monitored by atomic force microscopy", **Journal of bacteriology**, 178 (11): 3025-3030 (1996).
- Nelson, D. L., Cox, M. M., "Lehninger, Biyokimyanın İlkeleri, 5. baskıdan çeviri, 5. baskı", Elçin, Y. M., **Palme Yayıncılık**, Ankara, 59-61, 379-382, 399-401, 719-721, 723, 755-757 (2013).
- Ng, K.-H. Non-ionizing radiations—sources, biological effects, emissions and exposures; 2003.
- Nguyen, H. H., La Tour, D., Bouthier, C., Toueille, M., Vannier, F., Sommer, S., Servant, P., "The essential histone-like protein HU plays a major role in *Deinococcus radiodurans* nucleoid compaction", **Molecular microbiology**, 73 (2): 240-252 (2009).
- Nias, A., "An introduction to radiobiology, 2. baskı, **John Wiley & Sons**, İngiltere, 127-135, 156-165, 199-204 (1998).
- Nishi, T., Forgac, M., "The vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases nature's most versatile proton pumps", **Nat Rev Mol Cell Biol**, 3 (2): 94-103 (2002).
- Omelchenko, M. V., Wolf, Y. I., Gaidamakova, E. K., Matrosova, V. Y., Vasilenko, A., Zhai, M., Daly, M. J., Koonin, E. V., Makarova, K. S., "Comparative genomics of *Thermus thermophilus* and *Deinococcus radiodurans*: divergent routes of adaptation to thermophily and radiation resistance", **BMC Evolutionary Biology**, 5 (1): 1 (2005).
- Özbey, E., "Radyasyona Dirençli *Deinococcus radiodurans* ile *Escherichia coli* 'de Radyasyonun Antioksidan Sistem Üzerine Etkisinin Araştırılması", Yüksek Lisans, **İnönü Üniversitesi**, Malatya, 106 (2009).
- Padan, E., Bibi, E., Ito, M., Krulwich, T. A., "Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights", **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, 1717 (2): 67-88 (2005).
- Padan, E., Schuldiner, S., "Molecular physiology of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in *Escherichia coli*", **Journal of Experimental Biology**, 196 (1): 443-456 (1994).
- Pavkov-Keller, T., Howorka, S., Keller, W., "Chapter 3 - The Structure of Bacterial S-Layer Proteins", Progress in Molecular Biology and Translational Science, Stefan, H., **Academic Press**, 73-130 (2011).

Pietrokovski, S., "Identification of a virus intein and a possible variation in the protein-splicing reaction", *Current Biology*, 8 (18): 634-638 (1998).

Radiation, U.N.S.C.O.T.E.O.A., "Sources, effects and risks of ionizing radiation: UNSCEAR 2012 Report", *New York*, 5-6 (2015).

Rainey, F. A., Ray, K., Ferreira, M., Gatz, B. Z., Nobre, M. F., Bagaley, D., Rash, B. A., Park, M.-J., Earl, A. M., Shank, N. C., "Extensive diversity of ionizing-radiation-resistant bacteria recovered from Sonoran Desert soil and description of nine new species of the genus *Deinococcus* obtained from a single soil sample", *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (9): 5225-5235 (2005).

Ravanat, J.-L., Douki, T., Cadet, J., "Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63 (1): 88-102 (2001).

Rawson, S., Phillips, C., Huss, M., Tiburcy, F., Wiczorek, H., Trinick, J., Harrison, Michael, A., Muench, Stephen, P., "Structure of the Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase Rotary Motor Reveals New Mechanistic Insights", *Structure*, 23 (3): 461-471 (2015).

Reisz, J. A., Bansal, N., Qian, J., Zhao, W., Furdui, C. M., "Effects of Ionizing Radiation on Biological Molecules-Mechanisms of Damage and Emerging Methods of Detection", *Antioxidants & Redox Signaling*, 21 (2): 260-292 (2014).

Riley, P. A., "Free Radicals in Biology: Oxidative Stress and the Effects of Ionizing Radiation", *International Journal of Radiation Biology*, 65 (1): 27-33 (1994).

Rothschild, L. J., Mancinelli, R. L., "Life in extreme environments", *Nature*, 409 (6823): 1092-1101 (2001).

Rottenberg, H., "The measurement of membrane potential and  $\Delta$ pH in cells, organelles, and vesicles", *Methods in enzymology*, 55 (6): 547-569 (1979).

Rozen, S., Skaletsky, H., "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers", *Bioinformatics methods and protocols*, 132 365-386 (1999).

Schäfer, G., Penefsky, H., "Bioenergetics: energy conservation and conversion, *Springer Science & Business Media*, Heidelberg, (2008).

Scott, D. R., Marcus, E. A., Wen, Y., Oh, J., Sachs, G., "Gene expression in vivo shows that *Helicobacter pylori* colonizes an acidic niche on the gastric surface", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (17): 7235-7240 (2007).

Senkevich, T. G., Koonin, E. V., Bugert, J. J., Darai, G., Moss, B., "The genome of molluscum contagiosum virus: analysis and comparison with other poxviruses", *Virology*, 233 (1): 19-42 (1997).

Sherer, M. A. S., Visconti, P. J., Ritenour, E. R., Haynes, K., "Radiation protection in medical radiography, *Elsevier Health Sciences*, Maryland, 15 (2014).

Slade, D., Lindner, A. B., Paul, G., Radman, M., "Recombination and replication in DNA repair of heavily irradiated *Deinococcus radiodurans*", *Cell*, 136 (6): 1044-1055 (2009).

Slade, D., Radman, M., "Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75 (1): 133-191 (2011).

Sleytr, U. B., Messner, P., Pum, D., Sára, M., "Crystalline bacterial cell surface layers", *Molecular Microbiology*, 10 (5): 911-916 (1993).

Sleytr, U. B., Sára, M., "Bacterial and archaeal S-layer proteins: structure-function relationships and their biotechnological applications", *Trends in Biotechnology*, 15 (1): 20-26 (1997).

Slonczewski, J. L., Fujisawa, M., Dopson, M., Krulwich, T. A., "Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea", *Advances in microbial physiology*, 55 1-317 (2009).

Smith, K. S., Ferry, J. G., "Prokaryotic carbonic anhydrases", *FEMS Microbiology Reviews*, 24 (4): 335-366 (2000).

Smith, M. D., Masters, C. I., Lennon, E., McNeil, L. B., Minton, K. W., "Gene expression in *Deinococcus radiodurans*", *Gene*, 98 (1): 45-52 (1991).

Sukhi, S. S., Shashidhar, R., Kumar, S. A., Bandekar, J. R., "Radiation resistance of *Deinococcus radiodurans* R1 with respect to growth phase", *FEMS microbiology letters*, 297 (1): 49-53 (2009).

Sweet, D. M., Moseley, B., "The resistances of *Micrococcus radiodurans* to killing and mutation by agents which damage DNA", *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 34 (2): 175-186 (1976).

Swiatla-Wojcik, D., "Computation of the effect of pH on spur chemistry in water radiolysis at elevated temperatures", *Nukleonika*, 53 (1): 31-37 (2008).

Tatsuzawa, H., Maruyama, T., Misawa, N., Fujimori, K., Nakano, M., "Quenching of singlet oxygen by carotenoids produced in *Escherichia coli*—attenuation of singlet oxygen-mediated bacterial killing by carotenoids", *FEBS letters*, 484 (3): 280-284 (2000).

Thompson, B., Anderson, R., Murray, R., "Unusual polar lipids of *Micrococcus radiodurans* strain Sark", *Canadian journal of microbiology*, 26 (12): 1408-1411 (1980).

Thornley, M. J., Horne, R., Glauert, A. M., "The fine structure of *Micrococcus radiodurans*", *Archiv für Mikrobiologie*, 51 (3): 267-289 (1965).

Tian, B., Hua, Y., "Carotenoid biosynthesis in extremophilic *Deinococcus-Thermus* bacteria", *Trends in microbiology*, 18 (11): 512-520 (2010).



Tian, B., Sun, Z., Shen, S., Wang, H., Jiao, J., Wang, L., Hu, Y., Hua, Y., "Effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* on protein oxidation", *Letters in applied microbiology*, 49 (6): 689-694 (2009).

Tolner, B., Poolman, B., Konings, W. N., "Characterization and functional expression in *Escherichia coli* of the sodium/proton/glutamate symport proteins of *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus caldotenax*", *Molecular microbiology*, 6 (19): 2845-2856 (1992).

Tolner, B., Ubbink-Kok, T., Poolman, B., Konings, W. N., "Characterization of the proton/glutamate symport protein of *Bacillus subtilis* and its functional expression in *Escherichia coli*", *Journal of bacteriology*, 177 (10): 2863-2869 (1995a).

Tolner, B., Ubbink-Kok, T., Poolmann, B., Konings, W. N., "Cation-selectivity of the l-glutamate transporters of *Escherichia coli*, *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus caldotenax*: dependence on the environment in which the proteins are expressed", *Molecular microbiology*, 18 (1): 123-133 (1995b).

Ünlü, S., "İyonize Radyasyonun DNA'ya Verdiği Hasarın Çeşitli Moleküler Teknikler Kullanılarak Araştırılması", Doktora, *Hacettepe Üniversitesi*, Ankara, 133 (2011).

Wang, P., Schellhorn, H. E., "Induction of resistance to hydrogen peroxide and radiation in *Deinococcus radiodurans*", *Canadian journal of microbiology*, 41 (2): 170-176 (1995).

Waser, M., Hess-Bienz, D., Davies, K., Solioz, M., "Cloning and disruption of a putative Na/H-antiporter gene of *Enterococcus hirae*", *Journal of Biological Chemistry*, 267 (8): 5396-5400 (1992).

Weidinger, A., Kozlov, A. V., "Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction", *Biomolecules*, 5 (2): 472-484 (2015).

Weisburg, W. G., Giovannoni, S. J., Woese, C. R., "The *Deinococcus-Thermus* phylum and the effect of rRNA composition on phylogenetic tree construction", *Systematic and Applied Microbiology*, 11 (2): 128-134 (1989).

Weisstein, E. W., "Eric Weisstein's world of physics, *Wolfram Research Group*, (2004).

Wen, Y., Marcus, E. A., Matrubutham, U., Gleeson, M. A., Scott, D. R., Sachs, G., "Acid-adaptive genes of *Helicobacter pylori*", *Infection and immunity*, 71 (10): 5921-5939 (2003).

Weng, M. W., Zheng, Y., Jasti, V. P., Champeil, E., Tomasz, M., Wang, Y., Basu, A. K., Tang, M. S., "Repair of mitomycin C mono- and interstrand cross-linked DNA adducts by UvrABC: a new model", *Nucleic acids research*, 38 (2010): 576 (2010).

White, O., Eisen, J. A., Heidelberg, J. F., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Dodson, R. J., Haft, D. H., Gwinn, M. L., Nelson, W. C., Richardson, D. L. ve diğerleri, "Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1", *Science*, 286 (5444): 1571-1577 (1999).

Woese, C. R., "Bacterial evolution", *Microbiological reviews*, 51 (2): 221 (1987).

Wolfrom, M., Binkley, W., McCabe, L., Han, T. S., Michelakis, A., "The effect of ionizing radiations on carbohydrates", *Radiation Research*, 10 (1): 37-47 (1959).

Xu, G., Lu, H., Wang, L., Chen, H., Xu, Z., Hu, Y., Tian, B., Hua, Y., "DdrB stimulates single-stranded DNA annealing and facilitates RecA-independent DNA repair in *Deinococcus radiodurans*", *DNA repair*, 9 (7): 805-812 (2010).

Zahradka, K., Slade, D., Bailone, A., Sommer, S., Averbeck, D., Petranovic, M., Lindner, A. B., Radman, M., "Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*", *Nature*, 443 (7111): 569-573 (2006).

Zerquera, J. T., Alonso, M. P., Gomez, I. M. F., Castro, G. V. R., Ricardo, N. M., Bejerano, G. L., do Lopez, J. O. A., Rodriguez, N. A., Gonzalez, J. C., Flores, O. B. and others, "Studies on internal exposure doses received by the Cuban population due to the intake of radionuclides from the environmental sources", *Radiat Prot Dosim*, 121 (2): 168-174 (2006).

Zhang, B., Wang, Y., Pang, X., Su, Y., Ai, G., Wang, T., "ER stress induced by ionising radiation in IEC-6 cells", *International journal of radiation biology*, 86 (6): 429-435 (2010).

Zhang, C., Wei, J., Zheng, Z., Ying, N., Sheng, D., Hua, Y., "Proteomic analysis of *Deinococcus radiodurans* recovering from  $\gamma$ -irradiation", *Proteomics*, 5 (1): 138-143 (2005).

Zhang, L., Yang, Q., Luo, X., Fang, C., Zhang, Q., Tang, Y., "Knockout of crtB or crtI gene blocks the carotenoid biosynthetic pathway in *Deinococcus radiodurans* R1 and influences its resistance to oxidative DNA-damaging agents due to change of free radicals scavenging ability", *Archives of microbiology*, 188 (4): 411-419 (2007).

Zhang, P., Omaye, S. T., " $\beta$ -Carotene and protein oxidation: effects of ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol", *Toxicology*, 146 (1): 37-47 (2000).

**EKLER****EK 1. DR\_1343 Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz**

Forward Primer: 5'-CATTGGAGATGATGTGGTGGTTG

Reverse Primer: 5'-GTCAACGGCAAGAAGATTCAGG

TTAGCCTTTGTTCTGAACGAGCTGCACCAGGTCCGCGATGCGGTTGCTGTAGCCCCACTC  
 GTTGTTCGTACCACGAGAAGAAGACTTGACGAGGTTGCCATCGCCATGGTCAGGCCGCGTC  
 AATGATCGCGCTGTGCGGGTCGCCCTGAATGTCGGTCAGCACAATGGGGTCTTCGGTGTA  
 GGCCATGATGCCTTTGTAAGTTCGCCGTTTCACGGAAGACGTTGTTGACTTCTCTCG  
 ACAGTCACGTCGCGCCCCAGGATCACGCTCACGTCGCTGATCGAGCCGGTGGGCGTGGG  
 CACGCGCAGGCTGGTGCCGTCGAAGTTCGCCCTTCAGCGCGGGGTACACCTGCGACACAG  
 CCTTGGCGGGCGCCGGTCGAGGTGGGAATGATGTTGATCGCAGCGGCGCGGGCGCGGCGC  
 AGGTCGCTGTGCGGCAGGTCCAGCACGCGCTGGTCGTTGGTGTAGCTGTGCACGGTGGTC  
 ATGATGGCCTTCTCGATGCCGAACGCCTCGTCGATGACCTTCATCGGCACGCCGAGGCTG  
 TTGGTGGTGCAGCTGGCATTGGAGATGATGTGGTGGTTGGCGGGGTCGTAAGTCTCGTCG  
 TTCACGCCCAGCACGATGGAGAAGTCTCGCCCTTGGCCGGCGCGGTGATGATGACCTTC  
 TTGGCCCCGCCCTGCATGTGCTTGGAGGCCCTTCGCGGCTGGTGAAGATGCCGGTGGAT  
 TCGATCACGATGTCGGCGCCGTAAGTTCGCCCCACTTGATGTTGGCGGGGTCGCGCTCGGCG  
 ATGGCCTGAATCTTCTTGCCGTTGACCGTTCAGGCTGCTTTCGTCGTAAGTCCACGGTGGCGT  
 CAAAGCGCCCGGCGGTCGAGTCGTAAGTTCGAGCAGGTGCGCCAGCGTGTGGTTGTCGGTC  
 AGGTCGTTGATGGCGACCACTTCGACGCCGCGCGCTTCGAGGATGCGGAAAACCAGCCG  
 ACCGATGCGGCCAAAGCCGTTGATGCCTACTTTCAT

**EK 2. DR\_2238  $\beta$ -Karbonik anhidraz**

Forward Primer: 5'-GACAATTCAGAGACGTTACAGGC

Reverse Primer: 5'-GTTGCCTTCCATCAGCGTCT

ATGGGGCGCAGGCTAGCGCGTGCCTGTTGGGGCTACGATACAGGCATGACCGCGCCAGACAA  
 TTCAGAGACGTTACAGGCCCAACTCCTCGAACTGACCCCGAGGAACTCCAGCGCCGACT  
 GCTCCAGGCCGTGCGCCGGGGGGCGAGCATGGAAGAAATCGCCAAGCTCAAGGATTTCGG  
 ACGTGGCAACCCCGAGGCGGCCATTCCAGACGCTGATGGAAGGCAACGCCCGCTTTTTC  
 GGTGGGCAGGCGCGACGCCCGGACATCGGGGCGAACGAGCGCCGCGCCCAGATCATCGG  
 GCAAACGCCCTACGCGGCGATCCTCGCGTGCAGCGACAGTCGGGTGCCGGTAGAACTGG  
 TGTTCGACCAGGGGCTGGGGCAACTGTTTCGTGGTGCGGGTGGCGGGCAACGTGGTGGGC  
 GAAAGCGGCCTGGGCACGCTCGAATACGCCATCCGGCACCTCGACGTGCACCTCGTGAT  
 GGTGATGGGCCACGAGGGCTGCGGCGCGGTGGCGGCGGCGCTGATGCCGGACGACAAA  
 ATCGCCGAGGAGCCGCCGCACCTTCAGTCCCTGATTGGCCGCATTCGCCCAGCGTGGAA  
 AATCTGCCCGCCATCCGCGACAAGAAGGCCCGGATGCGCGAGGCCGTCATCAACAATGT  
 GCGCCGCCAAGTCGCCCTGCTGCGCCGTCAGGCGGTGATTCAGGAAGCCGAGGCGTCCG  
 GCCAGATTCGGGTCATCGGCGGCTACTACGAAATCGGCTCGGGCGCGGTGGACTTTCTGG  
 TGGACGAGGACGACCTCGCACTCTAA

**EK 3. DR\_A0316 Hidrojenaz HypA**

Forward Primer: 5'-CTAATTCAAGTTCGTCGCCTTGC

Reverse Primer: 5'-GTCGAGCGTGGTGCCTGA

TCATAGATTCTCCAATTCAAGCTGGTCTAATTTCGAGCTGATCTAATTCAAGTTCGTCGCCT  
TGAAGAGCCTCGGCGTGGGCGCTCCGCACAGCGGACAGCGTAGGCCCGCCAGACTTC  
CAGTTCGACGGGGCCGTGCTGCGGGCACTCGCCGACGCCGGCACCCGCTCGATGCTCA  
GGCGCGCTCCGGCGAGCGGCGTGCCCTCGGCGCAGGCGGGAAACGCGGGCGGCCAGCGCT  
TCAGGCACCACGCTCGACCACTGCCCCACCCGCACGGTCAGCGCCGAGGCGGGGCGGC  
GCCGTGTTTCGCGCAGCACGTCGCCGGCCACGTCGATGAGCGCGAGGGCGATGGAAGCTT  
CGTGCAT

**EK 4. DR\_A0315 Hidrojenaz HypB**

Forward Primer: 5'-ATTTTCGTAATCACCACCACGTC

Reverse Primer: 5'-TTTCTGGAAAACGTGGGCAAC

TCAACGCTCGCCCCGCACGAAGGCGTACCAGGCGTCCAGCCCTTCGCCCTGGCGGCTGCT  
 CAGTTCGATGACCGGCACGCCGGGCCGCGCCCCGGTCGATGTTCTCGCGGCACAGGGCGC  
 GGTCGAAGCCCACCGCGTCGGCAATGTCCATTTTCGTAATCACCACCACGTCGCCCCTGT  
 TGAACATGGTGGGGTACTTCAGCGGCTTGTCTTCGCCCTCGGTGGTCGAGATGAGCACGG  
 CGCGCGCCGCTTCGCCGAGGTTCGTAGGAACTCGGGCACACCAGGTTGCCACGTTTTCCA  
 GAAACAGCACGTCGAGGGCCGCGAGGTTCGAAGCGCGGCAGCACCTCGCCACCATCGCC  
 GCGTCGAGGTGGCAGACGGTGCCGGTGACGATCTGCTCGGCCTGCGCGCCCCACTGCCG  
 CAGCCGCGCGGCGTCGTTGTCTGGTGGCGAGGTTCGCCACCAGCCACCGCCATGTTTCAGCCC  
 CCTGGCAAGGTCACGCAGGGTGCCTTCGAGCAGCGCCGTCTTGCCCGCGCCGGGGCTGCT  
 CGCGAGGTTGATGGCCCGCACGCCCGCCGCTCGAAAGTCCGGCGATTCTCGGCGGCAG  
 TGTGATCGTTGGCTTTGAGGATGTTCTGACGAACGGTGACGATTCCGGGGAGCAGTCGCAG  
 TCAT

**EK 5. DR\_0656 H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-glutamat simport membran kanal proteini**

Forward Primer: 5'-GAAAAACACCGCGAAGAAGATGA

Reverse Primer: 5'-CTGCTGATGGGTAACCTCTTTCA

TCAGTGCCCCGTCGCCTCGCTAAGCGGCGGCAGGGTGCCTGCTTTTCATGTCGGCCACGTA  
 CTGCCGGGACTTGGCGTCGTCGAACTCGCCCTCGAAGCGGCTCATGACGACGGCGGCGA  
 GACTGTTGCCGACCACGTTACGGCGGTGCGCGCCATGTCCAGAATGCGGTTCGATGCCGG  
 CGATGAAGGCGAGGCCCTCCACCGGAATCCCACCGTGCCCAGGGTGGCGAGCAGCACC  
 ACGAAGCTCACGCCCCGGCACGCCCCGCGATGCCCTTGGAGGTCAGCATCAGCGTGACGAC  
 CAGCAGCAGTTGCTTTTCGAGCGGCATGTGGATGCCGTAGAGCTGCGCGATGAACAGGG  
 CGGCGATGGTCTGGTAGAGCGTGCTGCCGTCAAGGTTGAACGAGTACCCGGTGGGAATG  
 ACGAAACTGGTGATGTAGCGCGGACAGCCGAATGCCTCCATCTTCTGCATGAGGCGCGG  
 CAGCACCGATTCGCTGCTCGCCGTCGAGTAGGCCAGCGTCAGTTCCTCGCGCAGCACCTG  
 AATGAGCGTGAAGATGCTGGTGCCCCGCGAGCCGCGGACCCCGCCCAGAATGACCAGCA  
 CGAAGGCGAGCATGGCCCCGTACACCACCAGCACCAGCTTGCCGAGCGGAATGAGGCTC  
 TGCACGCCGAATTTACTGACGGTGACGCCAATCAGGGGCAAAAACGCCGATGGGCGCGAG  
 TTTTCATGATCTGGTTGGTGACCCAGAACATGGTGTGCGCCACGAGCTGAAAGATGTTTCAG  
 CAGCGGCTTGCCGCGTTCACCGAGCGCGCCAGTCCGAGCCCGAAAAACACCGCGAAGA  
AGATGATTGGCGAGCATGTCGCCGCGTGCGAAGGCGTCCACCACGTTTCGTCGGCACGATG  
 TTGACGAACGTGTCGGCAAAGCTGTGGCTGGTCGCGGCCTGGGCACCCTCGGTGTACTTG  
 GTGATGTCGGTCTTGGTGAGGTCGCCAGGTTACCCCCGCGCCGGGCTTGAAAGAGGTTA  
CCCATCAGCAGGCCGAACAGAATGGCGCCCGTCGTAACCACCTCGAAATAGATCAGGGT  
 CAGGCCGCCGAGCTTGCCGAGCTTTTTTCATGTCGCCACGCCGCCACGCCACGATCAG  
 GGTGCTCAGGACGATGGGCACCACGATCATCTTGATCAGCCGAATAAAGATGTCGCCCA  
 GCGGTTGCAGCCAGCTCACCACCGTCGGATTGCCGTAAAACACGGCCCCGACGATCAG  
 CCCAGCACGAGGCCGATCAGAATCTGAACCGCCAACGAGGGTCTTTTCAT

**EK 6. DR\_0373 Katyon değiştirici membran kanal proteini**

Forward Primer: 5'-CGTTTTTCCTGGGGATTATCGTG

Reverse Primer: 5'-TCAGGTAGGAAATCAGAACCAGC

ATGTGGATGAATCTCCTGCTGGCGTTTTTGCCGGTCAGCCTGCTGCTGGAATACGTCTTTC  
 ACGCGCCGCCGCTGTGGGTGTTTTTCACGGCGACCATCGCCATCATTCCGCTCGCCGACT  
 GGCTGCGGCAGGCCACCGAACAGATTGCCGAGCGGGTCGGGCAGACTATCGGCGGGCTG  
 CTC AACGTGACCTTCGGCAACCTCGCCGAACATCATCGCCATTTTCGTGCTGCTGTCCG  
 GCAACGCGGTGGTCTCAAGGCGCAGATTACCGGCTCTATCATCGGCAACGCGCTGCTG  
 GGGCTGGGGCTCGCCATCCTCATCGGCAGCGTCGGGCGGCAGCGGCAGAAATTCAGCTG  
 GCAAAACGCCGGGCAGCTCAACTCCATGCTGGTGCTCGTGACCATCGCCCTGCTCATCCC  
 GCGCTGTTGACTACACCGAGCGGCTGCCGGGCTTCGCGGCGGGAAGCGACCTCGCGC  
 GCAGCGACCTCGACGAGCGCCTGAGCCTCGCGGTGGCGGTGGTTTTGATCGCGGCCTACG  
 CCCTGAACCTCGTCTACACGCTGGTCACCCACAAGGACATCTTCGCCCTCGATGACGGCA  
 CCGAGGAAGGCTCAGCGGAGGGCCAGCAGAGAGCACAGCGGAAGGCGCAGGGGCACTC  
 GCACGTCGCCCCGTGGCCCGTCTGGAAGGCCGTCGGGGTGCTCGTCGGGGCCACCGTGCT  
 CATCGCCTGGATGTCCGAGATTCTCTCCGGCGCCCTCGAAGCGACCTCGCAGACGCTGGG  
 CCTGAGCCCGTTTTTCCTGGGGATTATCGTGCTGGCGGTCTGTCGGCAACTTTGCCGAGTA  
 CATTTCGGGCAGCTACTTCGCCCCGCAGGGCAAATCGGCCTCGCCATCAACATCGCGGT  
 GGGGGCGACCATTAGGTGGCGCTGTTACGGCCCCGGTGCTGGTTCTGATTTCCTACCT  
 GATCGGCAAGCCGATGAACCTGGTGTTTCGGCAGTCCGCTGGAACCTCGTCGCCATCGTGCC  
 TGTCGCCATCACAGTGTCCACCGTCACCCGCGACGGCGAGGCCACCTGGTTCGAGGGCGT  
 GCTGCTGCTCACGGTGTATGTGCTGCTCGCCCTCGCCTTCTTCTTCGTCACGCCGCGTGCC  
 GAGGAGGGGGCGCCCCGCGCTCTGTACGCCCCGGCGCCCCGCGCTGGTGCAGGCGGCGCC  
 GGAGCGATTGGCGCTGGCAAGTTAA



**EK 7. DR\_0243 Arginin dekarboksilaz**

Forward Primer: 5'-GTGTAGTTCATGGAGGCGTAGAA

Reverse Primer: 5'-TCAAGGAAGAGAACATGCTCGAC

TCAGCTTTCGTA CTCCAGGTAGGTGTAGCCGAGCAGTTCCTCGCCGTAGTCCTCAAGCAG  
 CTCGTGCTCCTGCTCCTGCGTCAGCGTGCCGCGCCCGATGGCGGGCGTCGGCCTGGTCCTC  
 AATCGCGTCGCGCAGCATCGGCTCCTCGTAGCCCATCGACTCGATCATGCGCCGCGCCTT  
 CTGGCCGCGCACGAAGAGGTCGATGTTGAAGCGTCCGCCGGGCCGACCGTCACGTGCG  
 CCTCGCTCACCTTGCCGAAGAGGTTGTGGGCGCTGCCGAGCACGTCCTGATACGCGCCCA  
 TCAGGAACGCGCCGAGGTAGTAGGGCCGGTCGCCGGGTTTCGTGCAGCGGCAAGGTGGCC  
 TTCACGTGCGCGCAGGTCGATGAATTTCTCGACTTTGCCATCACTGTCGCAGGTGATGTCTA  
 CCAGCGTGGCCTGCCGGGTGGGTTGTTTCGTTTCAGGCGGTCGAGCGGCACGATGGGAAAC  
 AGCGCCCCGATGGCCAGTTGTCGGGCAGGCTCTGAAACAGCGAGAAGTTGCAGATGAA  
 CTTGTCGGCGAGCACCTTTTGCAGGTCTTCGAGTTCGTCGGGCACATACTTTTCGCCCTGA  
 ATCAGCTTGGCGATCTTGCGCAGAATCGCGTTGAATAGCGCCTCGCCTCGCGCCCGGTCC  
 TCAAGGGTCACGTAGCCGAGGTCGAAGAGGTTGTGCAGCGTCTGCTTGTGCCCCACCGCG  
 TCGTTGTAGGACTCCCGGTAGTTACGCATGGAGATGTTTTCCAGCGTCTCGTACATGTCG  
 CGCACGATCTGGTGGCTGTCCTCGCCCGGCACCGTCAGTTCCTGGTCTTCGAGGTTGCGC  
 GTCGGCCCCGGTCACGTCCACCACCGGCAAATCAGCACGGCGTGGTGCAGTGAGCGC  
 CCGCCCCGATTCCGACACGATGACCGGCTCGGGCACTTCGCGCGCCTTGACACCTCCTG  
 CACGGTGTACACGATGTCGGCGGCGTATTCTTGCAGGTTAGTTCATGGAGGCGTAGAA  
 GGTCGTCTTGGAGCCGTCGTAGTCCACGCCGAGGCCGCCGCCACGTTGAGGTATTTAG  
 GTCGGCGCCCCGCCGCGATGAGGCCCGCGTAGGTCTGCGCCGCCTCGCGCACCGCCACCTT  
 GACCCGGCGAATGTCGGTGATTTGCGACCCGATGTGGGTGTGCAGCATCACCAGCGAGT  
 CGAGCATGTTCTCTTCCCTTGA GCCGCTCGACCACCCGACGAGCTCGTAGGCGTTGAGGC  
 CGAACTTGGCCTGGTCGCCGCCGACTCTTCCCACTGGCCCGAGCCCCGGGCGTGCAGCT  
 TGAAGCGCACGCCACAGCGGGCTTGACCCCGAGCGCCTTCGCCTGCTTGAAGGATGCGGT  
 CGAGTTCGGTGAACCTTCTCGATGGTGATGACCACGTTCTTGCCAGCGTCCGGCCCCACA  
 GGGCGAGCTTGATGAACCCGTCGTCCTTGAAGCCGTTGCAGCACAGCAGCGCGTCGGGG

**EK 7. DR\_0243 Arginin dekarboksilaz (Devamı)**

TGCATCTTCTGCGCGAGGCACAGCGCGAGCTCGGCCTTGGAGCCCGCTTCCAGCCCGTGC  
GCGTAGTCGTACCCGGCGGGCCACCGTCTCCACCACGGCGCGGGCTGGTTACCTTG  
ATGGGAAACACGCCCTGGTAATGCCCGGAGTAGTTGTACTCGTTGATGGCGGCCTGAAA  
CGCCTCGTTGAGGTGCTTGACCCGTCCGGCGAGCACCTGCGGAAAGCGCAGGATGACCG  
GCAGGCTCTCGCCCCGGTCCACGATTTTCGTCCACGATGGCGCGCAGCGAGGCGTGCAGG  
CCCGGCGCGGGGGTGGCCTCCATCAGGCCCTTGTCGGACACGCGGAACCAGCCGCCCGA  
CCAGTTGGGCACCTGGTAGAGTTCGGCGGGCGTCGGCGGAAGTAAAGCTGGTGTTGAGCG  
GATTGGCAGTCGTCATAGCGCTCCTCCTGTGGGTAGGTAGGCTCGCCGTGCGCGGGGTTTC  
GGAGCCGTGCGGGGCACAC

**EK 8. DR\_0183 Glutamat sentaz büyük altbirimi**

Forward Primer: 5'-TGTTGCCGATGATGATGTTGTTT

Reverse Primer: 5'-TGTTTATCCAGATGGAAGGCACT

TTA~~CTTCGTCAGCGTCCCCTTGCCGCCGA~~ACTTGTTGTCGGGCTGGCCGGTCTGCATCCGG  
 GTGGTGT~~CGGCGGCCTGCACGGTGCCCTCGTCCGCCTGCGTGCCTCCCGCAGGGCGCGG~~  
 GCGTACTCGTGCGGCATGACCTTGACGAACTTCTTCAGGGCGCTGTCCCAGTCGTCGAGC  
 AGCTCACTGGCGCGGCTTGAGCCGGTCCAGCGGTGGTGGTTTTCAATCAGTTCGCGCAGT  
 TGCGCCTCGTCGGACTTGCCGTTGTGCAGCTGATGAGGCACGGCGCTCTGCAACTGCTCG  
 TCTTCGGGCTGCACGCGCTCCAGGCCACCATGCTGAGGTTGCAGCGTTTCTCGAACTGG  
 CCGTCCACGTCTAGACGTAGGCGACGCCGCCGCTCATA~~CCCGCCGCGAAGTTGCGCCC~~  
 GTCTGCCCAGCACGACCACCGTGCCGCCGGTCA~~TGTATTCG~~CAGCCGTGGTCGCCGGTA  
 CCTTCGACAACCGCCGAGGCGCCCGAGAGCCGCACCGCGAAGCGTTCTCCCGCCACGCC  
 CCGGAAGTACGCCTCACCGCTCGTCGCGCCGTA~~AAGCGCCGTTG~~TGCCGATGATGATGTT  
~~GTTTTCGGCCTTGCCCCGGAATTCGATGGAGGGCGGACCACCACGCGGCCCCCGCTGAG~~  
 GCCCTTGCCGGTGTAGTCGTTGGCGTCGCCGATCAGGTACAGGGTCAGGCCCTGGGCGAG  
 GAACGCACCGAAGCTCTGGCCGCC~~AGTGCCTTCCATCTGGATAAACA~~CCGTCTGGTCGGG  
 CAGGCCGCCGGGGCGCGCGCGGACGAGTTCGCCCAGAGCATGGCCCCACCGAACGGT  
 TGACGTTGCGGGCGTCTGCAGGAAGTGGACGCGCTCGCCATGTTTCGATGGCGGGGCGG  
 CACTTCTCGATCAGCTTGAGGTCGAGCGCCTTGTCGAGTTCGTGGTCTGCCCAGTCAGG  
 TGCCGGGTACCGACTTCGGCGGGCATCTCGGGCTTGTAGAACACCCGCGAGAAGTCCAG  
 CCCCTGCGCCTTCCAGTGGTCGATGCCCGCCCGCATGTCGAGCAGGTCGGAGCGGCCAAT  
 CAGGTCGTGAAGCTGCGGACGCCGAGGCTCGCCATGAGTTGGCGCACCTCCTCGGCCA  
 CGAAGAAGAAGTAGTTGATGACGTGTTTCGGGCTTGCCCTGGAACCGGGCCCGCAGCACC  
 GGGTCTGCGTCGCCACGCCACCGGGCAGGTGTTGAGGTGACACTTGCGCATCATGATG  
 CAGCCCTCGGCGACGAGCGGGCGCGGTGCGAAAGCCGAACTCGTCGGCGCCGAGCAGCGC  
 GGCAATCACCACGTGCGGCCCGGTCTTGAGCTGCCCGTCGGTCTGCACGCGCACACGGTC  
 ACGCAACCTATTGAGCACCAGCGTCTGCTGCGTTTCGGCCAGCCCCAGTTCACAGGGCGT  
 CCCGGCGTGCTTGATGGA~~ACTCCAGGGGCTCGCCCCGGTGCCGCCGTCGTGCCCGGCGAT~~

**EK 8. DR\_0183 Glutamat sentaz büyük altbirimi (Devamı)**

GACGATGTGGTCGGCCTTCGCCTTCGCCACGCCCGCCGCGATGGTGCCACGCCCACTTC  
 CGACACCAGCTTCACCGAGATGTCGGCGCGCGGGTTGACATTCTTGAGGTCGTGGATGAG  
 CTGCTTGAGGTCTTCGATGGAGTAGATGTCGTGGTGCGGGGGCGGCGAAATCAATCCCAC  
 GCCGGGCACCGAGTGGCGCAGGAAGCCGATGTACTCGCTCACCTTGCCGCCGGGAGCT  
 GGCCGCCCTCGCCGGGTTTGGCGCCCTGCGCCATCTTGATCTGAATCTGGTTCGGCGGAGG  
 AAAGGTAGCCCGCCGTCACCCCGAAGCGGCCCGAGGCCACCTGCTTGATCTTGAGCGC  
 AGGCTGTCGCCGGGTTGCAGCGGGTAGTCCACCTCGACTCGGCTGCCGCCAAGACGCTC  
 GCCAGGGTTTCGCCCTCGTTGAACTGTTCCGCCGCGCAGTTCGCGCTCGTAGCGGGCGGGG  
 TCTTCGCCGCCTTCGCCGGTGTGCTCTTGCCGCCGATGCGGTTTCATGGCGACGGCGAGG  
 GTGGCGTGGGCCTCGGTGGAGATGGAGCCGAGGCTCATCGCGCCGGTGGCGAAGCGCTT  
 GACGATTTTCGGAAGCGGGTTCGACCTCTTCCAGCGGCACGGCGTTGCGGCCTTCGGTCTT  
 GAAATCGAACAGTCCGCGCAGCGTCATGTGGCGGCGGGCTCTGGTTCGTTGATGATGCGGG  
 CGTATTCGGCGTAGGTGCCGGCGTGACCGCTGCGCACCGAGTGCTGCAACTTTGCCACCG  
 CGTCGGGCGTCCACATGTGCTCTTCGCCCTGCGCGCGCCAGGCGTATTCGCCGCCCGCGT  
 TGAGGTTCTTCTCCATCAAGGGATCGCCGCTGAAGGCCGCGTGGTGGGTGCGAATGGCTT  
 CTTCCGGCCACCTCGAAAATGCCGATGCCGCCACCTGACTCGCGGTGCCGTAGAAGTACT  
 TCTGCACGAAGTCGGCTTGCAGGCCACCGCCTCGAACAGTTGCGCGCCGCGAGTAACTGA  
 GGTAGGTGCTCACGCCATCTTGACATGATCTTGCTCAGGCCCTTGCCGATGGCCTTGA  
 CATAGTTGTAGATGGCCTTTTCGGGGGTGACTTCGGTGAGGTCGGGCATCCCCGGAATCG  
 GCGTGTGGAGGTCGGTATCGTTTCGAGCGCGAGGTAGGGGTGAATCGCTTCGGCCCCGT  
 ACCCGGCGAGCGCGGCGAAGTGGTGGACTTCGCGGGCGTCGCCCGTTTCCACCACCAAT  
 CCGGTTTCGCATCCGCAGGCCCTTTTTACGAGGTGGTGATGAACGCTCGAGAGCGCGAGC  
 AGCGCGGAATCGCGGCCCGGCTGCGGTCCACTCGCTTGTCGGTCAGGATGATGATGTTG  
 TGGCCCCACTCGATGGCGTCCACCGCCCAGGCGTTGATGGTGGCGAGCTTGGCCTCGATG  
 CCGCGCGCGCCCCACTCGGCGGGGTAGGTGATGTCGAGGTGGAACGCCTTGAACCTGCC  
 ACGGGTGTGCGCCTCGATGTTGCGGACGCGCGCCATGTCGTGAAATCCAGAATGGGTTG

**EK 8. DR\_0183 Glutamat sentaz büyük altbirimi (Devamı)**

CTCGACTTCCAGGCGCATGGCGGGGTTGACTGCGTTGATATCGAGCAGGTTGGGGCGCG  
 GCCCGACGAAGGAGCGCAGGCTCATGACCACCGACTCGCGGATGGGGTCGATCGGCGGG  
 TTGGTCACCTGCGCGAAGAGCTGCCGGAAGTAGTTGTAGAGCGGCTTGGAGCGGTGCGA  
 GAGCACGGCGAGCGGGCTGTCGTTGCCATGCTGCCGATGCCTTCTTCGCCGTTTTTCGC  
 CATCGGGCCCATCAGGAACTTGAGGTCTTCTGGGTGTACCCGAACGCCTGCTGGCGCTT  
 GAGCAGCGGCTCGGCGAACTCGTCCACCGTGCCGGTTTCTCGGAATCGTCGAGGCGCA  
 GCGGGTGTTTTTCCACCCACTGGCGGTAGGGCTTGGCCTGCGCGAATTGCAGCTTCAGCT  
 CGTCGTCCTCGACAATCCGGCCCTGTTCGAGGTCGATCATGAACATCTTGCCGGGTTGCA  
 GCGCCACTTCTTGACGATCTGCGACTCGGGAATGGGCAGCACGCCCGACTCGGAGGCG  
 AGCACGACCAGCCGTCGCGGGTCTGGAGGTAGCGGGCGGGGCGCAAGCCGTTGCGGTC  
 GAGCATGGCGCCCACCTGCCGCCGTCGGTAAAGACCATCGCGGCGGGGCCGTTCCAGG  
 GCTCCATCATGGAGGCGTGGTACTCGTAGAACGCCCGCGGGCGGTCGTCGAGCAGCGCG  
 TTTTGCTCCCAGGCTTCGGGAATCATCATCATCGCGGCCTGCGCCATCGGGTAGCCCGCG  
 AGGGTCAGCAGCTCGATGGCGTTGTGCAAGGTCGCGGTGTGCGACTCGCCCTCGTAGGA  
 GATGGGGTAGAGCTTGCCGAGGTCATCGCCGAAGACGGGGCTGCTGAGAATCCCCTCGC  
 GCGCCCGCATCCAGTTGAAGTTGCCCTTGACGGTGTGATTCGCCGTTGTGGGCCACCA  
 TGCGGTAGGGGTGGGCGAGGCGCCACTCGGGGAAGGTGTTGGTGGAAAAGCGCTGGTGA  
 ACGACGGCGAGCGCCGACACGACTTCGGGCTGTTGCAGGTCGCGGTAGTACTCGCCAC  
 CTGATCGGCGAGCAGCAGACCCTTATAGATGATGGTCCGGCAGACATGGAGGGCACGT  
 AGTACTCCTGCCCGTGCGTGAAGTTCAGCCCCAGAATTGCGTTGCTCGCGCGGCGGGCGAA  
 TCACGTACAGCTTGCGCTCCAGCGGTCGGGCACCAGGGTGTGCGGGCCGGCGCCGATG  
 AAAATCTGGCGGATGACCGGCTCTTTTTCTTTACCGCCGGGCTCATCGGCATGGCGTGG  
 TTGATGGGCACGTCGCGCCAGCCGAGCACCCTTGGCCCTCGGCAATCACGGCGCGCTCG  
 AGTTCCTGTTGCGAGGCGGCGGCGAGGCGATTTCTTGGGCAGGAAAATCATGCCACG  
 CCGTAGTCGCCGGGCGGGGGCAGGGTCACGCCCTGAAGGCTCATTTGCGCGGGTAGAA  
 GCGTTCGGGATTTGCAGCAGGATGCCCGCGCCGTCGCCCATCAGGGGATCGGCACCGA

**EK 8. DR\_0183 Glutamat sentaz büyük altbirimi (Devamı)**

CGGCCCCGCGGTGGTTCGAGGTTTTCCAGAATCTTGAGGCCCTGGGCGATGATGTGGTGAG  
ACTTCTGCCCCGCCGATGTGGGCCACCATGCCACCCACAGGCGTCGTGTTCCGGCATTCCG  
CGTACAGGCCGCGCTCGGTCGCCCCGGCGCACCTCCTGGGCCGTGGCCGGTTGCTGCGGCC  
CGGTCTGCGGCCCGCTGCCGGGGTTTTCCCGCTGGTTCGTGTTTCTCCATGTCTGCACCCCT  
TGCGCTGGAAGTCAC



**EK 9. DR\_0698 V-tip ATP sentaz albirim-C**

Forward Primer: 5'-TAAGGTCGGAAAGGACTGTATGC

Reverse Primer: 5'-GTCGAAGAGGTTTTGCGACAG

GTGGGCGACTCGAGCGGGTCAAGGCCGACATGGCCCCGAGATCAGCCGCTGCTCGCG  
 GAATAAGGTCGGAAAGGACTGTATGCCGACGACTACTCCTACATCAACACGCGCGTTC  
 GCGTCATGCGGACCAAGCTGCTGGACGGGCGTGCCCTGGACGCGGCGCTCGCGTCGGGC  
 AGCTACCAGGAATTCCTGCGCGTCCTGAGCGAGACGGACTTCGCGCCCAACATGCGCGA  
 AACCACCGCTGAGGGCGCGGGTCTGCCCGAACTCGACCGCGCCCTGTGCGAAAACCTCTT  
 CGACACCACGCGAGCGGGTGTCTGGCTTTGCCGACGGCGACGCCAAACGCGAAATCGAGA  
 CCCTGCTGATGAAGTGGGACCTCACCAACCTCAAGACCCTGGCGCGCGGCATCGTCAGC  
 GGGCGCGGGGCCGAGACCATCCAGCAAACCTGATTCCCGGCGGCACCATCAAGCCGAG  
 TGTGCTGCAAACGGCGTCGCAATCGACCGACCTCGCGAGCGCGGGCAGCGCCCTCGGGC  
 TGGGCGGACACCCGCTCGCCAAGGTGTTTCGCAACGCGGTGACGGCCTACAACACGACG  
 GGGCGCCTGCTCGACCTCGAGGTGCTGCTCGACCAGGGTACTACCGCTACGCCACCCAG  
 GTGTCGCGGATACCAGCCTGCGCCGGTATCTGAGCCGCGAAATCGATATCACCAACGC  
 GCTGATTGCCCGCAACTCGCGCGGGCGGGACGCTCGACACCAACCTGTTTCGTGCCGGGAG  
 GCAGCCTCGACGCTGCCGGGTATGGACGGCTGGGCGCAGGTGACGCGGGCGGCAACGCC  
 GACATCACCGCCATTCTCGAAGCCCCGAGCATCGAGGACGCCGAAGTGGCGGCGCGCAC  
 GCGCTCGACCGCGCGGCCCGCAGCAGCGGGTGTCTGGACGTGGAAGGCGTGGGCATCA  
 TCCTCGACTTCCTGCGCCGCAAGGAAATCGAGGTGCCAAACTCCGCCTCATCGGGCGCG  
 GCAAGTACTACGACCTGCCACCGACGAGATTCGCCGGGAGGTGCAGGCATGA

**EK 10. DR\_2620 Sitokrom C oksidaz albirim-I**

Forward Primer: 5'-ATGATGACCACCGATCACAAGAA

Reverse Primer: 5'-CGGAATCAGGAAGAAAAACAGCA

GTGACGGTACATGCACCGCTGCCTCAGCACACCCAGACGGCTGCCAAACGCGGCGTGTG  
 GGAGGTCATCAAGGACTTCATGATGACCACCGATCACAAGAAAGATCGGTCTGCTGTACA  
 TCATCGTTTCGATCCTGGGCTTCTGCCTGGGCGGGCTGCTGGCGCTGGCGATCCGGGTTC  
 AGCTCGCGCTGCCCCAACAGACGCTGCTGGTGGGCACCACCTACAACCAGGTGCTGACC  
 ATGCACGCGGCGATCATGCTGTTTTTCTTCCTGATTCCGCTGGGGCTGTTTCGGCTTCGGCA  
 ACTATTTCTGCGCTGCAACTCGGCGTGCGTGACGTGGCCTTGCCCCGCCTGAACACCT  
 TCGCGGTGTGGCTGTTTATCGCCAGCCTGATTCTGGTGGTCTCGGCCTGTTCAACGGCG  
 GCGCCCCAGCGTTGGCTGGACCTTCTATTACCCGCTCACCATGGACGGCAACCAGACCG  
 GCGTGAGCGTGTTTCATGGTCGCGGTGATCCTCAACGGCCTGGGCTCGCTGCTCGGCTCGG  
 CCAACTTCGCCGCCACCATCGTCAACCTCCGCGCGCCCGCATGGGCCTGTGGAAGATGC  
 CGGTGTTTCGCGTGGAGCATCTTCGCCACCTCCATTCTCCAGCTGCTCACGCTGGGCGGCC  
 TGACCGCCCGCCTGCTCACCTACCTGGAAATCAAGCTGGGCCTGAGCATGTTCAACC  
 CCGGCATCGGCGGCGTGCCGGTGTGTACCAGCAGTTCTTCTGGTTCTACTCGCACCCCG  
 CCGTGACGTGATGCTGCTGCCCTACCTGGGCATCGGCGCCGAGGTGGCCTCCACCATGG  
 CCCGCAAGCCGCTGTTTCGGCTACCGCGTGATGGTGTACTCGATGCTCGCTATCGTGCTGG  
 TGTCGTGCATCGTGTGGCTGCACCACATGTTTCGCCGTCGGCATTCCCGAAGCCTGGCAGA  
 TCGCCTTCATGATCTCGACCCTGATCGTGGCTGTCCCGACTGGCGTCAAATCTTCAACCT  
 GATCGGCACCCTGTGGGGCGGACGCATCCTGATGCGGATGCCGACCTACTGGCTGATCG  
 GCTTTATCTTCAACTTCCTGATCGGCGGGATCACGGGCGTGAGCCTGGGGATGATTCCCT  
 TCGACTACCAGGTCACCATGTCCTACTACGTGGTGGCGCACTTCCACAACGTGATGATGT  
 TCGGCACCGCCTTCCTGGCGATGGCGGGTCTGTACTACTGGTGGCCCAAGATGACGGGCC  
 GCTTCCTGGACGAAAAGGTCGGTCTGGCCACTTCTGGCTGTTTCATGATCGGCTCGTGGC  
 TGACCTTCCTGCCGAGTACATCCTGGGTCTGCTGGGGATGCCCGGCGCTACTACACCT  
 ACCCGCCGGCAACTGGGCCTGGACCGAGCTGAACTTCGCCAGCACCGTGGGCGCCTTCC  
 TGCTGCTGCTCGGCGGCCTGGCGATGCTCTACAACATGTTCCAGAGCTTCAAGCGGCCCA





**EK 10. DR\_2620 Sitokrom C oksidaz albirim-I (Devamı)**

TTACCGCCGGACCCAACCCCTGGGGCGGCTTTACCCTGGAGTGGACGAGCAGCAGCCCG  
CCTGCCGCATACTTCGCCACGACTTCCCGCAGAACTTCCCACCGAGCGCCCGCTG  
TACGACTGGGAACAGAACGGCGAAACCCTGACCCCGGTGGACCCGAAGAGCATTTCATCT  
GCCGCAGGACAGCATCTGGCCGTTTCATGACCGCCTTCTCGCTGCTGCTGATGGGCTACGG  
CCTCTCTTTTCGGCTGGTTCACCAACTATGACCCGGCTGTGGGCCTCAAGCCCTTCGCCGAC  
GCCAGCCTGAGCTTCAAGATCGCCACGACGGTGTGTACCTCAGCCTCCCGGTGTTCTTC  
TACTCGCTGTTCAAGTGGGCGGGCACCCGTGAGTACGCCGTGCCGGTTCGCGCACCACCAC  
CTCACCAAGTACGACAACGGCTTCATGGGCATGGCCTGGTTCATCATCTCGGAAGTGGCG  
CTGTTTCGCCATCCTGATTGCCGGCTACGTGTACCTGCGCGTGATCGGGCGCCGCCGAGCCG  
CCCGCACTGCGCCCGAGCATCTGGCTGGCCGCGCTCAACACCTTGATTCTGGTCACCAGC  
TCGGGTGTGGTCCACAAGGCCGAGCAGGACCTGCACCACGGCCGCACCAGCTGGGGCCG  
CCTGGGCCTGTTTCATCACGCTGCTGCTGGGCGCGATCTTCATGATCTTCCAGGTGTACGA  
GTTCTCGCTGTTTCGGCACCGAAAGTACTGGCGCCAGAACCTGTGGCAGTCGTGCTTCTT  
CATCATCGTCGGCCTGCACGGTCTGCACATCCTGATCGGGCGCACCGGCATCGCCCTGCC  
CTACTACCAGCTGCTGACCGGTAAGATGGACAAGTACAACCACGGCTCCATCGTCCCTGC  
CAGCCTGTACTGGCACCTGGTGGACGTGGTGTGGCTCCTGATCGTCGCGATCTTCTACGC  
CTGGTAA

**EK 11. DR\_0954 Süksinat dehidrogenaz sitokrom albirimi**

Forward Primer: 5'-CCCAGGTCATAGACATGGTGAATA

Reverse Primer: 5'-GTACAAAGGGAGAGAAGGGCAG

TCAGTAGCCTCCCAGTATGCGCGGAAACTGTGCCAGGCCGCGTAGAGGGTCGCCAGCG  
 CCGTAATCGCCAGCACGCCGTACCACATCTGGCGCTGATACGCCACGCCGCACCCGCAA  
 AGTCCATCACGATGATGCGCAGGCCGTTGAAGGCGTGGTACACAACGCCCGCGACCACC  
 GCAATCAAGCCGACGCGGAAGATG  CCCAGGTCATAGACATGGTGAATACGCATGTAAAA  
 CTCTTCGCCCAAGATCACCGACCCGATGCTGAACACGTGCAGCATCAGGTACAGCAGAA  
 TCGCCAGTCCAGACAGGCGGTGCAGCAGGAAGGCCCA  CTGCCCTTCTCCCTTGTACA

T

**EK 12. DR\_1505 NADH dehidrogenaz albirim-B**

Forward Primer: 5'-CTCATCATCTCGATGGCGCA

Reverse Primer: 5'-ATGCCCTGAAAGAACTCATCG

TCATCGCAGCTCCCGGGTCCAGGCGTCCACCATCGGCAGTTGCTGCCCGAGCTGATCGAA  
 GGCCTCGCCGCGCACCTTTTTCTGGAGCTGCATCACGGCGTAGATCAGCGCCTCGGGGCG  
 GGGCGGGCAGCCGGGCACGAAAATGTCCACCGGCACCACGCTGTCCACGTTCTGCACCA  
 CGGCGTAGTTGTTGAACATGCCGCCCGAGCTCGCGCACGCGCCCATGCTGATGACCCACT  
 TGGGGTCGGGCATCTGGTCGTACACCCGGCGCATGACCGGGGCCATTTTCTTGCTCAGGC  
 GTCCGGCGACAATCATCACGTCCGCCTGCCGGGGAGAGGGCGCGAAAGACCTCGGACCCG  
 AAGCGGCTCATGTCGTTGCGGGCGTTGGTGGAGCTCATCATCTCGATGGCGCAGCACGCC  
 AGCCCGAAGGTCGCCGGCCACAGGCTGTTGCTGCGGCCCCACGCCACCAGTTTTTCCAGG  
 CTGGAACAGCACGCCCTCGGATTCGAGCTCCTGCCAGTCGCGGTCTGATGAGTTCTTTC  
 AGGGGCAT

**EK 13. DR\_A0314 Üreaz yardımcı protein UreE**

Forward Primer: 5'-CCCTGCGTCTTCCACGAAATC

Reverse Primer: 5'-GAGTTGCAGCTTGCCTTTCC

TCATCCCTCGTGCTCCCAGCTCGGGCGCCCGTGAAAAGGCCGCGTCTCGCGCGTAAATGG  
CACGCCAGCCGCGTGAGCAGCAGCTCGATGGGGCGTCCCAGGGGGTCAGGAAAGCCC  
CTGCGTCTTCCACGAAATC GCGGTGCAGGTTGCCACGGCGTGCGCGGTGTGGGCGGCCT  
CGGCCAGCGTGCGCGCACCCACGACTGCGACGTCCTCGGGCGCGGCGCTCACCACGTAA  
CTCACGCCGCCCGCGTGCCCAGCACGGTGCCGGGGCTGAGGACCGTGCCTGTGGAAA  
GGCAAGCTGCAACTCGGCGCCGTCCGGAGCGTGCAGGGCGGCGGCACCCGGGCGGCGGT  
CTACGGCGGTCAGGGGGACTTCGACCTGTGGCCCGTCTATCGCCTGTTCCGGCGCTTGCT  
TGGCCCCAGCGATAGGCAACAGCGGGCGGCGCAGGCCGGTCAGCCTCGTCAA

**EK 14. DR\_A0312 Üreaz yardımcı protein UreG**

Forward Primer: 5'-CCTCGACGGTTTCCTGATTGAG

Reverse Primer: 5'-ATCACCAACGACATCTACACCTT

TCAAAGACCGACCCGTGGCGGCGTCACGTCCCCGAAACAGCAGGTCGTGCTCGATCCAGG  
 CGATGATTTTCGTCCACGCCCGCCCCGCTTTTGTAGGTTGGTGAAGACGTAGGGGCGTACTT  
 CATCTCCAGCCCTGCGCTGCGCCCCGCGCTCGGCATCCATCACGCGCAGGTCGGCGCCCA  
 CCAGCGGAGCGAGGTCGGTCTTGTGATGACGAGCAGGTCGGAGTGCCGGATGCCGGGG  
 CCGCCCTTGCGCGGCACTTTTTCGCCGCCCGCCACGTCGAGGACGAACAGCCAGGCGTCC  
 ACCAGCTCGGGCGAAAAGGAGGACGCGAGGTTGTCGCCCCCCGACTCAATGAACAGCAG  
 TTCGAGGCCGGGAAACTCGCCTTGCAGCGCCTCGACGGTTTCCTGATTGAGCGAACTGTC  
 TTCCCGGATGGCGGTGTGGGGGCAGCCGCCGGTCTGCACGCCGCGGATGCGTTCAGGGG  
 CCAGCGCGGCGGCGGGTCAGGATGCGCTGGTCCTCGAAGGTGTAGATGTCGTTGGTG  
 ATGACGGCGAGGTCGTAACGGTCGCGCAGCTCGCGGCACAGCACTTCAAGCAGCGCGGT  
 CTTGCCGCTGCCGACCGGGCCCGCCGACCCGATTTTGTAGGGGAGTCAT

## ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Konya’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ereğli’de tamamladıktan sonra 2008 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü, Biyoteknoloji Ağırlıklı Biyokimyagerlik’ten mezun oldu. Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’de Biyoloji Anabilim dalında 2009 yılında başladığı yüksek lisansını tamamlamasının ardından 2011 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim dalında doktora eğitimine kabul edildi. Ayrıca 2013 yılında Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında Doktora’ya başladı. Mehmet KUZUCU halen Erzincan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.