

**TETRAHYMENA THERMOPHILA GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİM
AİLESİNDEN “MU” ALT SINIFI ÜYELERİNDEN BİRİNİN REKOMBİNANT
OLARAK ÜRETİMİ VE ENZİMATİK KARAKTERİZASYONU**

Handan Açelya KAPKAÇ

Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Mayıs 2021

Bu tez çalışması BAP Komisyonu tarafından kabul edilen 1001F45 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir. Ayrıca BAP Komisyonu ve TÜBİTAK tarafından BM1102 Aksiyon numaralı COST (European Cooperation in Science and Technology) projesi kapsamında değerlendirilmektedir.

ÖZET

TETRAHYMENA THERMOPHILA GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİM AİLESİNDEN “MU” ALT SINIFI ÜYELERİNDEN BİRİNİN REKOMBİNANT OLARAK ÜRETİMİ VE ENZİMATİK KARAKTERİZASYONU

Handan Açelya KAPKAÇ

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Mayıs 2021

Danışman: Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU

Sentetik bir ksenobiyotik olan 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) molekülüne maruz bırakılan sucul tek hücreli protist *Tetrahymena thermophila*'nın Glutasyon S-transferaz (GST) enzimlerinin kimliklendirilmesi, rekombinant üretimi ve enzimatik karakterizasyonu, bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır. CDNB ile 9 saat muamele edilen hücrelerin 3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) test bulgularında, CDNB'nin LD₅₀ değeri 0.079 mM olarak bulunmuştur. Toksik olmayan CDNB dozları ile muamele edilen hücrelerden glutasyon afinitesiyle saflaştırılmış 22 kDa ve 23 kDa'luk GST proteinlerinin TtGSTm19 ve TtGSTm34 genleri tarafından kodlandıkları, 2D-jel elektroforezi ile MALDI-Tof MS/MS analizi ile ispatlanmıştır. CDNB'nin 0.072 mM doz muamelesi altındaki hücrelerden affinitik saflaştırılmış GST'lerin toplam aktivitesi, zamana bağlı artış gösterirken hücre canlılığı azalmıştır. TtGSTm19 ve TtGSTm34 genlerinin mRNA ekspresyonu, toksik olmayan doz aralığında, kontrol grubuna göre anlamlı oranda artmıştır. TtGSTm34'ün 660 bp cDNA ORF'si, pIGF-1 vektörüne klonlanmış ve *T. thermophila*'ya elektroporasyon ile transforme edilmiştir. Rekombinant TtGSTm34-8xHis proteininin dual afinite kromatografisi ile saflaştırılması, SDS-PAGE ve Western blot analizi ile teyit edilmiştir. GSH ve CDNB'ye karşı TtGSTm34-8xHis enzim kinetik analizi, optimum pH'sının 7.0 ve optimum sıcaklığının ise 25°C olduğunu, sırasıyla 0.54 mM ile 0.47 mM Km değerleri ile yüksek enzim aktivitesine sahip göstermiştir. *T. thermophila*'da toksik olmayan CDNB dozlarının detoksifikasyonda TtGSTm34'ün ve TtGSTm19'un görev alabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: *Tetrahymena thermophila*, *Glutathione-S-transferaz*, *Toksisite*,
Proteom analizi, *Rekombinant enzim üretimi*.



ABSTRACT

RECOMBINANT PRODUCTION AND ENZYMATIC CHARACTERIZATION OF ONE OF “MU” SUB-CLASS MEMBERS FROM TETRAHYMENA THERMOPHILA GLUTATHYON S-TRANSFERASE ENZYME FAMILY

Handan Açelya KAPKAÇ

Department of Biology

Programme in Molecular Biology

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, May 2021

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Muhittin ARSLANYOLU

The aim of this study is the identification, recombinant production and enzymatic characterization of Glutathione S-transferase (GST) enzymes of aquatic unicellular protist *Tetrahymena thermophila* exposed to the synthetic xenobiotic 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) molecule. The LD50 value of CDNB was determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test as 0.079 mM at 9-hour exposure. 2D-gel electrophoresis and MALDI-Tof MS / MS analysis of 22 kDa and 23 kDa GSTs purified by glutathione affinity from cells under subtoxic CDNB dose treatment showed that they were encoded by the TtGSTm19 and TtGSTm34 genes. The activity of affinity purified GSTs increased with time under 0.072 mM CDNB dose treatment, while cell viability decreased. The mRNA expression of the TtGSTm19 and TtGSTm34 genes increased significantly in the non-toxic dose range compared to the control group. The 660 bp cDNA ORF of TtGSTm34 was cloned into pIGF-1 vector and transformed into *T. thermophila* by electroporation. Recombinant TtGSTm34-8xHis was purified by dual affinity chromatography, confirmed by SDS-PAGE and Western blot analysis. TtGSTm34-8XHis enzyme kinetic analysis against GSH and CDNB showed that the optimum pH was 7.0 and the optimum temperature was 25 ° C, and showed high enzyme activity with Km values of 0.54 mM and 0.47 mM, respectively. In view of these findings, it was concluded that TtGSTm34 and TtGSTm19 could be involved in *T. thermophila* detoxification against subtoxic doses of CDNB.

Keywords: *Tetrahymena thermophila*, *Glutathione-S-Transferase*, *Toxicity*, *Proteome analysis*, *Recombinant enzyme production*.

TEŞEKKÜR

Öncelikle doktora çalışmam süresince paha biçilmez tavsiyeleri, desteği ve sabrıyla kapısını hep açık tutan değerli tez danışmanım Doç. Muhittin Arslanyolu'na,

Doktoramın tez aşamasında değerli katkıları ve özverileriyle sayın jüri üyelerim Prof. Dr. Sezai Türkel ve Prof. Dr. Mehmet İnan'a,

Tezin proteomiks çalışmalarında hem laboratuvar kapılarını açıp tecrübelerini benimle paylaşan hem de bu deneylerin gerçekleşmesini mümkün kılan değerli hocalarım Doç. Dr. Gürler Akpınar ve Prof. Dr. Murat Kasap'a,

Hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen ve her zaman huzurlu bir ortamda beraber çalışmamızı sağlayan sevgili laboratuvar arkadaşlarım Nurçin Küçükkoğlu, Dr. Ayça Fulya Üstüntanır Dede, Erhan Aslan ve Dr. Murat Kaya'ya,

Her zaman yanımda hissettiğim, ömrüm boyunca minnettar olacağım annem İlknur, babam Erol ve kardeşim Melisa'ya,

Destekleriyle ve sevgileriyle bana güç veren annem Şengül, babam Feyyaz ve kardeşim Yiğit'e,

Hem akademik hayatımda hem de özel hayatımda hep yanımda olan Ulupınar Ailesi'ne,

Uykusuz laboratuvar gecelerinde benimle birlikte sabahlayan, bana huzur ve mutluluk veren sevgili eşim Özgür'e,

Ve son olarak hayatımı daha da anlamlı kılan, yüzümü güldüren canım oğlum Ömer'e çok teşekkür ediyorum.

İyi ki varsınız...

Handan Açelya KAPKAÇ

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Handan Açelya KAPKAÇ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR	vi
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Ksenobiyotik Detoksifikasyonu	1
1.2. İlaç Yapılarının GST'ler ile <i>in vivo</i> ve <i>in vitro</i> Enzimatik Biyotransformasyonu ve Biyoremidasyon'da GST'lerin Rolü	3
1.3. Glutayon-S-Transferaz Enzim Ailesi	5
1.4. Silli Tek Hücreli Ökaryot <i>Tetrahymena thermophila</i> GST Ailesi	7
1.5. Hipotez ve Amaç.....	9
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	9
2.1. Bölüm1- T. thermophila'nın CDNB Muamelesi, Detoksifikasyon Cevabı ve Görev Alan GST Enzimlerinin Kimliklendirilmesi	9
2.1.1. CDNB toksisitesinin belirlenmesi.....	10
2.1.2. Toplam çözüner protein izolasyonu	11
2.1.3. GST enzim aktivitesi testi	11
2.1.4. GSH affinitesi ile GST enzimlerinin saflaştırılması ve SDS-PAGE analizleri.....	12
2.1.5. 2D Jel elektroforezi ve MALDI-TOF MS ile protein kimliklendirme.....	12

2.1.5.1. Protein spot kesimi.....	13
2.1.5.2. Tripsinleme ve MALDI TOF MS analizi ile proteinlerin kimliklendirilmesi	13
2.1.6. RNA izolasyonu ve Real-Time PCR	14
2.2. Bölüm 2- <i>T. thermophila</i> Glutathione-S-transferaz mu 34 Geninin Protein Kodlayan Bölgesinin Klonlanması, Rekombinant Protein Üretimi ve Enzimatik Karakterizasyonu	15
2.2.1. TtGSTm34 geninin rekombinant protein üretim vektörü pIGF-1'e klonlanması ve <i>T. thermophila</i> hücrelerine elektroporasyon ile transformasyonu.....	15
2.2.2. Tetrahymena hücrelerine elektroporasyon yöntemi ile transformasyon ve antibiyotik seçilimi.....	18
2.2.3. Transformant hücrelerin CdCl ₂ ile indüksiyonu	18
2.2.4. Toplam protein lizatından Ni-NTA boncukları ile GSTm34-8xHis'in saflaştırılması.....	18
2.2.5. pIGF-1-TtGSTm34 vektörü içeren transformant hücrelerinden GSH afinitik boncukları ile TtGSTm34-8xHis'in saflaştırılması ve Western-Blot analizi.....	19
2.2.6. TtGSTm34-8xHis proteininin affinitik Ni-NTA ve GSH boncukları ile ardışık saflaştırılması	19
2.2.7. Rekombinant TtGSTm34 proteininin enzimatik karakterizasyonu	20
2.2.7.1. Optimum pH'ın belirlenmesi.....	20
2.2.7.2. Optimum iyonik şiddetin belirlenmesi	20
2.2.7.3. Optimum sıcaklığın belirlenmesi	20
2.2.7.4. TtGSTm34 enziminin GSH ve CDNB substratları için Km, Vmax, Kcat ve özgüllük sabitinin (Kcat/ Km) belirlenmesi	20
2.2.7.5. Enzim inhibisyonu	21
2.2.7.6. Enzim kararlılık testi	22
2.2.8. TtGSTm34 proteininin 3 boyutlu modellemesi	22
3. BULGULAR.....	23

3.1. Bölüm 1- CDNB Substratı ile Muamelesine Karşı <i>T. thermophila</i>'nın Biyolojik Cevabının Karakterizasyonu, Moleküler Analizi.....	23
3.1.1. CDNB'nin Tetrahymena hücrelerinde toksisitesinin belirlenmesi.....	23
3.1.2. Tetrahymena'nın CDNB toksisitesine cevap olarak ürettiği GST enzimlerinin glutatyon afinitik tanecikleri ile saflaştırılması ve toplam aktivite analizi.....	26
3.1.3. CDNB'ye maruz bırakılan <i>T. thermophila</i> hücrelerinden GSH affinitesi ile saflaştırılan GST proteinlerinin kimliklendirilmesi.....	28
3.1.4. CDNB'ye maruz bırakılan Tetrahymena'larda kimliklendirilen TtGST'lerin mRNA'larının ifade değişimi	31
3.2. Bölüm 2- TtGSTm34 geninin klonlanması, rekombinant protein üretimi ve enzim kinetik özelliklerinin belirlenmesi.....	34
3.2.1. TtGSTm34 geninin klonlanması, transformasyonu ve indüksiyonu	34
3.2.2. TtGSTm34 proteininin Ni-NTA ve GSH bağlı boncuklarıyla saflaştırılması.....	35
3.2.3. TtGSTm34-8xHis'in Ni-NTA ve GSH affinitesi ile ardışık saflaştırılması	38
3.2.4. Saflaştırılmış TtGSTm34-8xHis'in enzimatik karakterizasyonu ve kinetiği	39
3.2.5. TtGSTm34-8xHis enzim aktivitesine inhibitörlerin etkisi.....	43
3.2.6. Değişik sıcaklıkların zamana bağlı TtGSTm34-8xHis enzim aktivitesine etkileri	44
3.2.7. TtGSTm34-8xHis proteinin 3 boyutlu Homoloji modeli	45
4. TARTIŞMA	47
4.1. Bölüm 1- <i>T. thermophila</i>'nın CDNB Detoksifikasyonunda Görev Alan GST Enzimlerinin Belirlenmesi	47
4.1.1. CDNB toksisitesi ve enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	47
4.1.2. Protein kimliklendirilmesi	49
4.1.3. TtGSTm19 ve TtGSTm34 genlerinin ekspresyon analizi.....	52
4.2. Bölüm 2- TtGSTm34 Geninin Homolog Olarak Rekombinant Klonlanması, Ekspresyonu ve Enzimatik Karakterizasyonu	52

4.2.1. TtGSTm34 geninin klonlanması, homolog ekspresyonu ve saflaştırılması	52
4.2.2. Rekombinant enzimin optimum koşullarının belirlenmesi, Kinetik sabitleri ve inhibitörlerin aktiviteye etkisi	53
5. SONUÇ	58
KAYNAKÇA.....	59
EKLER	69
ÖZGEÇMİŞ	



TABLULAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. TtGST genlerinin tasarlanan primer çiftleri ve Taqman® propları	14
Tablo 2.2 Klonlamada kullanılan primerler	17
Tablo 3.1. <i>PDQuest yazılımı ile kantitatif olarak ölçülen spot büyüklükleri ve kontrol grubu spotlarına göre katsal farklılıkları.</i>	29
Tablo 3.2. <i>Tetrahymena thermophila</i> 'dan rekombinant TtGSTm34-8xHis 'nin iki aşamalı afinitik saflaştırması ve enzim aktivite analizi	40
Tablo 3.3. <i>Rekombinant TtGSTm34-8xHis enziminin optimum şartlarda kinetik değerleri</i>	43
Tablo 3.4. <i>Enzim kararlılığı testleri. Zamana ve sıcaklığa bağlı olarak TtGSTm34-8XHis enziminin aktivitesinin değişimi.</i>	45
Tablo 4.1. <i>Çeşitli organizmalardan elde edilen GST'lerle TtGSTm34'ün kinetik sabitlerinin karşılaştırılması</i>	55
Tablo 4.2. <i>Ticari olarak satılan GST enzimleri ile TtGSTm34-8xHis rekombinant enziminin aktivite karşılaştırılması Kinetik sabitleri</i>	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Ksenobiyotiklerin enzimatik biyotransformasyonları.	3
Şekil 1.2. GST'lerin CDNB substratına GSH ekleyerek detoksifikasyon reaksiyonunu katalizlemesinin şematik gösterimi	7
Şekil 2.1. pIGF-1-TtGSTm34 vektör tasarımı ve yapılandırılması.....	16
Şekil 3.1. Tetrahymenan'ın CDNB'nin çeşitli dozlarına maruz bırakılmasından sonra MTT (% Canlılık testi) ve toplam proteindeki toplam GST enzim aktivite grafiği.	25
Şekil 3.2. 0.018, 0.036 ve 0.072 mM CDNB dozlarına maruz bırakılmış Tetrahymena hücrelerinden elde edilen toplam protein izolatlarından GSH afinitik boncuklarıyla GST enzimlerinin saflaştırılması.	27
Şekil 3.3. GST proteinlerinin 2D jel elektroforezi ve MALDI-TOF MS analizi.	30
Şekil 3.4. CDNB dozlarına maruz bırakılan hücrelerde TtGSTm19 ve TtGSTm34 mRNA ifade değişimlerinin Real-Time PCR ile belirlenmesi.	33
Şekil 3.5. pIGF-1-GSTm34 vektörü içeren pozitif transformant hücrelerinin CdCl ₂ ile indüksiyonu ve SDS-PAGE analizi.	35
Şekil 3.6. pIGF-TtGSTm34 vektörü taşıyan T. thermophila transformantlarının CdCl ₂ ile 30 saat indüksiyonu sonrası TtGSTm34-8xHis'in Ni-NTA ile afinitik saflaştırması.	36
Şekil 3.7. T. thermophila pIGF-1-TtGSTm34 vektörü içeren transformant hücrelerin CdCl ₂ indüksiyonunu sonrası toplam protein izolatının GSH boncukları ile saflaştırılmasıyla elde edilen proteinlerin anti-His antikoru ile Western-Blot analizi.	37
Şekil 3.8. pIGF-TtGSTm34 içeren T. thermophila transformant hücrelerinden ardışık olarak Ni-NTA ve GSH afinitik saflaştırma yapılarak	39
Şekil 3.9. Rekombinant TtGSTm34-8XHis enziminin GST enzim aktivite reeaksiyonunda iki farklı tampon kullanılarak optimum pH'ın belirlenmesi.....	40
Şekil 3.10. Rekombinant TtGSTm34-8xHis enzim aktivitesinin optimum iyonik şiddeti.....	41
Şekil 3.11. Rekombinant TtGSTm34-8xHis enzim aktivitesinin optimum sıcaklığının belirlenmesi.	41

Şekil 3.12. CDNB substratına karşı rekombinant TtGSTm34-8xHis enziminin Lineweaver Burk grafiği.	42
Şekil 3.13. GSH substratına karşı rekombinant TtGSTm34-8xHis enziminin Lineweaver Burk grafiği.	42
Şekil 3.14. TtGSTm34-8xHis enzim aktivitesine çeşitli inhibitörlerin etkisi.	44
Şekil 3.15. TtGSTm34'in homoloji modellemesi.	46
Şekil 4.1. NetPhos yazılımı yardımıyla TtGSTm34 ve TtGSTm19 üzerinde olası fosforillenme bölgelerinin tayini.....	51



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Tt	: Alpha
Tetrahymena	: Beta
<i>E. coli</i>	: American Psychological Association (Amerikan Psikoloji Birliđi)
GST	: Metre-Kilogram-Santimetre
MTT1	: Qualifications Framework for European Higher Education Area
His-Tag	: Histidin takısı
dH ₂ O	: Distile su
T. Protein	: Toplam protein
TBS	: Tris Buffered Saline (TBS)
TBS-T	: Tris Buffered Saline, %0.1 Tween içerir.
kDa	: Kilodalton
µl	: Miktolitre
ml	: Mililitre
l	: Litre
gr	: Gram
mg	: Miligram
°C	: Santigrat derece
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
µM	: Mikromolar
M	: Molar
rpm	: Santrifüjün dakikadaki devir sayısı
g	: Göreceli santrifüj kuvveti
dk	: Dakika
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
K _m	: Michaelis sabiti
V _{max}	: Enzimin maksimum reaksiyon hızı
K _{cat}	: Enzimin devir Hızı
MALDI	: Matrix assisted laser desorption ionization
TOF	: Time of flight
MS	: Mass spectrometry

1. GİRİŞ

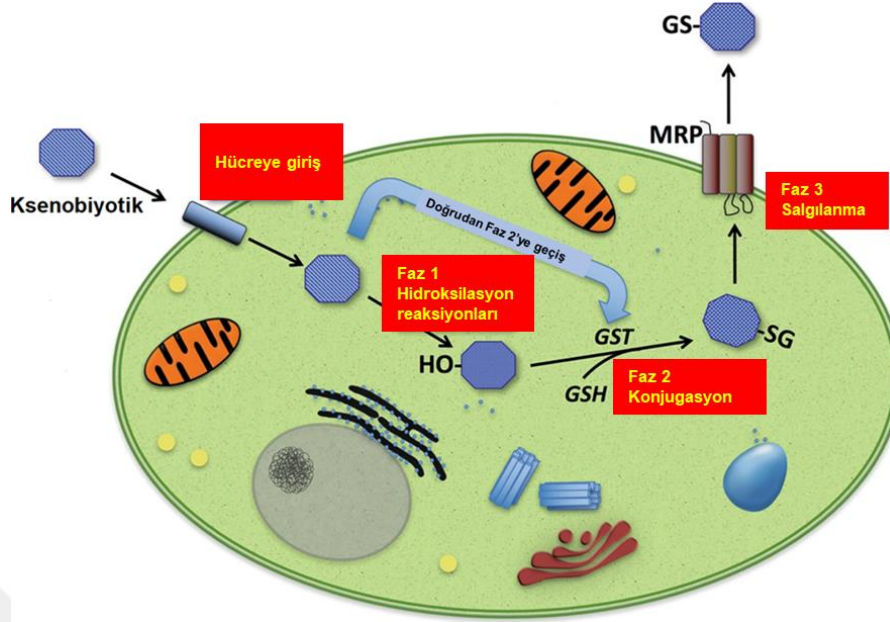
1.1. Ksenobiyotik Detoksifikasyonu

Organizmalar yaşamları boyunca sürekli olarak ekzojenik ve endojenik kökenli toksik kimyasallara maruz kalırlar. Normal fizyolojik/biyokimyasal işlevin ve homeostazın sürdürülmesi için organizmaya gerekli olmayan veya yabancı olan (genellikle dış kaynaklı) tüm kimyasal yapılara ksenobiyotik denilmektedir. Organizmaların bu tür bileşiklerin toksisitesinden kurtulma yeteneği, temel bir biyolojik adaptasyon olup hayatta kalmayı sağlar. Toksik bileşikler ile metabolitlerine karşı organizmalar koruma sağlayan farklı detoksifikasyon stratejileri geliştirmişlerdir. En temel strateji, zararlı bileşikleri organizmaya daha az zararlı olacak şekilde suda daha fazla çözünür hale getirmektir. Organizmanın genom kapasitesi ile bu yapılar detoksifiye edilemezse, bileşik hücrede birikerek toksik konsantrasyonlara ulaşır ve organizmanın yaşamsal dengesini bozar ya da ölümüne neden olur (Croom, 2012).

Hastalık tedavisinde kullandığımız ilaçlar ile çevremizi, besinlerimizi ve sularımızı kirleten hidrofobik-elektrofilik (**geçebilen-saldırgan**) özelliğe sahip kimyasallar, hidrofobik engel olan hücre membranından kolaylıkla geçerek, insan hücresi ve organizmalara, hatta hücre içi organellere girebilirler. Hidrofobik-elektrofilik kimyasallar, hidrofobik olmaları dolayısıyla su ortamında çözünür olmamalarına karşı lipid gibi hidrofobik ve bipolar yapılarda çözünebilirler. Ksenobiyotikler makromoleküllerin (DNA, RNA ve moleküler protein makinaları gibi) hidrofobik bölgelerine, hidrofobik kısımlarıyla bağlanarak elektrofilik saldırılarda bulunurlar. Sonuç olarak, makromolekül yapısında bulunması istenmeyen kovalent bağlar oluşur, böylece makromolekül yapısı geri dönüşü olmayan bir yapısal değişime uğrar, bu durum ise genellikle fonksiyon kaybı veya toksik etki ile sonuçlanır. Kimyasalların toksik etkiye neden olan hidrofobik-elektrofilik karakterleri, detoksifikasyonda görev yapan “**düşük-substrat seçicilikli enzim sistemleri**” tarafından hidrofilik karakterlere dönüştürülür; hücresel amaç, organeller arası fiziksel membran engelini aşamayan yani organeller arası serbest geçiş yapamayan yapılara dönüştürme ile hücre enzimleri tarafından tanınabilen ve hücre dışına atma ile hücresel kontrolün sağlanmasıdır (Rostami-Hodjegan ve Tucker, 2007).

Hücreye reseptör bağımlı veya bağımsız yollarla giren toksik maddeler; “düşük-substrat seçicilikli enzim sistemlerinin” görev aldığı Faz I (değiştirme), Faz II (ekleme)

ve Faz III (dışarı salgılama) aşamalarından oluşan detoksifikasyon ile kontrol altına alınır (Xu, C. ve ark., 2005). Faz I'de oksidasyon (C-H'in C-OH'a dönüşümü), redüksiyon, hidrolizasyon, siklizasyon veya desiklizasyon enzimleriyle toksik kimyasal yapılara polar yapılar eklenerek veya polar yapılar açığa çıkartılarak Faz II'ye hazırlanır (Şekil 1.1). Faz I'de, böylece toksik kimyasal yapılar (veya ilaç gibi ksenebiyotikler) karboksil (-COOH), hidroksil (-OH), amino (-NH₂) ve sülfidril (-SH) gibi polar gruplar kazanır. Faz II enzimleri, genellikle Faz I enzimlerinin eklediği veya yapıda bulunan polar gruplara glukronik asit, sulfonatlar, glutatyon veya amino asit gibi hidrofilik yapıların ekleme (konjugasyon) işlemini gerçekleştirerek, toksik-hidrofobik yapılar çözümlü forma dönüştürülür. Faz III aşamasında, bazen konjugatlı-ksenobiyotik yapılar ilave metabolik işlemde geçirilir; örneğin glutatyon konjugatı hücreden atılmadan önce asetilsistein (merkapturik asit) konjugatına dönüştürülür. Bu aşamada glutatyon konjugatında bulunan γ -glutamat ve glisin kısımları gamma-glutamil transpeptidaz ve dipeptidazlar ile uzaklaştırılır. Konjugatta kalan sistein kısmı ise asetillenir. Bazen metabolize edilemeyen kısmen toksik olan bu yeni türevlerden bazıları, eklenen anyonik takılar vasıtasıyla membran transport proteinleri veya çoklu-ilaç dirençlilik proteinleri (MRP) tarafından tanınır, bağlanır ve hücreden dışarıya atılır. Faz I ve II enzimleri, toksik olmayan (ilaç) kimyasallara nadir olarak toksik karakter kazandırabilirken bazen de toksik olan kimyasalların hücresel toksisitesini ortadan kaldırırlar. İlaç açısından bu modifikasyonlar aktivasyon veya inaktivasyon anlamına gelebilir. Böylece Faz I ve II enzimleri, hücreye yabancı olan kimyasal ve ilaç yapıların "*in vitro* veya *in vivo* enzim biyotransformasyonunda" görev alabilirler.



Şekil 1.1. Ksenobiyotiklerin enzimatik biyotransformasyonları. Zararlı moleküller plazma zarından hücre içine giriş yapabilir ve hücre içinde Faz I metabolizması enzimleri tarafından hedef alınır. Bu enzimlerin başlıcaları hidrosilasyon, oksidasyon ve indirgeme dahil olmak üzere farklı reaksiyonları katalizyen Sitokrom P450 ailesi üyeleridir. Faz II metabolizmasının ana rolü ise Faz I'de modifiye edilmiş ksenobiyotiklerin glutatyon (GSH) gibi hidrofilik moleküller ile konjugasyonu Glutatyon-S-transferaz gibi enzimler ile katalizlenir. Faz III'de oluşan bu konjugat moleküller uygun transmembran (Efflux) pompaları ile aktif olarak hücre dışına atılır. Bazı bileşiklerin ise Faz 2 metabolizmasından direk olarak hücre dışına atılması gerçekleşir. Şekil, Allocati ve ark., (2018) makalesinden türkçeleştirilmiştir.

1.2. İlaç Yapılarının GST'ler ile *in vivo* ve *in vitro* Enzimatik Biotransformasyonu ve Biyoremidasyon'da GST'lerin Rolü

Son yıllarda, büyük ölçekli genom verileri, gelişmiş biyoinformatik araçlar, eksprese edilmiş dizi etiket (EST) veritabanları ve enzimlerin üç boyutlu yapılarının X-ışını ile belirlenmesi, kristallografi ve *in silico* gibi teknik ile bilimsel bilgide genişleme, GST enzim ailesinin yapı-işlev ilişkisi ile tür seviyesinde bilgilerimizi arttırmıştır.

Günümüzde, PubMed veritabanında, "Glutatyon S-transferazlar" ile ilgili 41.000'den fazla, yine GST enzimlerinin ana substratı glutatyon ile ilgili de 157.000'den fazla kayıt bulunmaktadır (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed). GST'lere ilgi, tarımda herbisit biyoremediasyonu, tıpta karsinogenez ve klinik araştırmalarda ise ilaç dirençliliği hakkında biyokimyasal, fizyolojik ve toksikolojik özelliklere odaklanmaktadır.

GST'ler bilinen GSH konjugasyon görevi dışında izomerizasyon, indirgeme, taşıma, depolama, prostaglandin biyosentezi, tiyol transferi, hücre apoptozu ve peroksidaz aktivitesi gibi hücreysel görevlerde de rol almaktadırlar (Board ve Menon, 2013; Hayes vd., 2005; Kanaoka vd., 1997).

İlaç biyotransformasyonu açısından örneklenirse; Gunnarsdottir ve arkadaşları (2002) 6-tiyoguanin (6-TG) kan kanseri ilacının ön formları olan trans-6-(2-Asetilviniltiyo) guanin (trans-AVTG) ve cis- 6-(2-acetilviniltiyo) pürinin (cis-AVTP) normal hücrelerde *in vivo* biyotransformasyonu sonucu daha az toksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. İnsan GST genlerinden 13 adedinin (4 adet GSTalfa, 4 adet GSTmu, 1 adet GSTpi, 1 adet GSTomega, 1 adet GST theta, 1 adet GSTzeta) rekombinant olarak üretilmesi ve kullanılması ile cAVTP [cis-6-(2-asetilviniltiyo)pürin] ve tAVTG'nin [trans-6-(2-asetilviniltiyo)guanin] öncü-ilaç (prodrug) yapılarının bütanon kısmına glutasyon eklenebildiği *in vitro* biyotransformasyon ile aktif ilaç formu olan 4-glutasyonilbütan-2-one ve bütanon 4-(bis-glutasyonil) bütan-2-one'ın hücre içinde bu yolla dönüştüğünü HPLC, MS ve LC/MS/MS analizleri ile ispatlamışlardır (Eklund, B. ve ark., 2007). Bu çalışmada; 13 insan GST proteininden GSTmu1-1 ve GSTmu2-2 proteinlerinin cAVTP'ye karşı en yüksek biyotransformasyon aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Kan kanseri hücrelerinde, böylece GST enzimleri yardımıyla bu ön ilaçlar aktif formları olan 6-TG'ye dönüştürülerek, hücreyi öldürmektedir.

Biyoremediasyon açısından ise sebze, meyve ve diğer ürünleri kontamine eden funguslara karşı öldürücü etkisi bulunan geniş spektrumlu ve klorlu bir fungusit olan klorotalonil (2,4,5,6-tetrakloroizofitalonitril) üzerinde GST etkisi araştırılmıştır. Klorotalonil, memelilere karşı toksik olmamasına karşılık balıklara karşı oldukça toksiktir. Biyolojik olarak bu fungusitin kirletmiş olduğu toprak, su ve yiyeceklerden arındırılmasının (biyoremediasyon) amaçlandığı bir çalışmada; *Ochrobactrum anthropi* SH35B bakterisinden alınarak rekombinant üretilen bir GST enzimi, glutasyon varlığında klorotalonil'e mono, di ve triglutasyon ekleyerek, *in vivo* ve *in vitro* biyotransformasyonun mümkün olduğunu desteklemiştir (Kim ve ark., 2004).

Su kaynaklarının klorlanması sonucu fumik veya humik asitlerin klorinasyonu ile oluşan DCA (dikloro-asetik asit) kanserojen olup içilebilir suları kontamine etmektedir. Rekombinant rat ve insan GSTzeta enzimleri DCA'nın glutasyon bağımlı oksijenasyonu

ile glikosidik asite biyotransformasyonu katalize ederek, toksisitesini ortadan kaldırmaktadır (Tong, Z. ve ark., 1998).

Biyolojik ilaç ve/veya toksik etkiye sahip yukarıda verilen ksenobiyotik örnekleri gibi değişik kimyasalların düşük seçicilikli substrat kullanan GST enzimleri tarafından eklenen glutatyonlar ile *in vivo* veya *in vitro* biyotransformasyonlarının gerçekleştiği bilinmektedir. Toksikitesi giderilerek veya azaltılarak oluşturulan bu yeni türevler, bazen biyolojik ilaç aktivesini ortaya çıkartırken bazen de muhafaza edilmesinde yardımcı olurlar. Bu nedenle; farklı türlerden elde edilerek rekombinant üretilen GST enzimlerden oluşturulan enzim platformları, ilaç sanayisinden tarım uygulamalarına kadar geniş bir yelpazede enzimatik biyotransformasyonda *in vivo* olarak kullanılabilir.

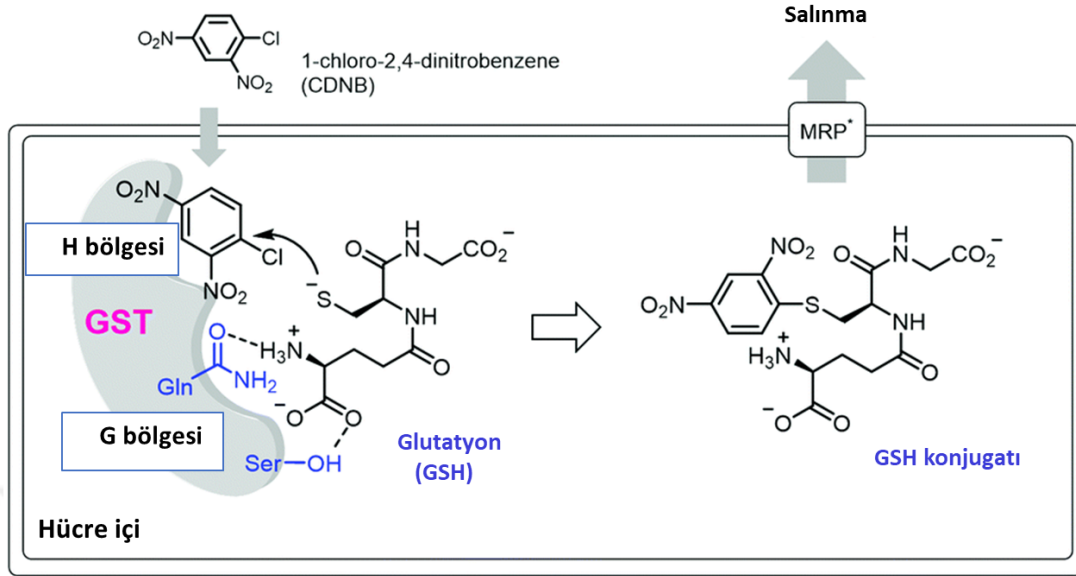
1.3. Glutayon-S-Transferaz Enzim Ailesi

Hücre sel detoksifikasyon işlemlerinde görev alan glutatyon-S-transferazlar (E.C. 2.5.1.18), ilk defa 1960 yılında sıçan karaciğer hücrelerinin sitoplazmasında 1,2-dikloro-4-nitrobenzen ve bromosülfotalein ile GSH arasındaki konjugasyonu katalizlemesi ile keşfedilmiştir (Booth, J. ve ark., 1961). GST ailesine ait enzimler tüm canlılarda bulunmaktadır (Üstüntanır Dede & Arslanyolu, 2019). GST enzimlerinin pek çoğu sitozolik olmakla birlikte bir kısmı mikrozomal (düz endoplazmik retikulumu yerleşik) ve diğer bir grubu ise mitokondriyaldir (Eaton, D.L. ve ark., 1999). Canlılar aleminde hücre sel GST'ler oniki alt-sınıf altında toplanır; Alfa (A), Mu (M), Pi (P), Sigma (S), Theta (T), Zeta (Z), Phi (F), Tau (U), Beta (B), Omega (O), Lambda (L), DHAR. Mikrozomal GST'ler tek formda bulunur ve MAPEG ismiyle bilinir. Kloroplastta bulunan GST'ler ise tek formda olup Kappa (K) ismiyle bilinir (Frova, C., 2006). Türler arasında GST alt-sınıf izoenzim üyeleri tipik olarak % 40 civarında benzerlik bulunurken, alt-sınıflar arasında bu benzerlik % 25 civarına düşmektedir (Flanagan ve Smythe, 2011). GST alt-sınıflarının tümüne hiçbir organizma sahip değildir ve türler arasında alt-sınıfların dağılımları farklılık gösterir (Üstüntanır Dede & Arslanyolu, 2019). Zeta ve theta gibi bazı GST alt-sınıfları bakteri, bitki ve hayvanlarda yaygın dağılım gösterirken diğer gruplar ise sadece memelilere (alpha, mu ve pi), bitkilere (phi, tau, lamda ve DHAR), böceklere (delta) ve bakterilere (beta) özgün kısıtlı bir dağılım gösterirler (Frova, C., 2006). Bir türün aynı GST alt-sınıf üyeleri arasında ise protein seviyesinde %60-80 gibi daha yüksek benzerlik bulunabilirken, farklı alt-sınıf üyeleri arasında %20-30 oranında benzerlik bulunur (Alberti, G. ve ark., 1996). Memeli sitozolik GST'leri iki

ana evrimsel gruba ayrılır. İlk grup; sigma, alfa, mu ve pi alt-sınıflarını içerirken hepsi 1-kloro-2, 4-dinitrobenzen (CDNB) için yüksek afinite göstermesi yanında GSH tiyol grubunu stabilize etme işlevini de görürler, ayrıca enzimin aktif merkezinde tirozin kalıntısına sahiplerdir. İkinci grup; omega, zeta ve teta alt-sınıflarından oluşurken CDNB'ye karşı düşük afiniteye sahiptirler ve enzimlerin aktif merkezinde tirozin bulunmamaktadır (Dourado vd., 2008).

Sitoplazmik GST enzimleri, genellikle 200-250 adet aminoasit uzunluğunda ve 23-30 kDa molekül ağırlığında monomerlerin bir araya gelmesi ile oluşan homodimerlerden oluşur. Sitoplazmik GST'lerin her monomerinde birbirinden bağımsız hareket eden birer aktif bölge vardır. Proteinin N-ucunda GSH substratının bağlandığı “hidrofilik G bölgesi” bulunurken (Şekil 1.2), C-ucunda hidrofobik substratların bağlandığı “hidrofobik H bölgesi” yer alır (Shishido vd., 2017). G bölgesi, GSH'ın bağlanması için tüm GST ailelerinde korunmuşken, H bölgesi ise çok çeşitli substratların bağlanmasına izin veren “**düşük seçicilikli**” bir özellikte olup GST'den GST'ye bağlanabildiği substrat yelpazesi farklılaşma gösterir (Eaton, D.L. ve ark., 1999; Shean, D. ve ark., 2001).

Monoklorobenzenlerin bir üyesi olarak CDNB, bir C-nitro bileşimidir. GST'ler CDNB substratının klorüne nükleofilik atakla glutatyon konjüge eder, bu nedenle in vitro GST aktivite testlerinde bu bileşik GST enzimlerinin genel substratı olarak kullanılır (Habig et al. 1974).



Şekil 1.2. GST'lerin CDNB substratına GSH ekleyerek detoksifikasyon reaksiyonunu katalizlemesinin şematik gösterimi (Shishido vd., 2017'den türkçeleştirilmiştir). *MRP, ilaç dirençlilik proteinleri.

Tüm GST aile üyelerinin üç boyutlu yapıları atasal tiyoredoksin (thioredoxin) katlanması gösterdiği için tiyoredoksin enziminden evrimleştikleri öne sürülmüştür (Frova, C., 2006). Tiyoredoksin katlanma yapısında; N-terminal domain 4 adet β tabakası ve 3 adet α -sarmaldan oluşurken, C-terminal domaini sadece α -sarmal kıvrımlardan oluşmaktadır (Allocati ve ark., 2018). Bu iki domain 8 amino asitten oluşan serbest bir yapıya sahip bağlantı bölgesi (loop) ile birbirine bağlanır (Polekhina, 2001). Bağlantı bölgesi prolin'ce (Pro) zengindir. Bu bağlantı bölgesi, memelilerin mu alt-sınıfı GST enzimlerinde β -2 ile α -2 arasında yer alan karakteristik yapısı korunmuş bir mu bağlantı bölgesi (loop) şeklindedir (Dirr H. ve ark. 1994; Sheean, D. ve ark. 2001). Yüksek ökaryotlarda mu loop "GDAPDYDRSQ" motifi ile karakterize olup, bu motif *T. thermophila* GST mu enzimlerinde bulunmamaktadır (Üstüntanır Dede & Arslanyolu, 2019). Fare GST M1-1 enziminde mu loop motifi silinmiş ve enzimin çeşitli substratlara olan afinitesi ile katalitik aktivitesi çalışılmış ve mu loop'suz enzimin substratlara karşı olan afinitesi azalırken (yüksek Km değerleriyle), katalitik aktivitesinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir (Hearne ve Colman, 2006).

1.4. Silli Tek Hücreli Ökaryot *Tetrahymena thermophila* GST Ailesi

Nehir ve göl gibi sucul ekosistemlerde bitki gibi çeşitli canlılardan veya fabrikalardan, evsel atıklardan salınan ksenobiyotiklerin biriktiği sistemlerdir. Bu biriken

ksenobiyotikler sucul ortamlarda yaşayan tek hücreli silli protistler ile diğer organizmalar için önemli stres faktörleridir. Ksenobiyotik toksisitesi hakkında sillerde yapılan çalışmalar, esas olarak ağır metal toksisitesi ile ilgili direnç (Gutiérrez ve ark., 2003), hücre büyümesi (Díaz ve ark., 2006; Madoni ve Romeo, 2006), hücresel yapıda değişiklikler (Martín-González ve ark., Trielli ve ark., 2007), doza bağlı enzim aktivitesi ve gen ekspresyonu (Hong ve ark., 2015; Kim ve ark., 2017) konularını kapsar.

Dünyada yaşamın evrimi boyunca, protistler, sürekli değişen çevre şartlarında yaşamalarından dolayı farklı türlerin salgıladığı ksenobiyotiklere doğal olarak maruz kalmış olmalıdırlar. Bu çevresel baskı sonucu; çok hücreli organizmalara kıyasla protistler, tüm detoksifikasyon aşamalarında görev alan düşük substrat seçicili enzim aile üyelerini kodlayan genlerin sayısını arttırarak, hayatta kalmış olmalıdırlar (Trielli ve ark., 2007). Tekhücreli siller için model organizma olan *T. thermophila*'da GST enzim ailesi, TtGSTmu, TtGSTtheta, TtGSTomega, TtGSTzeta, TtMAPEG ve TtEF1G alt-sınıflarıyla günümüze kadar gelmiş ve toplam 70 adet üyeye sahiptir (Üstüntanır Dede & Arslanyolu, 2019). Protistlerin ksenobiyotik metabolizmasında görev alan enzimleri kodlayan genlerin duplikasyonu ve mutasyonları ile farklılaşmasına dayanan bu yüksek kapasiteli gen havuzu, yalnızca hücresel toksik metabolik ara ürünlerinin detoksifikasyonunu değil, aynı zamanda habitatlarına salınan ksenobiyotiklere karşı da evrimleşmiş olmalıdırlar.

T. thermophila, tatlı su göletlerinde yaşayan, insan patojeni olmayan, silli, tek hücreli ökaryotik bir canlıdır. Oldukça ucuz olan besiyerlerinde, 12- 41 °C sıcaklık aralığında, kısa sürede büyük hacimlerde üretilirler. Sistematikte, Ciliata sınıfı Alveolata alt-sınıfında yer alır. Hücre ebatları 40-50 µm uzunluk ve maksimum 20-30 µm genişlikten oluşur. Bu organizmanın çekirdek görevini, çok hücrelilerden farklı olarak aynı sitoplazmada yapı ve görev açısından fiziksel olarak farklılaşmış iki çekirdek üstlenmiştir. Vejetatif yaşam sürecinde transkripsiyonel olarak aktif olmayan mikronukleus (MİK), 2n=10 kromozoma sahiptir ve sadece eşeyli üremede genetik çeşitliliği sağlayan mayoz esnasında görev alır. Transkripsiyonel olarak aktif olan makronukleus (MAK) ise yaşamsal olayları kontrol eder (Asai ve Forney; 2000).

T. thermophila GST'leri üzerine ilk çalışma 1988 yılında yapılmış olup bu organizmanın monomerik bir GST bulundurduğu bildirilmiştir (Overbaugh, J. ve ark. 1988). Bu çalışmada bir adet GST enzimi klasik kromatografik yöntemlerle saflaştırılmış ve enzim aktivitesi tüm GST substratlarına karşı karakterize edilmiştir. Ayrıca saflaştırılan bu enzim bir fungusit olan PCNB'nin (pentakloronitrobenzen)

biyotransformasyonunu sağlayarak, nötralize edebilmiştir. 2008 yılında, *T. thermophila*'nın zeta grubu üyesi genlerinden TtGSTz1, *E. coli*'de histidin takısı ile birlikte rekombinant protein olarak üretilerek, çift afinitik takı olarak kullanılabilirliği raporlanmıştır (Öziç, C., 2008). *T. thermophila* GST'leri ile yapılan bir diğer çalışmada ise TtGST ailesinin tüm üyeleri gen düzeyinde belirlenmiş, motif ve filogenetik analizi, ailenin gen duplikasyonu ile genomik genişlemesi, organizmanın değişik biyolojik safhalarındaki GST enzim düzeyleri ile aktivitesi raporlanmıştır (Üstüntanır Dede ve Arslanyolu, 2019). *T. thermophila* genomunda bulunan olası (putative) bu GST genlerinin kodladığı GST proteinlerinin N-ucu bölgesindeki GSH bağlanma ve C-ucu bölgesindeki substrat bağlanma motifleri ile yapılan biyoinformatik analizler ise GST alt-aile üyeleri arasında daha fazla bir filogenetik ilişki olduğunu ortaya koymuştur. *T. thermophila*'nın toplam çözünür protein özütleri Western blot ile analiz edildiğinde, incelenen tüm yaşam evrelerinde GST enzimlerinin bulunabileceği bildirilmiştir.

1.5. Hipotez ve Amaç

Tetrahymena gibi sucul protistler evrimsel süreçte çeşitli ksenobiyotiklere karşı hayatta kalmak için çeşitli adaptasyon mekanizmaları geliştirmiştir (Bogaerts ve ark, 2001). Sentetik ve toksik ksenobiyotik olan CDNB gibi nitroaromatik bileşikler, diğer organizmalardaki gibi *T. thermophila*'da serbest radikallerin oluşumu ve oksidatif stresi indükleyebileceği; *T. thermophila* GST enzimlerinin ise bu stresi CDNB'ye GSH ekleyerek detoksifiye edip organizmanın hayatta kalmasına yardımcı olacağı tez çalışmasının hipotezini oluşturmaktadır.

CDNB'nin *T. thermophila*'da ölümcül dozu ile yarı ölümcül dozlarının ne olduğunun belirlenmesi, organizmanın vereceği detoksifikasyon cevabında GST'lerin genel olarak enzimatik rolü, GST'ler ile verilen hücresel cevapta görev alan GST'lerin gen ve protein seviyesinde kimliklendirilmesi, bu genlerden en az birinin rekombinant üretilerek CDNB substratına karşı ilgisinin bulunup bulunmadığının enzim kinetik çalışmaları ile ortaya konulması bu tez çalışmasının amacını oluşturmaktadır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Bölüm1- *T. thermophila*'nın CDNB Muamelesi, Detoksifikasyon Cevabı ve Görev Alan GST Enzimlerinin Kimliklendirilmesi

T. thermophila hücrelerinin CDNB ile muamelesi ile toksisitesinin belirlenmesi,

MTT (3- (4,5-dimetil-2-tiazol-2-il)-2,5-difenil-2h-tetrazolium bromür) testi ile gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda hesaplanan LD₅₀ değerinin altında kalan dozlarla muamele edilen hücrelerden izole edilen toplam çözümlü proteinlerin toplam GST aktivite analizi yapıldıktan sonra glutasyon afinite yöntemi ile GST proteinleri saflaştırılıp 2D jel elektroforez analizi ve kontrol grubuna göre farklı bulunan protein spotlarının MALDI-ToF MS/MS ile kimliklendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca görev aldığı kimliklendirilerek belirlenen GST proteinlerini kodlayan genlerin mRNA ekspresyonu Real-Time PCR yöntemi ile analiz edilmiştir.

2.1.1. CDNB toksisitesinin belirlenmesi

Hücre canlılık testi daha önce *Tetrahymena* için yayınlanan MTT protokolünde küçük değişiklikler yapılarak kullanılmıştır (Zilberg ve Sinai, 2006). MTT testi metabolik olarak aktif olan (canlı) hücrelerde sarı renkli tetrazolium tuzunun mor renkli formozan kristallerine mitokondride redüksiyonu ile renk değişimine bağlı (kolorimetrik) canlılık tayini yapar.

Tez çalışmasında kullanılan *Tetrahymena thermophila SB210* hücreleri Cornell Üniversitesi *Tetrahymena* Stok Merkezi'nden (*Tetrahymena* Stock Center Cornell University, <https://tetrahymena.vet.cornell.edu/index.php>) tedarik edilmiştir.

CDNB ana stoğu; X mg tartılarak yaklaşık 50 µl %96'lık etanolde çözülerek hazırlanmış sonrasında kullanılan doz konsantrasyonları distile su ile bu ana stoktan dilüe edilerek hazırlanmıştır.

Hücreler, Proteose Peptone Yeast Extract (%2 proteaz pepton, %0,1 maya ekstratı 33 µM FeCl₂.6H₂O) besiyeri içeren petrilere (Isolab Cat.no: I.081.02.091, 90x17mm), 30±1°C etüvde, nem çemberi ortamında kültüre edilmişlerdir (Gaertig ve Gorovsky, 1992). Hücrelerin senkronizasyonu sabit faz senkronizasyon protokolünde yapılan küçük modifikasyonlarla gerçekleştirilmiştir (Murata-Hori ve Fujishima, 1996). Senkronizasyon için logaritmik fazdaki hücreler 3 kere açlık tamponuyla (0.6 g KH₂PO₄, 0.15 g K₂HPO₄ ve 0.25 g MgSO₄ 1 L'de çözülmüş pH 6.5'a NaOH ile ayarlanmıştır) yıkanmıştır. Her bir yıkama aşaması 5900 g'de 3 dak. santrifüjlerle gerçekleştirilmiştir. Sonrasında hücreler 2x10⁶ hücre/ml konsantrasyonuna yine açlık tamponu kullanılarak ayarlanmıştır. 24 saat açlık tamponuyla inkübe edilen hücreler 2xPPY besiyeriyle (açlık tamponuyla eşit hacimde) karıştırılarak PPY konsantrasyonu 1x'e indirilmiştir. Hücreler tekrar santrifüj edilip 1.200.000 hücre/ml konsantrasyonuna getirilmiş ve steril petri kaplarına 20'şer ml eklenmiştir. Hücrelerin üzerlerine D1: 0,018 mM, D2: 0,036 mM,

D3: 0,072 mM, D4: 0,109 mM, D5: 0,145 mM, D6: 0,210 mM final konsantrasyonda olacak şekilde CDNB eklenmiştir. Hücrelerin inkübasyonu, 9 saat boyunca nem çemberinde 30°C hibridizasyon fırınında çalkalamaksızın gerçekleştirilmiştir. Farklı dozlarla muamele edilen petri tabaklarından 3 saatte bir 110 µl hücre alınarak, 8 farklı 96 kuyucuklu Elisa petrisine (İsolab; Kat No: 122.11.096) aktarılmıştır. 96 kuyucuklu Elisa petrisinde bulunan hücre örnekleri üzerine MTT stoğundan (10 mg/ml, Sigma M2003) 10 µl eklenmiş, tabağın üzeri folyo ile kaplanıp ve hibridizasyon fırınında 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan formozan kristallerini çözmek için DMSO solüsyonundan kuyulara 120 µl eklenmiş ve 30 dakika karanlık ortamda bekletilmiştir. Elisa petri tabakları, süre sonunda 570 nm'de Elisa Reader (SpectraMax Plus384 Absorbance Microplate Reader) cihazında okutulmuştur.

2.1.2. Toplam çözümlü protein izolasyonu

Toplam protein izolasyonu 2×10^6 hücre için 3ml modifiye T100B liziz tamponu (%1 Triton X-100, 300 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl, pH 7.5, 2 mM PMSF ve proteaz inhibitör kokteyli- Roche, Cat No: 4693159001) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve detayları EK1'de verilmiştir (Aslan ve Arslanyolu, 2015; Zhang ve Thompson, 1997). Protein izolatlarının miktar tayinleri ise Bradford solüsyonu (Thermo Scientific, Cat No: 23200) ile gerçekleştirilmiştir.

2.1.3. GST enzim aktivitesi testi

CDNB ile muamele edilmiş hücrelerden elde edilen proteinlerin GST aktivite testi daha önce yayınlanan protokolda küçük değişikliklerle spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir (Habig ve ark., 1974). Kısaca 96 kuyucuklu Elisa petrilere (İsolab; Kat No: 122.11.096) 20 µl protein örneği ve 180 µl test tamponu (PBS pH 6.5, 10 mM CDNB, and 10 mM reduced Glutathione) eklenip enzim aktivitesi için BioTek The Synergy™ HT Elisa Reader- Epoch 2 cihazının kinetik programı ile 1'er dk. aralıklarla 20 dk. boyunca 340 nm'de O.D'ler okunmuştur. $\Delta A_{340}/\text{dakika}$ 'yı hesaplamak için zamana bağlı absorbans değişimi grafiği çizilip eğim hesaplanmış ve bu eğimin formülü kullanılmıştır. Aktivitenin ünite cinsinden değeri, 25°C'de 1 µmol substratı kataliz eden enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (CDNB extinction coefficient 340 nm = $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Öncelikle U/ml cinsinden hesaplanan aktiviteler sonrasında her bir örneğin Bradford yöntemi (Pierce™ Coomassie Plus Bradford Assay Reagent Cat no: 23238) ile tayin edilen protein konsantrasyonlarına bölünerek U/mg cinsinden spesifik aktiviteleri hesaplanmıştır.

2.1.4. GSH affinitesi ile GST enzimlerinin saflaştırılması ve SDS-PAGE analizleri

CDNB'nin 0.018, 0.036 ve 0.072 mM dozları ile 9 saat muamele edilen hücrelerden elde edilen toplam çözünür protein izolatlarından *T. thermophila* sitoplazmik toplam GST proteinleri, Glutathione Sepharose™ 4B (Cat No: GE17-0756-01) boncuklarıyla firmanın talimatlarına göre kullanılarak gerçekleştirilmiştir (EK1). Glutatyona bağlanmış GST proteinleri 300 µl elüsyon tamponu (5 mM Glutasyon, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) ile 3 kere elüe edilmiştir. Glutasyon affinite boncuklarıyla saflaştırılan proteinler, 3,5 µg protein içeren hacimde %12,5'lük SDS-PAGE jeline (Laemmli ve ark., 1970) yüklenmiş ve 200 Volt'ta 2 saat elektroforez yapıldıktan sonra jel Comassie Brilliant Blue (Page Blue- Cat No:24620 boyası) ile boyanmıştır. Yürütülen SDS-PAGE jeli BIO-RAD GelDoc™EZ görüntüleme sisteminde analiz edilmiştir.

2.1.5. 2D Jel elektroforezi ve MALDI-TOF MS ile protein kimliklendirme

2D-jel elektroforezi, jel analizi, spot kesimi ve proteinlerin MALDI-TOF MS ile kimliklendirilmesi Kocaeli Üniversitesi, DEKART proteomics laboratuvarında gerçekleştirilmiştir (<http://kabiproteomics.kocaeli.edu.tr/>).

2D-jel elektroforezi ReadyPrep 2-D Starter Kiti (Cat No: 163-2130) ve 17 cm Nonlinear Stripler (pI 3.0-10.0) (Bio-Rad Laboratories) kullanılarak, firmanın tavsiye ettiği protokolde bazı değişiklikler ile gerçekleştirilmiştir (Akpınar ve ark., 2017). Protein örneğinin 10 µg'ı striplere emdirilmiş ve izoelektrik odaklama cihazında (Biorad, Cat No: Protean IEF Cell 1654001) stripler yürütülmüştür. Fokuslama 50 Volt ile başlatılmış sonrasında lineer olarak artırılarak 50.000 Volta çıkartılarak, toplamda 5 saat süresince gerçekleştirilmiştir. İşlem sonunda stripler dengeleme tamponları (Equilibration buffer 1 ve 2) ile muamele edildikten sonra hazırlanan %12'lik SDS-PAGE jelinin üst kısmına yerleştirilmiş, önce 60 Voltta 1 saat, sonrasında da 180 Voltta 1 saat yürütülmüştür. Coomassie boyasıyla boyanan protein jellerindeki spotlar PDQuest Advance 2DE-analiz yazılımı (BioRad, USA) kullanılarak, kontrol ve diğer deney grupları ile karşılaştırılmıştır. Yazılımın spotlara numara verme prensibi; spotların pI değerleri, moleküler ağırlıkları, spotların birbirlerine olan uzaklıkları ve jeldeki konumlarına göre olup, farklı jellerde aynı olan proteinlere aynı SSP numaraları verilmiştir.

2.1.5.1. Protein spot kesimi

Tüm jellerin spot içermeyen dış kenarları, PDQuest Advance yazılımı kullanılarak aynı şekilde kesilip, jeldeki boya lekeleri filtrelenmiş ve tüm jellerin hedef alanları eşleştirilmiştir. Her bir spotun miktarı, toplam geçerli spot yoğunluğu ile normalize edilmiştir. Otomatik analiz, normalize edilmiş alandaki spot sayısı ve hacimleri ile yapılmıştır. Kontrol jeline (CDNB ile muamele edilmemiş Tetrahymena hücrelerinin GST proteinlerini içeren) göre ekspresyonu artmış (hacimsel olarak) ya da kontrol jeline bulunmayıp doz muamele jellerinde tespit edilen spotlar (Tablo 3.1) ExQuest spot kesicisi ile kesilip 96 kuyucuklu petrilere ayrı ayrı aktarılmıştır.

2.1.5.2. Tripsinleme ve MALDI TOF MS analizi ile proteinlerin kimliklendirilmesi

Proteinlerin kimliklendirilmesi MALDI-TOF/TOF ile yapılmıştır (ABSCIEX 5800 system). Protein spotlarından tripsin kesimi ile peptitlerinin eldesi In-Gel Tryptic Digestion (Thermo Cat no:89871) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kit'te TCEP (Tris [2-carboxyethyl] phosphine) ve IAA (Iodoacetamide) kullanarak, sistin aminoasidi kalıntılarının redüksiyonu ve alkilasyonu vasıtasıyla disülfid bağı oluşumu ya da yan zincir modifikasyonlarını minimize edilmesi ve böylece bilinmeyen kütlelerin (masses) MS analizinde ortaya çıkması engellendiği için kesim öncesi bu iki madde ile spotlar muamele edilmiştir. Kitte tavsiye edilen tüm adımlar herhangi bir değişiklik yapılmaksızın uygulanmıştır. Sonrasında örnekler ZipTip C18 (Millipore Cat No: Z720070) resinleri kullanılarak tuzdan uzaklaştırılmış ve konsantre edilmiştir. Resinlerden peptitler, α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid çözeltisi (%50 asetonitril ve %0,1 trifloroasetik asit içeren) ile elüe edilerek, MALDI plakası üzerine aktarılmıştır. AB Sciex 5800 MALDI TOF/TOF cihazında spotların okuması gerçekleştirilerek protein kütle parmak izleri elde edilmiştir. Kütle aralığı 400 ila 2000 Da olan TOF spektrumları pozitif iyon reflektör modunda kaydedilmiştir. Spektrumlar, dahili standartlar olarak tripsin oto-sindirim iyon piklerinin m/z (842.510 ve 2211.1046) değerleri ile kalibre edilmiştir. Toplam 8 spottan elde edilen peptid kütle büyüklükleri biyoinformatik MASCOT programı ile analiz edilmiştir. MASCOT programının analizde kullanacağı protein kütüphanesi, tüm Tetrahymena proteomunda bulunan proteinler ile yaklaşık olarak (Swissprot veritabanından manuel olarak çekilen) 16 milyon protein karıştırılarak tarafımızdan hazırlanmıştır. Ayrıca peptid kütle parmak izleri (PMF-Peptide mass fingerprinting) ProteinPilot (ABSCIEX, ABD) yazılımı kullanılarak Matrix Science'da National Center for Biotechnology Information nonredundant (NCBIInr) ve Tetrahymena

thermophila ile tür kısıtlaması, tripsin enzimi kesimi, sabit modifikasyon karbamidometil (Cys) ve değişken modifikasyon (Met) oksidasyonu, 1+ peptit yükü ve monoizotopik olma kriterlerine göre aranmıştır. MS / MS analizi için örnek başına TOF spektrasının en güçlü piklerinden on tanesi dikkate alınarak analizler gerçekleştirilmiştir.

2.1.6. RNA izolasyonu ve Real-Time PCR

Qiagen RNeasy kiti (Cat No: 74104) kullanılarak toplam RNA saflaştırılmış ve RNaz içermeyen DNaz I enzimi (Promega, Kat. No: M6101) ile muamele edilmiştir. Toplam RNA izolatlarının miktarı, Thermo Scientific™ Nanodrop 2000 Spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. GST genlerine özgü primer çifti ve Taqman® prob setleri, Primer Express 2.0 yazılımı kullanılarak tasarlanmıştır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. *TtGST* genlerinin tasarlanan primer çiftleri ve Taqman® propları

Gen Adı	Primer Seti	Dizi (5' > 3')	Ürün (bp)
TtGSTm13 EAR90276.1*	Forward primer	TGCCGATATCTATGCTTACGTCT	117
	Reverse Primer	TTGGGGATGCTTTCGAAGTTTT	
	Internal oligo (prop)	CCTGAAGCCTACGCCGAATTTGCTGC	
TtGSTm19 EAS07384.1*	Forward primer	TGGCTGATAAAAATTGTTCTTGG	128
	Reverse Primer	TCCAAACCAATCAGCAGGAT	
	Internal oligo	GGGCTGGTCTGGTAAGGCTCAA	
TtGSTm34 EAR99884.2*	Forward primer	TGGCTCAACCTATCCGTTTC	127
	Reverse Primer	GGAATGTTGGGGAAGTCAAA	
	Internal oligo	ACGCCAATCCTGAAGAATGGTTCG	
TtGSTm49 EAR86862.1*	Forward primer	CAGAGTCAGATGCAATAGCTCAA	150
	Reverse Primer	GGCTATAAGCAAGCTGTCCAA	
	Internal oligo	TGGCACAACCATTGAGGACAGAATCA	

*GeneBank Erişim numaraları.

Brilliant III Ultra-Fast QRT-PCR Master Mix (Agilent, Cat No:600885) ile tek-basamaklı Real-Time PCR gerçekleştirilmiştir (EK1). Tek-Basamaklı kit reaksiyonunda hem Reverse Transcriptase enzimini hem de Taq Polimeraz enzimi içermesinden dolayı aynı PCR tüpünde önce toplam RNA'dan RT-PCR reaksiyonu ile cDNA elde edilir, sonra üretilen bu cDNA PCR aşamasında kalıp görevi görerek, Real-Time PCR tamamlanmış olur. Real-Time PCR'lar Biorad CFX96 cihazı ve yazılımı kullanılarak üç tekrarlı yapılmıştır. Kalıp (RNA) veya Reverse Transcriptase enzimi içermeyen kontrol reaksiyonları her deney seti için kurulmuştur. Real-time PCR analizinde Taqman prop kullanımı ile ilgilenilen genin kopya sayısının rakamsal değerlerle ifade edilen

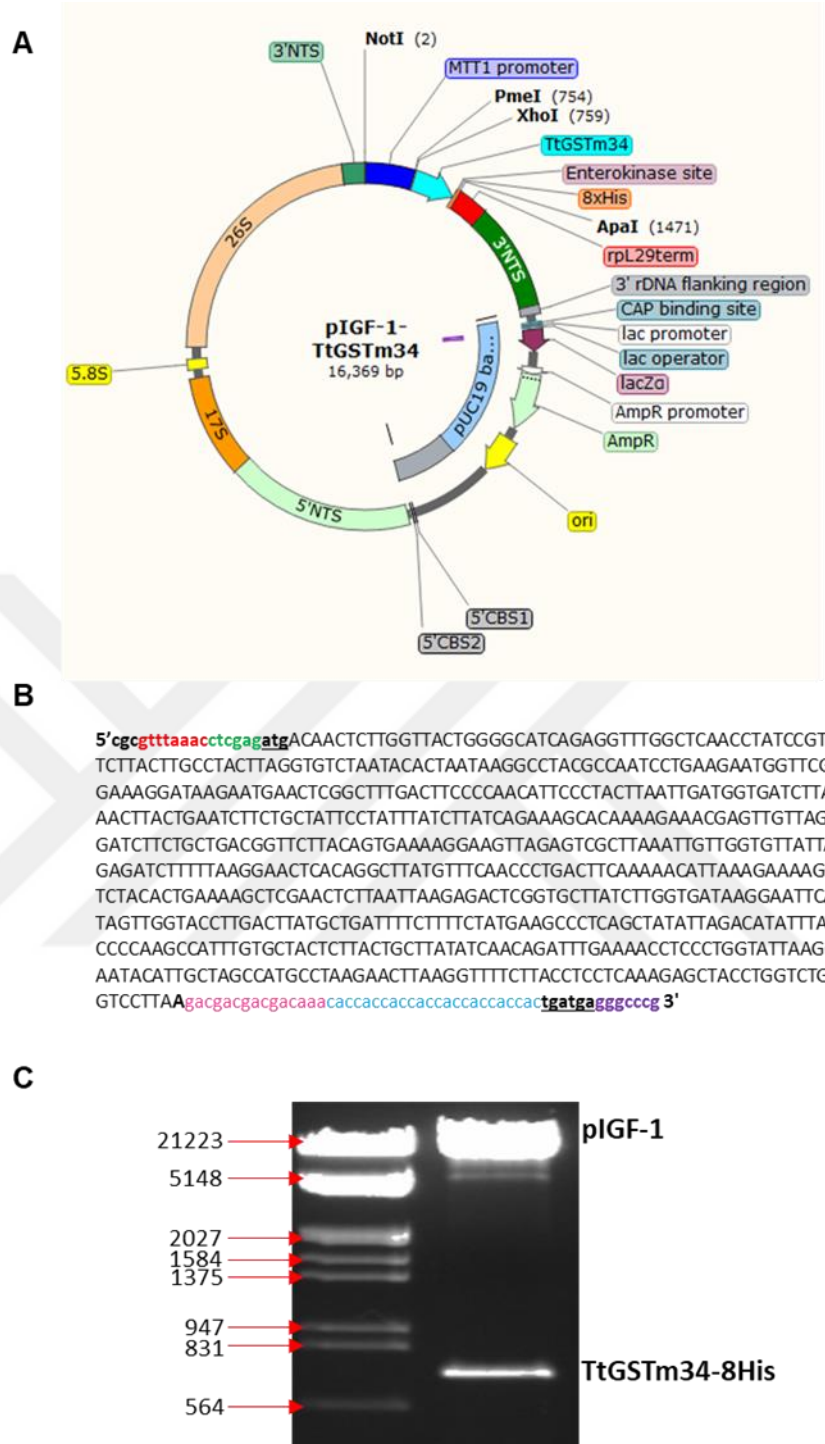
kantifikasyon yöntemlerinden ‘Absolute Quantification’ yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde genlerin mRNA ifadesinin kopya sayısının belirlenebilmesi için kopya sayılarının bir standart eğrisine ihtiyaç duyulur. Bu standart eğri ilgilenilen klonlanmış geni içeren bir plasmitten PCR ürünleri üretilerek oluşturulmuştur. Bu PCR ürünleri ve verilen formül kullanılarak standart olarak belirlenen bu ürünün kopya sayısı belirlenmiştir. $Kopya\ sayısı = PCR\ ürününün\ konsantrasyonu\ (ng) \times 6.022 \times 10^{23} (Avogadro\ sayısı) / PCR\ ürününün\ büyüklüğü\ (bp) \times 1 \times 10^9 (nanogramı\ grama\ çevirmek\ için\ kullanılan\ katsayı) \times 660 (1\ baz\ çiftlik\ çift\ zincirli\ DNA'nın\ ortalama\ moleküler\ ağırlığı-gram).$

2.2. Bölüm 2- *T. thermophila* Glutathione-S-transferaz mu 34 Geninin Protein Kodlayan Bölgesinin Klonlanması, Rekombinant Protein Üretimi ve Enzimatik Karakterizasyonu

Protein kimliklendirme çalışmaları içeren 1. Bölüm sonucunda elde edilen *T. thermophila* glutathione-S-transferase mu 34 geninin (TtGSTm34) protein kodlayıcı cDNA dizi bölgesinin klonlanması, aynı organizmada homolog rekombinant protein üretimi ve enzimatik karakterizasyonu aşağıda verilen adımlarla gerçekleştirilmiştir.

2.2.1. TtGSTm34 geninin rekombinant protein üretim vektörü pIGF-1'e klonlanması ve *T. thermophila* hücrelerine elektroporasyon ile transformasyonu

TtGSTm34 geninin TGD (Tetrahymena Genome Database) veritabanında bulunan protein kodlayıcı gen dizisi (GenBank Accession number: TTHERM_00661650) ve proteinin aminoasit dizisi EK2’de verilmiştir. pIGF-1-GSTm34 vektöründe (Şekil 2.1-A) TtGSTm34 geninin cDNA ORF’si Şekil 2.1-B’de verilen restriksiyon enzimleri, enterokinaz ve 8XHis afinitik takısının eklenmesiyle oluşturulan rekombinant bir DNA dizisi (726 bç) şeklinde PmeI ve ApaI arasına klonlanacak şekilde tasarlanmıştır.



Şekil 2.1. *pIGF-1-TtGSTm34* vektör tasarımı ve yapılandırılması. **A.** *pIGF-1-GFP* vektörünün *GFP* kodlayan dizisinin çıkarılması ve yerine *TtGSTm34-8xHis* eklenmesiyle oluşturulmuştur. **B.** Rekombinant *TtGSTm34-8XHis* DNA dizisi. Kodon optimizasyonuna nadir kullanılan (rare) kodon içermemesinden dolayı gerek duyulmamıştır. Protein kodlayıcı bölgesinin translasyon başlatma (*atg*) ve sonlandırma (*tgatga*) kodonları kalın ve altı çizili olarak verilmiştir. *PmeI* kesim bölgesi kırmızı; *8X His* takısı mavi, Enterokinaz kesim bölgesi koyu pembe; *XhoI* kesim bölgesi yeşil; *ApaI* kesim bölgesi ise mor ile verilmiştir. **C.** *pIGF-1-GSTmu34* vektörünün *PmeI*

saptanmış (EK1), pozitif kolonilerden izole edilen plazmitler restriksiyon enzim (Pme1-Apa1) kesimi ile teyit edilmiştir (Şekil 2.1-C). Kadmiyum ile indüklenebilir MTT1-TtGSTm34-8xHis-rpl29 gen kasetini taşıyan yapılandırılmış vektör, pIGF-1-GSTm34 (21.625 bp) olarak adlandırılmıştır.

2.2.2. Tetrahymena hücrelerine elektroporasyon yöntemi ile transformasyon ve antibiyotik seçilimi

Sıvı azottan taze uyandırılan ve konjugatif hale getirilen Tetrahymena B2086-CU428 hücrelerine, BioRad Gene Pulser cihazı ile pIGF-1-GSTm34 vektörü elektroporasyon yöntemi ile transform edilmiştir. Tetrahymena hücrelerine J. Gaertig ve M. A. Gorovsky'nin elektroporasyon ile transformasyon yöntemi kısmen modifiye edilerek (EK1) kullanılmıştır (Barchetta ve ark., 2008; Gaertig ve Gorovsky, 1992; Yılmaz ve Arslanyolu, 2015). Pozitif transformant hücreler, 5 ml 250 µg / ml Penisilin-Streptomisin (Pen-Strep) içeren SPP besiyerine aktarılmıştır. 12-24 saatlik inkübasyondan sonra transformant hücreler artan konsantrasyonlarda paramomisin baskısına alınmıştır (ilk gün 60 µg / ml, üçüncü gün 100 µg / ml ve beşinci gün 120 µg / ml paramomisin).

2.2.3. Transformant hücrelerin CdCl₂ ile indüksiyonu

Transformant hücreler, finalde 5µg/ml olacak şekilde CdCl₂ (Sigma, 439800) ile 36 saat boyunca indüklenmiş ve zaman zaman örnek toplanarak toplam protein izolasyonu 2.1.2'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. İzolatlar daha sonra %12,5'lik SDS-PAGE jellerine eşit gram (40 µg) miktarlarda yüklenerek analiz edilmiştir.

2.2.4. Toplam protein lizatından Ni-NTA boncukları ile GSTm34-8xHis'in saflaştırılması

Transformant hücrelerin 30 saat kadmiyum indüksiyonuna takiben hücrelerden toplam protein izolasyonu (2.1.2'de anlatıldığı gibi) gerçekleştirilmiştir. TtGSTm34 geninin C terminalinde bulunan 8X histidin takısı kullanılarak toplam proteinlerden Ni-NTA boncukları (Cat No:745400.25, Protino Ni-NTA Agarose) ile afinitik protein izolasyonu yapılmış (EK1), izolasyonun her aşamasında toplanan örnekler SDS-PAGE jeline yüklenmiştir. Boncuklar 3 kez 20 mM imidazol içeren yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra 250 mM İmidazol içeren Elüsyon tamponu ile 3 kez elüe edilmiştir.

2.2.5. pIGF-1-TtGSTm34 vektörü içeren transformant hücrelerinden GSH afinitik boncukları ile TtGSTm34-8xHis'in saflaştırılması ve Western-Blot analizi

TtGSTm34-8xHis proteinin glutatyona affinitesinin belirlenebilmesi için transformant hücrelerden elde edilen toplam proteinler, GSH Sepharose 4B boncukları (GE Healthcare Cat No: 52-2303-00 AK) ile saflaştırılmıştır. GSH Sepharose 4B boncukları ile saflaştırmada bağlanma tamponu olarak PBS pH 7.3 (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.3) kullanılmış ve elüsyon tamponu olarak ise 50 mM Tris-HCl, 10 mM reduced glutathione, pH 8.0 kullanılmıştır. Toplam çözünür proteinler, bağlanmayan proteinler, yıkama ile uzaklaşan proteinler ve son elüsyonlar %12,5'lik SDS-PAGE jeline yüklendikten sonra anti-6Xhistidin antikoru (Cat No: 200-301-382S, Rockland) kullanılarak Western Blot analizi yapılmıştır. İkincil antikor olarak ise keçi'de üretilmiş anti-fare IgG -HRP poliklonal antikoru (GenScript, Cat no: A00160) kullanılmıştır.

2.2.6. TtGSTm34-8xHis proteininin affinitik Ni-NTA ve GSH boncukları ile ardışık saflaştırılması

TtGSTm34-8xHis proteininin Ni-NTA boncukları ile saflaştırılması sonrası elüsyon kuyularında rekombinant protein haricinde görülen proteinlerin varlığı ikinci bir takı ile saflaştırma gerektirmiştir. Bunun için; Ni-NTA boncukları ile yapılan saflaştırma sonrası elde edilen elüsyon tüpleri bir araya getirilip (toplam hacim 60 ml) öncelikli olarak elüsyon tamponunda bulunan İmidazol'ün uzaklaştırılması için Ultrafiltrasyon (Amicon® Ultra-15 10K, cut-off 10kDa, Millipore Cat No: UFC901008) yöntemi ile tampon değiştirilmiştir. Ultrafiltrasyon tüplerinin kapasiteleri 15 ml olduğundan aynı tüpte 4 kez santrifüj yapılmıştır. Böylece sonraki aşama olan GSH boncukları ile saflaştırmada rekombinant proteinin GSH boncuklarına bağlanmasında imidazolün negatif etkisi bertaraf edilmiştir. Ultrafiltrasyon sonrası filtrede toplanan proteinlerden GSH boncukları ile ikinci bir afinitik saflaştırma gerçekleştirilmiş olup son Elüsyon aşaması iki kez yapılmıştır. Rekombinant TtGSTm34 proteininin hem Ni-NTA hem de GSH boncukları ile saflaştırılmasında elde edilen proteinler %12,5'lik SDS-PAGE jeline yüklenerek analiz edilmiştir.

2.2.7. Rekombinant TtGSTm34 proteininin enzimatik karakterizasyonu

Rekombinant TtGSTm34 enziminin optimum pH'sı, iyonik şiddeti ve sıcaklığı belirlenmiş, sonrasında ise K_m , V_{max} , K_{cat} ve K_{cat}/K_m değerleri hesaplanmıştır. Bu deneyler esnasında enzim aktivite ölçümleri 2.1.3'te anlatıldığı gibi yapılmıştır.

2.2.7.1. Optimum pH'ın belirlenmesi

Rekombinant TtGSTm34 enziminin optimum pH'sını belirlemek için pH'sı 5,0, 5,5 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 olan 0,1M potasyum fosfat tamponları ile pH'sı 8,0, 8,5, 9,0 ve 10 olan 0,1 M Tris-HCl tamponları hazırlanmıştır. Aktivite ölçümünde 2.1.3'te kullanılan test tamponundaki PBS yerine fosfat ve Tris-HCl tamponları kullanılmıştır.

2.2.7.2. Optimum iyonik şiddetin belirlenmesi

Rekombinant TtGSTm34-8xHis enziminin optimum aktivite gösterdiği iyonik şiddetin belirlenmesi için yine 2.1.3'te kullanılan test tamponundaki PBS yerine 0.00625 M, 0.0125 M, 0.025 M, 0.05 M, 0.1 M, 0.15 M, 0.2 M ve 0.3 M'lık hazırlanan potasyum fosfat tamponları kullanılmıştır. Bu çözeltilerin pH değerleri bir önceki deney sonucunda bulunan optimum pH 7,0'ye ayarlanarak aktivite ölçümleri yapılmıştır.

2.2.7.3. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Rekombinant TtGSTm34-8xHis enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın belirlenmesi için önceki deneylerde belirlenen koşullarda (0,2M potasyum fosfat tampon, pH:7.0) aktivite ölçümü için gerekli olan kofaktör ve substratları (finalde 1'er mM CDNB ve GSH) ihtiva eden karışım, Elisa petri kuyusu içerisinde istenilen sıcaklığa ayarlanmış olan su banyosunda 5'er dakika bekletilmiştir. İstenilen sıcaklığa ulaşan karışıma enzim pipetlenerek karıştırılıp hemen okuma yapılmıştır. 5°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 50°C ve 60°C'de aktivite ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

2.2.7.4. TtGSTm34 enziminin GSH ve CDNB substratları için K_m , V_{max} , K_{cat} ve özgülük sabitinin (K_{cat}/K_m) belirlenmesi

Glutasyon S-transferaz enziminin GSH ve CDNB substratları için K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver ve Burk (1934) metodunda bazı değişiklikler yaparak tespit edilmiştir. Bunun için reaksiyonda; finalde 0,9 mM sabit GSH konsantrasyonunda 7 farklı

CDNB konsantrasyonu (0.1125 mM, 0.225mM, 0.5 mM, 0.9 mM, 1.8 mM, 2.7mM ve 3.6 mM) ile 200 mM potasyum fosfat tamponunda 25°C’de aktivite ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen bulgulara göre $1/V^{-1}[\text{CDNB}]$ Lineweaver-Burk grafiği çizilmiş, bu grafik yardımı ile CDNB için K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Çizilen grafiğin $y=ax+b$ formülü, eğimde bulunduktan sonra V_{max} değeri $1/b$ ’den elde edilir. K_m ise; $K_m = ax V_{max}$ formülünden hesaplanır. Yine benzer şekilde 0,9 mM sabit CDNB konsantrasyonunda GSH’ın 7 farklı konsantrasyonu (0.1125 mM, 0.225 mM, 0.5 mM, 0.9 mM, 1.8 mM, 2.7 mM ve 3.6 mM) ile aynı şartlarda aktivite ölçümleri yapılarak, $1/V^{-1}[\text{GSH}]$ grafiği çizilmiştir. Bu grafikten ise GSH için K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. Tüm aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, K_m ve V_{max} değerleri hesaplanabilmesi için gerçekleştirilen deneyde kullanılan enzim çözeltisi içinde toplam enzim (E_t) miktarı, kantitatif (Bradford) protein tayin yöntemi ile belirlenmiştir. Enzimin turnover sayısını ifade eden K_{cat} değeri ise $K_{cat} = V_{max}/E_t$ formüyle hesaplanmıştır.

Çeşitli enzimlerin katalitik etkilerinin veya farklı substratların aynı enzimle ürüne dönüşümünün karşılaştırılmasının bir yolu da tepkimeler için özgülük sabitinin (V_0) bulunmasıdır. Özgülük sabiti $V_0 = K_{cat}/K_m$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

2.2.7.5. Enzim inhibisyonu

TtGSTm34-8xHis enziminin *in vitro* inhibisyon deneyleri, Trute ve ark., (2007) makalesindeki metotta bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. 96 kuyucuklu petrilere öncelikle 20 µl enzim konulup üzerine inhibitörleri içeren 0,2 M potasyum fosfat tamponu eklenmiş ve 15 dakika inhibitör ile enzim 25°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 80 µl 0,2M potasyum tamponu (1 mM CDNB ve 1 mM GSH içeren) ilave edilip hemen reaksiyon başlatılmış, 340 nm’de 2.1.3’te anlatıldığı gibi OD okumaları yapılarak aktiviteleri ölçülmüştür. İnhibitörler ve final konsantrasyonları; ağır metal olarak CuSO_4 (1 µM, 3 µM, 6.25 µM, 12.5 µM, 25 µM ve 50µM) ve CdCl_2 (0.1 µM, 0.5 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM ve 15 µM) ile genel inhibitör Etakrinik asit (0.001 mM, 0.01 mM, 0.1 mM ve 1 mM)’tir. Pozitif kontrol olarak rekombinant enzim, inhibitör içermeyen 200 mM potasyum fosfat tamponunda inkübe edilmiş ve sonraki aşamalar inhibitör gruplarında olduğu gibi gerçekleştirilmiştir.

2.2.7.6. Enzim kararlılık testi

TtGSTm34-8xHis enzim aktivitesinin zamana ve sıcaklığa bağılı olarak değişimi, optimum GST reaksiyon şartlarında 25°C’de, pH:7.0’de ve 200 mM potasyum fosfat tamponunda araştırılmıştır. Zamana ve sıcaklığa bağılı olarak aktivite değişim takibi; enzim elde edildikten sonra 2 gün oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 10 gün +4°C buzdolabında, 6 ay ve 12 ay -20°C derin dondurucuda muhafaza edildikten sonra aktivite ölçümlerinin tekrarlanması ile gerçekleştirilmiştir.

2.2.8. TtGSTm34 proteininin 3 boyutlu modellemesi

Proteinin  boyutlu modellemesi için öncelikle kristallografisi bitmiş ve proteinimize en yüksek benzerlik gösterebilecek bir hedef protein modeli, expasy.org’da Swiss-Model programında aramayla başlandı. TtGSTm34’n aminoait dizisinin bulucu olarak gönderildiği programda en yüksek dizi benzerliği (%41.03) *Mus musculus*’a ait GSTMu7 proteini bulunmuş olup Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/structure/2dc5>) veri tabanında 2dc5 pdb numarasıyla kayıtlıdır. TtGSTm34’nin 2dc5’ye göre homoloji modellemesi ve izimi BIOVIA tarafından geliştirilmiş “Discovery Studio 2021” yazılımı kullanılarak yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Bölüm 1- CDNB Substratı ile Muamelesine Karşı *T. thermophila*'nın Biyolojik Cevabının Karakterizasyonu, Moleküler Analizi

CDNB ile muamele edilen *Tetrahymena* hücrelerinin toksisite ve total GST aktivite analizleri, hayatta kalabildiği dozlarda bulunan TtGST proteinlerinin kimliklendirilmesi ile belirlenen TtGST genlerinin transkriptomik analiz bulguları, bu bölüm altında tanımlanmıştır.

3.1.1. CDNB'nin *Tetrahymena* hücrelerinde toksisitesinin belirlenmesi

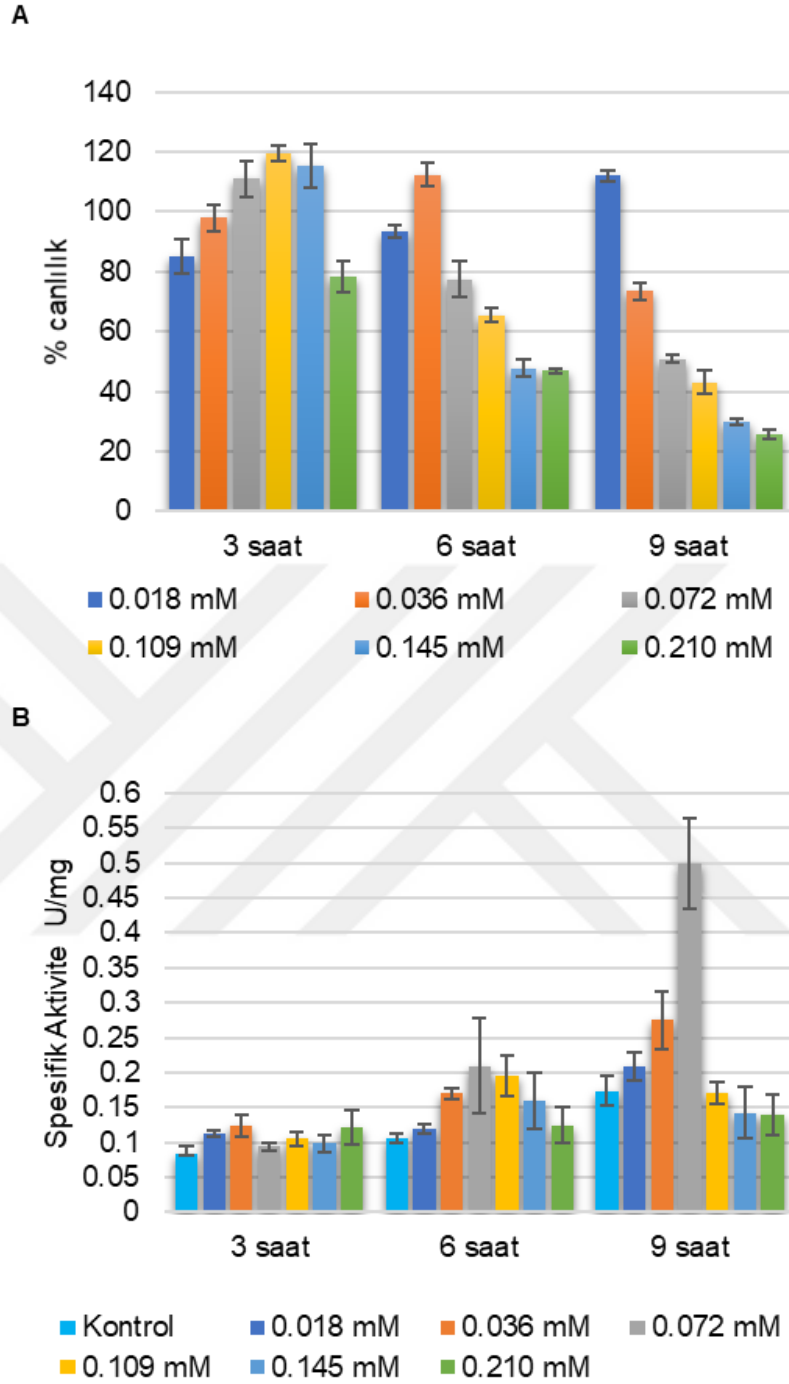
GST enzimlerinin bir substratı olan CDNB, sentetik üretildiği için doğada bulunmaz ve *T. thermophila* dahil bazı organizmalar üzerindeki biyolojik etkisi bilinmemektedir. Bu nedenle; 0.018 mM ila 0.210 mM aralığında CDNB'nin farklı dozları ile *T. thermophila* hücreleri 9 saat boyunca muamele edilmiş, böylece bu moleküle karşı organizmanın duyarlılığı ve hayatta kalma dinamikleri incelenmiştir (Şekil 3.1-A). Kontrol hücresinin canlılık değerinin (%100) altında kalan değerler doza bağlı toksisiteyi temsil ederken; üstünde olan değerler ise biyolojik mukavemet (detoksifikasyon mekanizmalarının devreye girdiğini) değerlerine karşılık geldiği varsayılmıştır. *Tetrahymena* hücrelerinin senkronize edildikten sonra her 4.5 saatte bir bölüdüğü daha önceden laboratuvarımızda yapılan çalışmalarla saptanmıştır. Şekil 3.1-A'da, 3 saatlik CDNB maruziyetinin hücre canlılığı üzerine istatistiksel olarak önemli bir etkisi görülmemiştir. Örneğin 0.109 mM'da hücre canlılığında yaklaşık %20 artış görülürken, 0.018 mM ve 0.210 mM dozlarında %20'lik bir azalma görülmüştür. 6. saat muamele grubuna bakıldığında canlılık son 4 dozda 3. saate kıyasla düşmüştür; 9. saat muamele edilen hücre grubunda ise 0.018 mM doz hariç tüm diğer dozlarda diğer saatlere kıyasla canlılığın %20'lere kadar düştüğü görülmüştür. Kontrole göre hücre canlılıklarında önemli miktardaki artış 9 saatlik muamelede 0.018 mM doz grubunda bulunmuştur. En yüksek dozun hücre canlılığını %20'lere kadar düşürdüğü 9 saatlik muamele hücre grubunda gözlemlenmesinden dolayı LD₅₀ dozu Miller ve Tainter (1944)'e göre bu grubun MTT test verileri kullanılarak hesaplanmıştır. CDNB ile muamele edilmiş *T. thermophila* hücrelerinde CDNB'nin LD₅₀ değeri 0.079 mM bulunmuş olup CDNB muamelesinin doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı sonucuna varılmıştır.

Hücre canlılığının korunmasında glutatyonun okside ve redükte formunun denge içinde bulunması oldukça kritiktir. CDNB gibi glutatyona afinitesi olan bileşikler hücre içinde glutatyon tükenmesine (GSH Depletion) neden olarak da oksidatif stresi indükleyebilirler (Mutoh et al., 2005).

CDNB'nin *T. thermophila*'da oksidatif strese neden olup olmadığını anlamak için, CDNB ile muamele edilen hücrelerin GST enzim aktivitesi, zamana bağlı olarak 3., 6. ve 9. saatte (yaklaşık iki hücre bölünmesi) analiz edilmiştir (Şekil 3.1-B).

İlk 3 saatlik hücre grubunda; 0.018 mM- 0.210 mM CDNB ile muamele edilmiş hücrelerde toplam GST aktivitesi, kontrol grubuna neredeyse eşit bulunmuştur. 6 saatlik hücre grubunda ise en düşük doz olan 0.018 mM ve en yüksek doz olan 0.210 mM ile muamele edilen hücrelerin toplam GST aktivitesi, kontrol hücrelerinin seviyesine neredeyse eşittir, ancak 0.072 mM- 0.109 mM doz aralığında muamele edilen hücrelerin toplam GST aktivitesinde kontrol grubuna kıyasla iki kat kadar beklenilmedik bir artış gözlenmiştir. 9 saatlik hücre grubunda, toplam GST aktivitesi yalnızca 0.072 mM ile muamele edilmiş hücrelerde önemli ölçüde (yaklaşık 5 kat) artmıştır. Ayrıca 0.036 mM ile muamele edilen hücre grubu neredeyse 2 kat artış göstermiş olmasına karşın 0.109 mM, 0.145 mM ve 0.210 mM dozların aktivite seviyesi kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur.

İlk üç dozdaki toplam GST aktivitesi, 3 saat ile 9 saatlik zaman aralıklarında artarken, hücre canlılığı testine baktığımızda yalnızca 0.018 mM dozundaki hücrelerin canlılığı, çalışılan tüm zaman aralıklarında artmaya devam etmiştir (Şekil 3.1-A). Bu durumun aksine, gözlemlenen en yüksek GST aktivitesi sadece 0.072 mM ile muamele edilen hücre grubunda ölçülmüştür. Sonuç olarak, hücre canlılığı ve toplam GST enzim aktivite grafiklerinin ikisinde birden 3, 6 ve 9 saatlik sürede artış eğilimi olan tek veri, 0,018 mM CDNB ile muamele edilmiş hücrelerde gerçekleşmiştir.



Şekil 3.1. *Tetrahymena*'nin CDNB'nin çeşitli dozlarına maruz bırakılmasından sonra MTT (% Canlılık testi) ve toplam proteindeki toplam GST enzim aktivite grafiği **A.** CDNB'nin dozlarına maruz bırakıldıktan sonra *Tetrahymena* hücrelerinin % canlılık veya hayatta kalma grafiği. CDNB ile muamele edilmeyen (kontrol) grubu hücrelerinden elde edilen O.D. değeri %100 olarak kabul edilip, dozla muamele edilen gruplardaki O.D'ler kontrol yüzdesine göre oranlanarak hesaplanmıştır. **B.** *Tetrahymena* hücrelerinin CDNB dozlarına maruz kalmasından sonrası izole edilen toplam çözümlü sitoplazmik proteinlerinin toplam GST enzim aktivite grafiği. GST aktiviteleri, toplam çözümlü sitozolik proteinlerin mg'ı başına GSH ile konjuge edilmiş

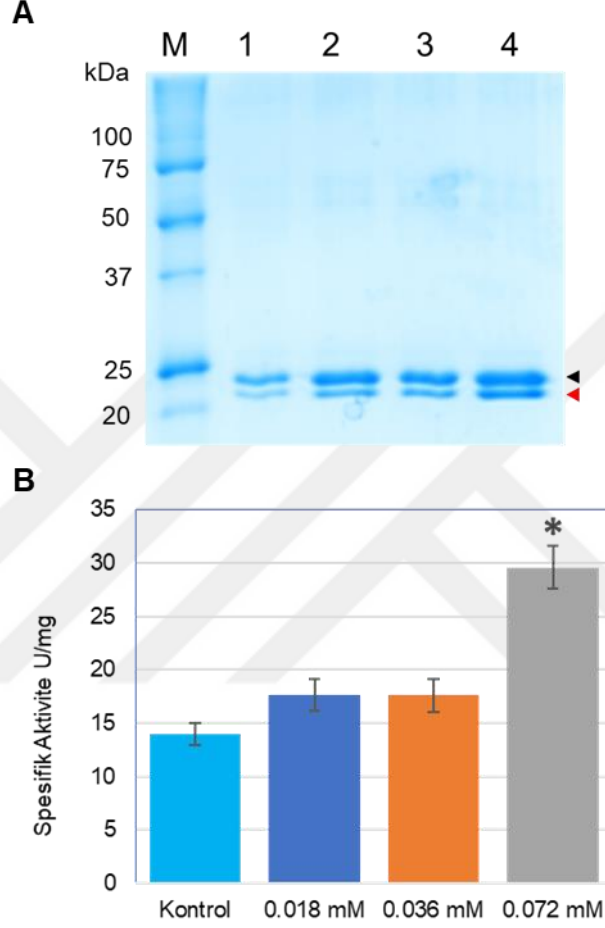
*CDNB'nin dakikadaki µmol dönüşümü olarak ifade edilmiştir. Bulgular 3 bağımsız deney tekrarının ortalama grafiğinde ± standart sapmalar ile verilmiştir. SPSS One-Way ANOVA Tukey Testi, muamele edilmemiş kontrol hücrelerinden elde edilen değerleri deneysel gruplarla $P \leq 0.05$ 'e göre karşılaştırmak için kullanılmış ve anlamlı deney grupları * ile işaretlenmiştir.*

3.1.2. Tetrahymena'nın CDNB toksisitesine cevap olarak ürettiği GST enzimlerinin glutatyon afinitik tanecikleri ile saflaştırılması ve toplam aktivite analizi

CDNB hücre toksisitesi bulgularına göre en yüksek hücre canlılığı ve toplam çözünür GST enzim aktivitesi, 9. saat içinde 0,018 mM, 0,036 mM ve 0,072 mM doz muamelelerinde görülmüş olup bu biyolojik cevabın bir kısmının TtGST genlerinin bu şartlara transkripsiyonel ve/veya posttranslasyonel uyumu ile sağladığını düşündürmüştür. Bu uyum; toplam protein lizatlarından glutatyon Sepharose 4B afinitik tanecikleri kullanılarak saflaştırılan GST proteinlerinin toplam aktivitelerinin doz muamele gruplarındaki karşılaştırması şeklinde Şekil 3.2-B'de verilmiştir. Bu saflaştırma ve aktivite analiz deneyi 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve saflaştırma sonunda taneciklerden toplam 3 elüsyon yapılmış olup, 1. ve 2. elüsyonlarda saflaştırılmış GST bulunurken 3. elüsyonlarda aktivite ölçümüne yetecek kadar protein elde edilememiştir. Böylece GSH boncuklarından 2 kere elüsyon yapılarak neredeyse bağlanan tüm proteinler elüe edilebilmiştir. Saflaştırmasının yıkama solüsyonları da aktivite analizi ile kontrol edilmiş fakat GST aktivitesi bulunamamıştır. EK 8'de bu üç deneye ait verilerin ayrı ayrı çizilen grafikleri verilmiştir. 2. elüsyonlarda daha fazla enzim aktivitesi gözlemlendiğinden bu 3 tekrarlı deneylerin 2. elüsyonlarının ortalama grafiği çizilmiş ve Şekil 3.2-B'de verilmiştir. 0.072 mM CDNB ile muamele edilmiş hücre grubundan saflaştırılan proteinlerin GST aktiviteleri kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak 2 kat daha fazla istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($p \leq 0.05$).

GSH afinite kolonlarından saflaştırılmış Tetrahymena GST'lerinin molekül ağırlıkları, CDNB ile muamele edilmiş deney grupları veya muamele edilmemiş kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak SDS-PAGE jelinde analiz edildiğinde, yaklaşık olarak 22 kDa ve 23 kDa büyüklüğünde iki büyük bant olarak gözlemlenmiştir (Şekil 3.2.A). Tetrahymena'nın sahip olduğu GST enzimlerinin biyoinformatik olarak moleküler ağırlıkları 23 kDa ile 30 kDa arasında değişmektedir (EK3). Bu protein bantlarına bakıldığında, doz gruplarında kontrol grubuna kıyasla daha fazla protein bulunduğu anlaşılmaktadır. 0.072 mM ile muamele edilen hücrelerden elde edilen GST proteinlerinin (Şekil 3.2.A'da 4. Kuyuda kırmızı ve siyah ok başı ile gösterilmiş) diğer

kuyulara kıyasla daha fazla olabileceği görülmektedir. Sonuç olarak; GSH afinitesi ile saflaştırılmış toplam Tetrahymena GST'lerinin hem protein miktarında hem de spesifik enzim aktivitesinde ki artış, 9. saatte 0.018 mM, 0.036 mM ve 0.072 mM CDNB doz muamelelerine karşı hücrenin detoksifikasyon cevabı oluşturduğunu desteklemektedir.



Şekil 3.2. 0.018, 0.036 ve 0.072 mM CDNB dozlarına maruz bırakılmış Tetrahymena hücrelerinden elde edilen toplam protein izolatlarından GSH afinitik boncuklarıyla GST enzimlerinin saflaştırılması. **A.** GSH boncuklarıyla saflaştırılmış GST proteinler, eşit miktarda (3,5 µg) olacak şekilde SDS-PAGE (%12.5) jeline yüklenmiştir; 1) doza maruz bırakılmayan kontrol hücresi, 2) 0.018 mM D1, 3) 0.036 mM D2, ve 4) 0.072 mM D3, M) protein standardı (Biorad Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards, Cat No:1610363). **B.** GSH afinitesi ile saflaştırılan GST proteinlerinin aktivite grafiği. Hata çubukları, üç bağımsız tekrar verisinin ortalamasından standart sapmaları temsil eder. * SPSS Tek Yönlü ANOVA-Tukey Testi, muamele edilmemiş kontrol hücre grubu aktivite verileri ile deney gruplarının karşılaştırılmasında kullanılmış ve anlamlı deney grubu yıldız ile işaretlenmiştir $P \leq 0.05$.

3.1.3. CDNB'ye maruz bırakılan *T. thermophila* hücrelerinden GSH affinitesi ile saflaştırılan GST proteinlerinin kimliklendirilmesi

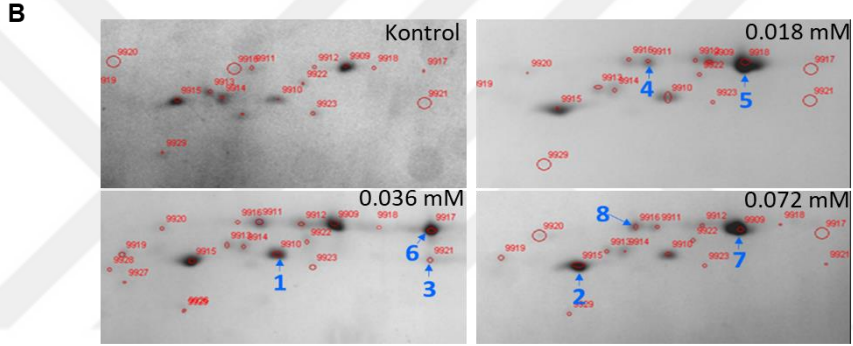
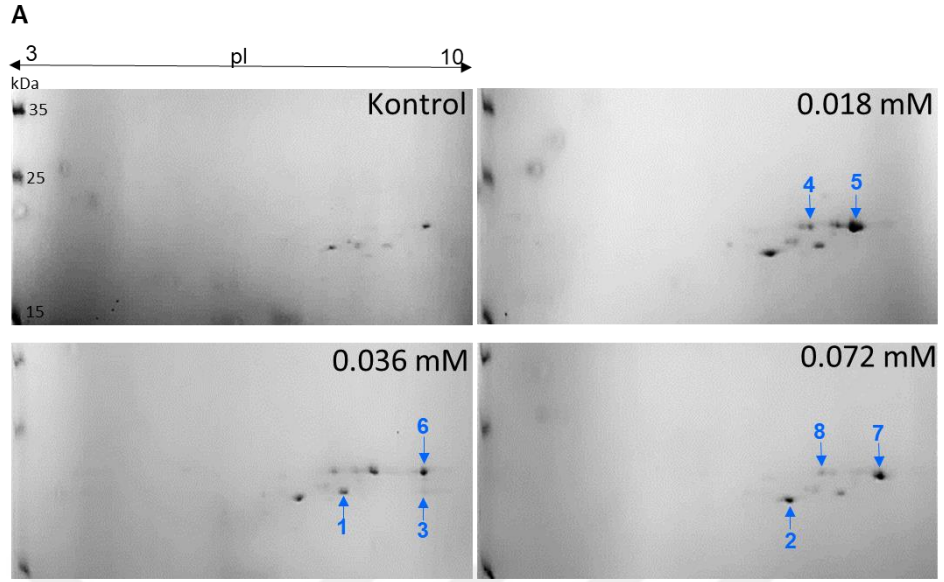
Protein ekspresyon analizi için 2 boyutlu jel elektroforezi ve akabinde elde edilen spotlardan MALDI-ToF MS/MS analizi gerçekleştirilmiştir (Deracinois et al., 2013). CDNB'nin 0.018, 0.036 ve 0.072 mM dozlarına 9 saat maruz bırakılan *Tetrahymena* hücrelerinden GSH affinitesi ile saflaştırılan 22 ve 23 kDa olan GST proteinleri; pI 3-10 stripleri ile yüklerine göre ilk boyutta ayrıldıktan sonra büyüklüklerine göre ikinci boyutta SDS-PAGE ile ayrılarak 2D jel elektroforezi gerçekleştirilmiştir, böylece kontrole göre biyolojik tepki olarak üretilen protein spotları belirlenmiştir (Şekil 3.3-A). Kontrol grubu ile doz gruplarının bulunduğu jeller PDQuest yazılımı yardımıyla karşılaştırıldığında, yeni üretilen veya ifadesi artan protein spotları mavi renk ile numaralandırılmıştır. Kontrol jeline (CDNB'ye maruz bırakılmamış *Tetrahymena* hücrelerinin GST proteinlerini içerir) göre ekspresyonu artmış (hacimsel olarak) ya da kontrol jeline bulunmayıp doz muamele jellerinde tespit edilen spotlar Tablo 3.1'de verilmiş olup yeşil renkle renklendirilen spotlar analiz edilmiştir. MALDI-ToF MS/MS ile 22 kDa'dan 1, 2 ve 3 numaralı spotlar ve 23 kDa'dan 4, 5, 6, 7 ve 8 numaralı spotlar analiz edildiğinde, 22 kDa'dan gelen protein spotlarının TtGSTm19 (Accession No: XP 001027626.1) geni ve 23 kDa'dan gelen protein spotlarının ise TtGSTm34 (Accession No: XP 001020129.1) geni tarafından kodlandığı, %64'ün üzerinde bir eşleşen peptid yüzdesi ile belirlenmiştir (Şekil 3.3-C). Eşleşen peptidlerin dizi üzerindeki yerleşimleri ve peptidlerin listesi EK6'da verilmiştir. Maskot programı ile yapılan analiz skorlarının 56'dan yüksek olanları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Tüm spotlar için bulunan protein skorları Şekil 3.3-C'de verilmiş olup en düşük skor 247'dir. Kimliklendirilen TtGSTm19'un hesaplanan molekül ağırlığı 22 kDa iken, TtGSTm34'ünki 23 kDa olup SDS-PAGE ile belirlenen molekül büyüklüklerine yakın değerlerdir (EK3). 2D jelde aynı protein bandından ayrılan birden fazla protein spot oluşumunun posttranslasyonel modifikasyonlar gibi olası izahları tezin tartışma kısmında literatür ile değerlendirilmiştir.

TtGSTm19 ve TtGSTm34 proteinleri için tahmini pI değerleri sırasıyla yaklaşık 6.5 ve 7.7 (EK3) olmasına rağmen, TtGSTm19 ve TtGSTm34'ün tüm protein spotları pH 8 ile pH 10 arasında alkalik pH'da ayrılmıştır. TtGSTm19 için 0.036 mM jeline spot1 ve 0.072 mM jeline spot2 ile TtGSTm34 için 0.018 mM jelineki spot5, 0.036 mM jelineki spot6 ve 0.072 mM jelineki spot7'nin protein seviyesinde ifade artışları göz ile de fark edilebilmektedir. Kontrol grubu jeline ana spotlardan 9909 no'lu spot ile 0.018

mM jelindeki 9918 nolu spot, 23 kDa'lık TtGSTm34 olarak tanımlanmıştır. Buna karşın 0.036 mM jelinde diğer jellerden farklı olarak 9909 spotuna ek olarak 9917 no'lu spotun ifadesi oldukça artmıştır. CDNB dozunun konsantrasyonunun LD₅₀ düzeyine yakın olduğu 0.072 mM jelinde ana spot 9909'da TtGSTm34 olarak belirlenmiştir. Spotlardaki pI kayması ve aynı proteinlerin birçok farklı pI'da bulunması; TtGSTm19 ve TtGSTm34 proteinlerinin translasyon sonrası modifikasyonlarla işlenmiş olabileceğine işaret etmektedir (Khoury, Baliban ve Floudas, 2011). Bununla birlikte, bazı spotlar MALDI-ToF MS / MS tarafından analiz edilmemiştir ve bu spotların kodlama genleri henüz tanımlanmadığından CDNB'ye yanıt veren farklı GST genlerinde olabileceği göz ardı edilmemesi gerekmektedir.

Tablo 3.1. PDQuest yazılımı ile kantitatif olarak ölçülen spot büyüklükleri ve kontrol grubu spotlarına göre katsal farklılıkları. Yeşil ile işaretli olanlar MALDI-TOF analizine alınan spotlardır.

SSP Numarası	Kontrol	D1	Kontrol-D1 Kat farkı	D2	Kontrol-D2 Kat farkı	D3	Kontrol-D3 Kat farkı
9918	176	20491	120	2197	1,2	75.8	-2
9911	440	9189	21	9678	22	3268	7
9917	168	1	-168	90555	135	1	-168
9910	277	29455	107	45125	163	15100	55
9915	11135	6633	-1,6	34527	3	156382	14
9909	10713	5593	-2	35446	3	50288	5
9916	1	1928	1928	4094	4094	11.6	11.6
9921	1	1	1	10.8	10.8	1514	1514



C

Spot numarası	Kat Farkı*	Mascot Skoru	Dizideki aminoasit yüzdesi	Protein ismi	Dizideki toplam peptid sayısı
1	163	806	79%	TtGSTm19	26
2	14	969	85%	TtGSTm19	31
3	15	423	64%	TtGSTm19	17
4	21	479	67%	TtGSTm34	21
5	148	247	37%	TtGSTm34	9
6	135	592	73%	TtGSTm34	23
7	19	682	73%	TtGSTm34	22
8	13	482	68%	TtGSTm34	21

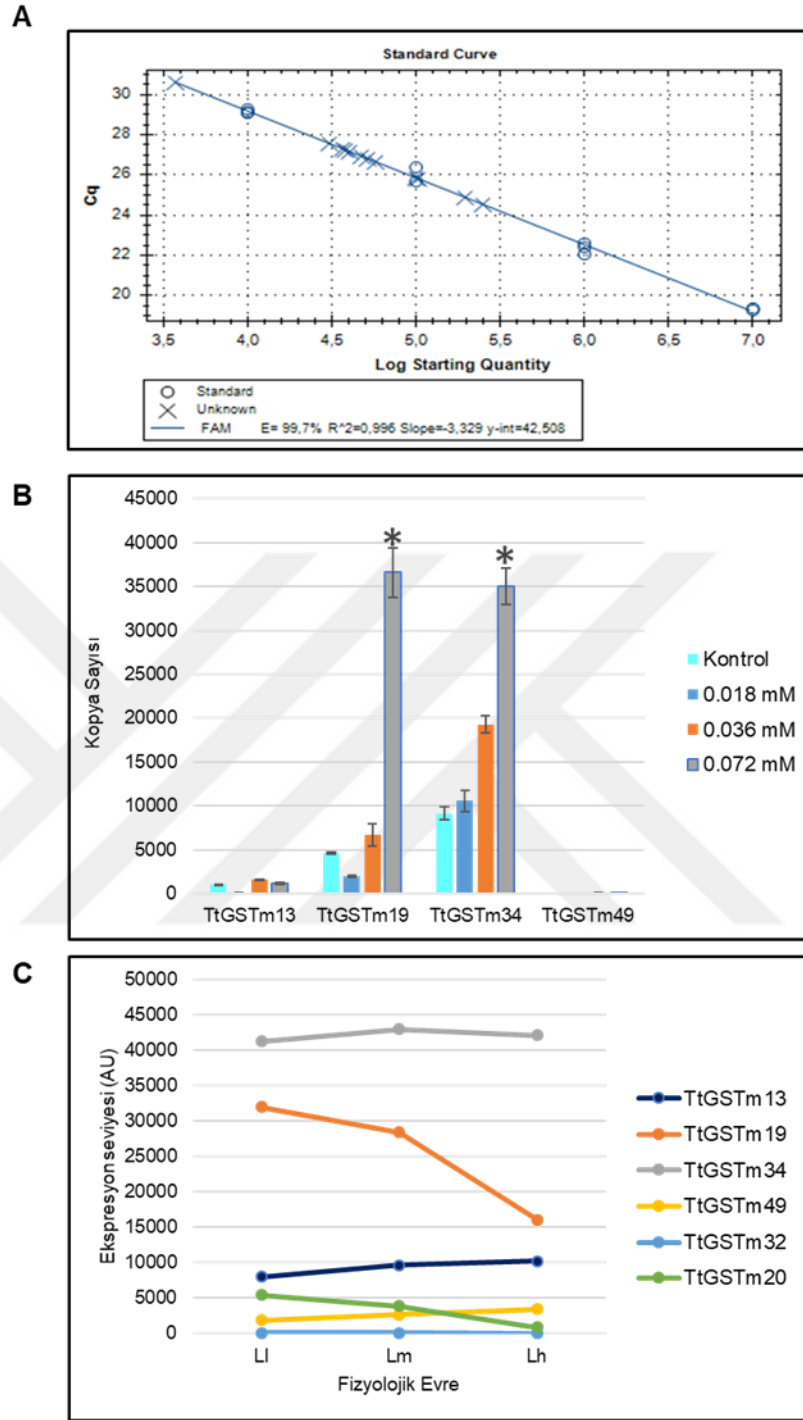
Şekil 3.3. GST proteinlerinin 2D jel elektroforezi ve MALDI-TOF MS analizi. A. pH 3-10 stripleri kullanılarak CDNB'nin 0.018 (D1), 0.036 (D2) ve 0.072 mM (D3) dozlarına 9 saat maruz kalan hücrelerden afinitik saflaştırılan GST proteinlerinin 2D jel görüntüleri. Kontrol jeli; doza maruz bırakılmayan hücrelerden paralelde saflaştırılan GST protein jelidir. B. Protein spotlarının karşılaştırabilmesi için daha yakınlaştırılmış jel görüntüleri. MALDI-TOF MS analizleri mavi rakamlı protein spotlarının kesimi ile yapılmıştır. C. MALDI-TOF MS analiz bulguları. *

Kontrol jelindeki spotlarla doz jellerindeki spotların arasında yoğunluk ve hacim değişiminin katsal ifadesidir.

3.1.4. CDNB'ye maruz bırakılan Tetrahymena'larda kimliklendirilen TtGST'lerin mRNA'larının ifade değişimi

Hücrelerin 9 saat 0.018 mM 0.036 mM ve 0.072 mM CDNB dozları ile maruz bırakılması, hücrelerin biyolojik cevabını TtGSTm19 ve TtGSTm34 genlerinin transkripsiyonel olarak regüle ederek oluşturabileceği hipoteziyle, bu genlerin mRNA ekspresyonları TaqMan prop kullanılarak Real-Time PCR yöntemi ile araştırılmıştır (Şekil 3.4-A ve B). TtGSTm19 ve TtGSTm34 genleri ile birlikte, negatif kontrol grubu olarak vejetatif evrede düşük mRNA ekspresyon profillerine sahip TtGSTm13 ve TtGSTm49 kullanılmıştır (Şekil 3.4-C) (Miao ve ark., 2009). Miao ve ark., (2009) tarafından vejetatif hücrelerden elde edilen ve Şekil 3.4-C'de verilen TtGSTm19 için 15.000-30.000 ve TtGSTm34 için 40.000 birim mRNA (AU) seviyeleri, bu genlerin Şekil 3.4-B'de kontrol için verilen TtGSTm19 için 4594 ve ve TtGSTm34 için 9138 kopya sayısı değerlerine karşılık geldiği varsayılmıştır. TtGSTm19 ve TtGSTm34 genleri için primer ve prob dizayn ederken bu iki gene homolog olan 2 adet daha gen tespit edilmiştir. Tetrahymena genomunda TtGSTm19 proteini ile nükleotid dizisi açısından %92'li bir benzerlik gösteren TtGSTm20 (TTHERM_00569160) gen dizisi bulunmaktadır (EK7). EK7'de verilen TtGSTm19 ve TtGSTm20 genlerine ait nükleotid dizilerinin Clustal Omega ile hizalanmasıyla elde edilen dikey hizalaması incelendiğinde sadece TtGSTm19 için spesifik primer ve prop (ileri primer mavi ile, geri primer pembe ile ve prop sarı ile renklendirilmiştir) tasarımının mümkün olmadığı bulunmuştur. Bu nedenle, Şekil 3.4-B'de gözlemlenen TtGSTm19 mRNA ekspresyonunun hem TtGSTm19 hem de kontamine edici TtGSTm20 geninin mRNA ekspresyonunun toplamı olabileceği göz ardı edilmemelidir. Benzer şekilde yine Tetrahymena genomunda TtGSTm34 geninin nükleotid dizisine %70 benzerlik gösteren ve homolog olabileceği düşünülen TtGSTm32 (TTHERM_00661620) geni bulunmaktadır. EK7'deki TtGSTm34 ile TtGSTm32 genlerinin nükleotid dizilerinin dikey hizalamaları incelendiğinde ise TtGSTm19-TtGSTm20 hizalanmasından farklı olarak primer ve probun bağlanacağı nükleotidlerde bazı dizi bölgelerinin farklı olduğu bulunmaktadır. Buna karşın hem deneysel negatif kontrol için seçilen TtGSTm13 ve TtGSTm49 genlerinin hem de bu çalışmada mRNA ekspresyonuna kontamine olabileceği düşünülen TtGSTm20 ve TtGSTm32 genlerinin vejetatif hücrelerde (herhangi bir doz ile muamele edilmeyen) düşük mRNA

ekspresyonlarına sahip oldukları Dede & Arslanyolu, (2019)'da rapor edilmiştir. CDNB stresi altında MALDI-ToF MS / MS proteom analizinde; TtGSTm20 homologuna ait peptid dizilerinin Mascot analizinde elde edilen peptid listesi içinde hiç bulunmaması, sadece TtGSTm19 proteininin peptid dizilerinin bulunması, yine benzer şekilde TtGSTm32 peptid dizilerinin hiç bulunmaması, sadece TtGSTm34 proteininin bulunması, TtGSTm19 ve TtGSTm34'ün transkripsiyonel olarak tercih edildiğini ve mRNA kontaminasyonunun olmadığı hipotezini desteklemektedir (EK7). Bu bilgiler ışığında Şekil 3.4-B incelendiğinde, 0.018 mM doz muamelesi TtGSTm19 ve TtGSTm34 mRNA ifade seviyesi kontrol seviyesine yakın değerlere sahip olmasından dolayı bir etki göstermemiştir. 0.036 mM muamelesi ise sadece TtGSTm34 mRNA ifade seviyesinde yaklaşık 2 kat bir artışa neden olmuştur. Fakat 0.072 mM muamelesi altındaki hücrelerde kontrol grubuna göre TtGSTm19 mRNA'sı yaklaşık 8 kat ve TtGSTm34 mRNA'sı ise yaklaşık 4 kat istatistiksel olarak anlamlı bir mRNA kopya artışı gerçekleştiği bulunmuştur.



Şekil 3.4. CDNB dozlarına maruz bırakılan hücrelerde TtGSTm19 ve TtGSTm34 mRNA ifade değişimlerinin Real-Time PCR ile belirlenmesi. **A.** Real time-PCR için hazırlanan kopya sayısının bulunmasında yardımcı olan standart eğri grafiği. Kopya sayısı standartlarının konsantrasyonlarının log değeri ile elde edilen Cq (kantitasyon döngüsü) değerlerine kullanılarak çizilmiştir. **B.** CDNB (0.018, D2: 0.036 ve D3: 0.072 mM) dozlarına 9 saat maruz kalan Tetrahymena hücrelerinin GST genlerinde bulunan mRNA kopya sayıları. Kontrol: CDNB'ye maruz bırakılmamış hücrelerin mRNA ekspresyon seviyesi. Hata çubukları, üç

*bağımsız tekrarın standart sapmasını temsil eder. *CDNB muamelesine girmemiş kontrol hücrelerinden elde edilen değerler ile giren deneysel grup değerlerinin $P < 0.05$ (0.001)'e göre SPSS Tek Yönlü ANOVA Tukey Test analizi ile bulunan anlamlı deney grubunu göstermektedir. C. TtGSTm13, TtGSTm19, TtGSTm34, TtGSTm49, TtGSTm20 ve TtGSTm32 genlerinin vejetatif hücrelerde mRNA ekspresyon grafiği. Y ekseninde mRNA ekspresyon seviyesi gösterilirken, X ekseninde Ll, Lm ve Lh ile sırasıyla düşük (1×10^5 h/ml), orta ($\sim 3.5 \times 10^5$ h/ml) ve yüksek ($\sim 1 \times 10^6$ h/ml) sayıda hücre içeren Tetrahymena populasyonlarını göstermektedir. GST genlerinin mRNA ekspresyon profilleri, Tetrahymena Functional Genomics Database-TetraFGD'den (<http://tfgd.ihb.ac.cn/>) elde edilmiştir. Veriler, Gorowski, Miao ve Pearlman Labs (Miao ve ark., 2009) tarafından elde edilen verilerin ortalaması olarak verilmiştir.*

3.2. Bölüm 2- TtGSTm34 geninin klonlanması, rekombinant protein üretimi ve enzim kinetik özelliklerinin belirlenmesi

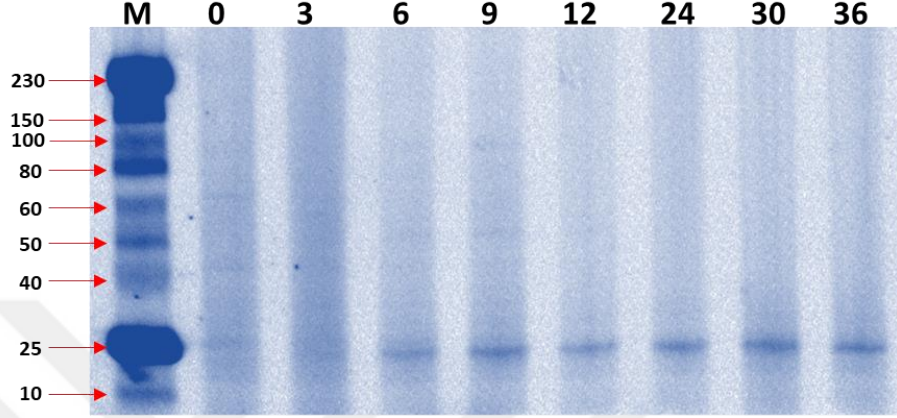
Bölüm 1'de CDNB substratına karşı Tetrahymena'nın detoksifikasyon mekanizmasının Faz II basamağında rol oynayabilecek enzimleri kodlayan genlerin TtGSTm19 ve TtGSTm34 olarak kimliklendirildiği sunulmuştur. TtGSTm19 ve TtGSTm34 genlerinin transkripsiyonel seviyede bir cevap oluşturduğu Real-Time PCR verileri ile 9 saatlik 0.072 mM doz muamelesinde belirlenmiştir. Bölüm 2'de ise bu iki GST enziminden mRNA tepkisi daha yüksek kopya sayılı olan TtGSTm34'ün rekombinant olarak üretilip saflaştırılması ve belirlenmiş enzim kinetik parametre bulguları sunulmuştur.

3.2.1. TtGSTm34 geninin klonlanması, transformasyonu ve indüksiyonu

Tetrahymena'ya ait TtGSTm34 geni kodon optimizasyonu yapılmaksızın klonlama konakçısı *E. coli* XL1-Blue hücrelerine yöntem kısmında anlatıldığı şekilde klonlanmış ve pozitif transformantlardan saflaştırılan plazmitlerin teyidi restriksiyon enzim kesimiyle gerçekleştirilmiştir. Şekil 2.1-C'de görüldüğü üzere kesim reaksiyonu sonrası elde edilen TtGSTm34 DNA parçası pIGF-1 vektörüne klonlanmış elde edilen pIGF-1-GSTm34 vektörü kesildiğinde, GSTm34-8xHis DNA parçasının beklenen büyüklüğü olan 726 bp'lik parçanın klonlandığı teyit edilmiştir.

TtGSTm34-8xHis genini içeren pIGF-1-GSTm34 vektörü elektroporasyon ile konjugatif Tetrahymena hücrelerine transforme edilmiş, antibiyotik seleksiyonu ile seçilen pozitif transformantlar, 36 saat boyunca CdCl_2 ile gen kasetinde bulunan MTT1 promotörü indüklenerek zamana bağlı TtGSTm34-8xHis üreten hücre örnekleri

toplanmıştır. Şekil 3.5'te zamana bağlı toplanan hücre örneklerinden saflaştırılan protein izolatları SDS-PAGE jel'de koşturulmuş ve Commassie blue boyası ile boyanarak görüntülenmiştir. GST enzimlerinden beklenen 23 kDa büyüklüğünde bir protein bandının 6. saatten itibaren 36. saate kadar artan bir şekilde üretildiği görülmüştür.

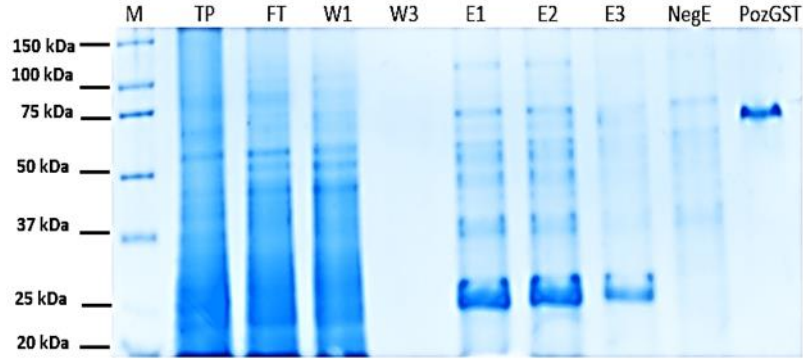


Şekil 3.5. *pIGF-1-GSTm34* vektörü içeren pozitif transformant hücrelerinin $CdCl_2$ ile induksiyonu ve SDS-PAGE analizi. Hücrelerden saflaştırılan toplam protein izolasyonlarının yüklendiği jel Commassie blue ile boyanmıştır. Rakamlar indüklenme zamanlarını saat olarak göstermektedir. M; marker, protein standartı (NEB; Cat No: P7710 Prestained Protein Ladder, Broad Range (10-230 kDa)).

3.2.2. TtGSTm34 proteininin Ni-NTA ve GSH bağlı boncuklarıyla saflaştırılması

TtGSTm34 geninin C-ucunda bulunan 8x histidin takısı kullanılarak induksiyon sonrası toplam proteinlerden Ni-NTA boncukları (40 ml lizata için 20 ml %50 slurry kullanılarak) ile TtGSTm34-8xHis protein izolasyonu afinitik olarak yapılmış, induksiyon saatlerinden saflaştırılan proteinler SDS-PAGE jelde analiz edilmiştir (Şekil 3.6). Şekil incelendiğinde FT (Flow-through) örneklerinde Ni-NTA taneciklerine bağlanamayan bir miktar 23 kDa'luk protein olduğu fark edilmektedir. İlk yıkama aşamasında taneciğe bağlanmayan ya da zayıf affinite ile bağlanan proteinlerin uzaklaştığı, 3. yıkama aşamasında ise daha fazla protein kaybı olmadığı görülmektedir. Ni-NTA'ya bağlanan TtGSTm34-8xHis proteinleri, boncuklardan 20 ml 250 mM imidazol elüsyonu (Şekil 3.6; kuyu E1, E2 ve E3), 3 kez gerçekleştirilmiştir. E3 elüsyonu incelendiğinde, boncuklardan halen rekombinant TtGSTm34-8xHis proteininin biraz azalmasına rağmen alınabildiği görülmektedir. Negatif kontrol (Şekil 3.6; NegE kuyusu) kuyusunda ise “kadmiyum ile indüklenmemiş” pIGF-TtGSTm34 vektörü taşıyan *T. thermophila* transformantlarının Ni-NTA elüsyonu bulunmaktadır. NegE kuyusunda 24

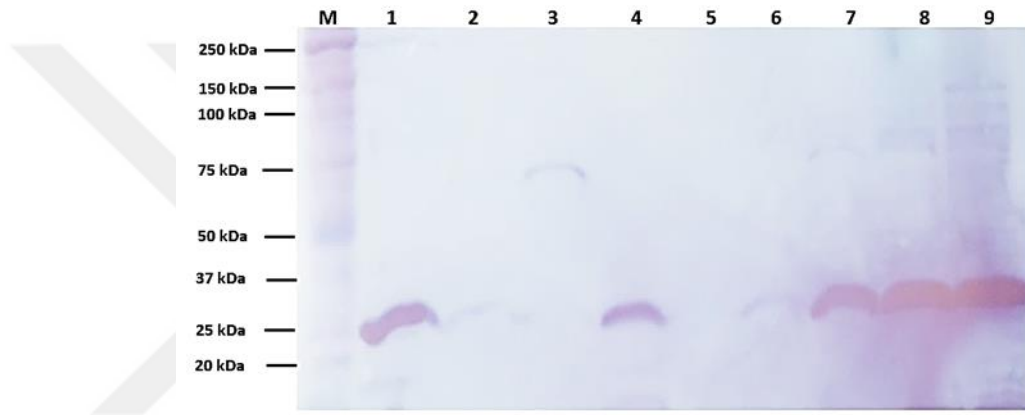
kDa'na karşılık gelen bir protein bandı gözlenmediğinden rekombinant proteinin MTT1 promotorundan sızıntılı bir ifadesinin bulunmadığı kanaatına varılmıştır. Şekil 3.6'nın PozGST kuyusuna at karaciğer GST'si (Cayman Glutathione S transferase Kit, Cat No: 703302) yüklenmiş olup yaklaşık 75 kDa olarak dimerik GST büyüklüğü civarında koşmuştur.



Şekil 3.6. *pIGF-TtGSTm34* vektörü taşıyan *T. thermophila* transformantlarının $CdCl_2$ ile 30 saat induksiyonu sonrası *TtGSTm34-8xHis*'in Ni-NTA ile afinitik saflaştırması. Transformant hücrelerin sonrası toplam protein lizatından Ni-NTA boncukları ile saflaştırma ve afinitik proteinlerin SDS-PAGE jel görüntüsü. TP; toplam protein, FT; Ni-NTA boncuklarına tutunamayan proteinler, W1 ve W3; boncukların 1. ve 3. yıkamasında toplanan proteinler, E1, E2 ve E3; boncukların 1.,2. ve 3. elüsyonu, NegE; kadmiyum ile indüklenmemiş *pIGF-TtGSTm34* vektörü taşıyan *T. thermophila* transformantının Ni-NTA elüsyonu bulunmaktadır. PozGST; Ticari pozitif kontrol GST enziminin (Cayman Glutathione S transferase Assay Kit-Cat No: 703302) 10 μ g yüklenmiştir. Marker olarak Biorad Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards Cat No:1610363) kullanılmıştır.

TtGSTm34-8xHis proteininin histidin takısı ile nikel taneciklerine afinitesi yardımıyla saflaştırılabildiği görüldükten sonra hedef proteinin glutasyon boncuklarına afinitesinde araştırılmıştır. GSH boncuklarıyla saflaştırılan *TtGSTm34-8xHis* elüsyonları, anti-His antikoru ile Western-Blot analizine alındığında öncelikle elüsyonlarda, 23 kDa yerine 25-27 kDa hizasında beklenen büyüklüğe çok yakın büyüklükte rekombinant protein bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 3.7). Histidin takısı bulunan kontrol proteini *TtsfGFP-6xHis*'nin büyüklüğü 27 kDa'dur (Şekil 3.7, kuyu 1). *TtGSTm34*'ün beklenen büyüklüğü 23 kDa olup yaklaşık 2,5 kDa olan 8X histidine takısıyla (Booth ve ark., 2018) beraber rekombinant *TtGSTm34-8xHis* proteininin büyüklüğü 25,5 kDa büyüklüğe ulaşmaktadır; elüsyonlarda bulunan *TtGSTm34-8xHis* proteini de bu büyüklükte veya 27 kDa büyüktür (Şekil 3.7, kuyu 4, 7-9). Negatif kontrol hücresi olarak vektör içermeyen

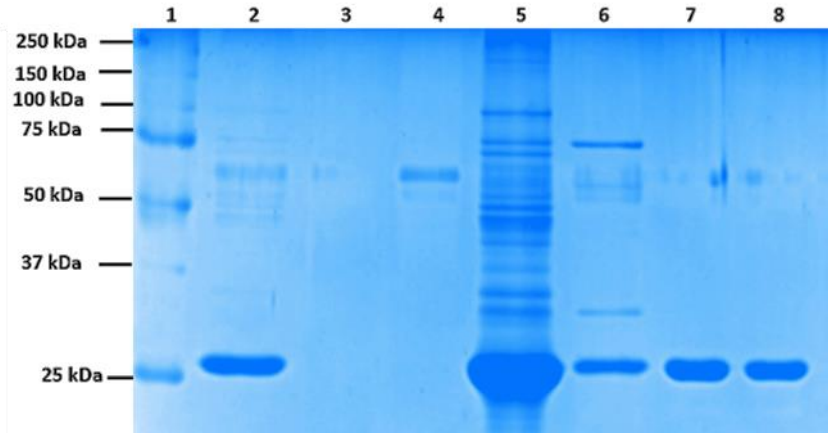
T. thermophila CU428 lizati kullanılmıştır (Şekil 3.7, kuyu 2). Vektör içeren ve indüklenmiş *T. thermophila* hücre izolatlarından saflaştırılan toplam protein içinde ise TtGSTm34-8xHis bulunduğu, Şekil 3.7'ün 4. kuyusunda görülmektedir. GSH boncuklarına bağlanmayan proteinler (flowtrough) içinde TtGSTm34-8xHis'in bulunmadığı yani tüm rekombinant proteinlerin GSH boncuklarına bağlandığı görülmektedir (Şekil 3.7, kuyu 5). GSH boncuklarının yıkanması aşamasında ise nispeten az miktarda da olsa TtGSTm34-8xHis proteininin kolondan söküldüğü görülmektedir (Şekil 3.7, kuyu 6). Rekombinant 27 kDa büyüklüğe TtGSTm34-8xHis proteininin 3 elüsyonda da bol miktarda elüe edildiği görülmektedir (Şekil 3.7, kuyu 7-9).



Şekil 3.7. *T. thermophila* pIGF-1-TtGSTm34 vektörü içeren transformant hücrelerin CdCl₂ indüksiyonunu sonrası toplam protein izolatının GSH boncukları ile saflaştırılmasıyla elde edilen proteinlerin anti-His antikorunu ile Western-Blot analizi. Birincil antikor olarak fare monoklonal anti-6XHis takı antikorunu (Cat No: 200-301-382S, Rockland) ve ikincil antikor olarak ise keçi anti-fare IgG-HRP poliklonal antikorunu kullanılmıştır (GenScript Cat No: A00160). M; protein standardı (Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards, Biorad Cat No:1610363), 1; TtsfGFP-6xHis western blot pozitif kontrolü (27 kDa), 2; pIGF-1-TtGSTm34 vektörü içermeyen *T. thermophila* CU428 ırkının toplam protein izolatından GSH affinitik saflaştırması sonucu elde edilen proteinler negatif kontrol olarak kullanımı, 3; pIGF-TtGFPm34-8xHis vektörünü içeren *T. thermophila*'ların indüklenmemiş transformant hücrelerinden saflaştırılan toplam proteinin GSH affinitik boncukları ile saflaştırılmış proteinler, pIGF-TtGFPm34-8XHis vektörü içeren *T. thermophila*'nın indüklenmiş transformant hücreleri kullanımı ile 4; saflaştırılan toplam protein, 5; saflaştırılan toplam proteinden GSH affinitik boncuklarıyla saflaştırılması esnasında, GSH boncuklarına bağlanmayan toplam proteinler (Flow trough), 6; GSH boncuklarının yıkanması ile uzaklaştırılan proteinler, 7, 8 ve 9; GSH boncuklarına bağlı TtGSTm34-8xHis proteinlerinin sırasıyla birinci, ikinci ve üçüncü elüsyonları.

3.2.3. TtGSTm34-8xHis'in Ni-NTA ve GSH affinitesi ile ardışık saflaştırılması

Bağımsız olarak Ni-NTA ve GSH afinitik boncuklarıyla TtGSTm34-8xHis'in yaklaşık %80 civarında saflaştırılabileceğinin görülmüş olması, bu hedef proteinin Ni-NTA ve GSH afinitik boncuklarının ardışık sırayla kullanımıyla daha yüksek saflık seviyesinde saflaştırılabileceğini işaret etmiştir. Fakat Ni-NTA boncuklarından elüsyon sonucunda elüsyonlarda bulunan imidazol, TtGSTm34-8xHis'in GSH boncuklarına bağlanmasını engelleyeceğinden ultrafiltrasyon ile tampon değişimi ve böylece imidazolün uzaklaştırılması sağlanmıştır. pIGF-1-GSTm34 vektörü içeren *T. thermophila* kadmiyum ile indüklenmiş transformant hücrelerinden saflaştırılan toplam çözünür proteinden TtGSTm34-8xHis, ilk önce Ni-NTA boncukları ile saflaştırılmış ve elüsyon içindeki imidazol ultrafiltrasyon ile uzaklaştırılırken TtGSTm34-8xHis konsantre edilmiştir; sonrasında GSH boncukları ile afinitik saflaştırma başlatılmıştır. Ni-NTA ve GSH boncukları (dual) ile ardışık afinitik saflaştırma sonucunda elde edilen proteinler SDS-PAGE'e yüklenerek, Commassie blue ile boyanmıştır (Şekil 3.8). Ni-NTA boncuklarının elüsyonu TtGSTm34-8xHis'in yaklaşık %80 seviyesinde saflaştırdığı tekrar göstermiştir (Şekil 3.8, kuyu 2). Ultrafiltrasyon ile tampon değişikliği ve konsantre edildiğinde Ni-NTA elüsyonunda yaklaşık %20 oranında bulunan kontaminant proteinler net olarak görülmektedir (Şekil 3.8, kuyu 5). GSH afinitik boncuklarına bağlanamayan TtGSTm34-8xHis'in bir miktarı, Şekil 3.8'in 6. kuyusunda görülmektedir. GSH affiniteli boncuk saflaştırmasından sonra elde edilen elüsyonlar; iki aşamalı ardışık afinitik saflaştırma stratejisinin kontaminant proteinleri nerdeyse tamamen uzaklaştırdığını ve 27 kDa'luk rekombinant TtGSTm34-8xHis proteininin ise yaklaşık %95 saflıkta saflaştırıldığını göstermiştir (Şekil 3.8, kuyu 7 ve 8).



Şekil 3.8. *pIGF-TtGSTm34* içeren *T. thermophila* transformant hücrelerinden ardışık olarak Ni-NTA ve GSH afinitik saflaştırma yapılarak TtGSTm34-8xHis'in yüksek saflıkta eldesi ve SDS-PAGE analizi. 1; protein standartı (Biorad Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards Cat No:1610363), 2; Ni-NTA saflaştırma sonrası birinci elüsyon, 3 ve 4; Ultrafiltrasyonda birinci ve ikinci santrifüj sonrası filtreden uzaklaştırılan proteinler, 5; Ultrafiltrasyon filtresinde muhafaza edilen TtGSTm34-8xHis ve kontaminant proteinler, 6; GSH affinitik boncuklarına bağlanamayan proteinle (flow-through), 7 ve 8; GSH affinitik boncuklarından elüe edilerek saflaştırılan proteinlerin birinci ve ikinci elüsyonları.

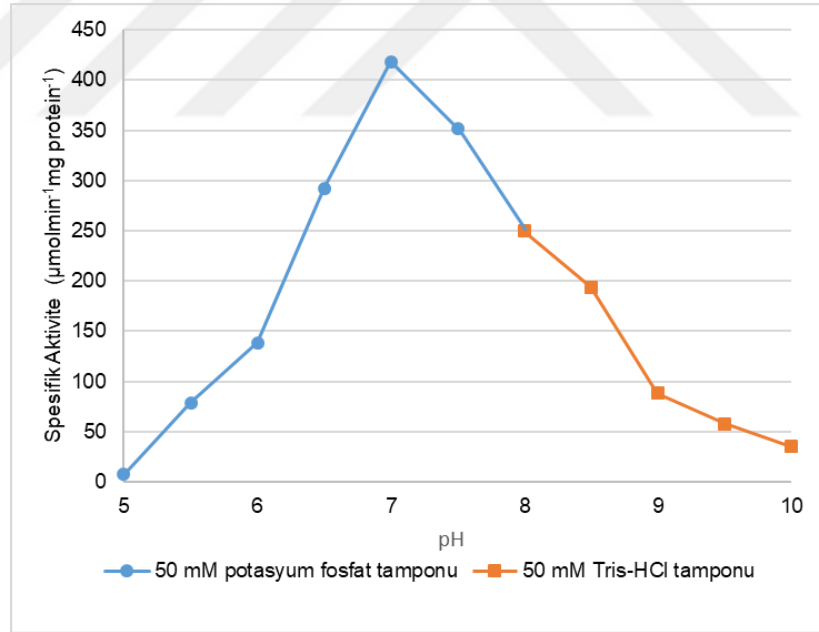
3.2.4. Saflaştırılmış TtGSTm34-8xHis'in enzimatik karakterizasyonu ve kinetiği

Rekombinant *T. thermophila*'nın 40 ml'lik kültüründen iki (dual: Ni-NTA ve GSH affinitik saflaştırma) aşamalı TtGSTm34-8xHis saflaştırma stratejisinin ana çıktıları Tablo 3.2'de özetlenmiştir. Tablo 3.2'de verilen enzim aktiviteleri TtGSTm34-8xHis için optimize edilmemiş reaksiyon (PBS tamponunda pH 7.3, oda ısısı) şartlarında elde edilmiştir. Tablo incelendiğinde, 40 ml'lik toplam hücre protein lizatından dual affinitik saflaştırma sonunda; TtGSTm34-8xHis enziminin final saflaştırması %25 verimlilikte, 3166 kat arttırılmış bir saflaştırma ile 190 U/mg spesifik aktivite değerlerine ulaşılarak gerçekleştirilmiştir.

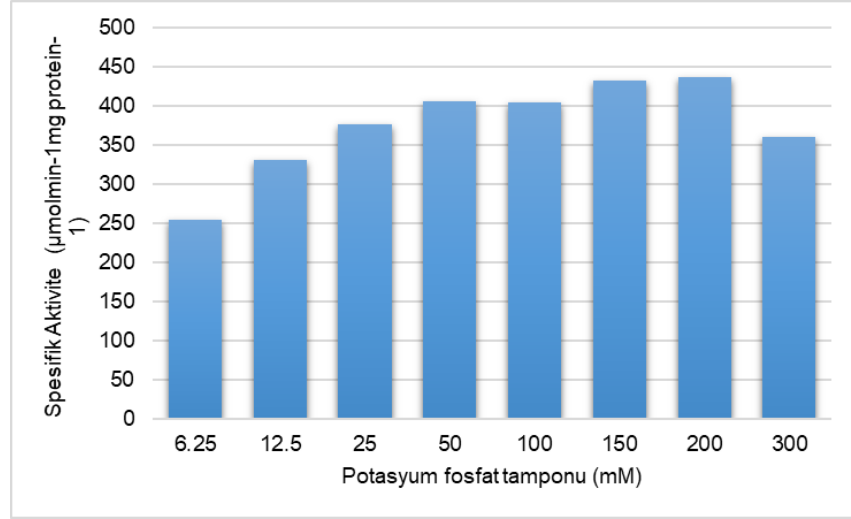
Tablo 3.2. *Tetrahymena thermophila*'dan rekombinant TtGSTm34-8xHis'nin iki aşamalı afinitik saflaştırması ve enzim aktivite analizi (GST enzim reaksiyonları optimize edilmemiş şartlarda gerçekleştirilmiştir; oda ısısı ve PBS pH:7.3)

	Hacim (ml)	Toplam protein (mg)	Toplam Aktivite (Unit)	Spesifik Aktivite ($\mu\text{molmin}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$)	Saflaştırma Katı (Purification fold)	Verim (Yield)
Lizat	40	137.37	9.2	0.06	1	100
Ni-NTA	60	2.34	5.4	2.30	38.33	58.69
Ultrafiltrasyon	0.25	0.08	3.42	42.75	712.5	37.17
GSH boncuk	0.1	0.012	2.28	190	3166.66	24.78

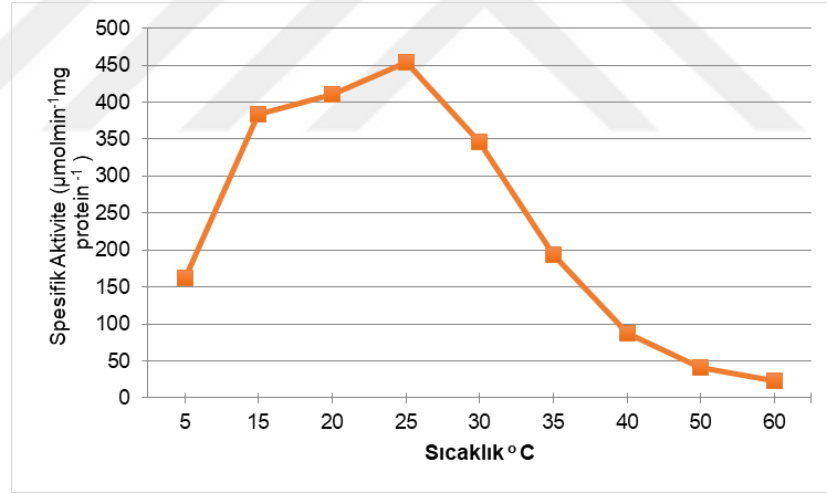
TtGSTm34-8xHis'nin için belirlenen optimum pH (Şekil 3.9), iyonik şiddet (Şekil 3.10) ve sıcaklık (Şekil 3.11) şartları, “200 mM fosfat tampon, pH 7.0 ve 25°C” şeklinde, saflaştırılan bu enzim için tekrar kullanıldığında spesifik aktivite 190 U/mg'dan 2.5 kattan fazla olan 453 U/mg'a yükselmiştir (Tablo 4.1).



Şekil 3.9. Rekombinant TtGSTm34-8xHis enziminin GST enzim aktivite reeaksiyonunda iki farklı tampon kullanılarak optimum pH'ın belirlenmesi. 50mM fosfat tamponu ve pH 7.0'de 418 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ spesifik aktivite gözlenmiştir. GST reaksiyonunda; tampon ve pH dışındaki diğer şartlar ise 100mM CDNB, 100mM redükte glutatyon ve 25°C'dir. Elisa Reader'ın kinetik programında 30 dk. boyunca 2'şer dk. aralıklarla 340 nm'de okunan O. D'lerden spesifik aktivite hesaplanmıştır.

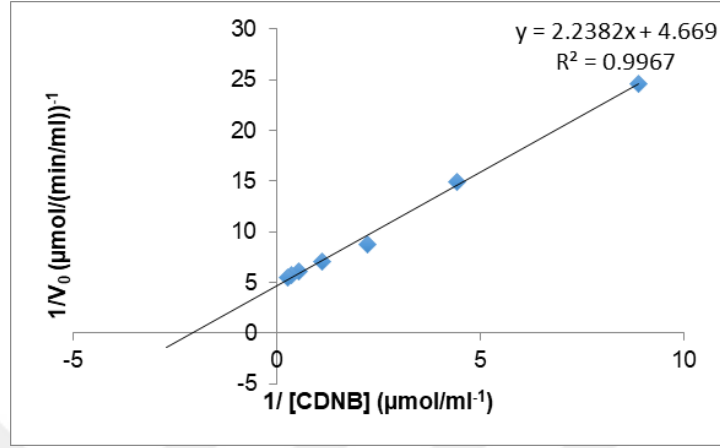


Şekil 3.10. Rekombinant T1GSTm34-8xHis enzim aktivitesinin optimum iyonik şiddeti. pH 7.0'de 200 mM fosfat tamponunda en yüksek spesifik aktivite 436 μmolmin-1mg protein-1 olarak bulunmuştur. GST reaksiyonda kullanılan diğer şartlar ise 100mM CDNB, 100mM redükte glutasyon ve 25oC'dir. Elisa Reader'ın kinetik programında 30 dk. boyunca 2'şer dk. aralıklarla 340 nm'de okunan O. D'lerden spesifik aktiviteler hesaplanmıştır.

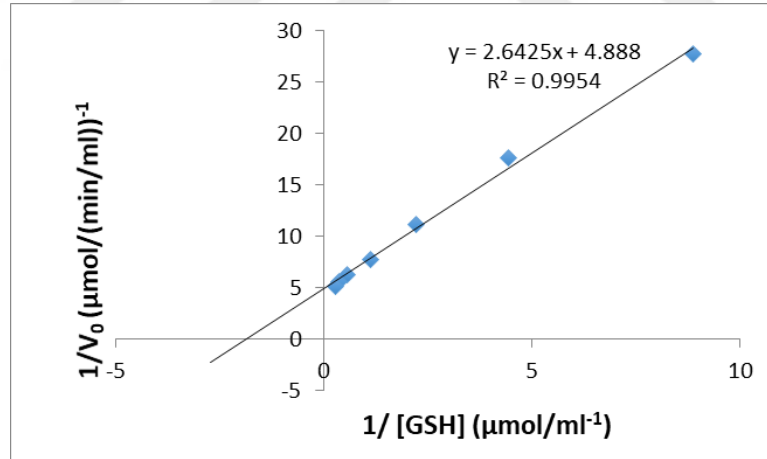


Şekil 3.11. Rekombinant T1GSTm34-8xHis enzim aktivitesinin optimum sıcaklığının belirlenmesi. Değişik sıcaklıkların enzim aktivitesi üzerine etkisine bakılarak optimum sıcaklık bulunmuştur. Enzim reaksiyonunda pH 7.0, 200 mM fosfat tamponu ve 25°C'de en yüksek spesifik aktivite olan 453 μmolmin-1mg protein-1 bulunmuştur. GST reaksiyonda sabit tutulan diğer şartlar 100mM CDNB ve 100mM redükte glutatyondur. Elisa Reader'da kinetik program kullanılarak 30 dk. boyunca 2'şer dk. aralıklarla 340 nm'de okunan O.D.'lerden spesifik aktiviteler hesaplanmıştır.

CDNB ve GSH substratlarının K_m değerlerinin belirlenebilmesi için Lineweaver-Burk eğrileri çizilmiştir (sırasıyla Şekil 3.12 ve Şekil 3.13). Bu eğriler yardımıyla CDNB ve GSH'nin K_m değerleri sırasıyla 0.47 ve 0.54 mM olarak bulunmuştur.



Şekil 3.12. CDNB substratına karşı rekombinant TtGSTm34-8xHis enziminin Lineweaver Burk grafiği. GST reaksiyonu 200 mM fosfat tamponu pH 7.0, 25°C, 100mM CDNB ve 100mM redükte glutatyonile gerçekleştirilmiştir. Elisa Reader'ın kinetik programında 30 dk. boyunca 2'şer dk. aralıklarla 340 nm'de O. D'ler ölçülmüştür.



Şekil 3.13. GSH substratına karşı rekombinant TtGSTm34-8xHis enziminin Lineweaver Burk grafiği. GST reaksiyonu 200 mM fosfat tamponu pH 7.0, 25°C, 100mM CDNB ve 100mM redükte glutatyon ile gerçekleştirilmiştir. Elisa Reader'ın kinetik programında 30 dk. boyunca 2'şer dk. aralıklarla 340 nm'de O. D'ler ölçülmüştür.

K_{cat} ya da turnover sayısı, diğer bir adıyla devir hızı; bir enzimin tek bir aktif bölgesi tarafından birim zamanda ürüne dönüştürülen substrat miktarıdır. Tablo 3.3'te GSH ve CDNB için K_{cat} değerleri verilmiş olup sırasıyla 186,9 ve 195,4 olarak bulunmuşlardır. Bir diğer önemli kinetik sabiti ise katalitik etkinlik değeri olan K_{cat}/K_m

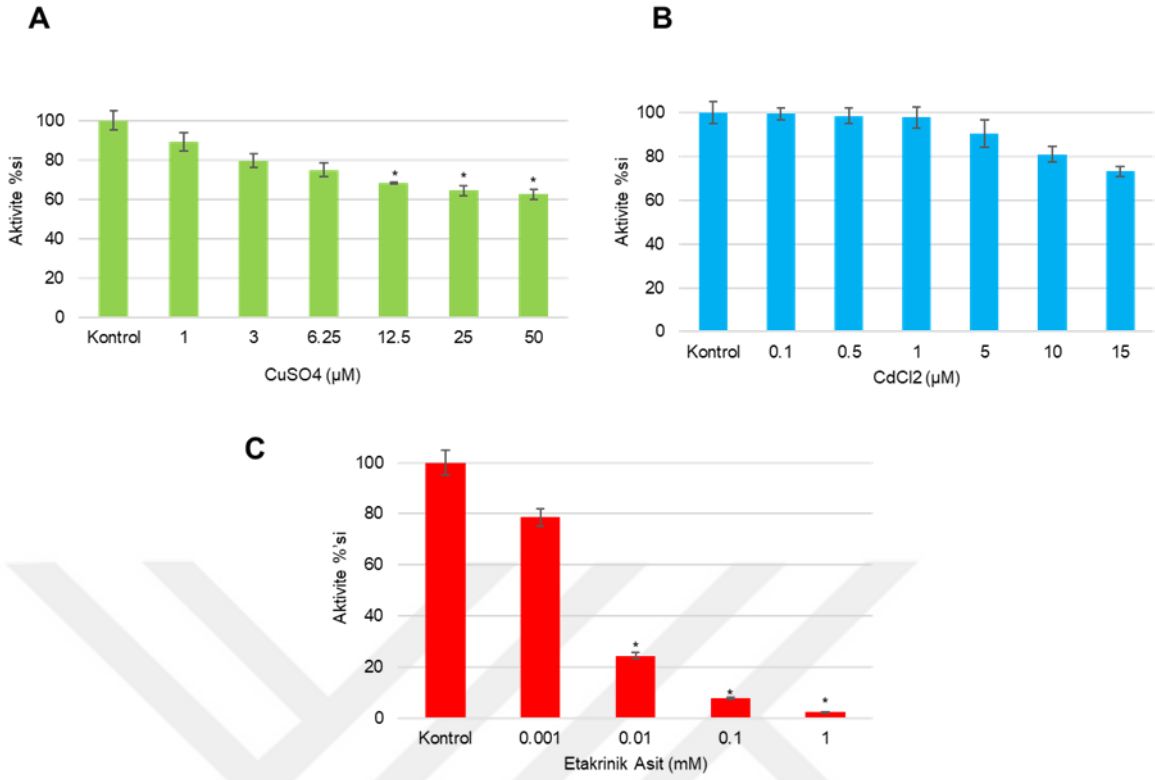
değeridir. Genellikle "özgüllük sabiti" olarak anılan K_{cat}/K_m oranı, alternatif, rakip substratlar üzerinde etki eden bir enzimin nispi oranlarını karşılaştırmak için kullanılan yararlı bir indekstir. Aynı zamanda enzimin genel olarak substratı ürüne dönüştürme yeteneğini temsil eden en iyi değerdir. Bu çalışmada; TtGSTm34-8xHis enziminin katalitik etkinlik değerleri GSH ve CDNB için sırasıyla 345.3 ve 407.7 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 3.3. Rekombinant TtGSTm34-8xHis enziminin optimum şartlarda kinetik değerleri (25°C, pH:7.0 ve 200 mM fosfat tamponunda)

Substrate	K_m (mM)	V_{max} (U/ml)	K_{cat} (s ⁻¹)	K_{cat}/K_m
GSH	0.54	0.2	186.9	345.3
CDNB	0.47	0.21	195.4	407.7

3.2.5. TtGSTm34-8xHis enzim aktivitesine inhibitörlerin etkisi

TtGSTm34-8xHis enzim aktivitesine, ağır metallere CuSO₄ ve CdCl₂ ile diüretik ilaç olan GST inhibitörü Etakrinik asitin çeşitli dozlarının inhibisyon etkisi incelenmiş ve sonuçlar Şekil 3.14'te verilmiştir. Kontrol grubunun aktivitesi 100 kabul edildiğinde CuSO₄'ün 12.5, 25 ve 50 µM'lık dozlarının aktivite üzerinde sırasıyla %32, %36 ve %38'lik istatistiksel olarak anlamlı bir inhibisyon etkisi bulunmuştur. CdCl₂'nin en yüksek dozu olan 15 µM'lık dozunda bile kontrol grubuna göre anlamlı bir inhibisyon etkisi bulunmazken, etakrinik asitin 0.01, 0.1 ve 1 mM'lık dozlarında sırasıyla %76, %92 ve %98'lik istatistiksel olarak anlamlı bir inhibisyon etkisi gözlenmiştir.



Şekil 3.14. *TtGSTm34-8xHis* enzim aktivitesine çeşitli inhibitörlerin etkisi. Veriler 3 bağımsız deney tekrarının ortalama ve \pm standart sapmalar ile grafik şeklinde verilmiştir. SPSS One-Way ANOVA, Tukey Testi, kontrol hücrelerinden elde edilen değerleri inhibitör eklenmiş gruplarla $P < 0.05$ (0.001)'e göre istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve anlamlı deney grupları * ile işaretlenmiştir.

3.2.6. Değişik sıcaklıkların zamana bağlı *TtGSTm34-8xHis* enzim aktivitesine etkileri

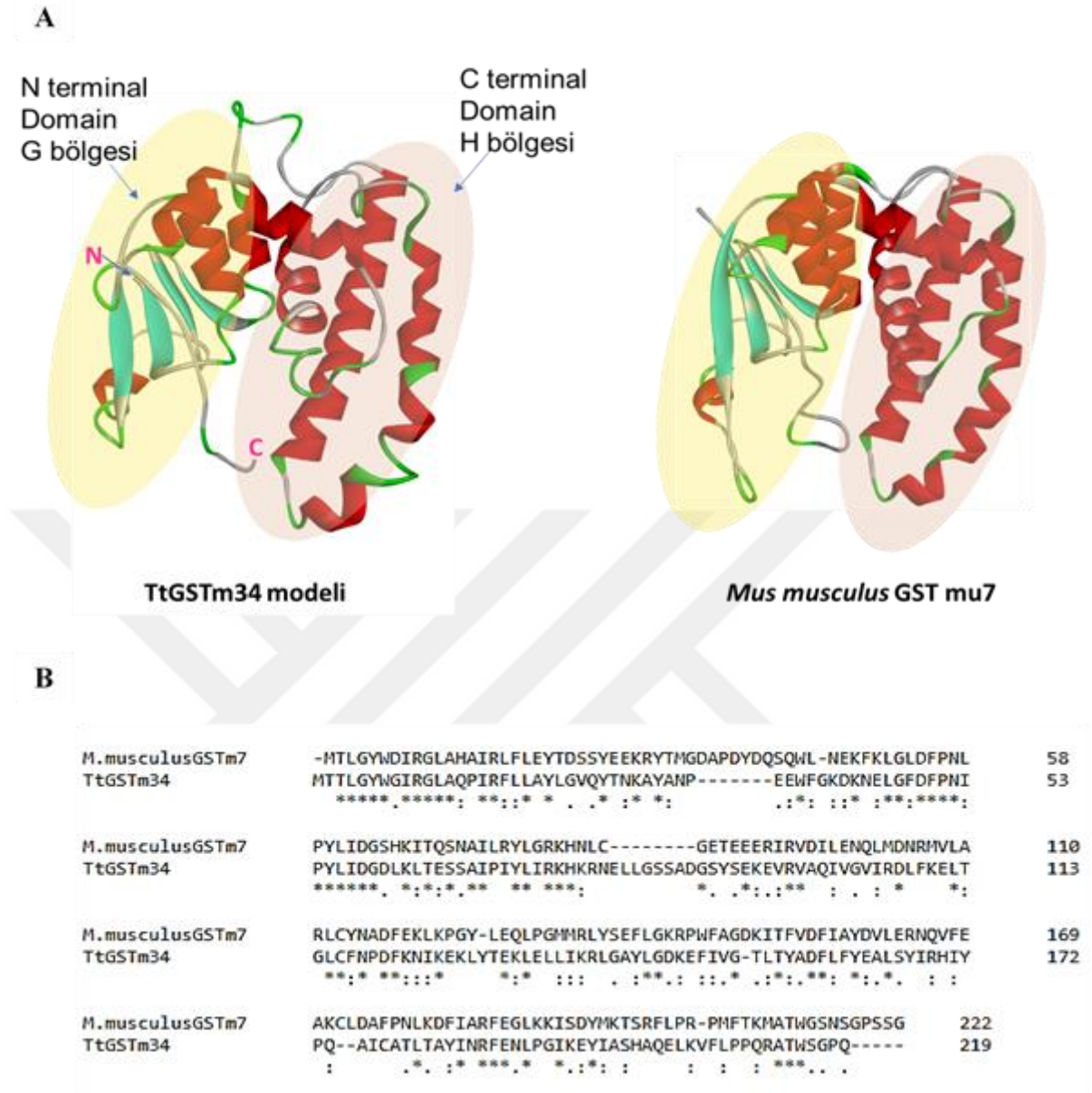
Rekombinant *TtGSTm34-8xHis* enziminin oda sıcaklığı, 4°C buzdolabı ve -20°C'de 12 ay boyunca aralıklarla enzim aktivitesi 2.1.3'te anlatıldığı gibi takip edilerek ölçülmüş ve sonuçlar Tablo 3.4'te verilmiştir. Tablo'da görüldüğü gibi 2 gün oda sıcaklığında bırakılmış olan enzimde %82'lik bir aktivite kaybı gözlenirken, 4°C'de 10. gününde %33'lük bir aktivite kaybı oluşmuştur. -20°C'lik derin dondurucuda 6 ay sonunda %23'lük, 12 ay sonunda ise %39'luk bir aktivite kaybı oluşmuştur.

Tablo 3.4. Enzim kararlılığı testleri. Zamana ve sıcaklığa bağlı olarak TtGSTm34-8XHis enziminin aktivitesinin değişimi (Optimum GST reaksiyon şartları 25°C’de, pH:7.0’de ve 200 mM potasyum fosfat tamponunda).

Zaman	Muhafaza Sıcaklığı	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Kayıp
0 gün	Oda sıcaklığı (25°C)	453	-
2 gün	Oda sıcaklığı (25°C)	78	82
10 gün	Buzdolabı (4°C)	302	33
6 ay	Derin dondurucu (-20°C)	348	23
12 ay	Derin dondurucu (-20°C)	275	39

3.2.7. TtGSTm34-8xHis proteinin 3 boyutlu Homoloji modeli

TtGSTm34’ün 3 boyutlu homoloji katlanma modeli, 2.2.8’de anlatılan aşamalarla oluşturulduktan sonra Şekil 3.15’te kalıp olarak kullanılan *Mus musculus* GSTMu7’nin protein yapısıyla beraber sunulmuştur. Bu iki proteinin aminoasit dizilerinin dikey hizalaması, %43’lük bir amino asit dizisel aynılığa sahip olduklarını göstermiştir. Tetrahymena GST’lerinin N-ucu bölgesi çoğunlukla bir $\beta 1\alpha 1\beta 2\alpha 2\beta 3\beta 4\alpha 3$ tiyoredoksin katlanması içerir. Şekil incelendiğinde, her iki proteininin N-ucu bölgesinde 4’er adet beta katlanma benzer şekilde görülürken, C-ucu bölgesinde ise 6 adet sarmal yapı bulunmakta olup toplamda 9’ar adet alfa katlanma görülmektedir. TtGSTm34 proteinine ait model Tetrahymena’da bulunan diğer GSTm üyelerine oldukça benzer şekilde katlanmaya sahiptir (Üstüntanır Dede ve Arslanyolu, 2019).



Şekil 3.15. TtGSTm34'in homoloji modellemesi. A. Kristal yapısı aydınlatılmış *Mus musculus* GSTMu7 (pdb ID: 2dc5) proteininin homoloji kalıbı olarak kullanılması ile TtGSTm34 proteininin homoloji modellemesi oluşturulmuştur. G bölgesi olarak gösterilen N-ucu domain glutasyon bağlanması ve H bölgesi olarak gösterilen C-ucu domaini ise CDNB gibi ksenobiyotiklerin bağlandığı bölgeler olup yüksek enzim aktivitesine uygun bir 3B katlanma modeli oluşmuştur. Proteinler homodimer olarak bulunmasına karşın şekilde sadece monomer yapıları verilmiştir. Mavi ile gösterilenler beta katlanmalar olup çizgi şeklinde, kırmızı ile gösterilenler ise alfa katlanmalar olup kurdele şeklinde verilmiştir. B. Protein data bankasından temin edilen *M. musculus* GSTmu7'nun peptid dizisi ile TtGSTm34'ün dizisi, Clustal Omega programı kullanılarak dikey hizalanmıştır.

4. TARTIŞMA

4.1. Bölüm 1- *T. thermophila*'nın CDNB Detoksifikasyonunda Görev Alan GST Enzimlerinin Belirlenmesi

4.1.1. CDNB toksisitesi ve enzim aktivitesi üzerine etkisi

Protistlerde ksenobiyotiklerle ilgili enzim aktivitesi ya da gen ekspresyonu çalışmaları ağır metal stresi ile sınırlıdır. Örneğin, Romero ve arkadaşlarına göre (2019), *T. thermophila* hücreleri 24 saat boyunca 20 µM ve 30 µM selenyum dozlarına maruz bırakıldığında GSTo1 ve GSTz2 genlerinin mRNA ekspresyonları önemli ölçüde artmıştır. *E. crassus*'ta ise 24 saat boyunca 50 µg/L Pb maruziyetinde GSTtheta ekspresyonu anlamlı bir artış göstermiştir (Kim ve ark., 2011). Benzer şekilde Cd ve Pb ile muamele edilen *Euglena gracilis*'te GST'lerin ekspresyonu sırasıyla 2,16 ve 1,59 kat artmıştır (Khatiwada ve ark., 2020). *Blepharisma japonicum* 6 saat süreyle ışıkla uyarıldığında BjGST1 ve BjGST2 genlerinin mRNA'larının ekspresyonları artmıştır (Takada ve Matsuoka, 2008). Tüm bu çalışmalara karşın ksenobiyotik bileşiklere karşı detoksifiye edici enzimler olan GST'lerle ilgili protistlerde yapılmış çalışmalar oldukça azdır. Bu çalışmada, *T. thermophila*'nın ksenobiyotik olan CDNB dozlarından 0,079 mM'nin (LD₅₀) altındaki dozlara direnç geliştirdiğini bulunmuştur.

CDNB'nin toksik olmayan dozları ile muamele edilen *T. thermophila*'larda kontrol grubuna göre (CDNB ile muamele edilmeyen hücreler) istatistiki olarak anlamlı daha yüksek toplam GST aktivitesi bulunmuştur. *T. thermophila*, genomunda bulunan GST gen kapasitesini ile 3 saatte oluşan 0.018 mM CDNB doz toksisitesini, 6 ve 9 saatlerde detoksifiye edebilen bir biyolojik cevap oluşturmuştur. CDNB'nin 0.036-0.145 mM doz aralığı ile 3 saat muamele edilen hücrelerde, hücre canlılığı yüksek olmasına karşın hayatta kalma oranları 6 ve 9. saatte, hücre ölümleriyle keskin bir şekilde azalmıştır.

T. thermophila hücrelerinin 3., 6. ve 9. saatte en düşük üç CDNB dozuyla muamelesi, toplam hücresel GST aktivitesinde ılımlı bir artış sağlarken hücre sağkalımını da kısmen arttırmıştır. Glutatyon affinitesi ile saflaştırılmış toplam GST'lerin spesifik aktivitelerinde değişimler veya bu GST'leri kodlayan genlerin mRNA ekspresyon seviyelerinin en düşük iki dozda düşük çıkması, detoksifikasyon regülasyonunun düşük dozlarda protein miktarı veya post-translasyonel modifikasyonlar ile gerçekleştirildiğini

işaret etmektedir. CDNB'nin 0.072 mM dozu ile muamele edilen hücrelerin toplam GST aktivitesi, afinitik saflaştırılmış GST'lerin spesifik aktivitesini ve TtGSTm19 ile TtGSTm34'ün mRNA ekspresyonunu arttırmış olmasına karşın zamana bağlı hücre hayatta kalma oranlarının %50'lere kadar düşmesine engel olamamıştır. Bu iki fazlı doz yanıtı (biphasic response); sodyum arsenatın düşük bir dozunun kültüre hamster hücrelerinin genel sağkalımı kontrole göre arttırması, daha yüksek dozunun ise daha düşük hayatta kalma oranlarına neden olduğu şeklinde rapor edilmiştir (Calabrese, 2013). Sığır filaryal paraziti (*Setaria cervi*) için de en düşük (10 µM) CDNB dozu, kontrol grubundan da yüksek hücre hayatta kalma oranını sağlarken daha yüksek doz (25 µM ve 50 µM) CDNB'nin 6 saatlik muamelesi ise sağkalımı sırasıyla % 76 ve % 90 azaltığı, benzer bir doz yanıtı olarak raporlanmıştır (Tiwari ve ark., 2015). Wareing ve arkadaşları (Wareing ve ark., 1993) tarafından CDNB toksisitesi üzerine yapılan bir çalışmada ise sekiz ay boyunca CDNB'ye maruz bırakılan CDNB'ye dirençli insan akciğer kanser hücrelerinin 25 µM CDNB'de büyüebildiğini bildirmişlerdir. *Escherichia coli* hücreleri 2 mM CDNB ile muamele edildiğinde, ilk 80 dakika canlı hücre sayılarında hiçbir değişiklik olmazken, sonrasında hücre canlılığında hızlı bir düşüş olduğu raporlanmıştır (Ness ve ark., 1997). Bahsedilen bu literatür bulgularına paralel şekilde, bu tez çalışmasında da *T. thermophila*'nın hayatta kalma oranı CDNB konsantrasyonu arttıkça azalmakta ve CDNB dozu azaldıkça artmaktadır (Şekil 3.1-A). Bu nedenle, CDNB muamelesinin, *T. thermophila* hücresinin genel hayatta kalma oranı üzerinde düşük doz uyarımı ve yüksek doz inhibisyon etkisi gösteren iki fazlı bir doz-yanıt eğrisine sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

CDNB'nin organizmalar üzerinde oksidatif strese neden olması; sadece GST enzim aktivitesi düzeyinde değil, aynı zamanda hücrel glutatyon seviyesinde oluşan düşüş ile gerçekleşmektedir. Örneğin; füzyon mayası *S. pombe* JY741 hücreleri, CDNB gibi bir oksidan ile muamele edildiğinde hücre içi GSH konsantrasyonu azalmış ve hücrel GSH oranı % 10'un altına düştüğünde süperoksit radikal üretimi artması nedeniyle, hücre hayatta kalma oranı kontrol grubuna göre % 10'a kadar düşmüştür (Mutoh ve ark., 2005). Su ortamındaki kirletici maddelere yüksek seviyede maruz kalan siliatlar, yüksek metabolik aktivite ve küçük hücre hacminden dolayı ksenobiyotik stresine karşı hızlı yanıt verme becerisi geliştirmiş olabilirler (Nałęcz-Jawecki, 2013). Örneğin; fosforamidat (Benbouzid ve ark., 2014) ile muamele edilen *Paramecium aurelia* hücreleri ile sipermetrine maruz bırakılan *D. melanotictus* kurbağa yavrularında (David

ve ark., 2012), GST aktivitesinde önemli bir artış olmuştur. Bu tez çalışmasında kullanılan en düşük CDNB dozu hipotetik olarak, *T. thermophila*'da hücre sağkalımını indükleyici doz olup hücrel GSH kullanımını veya üretimini artırıcı bir etkiye neden olabilir. Daha yüksek CDNB doz muamelesinde ise sadece GSH'ın GST'lerce hızlı bir şekilde CDNB'ye konjugasyonu ile tüketilmesi değil, aynı zamanda TtGST'leri konjugasyon reaksiyonu ile meşgul ederek de oksidatif stresi arttığı öne sürülebilir. Her ne kadar bu tez çalışmasında, Awashthi ve arkadaşlarının (1981) raporladığı gibi, CDNB muamelesinin GSH tüketimine yol açtığı deneysel olarak gösterilemese de *T. thermophila* hücrelerinin oksidatif stresi TtGSTm19 ve TtGSTm34 enzimlerinin gen ekspresyonlarını ve enzimatik aktivitelerini arttırarak, olasılıkla transkripsiyonel ve translasyon sonrası modifikasyonlarla regüle ettikleri sonucuna varılmıştır.

4.1.2. Protein kimliklendirilmesi

GSH affinite tanecikleri ile saflaştırılan *T. thermophila* GST'lerinden 24 kDa olanının 2D-SDS-PAGE jeli ile proteinleri spotlarına ayrıştırılarak, MALDI-ToFF MS/MS analizine alındığında, TtGSTm34 geni (NCBI GeneBank no: XP_001020129.1) olduğu kimliklendirilmiştir. TtGSTm34 geninin CDNB'nin toksik olmayan dozlarına karşı aktivite artışı olarak vermiş olduğu cevap, mRNA kopya sayısında artış olarak da Realtime PCR deneyi ile teyit edilmiştir. Böylelikle *T. thermophila* genomunda bulunan 70 farklı GST enzim kodlayan genlerden hangisinin GST'lerin genel substratı olan sentetik CDNB kimyasalını en iyi kullanabileceği, gen hedefleme yöntemiyle (gene targeting) TtGSTm34 olarak belirlenmiştir.

MALDI-TOF MS/MS bulguları, TtGSTm19 ve TtGSTm34'ün ksenobiyotik CDNB'nin farklı dozlarına farklı izoformlarıyla cevap oluşturduğunu göstermektedir. Proteinlerin büyük çoğunluğu translasyondan sonra amino asit dizilerinde ve/veya amino asitlerde 200'den fazla değişik şekilde modifiye edilirler (Walsh.,2006). Proteinlerde gerçekleştirilen bu post-translasyonel modifikasyonlar (PTMs) genellikle protein fonksiyonu, aktivitesini, hücrel lokalizasyonu ve diğer proteinler ile etkileşimleri düzenleyen kovalent değişikliklerdir (Wang ve ark., 2014). PTM'lerden fosforilasyon, asetilasyon, deaminasyon, alkilasyon ve sistein oksidasyonu ile fonksiyonel grupların eklenmesi, çıkarılması ya da değiştirilmesi hem protein kütlelerinde hem de pI'sında farklılaşmalara yol açar, böylece 2D jelde birçok PTM açısından farklı izoformlarla karşılaşılabilmektedir. Bu nedenle; bu tez kapsamında elde edilen bulgularda gözlemlenen

izoformların olası modifikasyonlarını literatür ışığında değerlendirmek, CDNB'ye karşı GST'ler ile oluşturulan hücrel tepkinin nasıl regüle edilebileceğini anlamamızı kolaylaştıracaktır.

GST'lerin fosforilasyona (Nicholson ve ark., 1993), metilasyona (Johnson ve ark., 1992), glikolizasyona (Kuzmich ve ark., 1991) ve asetilasyona (Shore ve ark., 1995) uğradığı raporlanmıştır. Bu modifikasyonlardan enzim aktivitesini sinyal yolları üzerinden regüle edilmesine yardımcı olan fosforilasyon, en sık karşılaşılan post-translasyonel modifikasyondur (Khoury ve ark., 2011). NetPhos yazılımı kullanarak yaptığımız biyoinformatik incelemede; TtGSTm19'da 2 serin, 3 treonin ve 5 tirozinin, TtGSTm34'de ise 4 serinin, 2 treonin ile 3 tirozinin fosforile edilebileceği öngörülmüştür (Şekil 4.1). Post-translasyonel modifikasyonların belirlenmesi Edman degradasyonu, isotopik etiketleme ya da immünokimyasal yollarla yapılabilmektedirler, ancak en etkili ve günümüzde sıklıkla kullanılan yöntem yüksek hassasiyeti, kompleks protein karışımlarının dahi PTM'leri saptayan LC MS/MS yöntemidir. Bu tez çalışmasının bulguları; gelecekte bu analiz ile Tetrahymena'nın CDNB ksenobiyotiğe karşı GST enzimlerinden TtGSTm19 ve TtGSTm34'de gerçekleştirmiş olduğu modifikasyonların neler olduğunun araştırılmasını tavsiye etmektedir. Böylece, değişik CDNB dozlara karşı TtGSTm34 ve TtGSTm19'un 2D jel elektroforezindeki spot izoformlarının nasıl bir regülasyon mekanizması ile oluştuğunu anlayabiliriz.

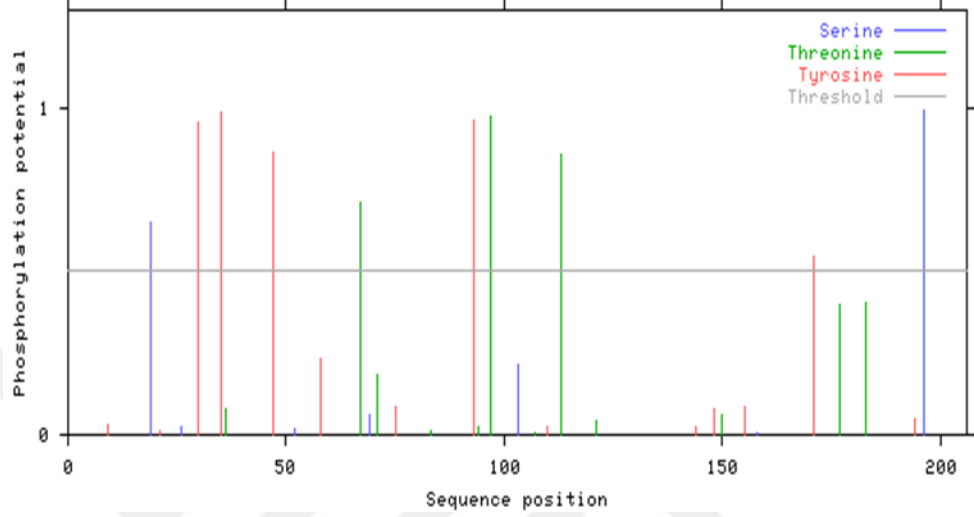

```

TtGSTm19
MADKIVLGYWAGPGKAQPSRYLLEISGVKYEVRVYTNPADWFGKDYALGLSFPNLPYLLDGDVKITESETIFDYLIHRL 80
NKTELLGKDNDKRYTVDTLRNLFSDIGTRLYMLTQKEGDDKT KFLNEQVLPKIKIDHFKPLGHKEYLLGYFTAADLYFLSFA 160
RGFKANLPEAYKEFAATFDPLVTRLEAI PQIAAYISEKRHP 240
.....S.....Y...Y.....Y.....T..... 80
.....Y...T.....T..... 160
.....Y.....S..... 240

```

Phosphorylation sites predicted: Ser: 2 Thr: 3 Tyr: 5

NetPhos 2.0: predicted phosphorylation sites in XP 00102762



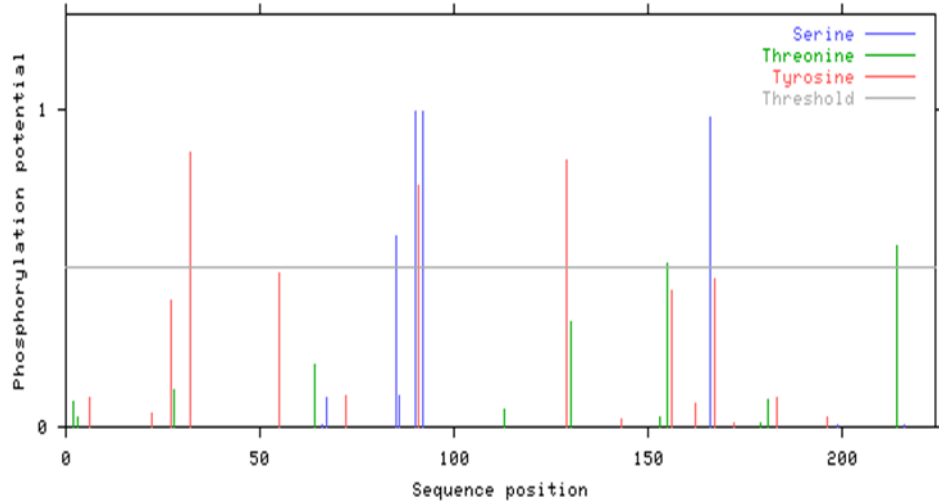
```

TtGSTm34
MTILGYWGIRGLAQPIRFLLAYLGVOYTNKAYANPEEFKDKONELGDFD PNIPLYIDGDLKLTSSAIP IYLIRKHKRN 80
ELLGSSADGSYSSEKEVRVAQIVGVIRDLFKE LTGLCFNPDFKNIKE KLYTEKLELL IKRLGAYLGDKEFI VGLTLYADFL 160
FYEALSYIRHIY PQAI CATLTA YINR FENLPGIKEY IASHAQELKV FLPPQRATW SGPO 240
.....Y..... 80
.....S.....SYS.....Y.....T..... 160
.....S.....T..... 240

```

Phosphorylation sites predicted: Ser: 4 Thr: 2 Tyr: 3

NetPhos 2.0: predicted phosphorylation sites in XP 00102012



Şekil 4.1. NetPhos yazılımı yardımıyla TtGSTm34 ve TtGSTm19 üzerinde olası fosforillenme bölgelerinin tayini

4.1.3. TtGSTm19 ve TtGSTm34 genlerinin ekspresyon analizi

Real-Time PCR ile 9 saatlik CDNB muamelesinde TtGSTm19 ve TtGSTm34'ün mRNA ekspresyonunda gözlemlenen istatistiksel olarak önemli artışlar, bu genlere dizisel homoloji gösteren TtGSTm20 ve TtGSTm32 genlerinin de mRNA ekspresyonları ile kontamine olmuş olabilir (EK7). Ancak TtGSTm20 ve TtGSTm32 genleri stressiz ortamda Real-Time PCR analizinde negatif kontrol genleri olarak kullanılan TtGSTm13 ve TtGSTm49 genleri gibi düşük mRNA kopya sayılarına sahiplerdir (Şekil 3.4-C). CDNB stresinde ise TtGSTm13 ve TtGSTm49 genlerinin ekspresyonunda bir artış gözlenmemektedir. Eğer mRNA ekspresyonunda homolog olan genlerden bir kontaminasyon olduğu düşünülürse, bu sınırlı bir kontaminasyondur çünkü MALDI-TOF MS analizlerinde bu homolog genlere ait olabilecek proteinlerdeki spesifik peptidlere rastlanmamıştır. Bu nedenle; CDNB stresine karşı TtGSTm19 ve TtGSTm34 mRNA ekspresyon profillerindeki artışın, bu genlerinden regülasyonu ile biyolojik bir cevaptan kaynaklandığı ortaya çıkmaktadır.

4.2. Bölüm 2- TtGSTm34 Geninin Homolog Olarak Rekombinant Klonlanması, Ekspresyonu ve Enzimatik Karakterizasyonu

4.2.1. TtGSTm34 geninin klonlanması, homolog ekspresyonu ve saflaştırılması

TtGSTm34 proteinini kodlayan kodonların kullanım frekansları Salim ve ark., (2008) göre incelenmiş ve nadir bir kodon bulundurmadığı, dolayısıyla kodon optimizasyonu yapılmaksızın rekombinant protein üretiminde kullanılmaya uygun olduğu sonucu varılmıştır. Ökaryotik silli-tek hücreli *Tetrahymena thermophila*'nın Glutasyon S transferaz mu 34 (TtGSTm34) geninin protein kodlayıcı dizisi TtGSTm34-8xHis formunda düzenlenerek, yine bu organizmada (=homolog olarak) 25-27 kDa'luk rekombinant enzim olarak üretilmiştir.

TtGSTm34 enzimi; 657 bp kodlayıcı diziden transle edilen 219 aminoasitlik (histidin takısız olarak) bir uzunlukta olup 25 kDa büyüklüğündedir. Benzer dizi uzunluğu ile bir çok GST enzimi literatürde raporlanmıştır; örneğin *Penaeus monodon kaplan karidesi* (219 aa, 25.5 kDa) (Wang ve ark., 2016), *Haemaphysalis longicornis-asya kenesi* (223 aa, 25.7 kDa) (Hernandez ve ark., 2018), *Litopenaeus vannamei-pasifik karidesi* (215 aa, 25.18 kDa) (Contreras-Vergara ve ark., 2004), rbGSTmu1-tavşan (218 aa, 25.4 kDa) (Lee ve ark., 1995), *Thais clavigera*- kaya kabuklusu (217 aa, 26 kDa) (Rhee ve ark., 2008), *Rutilus frisii* kutum- Hazar balığı (625 aa, 25.6 kDa) (Ahmadi ve

ark., 2020) benzer özelliklere sahiptir. Evrimsel olarak GST'ler, oksidatif stresin gelişmesine yanıt olarak tiyoredoksin benzeri bir atadan evrimleşen çok eski bir protein üst ailesini oluştururlar (Sheehan ve ark., 2001). TtGSTm34'ün N-terminalinde bulunan benzer tiyoredoksin katlanması da *Mus Musculus GST Mu 7* proteinine yüksek homoloji göstermiştir (Şekil 3.15).

TtGSTm34-8xHis rekombinant proteini hem Ni-NTA hem de GSH boncuklarıyla yaklaşık %80 saflıkta saflaştırılabilmektedir. Saflaştırma oranını %99'a çıkartabilmek için bu rekombinant protein önce Ni-NTA boncuklarıyla histidin afinitesinden, sonra ise glutatyon boncuklarıyla proteinin G bölgesinin Glutatyon afinitesinden yararlanılmış, çift afiniteli saflaştırma başarıyla gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.8'ki çift afinite saflaştırma basamaklarındaki proteinlerin analiz jeline bakıldığında son yıkama aşamasında bir miktar rekombinant protein kaybedilse de son elüsyon kuyularındaki protein saflığı istenen miktarda elde edilmiştir. Tablo 3.2 çift affinite saflaştırma sonrası ilk baştaki protein lizatına kıyasla son elüsyondaki proteinin yaklaşık olarak 3000 kat daha saf elde edildiğini göstermektedir. Rhee ve ark., (2008) *Thais clavigera* GST mu genini *E. coli*'de rekombinant olarak ürettikten sonra proteini Ni-NTA kolonundan geçirmişler ve başlangıca göre 4.8'lik bir saflaştırma katına ulaşmışlardır. Tablo 3.2'de görüldüğü üzere TtGSTm34 proteinin ilk basamak olan Ni-NTA saflaştırmasında 38 katlık bir saflaştırma elde edilmiştir.

4.2.2. Rekombinant enzimin optimum koşullarının belirlenmesi, Kinetik sabitleri ve inhibitörlerin aktiviteye etkisi

Enzim kinetiği araştırması için bu tez çalışması kapsamında, öncelikle rekombinant enzimin optimum sıcaklık, pH ve iyonik şiddeti sağlayacak aktivite tampon şartları belirlenmiştir. TtGSTm34 optimum olarak pH 7.0'de, 200 mM fosfat tamponunda ve 25°C'de en yüksek aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. TtGSTm34-8xHis enzim aktivitesine; CuSO₄, CdCl₂ ve Etakrinik asitin (ECA) çeşitli dozlarının inhibisyon etkisi incelenmiş ve Etakrinik asitin en yüksek inhibisyona neden olduğu gözlenmiştir. Wongtrakul ve ark., (2005) Sıtma GST'sinin (AdGSTD3-3) enzim aktivitesine 0.001 mM ECA'nın %35 inhibisyon ile inhibe ettiğini raporlamıştır. Bu tez çalışmasında ise ECA'nın en düşük dozu olan 0.01 mM dozu TtGSTm34 aktivitesinin %76'sını inhibe etmiştir. ECA'nın TtGSTm34'ün aktivitesi üzerindeki inhibe edici etkisi, muhtemelen inhibitörün enzime bağlanan GSH'ın SH-grubu ile doğrudan reaksiyonundan

kaynaklanmaktadır. Bir diğer ifadeyle; ECA, glutatyon ile konjugat oluşturan bir keton parçasına sahiptir (Wongtrakul ve ark., 2005). Bu ECA-GSH bağlanma inhibisyon reaksiyonu ise termodinamik olarak CDNB'nin GSH'a konjugasyonundan daha çok tercih edilir. Bu nedenle; ECA CDNB'ye göre daha güçlü GSH tüketim ajanı olarak davranış gösterir ve serbest GSH bulunmadığı için enzim aktivitesi düşer. Ağır metal iyonlarından CuSO₄ ve CdCl₂'ün TtGSTm34 üzerinde inhibisyon etkilerine bakıldığında CuSO₄'ün 12.5, 25 ve 50 µM'lık dozlarının aktivite üzerinde sırasıyla %32, %36 ve %38'lik bir inhibisyon etkisi gözlenmiştir. Bakır (Cu²⁺) GST üzerindeki sülfhidril oksidasyonunu kolayca kataliz ettiğinden GST inhibisyonuna neden olur. Qin vd., (2013) tarafından 50 µM'lık CuSO₄'ın *Locusta migratoria-Afrika çekirgesi*'de %80'lik bir inhibisyon etkisine sahip olduğu raporlanmıştır. Çalışmamızda kullandığımız bir diğer ağır metal iyonu ise kadminyumdur. Ancak CdCl₂'nin en yüksek dozu olan 15 µM'lık dozu bile kontrol grubuna göre anlamlı bir inhibisyon etkisi göstermemiştir. Çok daha yüksek doz olan 0.2 mM CdCl₂'ün bile GST aktivitesini sıçan karaciğerinde % 37 inhibe edebilmiştir (Dierickx, 1982). TtGSTm34'ün rekombinant üretimi için transformant hücrelerin indüksiyonu finalde 5 µg/ml, yani ~ 10µM CdCl₂ ile gerçekleştirilmekte olup, 10 µM CdCl₂ konsantrasyonunun sadece %20'lik düşük bir inhibisyon etkisi bulunmasından dolayı rekombinant çalışmalar için uygun olduğu teyit edilmiştir.

TtGSTm34-8xHis'in 453 U/mg'lik spesifik aktivitesi *Macrobrachium vollenhovenii* GST'sinin 12.36 U/mg (Adewale ve Afolayan, 2005), *Ruditapes decussatus* GST'sinin 361 U/mg (Hoarau ve ark., 2002) ve *Bombyx mori* GST'sinin 5.31 U/mg'lık (Yamamoto ve ark., 2012) spesifik aktivitelerinden daha yüksek olup hem enzimin etkinliğinin hem de iki aşamalı afinitik saflaştırmanın yetkinliğini işaret etmektedir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Çeşitli organizmalardan elde edilen GST'lerle TtGSTm34'ün kinetic sabitlerinin karşılaştırılması

Organizma	K _m (GSH)	K _m (CDNB)	K _{cat} /K _m (CDNB)	Spesifik Aktivite ($\mu\text{molmin}^{-1}\text{mg}$ protein^{-1})	Referans
<i>Tetrahymena thermophila</i>	0.54	0.47	407.7	453	Bu çalışma
<i>Litopenaeus vannamei</i>	0.3350	0.3904	642.93	440.12	(Contreras-Vergara ve ark., 2007)
<i>Macrobrachium vollenhovenii</i>	1.31	2.03	10.1	12.36	(Adewale ve Afolayan, 2005)
<i>Homo sapiens</i>	-	5.8	7.9	7.5	(Hubatsch ve ark.,1998)
<i>Ruditapes decussatus</i>	1.75	2.88	81.34	361	(Hoarau ve ark., 2002)
<i>Bombyx mori</i>	0.52	0.48	4.46	5.31	(Yamamoto ve ark.,2012)

K_m değeri enzimin substrata ilgi-bağlanabilme (afinitesi) hakkında bilgi verir. Düşük K_m değeri, substrat için yüksek afinite anlamına gelir. Böylece düşük K_m'ye sahip enzim düşük substrat konsantrasyonunda maksimum hıza ulaşır ve enzim sature olur. 10 mM ve üstü K_m değerleri yüksek (zayıf bağlanmayı temsil eder) iken bunun altındaki K_m değerleri düşük (güçlü bağlanmayı temsil eder) olarak tanımlanır (Berg ve Tymoczko, 2002). BRENDA enzim veritabanında bulunan diğer GST enzimlerinin kinetik değerleri ile rekombinant TtGSTm34 enzimin değerleriyle karşılaştırıldığında, TtGSTm34'nin hem Glutatyona hem de CDNB substratlarına karşı daha düşük K_m değerlerine (0,54 mM ve 0,47 mM) sahip olmasından dolayı bu substratlara daha yüksek afinite ile bağlandığı bulunmuştur. Örneğin *M. edulis* GSTpi geni rekombinant olarak ekspres edilmiş, bu enzimin CDNB için K_m değeri 0.68 mM ve V_{max}'ı 103 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ olduğu bildirilmiştir (Yang ve ark., 2004). Bir diğer çalışmada, *Rud tapes* kabuklusundan rekombinant olarak üretilen RpGST μ proteininin biyokimyasal özellikleri karakterize edilmiş, proteinin Glutasyon ve CDNB'ye ilgisi, K_m cinsinden sırasıyla 1.03 mM ve 0.56 mM bulunmuştur. Bu enzimin CDNB substrat ile gerçekleştirilen aktivite testinde, GST aktivitesi ise 3.19 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ raporlanmıştır (Bathige ve ark., 2014).

TtGSTm34-8xHis enziminin GSH'a karşı yüksek afiniteye sahip olması, aynı zamanda enzimin GSH afinitik boncuklar ile saflaştırılması esnasında saflaştırma verimliliği arttıran bir faktör olduğu böylelikle ortaya çıkmıştır. TtGSTm34-8xHis'nin bu özelliği ise rekombinant DNA teknolojilerinde *T. thermophila* veya diğer protein üretim konakçılarında üretilecek füzyon proteinler içinde GST affinitik takısı olarak kullanılabilineceğini tavsiye etmektedir. CDNB substratına karşı göstermiş olduğu yüksek afüfinitite ise TtGSTm34-8xHis enziminin GST enzim aktivite kitlerinde

kullanımı durumunda, çok düşük mg miktarlarının bile, enzim aktivite reaksiyonlarında yeterli olabileceğini de göstermektedir. TtGSTm34-8xHis enziminin saniyede substrattan ürün üretme hızı olarak bilinen K_{cat}/K_m değerlerinin yüksekliği, ilaç endüstrisinde bazı kimyasal yapıların enzimatik transformasyonunda kullanılabileceğini işaret etmektedir. TtGSTm34 proteininden elde ettiğimiz bu yüksek GST aktivitesi onun hem ticari bir enzim olarak hemde Enzim Kinetik kitlerinde kullanılabileceğini ortaya çıkarmış olduğundan bu amaçla piyasada satılan ticari enzimlerin aktiviteleri ile bir karşılaştırma analizi yapılmıştır (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Ticari olarak satılan GST enzimleri ile TtGSTm34-8xHis rekombinant enziminin aktivite karşılaştırılması Kinetik sabitleri (* Optimum GST reaksiyon şartları 25°C'de, pH:7.0'de ve 200 mM fosfat tamponunda)

GST (Firma adı)	Spesifik Aktivite (μmolmin^{-1} mg protein^{-1})	Kaynak
<i>Schistosoma japonicum</i> GST (LSBio, Cat no: LS-G627)	2.8 - 3.3	<i>E. coli</i>
<i>Schistosoma japonicum</i> GST (MyBioSource, Cat no: MBS203158)	>20	<i>E. coli</i>
Recombinant human Glutathione S Transferase alpha 1 protein (Abcam, Cat no: ab167981)	5 - 8	<i>E. coli</i>
Recombinant human GSTM2 protein (Abcam, Cat no: ab168017)	<25	<i>E. coli</i>
Recombinant mouse Glutathione S Transferase mu protein (Abcam, Cat no: ab168035)	<11	<i>E. coli</i>
GSTM1 glutathione S-transferase (Creative Biomart, Cat no: GSTM1-2473H)	68.9	<i>E. coli</i>
Recombinant Human Glutathione S-transferase Mu 5 Protein (Novusbio, Cat no: NBP2-52145)	>90	<i>E. coli</i>
Rekombinant TtGSTm34-8xHis	453^x	<i>T. thermophila</i>

Tablo 4.2'de verilen ticari GST enzimlerinin aktiviteleri ile karşılaştırıldığında TtGSTm34'ün oldukça yüksek olan aktivitesi, enzimin homolog olarak *Tetrahymena thermophila*'da rekombinant üretimi nedeniyle tüm translasyon modifikasyonlara sahip olmasıyla açıklanabilir.

Enziminin değişik şartlar ve sürelerde yapılan raf ömrü analizleri (Tablo 3.4) ise hızlı degrede olmayan ve oda ısısında enzim aktivitesini belirli sürelerle muhafaza edebilen özellikte olduğunu göstermiştir. -20°C'de, 1 yıl, gliserol ve fosfat tamponu içinde muhafaza edilen TtGSTm34 enzim stokları, enzim aktivitesinin sadece %39'luk kısmını kaybetmiş olup aktif ve kararlılığını sürdürmektedir. TtGSTm34 enzimi, 10 gün

+4 °C'de muhafaza edildikten sonra ise aktivitesinde yaklaşık %33'lük bir kayıp oluşmuştur. Oda sıcaklığında 2 gün muhafaza edilen enzim ise aktivitesinden %82 oranında kaybetmekte olmasına karşılık, kalan 78 U/mg'lık spesifik aktivitesi ile piyasadaki ticari enzimlerle yarışabilir düzeydedir.



5. SONUÇ

Tetrahymena thermophila'nın sentetik CDNB kimyasalına karşı antioksidan mekanizmasının Faz II enzimlerinden birisi olan GST enzimi özelinde oluşturabileceği cevap bu tez kapsamında araştırılmış olup, CDNB için *T. thermophila* üzerinde LD₅₀ dozu 0.079 mM bulunmuştur. Bu doz ve altında, hücrelerin canlılığı korunurken, genomunda bulunan 70 adet GST üyesinden TtGSTm19 ve TtGSTm34 hem transkripsiyonel hem de translasyonel olarak düzenlenerek, biyolojik cevabın oluşmasında katkıda bulunmuşlardır. TtGSTm34 geninin detoksifikasyonda nasıl bir rol oynadığının aydınlatılması için *Tetrahymena*'da klonlanıp ekspresyonuyla saflaştırılan rekombinant enzimin kinetik karakterizasyonu gerçekleştirilmiş ve 453 U/mg gibi yüksek bir enzim aktivitesine sahip olan proteinin aynı zamanda hem GSH'a hem de CDNB'ye oldukça düşük K_m değerleriyle yüksek afinitesi olduğu ortaya çıkarılmıştır.

TtGSTm34-8xHis'in yüksek aktiviteye sahip olması enzimin ticari olarak kullanılabilirliğini ortaya çıkartmıştır. CDNB'nin substrat olarak kullanıldığı enzim aktivite deneylerinde enzimin çok düşük miktarlarında bile (0,00046 mg) Delta optik yoğunluk (O.D absorbans) değişimi 0,1 olmasını sağlamıştır. Zamana bağlı olarak gözlenen bu ideal absorbans değişimi rekombinant enzimin çok küçük miktarının bile aktivite testlerinde kullanılabilmesini, böylece enzim kinetik reaksiyonlarında kullanım miktarını ve enzim üretim maliyetlerini düşüreceğini işaret etmektedir. Glutatyona olan yüksek affinitesi ise aynı zamanda TtGSTm34 proteininin rekombinant AR-GE çalışmalarında afinitik takı olarak kullanılabilirliği göstermiştir.

KAYNAKÇA

- Adewale, I. O., Afolayan, A. 2005. "Purification and catalytic properties of glutathione transferase from the hepatopancreas of crayfish *Macrobrachium vollenhovenii* (Herklots)". *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 18(6), 332–344.
- Ahmadi, S., Ghafouri, H., Tarazi, S., Sarikhan, S., Kh, O. S. 2020. "Cloning, purification and biochemical characterization of two glutathione S-transferase isoforms from *Rutilus frisii kutum*". *Protein Expression and Purification*, 179, 105800.
- Akpınar, G., Kasap, M., Canturk, N. Z., Zulfigarova, M., Islek, E. E., Guler, S. A., Simsek, T., & Canturk, Z. 2017. "Proteomics analysis of tissue samples reveals changes in mitochondrial protein levels in parathyroid hyperplasia over adenoma". *Cancer Genomics and Proteomics*, 14(3), 197–211.
- Alberti, G., ve ark. 1996. "Glutathione S-transferase M1 genotype and age-related cataracts lack of association in an Italian population," *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 37(6), 1167-1173.
- Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., Federici, L. 2018. "Glutathione transferases: Substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases". *Oncogenesis*, 7(1).
- Asai, D.J. ve J.D. Forney, 2000." *Tetrahymena thermophila*. *Methods in Cell Biology*", ed. L. Wilson and P. Matsudaira. Vol. 62., Academic Press.
- Aslan, E. ve Arslanyolu, M. 2015. "Identification of neutral and acidic deoxyribonuclease activities in *Tetrahymena thermophila* life stages". *Eur. J. Protistol*, 51, 173–185.
- Awasthi Yogesh. C., Garg, H. S., Dao, D. D., Partridge, C. A., & Srivastava, S. K. 1981." Enzymatic Conjugation of Erythrocyte Glutathione With 1-Chloro-2,4-Dinitrobenzene: The Fate of Glutathione Conjugate in Erythrocytes and the Effect of Glutathione Depletion on Hemoglobin". *Blood*. 58 (4), 733-738.
- Barchetta, S., La Terza, A., Ballarini, P., Pucciarelli, S., Miceli, C. 2008. "Combination of two regulatory elements in the *Tetrahymena thermophila* HSP70-1 gene controls heat shock activation". *Eukaryotic Cell*, 7(2), 379–386.

- Bathige, S. D. N. K., Umasuthan, N., Saranya Revathy, K., Lee, Y., Kim, S., Cho, M. Y., ... Lee, J. 2014. "A mu class glutathione S-transferase from Manila clam *Ruditapes philippinarum* (RpGST μ): Cloning, mRNA expression, and conjugation assays". *Comparative Biochemistry and Physiology Part-C: Toxicology and Pharmacology*, 162(1), 85–95.
- Benbouzid, H., Berrebbah, H., Berredjem, M., Djebar, M. R. 2014. "Induction of Oxidative Stress in *Paramecium Aurelia* Exposed To a Novel Phosphoramidate". *Fresenius Environmental Bulletin*, 23(12B), 3303–3307.
- Berg JM, Tymoczko JL, S. L. 2002. "The Michaelis-Menten Model Accounts for the Kinetic Properties of Many Enzymes.". İçinde *Biochemistry* (5th editio, s. Section 8.4). New York: W H Freeman.
- Board, P. G., Menon, D. 2013. "Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology". *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(5), 3267–3288.
- Bogaerts, P. ve ark. 2001 "Use of the Ciliated Protozoan *Tetrahymena pyriformis* for the Assessment of Toxicity and Quantitative Structure–Activity Relationships of Xenobiotics: Comparison with the Microtox Test", *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 49, 3, 293-301.
- Booth, J., Boyland, E. ve Sims P. 1961. "An Enzyme from Rat Liver Catalysing Conjugations with Glutathione" *Biochem. J.* 79, 516.
- Booth, W. T., Schlachter, C. R., Pote, S., Ussin, N., Mank, N. J., Klapper, V., ... Chruszcz, M. 2018. "Impact of an N-terminal polyhistidine tag on protein thermal stability". *ACS Omega*, 3(1), 760–768.
- Calabrese, E. J. 2013. "Biphasic dose responses in biology, toxicology and medicine: Accounting for their generalizability and quantitative features". *Environmental Pollution*, 182, 452–460.
- Contreras-Vergara, C. A., Harris-Valle, C., Sotelo-Mundo, R. R., Yepiz-Plascencia, G. 2004. "A mu-class glutathione S-transferase from the marine shrimp *Litopenaeus*

- vannamei: Molecular cloning and active-site structural modeling". *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 18(5), 245–252.
- Contreras-Vergara, C. A., Valenzuela-Soto, E., García-Orozco, K. D., Sotelo-Mundo, R. R., Yepiz-Plascencia, G. 2007. "A mu-class glutathione S-transferase from gills of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei*: Purification and characterization". *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 21(2), 62–67.
- Croom, E. 2012. "Metabolism of xenobiotics of human environments". İçinde *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (C. 112, ss. 31–88). Elsevier B.V.
- David, M., Marigoudar, S. R., Patil, V. K., Halappa, R. 2012. "Behavioral, morphological deformities and biomarkers of oxidative damage as indicators of sublethal cypermethrin intoxication on the tadpoles of *D. melanostictus* (Schneider, 1799)". *Pesticide Biochemistry and Physiology*.
- Díaz, S., Martín-González, A., & Carlos Gutiérrez, J. 2006. "Evaluation of heavy metal acute toxicity and bioaccumulation in soil ciliated protozoa". *Environment International*. 32(6), 711-717.
- Dierickx, P. J. 1982. "In vitro inhibition of the soluble glutathione S-transferases from rat liver by heavy metals". *Enzyme*, 27(1), 25–32.
- Dirr, H., ve ark. 1994. "X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases. Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function". *Eur.J. Biochemistry*. 220 645-661.
- Dourado, D., Fernandes, P., Ramos, M. 2008. "Mammalian Cytosolic Glutathione Transferases". *Current Protein & Peptide Science*, 9(4), 325–337.
- Eaton, D.L. ve Bammler, T.K. 1999. "Concise review of glutathione s-transferase and their significance to toxicology," *Toxicol Sci.*, 49, 156-164.
- Eklund, B.I., ve ark. 2002. "Screening for recombinant glutathione transferases active with monochlorobimane," *AnalBiochem.*, 309, 102-108

- Flanagan, J. U., Smythe, M. L. 2011. "Sigma-class glutathione transferases". *Drug Metabolism Reviews*, 43(2), 194–214.
- Frova, C. 2006. "Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives". *Biomolecular Engineering*. 23(4), 149–169.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. 1974. "Glutathione-S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation". *Journal of Biological Chemistry*. 249(22), 7130-7139.
- Gaertig, J., Gorovsky, M. A. 1992. "Efficient mass transformation of *Tetrahymena thermophila* by electroporation of conjugants". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(19), 9196–9200.
- Gunnarsdottir S ve ark. 2002." The glutathione-activated thiopurine prodrugs trans-6-(2-acetylvinylthio) guanine and cis-6-(2-acetylvinylthio) purine cause less in vivo toxicity than 6-thioguanine after single and multiple dose regimens". *Mol Cancer Ther*. 1: 1211-1220.
- Gutiérrez, J. C., Martín-gonzález, A., Díaz, S., & Ortega, R. 2003. "Ciliates as a potential source of cellular and molecular biomarkers / biosensors for heavy metal pollution Introduction: General concepts". *Cell*, 467(4), 461–467.
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., Jowsey, I. R. 2005. "Glutathione transferases". *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 51–88.
- Hearne, J.L., & Colman, R.F. 2006. "Contribution of the mu loop to the structure and function of rat glutathione transferase M1-1". *Protein Sci.*, 15, 1277–1289.
- Hernandez, E. P., Kusakisako, K., Talactac, M. R., Galay, R. L., Hatta, T., Matsuo, T., ... Tanaka, T. 2018. "Characterization and expression analysis of a newly identified glutathione S-transferase of the hard tick *Haemaphysalis longicornis* during blood-feeding". *Parasites and Vectors*, 11(1), 1–16.
- Hoarau, P., Garello, G., Gnassia-Barelli, M., Romeo, M., Girard, J. P. 2002. "Purification and partial characterization of seven glutathione S-transferase isoforms from the

- clam *Ruditapes decussatus*". *European Journal of Biochemistry*, 269(17), 4359–4366.
- Hong, Y., Liu, S., Lin, X., Li, J., Yi, Z., & Al-Rasheid, K. A. S. 2015. "Recognizing the importance of exposure–dose–response dynamics for ecotoxicity assessment: nitrofurazone-induced antioxidase activity and mRNA expression in model protozoan *Euplotes vannus*". *Environmental Science and Pollution Research*. 22, 544–9553.
- Hubatsch, I., Ridderström, M., Mannervik, B. 1998. "Human glutathione transferase A4-4: An Alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation". *Biochemical Journal*, 330(1), 175–179.
- Johnson, J.A., Finn, K.A. and Siegel, F.L. 1992. "Tissue distribution of enzymatic methylation of glutathione S-transferase and its effects on catalytic activity - 329 Methylation of glutathione S-transferase 11-11 inhibits conjugating activity towards 1-chloro-2,4-dinitrobenzene". *Biochemical Journal*,.282, 279-289.
- Kanaoka, Y., Ago, H., Inagaki, E., Nanayama, T., Miyano, M., Kikuno, R., ... Hayaishi, O. 1997. "Cloning and crystal structure of hematopoietic prostaglandin D synthase". *Cell*, 90(6), 1085–1095.
- Khatiwada, B., Hasan, M. T., Sun, A., Kamath, K. S., Mirzaei, M., Sunna, A., Nevalainen, H. 2020. "Proteomic response of *Euglena gracilis* to heavy metal exposure – Identification of key proteins involved in heavy metal tolerance and accumulation". *Algal Research*. 45, 101764.
- Khoury, G. A., Baliban, R. C., & Floudas, C. A. 2011. "Proteome-wide post-translational modification statistics: Frequency analysis and curation of the swiss-prot database". *Scientific Reports*.
- Kim, S. H., Jung, M. Y., & Lee, Y. M. 2011. "Effect of heavy metals on the antioxidant enzymes in the marine ciliate *Euplotes crassus*". *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 3(4), 213–219.

- Kim, Y. M., Park, K., Joo, G. J., Jeong, E. M., Kim, J. E., Rhee, I. K. 2004. "Glutathione-dependent biotransformation of the fungicide clorothalonil". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(13), 4192–4196.
- Kuzmich Sandra, Lisa A. Vanderweer and Kenneth D. Tew. 1991. "Evidence for a glycoconjugate form of glutathione S-transferase pI,". *International Journal of Peptide and Protein Research*. Volume 37, Issue 6, pages 565–571.
- Laemmli U.K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*. 227(5259): 680-5.
- Lee, S. H., Lee, Y. S., Han, J. S., Kim, Y. S., Koh, J. K. 1995. "Cloning and expression of a cDNA for mu-class glutathione S-transferase from rabbit liver". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 318(2), 424–429.
- Lineweaver, H., Burk, D. 1934. "The Determination of Enzyme Dissociation Constants". *Journal of the American Chemical Society*, 56(3), 658–666.
- Madoni, P., & Romeo, M. G. 2006. "Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists". *Environmental Pollution*. 141(1),1-7.
- Martín-González, A., Borniquel, S., Díaz, S., Ortega, R., & Gutiérrez, J. C. 2005." Ultrastructural alterations in ciliated protozoa under heavy metal exposure". *Cell Biology International*. 29(2) 119-126.
- Miao, W., Xiong, J., Bowen, J., Wang, W., Liu, Y., Braguinets, O., ... Gorovsky, M. A. 2009. "Microarray analyses of gene expression during the *Tetrahymena thermophila* life cycle". *PLoS ONE*. 4(2): e4429.
- Miller LC, Tainter ML. 1944. "Estimation of LD50 and its error by means of log-probit graph paper". *Proc Soc Exp Bio Med*. 57, 261.
- Murata-Hori, M., Fujishima, M. 1996. "Released substances from *Tetrahymena thermophila* arrest the cell cycle at G1 phase and removal of the substances induces highly synchronized cell division". *European Journal of Protistology*, 32, 481-489.

- Mutoh, N., Kawabata, M., Kitajima, S. 2005. "Effects of four oxidants, menadione, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, hydrogen peroxide and cumene hydroperoxide, on fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*". *Journal of Biochemistry*, 138(6), 797–804.
- Nałęcz-Jawecki G. 2013. "Protozoans in Ecotoxicology". In: Féraud JF., Blaise C. (eds) *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer, Dordrecht. ISBN 978-94-007-5040-1
- Nicholson, D.W., Ali, A., Vaillancourt, J.P., Kargman, S., Zamboni, R.J. and Ford-Hutchinson, A.W. 1993. "Purification to homogeneity of human leukotriene C-4 synthase: A unique homodimeric glutathione S-transferase comprised of 18 kDa subunits". *FASEB Journal*, 7, A217.
- Ness, L. S., Ferguson, G. P., Nikolaev, Y., Booth, I. R. 1997. "Survival of *Escherichia coli* cells exposed to iodoacetate and chlorodinitrobenzene is independent of the glutathione-gated K⁺ efflux systems KefB and KefC". *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10), 4083–4086.
- Overbaugh, J. M., Lau, E. P., Marino, V. A., & Fall, R. 1988. "Purification and preliminary characterization of a monomeric glutathione-S-transferase from *Tetrahymena thermophila*". *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 261(2), 227–234.
- Polekhina G, Board PG, Blackburn AC ve ark. 2001. "Crystal structure of maleylacetoacetate isomerase/glutathione transferase zeta reveals the molecular basis for its remarkable catalytic promiscuity". *Biochemistry*. 40, 1567-1576.
- Qin, G., Jia, M., Liu, T., Zhang, X., Guo, Y., Zhu, K. Y., ... Zhang, J. 2013. "Characterization and Functional Analysis of Four Glutathione S-Transferases from the Migratory Locust, *Locusta migratoria*". *PLoS ONE*, 8(3), 1–11.
- Rhee, J. S., Raisuddin, S., Hwang, D. S., Horiguchi, T., Cho, H. S., Lee, J. S. 2008. "A Mu-class glutathione S-transferase (GSTM) from the rock shell *Thais clavigera*". *Comparative Biochemistry and Physiology- C Toxicology and Pharmacology*, 148(3), 195–203.

- Romero, I., de Francisco, P., Gutiérrez, J. C., & Martín-González, A. 2019. "Selenium cytotoxicity in *Tetrahymena thermophila*: New clues about its biological effects and cellular resistance mechanisms". *Science of the Total Environment*, 671,850-865.
- Rostami-Hodjegan, A., Tucker, G. T. 2007. "Simulation and prediction of in vivo drug metabolism in human populations from in vitro data". *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(2), 140–148.
- Salim, H. M. W., Ring, K. L., Cavalcanti, A. R. O. 2008. "Patterns of Codon Usage in two Ciliates that Reassign the Genetic Code: *Tetrahymena thermophila* and *Paramecium tetraurelia*". *Protist*, 159(2), 283–298.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., Dowd, C. A. 2001. "Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily". *Biochem. J* (C. 360).
- Shishido, Y., Tomoike, F., Kimura, Y., Kuwata, K., Yano, T., Fukui, K., ... Abe, H. 2017. "A covalent G-site inhibitor for glutathione S-transferase Pi (GSTP1-1)". *Chemical Communications*, 53(81), 11138–11141.
- Shore LJ, Odell GB, Fenselau C. 1995. "Identification of an N-acetylated microsomal glutathione S-transferase by mass spectrometry". *Biochem Pharmacol*. 49(2):181-6.
- Takada Y, & Matsuoka T. 2008. "Relationship between two tandemly arranged and light-induced glutathione-S-transferase genes from the ciliated protozoa *Blepharisma japonicum*." *Microbiol Res*. 163(5):512-22.
- Tiwari, S., Wadhawan, M., Singh, N., Rathaur, S. 2015. "Effect of CDNB on filarial thioredoxin reductase: A proteomic and biochemical approach". *Journal of Proteomics*.
- Tong, Z., Board, P.G., Anders, M. W. 1998. "Glutathione transferase Zeta catalyses the oxygenation of the carcinogen dichloroacetic acid to glyoxylic acid". *Biochem J*. 331 (2): 371–374.
- Trielli, F., Amaroli, A., Sifredi, F., Marchi, B., Falugi, C., & Corrado, M. U. D. 2007. "Effects of xenobiotic compounds on the cell activities of *Euplotes crassus*, a single-

- cell eukaryotic test organism for the study of the pollution of marine sediments". *Aquatic Toxicology*, 83(4), 272–283.
- Trute, M., Gallis, B., Doneanu, C., Shaffer, S., Goodlett, D., Gallagher, E. 2007. "Characterization of hepatic glutathione S-transferases in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*)". *Aquatic Toxicology*, 81(2), 126–136.
- Üstüntanır Dede, A. F., & Arslanyolu, M. 2019." Genome-wide analysis of the *Tetrahymena thermophila* glutathione-S-transferase gene superfamily". *Genomics*. 111(4), 534-548.
- Xu, C., Li, C. Y. ve Kong, A. T. 2005. " Induction of Phase I, II and III Drug Metabolism/Transport by Xenobiotics". *Arch Pharm Res* Vol 28, No 3, 249-268.
- Wahner A.D ve ark. 2007." Glutathione S-transferase mu, omega, pi, and theta class variants and smoking in Parkinson's disease," *Neurosci. Lett.* 413 pp. 274–278.
- Walsh C. 2006. "Posttranslational modification of proteins : Expanding nature's inventory". Englewood, Colo.: Roberts and Co. Publishers. xxi, 490 p. p.
- Wang C.H., Peterson S. E., Loring J.F. 2014. "Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells". *Cell Research*. 24:143-160.
- Wang, Y., Liu, L., Huang, J., Duan, Y., Wang, J., Fu, M., Lin, H. 2016. "Response of a Mu-class glutathione S-transferase from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to aflatoxin B1 exposure". *SpringerPlus*, 5(1).
- Waering, C. J., Black, S. M., Hayes, J. D., Wolf, C. R. 1993. "Increased levels of alpha-class and pi-class glutathione S-transferases in cell lines resistant to 1-chloro-2,4-dinitrobenzene". *European Journal of Biochemistry*, 217(2), 671–676.
- Wongtrakul, J., Sramala, I., Prapanthadara, L. A., Ketterman, A. J. 2005. "Intra-subunit residue interactions from the protein surface to the active site of glutathione S-transferase AdGSTD3-3 impact on structure and enzyme properties". *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(3), 197–205.

- Yamamoto, K., Usuda, K., Kakuta, Y., Kimura, M., Higashiura, A., Nakagawa, A., ... Suzuki, M. 2012. "Structural basis for catalytic activity of a silkworm Delta-class glutathione transferase". *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1820(10), 1469–1474.
- Yang, H. L., Zeng, Q. Y., Li, E. Q., Zhu, S. G., Zhou, X. W. 2004. "Molecular cloning, expression and characterization of glutathione S-transferase from *Mytilus edulis*". *Comparative Biochemistry and Physiology- B Biochemistry and Molecular Biology*. 139(2), 175–182.
- Yang, X., Qian, K. 2017. "Protein O-GlcNAcylation: Emerging mechanisms and functions". *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(7), 452–465.
- Yilmaz, G., Arslanyolu, M. 2015. "Efficient expression of codon-adapted affinity tagged super folder green fluorescent protein for synchronous protein localization and affinity purification studies in *Tetrahymena thermophila*". *BMC Biotechnology*, 15(1), 1–9.
- Zilberg, D., Sinai, T. 2006. "Optimization and validation of a colorimetric assay for *Tetrahymena* sp. survival". *Research in Microbiology*, 157(4), 355–359.
- Zhang, X., Thompson, G.A. 1997. "An apparent association between glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and a sphingolipid in *Tetrahymena mimbres*". *Biochem. J.* 323, 197–206.

EKLER

EK 1. Deney Protokolleri

Toplam Protein İzolasyonu ve Saflaştırma

Toplam protein izolasyonu için önce hücreler bir veya iki gün süreyle büyütülür. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştığında sayılır. ~25 milyon hücre için 3 mL T-100B liziz tamponu (300 mM NaCl, 25 mM Tris H-Cl pH 7.5, %1 Triton X-100, 2 mM PMSF, 1 X Proteaz İnhibitör Kokteyli) kullanılır. Uygun miktarda hücre 1500 g'de 6' dk santrifüjlenerek (Allegra 25R™ Centrifuge, Beckman Coulter) peletlenir. Pelet 10' buzda bekletilir, ara ara pıt pıtlayarak karıştırılır. Sonra Bead beater ile 7.5 de 4' süreyle 0,2 µm çelik bilyeler ile homojenize edilir. Sonra 5' buzda inkübasyon edilir. Uygun tüplerde 13000 rpm, 4°C'de 20' süreyle santrifüjlenir. Süpernatant toplam protein içerir.

Glutathione Sepharose 4B ile GST proteinlerinin saflaştırılması

200 µl slurry (%50 boncuk, %50 boncukların saklandığı tamponu içeren karışım) öncelikli olarak PBS (pH 7.3) tamponu-Binding Buffer (1 ml) ile iki kez yıkanır. Bütün basamalarda santrifüj 500g'de 5 dk çevirilir. Hazır olan boncukların üzerine protein ekstraktından eklendikten sonra 45 dk. oda sıcaklığında çalkalamalı tablada inkübe edilir. Santrifüjden sonra süpernatanttan bir miktar FT (Flow-through) SDS_PAGE'e yüklemek üzere ayrılır. Boncuklar ise 3 kez PBS ile yıkanır. Sonrasında 100 µl elüsyon tamponu eklenip (10 mM Glutathione, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) 10 dakika oda sıcaklığında bekletilir ve santrifüj ile süpernatant saklanır.

Ni-NTA ile Afinitik Saflaştırma:

Ni-NTA saflaştırması Protino Ni-NTA Agaroz Tanecikleri (MACHEREY-NAGEL, Almanya) kullanılarak aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir.

40 ml lizata toplamda 10 ml (bed volüme) tanecik hacmine sahip boncuk kullanıldı. Bunun için 2 ayrı 50 ml'lik falkon tüpüne 10'ar ml slurry eklendi. 500 g'de 5 dk. santrifüjden sonra tamponundan temizlenen ve herbir falkonda 5'er ml bulunan boncuklar önce 45 ml NPI-10Tamponu (50 mM NaH₂PO₄.2H₂O, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) ile dengeye getirildi. Santrifüj sonrası ise bu iki falkon tüpüne 20'şer ml protein lizatı eklenir ve gece boyu +4 °C' de hafif çalkalamalı tablada inkübe edildi. Ertesi gün çalışmalar +4 derece dolap içerisinde yapılmaya devam edildi. Havada asılı duracak şekilde düzenek hazırlandı ve filtreli kolona Ni-NTA ile bağlanan örnek konuldu, kolonun altına tıpa takıldı ve 2-3 dk beklenildi, sonra tıplar açıldı ve kolonda tutulmayan

kısım Flow Through (Bağlanmayan Proteinler) buza gömülü şekilde duran ayrı tüplere alındı.

1. yıkama (2 kez yapıldı) : 150 mL NPI-20 Tamponu (= 50 mM NaH₂PO₄.2H₂O, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) ile yapıldı. Benzer şekilde tıpa kapatıldı 2-3 dk beklenildi, sonra tıplar açılarak buz içerisine gömülü olan 15 mL'lik santirfüj tüplerine kolondan yıkamalar alındı.

2. Yıkama: 100 mL NPI-50 Tamponu (50 mM NaH₂PO₄.2H₂O, 300 mM NaCl, 50 mM Imidazol) ile benzer şekilde yapıldı.

1. Elüsyon: Tıplar kapalıyken elüsyon tamponundan 30 ml kolona (50 mM NaH₂PO₄.2H₂O, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol) eklendi ~1 saat beklenildi, sonra elüe edildi.

2. Elüsyon: 30 mL eklendi ~1 saat beklenildi, sonra elüe edildi.

1. ve 2. Elüsyon biraraya getirilerek deneyin sonraki aşamalarında kullanılmak üzere -20 derecede muhafaza edildi.

SDS-PAGE Jel Elektroforezi:

%12'lik poliakrilamid jel kullanılır:

	<u>%12'lik Ayırma Jeli</u>	<u>%12'lik Paketleme Jeli</u>
% 30 Acrylamide/BIS	2 mL	0.425 mL
1.5 M Tris H-Cl	1.25 mL	0.5 M TrisH-Cl 0.625 mL
% 10 SDS	50 µL	25 µL
dH ₂ O	5 mL'ye tamamlanır	2.5mL'ye tamamlanır.
% 1 APS (Amonyum per sulfate)	25 µL	12.5 µL
TEMED	2.5 µL	2.5 µL

Yükleme Boyası 2X veya 6X olarak kullanılır.

6X Yükleme Boyası (pH 6.8'e ~1 damla NaOH ile ayarlanır): 0,006 g bromofenol blue, 6 mL %80'lik Gliserol, 1.2 mL 0,5 M Tris-HCl pH 6.8, 2.8 mL dH₂O, 1.2 g SDS içerir.6X yükleme boyasına 0.1 M DTT veya isteğe bağlı olarak %5 oranında merkaptan etanol eklenir.Jel dikey elektroforez tankında 60 V, maksimum mA'de yaklaşık 3 saat koşturulduğunda preoteinler hemen hemen baştan sona kadar koşmuş olurlar.

Western Blot Protokolü

SDS-PAGE elektroforezi bitince, jel oda ısısında ~5' süreyle dH₂O ile hafif çalkalamalı cihazda (Biometra, Wt 17) yıkanır. Sonra jel western transfer tamponu (25 mM Tris-Base, 195 mM Glisin, %25 Metanol) içine alınarak ~20' boyunca hafif çalkalamalı cihazda oda ısısında dengelenmesi sağlanır. (Towbin, H. 1979).

Jelin boyutuna göre kesilen blotlama işleminde kullanılacak 0.45 um'lik PVDF membran (IPFL00010, Immobilon[®]-FL, Merck) önce 30'' metanol ile muamele edilerek aktifleştirilir, daha sonra ~10' süreyle western transfer tamponu içinde hafif çalkalamalı cihazda, oda ısısında inkübe edilir.

İkişer adet alta ve ikişer adet üste olacak şekilde kesilmiş kalın filtre kağıtları (Sigma-Aldrich, P4681-100EA, Extra thick) western transfer tamponunda ıslatılır. Bunlardan iki tanesi blotmayı yapacak olan cihazın (Trans-Blot[®] Turbo, BIO-RAD) tablasına yerleştirilir, filtre kağıtlarının üzerine membran onun üzerine jel ve jelin üzerine de diğer iki filtre kağıdı konularak sandviç yapılır ve tablanın üst kapağı takılır ve blotlama işlemi, 25 V, 10 A, 30' süreyle gerçekleştirilir.

Blotlama işleminden sonra membran ve jel ayrı ayrı kaplarda ~5' süreyle, oda ısısında d.H₂O ile hafif çalkalamalı cihazda yıkanır.

Yıkamadan sonra PVDF membran 5 kez, 5' süreyle TBS-T ile inkübe edilerek yıkanır. Sonra membranın protein içermeyen kısımlarının bloklanması amacıyla % 5 süt tozu içeren TBS-T ile g/b + 4 °C'de hafif çalkalamalı cihazda inkübe edilir.

SDS-PAGE jeli ise comassi boyası ile oda ısısında ~30' - 1 saat süreyle boyanır, daha sonra d.H₂O ile yıkanarak boyanın jelden uzaklaşması sağlanır ve görüntülenir.

Ertesi gün bloklamadan sonra PVDF membran 5 kez, 5' süreyle TBS-T ile inkübe edilerek yıkanır. Sonra membran birincil antikor ile muamele edilir. Birincil antikor % 5 süt tozu içeren TBS-T içinde oda ısısında ~2 saat (veya g/b + 4 °C'de) hafif çalkalamalı cihazda inkübe edilir.

Birincil antikor ile muameleden sonra membran 5' süreyle TBS-T ile inkübe edilerek yıkanır. Sonra membran ikincil antikor ile (% 5 süt tozu içeren TBS-T içinde) oda ısısında ~2 saat (veya g/b + 4 °C'de) hafif çalkalamalı cihazda inkübe edilir.

İkincil antikor ile muameleden sonra membran 5 kez, 5' süreyle TBS-T ile inkübe edilerek yıkanır. Sonra membrandan görüntü alabilmek için, karanlık bir ortamda ~3 mL TMB (Prod# 37574, Thermo) ile muamele edilerek varsa protein bantlarının görünmesi

sağlanır. Bantların görünmesi TMB ile muameleden ~5' sonra başlar. Membran görüntülendikten sonra her zaman ışık görmeyecek şekilde saklanır.

Brilliant III Ultra-Fast QRT-PCR Master Mix ile One-Step Real Time PCR Reaksiyonu

Bu kit One-Step olmasından dolayı Reverse Transcriptase enzimini de içerir, böylece aynı PCR tüpünde, hem RT-PCR reaksiyonu gerçekleştirilerek cDNA elde edilir, hem de üretilen bu cDNA yine ortamda bulunan Taq Polimeraz enzimi için kalıp görevi görür ve qPCR reaksiyonu gerçekleşmiş olur. Deneyin işlem basamakları aşağıdaki gibidir;

1- Real time Primerleri ve Problarından 10.000 nanomolarlık stoklar hazırlandı. Reaksiyon karışımı içinde finalde primer konsantrasyonu 400 nM iken Prob konsantrasyonu 200nM'dır.

- Elimizde daha önceden peletleyip dolaba kaldırdığımız Kontrol(CDNB'ye maruz bırakılmayan), D1, D2 ve D3 dozlarına 9 saat boyunca maruz kalmış hücreler bulunmaktaydı. Bu hücrelerden RNA izolasyonu ve takiben Dnase Uygulaması gerçekleştirilmiş olup, RNA miktarları nanodrop ile ölçülmüştür. Bu RNA'lar kullanılarak hazırlanan tüpler aşağıdaki gibidir. Standart her bir genin kendi DNA'sı kullanılarak hazırlandı. .2 adet NTC tüpü (içinde template yani RNA yok, GST primerleri ve probu var)
- 4 adet kontrol grubu RNA, GST primerleri ve probu
- 4 adet D1 doz grubu RNA, GST primerleri ve probu
- 4 adet D2 doz grubu RNA, GST primerleri ve probu
- 4 adet D3 doz grubu RNA, GST primerleri ve probu
- 3 adet Standart Gst 1×10^{-2} dilüsyon DNA, Gst primerleri ve probu
- 3 adet Standart Gst 1×10^{-3} dilüsyon DNA, Gst primerleri ve probu
- 3 adet Standart Gst 1×10^{-4} dilüsyon DNA, Gst primerleri ve probu
- 3 adet Standart Gst 1×10^{-5} dilüsyon DNA, Gst primerleri ve probu
- 3 adet Standart Gst 1×10^{-6} dilüsyon DNA, Gst primerleri ve probu
- 3 adet Standart Gst 1×10^{-7} dilüsyon DNA, Gst primerleri ve probu

2- Yukarıdaki tüplere eklenecek PCR bileşenlerinin formülü;

2X QRT-PCR master mix	10µl		
Prob	1 µl	50°C	10' } 1X
Forward primer	1 µl	95°C	3' } 40X
Reverse primer	1 µl	95°C	20'' } 40X
100 mM DTT	0,2 µl	60°C	30'' } 40X
RT/RNase block	1 µl		
Template RNA	1 ul (200ng)		
dH ₂ O	<u>4,8 µl</u>		
	20 µl		

E.coli XL1-Blue kompetent hücre hazırlığı ve ısı şoku ile transformasyon

E. coli XL1-Blue hücreleri ticari olarak satın alınmış, sürekli kullanım için aşağıdaki protokol kullanılarak laboratuvarında kompetent haline getirilmiş ve -80°C' de stoklanmıştır.

1. LB agarda geliştirilen hücrelerin bir kolonisinden LB broth besiyerine ekim gerçekleştirilir ve 37°C' de çalkalamalı etüvde geliştirilmiştir.
2. Ertesi gün 100 ml' lik LB broth besiyerine başlangıç kültürden 300 µl alınarak ekim steril şartlarda gerçekleştirilmiş ve 37°C' de çalkalamalı etüvde OD'si 600 nm'de 0,2-0,4 olana kadar çoğaltılmıştır.
3. OD değerine ulaşıldığında 5000 g' de 4°C' de 5 dk. santrifüj gerçekleştirilmiştir.
4. Tüm peletin üzerine 50 ml 50 mM CaCl₂ eklenmiş ve pipetör ile yavaşça hücreler resüspanse edilmiş ve 15 dk. buzda inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
5. İnkübasyon sonunda 5000 g' de 4°C' de santrifüj 10 dk. santrifüj yapılmış ve süpernatant atılmıştır.
6. Peletin üzerine 4 ml 50 mM CaCl₂ ilave edilmiş ve hücreler resüspanse edilmiştir.
7. Üzerine 600µl saf gliserol ilave edilmiş ve 100 µl olacak şekilde steril 1.5 ml' lik ependorf tüplere paylaştırılmıştır.
8. Tüm tüpler -80°C' de ısı şoku ile transformasyon adımı kadar saklanmıştır.

Isı şoku için laboratuvarımızda daha önce hazırlanmış ve -86 °C' de stoklanmış *E. coli* XL1-Blue kompetent hücreleri kullanılmıştır. Deneye başlamadan önce hücreler

stoktan alınarak buzda 5 dk. bekletilmiştir. Ardından ligasyon ürününün tümü kompetent hücrelere eklenmiş ve 30 dk. buzda inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda ısı şoku daha önce 42 °C' ye ısıtılmış su banyosunda 2 dk. olarak gerçekleştirilmiş ve ardından 3 dk. buzda bekletilmiştir. Sonunda, hücrelerin üzerine 500 µl LB besiyeri eklenerek 37 °C' de 1 saat gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda 8000 rpm' de 3 dk. santrifüj işlemi yapıldıktan sonra bir miktar besiyerinde çözülen pelet amfisilinli LB agar petrilere yayılmıştır. Gece boyu (maksimum 16 saat) 37 °C' de kolonilerin gelişmesi için inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Ertesi gün kolonilerden seçilenlerin fazla miktarda üretilmesi için yeni bir LB agar tabağına çizgi ekim ile yayılmış ve 1 gece inkübe edildikten sonra koloni PZR yapılmıştır.

Koloni PZR için koloniler 25 µl distile suya kolonilerden öze ucu ile aktarım yapılmış, 10 dk. 95°C' de bekletilmiş, ardından buzda bekletilen örnekler 14000 rpm' de 2 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatanttan 2 µl alınarak, Taq DNA Polimeraz (Thermo Scientific, # EP0401) ile PZR gerçekleştirilmiştir. 94°C' de 2 dk ön denatürasyon, 34 döngü olarak 95°C' de 30 sn. denatürasyon, 60°C' de 30 sn, 72°C' de 30 sn. (1 dk./kb), 1 döngü 72°C' de 5 dk. olarak döngü tamamlanmıştır. Pozitif kolonilerin belirlenmesi için %1' lik jele yükleme yapılmıştır. Pozitif olarak belirlenen kolonilerden plazmid izolasyon kitiyle (NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel,740588.50) plazmitler elde edilmiştir. Farklı restriksiyon enzimleriyle ve dizi analizi ile teyit işlemleri yapılarak *T. thermophila* hücrelerine transofarmasyona hazır hale gelmişlerdir.

***Tetrahymena thermophila* Hücrelerine Konjugatif Elektroporasyon**

1) 50 ml' lik PPY besiyerine (250 µl penisilin-streptomisin ve 50 µl amfoterisin içeren) *Tetrahymena thermophila* Cu428 ırkından 500 µl ve B2086 ırkından 600 µl inokule edilmiş ve 30 °C' de çalkamalı etüvde 2 gün boyunca büyümeye bırakılmıştır.

2) İstenen yoğunluğa erişen hücreler 8000 rpm' de 7 dk santrifüjlenerek peletlenmiştir.

3) Pelet 10 mM Tris.HCl (pH 7.5) açlık tamponu ile 2 defa yıkanmış ve besiyeri hacmi olan 50 ml açlık tamponunda (penisilin-streptomisin içeren) bir gece boyunca 30 °C' de çalkamalı etüvde açlığa alınmıştır.

4) Açlıkta 20 saat bekletilen hücrelerden 3 tekrarlı olarak thoma lamında sayım yapılmıştır ve hücre sayısı ml' de 3×10^5 olacak şekilde açlık tamponunda (penisilin-streptomisin içeren) çözülmüştür.

- 5) Bu işlemin ardından her iki ırktan da eşit hacimde hücre alınarak (50 ml) 2 lt' lik erlende konjugasyon işlemi çalkalamasız olarak 30 °C' de başlatılmıştır.
- 6) Konjugasyonun başlatıldığı üç saatin sonunda ışık mikroskobu altında hücrelerin en az %80' ninin konjugasyona girip girmediği kontrol edilmiştir.
- 7) Konjugasyonun 7. saatinde hücrelerden 500 µl alınarak üzerine 15 µl hoechst boyası eklenmiş ve 10 dk inkübasyonun ardından 1 µl fiksatif ile hücreler öldürülmüş ve fluoressan mikroskop altında çekirdek durumları incelenmiş ve konjugasyonun saati teyit edilmiştir.
- 8) Doğru şekilde ilerlediği teyit edilen konjugasyonun 9 buçuğuncu saatinde hücrelerin tamamı 50 ml'lik iki falcon tüpe bölünerek 6.500g' de 6 dk santrifüjlenmiş ve 50 ml oda sıcaklığında bekletilmiş HEPES ile yıkanmıştır.
- 9) HEPES ile yıkanan hücreler 6.500g' de 6 dk santrifüjlenmiş ve oluşan pellet iki tüpteki her bir pellet 500 µl HEPES ile çözülmüştür.
- 10) Bu aşamaya gelmeden önce daha önceki bölümde anlatılan plazmidler, çok miktarda elde edilmiş ve 15 µg plazmid DNA'lar denk gelen hacim hesaplanmış ve ependorf tüplere aktarılmıştır.
- 11) Bu plazmid DNA' ların üzerine toplam hacim 125 µl olacak şekilde HEPES eklenmiş ve karışım transformasyon saatine kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- 12) Elektroporasyon için hazırlanmış 50 ml' lik her kültür için 500 µl HEPES'de çözülmüş hücrelerden 125 µl alınarak hazırlanan plazmidin üzerine eklenmiştir, bir kez pipetörle al-ver yapılarak 250 µl' lik karışım hassas bir şekilde 0.4 cm'lik BioRad elektroporasyon küvetine aktarılmış ve hızlı bir şekilde elektroporasyon cihazının şoklayıcısına yerleştirilmiştir.
- 13) Elektroporasyon aletinin ayarları 200 Ω' da 25 µF kapasitör ile 0.44 kV ayarlanmış ve elektrotransformasyon gerçekleştirilmiştir (Barchetta ve ark., 2008).
- 14) Elektropore edilen küvetteki hücrelerin üzerine 1 ml SPP besiyeri eklenmiştir ve pipetörle bir kere al ver yapılmıştır.
- 15) Ardından hücreler hızlı ve dikkatli bir şekilde küvetten 5 ml SPP (20 ml SPP için 100µl Penisilin-streptomisin; 100µl Amfoterisin B) içeren tüplere aktarılmıştır. Gece boyu 30 °C' de çalkamasız bir şekilde tutulmuştur.
- 16) Konjugasyondan sonraki 18-24 saat içinde hücreler 60 µg/ml olacak şekilde paromomisin ile seleksiyona başlanır.

17) Konjugasyondan sonraki 3. gün 100 µg/ml olacak şekilde paromomisin miktarı artırılır.



EK 2. TtGST genlere ait protein kodlayıcı nükleotid ve aminoasit dizileri

TtGSTm19 (Accession No: XP 001027626.1)

```
>TTHERM_00569200 (coding)
ATGGCTGATAAAAATTGTTCTTGGTTATTGGGCTGGTCCTGGTAAGGCTCAACCTTCCAGA
TATTTACTTGAAATCTCAGGAGTTAAATACGAAGAAGTCAGATACACTAATCCTGCTGAT
TGGTTTGGAAAAGACAAGTATGCCTTAGGATTATCTTTCCCTAACTTACCTTACCTTTTA
GATGGAGATGTA AAAATCACTGAAAGTGAAACTATCTTTGATTACTTGATCCACAGACTC
AACAAAACAGA ACTTTTAGGCAAGGATAATGATAAGTACACTGTAGATACTCTCAGAAAC
CTCTTTTCTGATATTGGCACCAGATTGTACATGCTTACTTAAAAGGAAGGTGATGACAAA
ACTAAATCTTAAACGAATAAGTTCTTCCTAAGATTAAAGATATCCACAAATTCTTAGGA
CATAAGGAATATCTTTTAGGATATTTCACTGCTGCTGACCTTTACTTCTTAAGTTTCGCT
AGAGGTTTTAAGGCTAATCTCCCTGAAGCTTACAAAGAATTTGCTGCAACCTTCGATCCT
TTGGTA ACTTAGACTTGAAGCCATTCCTTAAATTGCTGCTTATATTTT CAGAAAAGCGTCAT
CCTTGA
```

```
>TTHERM_00569200 (protein)
MADKIVLGYWAGPGKAQPSRYLLEISGVKYEEVRYTNPADWFGKDKYALGLSFPNLPYLL
DGDVKITESETIFDYLIHRLNKTELLGKDNDKYTVDTLRNLFSDIGTRLYMLTQKEGDDK
TKFLNEQVLPKIKDIHKFLGHKEYLLGYFTAADLYFLSFARGFKANLPEAYKEFAATFDP
LVTRLEAIPQIAAYISEKRHP
```

TtGSTm34 (Accession No: XP 001020129.1)

```
>TTHERM_00661650 (coding)
ATGACAACCTCTGGTTACTGGGGCATCAGAGGTTTGGCTCAACCTATCCGTTTCTTACTT
GCCTACTTAGGTGTCTAATACTAATAAGGCCTACGCCAATCCTGAAGAATGGTTCGGA
AAGGATAAGAATGAACTCGGCTTTGACTTCCCCAACATTCCCTACTTAATTGATGGTGAT
CTTAAACTTACTGAATCTTCTGCTATTCCTATTTATCTTATCAGAAAGCACAAAAGAAAC
GAGTTGTTAGGATCTTCTGCTGACGGTTCTTACAGTGAAAAGGAAGTTAGAGTCGCTTAA
ATTGTTGGTGTATTAGAGATCTTTTTAAGGAACTCACAGGCTTATGTTTCAACCCCTGAC
TTCAAAAACATTAAAGAAAAGCTCTACACTGAAAAGCTCGAACTCTTAATTAAGAGACTC
GGTGCTTATCTTGGTGATAAGGAATTCATAGTTGGTACCTTGACTTATGCTGATTTTCTT
TTCTATGAAGCCCTCAGCTATATTAGACATATTTATCCCCAAGCCATTTGTGCTACTCTT
ACTGCTTATATCAACAGATTTGAAAACCTCCCTGGTATTAAGGAATACATTGCTAGCCAT
GCCTAAGA ACTTAAGTTTTCTTACCTCCTCAAAGAGCTACCTGGTCTGGTCCTTAATGA
```

```
>TTHERM_00661650 (protein)
MTTLGYWGI RGLAQPIRFL LAYLGVQYTNKAYANPEEWFGKDKNELGFDFPNIPYLIDGDL
KLTESSAIP IYLIRKHKRNELLGSSADGSYSEKEVRVAQIVGVIRD LFKELTGLCFNPDFK
NIKEKLYTEKLELLIKRLGAYLGDKEFIVGTLTYADFLFY EALSYIRHIYPQAICATLTAY
INRFENLPGIKEYIASHAQELKVFLPPQRATWSGPQ
```

EK 3. *Tetrahymena thermophila* hipotetik GST genlerinin moleküler ağırlıkları ve izoelektrik pH'ları.

Biyoinformatik analizle tetrahymena'nın hipotetik olarak bilinen tüm GST'lerin dizilerinin moleküler ağırlıkları (MW) ve izoelektrik pH'ları (pI) Expasy veritabanında hesaplatılmıştır. Tablo 0.1'de tüm tetrahymena GST'leri ve Moleküler ağırlıkları verilmiştir. Tablodan da görüldüğü üzere GST enzimlerinin moleküler ağırlıkları 23 kDa ile 30 kDa arasında değişmektedir.

Tablo 0.1: *Tetrahymena thermophila* hipotetik GST genlerinin moleküler ağırlıkları ve izoelektrik pH'ları. "m", Mu genlerini, "o" Omega genlerini, "t" theta genlerini, "z" zeta geni ve "MAAI", maleylacetoacetate isomerase enzimin kısaltmalarıdır.

	pI	MW (dalton)
TtGSTm1	7.62	24754.01
TtGSTm2	7.64	24657.83
TtGSTm3	7.63	25972.41
TtGSTm4	6.75	25974.40
TtGSTm5	8.78	25934.45
TtGSTm6	7.64	25714.31
TtGSTm7	8.40	24245.73
TtGSTm8	8.43	24299.87
TtGSTm9	8.41	24368.93
TtGSTm10	6.97	24473.98
TtGSTm11	8.43	24286.83
TtGSTm12	8.74	24386.92
TtGSTm13	6.34	25528.13
TtGSTm14	5.80	26024.74
TtGSTm15	5.43	25716.42
TtGSTm16	7.62	25111.82
TtGSTm17	8.91	24044.62
TtGSTm18	6.74	23879.53
TtGSTm19	6.44	23135.52
TtGSTm20	8.49	23229.77
TtGSTm21	5.80	23497.88
TtGSTm22	5.19	23652.11

TtGSTm23	7.72	23089.94
TtGSTm24	6.11	23935.34
TtGSTm25	6.42	24386.05
TtGSTm26	5.83	29222.18
TtGSTm27	8.10	46122.00
TtGSTm28	6.01	25899.90
TtGSTm29	5.46	26055.91
TtGSTm30	8.39	28174.64
TtGSTm31	Ekstra domain	
TtGSTm32	8.31	25040.98
TtGSTm33	8.54	42802.24
TtGSTm34	7.68	23229.77
TtGSTm35	8.88	25441.59
TtGSTm36	Ekstra domain	
TtGSTm37	8.90	25541.72
TtGSTm38	8.69	25188.00
TtGSTm39	6.15	26292.08
TtGSTm40	Başında ABC membran proteini var	
TtGSTm41	8.67	29292.30
TtGSTm42	7.69	27027.04
TtGSTm43	5.84	26117.15
TtGSTm44	6.33	28038.19
TtGSTm45	6.54	28047.16
TtGSTm46	6.97	28925.56
TtGSTm47	C terminal eksik	
TtGSTm48	6.85	26779.68
TtGSTm49	6.74	26638.22
TtGSTo1	5.74	30661.98
TtGSTo2	6.85	30784.16
TtGSTo3	5.46	30476.76
TtGSTo4	6.02	30483.71

TtGSTo5	7.02	30000.35
TtGSTo6	8.79	30565.00
TtGSTo7	9.25	35076.91
TtGSTt1	9.13	27968.36
TtGSTt2	8.98	27131.70
TtGSTt3	8.75	27960.12
TtGSTt4	8.88	27163.55
TtGSTt5	8.27	26072.93
TtGSTz1	5.99	25208.01
TtMAAI1	6.19	25294.14



EK-4 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

- Tris Base (Applichem A2264)
- Tris.HCl (Sigma, 05432): 10 mM pH 7.5 olarak hazırlanan steril Tris-HCl
- Borik Asit (Bio Basic BB0044)
- İzopropanol (Riedel de Haen, 24137).
- Etanol (Riedel, 071029)
- Etidyum Bromür (EtBr) (Sigma, E8751): Konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde dH₂O'da çözülerek hazırlanmış ve çözelti +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Agaroz jel elektroforezinde, jel içerisinde farklı büyüklüklerde DNA'lara bağlanarak 312-365 nm UV ışığında DNA'ların görünür olmasını sağlamaktadır. Agaroz jel içerisine 0,5 µg/mL EtBr olacak şekilde eklenmektedir.
- Agaroz A (Biomax, IB70073): Agaroz jel elektroforezinde DNA'ların büyüklüklerine göre ayrılması için %0,7 ve %1 aralığında ki farklı yoğunluklarda hazırlanan jellerde kullanılmıştır. Jelin hazırlanması sırasında agarozun çözücü tamponu olarak 1X'lik TBE (Tris- Borik Asit- EDTA) tamponu kullanılmıştır.
- 10X TBE (Tris- Borik Asit- EDTA): 108 gr Trizma base ve 55 gr borik asit tartılarak 600 mL dH₂O'da tamamiyle çözülür ve ardından çözeltiye 40 mL 0,5 M pH 8.0 EDTA eklenir, EDTA'nın çözülmesinin ardından tampon 1 lt'ye tamamlanır. Hazırlanan tampon 1/10 oranında seyreltilerek 1X TBE olacak şekilde seyreltilmiş ve agaroz jel elektroforezinde kullanılmıştır.
- 6X DNA Yükleme Tamponu (Thermo, #R0611)
- DNA Marker 0,5 µg/mL (Thermo, #SM0331)
- Tripton (Sigma, 95039)
- Maya ekstratı (Sigma, Y1625)
- Proteaz Pepton (Sigma, 82450)
- Sodyum Klorür NaCl (Merck, 1.06400)
- D (+) Glikoz monohidrat (Riedel-de Haen, 16301)
- Gliserol (Sigma, G2289): %80'lik gliserol *E. coli* hücrelerinin -80 °C stoklarının yapılmasında ve kimyasal kompotent hücre hazırlığında sırasında kullanılmıştır. %99'lık gliserolden dH₂O ile %80'liğe steril dH₂O ile seyreltilen gliserol otoklav edildikten sonra +4 °C'de muhafaza edilir.
- Kadmiyum Klorür (CdCl₂) (Sigma, 439800): Protein ekspresyon deneylerinde MTT1 promotorunun indükleyecisi olarak kullanılan CdCl₂, promotor bölgeye

bağlanarak o promotor kontrolündeki genin kontrollü bir şekilde üretilmesine yardımcı olur. Stok solüsyonu 1000 mg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır.

- Paramomisin (Sigma, P9297): Stok solüsyonu 50 mg/mL hazırlanmış olan paramomisin, Tetrahymena antibiyotik direnç geni varlığında, transforme edilen plazmidün seçiciliğini sağlar.

- Penisilin-Streptomisin (Pen-Strep) (Sigma, P4333): PPY ve SSP besiyerlerinde bakteri ve küf kontaminasyonunu engellemek amacıyla kullanılmıştır.

- Amfisilin (Sigma, A0104): *E. coli*' de yapılan klonlama deneylerinde pozitif klon seçiciliğinin sağlanmasında kullanılmıştır. Stok solüsyon (1000X) 100 mg amfisilinin 1 mL steril dH₂O'da çözülmesiyle hazırlanır ve 0.45 µm por çaplı membran filtre ile sterilizasyon yapılır. -20 °C'de muhafaza edilir.

EK-5 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Etüv (Genhart, Thermo Shaker THO 220), Santrifüj (Thermo IEC Micromax, Beckman Coulter Microfuge 22R, ve Beckman Coulter Allegra 25R), Otoklav (Eastern Medical, Vertical Autoclave), PZR Cihazı (Biorad, iCycler thermal; Applied Biosystem, Veriti Thermal Cycler) , Agaroz Jel Elektforez Aparatı (Thermo EC Mini Cell EC320, Thermo EC Midi Cell Ec 330 ve BioRad Mini SubCell GT), Güç Kaynağı (Thermo Electrocorporation EC250-90), UV Jel Görüntüleme Kabini (Uvitec M02 4611), pH Metre (Crison, Basic 20), Vorteks (IKA MS2), Su banyosu (Memmert D-91126), Nanodrop (Metek ND-100), Spektofotometre (UV- 2101 PC Shimadzu), Terazi (Ohaus pro AV812), Gene Pulser Xcell (BioRad, 165-2666), Manyetik Karıştırıcı (Schott, SLK6).

EK 6. Eşleşen peptitler ve Mascot analizi sonuçları.

Diziler üzerinde eşleşen peptidler kırmızı ile renklendirilmiştir.

Spot 1 Tt**GSTm19**

1 MADK**IVLGYW AGPGKA**QPSR **YLLEISGVKY EEVRYTNPAD WFGKDKYALG**
51 **LSFPNLPYLL DGDVKITese TIFDYLIHR**L NKTELLGKDN **DKYTVDTLRN**
101 **LFSDIGTRLY MLTQK**EGDDK TK**FLNEQVLP KIKDIHKFLG HKEYLLGYFT**
151 **AADLYFLSFA RGFKANLPEA YKEFAATFDP LVTRLEAIPQ IAAYISEKR**H
201 P

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Sequence
5 - 15	1160.6156	1159.6083	1159.6390	-26	0	K.IVLGYWAGPGK.A (No match)
5 - 15	1160.6156	1159.6083	1159.6390	-26	0	K.IVLGYWAGPGK.A (Ions score
21 - 29	1021.5527	1020.5454	1020.5855	-39	0	R.YLLEISGVK.Y (No match)
21 - 34	1697.8806	1696.8733	1696.9035	-18	1	R.YLLEISGVKYEVR.Y (No matc
21 - 34	1697.8806	1696.8733	1696.9035	-18	1	R.YLLEISGVKYEVR.Y (Ions sc
35 - 44	1198.5219	1197.5146	1197.5455	-26	0	R.YTNPADWFGK.D (Ions score
35 - 44	1198.5219	1197.5146	1197.5455	-26	0	R.YTNPADWFGK.D (No match)
35 - 46	1441.6329	1440.6256	1440.6674	-29	1	R.YTNPADWFGKDK.Y (No match)
45 - 65	2338.1721	2337.1648	2337.2256	-26	1	K.DKYALGLSFPNLPYLLDGDVK.I (
47 - 65	2095.0566	2094.0493	2094.1037	-26	0	K.YALGLSFPNLPYLLDGDVK.I (No
66 - 79	1736.8555	1735.8482	1735.8781	-17	0	K.ITESETIFDYLIHR.L (Ions sc
66 - 79	1736.8555	1735.8482	1735.8781	-17	0	K.ITESETIFDYLIHR.L (No matc
89 - 99	1339.6106	1338.6033	1338.6416	-29	1	K.DNDKYTVDTLR.N (No match)
100 - 108	1022.5083	1021.5010	1021.5193	-18	0	R.NLFSDIGTR.L (No match)
100 - 108	1022.5083	1021.5010	1021.5193	-18	0	R.NLFSDIGTR.L (Ions score 6
109 - 115	912.4534	911.4461	911.4786	-36	0	R.LYMLTQK.E Oxidation (M) (
123 - 131	1087.5773	1086.5700	1086.6073	-34	0	K.FLNEQVLPK.I (Ions score 4
123 - 131	1087.5773	1086.5700	1086.6073	-34	0	K.FLNEQVLPK.I (No match)
143 - 161	2260.0823	2259.0750	2259.1252	-22	0	K.EYLLGYFTAADLYFLSFAR.G (No
165 - 172	905.4407	904.4334	904.4654	-35	0	K.ANLPEAYK.E (No match)
165 - 184	2253.1082	2252.1009	2252.1477	-21	1	K.ANLPEAYKEFAATFDPLVTR.L (I
165 - 184	2253.1082	2252.1009	2252.1477	-21	1	K.ANLPEAYKEFAATFDPLVTR.L (N
173 - 184	1366.6674	1365.6601	1365.6929	-24	0	K.EFAATFDPLVTR.L (Ions scor
173 - 184	1366.6674	1365.6601	1365.6929	-24	0	K.EFAATFDPLVTR.L (No match)
185 - 198	1545.8009	1544.7936	1544.8450	-33	0	R.LEAIPQIAAYISEK.R (No matc
185 - 199	1701.9032	1700.8959	1700.9461	-29	1	R.LEAIPQIAAYISEKR.H (No mat

Spot 2 TtGSTM19

1 MADKIVLGYW AGPGKAQPSR YLLEISGVKY EEVRYTNPAD WFGKDKYALG
 51 LSFENLPYLL DGDVKITese TIFDYLIHRL NKTELLGKDN DKYTVDTLRN
 101 LFSDIGTRLY MLTQKEGDDK TKFLNEQVLP KIKDIHKFLG HK EYLLGYFT
 151 AADLYFLSFA RGFKANLPEA YKEFAATFDP LVTRLEAIPQ IAAYISEKRH
 201 P

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence
5 - 15	1160.6466	1159.6393	1159.6390	0	0	K.IVLGYWAGPGK.A (No match)
5 - 15	1160.6466	1159.6393	1159.6390	0	0	K.IVLGYWAGPGK.A (Ions score
21 - 29	1021.5840	1020.5767	1020.5855	-9	0	R.YLLEISGVK.Y (No match)
21 - 34	1697.9211	1696.9138	1696.9035	6	1	R.YLLEISGVKYEEVR.Y (No matc
21 - 34	1697.9211	1696.9139	1696.9035	6	1	R.YLLEISGVKYEEVR.Y (Ions sc
35 - 44	1198.5561	1197.5489	1197.5455	3	0	R.YTNPADWFGK.D (Ions score
35 - 44	1198.5562	1197.5489	1197.5455	3	0	R.YTNPADWFGK.D (No match)
35 - 46	1441.6655	1440.6582	1440.6674	-6	1	R.YTNPADWFGK.Y (No match)
45 - 65	2338.2256	2337.2183	2337.2256	-3	1	K.DKYALGLSFPNLPYLLDGDVK.I (
47 - 65	2095.1104	2094.1031	2094.1037	-0	0	K.YALGLSFPNLPYLLDGDVK.I (Nc
66 - 79	1736.8971	1735.8898	1735.8781	7	0	K.ITESEITIFDYLIHR.L (Ions sc
66 - 79	1736.8971	1735.8898	1735.8781	7	0	K.ITESEITIFDYLIHR.L (No matc
83 - 99	1981.0117	1980.0044	1980.0164	-6	2	K.TELLGKDN DKYTVDTLR.N (No r
89 - 99	1339.6483	1338.6410	1338.6416	-0	1	K.DNDKYTVDTLR.N (No match)
89 - 99	1339.6483	1338.6410	1338.6416	-0	1	K.DNDKYTVDTLR.N (Ions score
93 - 99	867.4521	866.4448	866.4498	-6	0	K.YTVDTLR.N (No match)
100 - 108	1022.5349	1021.5276	1021.5193	8	0	R.NLFSDIGTR.L (No match)
100 - 108	1022.5349	1021.5276	1021.5193	8	0	R.NLFSDIGTR.L (Ions score 5
109 - 115	896.4835	895.4762	895.4837	-8	0	R.LYMLTQK.E (No match)
109 - 115	912.4791	911.4718	911.4786	-7	0	R.LYMLTQK.E Oxidation (M) (
123 - 131	1087.6089	1086.6016	1086.6073	-5	0	K.FLNEQVLPK.I (Ions score 3
123 - 131	1087.6089	1086.6016	1086.6073	-5	0	K.FLNEQVLPK.I (No match)
132 - 137	753.4558	752.4485	752.4545	-8	1	K.IKDIHK.F (No match)
143 - 161	2260.1318	2259.1245	2259.1252	-0	0	K.EYLLGYFTAADLYFLSFAR.G (Nc
165 - 172	905.4668	904.4595	904.4654	-6	0	K.ANLPEAYK.E (No match)
165 - 184	2253.1589	2252.1516	2252.1477	2	1	K.ANLPEAYKEFAATFDPLVTR.L (N
165 - 184	2253.1589	2252.1517	2252.1477	2	1	K.ANLPEAYKEFAATFDPLVTR.L (I
173 - 184	1366.7001	1365.6928	1365.6929	-0	0	K.EFAATFDPLVTR.L (Ions scor
173 - 184	1366.7001	1365.6928	1365.6929	-0	0	K.EFAATFDPLVTR.L (No match)
185 - 198	1545.8463	1544.8390	1544.8450	-4	0	R.LEAIPQIAAYISEK.R (No matc
185 - 199	1701.9454	1700.9381	1700.9461	-5	1	R.LEAIPQIAAYISEKR.H (No mat

Spot 3 **TtGSTm19**

1 MADKIVLGYW AGPGKAQPSR YLLEISGVKY EEVRYTNPAD WFGKDKYALG
 51 LSFNLPYLL DGDVKITESE TIFDYLIHRL NKTELLGKDN DKYTVDTLRN
 101 LFSDIGTRLY MLTQKEGDDK TKFLNEQVLP KIKDIHKFLG HKEYLLGYFT
 151 AADLYFLSFA RGFKANLPEA YKEFAATFDP LVTRLEAIPQ IAAYISEKRH
 201 P

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Sequence
16 - 29	1560.7998	1559.7925	1559.8671	-48	1	K.AQPSRYLLEISGVK.Y (No matc
21 - 29	1021.5427	1020.5354	1020.5855	-49	0	R.YLLEISGVK.Y (No match)
21 - 34	1697.8326	1696.8253	1696.9035	-46	1	R.YLLEISGVKYEEVR.Y (No matc
21 - 34	1697.8326	1696.8254	1696.9035	-46	1	R.YLLEISGVKYEEVR.Y (Ions sc
35 - 44	1198.4994	1197.4921	1197.5455	-45	0	R.YTNPADWFGK.D (No match)
47 - 65	2095.0073	2094.0000	2094.1037	-50	0	K.YALGLSFNLPYLLDGDVK.I (Nc
66 - 79	1736.8087	1735.8014	1735.8781	-44	0	K.ITESETIFDYLIHR.L (No matc
66 - 79	1736.8087	1735.8014	1735.8781	-44	0	K.ITESETIFDYLIHR.L (Ions sc
89 - 99	1339.5886	1338.5813	1338.6416	-45	1	K.DNDKYTVDTLR.N (No match)
100 - 108	1022.4860	1021.4787	1021.5193	-40	0	R.NLFSDIGTR.L (Ions score 4
100 - 108	1022.4860	1021.4787	1021.5193	-40	0	R.NLFSDIGTR.L (No match)
123 - 131	1087.5615	1086.5542	1086.6073	-49	0	K.FLNEQVLPK.I (No match)
143 - 161	2260.0303	2259.0230	2259.1252	-45	0	K.EYLLGYFTAADLYFLSFAR.G (Nc
165 - 184	2253.0561	2252.0489	2252.1477	-44	1	K.ANLPEAYKEFAATFDPLVTR.L (I
165 - 184	2253.0562	2252.0489	2252.1477	-44	1	K.ANLPEAYKEFAATFDPLVTR.L (N
173 - 184	1366.6350	1365.6277	1365.6929	-48	0	K.EFAATFDPLVTR.L (No match)
173 - 184	1366.6350	1365.6277	1365.6929	-48	0	K.EFAATFDPLVTR.L (Ions scor

Spot 4 TtGSTm34

1 MTTLGYWGIR **GLAQPIRFL** **AYLGVQYTNK** **AYANPEEWFG** **KDKNELGFDF**
 51 **PNIPYLIDGD** **LKLTSSAIP** **IYLIRKHKRN** **ELLGSSADGS** **YSEKEVVRVAQ**
 101 **IVGVIRDLFK** **ELTGLCFNPD** **FKNIKEKLYT** **EKLELLIKRL** **GAYLGDKEFI**
 151 VGTLTLYADFL FYEALSYIRH IYPQAICATL TAYINR**FENL** **PGIKEYIASH**
 201 **AQELKVFLPP** **QR**ATWSGPQ

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss Sequence
11 - 17	754.4345	753.4272	753.4497	-30	0 R.GLAQPIR.F (No match)
18 - 30	1529.7806	1528.7733	1528.8289	-36	0 R.FLLAYLGVQYTNK.A (No match)
31 - 41	1311.5676	1310.5603	1310.5931	-25	0 K.AYANPEEWFGK.D (No match)
31 - 41	1311.5676	1310.5604	1310.5931	-25	0 K.AYANPEEWFGK.D (Ions score 49)
42 - 62	2423.1602	2422.1529	2422.2056	-22	1 K.DKNELGFDFPNIPYLIDGLK.L (No m
63 - 75	1475.8243	1474.8170	1474.8395	-15	0 K.LTESSAIPYILIR.K (No match)
63 - 75	1475.8243	1474.8171	1474.8395	-15	0 K.LTESSAIPYILIR.K (Ions score 9
79 - 94	1712.7633	1711.7560	1711.8013	-26	1 K.RNELLGSSADGSYSEK.E (No match)
79 - 94	1712.7633	1711.7560	1711.8013	-26	1 K.RNELLGSSADGSYSEK.E (Ions scor
80 - 94	1556.6652	1555.6579	1555.7002	-27	0 R.NELLGSSADGSYSEK.E (No match)
98 - 106	954.5872	953.5799	953.6022	-23	0 R.VAQIVGVIR.D (Ions score 59)
98 - 106	954.5872	953.5799	953.6022	-23	0 R.VAQIVGVIR.D (No match)
98 - 110	1457.8147	1456.8074	1456.8766	-47	1 R.VAQIVGVIRDLFK.E (No match)
111 - 122	1440.6436	1439.6363	1439.6755	-27	0 K.ELTGLCFNPDFK.N Carbamidomethy
133 - 138	728.4636	727.4563	727.4843	-39	0 K.LELLIK.R (No match)
139 - 147	992.5225	991.5152	991.5451	-30	1 K.RLGAYLGDK.E (No match)
187 - 194	917.4757	916.4684	916.5018	-36	0 R.FENLPGIK.E (No match)
195 - 205	1288.6158	1287.6085	1287.6459	-29	0 K.EYIASHAQELK.V (No match)
195 - 205	1288.6158	1287.6086	1287.6459	-29	0 K.EYIASHAQELK.V (Ions score 49)
206 - 212	856.4905	855.4832	855.4967	-16	0 K.VFLPPQR.A (No match)
206 - 212	856.4905	855.4833	855.4967	-16	0 K.VFLPPQR.A (Ions score 26)

Spot 5 TtGSTm34

1 MTTLGYWGIR GLAQPIRFL AYLGVQYTNK **AYANPEEWFG KDKNELGFDF**
51 PNIPYLIDGD LKLTESSAIP IYLIRKHKRN **ELLGSSADGS YSEKEVRVAQ**
101 **IVGVIRDLFK** ELTGLCFNPD FKNIKEKLYT **EKLELLIKRL GAYLGDKEFI**
151 VGTLYADFL FYEALSYIRH **IYPQAICATL TAYINRFENL PGIKEYIASH**
201 AQELKVFLPP QRATWSGPQ

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Sequence
31 - 43	1554.7974	1553.7901	1553.7150	48	1	K.AYANPEEWFGKDK.N (No match)
79 - 94	1712.8925	1711.8852	1711.8013	49	1	K.RNELLGSSADGSYSEK.E (Ions sc
79 - 94	1712.8925	1711.8852	1711.8013	49	1	K.RNELLGSSADGSYSEK.E (No matc
98 - 110	1457.9221	1456.9148	1456.8766	26	1	R.VAQIVGVIRDLFK.E (No match)
133 - 138	728.5176	727.5103	727.4843	36	0	K.LELLIK.R (No match)
139 - 147	992.5910	991.5837	991.5451	39	1	K.RLGAYLGDK.E (No match)
170 - 186	2005.1179	2004.1106	2004.0251	43	0	R.HIYPQAICATLTAYINR.F Carbami
170 - 186	2005.1179	2004.1106	2004.0251	43	0	R.HIYPQAICATLTAYINR.F Carbami
187 - 194	917.5488	916.5415	916.5018	43	0	R.FENLPGIK.E (No match)

Spot 6 TtGSTM34

1 M**TT**LGYWGIR **GLA**QPIR**FLL** AYLGVQYTNK **AYANPEEWFG** **KDKNELGFDF**
 51 **PNIPYLIDGD** **LKL**TESSAIP **IYLIR**KHKRN **ELLGSSADGS** **YSEK**EV**VAQ**
 101 **IVGVIRDLFK** **ELTGLCFNPD** **FK**NIKEKLYT **EK**LELLIKRL **GAYLGDKEFI**
 151 VGT**LT**YADFL **FYEALS**YIRH **IYPQAICATL** **TAYINRFENL** **PGIKEYIASH**
 201 **AQELKVFLPP** **QR**ATWSGPQ

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Sequence
2 - 10	1066.5795	1065.5722	1065.5607	11	0	M.TTLGYWGIR.G (Ions score 3)
2 - 10	1066.5795	1065.5722	1065.5607	11	0	M.TTLGYWGIR.G (No match)
11 - 17	754.4686	753.4613	753.4497	15	0	R.GLAQPIR.F (No match)
31 - 41	1311.6168	1310.6095	1310.5931	13	0	K.AYANPEEWFGK.D (No match)
31 - 41	1311.6168	1310.6095	1310.5931	13	0	K.AYANPEEWFGK.D (Ions score 3)
42 - 62	2423.2512	2422.2439	2422.2056	16	1	K.DKNELGFDFPNIPYLIDGDLK.L (No match)
63 - 75	1475.8762	1474.8689	1474.8395	20	0	K.LTESSAIPYILIR.K (No match)
63 - 75	1475.8762	1474.8689	1474.8395	20	0	K.LTESSAIPYILIR.K (Ions score 3)
79 - 94	1712.8258	1711.8185	1711.8013	10	1	K.RNELLGSSADGSYSEK.E (No match)
79 - 94	1712.8258	1711.8185	1711.8013	10	1	K.RNELLGSSADGSYSEK.E (Ions score 3)
80 - 94	1556.7249	1555.7176	1555.7002	11	0	R.NELLGSSADGSYSEK.E (No match)
98 - 106	954.6270	953.6197	953.6022	18	0	R.VAQIVGVIR.D (No match)
98 - 106	954.6270	953.6197	953.6022	18	0	R.VAQIVGVIR.D (Ions score 6)
98 - 110	1457.8427	1456.8354	1456.8766	-28	1	R.VAQIVGVIRDLFK.E (No match)
111 - 122	1440.7021	1439.6948	1439.6755	13	0	K.ELTGLCFNPDFK.N Carbamidon
133 - 138	728.4883	727.4810	727.4843	-5	0	K.LELLIK.R (No match)
139 - 147	992.5568	991.5495	991.5451	5	1	K.RLGAYLGDK.E (No match)
170 - 186	2005.0519	2004.0446	2004.0251	10	0	R.HIYPQAICATLTAYINR.F Carba
170 - 186	2005.0519	2004.0446	2004.0251	10	0	R.HIYPQAICATLTAYINR.F Carba
187 - 194	917.5097	916.5024	916.5018	1	0	R.FENLPGIK.E (No match)
195 - 205	1288.6632	1287.6559	1287.6459	8	0	K.EYIASHAQELK.V (No match)
206 - 212	856.5255	855.5182	855.4967	25	0	K.VFLPPQR.A (No match)
206 - 212	856.5255	855.5182	855.4967	25	0	K.VFLPPQR.A (Ions score 40)

Spot 7 TtGSTm34

1 M**TTLGYWGIR** **GLAQPIR**FLL AYLG**VQY**TNK **AYANPEEWFG** **KDKNELGFDF**
 51 **PNIPYLIDGD** **LKLT**ESSAIP **IYLIR**KHKRN **ELLGSSADGS** **YSEK**EV**VAQ**
 101 **IVGVIRDLFK** **ELTGLCFNPD** **FKNIKEKLYT** **EKLELLIKRL** **GAYLGDK**EFI
 151 **VGTLTYADFL** **FYEALS**YIRH **IYPQAICATL** **TAYINRFENL** **PGIKEYIASH**
 201 **AQELKVFLPP** **QR**ATW**SGPQ**

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Sequence
2 - 10	1066.5872	1065.5799	1065.5607	18	0	M.TTLGYWGIR.G (No match)
11 - 17	754.4692	753.4619	753.4497	16	0	R.GLAQPIR.F (No match)
31 - 41	1311.6246	1310.6173	1310.5931	18	0	K.AYANPEEWFGK.D (No match)
31 - 41	1311.6246	1310.6174	1310.5931	18	0	K.AYANPEEWFGK.D (Ions score 7)
42 - 62	2423.2793	2422.2720	2422.2056	27	1	K.DKNELGFDFPNIPYLIDGDLK.L (No match)
63 - 75	1475.8926	1474.8853	1474.8395	31	0	K.LTESSAIPYILIR.K (Ions score 7)
63 - 75	1475.8926	1474.8853	1474.8395	31	0	K.LTESSAIPYILIR.K (No match)
79 - 94	1712.8317	1711.8244	1711.8013	14	1	K.RNELLGSSADGSYSEK.E (Ions score 7)
79 - 94	1712.8317	1711.8244	1711.8013	14	1	K.RNELLGSSADGSYSEK.E (No match)
98 - 106	954.6304	953.6231	953.6022	22	0	R.VAQIVGVIR.D (No match)
98 - 106	954.6304	953.6232	953.6022	22	0	R.VAQIVGVIR.D (Ions score 57)
98 - 110	1457.8495	1456.8422	1456.8766	-24	1	R.VAQIVGVIRDLFK.E (No match)
111 - 122	1440.7144	1439.7071	1439.6755	22	0	K.ELTGLCFNPDFK.N Carbamidomet
111 - 122	1440.7144	1439.7071	1439.6755	22	0	K.ELTGLCFNPDFK.N Carbamidomet
133 - 138	728.4835	727.4762	727.4843	-11	0	K.LELLIK.R (No match)
139 - 147	992.5547	991.5474	991.5451	2	1	K.RLGAYLGDK.E (No match)
170 - 186	2005.0660	2004.0587	2004.0251	17	0	R.HIYPQAICATLTAYINR.F Carbamidomet
170 - 186	2005.0660	2004.0588	2004.0251	17	0	R.HIYPQAICATLTAYINR.F Carbamidomet (124)
187 - 194	917.5101	916.5028	916.5018	1	0	R.FENLPGIK.E (No match)
195 - 205	1288.6677	1287.6604	1287.6459	11	0	K.EYIASHAQELK.V (No match)
206 - 212	856.5320	855.5247	855.4967	33	0	K.VFLPPQR.A (No match)
206 - 212	856.5320	855.5248	855.4967	33	0	K.VFLPPQR.A (Ions score 41)

Spot 8 TtGSTm34

1 MTTLGWYWGIR **GLAQPIR**FLL AYLGVQYTNK **AYANPEEWFG** **KDKNELGFDF**
51 **PNIPYLIDGD** **LKLTSSAIP** **IYLIRKHKRN** **ELLGSSADGS** **YSEKEVRVAQ**
101 **IVGVIRDLFK** **ELTGLCFNPD** **FKNIKEKLYT** **EKLELLIKRL** **GAYLGDKEFI**
151 VGTLLTYADFL FYEALSIRH **IYPQAICATL** **TAYINRFENL** **PGIKEYIASH**
201 **AQELKVFLPP** **QRATWSGPQ**

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Sequence
11 - 17	754.4503	753.4430	753.4497	-9	0	R.GLAQPIR.F (No match)
31 - 41	1311.5873	1310.5800	1310.5931	-10	0	K.AYANPEEWFGK.D (Ions score
31 - 41	1311.5873	1310.5800	1310.5931	-10	0	K.AYANPEEWFGK.D (No match)
42 - 62	2423.1868	2422.1795	2422.2056	-11	1	K.DKNELGFDFPNIPYLIDGDLK.L (N
63 - 75	1475.8403	1474.8330	1474.8395	-4	0	K.LTSSAIPYILIR.K (No match)
63 - 75	1475.8403	1474.8331	1474.8395	-4	0	K.LTSSAIPYILIR.K (Ions scor
79 - 94	1712.7877	1711.7804	1711.8013	-12	1	K.RNELLGSSADGSYSEK.E (No mat
79 - 94	1712.7877	1711.7804	1711.8013	-12	1	K.RNELLGSSADGSYSEK.E (Ions s
80 - 94	1556.6908	1555.6835	1555.7002	-11	0	R.NELLGSSADGSYSEK.E (No matc
98 - 106	954.6041	953.5968	953.6022	-6	0	R.VAQIVGVIR.D (No match)
98 - 106	954.6041	953.5969	953.6022	-6	0	R.VAQIVGVIR.D (Ions score 51
98 - 110	1457.8420	1456.8347	1456.8766	-29	1	R.VAQIVGVIRDLFK.E (No match)
111 - 122	1440.6652	1439.6579	1439.6755	-12	0	K.ELTGLCFNPDFK.N Carbamidome
111 - 122	1440.6652	1439.6579	1439.6755	-12	0	K.ELTGLCFNPDFK.N Carbamidome
133 - 138	728.4719	727.4646	727.4843	-27	0	K.LELLIK.R (No match)
139 - 147	992.5432	991.5359	991.5451	-9	1	K.RLGAYLGDK.E (No match)
170 - 186	2005.0023	2003.9950	2004.0251	15	0	R.HIYPQAICATLTAYINR.F Carbar
187 - 194	917.4939	916.4866	916.5018	-17	0	R.FENLPGIK.E (No match)
195 - 205	1288.6372	1287.6299	1287.6459	-12	0	K.EYIASHAQELK.V (No match)
206 - 212	856.5048	855.4975	855.4967	1	0	K.VFLPPQR.A (Ions score 34)
206 - 212	856.5048	855.4975	855.4967	1	0	K.VFLPPQR.A (No match)

Ek 7. TtGSTm19 ve TtGSTm34 genlerinin homolog genleriyle hizalanması, protein peptid dizilerinin karşılaştırılması

THERM_00661650 (gene) GSTMu34	ACTCTTGGTACTGGGCATCAGAGGTT	TGGCTCAACCTATCCGTTTC	TACTTGCCTAC	180	
THERM_00661620 (gene) GSTMu32	ACTCTTGGCTACTGGAATGTTAGAGGATTAGGATAGTCTATCCGTTTCTTACTTGCTTAT			66	

THERM_00661650 (gene) GSTMu34	TTAGGTGCTAATACACTAATAAGGCCT	ACGCCAATCCTGAAGAATGGTTC	GAAAGGAT	240	
THERM_00661620 (gene) GSTMu32	TTGGGTGTAGAATAATAAGTAAAGTTTATAGCACAGCAGAAGAATGGTTGGTAAAGAT			126	
	**				
THERM_00661650 (gene) GSTMu34	AAGAATGAACTCGGC	TTGACTTCCCCAACATTC	CTACTTAATGATGGTGATCTTAAA	300	
THERM_00661620 (gene) GSTMu32	AAAATAACTTAGGTTTAGAATTTCCAAATATTCCTTATATTATCGATGGGGAATTTAAG			186	
	**				
THERM_00661650 (gene) GSTMu34	CTTACTGAATCTTCTGCTATTCCTATTTATCTTATCAGAAAGCACAAAAGAAACGAGTTG			360	
THERM_00661620 (gene) GSTMu32	CTTACTGAATCTTCTGCTATTCCTATTTATCTTATCAGAAATACAAAAGAGCTGATTTA			246	

THERM_00569200 (gene) GSTMu19	A	TGGCTGATAAAATTGTTCTTGGT	TATTGGGCTGGTCTGGTAAGGCTCAA	CCTTCCAGA	60
THERM_00569160 (gene) GSTMu20	ATGGCTTATAAAATTGTTCTTGGT	TATTGGGCTGGTCTGGTAAGGCTCAA	CCTTCCAGA	60	

THERM_00569200 (gene) GSTMu19	TATTTACTTGAATCTCAGGAGTTAAATACGAAGAAGTCAGATACACTA	ATCCTGCTGAT		120	
THERM_00569160 (gene) GSTMu20	TATTTACTTGAATCTCAGGAGTTAAATACTAAGATGTCAGATATCTAAACCTGCTGAT			120	

THERM_00569200 (gene) GSTMu19	TCGTTTGGAAAAGACAAGTATGCCTTAGGATTATCTTTCCCTAACTTACCTTACCTTTTA			180	
THERM_00569160 (gene) GSTMu20	TGGTTTGGAAAAGATAAGTATGCCTTAGGATTACCTTTCCCAACTTACCTTACCTTTA			180	

Şekil 0.1 A. *TtGSTm34* ve *TtGSTm32*'nin, **B.** *TtGSTm19* ve *TtGSTm20*'nin nükleotidlerinin Clustal Omega ile hizalanması. Real-Time PCR'da kullanılan ileri primer mavi, geri primer pembe, Prop sari ile renklendirilmiştir.

Spot number 2, TtGSTMu19, sequence coverage 85%, Mascot Score 969*.

1 MADKIVLGYW AGPGKAQPSR YLLEISGVKY EEVRYTNPAD WFGKDKYALG
51 LSPNLPYLL DGDVKITese TIFDYLIHRL NKTELLGKDN DKYTVDTLRN
101 LFSDIGTRLY MLTQKEGDDK TKFLNEQVLP KIKDIHKFLG HKEYLLGYFT
151 AADLYFLSFA RGFKANLPEA YKEFAATFDP LVTRLEAIPQ IAAYISEKRH
201 P

MASCOT SOFTWARE PEPTIDE LIST FOR SPOT 2

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Sequence
5 - 15	1160.6466	1159.6393	1159.6390	0	0	K.IVLGYWAGPGK.A
5 - 15	1160.6466	1159.6393	1159.6390	0	0	K.IVLGYWAGPGK.A (Ions score 84)
21 - 29	1021.5840	1020.5767	1020.5855	-9	0	R.YLLEISGVK.Y
21 - 34	1697.9211	1696.9138	1696.9035	6	1	R.YLLEISGVKYEVR.Y (No match)
21 - 34	1697.9211	1696.9139	1696.9035	6	1	R.YLLEISGVKYEVR.Y (Ions score 122)
35 - 44	1198.5561	1197.5489	1197.5455	3	0	R.YTNPADWFGK.D (Ions score 53)
35 - 44	1198.5562	1197.5489	1197.5455	3	0	R.YTNPADWFGK.D
35 - 46	1441.6655	1440.6582	1440.6674	-6	1	R.YTNPADWFGKDK.Y
45 - 65	2338.2256	2337.2183	2337.2256	-3	1	K.DKYALGLSFPNLPYLLDGDVK.I
47 - 65	2095.1104	2094.1031	2094.1037	-0	0	K.YALGLSFPNLPYLLDGDVK.I
66 - 79	1736.8971	1735.8898	1735.8781	7	0	K.ITESEITIFDYLIHR.L (Ions score 120)
66 - 79	1736.8971	1735.8898	1735.8781	7	0	K.ITESEITIFDYLIHR.L
83 - 99	1981.0117	1980.0044	1980.0164	-6	2	K.TELLGKDNNDKYTVDTLR.N
89 - 99	1339.6483	1338.6410	1338.6416	-0	1	K.DNDKYTVDTLR.N
89 - 99	1339.6483	1338.6410	1338.6416	-0	1	K.DNDKYTVDTLR.N (Ions score 89)
93 - 99	867.4521	866.4448	866.4498	-6	0	K.YTVDTLR.N
100 - 108	1022.5349	1021.5276	1021.5193	8	0	R.NLFSDIGTR.L
100 - 108	1022.5349	1021.5276	1021.5193	8	0	R.NLFSDIGTR.L (Ions score 51)
109 - 115	896.4835	895.4762	895.4837	-8	0	R.IYMLTQK.E
109 - 115	912.4791	911.4718	911.4786	-7	0	R.IYMLTQK.E Oxidation (M)
123 - 131	1087.6089	1086.6016	1086.6073	-5	0	K.FLNEQVLPK.I (Ions score 36)
123 - 131	1087.6089	1086.6016	1086.6073	-5	0	K.FLNEQVLPK.I
132 - 137	753.4558	752.4485	752.4545	-8	1	K.IKDIHK.F
143 - 161	2260.1318	2259.1245	2259.1252	-0	0	K.EYLLGYFTAADLYFLSFA.R
165 - 172	905.4668	904.4595	904.4654	-6	0	K.ANLPEAYK.E
165 - 184	2253.1589	2252.1516	2252.1477	2	1	K.ANLPEAYKEFAATFDPLVTR.L
165 - 184	2253.1589	2252.1517	2252.1477	2	1	K.ANLPEAYKEFAATFDPLVTR.L (Ions score 114)
173 - 184	1366.7001	1365.6928	1365.6929	-0	0	K.EFAATFDPLVTR.L (Ions score 82)
173 - 184	1366.7001	1365.6928	1365.6929	-0	0	K.EFAATFDPLVTR.L
185 - 198	1545.8463	1544.8390	1544.8450	-4	0	R.LEAIPQIAAYISEK.R
185 - 199	1701.9454	1700.9381	1700.9461	-5	1	R.LEAIPQIAAYISEK.R

```

THERM_00569200 (protein) GSTMu19 MADKIVLGYWAGPGKAQPSRYLLEISGVKYEVRYPADWFGKDKYALGLSFPNLPYLL 60
THERM_00569160 (protein) GSTMu20 MAYKIVLGYWAGPGKAPARYLLEISGVKQDVRYSKPADWFGKDKYALGLPFPNLPYLI 60
*****:*****:***:*****

THERM_00569200 (protein) GSTMu19 DGDVKITeseTIFDYLIHRLNKTELLGKDNNDKYTVDTLRNLFSDIGTRLYMLTQKEGDDK 120
THERM_00569160 (protein) GSTMu20 DGDVKITeseTIFDYLIHKLNKTQLLGQDNDKYTVDTLRNLIGDIGTRLQMLTQKEGDDK 120
*****:***:***:*****:*****

THERM_00569200 (protein) GSTMu19 TKFLNEQVLPKIKDIHKFLGHKEYLLGYFTAADLYFLSFA.RGFKANLPEAYKEFAATFDP 180
THERM_00569160 (protein) GSTMu20 TKFLNEQVLPKIKDIHKFLGHKEYLLGYFTAADLYFLSFA.RNLKKFYQEFALTFDG 180
*****:*****:***

THERM_00569200 (protein) GSTMu19 LVTRLEAIPQIAAYISEKRHP 201
THERM_00569160 (protein) GSTMu20 LVTRLEAIPQIAAYISEKRHP 201
*****

```

Şekil 0.2. Spot 2'de bulunan TtGSTM19 proteinindeki tanımlanan peptitlerin TtGSTM20 proteini ile karşılaştırılması. Mascot analizi sonucu elde edilen peptit listesinde pembe ile gösterilen aminoasitler TtGSTM20'de bulunmamaktadır.

Spot number 6, TtGSTMu34, sequence coverage 735%, Mascot Score 592.

1 M**TTLGYWGIR** GLAQPIRFL AYLGVQYTNK **AYANPEEWFG** KDKNELGFDF
 51 **PNIPYLIDGD** LKLTESSAIP IYLIRKHKRN ELLGSSADGS YSEKEVRVAQ
 101 **IVGVIRDLFK** ELTGLCFNPD FKNIKEKLYT EKLELLIKRL GAYLGDKEFI
 151 VGTLYADFL FYEALSYIRH IYPQAICATL TAYINRFENL **PGIKEYIASH**
 201 **AQELKVFLPP** QRATWSGPQ

MASCOT SOFTWARE PEPTIDE LIST FOR SPOT 6

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Sequence
2 - 10	1066.5795	1065.5722	1065.5607	11	0	M.TTLGYWGIR.G (Ions score 36)
2 - 10	1066.5795	1065.5722	1065.5607	11	0	M.TTLGYWGIR.G
11 - 17	754.4686	753.4613	753.4497	15	0	R.GLAQPIR.F
31 - 41	1311.6168	1310.6095	1310.5931	13	0	K.AYANPEEWFGK.D
31 - 41	1311.6168	1310.6095	1310.5931	13	0	K.AYANPEEWFGK.D (Ions score 63)
42 - 62	2423.2512	2422.2439	2422.2056	16	1	K.DKNELGFDFPNIPYLIDGDLK.L
63 - 75	1475.8762	1474.8689	1474.8395	20	0	K.LTESSAIPYILIR.K
63 - 75	1475.8762	1474.8689	1474.8395	20	0	K.LTESSAIPYILIR.K (Ions score 92)
79 - 94	1712.8258	1711.8185	1711.8013	10	1	K.RNELLGSSADGSYSEK.E
79 - 94	1712.8258	1711.8185	1711.8013	10	1	K.RNELLGSSADGSYSEK.E (Ions score 55)
80 - 94	1556.7249	1555.7176	1555.7002	11	0	R.NELLGSSADGSYSEK.E
98 - 106	954.6270	953.6197	953.6022	18	0	R.VAQIVGVIR.D
98 - 106	954.6270	953.6197	953.6022	18	0	R.VAQIVGVIR.D (Ions score 63)
98 - 110	1457.8427	1456.8354	1456.8766	-28	1	R.VAQIVGVIRDLFK.E
111 - 122	1440.7021	1439.6948	1439.6755	13	0	K.ELTGLCFNPDFK.N Carbamidomethyl (C
133 - 138	728.4883	727.4810	727.4843	-5	0	K.LELLIK.R
139 - 147	992.5568	991.5495	991.5451	5	1	K.RLGAYLGDK.E
170 - 186	2005.0519	2004.0446	2004.0251	10	0	R.HIYPQAICATLTAYINR.F Carbamidomethyl
(C) (Ions score 105)						
170 - 186	2005.0519	2004.0446	2004.0251	10	0	R.HIYPQAICATLTAYINR.F Carbamidomethyl
(C)						
187 - 194	917.5097	916.5024	916.5018	1	0	R.FENLPGIK.E
195 - 205	1288.6632	1287.6559	1287.6459	8	0	K.EYIASHAQELK.V
206 - 212	856.5255	855.5182	855.4967	25	0	K.VFLPPQR.A
206 - 212	856.5255	855.5182	855.4967	25	0	K.VFLPPQR.A (Ions score 40)

```

THERM_00661650 (protein) GSTMu34 MCLYIYIYPPKRYNFQKQQQINHKQNKTSLRNLIQYKQMTTLGYWGIRGLAQPIRFLLAY 60
THERM_00661620 (protein) GSTMu32 -----MITLGYWNVVRLGQSIRFLLAY 22
* *****:***.* *****

THERM_00661650 (protein) GSTMu34 LGVQYTNKAYANPEEWFGKDKNELGFDFPNIPYLIDGDLKLTSSAIPYILIRKHKRNEL 120
THERM_00661620 (protein) GSTMu32 LGVEYNSKVYSTAEWFGKDKNNLGLLEPNIPYIIDGFFKLTSSAIPYILIRKHKRNEL 82
***:*.*.*.*. *****:***:*****:***:*****:***:***.*

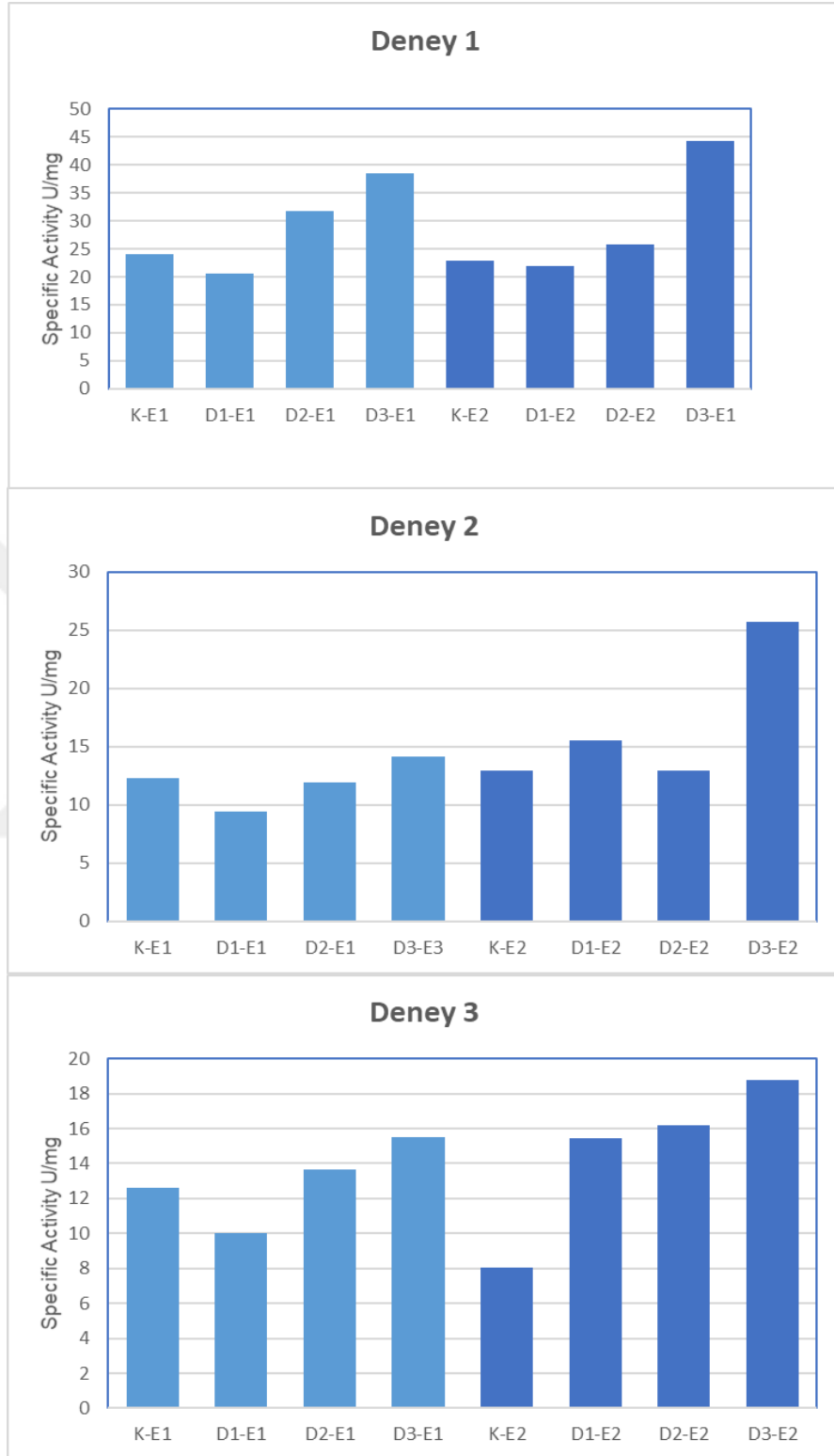
THERM_00661650 (protein) GSTMu34 LGSSADGSYSEKEVRVAQIVGVIRDLFKELTGLCFNPDFKNIKEKLYTEKLELLIKRLGA 180
THERM_00661620 (protein) GSTMu32 LGFSNDGSYSEREVRVAQLIGVIKDIYKETIPVCFSPDFDKIKDQAFK-GEVLLKLVLS 141
** * *****:*****:***:***:*** ** :*.***:***: :. : *:*:* :

THERM_00661650 (protein) GSTMu34 YLGDKFEFVGTLYADFLFYEALSYIRHIYPQAICATLTAYINRFENLPGIKEYIASHAQ 240
THERM_00661620 (protein) GSTMu32 FLGDKEFLLSTLYADFLLYEVLCCYKYIYPQAITPTLTAYMNRFNLPYIYIANPSI 201
:*****:*****:***.* * :***** *****:*****:***.*

THERM_00661650 (protein) GSTMu34 ELKVFLPPQRATWSGPQ 257
THERM_00661620 (protein) GSTMu32 NLKAFLEPTFKSTWSGPQ 218
:*.*** :*****
    
```

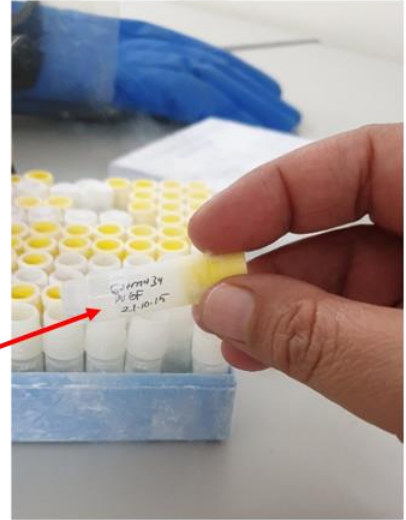
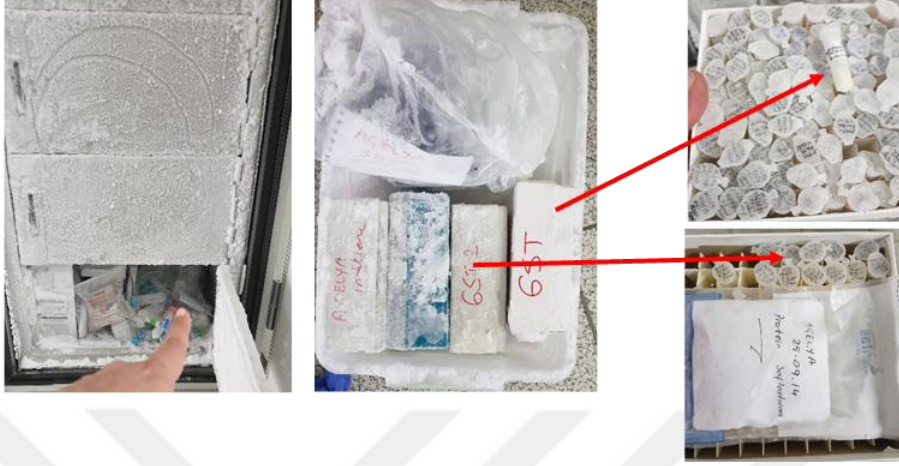
Şekil 0.3. Spot 6'da bulunan TtGSTMu34 proteinindeki tanımlanan peptitlerin TtGSTMu32 proteini ile karşılaştırılması. Mascot analizi sonucu elde edilen peptit listesinde sarı ile gösterilen aminoasitler TtGSTMu20'de bulunmamaktadır.

EK 8. GSH affinitesi ile saflaştırılan toplam GST proteinlerinin aktivite grafiği



Şekil 0.1. 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilen CDNB'nin D1(0.018 mM), D2 (0.036 mM) ve D3 0.072 mM dozlarına maruz kalan *T. thermophila* hücrelerine ait toplam GST proteinlerinin aktivite grafiği. E1 , GSH affinite saflaştırılmasındaki birinci eküsyonlar, E2 ise ikinci eküsyonlardır.

EK 9. TtGSTm34 kodlayıcı gen dizili pIGF-I vektörlerini taşıyan *E. coli* ve *T. thermophila* hücre stokları (-86 Dondurucu ve Sıvı Azotta)



ÖZGEÇMİŞ

ORCID NO: Click or tap here to enter text.

HANDAN AÇELYA KAPKAÇ

Akademik Görevler

Araştırma Görevlisi Eskişehir Teknik Üniversitesi/Fen Fakültesi/Biyoloji Bölümü/Genel Biyoloji Anabilim Dalı

Projelerde Yaptığı Görevler:

1. *Taxus baccata* GGPPS Geninin Biyoinformatik Olarak Oluşturulması ve *S. cerevisiae*'xxda Klonlanması, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Yürütücü: KARACA GENÇER HÜLYA, 01/06/2018 - 01/10/2019 (ULUSAL)
2. Farmasötik Mikrobiyoloji Laboratuvarında MICe Alternatif Floresans, Luminesans Tekniklerin Rutin Kullanılır Hale Getirilmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Yürütücü: KARACA GENÇER HÜLYA, Araştırmacı: KAPKAÇ HANDAN AÇELYA, Araştırmacı: Tekinkoca Sinem, 14/05/2016 - 09/09/2017 (ULUSAL)
3. Viral Aracılıklı Gen Transfer Yöntemi İle Sıçanlarda Oluşturan Proteinopatik Değişikliklerin Kortikal Motor Nöronlar Üzerindeki Etkileri, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Bursiyer: Raghıb Sanaz, Bursiyer: Erçelen Birçe, Bursiyer: POLAT ÇORUMLU ELİF, Bursiyer: KAPKAÇ HANDAN AÇELYA, Danışman: ARSLANYOLU MUHİTTİN, Yürütücü: ULUPINAR EMEL, 27/01/2016 - 27/01/2018 (ULUSAL)
4. Kortikal Motor Nöronlarda Proteinopatik Hasara Neden Olan Yeni Bir Hayvan Modelinin Geliştirilmesi, TÜBİTAK PROJESİ, Bursiyer: POLAT ÇORUMLU ELİF, Bursiyer: Raghıb Sanaz, Danışman: Aydın Osman Özcan, Yürütücü: ULUPINAR EMEL, Bursiyer: KAPKAÇ HANDAN AÇELYA, Bursiyer: Erçelen Birçe, 15/07/2017-15 Ocak 2020 (ULUSAL)

5. Metabolizma mühendisliği yaklaşımları ile *S. cerevisiae*'da Taksol öncüsü Taksa 4,5-diyen-11,12' nin üretimi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Danışman: ÖZTÜRK YUSUF, Danışman: nielsen jens, Yürütücü: KARACA GENÇER HÜLYA, Araştırmacı: ÖZKAY YUSUF, Araştırmacı: KAPKAÇ HANDAN AÇELYA, Araştırmacı: LEVENT SERKAN, 31/01/2017 - 10/12/2020 (ULUSAL)
6. Çift Demetli Odaklanmış İyon Demeti-Taramalı Elektron Mikroskopi Sistemi ile Araştırma Olanaklarının İyileştirilmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: KAPKAÇ HANDAN AÇELYA, Araştırmacı: AY FERİDUN, Araştırmacı: SAVACI UMUT, Yürütücü: TURAN SERVET, Araştırmacı: BAŞKUT SİNEM, Araştırmacı: SERİNCAN UĞUR, 25/11/2015 (Devam Ediyor) (ULUSAL)
7. Bazı yeni hidrazon türevi bileşiklerin antimikrobiyal aktivitelerinin yeni alternatif teknikler ile belirlenmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Danışman: KAYMAKÇIOĞLU BEDİA, Yürütücü: KARACA GENÇER HÜLYA, Araştırmacı: KAPKAÇ HANDAN AÇELYA, Uzman: Tekinkoca Sinem, 14/09/2016 - 29/12/2017 (ULUSAL)

Ödüller

1. En İyi Deneysel / Mikroskopik Çalışma alanında "En İyi Sözlü Bildiri Ödülü", Türk Anatomi ve Klinik Anatomi Derneği, 2020
2. Poster Sunum Ödülü, Türkiye Beyin Araştırmaları ve Sinirbilimleri Derneği, 2019

Eserler

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. KARAMAN NURCAN, Zainel Rabeah Adil, KAPKAÇ HANDAN AÇELYA, KARACA GENÇER HÜLYA, KARADUMAN ABDULLAH BURAK, ILGIN SİNEM, İYİDOĞAN AYŞEGÜL, EMRE EMİNE ELÇİN, KAYMAKÇIOĞLU BEDİA (2018). Design and evaluation of biological activities of 1,3-oxazolidinone derivatives bearing amide, sulfonamide, and thiourea moieties. ARCHIV DER PHARMAZIE, 351(9), Doi: 10.1002/ardp.201800057 (Yayın No: 4572878)
2. ALPDAĞTAŞ SAADET, YÜCEL SEVİL, KAPKAÇ HANDAN AÇELYA, Liu Siqing, BİNAY BARIŞ (2018). Discovery of an acidic, thermostable and highly NADP dependent formate dehydrogenase from *Lactobacillus buchneri* NRRL B-30929. Biotechnology Letters, 40(7), 1135-1147., Doi: 10.1007/s10529-018-2568-6 (Yayın No: 4338266)

3. SEVER BELGİN, ALTINTOP MEHLİKA DİLEK, KARACA GENÇER HÜLYA, KAPKAÇ HANDAN AÇELYA, ATLI EKLIÖĞLU ÖZLEM, BAYSAL MERVE, ÖZDEMİR AHMET (2018). Synthesis of New Thiazolyl-Pyrazoline Derivatives and Evaluation of Their Antimicrobial, Cytotoxic and Genotoxic Effects. Letters in Drug Design Discovery, 15(7), 744-756., Doi: 10.2174/1570180814666170925152902 (Yayın No: 4573045)
4. ÖZDEMİR AHMET, ALTINTOP MEHLİKA DİLEK, SEVER BELGİN, Gençer Hülya Karaca, KAPKAÇ HANDAN AÇELYA, ATLI ÖZLEM, BAYSAL MERVE (2017). A New Series of Pyrrole-Based Chalcones: Synthesis and Evaluation of Antimicrobial Activity, Cytotoxicity, and Genotoxicity. Molecules, 22(12), 2112, Doi: 10.3390/molecules22122112 (Yayın No: 3674988)
5. AKDAMAR HANDAN AÇELYA, YILMAZ SARIÖZLÜ NALAN, ÖZCAN AYÇA, ERSÖZ ARZU, DENİZLİ ADİL, Say Rıdvan (2009). Separation and purification of hyaluronic acid by glucuronic acid imprinted microbeads. Materials Science S Engineering C-Materials for Biological Applications, 29(4), 1404-1408., Doi: 10.1016/j.msec.2008.10.038 (Yayın No: 506293)

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler

1. Erçelen Birce, KAPKAÇ HANDAN AÇELYA, POLAT ÇORUMLU ELİF, ARSLANYOLU MUHİTTİN, ULUPINAR EMEL (2019). Establishment of an animal model that causes proteinopathic changes in neurons by virus-mediated gene transfer method. 17th Turkish Neuroscience Congress 4-7 April 2019, Trabzon, Turkey, 13(S29), 1-79., Doi: 10.2399/ana.19.001s (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:5685422)
2. KARAMAN NURCAN, İYİDOĞAN AYŞEGÜL, KAYMAKÇIOĞLU BEDİA, KAPKAÇ HANDAN AÇELYA, KARACA GENÇER HÜLYA, ILGIN SİNEM, KARADUMAN ABDULLAH BURAK, ADIL ZAINEL RABEAH, EMRE EMİNE ELÇİN (2018). Synthesis and Antimicrobial Activity of Amide, Sulfonamide and Thiourea Derivatives Bearing 1,3-Oxazolidinones. 12nd International Symposium on Pharmaceutical Sciences, ISOPS-12 (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:5695698)
3. KARAMAN NURCAN, İYİDOĞAN AYŞEGÜL, KAYMAKÇIOĞLU BEDİA, KAPKAÇ HANDAN AÇELYA, KARACA GENÇER HÜLYA, ILGIN SİNEM, KARADUMAN ABDULLAH BURAK, ADIL ZAINEL RABEAH, EMRE EMİNE ELÇİN (2018). Synthesis and Antimicrobial Activity of Amide, Sulfonamide and Thiourea Derivatives Bearing 1,3-Oxazolidinones. 12nd

International Symposium on Pharmaceutical Sciences, ISOPS-12 (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:5695698)

4. KAPKAÇ HANDAN AÇELYA, ARSLANYOLU MUHİTTİN (2018). Molecular cloning, recombinant expression and enzymatic characterization of a mu class Glutathione S transferase gene (TtGSTm34) from Tetrahymena thermophila. European Biotechnology Congress 2018, Athens, Greece (/Poster) (Yayın No:4448118)
5. KARACA GENÇER HÜLYA, KAPKAÇ HANDAN AÇELYA (2018). Evaluation of Candida albicans GSY1 gene promoter as a Cd inducible promoter. European Biotechnology Congress 2018, Athens, Greece (/Poster) (Yayın No:4532701)
6. ALPDAĞTAŞ SAADET, YÜCEL SEVİL, KAPKAÇ HANDAN AÇELYA, LİU SİQİNG, BİNAY BARIŞ (2018). A novel NADPH regenerator for industrial biocatalysis. Multistep enzyme catalyzed processes congress (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:4572539)
7. KAPKAÇ HANDAN AÇELYA, ARSLANYOLU MUHİTTİN (2015). A xenobiotic CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) substrate specific glutathione-S-transferase targeted genes in Tetrahymena thermophila GST-Mu 19 and GST-Mu 34. 2015 Ciliate Molecular Biology (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:3555467)

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

1. Erçelen Birce, KAPKAÇ HANDAN AÇELYA, ARSLANYOLU MUHİTTİN, POLAT ÇORUMLU ELİF, ULUPINAR EMEL (2019). Motor nöronlarda hasar oluşturmaya hedefleyen bir viral vektör tasarımının oluşturulması. 17. Ulusal Sinirbilim kongresi (/Sözlü Sunum) (Yayın No:5022338)
2. KAPKAÇ HANDAN AÇELYA, ARSLANYOLU MUHİTTİN (2014). CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) Maddesinin Tetrahymena thermophila Hücreleri Üzerine Toksisitesi ve Glutatyon-S-transferaz (GST) Aktivitesinin Belirlenmesi. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:3555443)
3. KAPKAÇ HANDAN AÇELYA, Aslan Erhan, ARSLANYOLU MUHİTTİN (2009). Tetrahymena thermophila Maleylasetoasetat İzomeraz MAI Proteininin E coli de Rekombinant Üretimi İçin Gerekli Olan Nokta Mutasyonların PZR ile Yerleştirilmesi. 16. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:524376)

4. Küçüköğlü Nurçin, KAPKAÇ HANDAN AÇELYA, ARSLANYOLU MUHİTTİN (2008). Tetrahymena thermophila ATP Bağımlı DNA Ligazların Biyoinformatik Analizi ve DNA Ligaz 1 Geninin Klonlanması. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:524590)
5. ÖZCAN AYÇA, KAPKAÇ HANDAN AÇELYA, Biçen Özlem, YILMAZ SARIÖZLÜ NALAN, Say Rıdvan (2008). Glukuronik Asit Baskılı Polimerik Mikrokürelerin Kullanımıyla Hiyaluronik Asit Saflaştırılması. 4. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:524748)
6. KAPKAÇ HANDAN AÇELYA, YILMAZ SARIÖZLÜ NALAN, EMİR DİLTEMİZ SİBEL, biçen özlem, ERSÖZ ARZU, say rıdvan (2007). Hiyaluronik Asidin Refraktometrik İnterferans Spektroskopi Tekniği ile Tayini. 3. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:524874)

Diğer Yayınlar

1. ULUPINAR EMEL, Erçelen Birce, POLAT ÇORUMLU ELİF, KAPKAÇ HANDAN AÇELYA, ARSLANYOLU MUHİTTİN (2020). Ultrastructural Effects of Targeted TDP-43 Expression in the Upper Motor Neurons of Rats by Systemic Delivery of Adeno-Associated Virus Vectors. JOURNAL OF ANATOMY, 236(S1 1-364), 206-206., Doi: 10.1111/joa.13163 (Uluslararası) (Hakemli) (MAKALE Özet) (Yayın No: 6788005)
2. Erçelen Birce, KAPKAÇ HANDAN AÇELYA, POLAT ÇORUMLU ELİF, ARSLANYOLU MUHİTTİN, ULUPINAR EMEL (2019). Establishment of an animal model that causes proteinopathic changes in neurons by virus-mediated gene transfer method. Anatomy, 13, 29, Doi: 10.2399 (Ulusal) (Hakemli) (MAKALE Özet) (Yayın No: 5949293)
3. KAPKAÇ HANDAN AÇELYA, ARSLANYOLU MUHİTTİN (2018). Molecular cloning, recombinant expression and enzymatic characterization of a mu class Glutathione S transferase gene (TtGSTm34) from Tetrahymena thermophila. Journal of Biotechnology, 280, 50, Doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.06.160 (Uluslararası) (Hakemli) (MAKALE Özet) (Yayın No: 4338269)
4. KARACA GENÇER HÜLYA, KAPKAÇ HANDAN AÇELYA (2018). Evaluation of Candida albicans GSY1 gene promoter as a Cd inducible promoter. Journal of Biotechnology, 280, 48, Doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.06.152 (Uluslararası) (Hakemli) (MAKALE Özet) (Yayın No: 4338274)
5. KAPKAÇ HANDAN AÇELYA, ARSLANYOLU MUHİTTİN (2014). Targeting of a CDNB (1-chloro-2, 4-dinitrobenzene) substrate specific

glutathione-S-transferase gene from *Tetrahymena thermophila* to be used a new biotechnology product. JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY (Uluslararası) (Hakemli) (MAKALE Özet) (Yayın No: 3555211)

KAPKAÇ HANDAN AÇELYA, Küçüköğlü Nurçin, ARSLANYOLU MUHİTTİN (2009). Bioinformatic analysis of *Tetrahymena thermophila* ATP dependent DNA ligases. New Biotechnology (Uluslararası) (Hakemli) (MAKALE Özet) (Yayın No: 3555219).

