

PAPER DETAILS

TITLE: UV-C'nin, *Deinonoccus radiodurans* ve *Vitreoscilla* Hemoglobin (vgb) Geni Aktarılmis Rekombinantlarında; SOD, KAT ve Karoten Miktarı Üzerine Etkisi

AUTHORS: Elif ÖZBEY,Dilek ASMA

PAGES: 476-484

ORIGINAL PDF URL: <http://dogadergi.ksu.edu.tr/tr/download/article-file/1707806>

UV-C'nin, *Deinonoccus radiodurans* ve *Vitreoscilla* Hemoglobin (vgb) Geni Aktarılmış Rekombinantlarında; SOD, KAT ve Karoten Miktarı Üzerine Etkisi

Elif ÖZBEY^{1*}, Dilek ASMA²

¹Turgut Özal Üniversitesi, Park ve Bahçe Bitkileri Bölümü, Malatya, Türkiye ²İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Malatya, Türkiye

¹<https://orcid.org/0000-0001-7215-1922>, ²<https://orcid.org/0000-0002-3866-3016>

✉: elif.ozbey@ozal.edu.tr

ÖZET

Ultraviyole radyasyon (UV); biyolojik dokularda reaktif oksijen türlerinin meydana gelmesine neden olarak oksidatif stres oluşturmaktadır. UV' nin indüklediği reaktif oksijen türleri, bunların etkileri ve bunlara karşı hücresel savunma mekanizmaları ve reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinden sorumlu antioksidan sistemleri günümüzde üzerinde oldukça fazla araştırma yapılan konulardır. Bu çalışmada, yüksek seviyede iyonize radyasyon ve UV radyasyon, kuraklık ve DNA' ya zarar veren kimyasallar gibi birçok ajan ve koşula olan direnciyle iyi bilinen bir ekstremofil olan *Deinococcus radiodurans* ile *Vitreoscilla* hemoglobin (vgb) geni klonlanmış rekombinantı ve kontrol olarak da vgb⁻ rekombinant suşu kullanılmıştır. UV-C' nin *D. radiodurans*' in antioksidan savunma sistemleri (süperoksit dismutaz, katalaz ve karoten) üzerine etkisi araştırılıp, buna ek olarak organizmaya daha fazla oksijenli ortam sağlayarak daha fazla büyümesini sağlayan vgb geninin, bakterinin UV direncine yapacağı katkısı araştırılmıştır. Buna göre, *D. radiodurans* (vgb⁻) in UV-C uygulanan örnekleri kontrol gruplarıyla kıyaslandığında süperoksit dismutaz ve katalaz enzim aktivitesinin yabancıl ve vgb genini taşıyan rekombinantına oranla daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Yine yüksek karoten içeren yabancıl tipi bakterilerde, UV-C uygulamasına bağlı olarak karoten miktar artışı net bir şekilde gözlenmiştir.

Bahçe Bitkileri

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 15.04.2021

Kabul Tarihi : 28.07.2021

Anahtar Kelimeler

UV-C radyasyon
Antioksidan enzim
Süperoksit dismutaz
Katalaz
Karoten

In UV-C, *Deinonoccus radiodurans* and *Vitreoscilla* Hemoglobin (vgb) Gene Transferred Recombinants: Effect on SOD, KAT and Carotene Amount

ABSTRACT

Ultraviolet radiation (UV); creates oxidative stress by causing the formation of reactive oxygen species in biological tissues. Reactive oxygen species induced by UV, their effects and cellular defense mechanisms against them, and antioxidant systems responsible for cleaning reactive oxygen species are the subjects of much research today. In this study, *Deinococcus radiodurans* which is well known an extremophile for its resistance to many agents and conditions such as high levels of ionizing radiation and UV radiation, drought and chemicals that damage DNA and *Vitreoscilla* hemoglobin (vgb) gene cloned recombinant with, and vgb⁻ recombinant strain as a control were used. The effect of UV-C on the antioxidant defense systems of *D. radiodurans* (superoxide dismutase, catalase and carotene) was investigated, and in addition, the contribution of the vgb gene, which provides more oxygenated environment to the organism, to the UV resistance of the bacteria, was investigated. Accordingly, when UV-C treated samples of *D. radiodurans* (vgb⁻) were compared with the control groups, it was determined that the superoxide dismutase and catalase enzyme activities were lower than the wild and the recombinant carrying the vgb gene. Again, in wild-type bacteria with high carotene, an increase in the amount of carotene was clearly observed due to UV-C application.

Horticulture

Research Article

Article History

Received : 15.04.2021

Accepted : 28.07.2021

Keywords

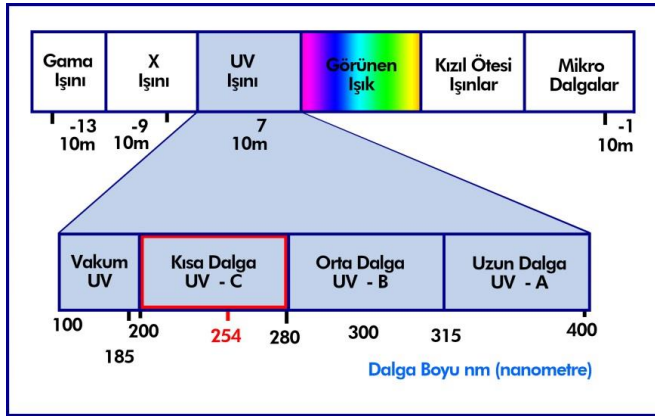
UV-C radiation
Antioxidant enzyme
Superoxide dismutase
Catalase
Carotene

- Atıf İçin:** Özbey E, Asma D 2022. UV-C'nin, *Deinonoccus radiodurans* ve *Vitreoscilla* Hemogloblin (vgb) Geni Aktarılmış Rekombinantlarında; SOD, KAT ve Karoten Miktarı Üzerine Etkisi. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 25 (3): 476-485. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.916575>.
- To Cite** Özbey E, Asma D 2022. In UV-C, *Deinonoccus radiodurans* and *Vitreoscilla* Hemogloblin (vgb) Gene Transferred Recombinants; Effect on SOD, KAT and Carotene Amount. KSU J. Agric Nat 25 (3): 476-485. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.916575>.

GİRİŞ

Elektromanyetik Dalgalar

Işık veya elektromanyetik dalga foton olarak isimlendirilen kütesiz bir parçacık akışı olmak üzere birbirini tamamlayan iki biçiminde tanımlanmaktadır. (<http://astom.omu.edu.tr>, 2006). X-ışınları, ultraviyole (mor ötesi) ışınları, mikro dalgalar ve radyo dalgaları başlıca elektromanyetik dalgalar arasında sayılmaktadır (Henden, 2000). Elektromanyetik dalgalar, dalga boylarına veya enerjilerine göre çok geniş bir alana yayılırlar. Elektromanyetik spektrum bölgeleri Şekil 1'deki gibi gösterilebilir.



Şekil.1 Elektromanyetik spektrum bölgeleri (Perincek, 2006)

Figure.1 Electromagnetic spectrum regions (Perincek, 2006)

Ultraviyole Radyasyon

UV, güneş tarafından yayılan ve göz tarafından algılanmayan radyasyon tipidir. Güneş, elektromanyetik spektrum olarak bilinen bir dizi enerji yaymaktadır ve bu enerjinin değişik şekilleri dalga boylarına göre sınıflandırılır. Buna göre UV radyasyon, farklı dalga boylarına göre üç tipte incelenebilmektedir;

UV-A: 315-380 nm

UV-B: 280-315 nm

UV-C: 190-280 nm dalga boyları arasındadır.

Dalga boyları ile radyasyonun enerjisi arasında ters bir ilişki bulunmaktadır. Bu nedenle dalga boyu en az ve dolayısıyla enerjisi en yüksek olan UV-C' nin daha ağır hücresel hasarlara neden olabileceği söylenebilmekte (Caspary, 2000) ve yine dalga boyu en yüksek ve enerjisi en az olan UV-A' nın da hücresel

zararlarının tolere edilebilecek düzeyde olduğundan bahsedilmektedir (Leena ve Marikki, 2005).

UV ışınları aynı zamanda serbest radikaller meydana getirerek hücrelerde oksidatif strese neden olurlar (Latonen ve Laiho, 2005). Oluşan bu serbest radikaller, hücrede biyomoleküllere hasar vererek, hücrenin bütünlüğünün bozulmasına, yaşlanmasına ve hücre ölümüne neden olabilmektedirler (Özalp, 2001).

Deinococcus radiodurans

Deinococcus radiodurans, yüksek seviyede iyonize radyasyon ve UV radyasyon, kuraklık ve DNA' ya zarar veren kimyasallar gibi birçok ajan ve koşula olan direnciyle iyi bilinen bir ekstremofildir (Battista, 1997). Aynı zamanda çeşitli ağır metalleri ve radyoaktif metalleri yıkabilme özelliğine sahip bir bakteridir (Battista ve Raney, 1997).

D. radiodurans, UV-C radyasyona (190- 280 nm) son derece dirençli bir organizmadır ve UV-C' nin tetiklediği siklobütan, primidin dimerleri (CPDs) ve primidin-(6-4) primidon (6-4 PPs) gibi biprimidin ışık ürünlerini (BPPs) etkili bir şekilde tamir edebilmektedir (Setlow ve Duggan, 1964). UV-C' e maruz kalmış *D. radiodurans*' ın en önemli primidin ürünleri primidin dimerleridir (Moeller, 2010). UVC' nin tetiklediği DNA zararı iki nükleotit eksizyon tamir mekanizması (Moseley ve Evans, 1983; Minton, 1994) ve bir genetik rekombinasyon mekanizması ile tamir edilmektedir (Moseley ve ark., 1972; Moseley ve Copland, 1975).

D. radiodurans da Oksidatif Stres

Oksidatif stres, prooksidanlarla, reaktif oksijen türlerinin (ROT) ortamda artmasına engel olan antioksidanların savunma yeteneği arasındaki dengesizliğin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (John ve Gutteridge, 2010).

Yüksek oranda çeşitlilik gösteren antioksidan savunma sistemleri, protein oksidasyonuna engel olur ve Reaktif Oksijen Türlerini temizleyerek *D. radiodurans*' daki oksidatif stresi hafifletmektedir. *D. radiodurans*' daki antioksidan savunma mekanizması, genel olarak hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) (Mello ve Meneghini, 1984; Dunford, 1987), süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) (İmley, 2006) gibi 3 reaktif oksijen türüne karşı etkili olmaktadır.

D. radiodurans' ın H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, O_2^- gibi reaktif oksijen türlerini temizleme kapasitesi, *E.coli*' den sırasıyla 30 kat, 17 kat ve 6 kat daha yüksektir (Tian ve ark.,

2004). *D. radiodurans* oldukça yüksek katalaz ve SOD aktivitesine sahiptir (Lipton, 2002). Katalazlar ve peroksidazlar H_2O_2 ' i uzaklaştırırken SOD' lar hücrelerden süperoksit radikallerini elimine etmektedirler (Makarova, 2001;Markillie ve ark., 1999).

Karoten

Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında yer alan karoten, yağda çözünebilir doğal antioksidanlardır. Başta singlet oksijen ve peroksi radikalleri ($ROO^\cdot$) olmak üzere ROT türlerine karşı etkili bir savunma mekanizması oluşturmaktadır (Tatsuzawa ve ark., 2000;Stahl ve Sies, 2003). Karotenoidler, DNA' yı oksidatif zarardan, proteinleri karbonilasyondan ve membran lipidlerini lipid peroksidasyonundan korumaktadır (Stahl ve ark., 1998; Zhang ve Omave, 2000). *D. radiodurans* 'ın hücre içi karotenoidleri, ($\cdot OH$, $O_2^\cdot$, H_2O_2 , ve 1O_2) gibi ROT (Zhang ve ark., 2007; Tian ve ark., 2007) ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil gibi RNT (Reaktif Nitrojen Türleri)'ni ortamdan temizleyebilmektedir. Karotenoidlerin antioksidan aktivitesi, yapısındaki konjuge çift bağlardan ileri gelmektedir. *D. radiodurans* bakteriyeye turuncu rengini veren çok miktarda karoten sentezlemektedir. *D. radiodurans* 'ın renksiz mutant soyunun indüklenmiş oksidatif stres sonucu oluşan reaktif oksijen türlerine yabancıla oranla daha duyarlı olduğunu tespit edilmiştir (Carbonneau ve ark., 1989).

Vitreoscilla Hemoglobin

Hemoglobinler, 1986 yılına kadar ökaryotik orjinli proteinler olarak bilinmekteydi. Ancak Dr. Webster ve arkadaşları Gram (-) bir bakteri olan *Vitreoscilla stercoraria* 'nın doğal olarak hemoglobin içerdiğini tespit etmişlerdir (Wakabayashi ve ark.,1986). *Beggiatoaceae* familyasında bulunan *Vitreoscilla* zorunlu aerob, Gram (-) ve kemoorganotrof filamentli bir bakteridir. Zorunlu aerob olmasına rağmen doğal yaşam alanı oksijeni düşük ortamlardır ve bu koşullarda yaşamını sürdürebilmek için hemogloblin (vgb) genini sentezlemektedir (Woose, 1987). *Vitreoscilla* hemogloblininin (VHb) ökaryotik hemoglobinlerle yüksek homoloji göstermekte olup, farklı yapısal organizasyonu ve konformasyonu stres durumlarında kalma yeteneği gösterebilmesi onun birden fazla işlevi gerçekleştirebilmesine imkan sağlamaktadır (Khosla ve Bailey, 1988;Liu ve ark., 2008).

Bu çalışmada, yabancı *D. radiodurans* ile *Vitreoscilla* hemoglobin (vgb) geni klonlanmış rekombinantı ve kontrol olarak da *vgb* rekombinant suşu kullanılmıştır. Bakterilerin UV-C radyasyon direnci araştırılıp, bunlara ek olarak organizmaya daha fazla oksijenli ortam sağlayarak daha fazla büyümesini sağlayan *vgb* geninin, bakterinin UV-C direncine yapacağı katkının araştırılması planlanmıştır. Aynı

zamanda UV-C radyasyon uygulamalarının yabancı ve rekombinant *D. radiodurans* 'ın antioksidan savunma sistemleri (süperoksit dismutaz, katalaz ve karoten) üzerine etkisi araştırılıp, *vgb* 'nin bu savunma sistemine etkileri saptanacaktır. Çünkü UV' nin hücresel zararına karşı antioksidan savunma mekanizmalarında, oksijen gerektiren çeşitli oksijenaz ve deoksijenazlarla katalizlenen, etkin bir oksijen alımı ve kullanımını sağlayan *vgb* geni aktarılmış rekombinant bakterinin daha etkili olacağı düşünülmektedir. Bu bağlamda radyasyona dirençliliğiyle bilinen *D. radiodurans* 'ın *vgb*/VHb sisteminin UV-C direnç kapasitesine etkisi ve organizmanın bundan nasıl etkileneceği araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOD

Bakteri Soyları

Deinococcus radiodurans R1 (ATCC BAA-816), bu bakterinin *vgb* geni klonlanmış rekombinantı ve kontrol olarak da *vgb* rekombinant suşu kullanıldı. *D. radiodurans* 'ın iki rekombinantından *puc8* plazmitini taşıyan Dr[pUC8] olarak, aynı plazmitin *vgb* geni taşıyan formu ise Dr[pUC8:15] olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2).



Şekil 2. *D. radiodurans* ve rekombinantları
Figure 2. *D. radiodurans* and its recombinants

vgb Klonları

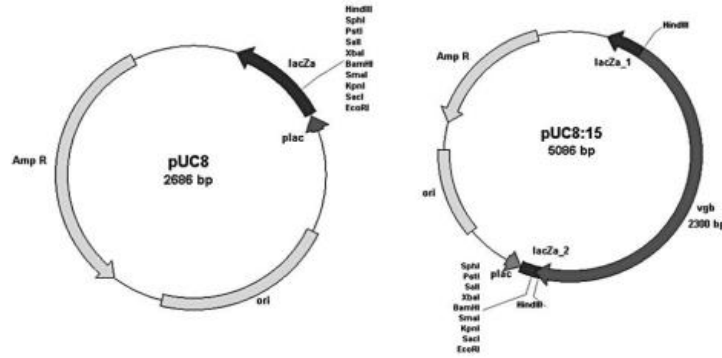
D. radiodurans 'ın Dr[pUC8] ve Dr[pUC8:15] rekombinantları İnönü Üniversitesi Moleküler Biyoloji Bölümünde Hikmet Geçkil' in laboratuvarından temin edilmiştir. *pUC8* plazmiti 2.7 kb büyüklüğünde olup işlevsel bir *lacZ* geni taşımaktadır. *pUC8:15* plazmiti ise, 5 kb büyüklüğündedir ve 2.3 kb uzunluğundaki multi klonlama bölgesine *vgb* geni yerleştirilmiştir (Şekil 3).

Bakterilerin UV-C Radyasyona Maruz Bırakılması

UV-C uygulaması için Philips TUV 15 Watt/G15 T8 254 nm dalga boyuna sahip 45 cm boyunda UV-C

lambası kullanılmıştır. UV-C radyasyon kaynağı tavana 6 cm mesafe ile yerleştirilmiştir. Işınlama için 90 x 60 x 70 cm boyutlarındaki alüminyum ile kaplı bir kabin kullanılmıştır. Lamba ile örnekler arası ışınlama mesafesi 11 cm'dir. Lambanın yüzeyinden 1 cm mesafede 15 w'lık bir güç var olduğundan dolayı 11

cm'deki uygulanan gücün değeri 0.124 wattır. 11 cm'lik mesafeden yapılan bu ışınlama 46 x 13 cm'lik bir yüzey alanını kapsamaktadır. Enzim aktivite tayini için UV-C uygulama süresine bağlı olarak uygulanan doz miktarları aşağıdaki çizelge 2' de verilmiştir.



Şekil 3. pUC8 ve pUC8:15 plazmitlerinin fiziki haritası.
Figure 3. Physical map of the pUC8 and pUC8:15 plasmids.

Çizelge 1. UV-C uygulama süresine bağlı olarak uygulanan doz miktarları
Table 1. Doses applied depending on the application time of UV-C.

UV-C Uygulama süresi UV-C Application time	Doz Miktarı (j cm ⁻²) Dosage Amount (j cm ⁻²)
6 saat	4.47
12 saat	8.94
24 saat	17.88
48 saat	35.76

Enzim Aktivite ve Karotenoid Miktar Tayini

Enzim aktivitesi tayin işlemlerinde, spektrofotometre (SHİMADZU UV-visible Spectrophotometer UV-1601) kullanıldı. Bütün enzimlerin aktiviteleri her bakteri için üç tekrarlı olarak ölçüldü. Katalaz enziminin aktivite tayini Luck (1963) yöntemine göre, SOD enziminin aktivitesi Mc Cord ve Fridovich (1969) yöntemine göre yapıldı. Absorbans değerleri belirlendikten sonra ml' deki enzim ünite sayısı spektrofotometrik olarak hesaplandı. Elde edilen değerler süpernatanın mililitresindeki miligram proteine bölünerek spesifik aktivite tespit edildi. 6, 12, 24 ve 48 saat UV-C radyasyon uygulanan örneklerin karoten tayini, spektrofotometrik olarak yapıldı (Bhosole ve Gadre, 2001). Litredeki miktarı bulmak için elde edilen sonuçlar 1000 ile çarpılarak toplam karotenoid miktarı mg L⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

İstatistik Analizler

Elde edilen sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi amacıyla istatistiksel paket program (SPSS 10.0 for Windows Inc., USA) kullanıldı. Bu programda önem kontrolü için Duncan testi uygulandı (Duncan, 1995).

BULGULAR

UV-C Uygulaması Sonrası SOD Aktivitesi

D. radiodurans (yabanıl) ve rekombinant bakterilerinde UV-C radyasyona maruz bırakılan ve bırakılmayan gruplarda süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri saptanmış ve sonuçlar Çizelge 2'de verilmiştir. Buna göre *D. radiodurans* (yabanıl)' da 12 ve 24 saatlik uygulamalarda kontrol grubuna göre bir artış saptanmıştır. *D. radiodurans* (vgb)' de UV-C uygulamasına bağlı olarak kontrol gruplarıyla karşılaştırıldıklarında SOD enzim aktivitesinde genel olarak bir artış gözlenmiştir. *D. radiodurans* (vgb) ve *D. radiodurans* (pUC8)' in UV-C uygulamasına bağlı olarak kontrol gruplarıyla karşılaştırıldıklarında SOD enzim aktivitesinde genel olarak bir artış gözlenmiştir.

UV-C Uygulaması Sonrası Katalaz Aktivitesi

D. radiodurans ve rekombinant suşlarında UV-C radyasyona maruz bırakılan ve bırakılmayan gruplarda katalaz (KAT) aktiviteleri saptanmış ve sonuçlar Çizelge 2'de verilmiştir. Buna göre *D. radiodurans* (yabanıl)' da en yüksek enzim aktivitesi de 24 saat UV-C uygulanan örneklerde tespit edilmiştir. *D. radiodurans* (vgb)' de UV-C uygulamasına bağlı olarak kontrol gruplarıyla kıyaslandığında 24 saatlik UV-C uygulanan örneklerdeki KAT enzim aktivitesi kontrol grubundan yüksek olmasına rağmen 6 saatlik ışın uygulanan örneklerden daha düşük tespit edilmiştir. Bunun dışında diğer örneklerde doza bağlı olarak bir artış gözlenmiştir. *D. radiodurans* (pUC8)' in UV-C uygulanan örnekleri kontrol gruplarıyla kıyaslandığında 12 saatlik UV-C uygulanan örneklerdeki KAT enzim aktivitesi kontrol grubundan yüksek olmasına rağmen 6 saatlik ışın uygulanan örneklerden daha düşük tespit edilmiştir.

Çizelge 2. Farklı dozlarda UV-C radyasyon uygulanan *D. radiodurans* ve rekombinant suşlarda süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) aktivitesi

Table 2. *Superoxide dismutase (SOD) and catalase (KAT) activity in D. radiodurans and recombinant strains treated with different doses of UV-C radiation.*

Bakteri Bacterium	UV-C Uygulama Süresi UV-C Application Time	SOD Aktivitesi ($\mu\text{mol ml}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$) SOD Activity ($\mu\text{mol ml}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$)	KAT Aktivitesi ($\mu\text{mol ml}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$) CAT Activity ($\mu\text{mol ml}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$)
<i>D. radiodurans</i> (yabanıl) (wild)	6 saat (kontrol)	124.3 $\pm$ 10.1	158.66 $\pm$ 8.5
	6 saat (UV-C)	79.06 $\pm$ 7.5	53.34 $\pm$ 6.4
	12 saat (kontrol)	229.4 $\pm$ 8.6	189.21 $\pm$ 10.4
	12 saat (UV-C)	235.06 $\pm$ 9.3	197.15 $\pm$ 8.6
	24 saat (kontrol)	252.93 $\pm$ 15.5	178.36 $\pm$ 9.4
	24 saat UV-C	939.04 $\pm$ 14.2	278.66 $\pm$ 11.2
	48 saat (kontrol)	216.07 $\pm$ 7.6	166.34 $\pm$ 9.3
	48 saat (UV-C)	19.2 $\pm$ 2.3	1.77 $\pm$ 0.9
<i>D. radiodurans</i> (vgb)	6 saat (kontrol)	139.27 $\pm$ 4.7	52.94 $\pm$ 4.2
	6 saat (UV-C)	534.8 $\pm$ 26.4	102.24 $\pm$ 5.3
	12 saat (kontrol)	265.1 $\pm$ 8.7	52.27 $\pm$ 4.5
	12 saat (UV-C)	372.5 $\pm$ 9.6	155.66 $\pm$ 8.7
	24 saat (kontrol)	201.5 $\pm$ 6.3	57.18 $\pm$ 5.6
	24 saat UV-C	1002.2 $\pm$ 18.5	118.06 $\pm$ 9.2
	48 saat (kontrol)	330.2 $\pm$ 12.4	60.81 $\pm$ 6.3
	48 saat (UV-C)	1427.07 $\pm$ 19.6	237.4 $\pm$ 12.3
<i>D. radiodurans</i> (pUC8)	6 saat (kontrol)	223.3 $\pm$ 11.3	38.58 $\pm$ 11.2
	6 saat (UV-C)	563.27 $\pm$ 10.4	165.27 $\pm$ 9.7
	12 saat (kontrol)	310.3 $\pm$ 9.6	41.74 $\pm$ 6.7
	12 saat (UV-C)	370.13 $\pm$ 11.2	149.74 $\pm$ 8.9
	24 saat (kontrol)	252.5 $\pm$ 8.9	60.57 $\pm$ 7.2
	24 saat UV-C	569.32 $\pm$ 11.2	172.11 $\pm$ 9.7
	48 saat (kontrol)	210.6 $\pm$ 7.8	65.90 $\pm$ 4.5
	48 saat (UV-C)	579.19 $\pm$ 13.2	178.10 $\pm$ 6.6

UV-C Uygulaması Sonrası Karoten Miktarındaki Değişimler

6, 12, 24 ve 48 saatlik UV-C uygulaması sonrası toplam karoten miktarındaki değişimler, *D. radiodurans* (yabanıl) ve rekombinantları için tespit edilmiştir. Buna göre 6 saatlik UV-C uygulanan örneklerle kontrol grupları karşılaştırıldığında *D. radiodurans* (yabanıl)'a turuncu rengini veren karotenin kontrol gruplarında, rekombinant bakterilerden yaklaşık olarak 1,5 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Aynı zamanda UV-C uygulaması sonrası bu fark yaklaşık 4,5 kata çıkmıştır. 6 saatlik UV-C uygulaması sonrası bakterilerin karoten miktarındaki değişimler Şekil 4' de verilmiştir.

12 saatlik UV-C uygulanan örneklerle kontrol gruplarını kıyaslandığında *D. radiodurans* (yabanıl)' ın kontrol gruplarında, rekombinant bakterilerden yaklaşık olarak 3,5 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Aynı zamanda UV-C uygulaması sonrası bu fark yaklaşık 6 kata çıkmıştır. 12 saatlik UV-C uygulaması sonrası bakterilerin karoten miktarındaki değişimler Şekil 5' de verilmiştir.

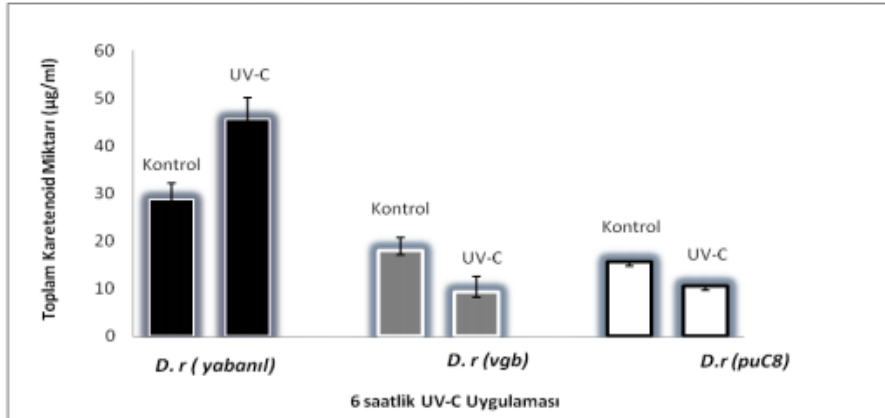
24 saatlik UV-C uygulanan örneklerle kontrol gruplarını kıyaslandığında *D. radiodurans* (yabanıl)'ın

kontrol gruplarında, rekombinant bakterilerden yaklaşık olarak 3,5 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda UV-C uygulaması sonrası bu fark yaklaşık 8 kata çıkmıştır. 24 saatlik UV-C uygulaması sonrası bakterilerin karoten miktarındaki değişimler Şekil 6' da verilmiştir.

48 saatlik UV-C uygulanan gruplarla kontrol grupları kıyaslandığında *D. radiodurans* (yabanıl)' ın kontrol gruplarındaki karoten miktarının rekombinant bakterilerden yaklaşık 3,5 kat daha fazla olduğu ortaya çıkmıştır. UV-C uygulamasına bağlı olarak bu fark 4,2 kata çıkmıştır. 48 saatlik UV-C uygulaması sonrası bakterilerin karoten miktarındaki değişimler Şekil 7' de verilmiştir.

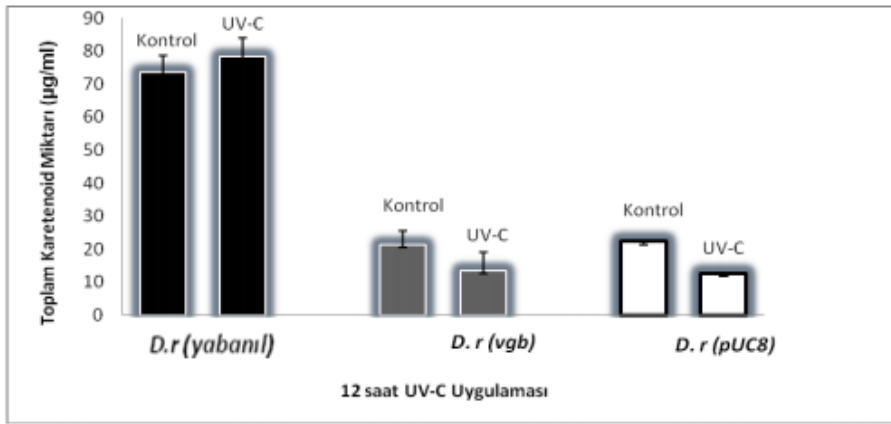
Bakterilerin UV-C Uygulaması Öncesi ve Sonrası SEM Resimleri

D. radiodurans (yabanıl) ve rekombinantlarının, UV-C uygulaması öncesi ve sonrası bakterilerin hücresel yapılarındaki değişimler Scanning Elektron Mikroskopunda tespit edilmiştir (Şekil 8). *D. radiodurans* (yabanıl), kok şeklinde ve genel olarak ikili veya dördü hücre kümeleri şeklinde bulunurlar.



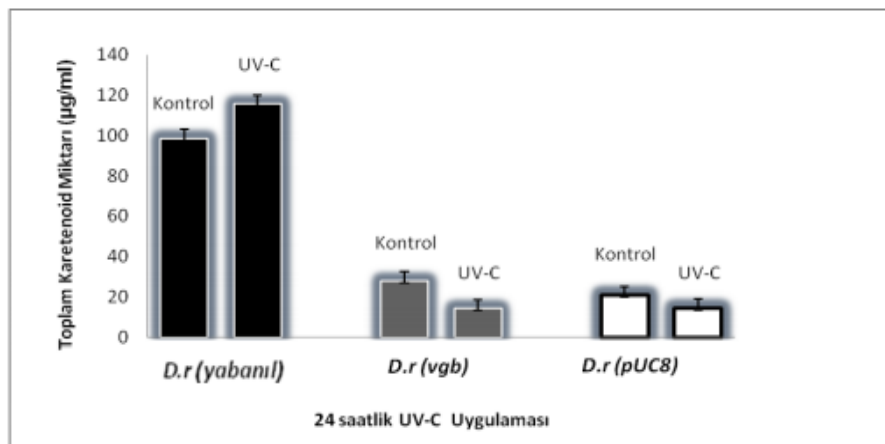
Şekil 4. *D. radiodurans* (yabanıl) ve rekombinantlarının 6 saatlik UV-C uygulaması sonrası toplam karoten miktarındaki değişimler

Figure 4. Changes in total carotene amount after 6 hours UV-C application of *D. radiodurans* (wild) and recombinants



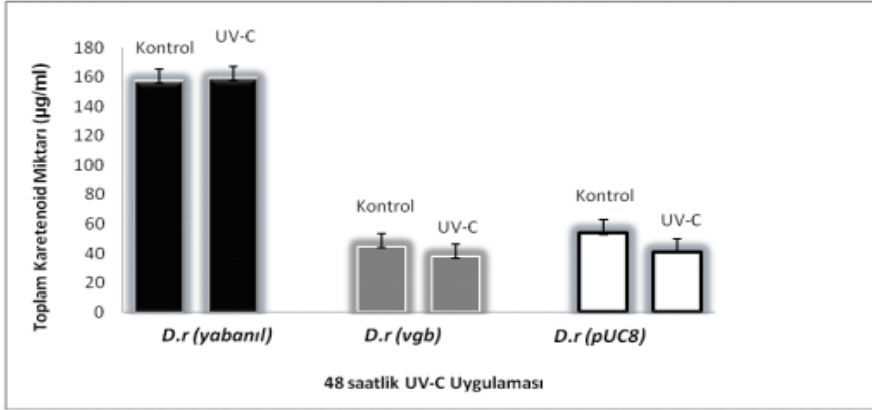
Şekil 5. *D. radiodurans* (yabanıl) ve rekombinantlarının 12 saatlik UV-C uygulaması sonrası toplam karoten miktarındaki değişimler

Figure 5. Changes in the total carotene amount after 12 hours UV-C application of *D. radiodurans* (wild) and recombinants

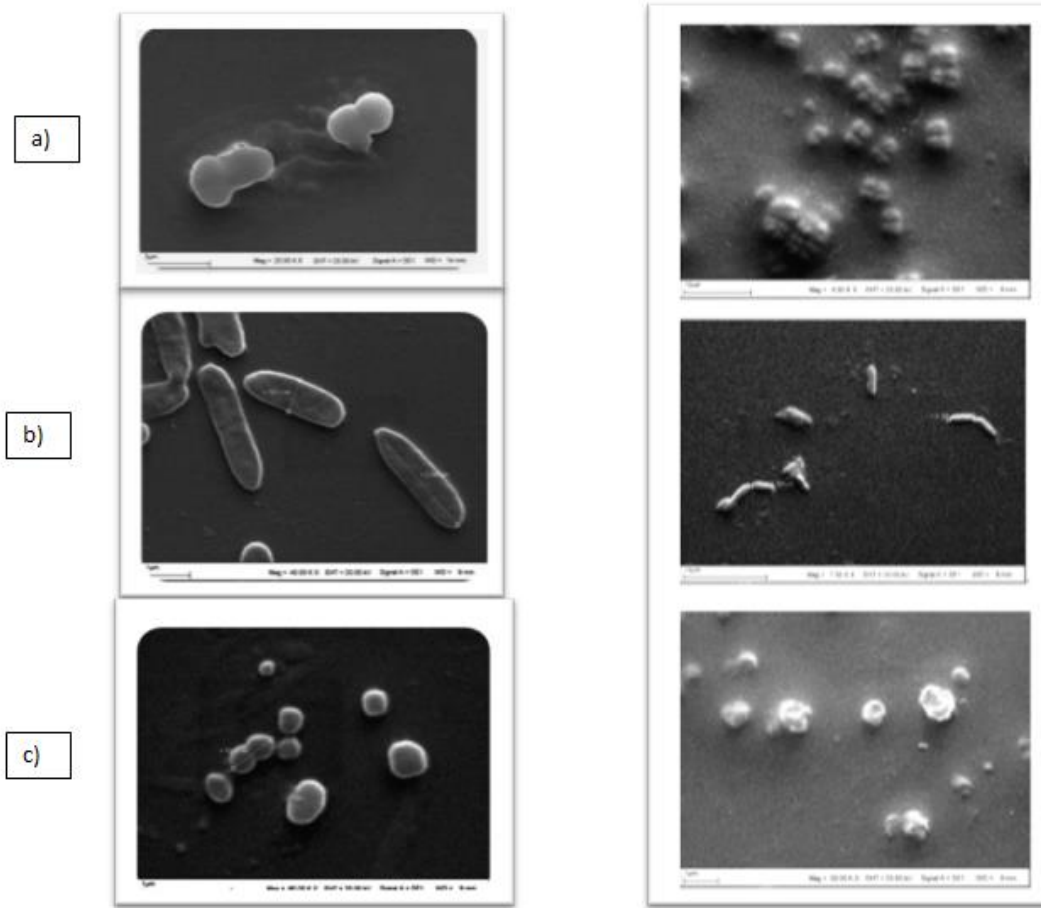


Şekil 6. *D. radiodurans* (yabanıl) ve rekombinantlarının 24 saatlik UV-C uygulaması sonrası toplam karoten miktarındaki değişimler

Figure 6. Changes in the total carotene amount after 24 hours UV-C application of *D. radiodurans* (wild) and recombinants



Şekil 7. *D. radiodurans* (yabanıl) ve rekombinantlarının 48 saatlik UV-C uygulaması sonrası toplam karoten miktarındaki değişimler.
Figure 7. Changes in the total carotene amount after 48 hours UV-C application of *D. radiodurans* (wild) and recombinants



Şekil 8. *D. radiodurans* (yabanıl) ve rekombinantlarının 48 saatlik UV-C uygulaması sonrası SEM görüntüleri. a) *D. radiodurans* (yabanıl), b) *D. radiodurans* (vgb), c) *D. radiodurans* (pUC8).
Figure 8. SEM images of *D. radiodurans* (wild) and its recombinants after 48 hours UV-C application. a) *D. radiodurans* (wild), b) *D. radiodurans* (vgb), c) *D. radiodurans* (pUC8).

48 saatlik UV-C uygulaması sonrası SEM resimleri karşılaştırıldığında, bakteri UV-C uygulamasından sonra boyut olarak büyümüş ve daha çok dörtlü hücre kümeleri halinde görülmüştür. Aynı zamanda hücre örtülerinin pürüzsüz yapısı bozularak deformasyonlar

gözlenmiştir. *D. radiodurans* (vgb) rekombinantının yabanılından farklı olarak uzun basil yapısında olan şekli, 48 saatlik UV-C uygulaması sonrası boyut olarak oldukça küçülmüş ve hücre yapısında bozulmalar gözlenmiştir. *D. radiodurans* (pUC8),

yabanıl tipteki bakteri gibi kok şeklindedir. 48 saatlik UV-C uygulaması sonrası bakteri boyut olarak büyümüş ve hücre örtülerinin pürüzsüz yapısı bozularak deformasyonlar gözlenmiştir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

UV-C uygulamasının antioksidan sistem üzerine etkisinin karoten pigmenti ile ilişkilendirildiği çalışmada, aynı zamanda vgb geninin de antioksidan savunmaya katacağı katkı araştırılmak istenmiştir. UV-C'nin hücresel zararına karşı antioksidan savunma mekanizmalarında, oksijen gerektiren çeşitli oksijenaz ve deoksijenazlarla katalizlenen, etkin bir oksijen alım ve kullanımını sağlayan sistemle (vgb) geninin etkinliği tespit edilmiştir (Liu ve ark., 1995).

VHb' nin hem endojen hem de eksojen hidrojen peroksite karşı savunmada rol aldığı aynı zamanda stres altında SOD ve KAT gibi enzimlerin aktive olmasına neden olduğu tespit edilmiştir. VHb' nin oksidatif strese karşı bu koruyucu etkisinin heterolog hücrelerdeki üretkenliği artırma yeteneğinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Akbas ve ark., 2011)

D. radiodurans (pUC8) in UV-C uygulanan örneklerini kontrol gruplarıyla kıyaslandığında SOD ve KAT enzim aktivitesinin yabanıl ve vgb genini taşıyan rekombinantına oranla daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Enzim aktivitelerinin yüksek olduğu yabanıl ve vgb genini taşıyan bakterilerde, radyasyonun zararlı etkisi yabanıl için 48. saatte kendini gösterirken, vgb rekombinantı VHb/vgb gen sisteminin vermiş olduğu avantajlar sayesinde 48. saatte en yüksek enzim aktivitesine sahiptir.

Karotenoid pigmentinin iyonize ve iyonize olmayan radyasyona karşı canlıları koruduğu bilinmektedir. (Jagannatham ve ark., 2000). Bu çalışmada özellikle yüksek karoten içeren yabanıl tipi bakterilerde, UV-C uygulamasına bağlı olarak miktar artışı net bir şekilde gözlenmiştir (Tian ve ark., 2007). 6, 12, 24 ve 48 saatlik UV-C uygulanan *D. radiodurans* (yabanıl) ve rekombinant bakteriler için toplam karoten miktarı *D. radiodurans* (yabanıl)'a turuncu rengini veren karotenin kontrol gruplarında, rekombinant bakterilerden yaklaşık olarak 1,5 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Aynı zamanda UV-C uygulaması sonrası bu fark yaklaşık 4,5 kata çıkmıştır. Bu sonuçlar *D. radiodurans* karotenoidlerinin çevresel stresle mücadelede bakteriye katkısının olduğunu düşündürmektedir.

TEŞEKKÜR

D. radiodurans' ın Dr[pUC8] ve Dr[pUC8:15] rekombinantları İnönü Üniversitesi Moleküler Biyoloji Bölümünde Prof. Dr. Hikmet Geçkil' in laboratuvarından temin edilmiştir. Ayrıca bu çalışma 2012-192 no'lu proje ile İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Araştırma, yazma, orijinal taslak hazırlama, inceleme ve düzenleme, görselleştirme ve biçimsel analiz ile ilgili olarak yazarlar makaleye eşit oranda katkıda bulundu ve son halini okuyarak onayladı.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

- Akbas M, Tugrul D, Serhat O, Benjamin S 2011. Further Investigation of the Mechanism of Vitreoscilla Hemoglobine Protection from Oxidative stress in *Escherichia coli*. *Section Cellular and Molecular Biology*, 66(5): 735-740.
- Anonim 2006. Elektromanyetik Dalgalar, <http://astom.omu.edu.tr>.
- Battista JR, Raney FA 1997. *Deinococcus-Thermus*. Nobre, Schumann, Stackebrandt, 513.
- Battista JR. 1997. Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 203-224.
- Bhosole P, Gadre RV 2001. Optimization of Carotenoid Production from Hyper-Producing Rhodotorula glutinis Mutant 32 by a Factorial Approach, *Letters in Applied Microbiology*, 33: 12-16.
- Carbonneau MA, Melin AM, Perromat A, Clerc M 1989. The action of free radicals on *Deinococcus radiodurans* carotenoids, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 275(1): 244-251.
- Caspari T 2000. How to Activate p53, *Current Biology*, 10: 315-317.
- Duncan B 1995. Multiple Range and multiple F Tests. *Biometrics*, 11: 1-14.
- Dunford HB 1987. Free radicals in iron-containing systems. *Free Radic. Biol. Med.* 3: 405-421.
- Henden E 2000. Enstrümantel Analiz II, Spektroskopik Analiz Yöntemleri, Ankara
- Imlay JA 2006. Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Mol. Microbiol.* 59: 1073-1082.
- Jagannatham MV, Cattopadhyay MK, Subbalakshmi C, Varamani M, Narayanan K, Rao CM, Shivaji S 2000. Carotenoids of an Antarctic psychrotolerant bacterium. *Sphingobacterium antarcticus* and a mesophilic bacterium *Sphingobacterium multivorum*. *Arch. Microbiol.* 173: 418-424.
- John MC, Gutteridge Barry H 2010. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem and Biophy Res Commun*, (19):393(4):561-64.
- Khosla C, Bailey JE 1988. Heterologous expression of a bacterial haemoglobin improves the growth properties of recombinant *Escherichia coli*. *Nature*, 331: 633-635.
- Latonen L, Laiho M 2005. Cellular UV damage responses—Functions of tumor suppressor p53, *BBA*, 1755: 71-89.

- Leena L, Marikki L 2005. Hücresel UV hasar tepkileri Tumor baskılayıcı p53'ün işlevleri. *Biochim Biophys Acta*, 1755 (2): 71-89.
- Lipton MS, Paša-Tolić L, Anderson GA, Anderson DJ, Auberry DL 2002. Global analysis of the *Deinococcus radiodurans* proteome by using accurate mass tags. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 99: 11049-11054.
- Liu SC, Webster DA, Stark BC 1995. Cloning and expression of the *Vitreoscilla* Hemoglobine gene in *Pseudomonas*: Effect on cell growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44(3): 419-424.
- Liu Q, Zhang J, Wei XX, Ouyang SP, Wu Q, Chen GQ 2008. Microbial production of L-glutamate and L-glutamine by recombinant *Corynebacterium glutamicum* harboring *Vitreoscilla* hemoglobin gene vgb. *Appl. Microbiol. and Biotechnol*, 77:1297-1304.
- Luck H 1963. Catalase. *Methods of Enzymatic Analysis* 885-888.
- Makarova KS, Aravind L, Wolf YI, Tatusov RL, Minton KW, Koonin EV, Daly MJ 2001. Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, 65: 44-7.
- Markillie LM, Varnum SM, Hradecky P, Wong KK 1999. Targeted mutagenesis by duplication insertion in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*: radiation sensitivities of catalase (katA) and superoxide dismutase (sodA) mutants. *J. Bacteriol*, 181: 666-669.
- Mc Cord JM, Fridovich I 1969. *Superoxide Dismutase: An Enzymic Function for Erythrocyte (Hemoerythrocyte)*, *J. Biol. Chem*, 244(22): 6049-6055.
- Mello F, Meneghini R 1984. In vivo formation of singlestrand breaks in DNA by hydrogen peroxide is mediated by the Haber- Weiss reaction. *Biochim. Biophys. Acta*, 781: 56-63.
- Minton KW, 1994. DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mol. Microbiol*, 13: 9-15.
- Moeller R, Bauermeister A, Reitz G, Sommer S, Rettberg P 2010. Effect Of Relative Humidity On *Deinococcus Radiodurans*' Resistance To Prolonged Desiccation, Heat, Ionizing, Germicidal, And Environmentally Relevant Uv Radiation. *Microbial Ecology*, 61: 715-722.
- Moseley BE, Mattingly A, Copland HJ 1972. Sensitization to radiation by loss of recombination ability in a temperature-sensitive DNA mutant of *Micrococcus radiodurans* held at its restrictive temperature. *J. Gen. Microbiol*, 72: 329-338.
- Moseley BE, Copland HJ 1975. Isolation and properties of a recombinationdeficient mutant of *Micrococcus radiodurans*. *J. Bacteriol*, 121: 422-428.
- Moseley BE, Evans DM 1983. Isolation and properties of strains of *Micrococcus (Deinococcus) radiodurans* unable to excise ultraviolet light-induced pyrimidine dimers from DNA: evidence for two excision pathways. *J. Gen. Microbiol*, 129: 2437-2445.
- Özalpan A 2001. İyonlaştırıcı radyasyonlar ve radyasyon enerjisinin absorpsiyonu Temel radyobioloji. Vol. 1, Haliç Üniversitesi Yayınları, İstanbul. (pp:31).
- Perincek S, 2006 "Ozon, UV, Ultrason Teknolojileri ve Kombinasyonlarının Ön Terbiye İşlemlerinde Uygulanabilirliğinin Araştırılması. Ege Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Yüksek Lisans Tezi
- Setlow JK, Duggan DE 1964. The resistance of *Micrococcus radiodurans* to ultraviolet radiation. I. Ultraviolet-induced lesions in the cell's DNA. *Biochim. Biophys. Acta*, 87: 664-668.
- Stahl W, Sies H 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol. Aspects Med*, 24: 345-351.
- Stahl W, Junghans A, Boer B, Driomina ES, Briviba K, Sies H 1998. Carotenoid mixtures protect multilamellar liposomes against oxidative damage: synergistic effects of lycopene and lutein. *FEBS Lett*. 427: 305-308.
- Tatsuzawa H, Maruyama TN, Misawa K, Fujimori and Nakano M 2000. Quenching of singlet oxygen by carotenoids produced in *Escherichia coli*—attenuation of singlet oxygen-mediated bacterial killing by carotenoids. *FEBS Lett*, 484: 280-284.
- Tian B, Wu Y, Sheng D, Zheng Z, Gao G, Hua Y 2004. Chemiluminescence assay for reactive oxygen species scavenging activities and inhibition on oxidative damage of DNA in *Deinococcus radiodurans*. *Luminescence*, 19: 78-84.
- Tian B, Xu Z, Sun Z, Lin J, Hua Y 2007. Evaluation of the antioxidant effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* through targeted mutagenesis, chemiluminescence, and DNA damage analyses. *Biochim. Biophys. Acta*, 1770: 902-911.
- Wakabayashi S, Matsubara H, Webster DA 1986. Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from *Vitreoscilla* *Nature*, 322: 481-483.
- Woese CR. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev*, 51: 221-271.
- Zhang P, Omaye ST 2000. Beta-carotene and protein oxidation: effects of ascorbic acid and alpha-tocopherol. *Toxicology*, 146: 37-47.
- Zhang L, Yang Q, Luo X, Fang C, Zhang Q, Tang Y 2007. 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. *Arch. Microbiol*, 188: 411-419.