T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Microcystis aeruginosa TOKSİK PEPTİDLERİNİN KROMATOGRAFİK ANALİZİ ve EPİTEL HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Seda KUŞOĞLU

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA

Mayıs, 2019

İSTANBUL

Bu çalışma, 20.05.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Evren ÖNAY-UÇAR
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Kaan YILANCIOĞLU
Üsküdar Üniversitesi
Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2016-21655 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim sırasında bilgi ve deneyimiyle her an yanımda olan ve çalışmamı gerçekleştirmem için beni cesaretlendiren, sabrını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Nazlı ARDA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İstanbul Üniversitesi Su Bilimleri Fakültesi'nden Prof. Dr. Reyhan AKÇAALAN ALBAY'a yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarım sırasında hem bilimsel hem manevi açıdan desteğini arkamda hissettiğim Üsküdar Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Dekan Yardımcısı Dr. Öğr. Üyesi Kaan YILANCIOĞLU'na ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı Doç. Dr. Belkıs ATASEVER-ARSLAN'a teşekkür ederim.

Lisans eğitimimden itibaren bilgi ve tecrübeleri ile beni aydınlatan sevgili hocalarım Doç. Dr. Evren ÖNAY UÇAR ve Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ'e teşekkürü borç bilirim.

Sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Elif MERTOĞLU, Aslıhan ŞENGELEN ve Yunus AKSÜT'e bu süreçte bana göstermiş oldukları sabır ve anlayışlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Üsküdar Üniversitesi'nden çalışma arkadaşlarıma manevi desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Bu süreçte bana karşı göstermiş olduğu sabır ve anlayışından ötürü Güney GÜLTEKİN'e teşekkür ederim.

Son olarak, eğitim hayatım boyunca, her türlü maddi ve manevi desteklerini arkamda hissettiğim annem Nuran KUŞOĞLU ve babam Özcan KUŞOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs 2019 Seda KUŞOĞLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **iv**

İÇİNDEKİLER ..... **v**

ŞEKİL LİSTESİ ..... **viii**

TABLO LİSTESİ ..... **xi**

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xii**

ÖZET ..... **xvi**

SUMMARY ..... **xviii**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL KISIMLAR **6**

2.1. SİYANOBAKTERİLER 6

2.1.1. *Microcystis aeruginosa* 6

2.2. SİYANOTOKSİNLER 9

2.2.1. Siklik Peptidler 10

2.2.2. Alkaloidler 17

2.2.3. Lipopolisakkarit (LPS) Endotoksinler 18

2.3. PROTEİN AYIRMA, SAFLAŞTIRMA VE ANALİZ TEKNİKLERİ 19

2.3.1. Kromatografik Teknikler 19

2.3.1.1. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) 21

2.2.2. Elektroforetik Teknikler 24

2.2.3. Diğer Ayırma, Saflaştırma ve Analiz Yöntemleri 26

2.4. MEMELİ HÜCRE KÜLTÜRÜ 27

2.4.1. Sterilizasyon Yöntemleri 28

2.4.2. Hücre Kültürü Bileşenleri 29

2.4.3. Epitel Hücre Hattı 29

2.4.3.1. ECV304 Hücre Hattı 30

3. MALZEME VE YÖNTEM **32**

3.1. *Microcystis aeruginosa* KÜLTÜRLERİNİN KURULMASI 32

3.2. *Microcystis aeruginosa* KÜLTÜRÜNDEN HAM EKSTRE HAZIRLANMASI 33
3.3. PROTEİN KONSANTRASYONUN BELİRLENMESİ 33
3.4. ALG EKSTRESİNİN KOLON KROMATOGRAFİSİ İLE FRAKSİYONLARINA AYRILMASI VE FRAKSİYONLARIN TOPLANMASI 34
3.5. MEMELİ HÜCRE KÜLTÜRÜNÜN KURULMASI 35
3.5.1. Hücreler İçin Gerekli Olan Besiyerinin ve Dondurma Besiyerinin Hazırlanması 35
3.5.2. Hücre Açma 36
3.5.3. Hücrelerin Alt Kültürlerinin Kurulması 36
3.5.4. Hücrelerin Dondurulması ve Stoklama İşlemi 37
3.6. ECV304 HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA EĞRİSİNİN OLUŞTURULMASI 37
3.7. HÜCRE CANLILIK TESTLERİ 38
3.7.1. Total Alg Ekstresi için Hücre Canlılık Testi 38
3.7.2. HPLC ile Toplanan Fraksiyonlar için Hücre Canlılık Testi 39
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER 39
3.9. SODYUM DODESİL SÜLFAT POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ 40
3.10. BOYAMA YÖNTEMLERİ 41
3.10.1. Coomassie Boyama 41
3.10.2. Hızlı Gümüş Boyama 42
4. BULGULAR 43
4.1. ALG KÜLTÜRÜNÜN KURULMASI VE EKSTRE HAZIRLAMA 43
4.2. ALG EKSTRESİNİN PROTEİN KONSANTRASYONU 44
4.3. KOLON KROMATOGRAFİSİ İLE ELDE EDİLEN FRAKSİYONLAR 45
4.4. ECV304 HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA EĞRİSİ 46
4.5. ALG EKSTRESİ VE HPLC İLE TOPLANAN FRAKSİYONLARIN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ 47
4.5.1. Alg Ekstresinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi 47
4.5.2. HPLC'den Toplanan Birinci Fraksiyonun Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi 48
4.5.3. HPLC'den Toplanan İkinci Fraksiyonun Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi 50
4.5.4. HPLC'den Toplanan Üçüncü Fraksiyonun Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi 51
4.5.5. HPLC'den Toplanan Dördüncü Fraksiyonun Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi 52
4.5.6. HPLC'den Toplanan Beşinci Fraksiyonun Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi 54
4.5.7. HPLC'den Toplanan Altıncı Fraksiyonun Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi 55
4.5.8. HPLC'den Toplanan Yedinci Fraksiyonun Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi 57
4.5.9. HPLC'den Toplanan Sekizinci Fraksiyonun Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi 58

4.5.10. HPLC'den Toplanan Fraksiyonların Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Karşılaştırılması 60
4.6. ALG EKSTRESİ VE HPLC İLE TOPLANAN FRAKSİYONLARIN SODYUM DODESİL SÜLFAT POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ 62
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 66
KAYNAKLAR 73
ÖZGEÇMİŞ 85

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Siyanobakterilerin ürettiği toksinlerin etkilerine ve kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması. 9

Şekil 2.2: Mikrosistinin türevleri [Kleinteich ve diğ., 2018 tarafından tanımlanmış 7 mikrosistinin kimyasal yapısı (MC-LR: mikrosistin lösin-arjinin), MC-LA: mikrosistin lösin-alanin, MC-RR: mikrosistin arjinin-arjinin, ADMAdda: O-asetil-O-dimetil 3-amino-9-metoksi-2,6,8-trimetil-10-fenildeka-4,6-dienoik asit, Ala: alanin, Arg: arjinin, Asp: aspartik asit, Dha: dihidroalanin, Dhb: dihidro butirin, Leu: lösin, Ser: serin ve Thr: treonin)]. 11

Şekil 2.3: Mikrosistin-LR'nin yapısı (Yu ve diğ., 2015). 13

Şekil 2.4: Mikrosistin-RR'nin yapısı (Yu ve diğ., 2015). 14

Şekil 2.5: Nodülarin'in yapısı (Yu ve diğ., 2015). 15

Şekil 2.6: Siyanopeptolin-A'nın yapısı (Martin ve diğ., 1993). 16

Şekil 2.7: Anabaenopeptin'in yapısı (Yu ve diğ., 2015). 16

Şekil 2.8: Anatoksin'in yapısı (James ve diğ., 1998). 17

Şekil 2.9: Saksitoksin'in yapısı (Merwe, 2015). 18

Şekil 2.10: Lipopolisakkarit endotoksin yapısı (Durai ve diğ., 2015). 18

Şekil 2.11: Ayrılma mekanizmaları, uygulama biçimi ve faz tiplerine göre kromatografi çeşitleri (Temizkan, 2017). 20

Şekil 2.12: HPLC cihazının şematik gösterimi (A) ve çalışmada kullanılan Shimadzu Corporation marka HPLC (B) cihazı. 22

Şekil 2.13: Morfolojilerine göre 3 temel sınıfa ayrılmış olan hücre tipleri [Sırasıyla; fibroblastik (A), epitel benzeri (B) ve lenfoblast benzeri hücre (C)] (Alberts ve diğ., 2015). 27

Şekil 2.14: Sterilizasyon yöntemleri. 28

Şekil 2.15: Örtü epiteli çeşitleri (Alberts ve diğ., 2015). 30

Şekil 4.1: *M. aeruginosa*'nın sıvı besiyerine ekiminin birinci gününe (A) ve yirmi sekizinci gününe (B) ait görüntüler. 43

Şekil 4.2: Parçalanmamış (A) ve parçalanmış (B) *M. aeruginosa* hücrelerinin mikroskoptaki görüntüsü (40X büyütme). 43

Şekil 4.3: Protein konsantrasyonunu belirlemede kullanılan standart grafik.....44

Şekil 4.4: Alg ekstresinin HPLC sonrası kromatogramı (1. Fr.; 2-5 dak arası, 2. Fr.; 5-8 dak arası, 3.Fr.; 9-14 dak arası, 4.Fr., 14-16 dak arası, 5. Fr.; 16-18.5 dak arası, 6. Fr.; 18.5-23 dak arası, 7. Fr.; 27-33 dak arası, 8. Fr.; 23-27 ve 33-50 dak arası).....45

Şekil 4.5: Başlangıç sayısı $0.5x10^5$ hücre/mL ve $1x10^5$ hücre/mL olan ECV304 hücrelerinin çoğalma eğrileri (Eğrilerin üzerindeki dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir). 46

Şekil 4.6: ECV304 hücreleri üzerine 48 saat süreyle uygulanmış farklı protein konsantrasyonuna sahip total alg ekstrelerinin %canlılık üzerine etkilerinin karşılaştırılması (***P<0.001, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir).....47

Şekil 4.7: Farklı konsantrasyonlarda protein içeren total alg ekstresinin hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik etkisi (R^2=0.9012). 48

Şekil 4.8: ECV304 hücreleri üzerine 48 saat süreyle ağırlıkça farklı konsantrasyonlarda uygulanmış 1. fraksiyonun %canlılık üzerine etkilerinin karşılaştırılması (***P<0.001, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir). 49

Şekil 4.9: Farklı konsantrasyonlardaki 1. fraksiyonun sitotoksik etkisi (R^2=0.6882). 49

Şekil 4.10: ECV304 hücreleri üzerine 48 saat süreyle ağırlıkça farklı konsantrasyonlarda uygulanmış 2. fraksiyonun %canlılık üzerine etkilerinin karşılaştırılması (***P<0.001, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir).....50

Şekil 4.11: Farklı konsantrasyonlardaki 2. fraksiyonun sitotoksik etkisi (R^2=0.8361). 51

Şekil 4.12: ECV304 hücreleri üzerine 48 saat süreyle ağırlıkça farklı konsantrasyonlarda uygulanmış 3. fraksiyonun %canlılık üzerine etkilerinin karşılaştırılması (**P<0.01, ***P<0.001, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir).....51

Şekil 4.13: Farklı konsantrasyonlardaki 3. fraksiyonun sitotoksik etkisi (R^2=0.7581). 52

Şekil 4.14: ECV304 hücreleri üzerine 48 saat süreyle ağırlıkça farklı konsantrasyonlarda uygulanmış 4. fraksiyonun %canlılık üzerine etkilerinin karşılaştırılması (**P<0.01, ***P<0.001, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir).....53

Şekil 4.15: Farklı konsantrasyonlardaki 4. fraksiyonun sitotoksik etkisi (R^2=0.7472). 54

Şekil 4.16: ECV304 hücreleri üzerine 48 saat süreyle ağırlıkça farklı konsantrasyonlarda uygulanmış 5. fraksiyonun %canlılık üzerine etkilerinin

karşılaştırılması (*P<0.05, ***P<0.001, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir).....54

Şekil 4.17: Farklı konsantrasyonlardaki 5. fraksiyonun sitotoksik etkisi (R^2=0.9236). 55

Şekil 4.18: ECV304 hücreleri üzerine 48 saat süreyle ağırlıkça farklı konsantrasyonlarda uygulanmış 6. fraksiyonun %canlılık üzerine etkilerinin karşılaştırılması (**P<0.01, ***P<0.001, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir).....56

Şekil 4.19: Farklı konsantrasyonlardaki 6. fraksiyonun sitotoksik etkisi (R^2=0.7342). 57

Şekil 4.20: ECV304 hücreleri üzerine 48 saat süreyle ağırlıkça farklı konsantrasyonlarda uygulanmış 7. fraksiyonun %canlılık üzerine etkilerinin karşılaştırılması (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir). 57

Şekil 4.21: Farklı konsantrasyonlardaki 7. fraksiyonun sitotoksik etkisi (R^2=0.03870). 58

Şekil 4.22: ECV304 hücreleri üzerine 48 saat süreyle ağırlıkça farklı konsantrasyonlarda uygulanmış 8. fraksiyonun %canlılık üzerine etkilerinin karşılaştırılması (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir). 59

Şekil 4.23: Farklı konsantrasyonlardaki 8. fraksiyonun sitotoksik etkisi (R^2=0.07665). 60

Şekil 4.24: ECV304 hücreleri üzerine 48 saat süreyle uygulanan 48 mg total alg ekstresi ile bu ekstreden elde edilen farklı miktarlardaki (sırasıyla 9.6, 4.8, 4.9, 6.3, 6.2, 6.1, 1.2 ve1.8 mg) 1-8 no.lu fraksiyonların hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması (**P<0.01, ***P<0.001, ###P<0.001, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir). 61

Şekil 4.25: ECV304 hücreleri üzerine 48 saat süreyle aynı konsantrasyonda (48 µg/µL) uygulanan 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 numaralı fraksiyonların hücre canlılığı üzerine etkilerinin karşılaştırılması (**P<0.01 ve ***P<0.001, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir.....62

Şekil 4.26: Total alg ekstresindeki proteinlerin Coomassie boyama yöntemi ile boyanmış SDS-PAGE jelindeki görüntüsü. 63

Şekil 4.27: 0.3 µg protein içeren total alg ekstresi uygulanmış ve hızlı gümüş boyama yöntemi ile boyanmış örnek jel görüntüsü. 64

Şekil 4.28: Hızlı gümüş boyama yöntemi ile boyanmış fraksiyonlara (1-8) ait jel görüntüsü. 64

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: *M. aeruginosa*'ya ait bazı hücresel peptid ve proteinler. 8

Tablo 2.2: Maksimum basınç değerlerine göre sıvı kromatografi çeşitleri. 21

Tablo 3.1: BG-11 besiyeri içeriği. 32

Tablo 3.2: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi.....33

Tablo 3.3: HPLC lineer gradient koşulları. 35

Tablo 4.1: HPLC'de toplanan fraksiyonlar ve liyofilize edildikten sonraki ağırlıkları.....46

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
~	: Yaklaşık
%	: Yüzde
ºC	: Derece Santigrat
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
$AgNO_3$	: Gümüş nitrat
$CaCl_2.2H_2O$	: Kalsiyum klorür dihidrat
cm^2	: Santimetrekare
CO_2	: Karbon dioksit
$CuSO_4.5H_2O$	: Bakır (II) sülfat pentahidrat
Da	: Dalton
dH_2O	: Distile su
g	: Gram
KH_2PO_4	: Monopotasyum dihidrojen fosfat
H_3BO_3	: Borik asit
HCl	: Hidroklorik asit
K_2HPO_4	: Dipotasyum hidrojen fosfat
KCl	: Potasyum klorür
kDa	: Kilodalton
kg	: Kilogram
L	: Litre
mg	: Miligram
$MgSO_4.7H_2O$	: Magnezyum sülfat heptahidrat
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
$MnCl_2.4H_2O$	: Mangan (II) klorür tetrahidrat
Na_2CO_3	: Sodyum karbonat
Na_2HPO_4	: Disodyum hidrojen fosfat

$Na_2MoO_4.2H_2O$: Sodyum molibdat dihidrat

$Na_2S_2O_3$: Sodyum tiyosülfat

NaCl : Sodyum klorür

$NaNO_3$: Sodyum nitrat

nm : Nanometre

nM : Nanomolar

v : Hacim (“Volume”)

V : Volt

w : Ağırlık (“Weight”)

$ZnSO_4.7H_2O$: Çinko sülfat heptahidrat

Kısaltmalar	Açıklama
1D-PAGE	: Bir boyutlu poliakrimalid jel elektroforezi (“1-Dimensional polyacrylamide gel electrophoresis”)
2D-PAGE	: İki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (“2-Dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis”)
APS	: Amonyum persülfat
BCA	: Bişinkoninik asit
BSA	: Sığır serum albumin (“Bovine serum albumin”)
dak	: Dakika
dH2O	: Distile su
diğ.	: Diğerleri
DMEM	: “Dulbecco's Modified Eagle's medium”
DMSO	: Dimetilsülfoksit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EDTA-Na_2	: Etilendiamintetraasetik asit disodyum
FBS	: Fetal sığır serumu (“Fetal bovine serum”)
HPLC	: Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (“High Performance Liquid Chro-matography”)
HPLC-DAD	: Diyot-array dedektörlü HPLC (“Diot array detector-HPLC)
HPLC-MS	: Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (“Mass Spectrometry”)
IC_{50}	: Canlı hücre sayısını %50 düşüren madde konsantrasyonu
LC-MS	: Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometrisi (“Liquid Chromatography-Mass Spectrometry”)
MC-LA	: Mikrosistin lösin-alanin
MC-LR	: Mikrosistin lösin- arjinin
MC-RR	: Mikrosistin arjinin-arjinin
MC-YR	: Mikrosistin tirozin-arjinin
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolyum)
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (“Phosphate-buffered saline”)
PP1	: Protein fosfataz 1
PPA2	: Protein fosfataz 2A
ROT	: Reaktif oksijen türleri (“Reactive Oxygen Species”)
RP-HPLC	**:** Terz-Faz Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (“ Revers-Phase High Performance Liquid Chro-matography”)
SDS	: Sodyum dodesil sülfat

SDS-PAGE : Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (“Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis”)

TEMED : Tetrametiletilendiamin

rpm : Devir/dakika **(“**Revolutions per Minute”)

TFA : Trifoloroasetik asit

WHO : Dünya Sağlık Örgütü (“World Health Organization”)

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Microcystis aeruginosa TOKSİK PEPTİDLERİNİN KROMATOGRAFİK ANALİZİ ve EPİTEL HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Seda KUŞOĞLU

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA

Artan dünya nüfusuna bağlı olarak, özellikle içme suyu kaynaklarının güvenliği ve kalitesi son yıllarda dünya genelinde büyük önem arz etmeye başlamıştır. Siyanobakterilerin suda bulunuşu ve toksik bileşenlerinin tanımlanması öncelikli araştırma konuları haline gelmiştir, çünkü insan ve tüm canlı organizmalar üzerindeki toksik ve öldürücü etkilerinin önüne geçilmesi için bu verilerin elde edilmesi gereklidir. Ayrıca siyanobakteriyel kontaminasyondan kaynaklanan patolojik süreçleri önlenmek veya tedavi etmek üzere etkili stratejiler geliştirmek için toksik maddeler ve etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılmalıdır.

Dünya genelinde neredeyse tüm tatlı su kaynaklarında yaşayan siyanobakterilerden *Microcystis aeruginosa* ile yapılan çalışmalar, bu türün diğer alg türlerine göre daha yüksek toksisiteye neden olduğunu göstermiştir. Bu toksisite başta insan ve hayvanlar olmak üzere tüm canlıların yaşamını tehdit etmektedir. Toksik bileşenler, sulama sırasında absorbsiyon yoluyla bitki dolaşım sistemine girmekte ve buna bağlı olarak sadece kontamine olmuş suyun kullanımı ile değil, bu su ile sulanmış bitkilerin tüketimi ile de besin zincirine katılmaktadır.

*Microcystis aeruginosa'*da yüksek hepatotoksik aktivite gösteren birçok peptid tanımlanmıştır. Bu toksik peptidler genellikle hücre içinde tutulmakla beraber, hücre lizizine bağlı olarak veya aktif taşıma sistemleri ile hücre dışına da salınmaktadır. Beslenme yoluyla alınan toksik peptidler, organik anyon transport proteinleri ile karaciğere taşınıp protein fosfataz 1 ve protein

fozfataz 2A enzimlerini inhibe ederek, hücre içi fosfoprotein artışına ve buna bağlı intrahepatik kanamaya, hücre nekrozuna ve karaciğerde tümör oluşumuna sebep olmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, toksik peptidler ve proteinler içeren *Microcystis aeruginosa* ekstresinin ve kromatografik olarak ayrılmış fraksiyonlarının insan epitel hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini değerlendirmektir.

Çalışmanın ilk aşamasında, kültürdeki *Microcystis aeruginosa* hücrelerinden total ekstre hazırlandı. Daha sonra bu ekstre yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC) yöntemiyle 8 fraksiyona ayrıldı. Total ekstre ve fraksiyonların farklı konsantrasyonları logaritmik büyüme evresinin ortasında ECV304 hücreleri üzerine 48 saat süreyle uygulandı ve konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığı üzerindeki etkileri istatistiksel açıdan değerlendirildi. Ayrıca, total ekstrede ve her bir fraksiyonda bulunan polipeptidlerin molekül ağırlıkları sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforeziyle analiz edildi.

En yüksek toksik etkiyi (~%70), beklendiği gibi total alg ekstresi gösterdi. Fraksiyonların hücre çoğalması üzerindeki etkileri birbirinden farklılık gösterdi. Bazı fraksiyonlar (1, 2, 4, 5 ve 6 no.) sitotoksik etki ortaya koyarken (sırasıyla, %55, %40, %40, %35 ve %30), bazı fraksiyonların özellikle düşük konsantrasyonları (3, 7 ve 8 no.) proliferatif etki (~%80-%5) gösterdi.

Bu tez, *Microcystis aeruginosa* ekstresindeki toksik peptidlerin HPLC ile ayrımını ve her bir fraksiyonun ayrı ayrı sitotoksik etkisini rapor eden ilk çalışmadır. Epitel hücreleri üzerindeki en yüksek sitotoksik aktivitenin total alg ekstresinde belirlenmiş olması, farklı fraksiyonlarda bulunan polipeptidlerin sitotoksisiteye sinerjik katkı sağladığını düşündürmektedir. Elektroforetik analizler total ekstre ve fraksiyonlarının geniş bir molekül ağırlığı aralığında (5-300 kDa) ortak veya farklı polipeptidler içerdiğini ortaya koymuştur.

Bu sonuçlar, *Microcystis aeruginosa'*ya bağlı toksisitenin önlenmesinde ve tedavisinde hedeflenecek toksik moleküllerin belirlenmesi açısından önem arz etmektedir. Bu çalışmada optimize edilen HPLC prosedürü, *Microcystis aeruginosa*'nın ve diğer alglerin toksik peptidlerinin analizi için gelecekte yürütülecek çalışmalarda yol gösterici olabilir.

Gelecek çalışmalarda *Microcystis aeruginosa*'daki toksik peptidleri daha iyi tanımlayabilmek için, total alg ekstresi yerine bu ekstreden çöktürülerek ayrılan total proteinlerin referans toksik peptidlerle birlikte kullanılması daha iyi sonuç verebilir. Ayrıca fraksiyonlardaki toksik peptidleri daha belirgin bir şekilde görüntüleyebilmek için peptidlere özel 1- ve 2-boyutlu PAGE sistemleri kullanılmalıdır.

Mayıs 2019, 104 sayfa.

Anahtar kelimeler: *Microcystis aeruginosa*, ECV304, HPLC, toksik peptidler, sitotoksisite

SUMMARY

M.Sc. THESIS

CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF *Microcystis aeruginosa* TOXIC PEPTIDES AND EVALUATION OF EFFECTS ON EPITHELIAL CELLS

Seda KUŞOĞLU

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA

Due to the increase in worlds' population, especially safety and quality of drinking water resources have become very important in recent years worldwide. The entity of cyanobacteria in water, and identification of their toxic components have become primary research subjects, since these data must be achieved to avoid their toxic or fatal effects on human and all living organisms. Furthermore, toxic substances and their mechanisms of action must be fully elucidated to develop efficient strategies for the prevention or treatment of pathological processes arising from cyanobacterial contamination.

Studies with *Microcystis aeruginosa*, a cyanobacterium living in almost all freshwater sources in all over the World, have revealed that this species has higher toxicity than other algae species. This toxicity threatens the lives of all living beings, especially humans and animals. The toxic components enter the plant circulation system through the absorption by the plants during the irrigation, and accordingly participate to food chain by not only the use of contaminated water, but also the consumption of the plants irrigated with this water.

Many peptides with high hepatotoxic activity have been described in *Microcystis aeruginosa*. While these toxic peptides are generally retained in the cell, they are also released from the cell due to cell lysis, or by active transport systems. Dietary toxic peptides are transported to the liver by organic anion transport proteins and inhibit protein phosphatase 1 and protein

phosfatase 2A enzymes, resulting in an increase of intracellular phosphoprotein, and associated intrahepatic bleeding, cell necrosis and tumor formation in the liver.

The aim of this study was to evaluate the cytotoxic effects of *Microcystis aeruginosa* extract, which contains toxic peptides and proteins, and its chromatographically separated fractions on human epithelial cells.

In the first step of the study, total extract was prepared from the *Microcystis aeruginosa* cells in the culture. The extract was then separated into 8 fractions by high performance liquid chromatography (HPLC) method. Different concentrations of total extract and fractions introduced to ECV304 cells on mid-log phase for 48 hours, and their concentration-dependent effects on cell viability were statistically evaluated. In addition, the molecular weights of the polypeptides in total extract and each fraction were analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

Total algal extract showed the highest toxic effect (~70%), as expected. Effects of fractions on cell proliferation varied. Some fractions (1, 2, 4, 5 and 6 no.) possessed cytotoxic activity (55%, 40%, 40%, 35% and 30%, respectively) while especially lower concentrations of some others (3, 7 and 8 no.), on the contrary, exerted proliferative effect (80%-5%).

This thesis is the first study reporting the separation of toxic peptides in *Microcystis aeruginosa* extract by HPLC and the individual cytotoxic effect of each fraction. Since the highest cytotoxic activity on the epithelial cells was detected in total algal extract, the polypeptides found in different fractions seem to contribute to the cytotoxicity synergistically. Electrophoretic analyses revealed that total extract and fractions contained common or different polypeptides in a wide range of molecular weight (5-300 kDa).

These results are important for the detection of toxic molecules targetted in the prevention and treatment of *Microcystis aeruginosa*-induced toxicity. The HPLC procedure optimized in this study may be a guide for future studies to analyze the toxic peptides of *Microcystis aeruginosa* and other algae.

In future studies, the use of total proteins that are precipitated from total algal extract along with reference toxic peptides rather than this extract itself may produce better results for the identification of toxic peptides in *Microcystis aeruginosa*. Furthermore, peptides-specific 1- and 2-dimensinola PAGE systems might be used to visualize the toxic peptides in the fractions.

May 2019, 104 pages.

Keywords: *Microcystis aeruginosa*, ECV304, HPLC, toxic peptides, cytotoxicity

1. GİRİŞ

Oksijenik fotosentetik bakteriler grubunda yer alan siyanobakteriler, sucul ve karasal çevrede yaygın olarak bulunurlar. Endüstriyel atıkların işlem görmeden içme suyu kaynaklarına salınımı ve plansız yerleşim, göl ve akarsu kaynaklarında su kalitesinin düşmesine ve siyanobakteriyel hücre topluluklarının artışına sebep olmaktadır. Siyanobakterilerin artışı ve buna bağlı olarak yüksek metabolik aktiviteleri sonucu sularda tat ve koku değişiklikleri meydana gelmektedir (Kahraman ve Küplülü, 2012). Siyanobakterilerin bir kısmı, non-ribozomal peptidler, poliketidler ve alkaloidleri içeren toksik sekonder metabolitler (siyanotoksinler) üretebilmektedirler. Siyanotoksinler; nörotoksinler, hepatotoksinler ve sitotoksinler olmak üzere üç ana sınıfa ayrılırlar (Chorus ve diğ., 1999).

Siyanobakteriler, sıcaklık ve CO_2 konsantrasyonu artışı gibi değişen çevre şartlarına, gen regülasyonunda değişime giderek hızlıca adapte olabilmekte ve daha yüksek konsantrasyonlarda toksik metabolit üretebilmektedirler. Dolayısıyla gelecekte küresel ısınmanın bir sonucu olarak daha da yüksek toksisiteye neden olacakları öngörülmektedir (Kurmayer, 2011). Sucul ortamlarda yaşayan siyanobakterilerin ürettiği siyanotoksinler bu ortamlarda yaşayan ve bu ortamlarla etkileşime giren tüm canlıların yaşamını tehdit edecek boyutlara ulaşabilir. Özellikle içme sularında bulundukları zaman insanlar için tehlike arz eden bu toksinlerin içme suyundan uzaklaştırılmasında klasik yöntemler yetersiz kalmaktadır. Uzun süreli tüketim de kişilerde kronik toksisiteye sebep olmaktadır. Siyanotoksin içeren suların arıtımı için, aktif karbon, filtrasyon, klorlama, $FeCl_3$ ile yüzdürme, sedimentasyon, kum filtrasyonu ve aktif karbon filtrasyonu gibi yöntemler kombine şekilde kullanılarak bir sistem oluşturulmuş, aktif karbonun toksinlerin uzaklaştırılmasında en etkin yöntem olduğu belirlenmiştir. Fakat ekonomik olmadığı için bu yöntem tercih edilmemektedir (Carmichael, 1994).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO, 1999) tatlı sularda ve içme sularındaki algler ve siyanobakterilerden kaynaklanan siyanotoksinlere dikkat çekmekte, çevresel tehdidin global ısınmayla ve insan kaynaklı çevre kirliliğiyle sürdüğünü bildirmektedir. WHO tarafından belirlenen risk faktörleri ve siyanotoksinler için önerilen güvenlik sınırlarından oluşan detaylı referans bilgiler yayımlanmıştır (WHO, 2011). İçme suyu hariç genel kullanımdaki suyun bir

mililitresinde 20.000'den fazla siyanobakteri hücresinin sağlık için risk oluşturduğu bildirilmektedir (WHO, 2003). İçme sularına ilişkin veriler güvenlik sınırını daha da aşağılara çekmektedir. "Avustralya New South Wales Bleu Green Alg Task Force" tarafından 1992 yılında yayımlanan genelgede, tatlı su kaynaklarının arıtımı sonucu elde edilen içme sularında bulunan siyanobakteri sayısı 500-2000 hücre/mL aralığında ise gözlemlerin arttırılması; 2000-6500 hücre/mL aralığında ise toksisite analizlerinin yapılması; 6500 hücre/mL'den büyükse arıtma sistemlerinin incelenmesi ve bu suyun insan kullanımı için uygun ve güvenilir olmadığının bildirilmesi gerektiği ilan edilmiştir (Carmichael, 2001).

Yeterli klorlama yapılmayan içme sularında bulunan ve canlılar için toksik bir alg olan *M. aeruginosa* türünün varlığı, insanlar ve birçok hayvan türü için hayati tehlike oluşturmakta, ayrıca su kalitesinin ve güvenliğinin düşük olduğunu gösteren temel belirteçlerden biri olarak kabul edilmektedir (Codd ve diğ., 1989; Carmichael, 1994). Akarsu ve göllerdeki su kalitesinin belirlenmesinde alglerin indikatör olarak kullanımı Dünyada uzun yıllardır söz konusu olmasına rağmen, Türkiye'de ancak son yirmi yılda gündeme gelmiştir. 1980'li yıllardan itibaren İstanbul'a içme suyu sağlayan Küçükçekmece Gölü'nde, 2000 yılının Haziran ve Ekim ayları arasında şiddetli balık ölümleri gerçekleşmiştir. Bu sebeple, 2000-2003 yılları arasında, her mevsimde Küçükçekmece Gölü'nden düzenli aralıklarla su örneği alınarak incelenmiş ve gölde 24 farklı siyanobakteri türünün yaşadığı belirlenmiştir (Albay ve diğ., 2005). Bu türlerden baskın olanının ise *M. aeruginosa* olduğu bulunmuş ve ölçümlerde temel olarak bu organizmanın hücre sayısı ve organizmanın ürettiği mikrosistin siyanotoksininin konsantrasyonu kayıt altına alınmıştır. 2000 yılından 2001 yılına kadar yapılan ölçümlerde, su sıcaklığının 24^{o}C'nin üzerine çıktığı yaz aylarında, mikrosistin konsantrasyonunun 24.2 µg/L'ye kadar yükseldiği gözlenmiştir. Bu değer, WHO'nun 1998 yılında yayınladığı içme su kaynaklarında bulunabilecek maksimum mikrosistin konsantrasyonun 24 katıdır. Takip eden 3 yıl boyunca yapılan ölçümlerde, su sıcaklığının düşük olduğu kış ve erken ilkbahar aylarında mikrosistin tespit edilmezken, yaz aylarında mikrosistin konsantrasyonunda şiddetli artışlar saptanmıştır. Araştırmacılar bu durumun, başta bu gölde yaşayan balık popülasyonu olmak üzere, gölün su sağladığı bölgelerde yaşayan tüm canlıları tehdit ettiğine dikkat çekmişlerdir.

Küçükçekmece Gölü'nün rehabilitasyon planı ile ilgili yapılan bir çalışmada (Gürevin ve diğ., 2017) Ekim 2006 ile Şubat 2008 arasında gölden belirli zaman aralıklarında örnek alınmıştır. Göle boşaltılan evsel atıkların neden olduğu yüksek konsantrasyonda nitrojen ve fosfor temelli

atıkların, gölde yaşayan siyanobakteriler için zengin besiyeri sağladığı saptanmıştır. Bu boşaltımın önüne geçilmesinin yanı sıra, gölün mevcut suyunun besin yükü az su ile değiştirilmesi ile yaklaşık 30 yıl sonra, göldeki siyanobakteri popülasyonunun güvenli sınırlara çekilebileceği ön görülmüştür.

Sakarya iline içme suyu sağlayan Sapanca, İznik ve Sakarya Çaltıcak Göllerinde gerçekleşen balık ölümleri sonrası, 1998 yılında Mayıs ve Ağustos ayları arasında farklı derinliklerden toplanan su örnekleri analiz edilmiştir (Albay ve diğ., 2003). Bu araştırmada İznik ve Sakarya Çaltıcak Göllerinde bulunan siyanobakteri popülasyonu içinde baskın türün *M. aeruginosa* ve Sapanca Gölü'nde baskın türün *Planktothrix rubescens* olduğu belirlenmiştir. Bu göllerdeki yüksek siyanobakteri biyokütlesinin temel nedeni, bu göllere bırakılan evsel ve tarımsal atıkların yarattığı zengin besin kaynaklarıdır. Benzer riskler Ülkemizin farklı bölgelerindeki su kaynakları için de rapor edilmiştir (Tas ve Gonulol, 2006; Çelik ve Ongun, 2008; Sömek ve diğ., 2008; Gurbuz ve diğ., 2009; Yerli ve diğ., 2012).

Bölge halkı için tatlı su kaynağı, balıkçılık ve turizm açısından yüksek önemi olan Eğirdir Gölü'nün yüzeyinde 2006 yılı yaz ve sonbahar mevsimlerinde gözlemlenen renk değişimi sonucu yapılan bir çalışmada (Sömek ve diğ., 2006), gölde yüksek yoğunlukta *M. aeruginosa* siyanobakterisinin ve 4.14 µg/L MC-LR toksininin bulunduğu tespit edilmiştir. Bu değerler, Eğirdir Gölü'nün siyanobakteri toksisitesi açısından risk altında olduğunu ve gölün kontrollerinin aksatılmadan yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Kızılırmak Deltası çok sayıda göle (Liman Gölü, Cernek Gölü, Tatlı Göl, Karaboğaz Gölü gibi) ev sahipliği yapmaktadır ve bu göller, balıkçılık, turizm ve tarımda aktif olarak kullanılmaktadır. 1996-1997 yıllarında bu göllerden farklı mevsimlerde örnek alınarak baskın siyanobakteri türlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada (Tas ve Gonulol, 2007), ilkbahar mevsiminde, *Cladophora glomerata, Cyclotella ocellata, Microcystis aeruginosa, Monoraphidium* sp., *Nitzschia acicularis, Oocystis borgei, Pediastrum boryanum Phacotus lenticularis, Scenedesmus* sp. türlerinin, yaz mevsiminde ise, *Anabaena catenula, Anabaena spiroides, Microcystis aeruginosa, Nodularia spumigena* türlerinin baskın olarak bulunduğu gözlenmiştir.

Kovada Gölü'nde (Isparta) bulunan siyanobakterilerin tanımlandığı bir çalışmada (Gurbuz ve diğ., 2009), Mayıs 2005 ve Ekim 2005 ayları arasında alınan örneklerde baskın siyanobakteri

türünün *M. aeruginosa* olduğu tespit edilmiştir. Ölçüm alınan aylardan su sıcaklığının en yüksek düzeyde olduğu Ağustos 2005'te *M. aeruginosa* koloni sayısının 150 koloni/mL olduğu ve ölçüm alınan 6 ayda mikrosistin konstrasyonunun 0.7-48.5 μg/L aralığında değiştiği tespit edilmiştir.

Mogan Gölü'nden (Ankara) 1 yıl boyunca (Ekim 2005-Ekim 2006) toplanan göl suyu örneklerinin analiz edildiği bir çalışmada (Yerli ve diğ., 2012), sıcak dönem olan Mayıs-Ekim arasındaki dönemde, en baskın türün *Merismopedia minima* olduğu, *M. aeruginosa'*nın ise ikinci baskın tür olarak bulunduğu gözlenmiştir. *M. minima*'nın ilkbaharda, *M. aeruginosa'*nın ise erken sonbaharda en yüksek üreme değerlerine ulaştığı tespit edilmiştir.

Manyas Gölü'nde bulunan baskın siyanobakteri türünün analizi ile ilgili bir çalışmada (Çelik ve Ongun, 2008), Ocak 2003 ve Aralık 2004 arasında toplanan örneklerde soğuk periyotta (su sıcaklığının 25^{o}C'nin altında olduğu dönemlerde) baskın türün *Acourtia microcephala,* sıcak periyotta (≥25^{o}C) ise baskın türün *M. aeruginosa* ve *Anabaena spiroides* olduğu rapor edilmiştir.

Siyanobakteri kontaminasyonu Dünyanın değişik bölgelerinde sıklıkla karşılaşılan ciddi bir sorundur. Itaparica Dam (Brezilya)'da 1993 yılında, içme su kaynaklarında *Anabaena* sp. ve *Microcystis* sp. kontaminasyonu sonucu 88 kişi hayatını kaybetmiş, çok sayıda kişide ise gastroenterit rahatsızlıklar gözlenmiştir. 1983 yılında Armidale (Avustralya)'de çok sayıda kişide *M. aeruginosa* kaynaklı karaciğer hasarı saptanmıştır. İngiltere'de 1989 yılında Staffordshire'a yakın Rudyard Gölü'nde artan *M. aeruginosa* popülasyonuna bağlı olarak, göl suyu ile temas eden kişilerde uzun süreli diyare ve kusma gözlenmiştir. 1988'de Amerika'da Güney Dokata'ya yakın Richmond Gölü'nden su sağlayan çiftlikte kuş, köpek ve çiftlik hayvanlarında toplu ölümler gözlenmiş ve ölümlerin göl suyunda yüksek miktarda üremiş olan *M. aeruginosa'*dan kaynakladığı bulunmuştur. Bu verilerin dışında Amerika, Karayip Adaları, Doğu Avrupa, Güney Asya gibi çeşitli yerlerde mevsimler değişikliklere bağlı su kaynaklarının ısınmasıyla *Microcystis* popülasyonunda artış gözlenmektedir (Long ve diğ., 1991; Hitzfeld ve diğ., 2000).

Dünya genelinde en az 46 siyanobakteri cinsinin omurgalılar için toksik olduğu belirlenmiştir. Tatlı sularda en çok yayılım gösteren siyanobakteri cinslerinin ise, *Microcystis, Anabaena, Oscillatoria, Planktothrix, Chroococcus ve Nostoc* olduğu ve bu siyanobakterilerin heptapeptid

yapısında bir hepatotoksin olan stabil mikrosistin sentezledikleri belirlenmiştir (Kurmayer, 2011). Farklı iklim koşullarına kolaylıkla adapte olabilen *M. aeruginosa* başta olmak üzere birçok farklı siyanobakteri türü tarafından sentezlenen mikrosistin molekülü, hayvanlarda ve gelişmiş bitkilerde bulunan protein fosfataz 1 (PP1) ve protein fosfataz 2A (PP2A)'yı inhibe etmektedir (Lawton ve diğ., 1994; Pearson ve diğ., 2010). Pirinç *(Oriza sativa)* ile yapılan bir çalışmada (Prieto ve diğ., 2011), bitkiye 48 saat boyunca ekolojik konsantrasyona yakın konsantrasyonda (2.5 µg/L) mikrosistin uygulanmıştır. İşlem sonrasında, bitkinin taze ağırlığında azalma ve reaktif oksijen türlerinde artış olduğu belirlenmiştir.

Günümüzde *Microcystis aeruginosa*'nın ürettiği 90'a yakın mikrosistin izoformunun, metilasyon, hidroksilasyon, epimerizasyon derecesi, peptid sekansı ve toksisitesi tanımlanmıştır (Rao ve diğ., 1998; Yalçın, 2012). Mikrosistin zehirlenmelerinin en önemli sonucu karaciğer hasarıdır. Bunun dışında rutin olarak etkin klorlama ya da filtreleme yapılmayan suların tüketimine bağlı gözlenen zehirlenme durumlarında kusma, kaslarda zayıflık ve akut karaciğer hasarı gözlenmiştir. Sularda tespit edilen mikrosistinlerin, hastaların karaciğer dokusunda ve kanında bulunduğu tespit edilmiştir (Campos ve diğ., 2010). Çok tehlikeli *M. aeruginosa*'nın, mikrosistin dışındaki diğer hücre bileşenleri ile ilgili yeterli çalışma henüz bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, *M. aeruginosa* hücresel ekstresinin Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile analizi ve toplanan fraksiyonların sağlıklı epitel hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

Bu çalışmanın, hepatotoksik bir alg olduğu bilinen *M. aeruginosa* türünün hücresel içeriğinin aydınlatılması ve potansiyel etkilerinin araştırılması üzerine yürütülecek yeni projelere öncülük etmesi beklenmektedir. Çalışmada elde edilen verilerin *M. aeruginosa* sitotoksisitesine karşı gelecekte uygulanabilecek tedavi stratejilerine de katkı sağlama potansiyeli bulunmaktadır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. SİYANOBAKTERİLER

Siyanobakteriler sahip oldukları fotosentetik pigmentler nedeniyle "mavi-yeşil alg" olarak da adlandırılan ve geçici olarak donabilen su habitatlarından sıcak su kaynaklarına kadar geniş bir yaşam alanına sahip olan organizmalardır (Carmichael, 1988). En ilkel fotosentetik organizma olan siyanobakteriler; nükleus zarı bulundurmadıkları için "bakteri", fotosentez yapabildikleri için de "alg" olarak nitelendirilmektedirler (Bryant, 1994). Fotosentez yapabilmeleri sebebiyle su ortamındaki besin ve O_2 oranının artmasını sağlamaktadırlar. Nükleus ve organel zarlarına sahip olmadıkları için, genetik materyal ve pigment maddeleri sitosolde serbest halde bulunur. Gram negatif bakterilerin hücre duvarına benzer, az miktarda peptidoglikan içeren hücre duvarına ve 80S ribozomal RNA'ya sahiptirler (Paiva ve diğ., 2017).

Sitosollerinde, serbest halde fotosentetik bir pigment olan klorofil-a ve mavi renkli fikobilin pigmenti içerirler. Siyanobakterilerin sahip olduğu mavi-yeşil renk, klorofil-a ve fikobilin pigmentlerinden kaynaklanır. Fikobilinler molekül ağırlığı 30-35 kDa olan proteinlere kovalent olarak bağlı şekilde bulunurlar. Proteine bağlı fikosiyanobilin pigmenti fikosiyanin olarak adlandırılır ve mavi renkli olup 610-660 nm arasında maksimum absorpsiyon yapar (Chorus, 2001).

Siyanobakteriler tek hücreli ya da çok hücreli koloniler oluşturabilmektedirler. Buna ek olarak ipliksi yapıda da olabilmektedirler. Vejetatif bölünmeyle ya da sporlarla üreyebilirler (Kahraman ve Küplülü, 2012).

Siyanobakteriler çok sayıda toksin (siyanotoksin) üretirler (bkz. 2.2. Siyanotoksinler).

2.1.1. *Microcystis aeruginosa*

İlk kez 1982'de Kasumigaura Gölü'nden (Japonya) izole edilen ve taze su ekosistemlerinde en yaygın üreme gösteren siyanobakterilerden olan *M. aeruginosa* beş kıtada yayılım göstermektedir. Bu tür, insan ve hayvan için hepatotoksik olan çok sayıda sekonder metabolit üretmektedir. Genomu, çok sayıda uzun tekrarlı dizileri ve transpozaz genlerini içermektedir (Straub ve diğ., 2011).

*Microcystis aeruginosa'*nın taksonomik sınıflandırılması: Prokaryota (domain), Bacteria (alem), Negibacteria (alt alem), Cyanobacteria (sınıf), Chroococcales (takım), Chroococcaceae (aile), *Microcystis* (cins) ve *Microcystis aeruginosa* (tür) şeklindedir (Cavalier-Smith, 2002).

Diğer alg türleri ile karşılaştırıldığında daha düşük üreme hızına sahip *M. aeruginosa*'nın yıllık yaşam döngüsü belirgin iki fazdan oluşur. Birinci faz; kış ve ilkbaharın başlarında gerçekleşen çökeltiler üzerinde yaşadığı sucul faz; ikinci faz ise, plantonik faz diye isimlendirilen, yaz ve sonbahar mevsimlerinde gerçekleşen suda yaşadığı fazdır. Maksimum büyüme hızına 25ºC'nin üzerindeki sıcak sularda ulaşır ve bu sebeple yaz aylarında gerçekleşen plantonik fazda yüksek hızda üreme gösterir (Rao ve diğ., 1997).

Sitosolünde suyun yoğunluğu ile kıyaslandığında daha düşük yoğunlukta gaz vakuolleri bulunduran bu siyanobakteri, bu vakuoller sayesinde, hem su yüzeyinde bulunabilme hem de ışığın ve besinin daha fazla olduğu ortamlara yönlenme yeteneğine sahiptir (Walsby, 1987).

Yapısında bulundurduğu, diğer alg türleri ile ortak klorofil-a (kl-a) pigmenti sayesinde, fotosentez yapabilen *M. aeruginosa,* klorofil-a'ya ek olarak başka fotosentetik pigmentler de içerir. Bu sebeple, geniş dalga boyundaki (500-600 nm) ışığı kullanarak aktif şekilde besin ve O_2 üretimi gerçekleştirir (Cohen ve Gurevitz, 2006).

Fotosentetik bir organizma olan *M. aeruginosa* metabolizması için hayati önem taşıyan ışık için çeşitli adaptasyonlar geliştirmiştir. Böylece diğer yeşil alglere kıyasla ışık eksikliğini daha iyi tolere edebilmektedir, hatta düşük ışık yoğunluğunda, yüksek ışık yoğunluğuna göre daha hızlı üreyebilmektedir. *M. aeruginosa*'nın en yüksek düzeyde toksik peptid ürettiği ışık düzeyi aralığı 40 ve 50 mikroeinstein m^{-2} sn^{-1}'dir (Mur ve diğ., 1978; Oh ve diğ., 1999).

*M. aeruginosa'*nın hücre çapı, 1-9 µm aralığındadır ve hücresel içeriğinin %36'sının karbohidrat, %18.2'sinin yağ asitleri, %0.7'sinin fosfor ve %0.4'ünün protein olduğu bilinmektedir (Durai ve diğ., 2015; Harke ve diğ., 2016).

Dünya genelinde 257 ülkede varlığı rapor edilen *M. aeruginosa,* ortalama 4.26 Mbp genom boyutuna ve 12.000 gene sahiptir (Harke ve diğ., 2016).

M. aeruginosa'da bugüne kadar tanımlanmış peptid ve proteinlerin listesi Tablo 2.1'de verilmiştir. Bu tabloda toksik peptidlerin yanı sıra çeşitli metabolik yollarda fonksiyonu olan birçok protein görülmektedir.

Tablo 2.1: *M. aeruginosa*'ya ait bazı hücresel peptid ve proteinler.

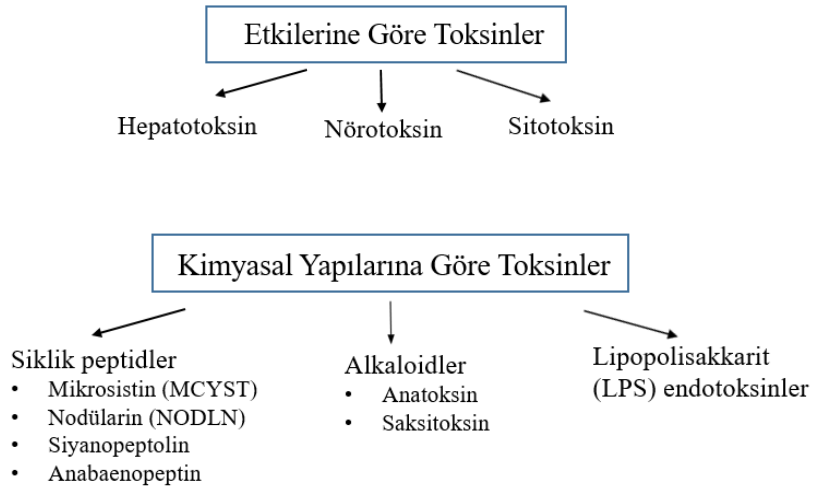
	Peptid/protein	**Molekül ağırlığı**	**Kaynakça**
TOKSİK PEPTİDLER	Mikrosistin-LR	995 Da	Chen ve diğ., 2018
	Mikrosistin-RR	1038 Da	Zhong ve diğ., 2017
	Mikrosistin-YR	1045 Da	Moreno ve diğ., 2004
	Mikrosistin-LA	910 Da	Ramanan ve diğ., 2000
	Mikrosistin-LY	1002 Da	Birungi ve Li, 2009
	Mikrosistin-LW	1025 Da	Faassen ve Lürling, 2013
	Mikrosistin-LF	986 Da	Faassen ve Lürling, 2013
	Siyanopeptolin	957 Da	Kotak ve diğ., 1995
	Anabaenopeptin	836 Da	Kotak ve diğ., 1995
DİĞER PEPTİD/PROTEİNLER	Mikrosistin sentetaz	116-205-402 kDa	Tillett ve diğ., 2000
	Fosforibulokinaz	38.036 kDa	Wei ve diğ., 2016
	Asetil-Coa asetiltransferaz aile proteini	41.396 kDa	Wei ve diğ., 2016
	Fosfogliserat kinaz	42.811 kDa	Wei ve diğ., 2016
	Fruktoz-bifosfat aldolaz, sınıf II, Kalvin döngüsü subtipi	39.156 kDa	Wei ve diğ., 2016
	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz	37.128 kDa	Wei ve diğ., 2016
	60 kDa şaperonin	57.701 kDa	Wei ve diğ., 2016
	ATP sentaz subunit alfa	54.116 kDa	Wei ve diğ., 2016
	ThiF ailesi proteini	42.979 kDa	Wei ve diğ., 2016
	Oligo-ulvanlar	50-60 kDa	Kim ve Chojnacka, 2015

Tablo 2.1 (devam): *M. aeruginosa'*ya ait bazı hücresel peptid ve proteinler.

Akt substrat	160 kDa	Kim ve Chojnacka, 2015
Floroglukinol	162-650 kDa	Kim ve Chojnacka, 2015
Ulvan	189-8200 kDa	Kim ve Chojnacka, 2015
Laminaran	5 kDa	Pereira, 2018

2.2. Siyanotoksinler

Siyanobakterilerde bulunan siyanotoksinler etkilerine ve kimyasal yapılarına göre farklı gruplarda sınıflandırılabilir (Şekil 2.1). Siyanotoksinler; korunma, neslin devamını sağlama ve ekosistemle ilişkilerini düzenlenme gibi işlevlerde görev aldıklarından, bulundukları siyanobakteriler için hayati öneme sahiptirler (Chorus ve diğ., 1999). Diğer canlılar üzerinde toksik etkiye sahip bu bileşikler, hücre içeriği bozulmadığı sürece genelde hücre dışına salınmazlar; ancak stres altındayken ya da hücre çözülüp dağıldığında serbest kalırlar.



Şekil 2.1: Siyanobakterilerin ürettiği toksinlerin etkilerine ve kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması**.**

Omurgalılar için toksik olduğu bilinen 46 siyanobakteri türü tarafından üretilen siyanotoksinlerin etkileri, toksinleri içeren suların tüketilmesi veya bu sularla temas sonucu ortaya çıkar. Karaciğer ve böbrek rahatsızlığı olan kişilerin ve çocukların daha yüksek risk

grubunda olduğu bilinmektedir (Chorus ve diğ., 1999). Siyanobakterilerin ürettikleri toksinlerin etkisi her zaman aynı düzeyde olmamaktadır. Bu durum; mevsimden mevsime hatta günden güne bile değişiklik gösterebilmektedir (Robillot ve diğ., 2000).

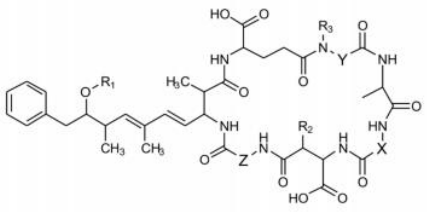
2.2.1. Siklik Peptidler

Siyanobakterilerin mikrosistin, nodülarin, siyanopeptolin, aeruginosin, anabaenopeptin, mikroginin, mikroviridin gibi siklik peptid yapısında çok sayıda siyanotoksin (siyanopeptid) ürettiği bilinmektedir. Çoğunlukla hidrofilik karakterde olan siklik peptidler, omurgalı hücre zarından basit difüzyonla geçememekte, enerji gerektiren aktif taşıma sistemleri ile hücre içine alınmaktadırlar (Kotak ve diğ., 1995). Yapılan çalışmalar siklik peptidlerin hücre içine taşınmasında, organik anyon taşıyıcılarının görevli olduğunu göstermektedir (Welker ve diğ., 2006). Non-proteinojenik amino asitler içeren bu siyanopeptidler, non-ribozomal polipeptid sentetaz, poliketid sentetaz ve mikrosistin sentetaz enzimleri tarafından sitosolde sentezlenirler ve *Mcy* gen kümesi tarafından düzenlenirler (Ouellette ve diğ., 2006). Son yıllarda yapılan çalışmalar, bu moleküllerin sitotoksik, anti-fungal, anti-bakteriyal, anti-viral ve anti-inflamatuar etkilere sahip olduklarını ve bunlara ek olarak da kuvvetli proteaz inhibitörü olarak iş gördüklerini göstermiştir (Paiva ve diğ., 2017).

Siyanotoksinlerden en bilineni, 1982 yılında izole edilip karakterizasyonu yapılan siklik heptapeptid yapıdaki mikrosistindir. Mikrosistin 7 amino asit içermektedir ve farklı formları vardır. Bu formlar arasından en yaygın olanlar, mikrosistin-LR (lösin-arjinin), mikrosistin-RR (arjinin-arjinin), mikrosistin-YR (tirozin-arjinin) ve mikrosistin-YA (tirozin-alanin)'dır. En sık rastlanan yapı siklo (-D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-Glu-Mdha-)'dır (Nishizawa ve diğ., 2000; Kaebernick ve diğ., 2001). Siklik peptid yapısındaki 2 amino asidin farklı kombinasyonu sonucu, molekül ağırlıkları 800-1000 Da arasında değişen farklı mikrosistin izoformları oluşmaktadır. Günümüze kadar mikrosistinin 90 izoformu karakterize edilmiş (Karan ve diğ., 2015) ve kütle spektrometrisiyle elde dilmiş molekül ağırlıklarının gösterildiği uzun bir liste yayımlanmıştır (Spoof ve Catherine, 2017). Mikrosistin üretimi üzerinde çevresel faktörlerin de etkili olduğu bilinmektedir. Örneğin, ışık, sıcaklık, pH, besin ve iz metaller gibi çevresel faktörler *M. aeruginosa*'nın ürettiği toksik yükü etkilemektedir (Robillot ve diğ., 2000). Mikrosistinin birçok hücre içi fonksiyonu bulunmaktadır. Bu maddeler, örneğin ışık şiddeti ve besin kısıtlılığı gibi çevresel stres koşullarına adaptasyonda *M. aeruginosa* için avantaj sağlamaktadır. Bir çalışmada, mikrosistinden sorumlu gen kümesinde mutasyon bulunan ve

bulunmayan suşların farklı konsantrasyonlarda demir içeren besiyerlerinde üreme durumları araştırılmıştır (Alexova ve diğ., 2011). Mikrosistin üretimini gerçekleştiren mutant olmayan suşların, artan demir konsantrasyonlarına direnç gösterdikleri ve yaşamaya devam ettikleri, mikrosistin sentezleyemeyenlerin ise hayatta kalamadıkları gözlenmiştir. Mikrosistin sentezinden sorumlu gen bakımından mutant ve mutant olmayan suşlar ile yapılan bir başka çalışmada, mutant olan hücrelerde pigmentasyon farklılıkları olduğu ve bu hücrelerin, mutant olmayanlara göre oksidatif strese karşı daha hassas oldukları gözlenmiştir (Hesse ve diğ., 2001).

Bu toksin yaygın olarak *Microcystis* cinsi tarafından üretilir; ancak bunun dışında *Anabaena, Oscillatoria* ve *Nostoc* cinsleri tarafından da üretilir (Ikawa ve diğ., 1998). Bu toksinin biyosentezi ve biyokimyasal geçiş yolakları ile ilgili çalışmalar devam etmekte olup henüz yeterli bilgilere ulaşılmamıştır. Toksin üretiminden sorumlu gen (*mcyS*), adenilasyon, kondensasyon bölgesi ve peptidil taşıyıcı bölge olmak üzere 3 domain bulundurur. Bu domainlere ek olarak, epimerizasyon ve N-metilasyon gibi bölgeler içerir. Çok yeni bir çalışmada (Kleinteich ve diğ., 2018) yapısı aydınlatılmış olan mikrosistinler Şekil 2.2'de verilmiştir.



	R_1	R_2	R_3	X	Y	Z
MC-LR	$-CH_3$	$-CH_3$	$-CH_3$	Leu	Dha	Arg
MC-LA	$-CH_3$	$-CH_3$	$-CH_3$	Leu	Dha	Ala
[Asp^3, Ser^7] MC-RR	$-CH_3$	-H	-H	Arg	Ser	Arg
[Asp^3, Dha^7] MC-RR	$-CH_3$	-H	-H	Arg	Dha	Arg
[Asp^3, ADMAdda^5, Thr^7] MC-LR	$-COCH_3$	-H	-H	Leu	Thr	Arg
[Asp^3, ADMAdda^5, Dhb^7] MC-LR	$-COCH_3$	-H	-H	Leu	Dhb	Arg
[Asp^3, ADMAdda^5, Dhb^7] MC-RR	$-COCH_3$	-H	-H	Arg	Dhb	Arg

Şekil 2.2: Mikrosistinin türevleri [Kleinteich ve diğ., 2018 tarafından tanımlanmış 7 mikrosistinin kimyasal yapısı (MC-LR: mikrosistin lösin-arjinin), MC-LA: mikrosistin lösin-alanin, MC-RR: mikrosistin arjinin-arjinin, ADMAdda: O-asetil-O-dimetil 3-amino-9-metoksi-2,6,8-trimetil-10-fenildeka-4,6-dienoik asit, Ala: alanin, Arg: arjinin, Asp: aspartik asit, Dha: dihidroalanin, Dhb: dihidro butirin, Leu: lösin, Ser: serin ve Thr: treonin)].

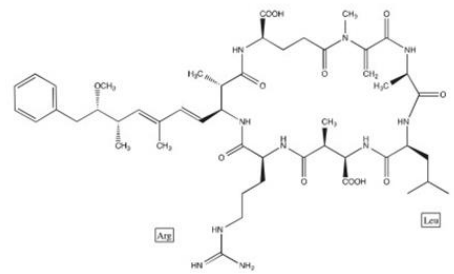
Mikrosistinler, memelilerde beslenme yoluyla alındığında organik anyon transport proteinleri ile karaciğere taşınmakta ve serin/treonin protein fosfataz 1 (PP1) ve 2A'yı (PP2A)'yı inhibe etmektedirler (Runnegar ve diğ., 1995; Bagu ve diğ., 1997; Welker ve diğ., 2006). Bu inhibisyonu; enzimin katalitik domainindeki sistein bakiyeleri ile kovalent bağ yaparak sağlarlar (Runnegar ve diğ., 1995). Hücrede iç dengenin sağlanmasında görevli olan protein fosfatazların inhibisyonu, hedef proteinlerin (yapısal filamentlerin) gereğinden fazla fosforlanmasına ve bu da hücre iskeleti degradasyonuna ve hepatik yapının bozulmasına neden olur. Hepatositlerde meydana gelen büzülme ve küçülmeler karaciğer dokularında hasara yol açar. Bu değişimlere bağlı olarak, aşırı sinyal oluşumu, hızlı bölünme, transformasyon ve tümör oluşumu gözlenir (Yoshizawa ve diğ., 1997; Tonk ve diğ., 2005). Bölgesel doku hasarı, organ yıkımı ve hemorajik şok ile sonuçlanır (Machu ve diğ., 2015). Memelilerde mikrosistin zehirlenmeleri hepatik yapının zarar görmesini takiben hepatik kanama ve ölüm şeklinde gözlenir. Mikrosistin kontaminasyonuna sahip suların tüketimine bağlı karaciğer hasarı, hepatit virüsleri ve aflatoksinlerden sonra gelmektedir (Shunzhang ve Gang, 1994).

Sıçan ve farelerde mikrosistinlerin sebep olduğu protein fosfataz inhibisyonu üzerine yapılan birçok çalışma, letal olmayan dozlarda kronik olarak mikrosistine maruz kalmanın başta cilt ve karaciğerde kanser gelişimini indüklediğini göstermiştir (Falconer, 1991; Nishiwaki-Matsushima ve diğ., 1992). Epidemiyolojik veriler doğrultusunda, uzun dönem mikrosistin kontaminasyonu olan içilebilir su kaynaklarının tüketimi ile de hepatoselüler karsinoma gözlenebileceğini öngörülmektedir (Tang, 1985; Yu ve diğ., 1995).

Oral yolla mikrosistine maruz kalan fare ve sıçanlarda, mikrosistin kaynaklı intrahepatik kanama ve nekroz birkaç saat içinde ortaya çıkmaktadır. PP1 ve PP2A'nın inhibisyonunu takiben, karaciğer hücrelerinde protein fosforilasyonu artmaktadır. Karaciğer hücrelerinde okadaik asit yolağına benzer bir yolla, farelerde tümör gelişimi olmaktadır. Sıçanlarla yapılan bir çalışmada, 3 deney grubuna 8 hafta boyunca haftada 2 defa intraperitonel yolla 10 µg/kg, 25 µg/kg ve 50 µg/kg olmak üzere 3 farklı dozda mikrosistin-LR verilmiştir. Enjeksiyonun ardından 1, 3, 6, 9 ve 24. saatlerde kan alınarak, serumda alanin aminotransferaz ve aspartat aminotransferaz seviyelerine bakılmış ve bu enzimlerde artış olduğu gözlenmiştir. Deney sonunda, hayvanlar sakrifiye edilerek immünohistokimyasal boyama yapılmış ve mikrosistinin, böcek ilaçlama maddesi olan, yüksek karsinojenik etkiye sahip heksaklorosikloheksandan daha

yüksek tümör promotör etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Nishiwaki-Matsushima ve diğ., 1992).

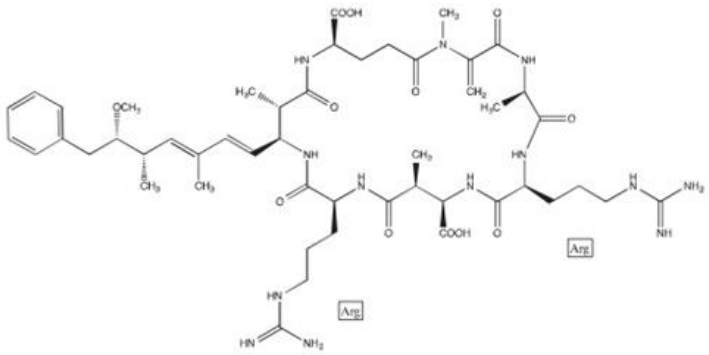
Mikrosistin türevleri arasında en yüksek toksisiteye sahip molekül, mikrosistin lösin-arjinin (mikrosistin-LR)'dir (Şekil 2.3) (Karan ve diğ., 2015). Mikrosistin-LR için farede LD_{50} 50 µg/kg olarak tespit edilmiştir (Yu ve diğ., 2015). Fareler üzerinde yapılan bir başka çalışmada, mikrosistin-RR formu (Şekil 2.4) (Yu ve diğ., 2015) için ise LD_{50}'nin 600 µg/kg olduğu bulunmuştur (Watanabe ve diğ., 1988). Farelerde intraperitonel enjeksiyonla LD_{50} değeri 0.05 mg/kg olarak belirlenen mikrosistin-LR (MC-LR)'nin proteolitik hidrolize ve buna bağlı olarak doku bozulmalarına sebep olduğu belirlenmiştir (Carmichael ve diğ., 1988). Farede yapılan bir başka çalışma (MacKintosh ve diğ., 1990), MC-LR için IC_{50} değerinin 0.1 nM olduğunu rapor etmiştir.



Şekil 2.3: Mikrosistin-LR'nin yapısı (Yu ve diğ., 2015).

Xenopus laevis embriyoları üzerindeki teratojenik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, MC-LR'nin belirgin olarak embriyo ölümüne sebep olduğu gösterilmiştir (Fischer ve Dietrich, 2000). İnsan hepatom hücre hattı (HepG2) ile yapılan bir çalışmada, mikrosistin-LR'nin, sitotoksik olmayan dozda (0.01–1 µg/mL) 4 saat boyunca memeli hücreleri ile mualemesi sonucu, mikrosistin-LR'nin, DNA onarım inhibitörleri ile beraber çalıştığı, DNA'yı oksidatif stresten korumakla görevli enzimlere zarar verdiği, hücre içi reaktif oksijen türlerini artırdığı ve DNA'da kırıklar meydana getirdiği gözlenmiştir. Bu kırıkların da, karaciğer kanseri için başlatıcı görev üstlendiği düşünülmektedir (Zegura ve diğ., 2003). *M. aeruginosa'*nın *in vitro* genotoksisitesi üzerine insan lenfoblastoid hücre hattı (TK6) kullanılarak yapılan bir çalışmada (Zhan ve diğ., 2004), 80 µg/mL mikrosistin-LR verilen memeli hücre hattında 24 saat sonra, heterozigot timidin kinaz lokuslarında, kontrole kıyasla 5 kat yüksek mutasyon varlığı tespit

edilmiştir. Bu çalışmada, mikrosistin-LR'nin hepatotoksik olmasının yanı sıra genotoksisiteye de sahip olduğu belirlenmiştir.



Şekil 2.4: Mikrosistin-RR'nin yapısı (Yu ve diğ., 2015).

Çeşitli çalışmalar mikrosistinin toksisitesinden, ekspresyonu besin, tuzluluk, ışık yoğunluğu ve sıcaklık gibi çevresel şartlardan etkilenebilen, *mycS* gen kümesinin ürünü olan mikrosistin sentetaz enziminin sorumlu olduğunu göstermektedir (Tillet ve diğ., 2000). Bu gen kümelerinde insersiyon mutasyonlarıyla yapılan değişiklikler sonucunda *M. aeruginosa'*nın toksik olmayan fenotipleri de elde edilmiştir (Qu ve diğ., 2018). Karşılaştırmalı proteomik verileri, toksik olmayan *M. aeruginosa* ırklarında enerji metabolizması ve karbon fiksasyonu ile ilgili proteinlerin üretiminde artış olduğunu göstermektedir.

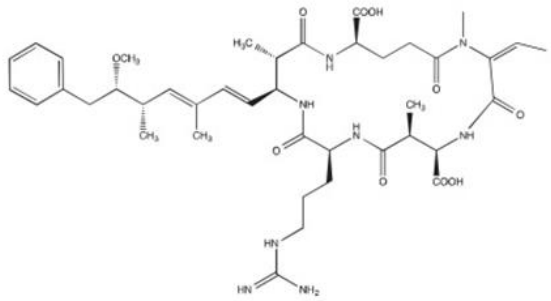
Mikrosistinin vücuda verdiği zararlar, güçsüzlük, harekette zorlanma, yemek yiyememe, solgun ten rengi, zihinsel dengesizlik ve bulanıklık, kaslarda titreme, koma ve takiben birkaç gün içinde gerçekleşen ölüm durumudur. Ölüm, intrahepatik karaciğer kanaması ve buna bağlı olarak vücudun kansız kalması sebebiyle gerçekleşmektedir (Galey ve diğ., 1987).

Microcystis ile kontamine sular sadece insanlar için değil, hayvanlar için de risk taşımaktadır. *Microcystis* ile kontamine olmuş suyu tüketen köpeklerde, abdominal rahatsızlıklar, diyare, kusma, gözden ve ağızdan aşırı salgılama, yemek yiyememe, koma ve ölüm gerçekleşmiştir (Shunzhang ve Gang, 1994).

Maymunlarda benzer semptomların gözlendiği bir vakada, ölüm öncesi karaciğerden parça alınarak yapılan biyopside karaciğer dokusunda nekroz ve şiddetli kanama gözlenmiştir (Shunzhang ve Gang, 1994).

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre; içme sularında bulunabilecek maksimum mikrosistin konsantrasyonu 1 µg/L'dir (WHO, 1998). Mikrosistinler hücre içi moleküllerdir ve serbest halde ya da hücre membranına tutunmuş halde bulunurlar. Hücresel mikrosistin konsantrasyonu, kuru hücre için 2-8 mg/g değerleri arasındadır (Robillot ve diğ., 2000). Hücre dışında bulunan mikrosistinler genellikle lizise ve çürümeye bağlı olarak hücre dışına çıkarlar; ancak bunun dışında, büyüme evresindeki siyanobakterilerde aktif taşıma ile de hücre dışına salınabilirler (Babica ve diğ., 2006).

Yapısal ve toksik etki bakımından mikrosistine benzer özellikte olan, pentapeptid yapısındaki nodülarin (Şekil 2.5) (Yu ve diğ., 2015) ise, çoğunlukla tuzlu su habitatlarında yaşayan siyanobakteriler tarafından üretilir ve ökaryotik PP1 ve PP2A üzerinde mikrosistine benzer inhibitör etki gösterir. Mikrosistin gibi, karaciğerde tümör oluşumuna sebep olarak hayvan sağlığını tehdit eder (Karjalainen ve diğ., 2007). Günümüze kadar nodülarinin 7 doğal izoformu belirlenmiştir (Rinehart ve diğ., 1994).

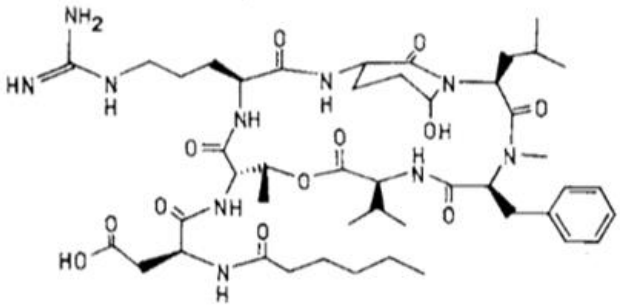


Şekil 2.5: Nodülarin'in yapısı (Yu ve diğ., 2015).

Farede yapılan bir çalışmada, nodülarin için LD_{50} dozunun 50 µg/kg olduğu tespit edilmiştir. Bu dozun altındaki dozların ise, karaciğer hücrelerinde kontrolsüz bölünmeye sebep olarak karsinojen etki gösterdiği belirlenmiştir (Ohta ve diğ., 1994). Nodülarin biyosentezi, mikrosistinden sorumlu *mcyS* gen kümesi ile homolog olan *ndaS* gen kümesi tarafından kontrol edilir (Kleinkauf ve Von Dohren, 1996).

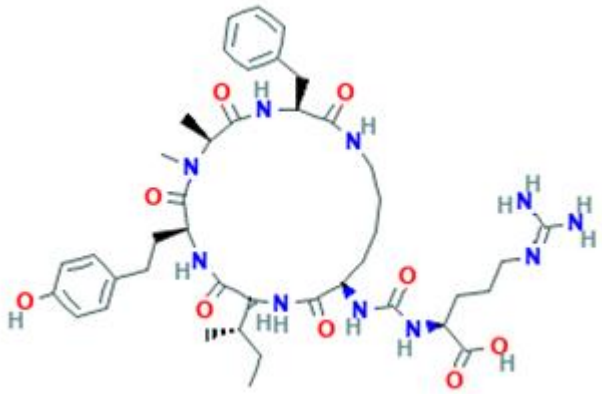
Siyanobakterilerin ürettiği siklik peptidlerden biri de siyanopeptolin (CP)'dir. Moleküler ağırlığı ortalama 957 Da olan bu peptidin mikrosistin ve nodülarine kıyasla daha az toksik özellikte olduğu bilinmektedir (Kotak ve diğ., 1995; Welker ve diğ., 2006). Kimyasal yapı

olarak 7 amino asit bakiyesi barındıran siyanopeptolin, 3-amino-6-hidroksi-2-piperidon içerir. 4 farklı izoformu bulunan siyanopeptolin, yapısında arjinin bulundurursa CP-A (Şekil 2.6), lisin bulundurursa CP-B, metil-lisin bulundurursa CP-C, dimetil-lisin bulundurursa CP-D olarak isimlendirilir (Martin ve diğ., 1993). Siyanopeptolin sentezinden sorumlu gen kümesi non-mikrosistin peptid sentetaz gen ailesidir (Rounge ve diğ., 2007).



Şekil 2.6: Siyanopeptolin-A'nın yapısı (Martin ve diğ., 1993).

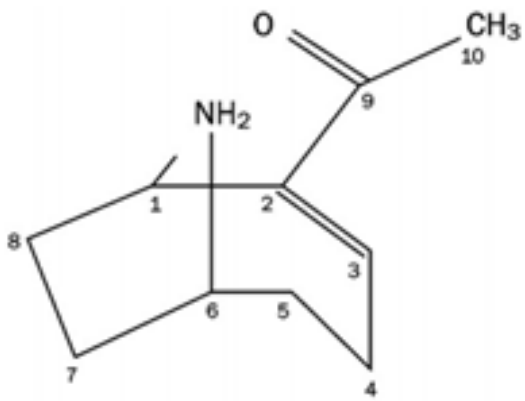
Anabaenopeptin (AP) (Şekil 2.7) ise, siyanobakterilerin ürettiği, mikrosistine ve nodülarine kıyasla daha az toksisiteye sahip hekzapeptid yapıda olan bir diğer siklik moleküldür. *apnA-E* gen kümesi tarafından non-ribozomal olarak sentezlenir. 836 Da ağırlığında olan bu molekülün farklı pozisyonlarda farklı amino asit içeren çok sayıda yapısal varyantı bulunabilmektedir. Siyanobakterilerin kuru ağırlığının yaklaşık %0.5'i anabaenopeptin kaynaklıdır (Kotak ve diğ., 1995; Entfellner ve diğ., 2017).



Şekil 2.7: Anabaenopeptin'in yapısı (Yu ve diğ., 2015).

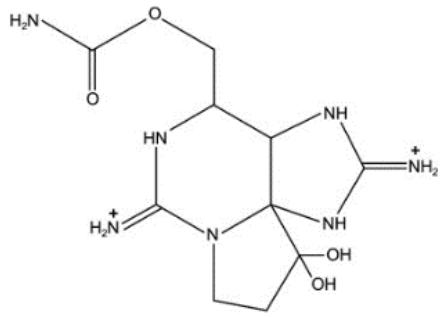
2.2.2. Alkaloidler

Anabaena ve *Oscillatoria* cinsleri tarafından üretilen ve alkoloid yapısında nörotoksin olan anatoksin (Şekil 2.8) (James ve diğ., 1998), sahip olduğu post sinaptik depolarize edici etki sebebiyle nöromuskuler blokaj yapmaktadır. Bu nörotoksin sinir sistemini etkileyerek Na^+ kanallarının daimi olarak açık kalmasını sağlar ve asetilkolinesteraz enzimini geri dönüşümsüz olarak inhibe eder. Doğal organofosfat olan bu molekül, karbamat böcek ilacına (insektisit) benzer bir etkiyle memeliler ve kuşlar üzerinde toksisiteye neden olmaktadır. Kas demetlerinde kasılma, beyinde oksijen yetersizliğine bağlı çırpınma ve ardından konvülziyon ve siyonoza bağlı ölüme sebep olur (Kahraman ve Küplülü, 2012).



Şekil 2.8: Anatoksin'in yapısı (James ve diğ., 1998).

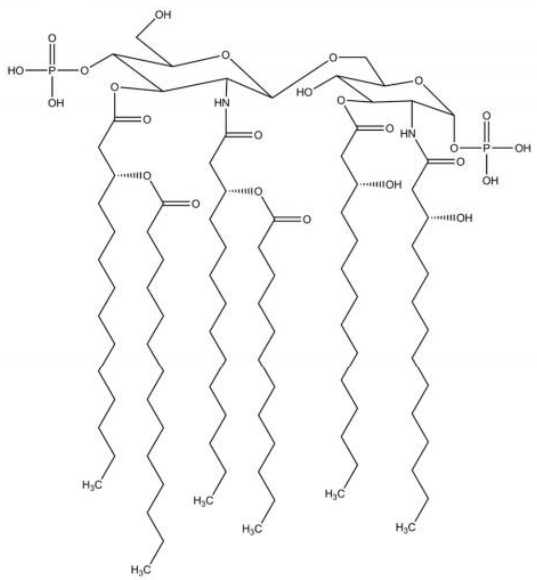
Çeşitli durgun su siyanobakterileri ve bazı denizanası türleri tarafından üretilen, yüksek nörotoksik olan saksitoksin ve analogları (Şekil 2.9) (Merwe, 2015), toplu balık ve hayvan ölümlerine sebep olmaktadır. Bu moleküller ile kontamine olmuş su kaynakları, besin zincirindeki diğer hayvanları da tehdit etmektedir. Saksitoksin ürettiği bilinen bazı siyanobakteri türleri arasında *Anabaena circinalis, Aphanizomenon* sp., *Aphanizomenon gracile, Cylindrospermopsis raciborskii* ve *Lyngbya wollei* sayılabilir (Pearson ve diğ., 2010). Coğrafi olarak birbirine uzak lokasyonlarda bulunan aynı türlerin farklı toksik düzeylerde saksitoksin ürettiği gözlenmiştir (Velzeboer ve diğ., 2000).



Şekil 2.9: Saksitoksin'in yapısı (Merwe, 2015).

2.2.3. Lipopolisakkarit (LPS) Endotoksinler

Lipopolisakkarit (LPS) endotoksinler ya da kısaca endotoksinler olarak isimlendirilen sekonder metabolitler (Şekil 2.10) (Durai ve diğ., 2015); çoğu gram negatif bakterilerin ve siyanobakterilerin membranının karakteristik bileşenini oluşturmaktadır. *Synechococcus, Synechocystis, Microcystis, Anabaena, Phormidium, Oscillatoria* ve *Schizothrix* cinsleri tarafından üretilen endotoksinler ile kontamine olmuş tatlı suların tüketimi gastroenterit rahatsızlıklara ve alerjik reaksiyonlara neden olmaktadır. Toksisitesi yüksek olan bu moleküller, tekrarlı oligosakkarit ve polisakkarit zincirlerinin birleşmesinden oluşur (Rapala ve diğ., 2002).



Şekil 2.10: Lipopolisakkarit endotoksin yapısı (Durai ve diğ., 2015).

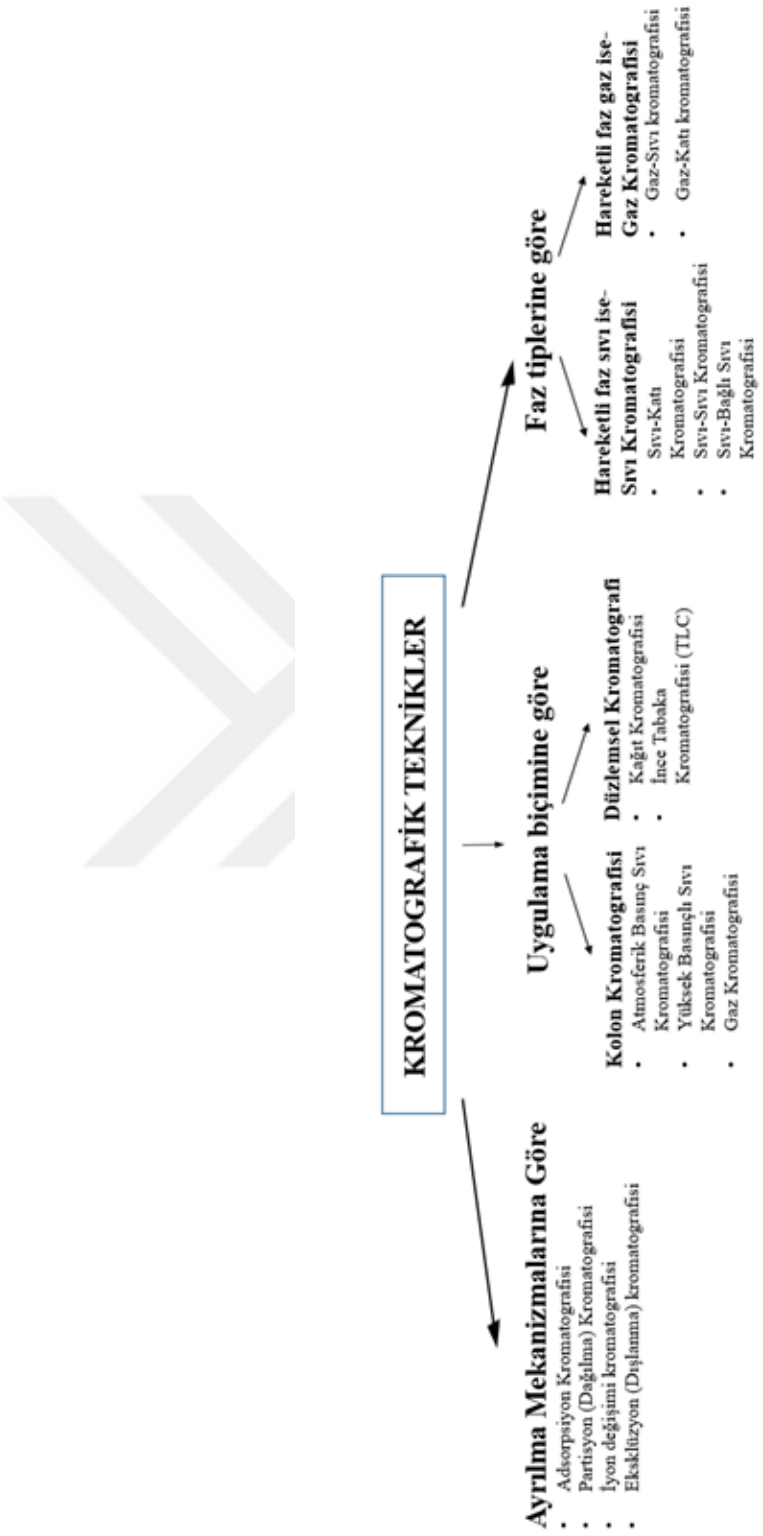
2.3. PROTEİN AYIRMA, SAFLAŞTIRMA ve ANALİZ TEKNİKLERİ

Hücrenin temel yapısal bileşeni olan proteinlerin enzimatik kataliz, depolama, sinir impulslarının transmisyonu, hücreye mekanik destek ve koordine hareket sağlama, dış etkenlere karşı immün koruma, büyüme ve farklılaşma gibi fonksiyonları bulunmaktadır. Metabolik yolakların aydınlatılması ve bu yolaklarda görev yapan moleküllerin incelenmesi açısından protein ayırma, saflaştırma ve analiz işlemleri büyük önem arz etmektedir (Telefoncu, 1996). Protein yapı/fonkiyon/etkileşim çalışmaları, enzim aktivitesi çalışmaları, biyoteknolojik protein üretimi gibi çalışmalarda karışım halindeki peptid ve proteinleri ayırmak, saflaştırmak ve analiz etmek için pek çok ortak teknik geniş çapta uygulanmaktadır. Bu teknikler, kromatografik, elektroforetik ve bu iki yöntem dışında kalanlar olmak üzere 3 ana başlığa ayrılmıştır.

2.3.1. Kromatografik Teknikler

Yirminci yüzyıldan itibaren kullanılmaya başlayan "Kromatografi" kelimesi; Yunanca renk anlamında olan "Chroma" ve yazmak anlamında olan "Graphein" kelimelerinden kökenlenmiştir. İlk olarak, botanik bilimci Mikhail Tsvett tarafından renkli bitki pigmentlerinin ayrılmasında kullanılmış bir tekniktir (Telefoncu, 1996).

Kromatografide, durağan (sabit) ve hareketli (mobil) faz olmak üzere 2 faz bulunur. Sistem, hareketli fazın durağan fazdan geçerken ayrımı yapılması istenen maddeyi beraberinde sürüklemesi temeline dayanarak çalışır. Ayrımı yapılmak istenen karışımda bulunan maddeler, sabit fazla farklı derecelerde etkileşime girer. Durağan fazla etkileşimi fazla olan bileşenler daha yavaş, etkileşimi az olan bileşenler daha hızlı hareket ederek sistemden ayrılırlar. Ayrılma mekanizmaları, uygulama biçimi ve faz tiplerine göre farklı kromatografi çeşitleri geliştirilmiştir (Şekil 2.11) (Enginün, 1996; Temizkan, 2017).



Şekil 2.11: Ayrılma mekanizmaları, uygulama biçimi ve faz tiplerine göre kromatografi çeşitleri (Temizkan, 2017).

Peptid ve/veya proteinlerin ayrımı için farklı sıvı kromatografi tipleri bulunmaktadır. Bunlar, Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC), Hidrofilik Etkileşim Sıvı Kromatografisi (HILIC), Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HIC), İyon Değişim Kromatografisi (IEC), Afinite Kromatografisi (AC) ve Boyut Dışlama Kromatografisi ("Size Exclusion Chromatography", SEC)'dir.

Sıvı kromatografisi, ayırma sırasında uygulanan basınca göre değişik adlar almaktadır (Tablo 2.2).

Tablo 2.2: Maksimum basınç değerlerine göre sıvı kromatografi çeşitleri.

Maksimum basınç değeri	Yöntemin adı	Kısa gösterilişi
1 bar	Atmosferik Basınçlı Kimyasal İyonlaşma	APLI
40 bar	Orta Performans Sıvı Kromatografisi veya Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi	MPLC veya FPLC
500 bar	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi	HPLC
1000 bar	Ultra Performans Sıvı Kromatografisi	UPLC

2.3.1.1. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC)

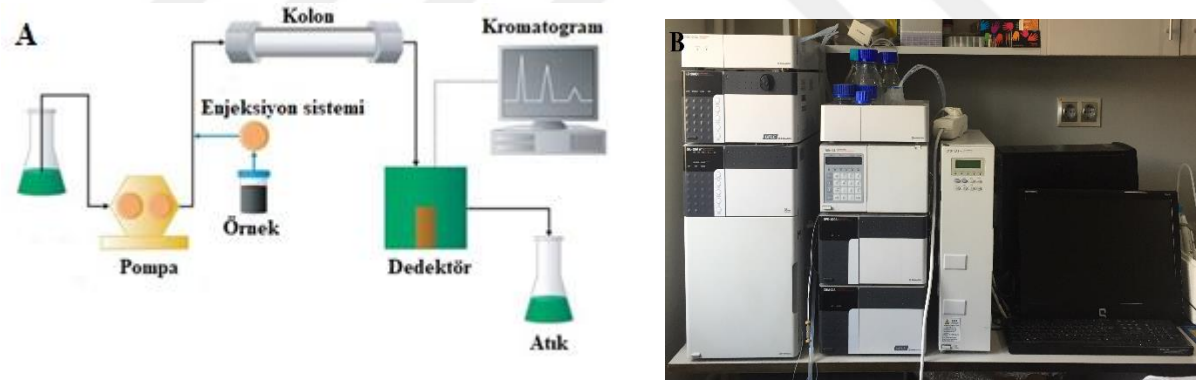
1970'li yıllardan itibaren kullanılmaya başlanan "Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi" (HPLC), solüsyon içinde çözdündürülen bileşinlerin, yüksek basınç altında, porlu sabit faz içinden geçen hareketli fazla beraber geçmeye zorlanarak bireysel olarak ayrımını sağlamaktadır. Isı değişimine duyarlı moleküllerin ayrımı için büyük avantaj sağlayan analitik tekniklerden olan HPLC, kimya, ilaç, gıda gibi birçok araştırma alanında aktif olarak kullanılmaktadır (Gunsen, 2016).

HPLC, sahip olduğu çeşitli özellikler bakımından diğer yöntemlerle kıyaslandığında pek çok avantaja sahiptir. Bu avantajlar arasında; yüksek ayırma gücüne sahip olması ve az örneğe gereksinim duyması, akış hızı kontrolü ve yüksek iç basınç sağlanabilmesi, bilgisayar

sisteminin kolay ve anlaşılabilir olması, hızlı analiz imkanı sağlaması sayılabilir (Babica ve diğ., 2006).

HPLC, bir çözeltideki bileşenlerin izolasyonu ve hedef bileşiğin diğer bileşikler ya da kontaminantlardan ayrılması ve saflaştırılması, kromatogramda gözlenen spesifik pikler ve standart çözeltiye ait piklerin karşılaştırılarak bileşenlerin tanımlanması ve pik yükseklikleri kullanılarak miktar tayinin yapılmasına imkan tanımaktadır (Gunsen, 2016).

HPLC hareketli faz rezervuarı, pompa sistemi, numune enjeksiyon sistemi, kolon, dedektör ve kaydedici sistemleri olmak üzere farklı kısımlardan oluşur (Fields, 2007). Kromatografik işlem, örneğin uygulanması (yüklenmesi) ve hareketli fazın kolondan geçirilmesi ile başlar ve ayrımı sağlanan her bileşenin piklerinin eş zamanlı olarak kaydedilmesi ile devam eder. Ayrı ayrı fraksiyonlarda toplanan bileşenler için alınan dedektör cevabı, sisteme bağlı bilgisayar ekranından kromatogram olarak görüntülenir (Fields, 2007). HPLC sistemlerinin genel şematik gösterimi ve bu çalışmada kullanılan cihaz Şekil 2.12'de verilmektedir.



Şekil 2.12: HPLC cihazının şematik gösterimi (A) ve çalışmada kullanılan Shimadzu Corporation marka HPLC (B) cihazı**.**

HPLC'nin temel kısımlarından biri olan pompa sistemleri, analitin; enjektör, kolon ve dedektörden geçişi boyunca sabit akışını sağlamakla görevlidir. Pompaların sabit basınç, şırınga tipi ve emme basma piston gibi çeşitleri bulunmaktadır. Bu pompalar çözücü maddelerin korozyon etkisine karşın dayanıklı olmalı, yüksek basınçlar oluşturabilmeli ve geniş bir aralıkta (1-10 mL/dak) akış hızı sağlayabilmelidir.

Örneklerin, HPLC'ye enjekte edildikleri yer olan örnek enjeksiyon sistemleri, bir enjeksiyon valfi ve örnek haznesinden oluşur.

Karışımda bulunan proteinlerin saflaştırılmasıda kullanılacak kolonun şekli ve büyüklüğü, karışımın karakterine ve uygulanacak kromatografik yönteme göre değişmektedir. Kısa ve kalın kolonlar genellikle afinite ve iyon değişimi kromatografisinde, uzun ve ince kolonlar ise, jel filtrasyonu yöntemlerinde tercih edilir. Kullanılacak kolonun hacmine ise, saflaştırma ölçeği göz önüne alınarak karar verilir (Arda ve Ertan, 2017). HPLC kolonları, yüksek basınçlara dayanıklı, paslanmaz çelikten yapılmış olup, genellikle 4.5-5.0 mm iç çaplı ve 10-30 cm uzunluğundadır. Kolon içinde bulunan katı destek materyali, HPLC sabit fazıdır. Örnek solüsyonunun kolona girişi ile durağan fazda bileşenlerin göçü başlamaktadır. Durağan faz ve karışımdaki bileşenlerin hareketli fazla fizikokimyasal etkileşimleri, bileşenlerin ayrımını belirler. Genellikle silika temelli olan kolon dolgu materyali, uygulanacak kromatografi türüne göre değişmektedir ve gözenekli, mikro, küresel tiplerde olmaktadır. Silika temelli kolon dolgu maddesine ek olarak, çeşitli polimerler veya alümina da kullanılmaktadır (Fields, 2007).

Hareketli faz tipleri; izokratik, gradiyent ve politipik olmak üzere üç formda uygulanabilir (Fields, 2007). İzokratik faz tipinde, karışım sabit bileşimli tek bir çözücü ile muamele edilir. Karışımdaki tüm bileşenler kolonda aynı anda, fakat farklı hızlarda göç ederler. Gradiyent faz tipi; polariteleri birbirinden farklı iki (veya bazen daha fazla) çözücü sisteminin kullanıldığı tekniktir. Çözücü bileşimi sürekli veya basamaklı olarak değiştirilir. Çözücü sistemlerinin analiz sırasında değiştirildiği politipik hareketli faz ise, karışık tip kromatografilerde tercih edilir.

Dedektörler, kolondan ayrılan örnek bileşenlerinden okunan sinyallerin, kromatogram üzerinde pik olarak ifade edilmesini sağlamaktadır. Yüksek duyarlılığa ve seçiciliğe sahip olması, sıcaklık ve basınçta meydana gelebilecek değişimlere duyarsız olması ideal özelliklerindendir. Dedektör, analiz edilecek örnek için uygun olmalıdır. Ultraviyole ya da görünür ışığın absorpsiyonuna dayanan dedektörler (Ultraviole ve Görünür Işık Dedektörleri) sıvı kromatografisinde sık kullanılan dedektör çeşitlerindendir. Bu dedektörlere ek olarak, Refraktif İndeks Dedektörler, Transport Dedektörler, Elektrokimyasal Dedektörler de bulunmaktadır (Skoog ve West, 1981).

HPLC'de kullanılan tüm çözücülerin gazının alınması zorunludur; alınmadığı durumda çözgende hava kabarcıklarının bulunması pompa ve kolonda problemlere sebep olmaktadır. Solventlerden gazın uzaklaştırılmasında; ısıtma, karıştırarak vakuma maruz bırakma, ultrasonikasyon veya çözgen rezervuarına helyum gazı verilmesi gibi teknikler kullanılabilir (Fields, 2007).

Sabit fazın polar, hareketli fazın apolar seçildiği Normal Faz Kromatografisi'nde (NP-HPLC), polar materyal kolonda tutulur. Genelde siyanopropil- ve aminopropil-türevi kolonlar kullanılır. Polar maddelerin NP-HPLC ile ayrımı yavaş olması ve elde edilen kromatogramda gözlenen piklerin keskin olmaması sebebiyle NP-HPLC çalışmalarda çok tercih edilmez (Field, 2007).

Sabit fazın apolar (hidrofobik), hareketli fazın ise polar olduğu Ters Faz Kromatografisi ("Revers Phase HPLC, RP-HPLC"), çok sayıda organik bileşenin yüksek verimde ayrımına olanak tanıdığı için sıklıkla kullanılmaktadır (Babica ve diğ., 2006). RP-HPLC'de kullanılan kolon dolgu maddesi hidrofobik gruplarla modifiye edilmiştir ve proteinler sahip oldukları hidrofobisiteye göre sabit fazla etkileşerek kolondan ayrılırlar. Polar yapıda olan hareketli faz ile daha fazla etkileşen polar bileşenler kolondan daha önce çıkar (Arda ve Ertan, 2017). Peptidlerin ayrımında sıklıkla tercih edilen RP-HPLC'de silika temelli kolon dolgu maddesine kovalent bağlı dimetil-(C_2), oktil-(C_8) veya oktadesil-(C_{18}) gruplarından oluşur (Field, 2007).

2.2.2. Elektroforetik Teknikler

Yüklü moleküllerin elektriksel alanda, sahip oldukları pozitif ya da negatif yüke bağlı olarak anod ya da katoda göç etmesi Elektroforez olarak isimlendirilmektedir (Özer ve diğ., 2000). Elektroforetik teknikler, saflık kontrolü, moleküler ağırlığın saptanması, ayırma, saflaştırma ve analiz amacıyla geniş çapta kullanılır.

Bu teknikte örnek, kağıt, selüloz, agaroz ya da poliakrilamid jel türevi bir destek matriksi üzerinde göç eder. Sıklıkla kullanılan destek matriksi olan agarozdan yapılmış jeller, gözeneklerinin büyük olması sebebiyle, büyük molekül ağırlığına sahip nükleik asitler ve protein komplekslerinin ayrımında kullanılır. Küçük gözenekli jel oluşturan poliakrimalid ise, birçok proteinin ve küçük oligonükleotidlerin ayrımında kullanılır (Zihnioğlu, 1996).

Protein ve peptidlerin elektroforetik ayrımında en çok kullanılan destek materyali poliakrilamiddir. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) tekniğinde, akrilamid moleküllerinin çapraz bağlayıcı moleküller yardımıyla kovalent bağ yapması sonucu poliakrilamid oluşmaktadır. Kimyasal ya da fotokimyasal olarak gerçekleşen polimerizasyon işleminde, polimerizasyon başlatıcı olarak kimyasal yöntemde amonyum persülfat, fotokimyasal yöntemde ise riboflavin kullanılır. Her 2 yöntemde de N,N,N′,N′-Tetrametiletilendiamin (TEMED) katalizör olarak kullanılır (Arda ve diğ., 2017). Tek boyutlu (1D-) PAGE ("One Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis) yöntemi, doğal jel (non-denatüre) elektroforezi ve doğal olmayan (denatüre) jel elektroforezi (SDS-PAGE) olmak üzere 2'ye ayrılmaktadır.

Protein ve peptidlerinin denatüre edilmeden doğal formlarında kullanıldığı yapı ve/veya aktivite ile ilgili çalışmalarda ve fazla sayıda protein içeren karışımların ayrılmasında doğal jel elektroforezi kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemde, molekül şekli ve yükü, jeldeki göçe etki etmesi sebebiyle, proteinlerin gerçek moleküler ağırlıkları bilinememektedir (Özel ve diğ., 2013; Arda ve diğ., 2017).

Karışımdaki polipeptid/proteinlerin moleküler ağırlıklarının belirlenmesinde SDS-PAGE yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde kullanılan anyonik bir deterjan olan sodyum dodesil sülfat (SDS), protein zincirlerini ayrırır ve proteinlere negatif (-) yük kazandırır. Böylece örneklerin sahip oldukları iç elektriksel yükten etkilenmeden, moleküler ağırlıklarına göre ayrımı sağlanır (Özel ve diğ., 2013; Arda ve diğ., 2017).

İzoelektrik odaklama; proteinlerin sürekli bir pH gradientinde izoelektrik noktalarına göre ayrılması temeline dayanan ideal bir yöntemdir. Proteinler sahip oldukları iyon yüklerine göre, net yüklerinin sıfır olduğu pH değerine (pI) kadar göç ederler ve bu noktada hareketlerini sonlandırarak, dar bir bölgede odaklanırlar. İzoelektrik odaklama; proteinleri yük özelliklerine göre ayırdığı için, moleküler elek etkisini minimuma indirmek gereklidir (Zihnioğlu, 1996).

İki boyutlu jel elektroforezi ("Two Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis", 2D-PAGE), izoelektrik noktaya dayalı ayırma sağlayan izoelektrik odaklama (IEF) ile boyuta dayalı ayırma sağlayan SDS-PAGE'nin bileşimidir. 2D-PAGE proteinlerin ayrılmasında

yaygın olarak kullanılan analitik bir yöntemdir. Birinci boyutta, denatüre koşul, üre ve iyonik olmayan deterjanlarla sağlanır ve çubuk jelde veya özel şeritlerde IEF gerçekleştirilir. Bu adımda denatüre olmuş proteinler bu jelde/şeritte izoelektrik noktalarına göre ayrılırlar Ardından, ikinci boyutta, çubuk jel/şerit SDS jel sisteminin ayırma jeli üzerine uygulanır. Elektroforez başlatılır ve proteinler molekül büyüklüklerine göre ayrılırlar (Zihnioğlu, 1996; Temizkan, 2017).

2.2.3. Diğer Ayırma, Saflaştırma ve Analiz Yöntemleri

Diyaliz, esas olarak tampon değişimi ya da solüsyondan tuzların uzaklaştırılmasında kullanılır. Sistemin çalışma prensibi; yarı geçirgen membranla ayrılan iki faz arasındaki konsantrasyon farkına dayalı difüzyona dayanır. Farklı büyüklüklerde moleküller içeren çözelti, yarı geçirgen membrandan yapılan diyaliz tüpüne konur, su ve iyonlar gibi küçük moleküller zardan geçerken, makromoleküller geçemez ve bu işlem, küçük moleküllerin membranın her iki yüzeyindeki derişim farkı eşitleninceye kadar devam eder (Tarhan ve diğ., 2000; Temizkan, 2017).

Çöktürme yöntemi, çözücü içerisindeki moleküllerin katı hale dönüştürülerek ayrılmasına olanak tanır. Çökelme işlemi, polimer ilavesi, moleküllerin pH ve/veya iyonik kuvvet değişime sebep olan başka bileşenlerin (trikloroasetikasit, amonyum sülfat, organik çözücü vb.) ilavesi gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak agregat oluşumu sonucu meydana gelir (Scopes, 1987).

Santrifüjle ayırma tekniği; merkezkaç kuvveti etkisi altındaki partiküllerin, bağıl molekül ağırlığına, yoğunluğuna ve şekline bağımlı davranış farklılığı göstermesi ilkesine dayanmaktadır (Rickwood, 1984; Ford ve diğ., 1991). Diferansiyel santrifüj, izopiknik santrifüj, yoğunluk gradient santrifüj gibi farklı prensiplere dayanarak çalışan santrifüj çeşitleri bulunmaktadır (Tarhan ve diğ., 2000; Temizkan, 2017).

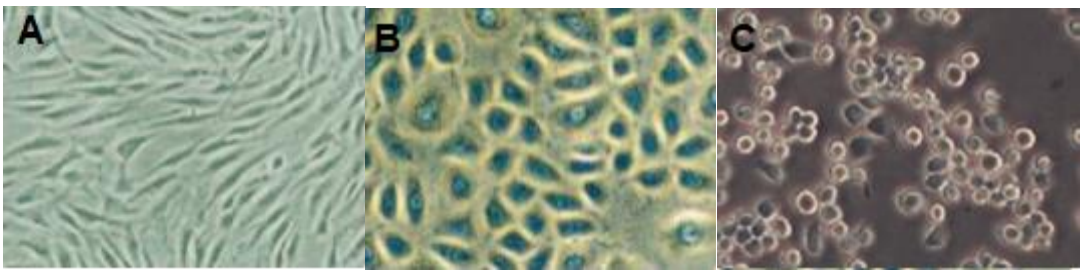
Ayrıştırma verimliliği yüksek ve hızlı bir ayırma yöntemi olan mikrofiltrasyon, sıvı ve gaz fazındaki katı partiküllerin yanı sıra çözeltide çözünmüş moleküllerin bağıl büyüklüklerine göre seçimli fraksiyonlanarak ayrılması ve konsantre olması amacıyla uygulanmaktadır. Kullanılacak tampon, reaktif veya örneklerden partiküllerin uzaklaştırılması için gerçekleştirilebilecek mikrofiltrasyonda 0.1-10 μm arasında por büyüklüğüne sahip olan mikrofiltreler kullanılır (Tarhan ve diğ., 2000).

Ultrafiltrasyon; solüsyonlarda bulunan protein, peptid, polisakkarit, DNA ve RNA gibi moleküllerin hidrostatik basınç ve santrifüj gibi transmembran kuvvetlerin etkisiyle membranlardan geçirilerek fraksiyonlanmasını sağlar (Lonsdale, 1982; Pusch ve diğ., 1982; McGregor, 1986; Harris ve Angal, 1989). Ultrafiltrasyonda akış hızı, membran basıncıyla ve indirekt olarak da membrandan geçen moleküllerin direnciyle orantılıdır. Ultrafiltrasyon verimi, çözelti ortamındaki parçacıkların veya makromoleküllerin membranda adsorblanması veya fiziksel olarak porlarda birikmeleriyle oluşan kirlenmelerden etkilenmektedir (Suki ve diğ., 1984; Baker ve diğ., 1985; Fane ve diğ., 1987).

2.4. MEMELİ HÜCRE KÜLTÜRÜ

Hayvansal kökenli dokulardan izole edilen ökaryotik hücreler, aşı araştırmaları, kanser çalışmaları, ilaç-doz denemeleri gibi birçok biyolojik, biyokimyasal ve biyomedikal araştırmada araştırıcılar tarafından uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Çalışmaya özel olarak seçilen hücreler, laboratuvar ortamında çalışmaya olanak vermek üzere optimize edilmişlerdir. Normal şartlarda sınırlı bölünme kapasitesine sahip zamanla yaşlanan memeli hücrelere kültürde devamlı bölünebilme yeteneği kazandırılmıştır (Tung ve diğ., 2016).

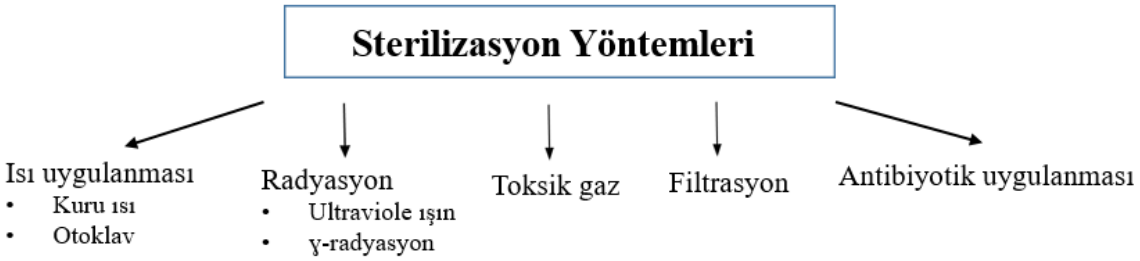
Kültürdeki hücreler morfolojilerine göre, 3 temel kategoriye ayrılır. Fibroblastik (fibroblast benzeri) hücreler, iki veya daha fazla kutuplu ve uzun şekillere sahiptir. Epitel benzeri hücreler, düzenli boyutlarda ve çokgen şekillerdedir. Yüzeye tutunarak çoğalan bu iki hücre tipine ek olarak, yüzeye tutunmadan süspanse halde çoğalan lenfoblast benzeri hücreler ise, küresel şekildedir (Şekil 2.13) (Alberts ve diğ., 2015).



Şekil 2.13: Morfolojilerine göre 3 temel sınıfa ayrılmış olan hücre tipleri [Sırasıyla; fibroblastik (A), epitel benzeri (B) ve lenfoblast benzeri hücre (C)] (Alberts ve diğ., 2015).

2.4.1. Sterilizasyon Yöntemleri

Hücre kültürü çalışmalarında, araştırıcılar için büyük engel teşkil eden, bakteri ya da mantar kaynaklı kontaminasyonların önüne geçmek için, kullanılan çözeltiler ve deney malzemeleri uygun sterilizasyon yöntemleriyle steril edilir. Bu yöntemlerin başlıcaları arasında, ısı uygulaması, radyasyon, toksik gaz, filtrasyon ve antibiyotik uygulaması gelmektedir (Alberts ve diğ., 2015). Temel olarak sterilizasyon yöntemleri beş ana başlığa ayrılır (Şekil 2.14).



Şekil 2.14: Sterilizasyon yöntemleri.

Kuru ısı uygulaması, 160 ^{o}C'ta 2 saat ya da 180 ^{o}C'ta 1 saat olmak üzere cam, metal, porselen, toprak kaplar ve emaye yapılı tüm eşyalar için kullanılır. Bu işlemle; vejetatif formdaki mikroorganizmalar, sporlar, endotoksik moleküller ve Gram (-) bakteriler uzaklaştırılmış olur.

Otoklav işlemi, yaklaşık 121^{o}C'ta, 1 atmosfer basınç altında otoklav cihazı içinde gerçekleştirilir. Sistem yirmi dakikanın altında bir sürede çalışarak materyali sterilize eder.

Ultraviyole ışın (~250-270 nm) uygulaması, özel kabin içinde gerçekleştirilen ve yaklaşık iki saat süren bir uygulamadır. Fakat pipet ucu ve kapalı kültür kaplarının sterilizasyonunda kullanışsız olması sebebiyle araştırıcılar tarafından sık tercih edilmez; daha çok çalışma ortamlarının sterilizasyonunda kullanılır.

Gamma radyasyon uygulaması, kültür laboratuvarlarında yaygın olmayan ancak plastik eşya ve liyofilize haldeki çözeltilerin sterilizasyonunda başarı sağlayan bir yöntemdir.

Yüksek basınç altında toksik gaz uygulaması, yüksek sıcaklıkta bozulabilen moleküllerin, mikroorganizmalardan arındırılması için yapılan bir işlemdir. Etilen oksit gazı kullanılarak

yapılan bu işlem kültür laboratuvarlarında tercih edilmezken, genellikle cerrahi aletlerin sterilizasyonunda kullanılır.

En basit ve hızlı sterilizasyon yöntemlerinden biri olan filtrasyonda ise, çözelti mikroorganizmaların geçemeyeceği kadar küçük gözeneklere sahip özel filtrelerden geçilir. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan 0.2 µm por çapına sahip filtreler, bakteri ve mantarların çözeltiden ayrılması için uygundur.

Memeli hücre kültürü çalışmalarında rutinde kullanılan antibiyotik uygulaması, Gram (+) ve Gram (-) bakterilerin besiyerinde büyümesini engellemektedir. Genellikle farklı antibiyotiklerin kombinasyonu şeklinde yapılan bu uygulamada penisilin ve streptomisin ikili antibiyotiği sık tercih edilmektedir. Bu antibiyotik ikilisinin tercih edilme sebebi, belirli dozların altında (<100 ünite/mL penisilin ve 10 µg/mL streptomisin) memeli hücreleri için non-toksik özellikte olmalarıdır.

2.4.2. Hücre Kültürü Bileşenleri

Hücre kültüründe kullanılan izotonik tampon, normal metabolizma için gerekli olan besin maddelerini (amino asit ve vitaminler) ve enerji kaynağını (genellikle glukoz) içermelidir. Hücre kültürü çalışmalarında sıklıkla kullanılan izotonik tampon, DMEM (“Dulbecco's Modified Eagle Medium”)’dir. Memeli hücreler bulundukları ortamda kan aracılığıyla çeşitli büyüme faktörlerine ve prekürsör moleküllere maruz kalmaktadır ve bu maruz kalma hücrelerin normal metabolizmalarını belirlemektedir. Bu sebeple, kültürdeki hücrelerin çoğalması için, tampona ek olarak fetal sığır serumu (FBS, “Fetal bovine serum) eklenmelidir. Çoğalan hücrelerin enerji ihtiyaçlarını desteklemek ve nükleik asit ve diğer azotlu bileşenlerin sentezi sırasında ortaya çıkan azot ihtiyacını karşılayabilmek için, kültür besiyerine L-glutamin amino asidi de eklenmelidir (Mather ve Roberts, 1998; Lodish ve diğ., 2016).

2.4.3. Epitel Hücre Hattı

Omurgalılarda iki yüzden fazla farklı tipte hücre tipi bulunmaktadır. Bu hücre gruplarından çoğunluğunu epitel hücreler oluşturur. Epitel doku, embriyonun gelişimi sırasında, endoderm, mezoderm ve ektodermden kökenlenir. Tek katlı, çok katlı, yalancı çok katlı veya değişken hücre katı sayısına sahip epitel hücreler, hücre şekline göre, kübik, yassı ve prizmatik olarak sınıflandırılır. Epitel hücrelerin komşu hücreye tutunduğu yüzey lateral yüzey, bazal laminaya

tutunduğu yüzeyi bazal yüzey, serbest bulunan yüzeyi ise apikal yüzey olarak isimlendirilir. Keratin, silyum veya mikrovillus gibi apikal yüzey özelleşmesi de gösterebilen epitel hücreleri, canlı vücutlarında çeşitli işlevler için özelleşmişlerdir. Bu işlevler 4 ana başlık altında toplanabilir; canlının dış yüzeyini ve organların iç yüzeyini kaplama (örtü epiteli); hormon, süt ya da gözyaşı gibi özel ürünleri salgılama (salgı epiteli); sindirim kanalında besinlerin emilimi ya da göz retinasında fotoreseptör tabaka sayesinde ışığın algılanması (duyu epiteli) ve kasılma (kas epiteli)'dır (Alberts ve diğ., 2015).

Örtü epiteli vücutta bulunduğu yere göre farklı isimler alır (Şekil 2.15).



Şekil 2.15: Örtü epiteli çeşitleri (Alberts ve diğ., 2015).

Epitel hücreleri yapısal ve fonksiyonel kutupsal (polar) organizasyon göstermektedir. Bu hücrelerde plazma membranı; farklı protein setleri içeren apikal membran ve bazolateral membran olmak üzere belirgin iki domaine ayrılır. Birçok çalışmada epitel hücrelerin polarite özelliği hücreleri kültüre almada kullanılır (Lodish ve diğ., 2016).

2.4.3.1. ECV304 Hücre Hattı

Bu tez kapsamında kullanılan epitel benzeri ECV304 insan göbek bağı endotel hücre hattı (Umbilical Vein Endothelial Cell Line"), ilk olarak, Japonya'da yeni doğmuş bir kız çocuğundan izole edilmiş ve tanımlanmıştır (Takahashi, ve diğ., 1990).

Endotel hücreler, vücutta, dolaşım sisteminin (kan ve lenf damarları) iç yüzeyini ve kalbin kulakçık ve karıncıklarını kaplayan tek katlı yassı epitel hücreleridir ve embriyonik dönemde mezodermden kökenlenirler (Alberts ve diğ., 2015). Epitel hücre tayini için kullanılan dezmozom ve sitokeratin kombinasyonu ECV304 hücre hattında da bulunmaktadır (Kiessling ve diğ., 1999).

ECV304, epitel hücrelerin özelleşmiş bir sınıfı olan endotel hücre sınıfında bulunmaktadır. Ancak hücre içi fonksiyonları incelendiğinde (Hughes, 1996), epitel hücre hattının karakteristik özelliği olan epiteliyal sitokeratinlerin anlatımını yaptığı görülmektedir ve ECV304 hücre hattının epitel hücre hattı fenotipine sahip olduğu kabul edilmektedir. Spesifik epitel hücre markırı olan E-kaderin molekülünün, ECV304 hücre hattında anlatım yaptığı ileri düzeyde protemik tekniklerle ortaya konulmuştur. E-kaderine ek olarak, epitel hücrelerde bulunan dezmozom moleküllerinin de ECV304 hücre hattında varlığı gösterilmiştir (Kiessling ve diğ., 1999). Bununla birlikte, ECV304 hücre hattının, epitel hücre modeli olarak kullanıldığı bir çalışmada (Penfold ve diğ., 2000), ECV304'ün, endotel hücre hatlarının karakteristik özelliği olan kaderin-5, E-selektin, von Willebrand's faktörüne (faktör VIII) sahip olmadığı, bunun yanı sıra epitel hücre proteinleri olan dezmoplakin antijenlerine ve E-kaderine sahip olduğu gözlenmiştir. ECV304 hücre hattının, fenotipik karakter olarak İnsan Retinal Pigment Epitel Hücre Hattı ("Human Retinal Pigment Epithelial Cells", D407)'na benzer olduğu bulunmuştur.

ECV304 hücre hattı; inflamasyonun patalojik işleyişi, tümör yayılımı, damar sertliği (ateroskleroz), anjiyogenez, hücre göçü, glukoz transport çalışmalarında ya da damar büyüme faktörlerinin sinyal transdüksiyon çalışmalarında çok kullanılır. Buna ek olarak, kan beyin bariyerinin karakteristik özelliklerinin incelenmesi ile ilgili çalışmalarda sıklıkla yararlanılır (Suda ve diğ., 2001).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. *Microcystis aeruginosa* KÜLTÜRLERİNİN KURULMASI

Bu tez kapsamında, İstanbul Üniversitesi Su Bilimleri Fakültesi'nden temin edilen *M. aeruginosa* PCC7806 kullanıldı.

M. aeruginosa kültürü, 250 mL'lik cam flasklarda, pH'ı 7.1 olan ve içeriği Tablo 3.1'de verilen 150 mL BG-11 besiyerine, besiyeri hacminin %15'i (22.5 mL) kadar stok alg kültürü eklenerek hazırlandı ve 28˚ C'ta, 110 rpm'de çalkalamalı inkübatörde (Thermo Scientific, MaxQ 4000) sürekli ışık kaynağı altında 28 gün süre ile üretildi (Stanier ve diğ., 1971).

Tablo 3.1: BG-11 besiyeri içeriği.

Bileşen	**Konsantrasyon**	**İz metal karışımı**	**Konsantrasyon**
$NaNO_3$	1.5 g/L	H_3BO_3	2.86 g/L
K_2HPO_4	0.04 g/L	$MnCl_2.4H_2O$	1.81 g/L
$MgSO_4.7H_2O$	0.075 g/L	$ZnSO_4.7H_2O$	0.222 g/L
$CaCl_2.2H_2O$	0.036 g/L	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.39 g/L
Sitrik asit	0.006 g/L	$CuSO_4.5H_2O$	0.079 g/L
Amonyum ferrik sitrat	0.006 g/L		
EDTA-Na_2	0.001 g/L		
Na_2CO_3	0.02 g/L		
İz metal karışımı	1 ml/L		

3.2. *Microcystis aeruginosa* KÜLTÜRÜNDEN HAM EKSTRE HAZIRLANMASI

Alg parçalama işlemi sırasında kullanılacak olan tampon fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) (Tablo 3.2) distile su kullanılarak hazırlandı ve por çapı 0.45 µm olan steril şırınga filtresinden geçirilerek steril edildi ve kullanılıncaya kadar +4^{o}C'ta saklandı.

Tablo 3.2: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi.

Bileşen	**Konsantrasyon**
NaCl	8 g/L
KCl	0.2 g/L
Na_2HPO_4	0.72 g/L
KH_2PO_4	0.12 g/L

Yeterli büyüme gösteren alg kültürleri, oda sıcaklığında, 3901 x*g*'de 50 dak santrifüj (Beckman Coulter, Allegra X-30R Centrifuge, SX4250 Rotor) edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 37^{o} C'a ayarlanmış etüvde (Thermo Scientific, Heratherm Oven) 30 dak kurutuldu. Kurutmanın ardından, pelletin kuru ağırlığı ölçüldü ve pellet 1 mL steril PBS'de çözüldü.

Ardından mikrotüpler, homojenizatörde (MagNA Lyser Roche) 5000 x*g*'de 1 dak homojenize edildi. Ardından tüplerdeki ısınmanın önüne geçmek için -20^{o} C'ta 10 dak bekletildi. Bu işlem 8 defa tekrarlandı.

İşlem sonrası örneklerden hazırlanan lam-lamel arası preparatlar ışık mikroskobunda 40X'lik objektif altında incelenerek, parçalanmanın sağlandığı teyit edildi. Örnekler -20^{o}C derin dondurucuda saklandı.

3.3. PROTEİN KONSANTRASYONUN BELİRLENMESİ

Alg ekstresinin protein konsantrasyonu, ticari bir kit olan "SMART^{TM} BCA Protein Assay Kit" (iNtRON Biotechnology) ile üretici firmanın önerdiği şekilde belirlendi.

Bu yöntem, alkali çözeltideki proteinlerin biüre reaktifiyle işleme sokulduğunda bakır (II) iyonlarının bakır (I) iyonlarına indirgemesi ve bakır (I) iyonlarının BCA ile oluşturduğu koyu renkli mor kompleksin 562 nm'deki absorbansının ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Duyarlılık

sınırları 20-100 µg/mL olan BCA yöntemi proteinlerin amino asit içeriğinden orta derecede etkilenmektedir.

Konsantrasyonu belirlenecek alg ekstresi örneği, 1:10 ve 1:50 oranlarında sulandırılarak hazırlandı ve her bir karışımdan 25 µL alınarak üzerine 50:1 (v:v) oranında reaktif A ve reaktif B solüsyonu içeren BCA belirtecinden 200 µL eklendi ve çalkalayıcıda (Heidolph Unimax 1010), 1 dak süreyle, yüksek devirde karışması sağlandı. Kör örnek olarak dH_2O ile sulandırılmış PBS (1:10 ve 1:50) kullanıldı. Standart olarak, kitin önerdiği konsantrasyonlar olan 500, 1000, 1500, 2000 ve 2500 µg/mL konsantrasyonda hazırlanmış sığır serum albumini (Bovine Serum Albumin/BSA) çözeltileri kullanıldı. Standartın kör örneği olarak dH_2O kullanıldı. Hazırlanan karışımlar 37°C'lık etüvde (Thermo Scientific, HERACELL 1500 İ) 30 dakika bekletildikten sonra, absorbansları dalga boyu 562 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede (Bio-Tek, µ-Quant) ölçüldü. Standart protein çözeltilerinin konsantrasyonları ve elde edilen absorbans değerleri kullanılarak standart grafik hazırlandı. Bu grafikten elde edilen doğru denklemi yardımıyla örneğe ait protein konsantrasyonu hesaplandı.

3.4. ALG EKSTRESİNİN KOLON KROMATOGRAFİSİ İLE FRAKSİYONLARINA AYRILMASI VE FRAKSİYONLARIN TOPLANMASI

Ticari bir kit olan BCA kiti ile protein konsantrasyonu belirlenen alg ekstresi, 0.45 µm por çapına sahip şırınga filtresinden geçirildi, protein konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde PBS ile seyreltildi ve C-18 ters faz kolon kromatografisiyle fraksiyonlarına ayrıldı. Bu işlem için ilk olarak Lawton ve diğ., (1994) tarafından önerilen temel prosedür uygulandı. Ancak bu prosedürle yeterli bir ayrım elde edilmeyince, gradient koşulları ve solvent A'nın içeriğinde değişikliklere gidilerek yöntem optimize edildi. Ayrıca ilgili referansta yer almayan uygulama (enjeksiyon) hacmi ve fırın sıcaklığı, sırasıyla 50 µL ve 40^oC olarak ayarlandı.

HPLC'de (Shimadzu Corporation) kullanılan mobil fazlardan solvent A ultra saf su-%10 (v/v) asetonitril-%0.05 (v/v) TFA ve solvent B asetonitril-%0.05 (v/v) TFA olacak şekilde hazırlanarak, içeriğindeki çözünmüş havanın uzaklaştırılması için 20 dak sonikatörde bekletildi.

Tablo 3.3'te verilen yöntem sisteme işlenerek, enjeksiyon hacmi 50 µL, solventlerin sistemden akış hızı 1 mL/dak ve fırın sıcaklığı 40^oC olacak şekilde ayarladı. Kullanılacak olan A ve B elektrodlarının 5'er dakika, örnek elektrodunun 10 dak mobil fazlar ile şartlanması yapıldı.

Ardından cihaza 5 dak akış verilerek kolonun (GL Sciences, Inertsil ODS-3.5µm, 4.6 x 250mm) mobil fazlara alışması sağlandı.

Tablo 3.3: HPLC lineer gradient koşulları.

	Zaman/dakika					
	0 dak	10 dak	40 dak	44 dak	46 dak	50 dak
Solvent A	80	75	20	0	80	80
Solvent B	20	25	80	100	20	20

Fraksiyonlama işlemi 13 defa tekrarlandı ve toplanan herbir fraksiyon aynı falkon (50 mL) içinde biriktirildi. Elde edilen örnekler gece boyu -80^{o}C'ta dondurulduu. Örneklerde bulunan çözücülerin uzaklaştırılması için, dondurarak kurutma çalışma prensibi ile çalışan liyofilizatör (CHRIST/ALPHA 1-4 LD Plus) kullanıldı. Kurutma işlemi tamamlanan liyofilize örnekler 100 µL PBS'de çözüldü ve -20^{o}C derin dondurucuda saklandı.

3.5. MEMELİ HÜCRE KÜLTÜRÜNÜN KURULMASI

Deneylerde kullanılan ECV304 insan endotel hücre hattı, soğuk zincir altında Üsküdar Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden temin edildi ve -80^{o}C'ta derin dondurucuda saklandı.

3.5.1. Hücreler İçin Gerekli Olan Besiyerinin ve Dondurma Besiyerinin Hazırlanması

ECV304 hücre hattının çoğaltımı için en uygun besiyeri olan; "Dulbecco's Modified Eagle's Medium/High Glucose" (DMEM/High, Gibco 41966) kullanıldı. DMEM/High içeriğinde pirüvat, L-Glutamin ve 4.5 g/L D-glukoz bulunmaktadır. Deneylerde kullanılacak besiyeri; steril DMEM/High solüsyonuna steril koşullarda %10 (v/v) fetal sığır serumu (FBS) ve %1 (v/v) antibiyotik (<100 ünite/mL penisilin ve 10 µg/mL streptomisin) solüsyonu eklenerek laminar hava akımlı steril kabinde (Thermo Scientific, Heracell™ 150i) hazırlandı. Hazırlanan besiyeri +4^{o} C'ta buzdolabında saklandı.

Hücreleri dondurma için kullanılacak olan dondurma besiyeri son hacim 50 mL olacak şekilde, %10 (v/v) DMSO ve %90 (v/v) FBS olacak şekilde hazırlandı ve +4ºC'ta saklandı.

3.5.2. Hücre Açma

Hücre açma işlemine başlamadan önce kullanılacak solüsyonlar su banyosunda (Bio-Rad Water Bath) 37ºC'a getirildi. Dondurma besiyerinin içinde, -80ºC'ta saklanan hücreler, hızlı şekilde su banyosunda çözündürüldü. Hücre canlılığının kaybedilmemesi için, çözündürme işleminin hızla gerçekleştirilmesine dikkat edildi. Çözünmenin ardından 1 mL hücre karışımı pipet yardımıyla alındı ve 4 mL hazır besiyeri eklenmiş 15 mL'lik falkona aktarılarak santrifüjde (Beckman Coulter, Allegra X-30R Centrifuge) 155 x*g*'de 4 dak santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrası dondurma besiyerinden ayrılan hücre pelleti, 1 mL taze besiyerinde süspanse edilerek, 4 mL besiyeri eklenmiş, tek kullanımlık 25 cm^2'lik hücre kültürü flasklarına aktarıldı.

Ekim işlemi tamamlandıktan sonra, flasklar 37°C'ta %5 atmosferik CO_2 içeren nemli etüvde (Thermo Scientific, Forma Direct HeatCO_2 Incubator) 24 saat inkübe edildi. Bir sonraki gün hücrelerin yüzeye tutunma durumları invert mikroskop ile kontrol edildi. İlk ekimi takip eden 48 saat sonra flasklardaki tüm besiyerleri serolojik pipet yardımıyla çekilerek, hücrelerin üzerine 37ºC su banyosunda ısıtılan 4 mL taze DMEM eklendi ve 37ºC etüvde inkübasyona devam edildi. Hücreler bulundukları flaskta yüzde 80 oranında yüzeyi kaplayacak çoğalma gösterdikten sonra pasajlama (alt kültürleme) işlemi gerçekleştirildi.

3.5.3. Hücrelerin Alt Kültürlerinin Kurulması

ECV304 hücrelerinin alt kültürlenmesi işlemleri laminar hava akımlı steril kabinde gerçekleştirildi. Pasajlanma işlemi, Atasever-Arslan ve diğ. (2016) tarafından önerilen yönteme göre yapıldı.

Pasajlama işlemine başlarken 25 cm^2'lik hücre kültürü kabı içerisindeki tüm besiyeri tek kullanımlık 10 mL'lik serolojik pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Hücre yüzeyinde kalan besiyerinin uzaklaştırılması için hücreler, steril PBS ile yıkandı ve yıkamanın ardından PBS uzaklaştırıldı. Hücrelerin kabın yüzeyinden kalkmalarını sağlamak için 1 mL Tripsin/EDTA eklenerek hücre kültürü kabı 1 dak etüvde bekletildi ve ardından yüzeyden ve birbirlerinden ayrılmalarını sağlamak için kültür kabının yan yüzeylerine elle vuruldu. Hücrelerin yüzeyden tamamen kalkıp kalkmadığı invert mikroskop ile kontrol edildi. Ayrılma işlemini sağlayan

tripsin aktivitesini durdurmak için, hücre kültürü kaplarına 3 mL besiyeri eklendi. Elde edilen solüsyon 15 mL'lik steril falkona geçirilerek 155 x*g*'de 4 dak santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak hücreler taze besiyeri ile süspanse hale getirildi. Hücre sayımı Tripan mavisi boyası ve hemositometre kullanılarak gerçekleştirildi. Yeni hücre kültürü kabına $5x10^4$ hücre/mL olacak şekilde hücre koyuldu ve son hacim 4 mL olmak üzere taze besiyeri ile tamamlandı.

Hücreler 37°C'ta karbondioksitli etüvde çoğalmaya bırakıldı. Yeterli çoğalma (%80) düzeyine ulaşan kültürlerde ortalama 3 günde bir pasajlama işlemi gerçekleştirildi.

3.5.4. Hücrelerin Dondurulması ve Stoklama İşlemi

Hücrelerin dondurulma işlemi şu şekilde gerçekleştirildi. Yüzeyin yüzde 80'ini kaplayacak şekilde çoğalan hücrelerden besiyeri tamamen uzaklaştırıldı. Besiyeri kabına hücrelere zarar vermeyecek şekilde steril PBS eklenerek, hücrelerin yıkanması sağlandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra hücre kültürü kabı üzerine 1 mL tripsin/EDTA eklendi ve 1 dak 37°C'ta inkübe edildi. Ardından kültür kabının yan yüzeylerine vurularak fiziksel kuvvet uygulandı. Böylelikle hücrelerin birbirlerinden ve tutundukları yüzeyden ayrılmaları sağlandı. Taze besiyeri (3 mL) eklemiş falkona aktarılan hücre süspansiyonu 155 x*g*'de 4 dak santrifüj edildi. Bu işlemin ardından, süpernatant tamamen uzaklaştırıldı. Elde edilen hücre pelleti, 2 mL dondurma besiyerinde süspanse hale getirildi. Thoma lamı ile sayımı gerçekleştirildikten sonra, 10^6 hücre/mL olacak şekilde kriyotüplere aktarıldı. Tüpler etiketlenerek, kademeli şekilde donmaları için sırasıyla +4 °C buzdolabı, -20°C derin dondurucu ve son olarak -80°C derin dondurucuya aktarılarak stoklama işlemi tamamlandı.

3.6. ECV304 HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA EĞRİSİNİN OLUŞTURULMASI

ECV304 hücre hattının jenerasyon süresinin belirlenmesi ve çoğalma eğrisinin çıkartılması için, 24 kuyucuklu kültür kaplarına başlangıç değerleri 10^5 hücre/mL ve $5x10^4$ hücre/mL olacak şekilde ekim yapıldı. On gün boyunca, ekimin gerçekleştirildiği saatte, hücre sayımı yapıldı (Atasever-Arslan ve diğerleri, 2016). Bu amaçla, kuyucukta bulunan besiyeri pipetle çekildi, hücreler PBS ile yıkandı ve kuyu başı 200 µL tripsin/EDTA eklenerek hücrelerin yüzeyden kalkması sağlandı. Tripsin inhibisyonu için DMEM besiyeri eklendi ve hücre süspansiyonu tripan mavisi ile 1:1 (v:v) oranında karıştırıldı. Hemositometre kullanılarak, canlı

(boyanmamış) hücrelerin sayımı gerçekleştirildi. Deneyler 3 kez tekrarlandı ve GraphPad Prism® 7.0 programı kullanılarak, absise günler ve ordinata ise mL'deki hücre sayıları konularak grafik çizildi. Çoğalma eğrisine göre hücrelerin lag, log, durağan ve ölüm fazları belirlendi. Hücrelerin jenerasyon sayısı (n) ve süresini (St) hesaplamak için aşağıda verilen denklemler kullanıldı (Moat, 2002).

$n = (\log N_2 - \log N_1) / \log 2$

n: Jenerasyon sayısı

N_2: Logaritmik bölünme evresinin sonundaki hücre sayısı

N_1: Logaritmik bölünme evresinin başlangıcındaki hücre sayısı

$St = (T_2 - T_1)/n$

St: Jenerasyon süresi

T_2: Logaritmik bölünme evresinin bitiş zamanı

T_1: Logaritmik bölünme evresinin başlangıç zamanı

3.7. HÜCRE CANLILIK TESTLERİ

Sitotoksisite analizi için, Atasever-Arslan ve diğ. (2016) tarafından önerilen MTT testinden yararlanıldı. Canlı hücrelerde mitokondriyal dehidrogenaz enzimi varlığında MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2, 5-difeniltetrazolyum)] molekülünün tetrazolyum halkası koparılmakta ve bu molekülün suda çözünemeyen formazan kristallerine dönüşümü sağlanmaktadır. Ardından oluşan formazan kristallerinin DMSO yardımıyla çözünmeleri sağlanıp, spektrofotometrede 570 nm'de absorbans ölçümü yapılmaktadır.

Bu test için, tek kullanımlık, steril 96 kuyucuklu kültür kaplarının her bir kuyucuğunda uygun sayıda ($1x10^5$ hücre/mL) hücre bulunacak şekilde, hücre süspansiyonundan 90 µL alınarak hücre ekimi gerçekleştirildi. Hücreler 1 gece 37ºC, %5 karbondioksitli etüvde inkübe edilerek kuyucuklara tutunmaları sağlandı.

3.7.1. Total Alg Ekstresi için Hücre Canlılık Testi

Başlangıç protein konsantrasyonu 13.06 mg/mL olan alg ekstresi ile farklı sulandırımlarının (6.53, 3.27, 1.63, 0.82, 0.41, 0.205, 0.102, 0.05 ve 0.025 mg/mL) ECV304 hücre canlılığı

üzerindeki etkilerini araştırmak için, bu sulandırımlar 0.45 µm şırınga filtresinden geçirilerek hücre ekiminin 24. saatinde (logaritmik fazın ortasında) her bir kuyucuktaki hücrelerin üzerine 10'ar µL olacak şekilde uygulandı. Seyreltmeler PBS ile yapıldı. Kontrol grubuna steril 10 µL PBS uygulandı ve bu gruptaki hücreler %100 canlı olarak kabul edildi. Her iki grupta (kontrol ve deney) 3'er tekrarlı 2 bağımsız deney gerçekleştirildi. 96 kuyucuklu kültür kaplarında hazırlanan karışımlar aynı şartlar altında (37^{o}C %5 karbondioksit sağlayan etüvde) 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından her kuyuya konsantrasyonu 5 mg/mL olacak şekilde steril PBS içerisinde hazırlanmış MTT solüsyonundan 10 µL eklendi ve 3 saat 37^{o}C, %5 CO_2 sağlayan etüvde inkübe edildi. Ardından her kuyudan 80 µL sıvı çekilerek uzaklaştırıldı ve taze hazırlanmış 1:1 (v/v) izopropanol-DMSO çözeltisinden 100 µL eklenerek karanlıkta 45 dak inkübe edildi. Ardından spektrofotometrede 570 nm'de absorbans ölçümü alındı ve sonuçlar kaydedildi. Absorbans değerleri aşağıda verilen denkleme konularak %Canlılık oranları hesaplandı.

%Canlılık = (Deney grubuna ait absorbans / Kontrole ait absorbans) x 100

Sonuçlar değerlendirilerek alg ekstresinin ECV304 hücreleri üzerindeki toksik dozu (hücrelerin yarısını öldüren IC_{50} değeri) belirlendi.

3.7.2. HPLC ile Toplanan Fraksiyonlar için Hücre Canlılık Testi

HPLC kolonundan toplanmış, liyofilize haldeki her bir fraksiyon 100 µL PBS'de çözündürüldü. Bu örnekler PBS ile 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 hacim oranlarında seyreltilerek her bir fraksiyon için toplam 7 farklı konsantrasyonda örnek elde edildi. Hücre canlılık testi 3.7.1'de anlatıldığı gibi 3'er tekrarlı 2 bağımsız deneyle gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar değerlendirilerek, fraksiyonların ECV304 hücreleri üzerindeki toksik ya da proliferatif etkileri belirlendi. En yüksek sitotoksik etkiye sahip fraksiyonu belirlemek için, 1-6 no.lu fraksiyonların konsantrasyonları 48 µg/µL olacak şekilde ortak bir değere ayarlanarak da hücreler üzerine uygulandı ve hücre canlılık testi 3.7.1'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen miktarları çok az olduğu için, 7 ve 8 no.lu fraksiyonlar bu teste tabi tutulamadı.

3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Total alg ekstresi ve HPLC'den elde edilen fraksiyonların ECV304 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin analizi için yapılan sitotoksisite testleri sonucu ortaya çıkan veriler

GraphPad Prism® 7 programı kullanılarak değerlendirildi. Gruplar arasındaki farkların anlamlı olup olmadığı tek-yönlü ANOVA (one-way ANOVA) analizi ve Dunnett's testi kullanılarak belirlendi. Anlamlılık sınırı $P<0.05$ olarak kabul edildi.

3.9. SODYUM DODESİL SÜLFAT POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ

Total alg ekstresi ve HPLC ile toplanan fraksiyonlar, SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi) yöntemi ile mini jel elektroforez sisteminde (Mini-PROTEAN 3 cell, Bio-Rad) analiz edildi (Walker, 2002). Elektroforez işleminde kullanılacak cam malzemeler ve jel kaseti deterjan ile yıkanıp durulandıktan sonra distile sudan geçirildi. Elektroforez sisteminde kullanılacak bütün cam malzemeler %70'lik etanol ile silindi ve kurulandı. Camlar üzerinde kalıntı kalmamasına dikkat edildi. Jel kaseti, elektroforez sisteminin kullanım kitapçığında belirtildiği şekilde hazırlandı. Elektroforezde kullanılacak, stok akrilamid çözeltisi [%30 (w/v) akrilamid, %2.67 bis], 1.875 M Tris-HCl tamponu (pH 8.8), 0.6 M Tris-HCl tamponu (pH 6.8), 5X tank tamponu [pH 8.3 olmak üzere, 0.025 M Tris, 0.192 M glisin, %0.1 (w/v) SDS] ve 2X örnek uygulama tamponu [0.125 M tris, %20 (v/v) gliserol, %4 (w/v) SDS, %10 (v/v) 2-Merkaptoetanol, %0.2 (w/v) Bromofenol mavisi] hazırlandı.

%10'luk ayırma jeli için, 1 mL Tris-HCl (1.875 M, pH 8.8), 2.262 mL distile su, 1.662 mL stok akrilamid çözeltisi, 50 µL %10 (w/v) SDS ve 25 µL %10 (w/v) APS karıştırıldı ve içinde bulunan çözünmüş oksijenin uzaklaştırılması için 15 dak ultrasonik su banyosunda (WiseClean, WUC-D10H) bekletildi. Polimerizasyonu başlatmak için karışıma 15 µL TEMED eklenerek iyice karışması sağlandı ve iki cam arasına kasetin 4/5'ini dolduracak şekilde enjektör yardımıyla hızlıca dolduruldu. Polimerizasyon sırasında dökülen ayırma jelinin üst yüzeyinde düz bir yüzey oluşması ve jelin polimerzasyonunu engelleyebilecek oksijenle temasın kesilmesi için, kapiler uç yardımıyla jelin yüzeyini örtecek şekilde distile su eklendi.

Ardından, %5'lik yükleme jeli için, 250 µL Tris-HCl (0.6M, pH 6.8), 1.875 mL distile su, 338 µL stok akrilamid çözeltisi, 25 µL %10 (w/v) SDS, 12.5 µL %10 (w/v) APS karıştırıldı ve içinde bulunan çözünmüş oksijenin uzaklaştırılması için 15 dak ultrasonik su banyosunda bekletildi. Polimerizasyonu başlatmak için 5 µL TEMED eklenerek iyice karışması sağlandı. Ayırma jelinin polimerizasyonu tamamlandıktan sonra (yaklaşık 1 saat), üst yüzeydeki su kurutma kağıdı yardımıyla uzaklaştırılarak, ayırma jeli üzerine enjektörle yükleme jeli karışımı eklendi. Proteinlerin yükleneceği kuyucukların oluşturulması için tarak (1 mm et kalınlığında)

distile sudan geçirilerek jel kasedine yerleştirildi. Polimerizasyon işleminin tamamlanmasının ardından tarak çıkartıldı ve cepler 1X tank tamponuyla yıkandı ve polimerize olmamış jel parçaları kuyulardan uzaklaştırıldı. Jel kaseti 1X tank tamponu ile doldurulmuş elektroforez tankına yerleştirildi. Total alg ekstresinin protein konsantrasyonu 200, 100, 75, 50 ve 25 µg/µL olan sulandırımlarından 10'ar µL alınarak eşit hacimde 2X örnek uygulama tamponu ile karıştırıldı ve 3 dak 95°C'ta kaynatıldıktan sonra jele yüklendi. Bu uygulama ile jeldeki kuyucuklarda sırasıyla 2, 1, 0.75, 0.5 ve 0.25 µg protein bulunması sağlandı. Sekiz HPLC fraksiyonu ise, protein konsantrasyonları belirlenemediğinden kuru ağırlıkları göz önüne alınarak PBS'de çözündürüldü ve her bir fraksiyondan 10 µL alınarak eşit hacimde 2X örnek uygulama tamponu ile karıştırıldı ve kaynatılarak jele uygulandı. Kuyucuklardan birine 10-200 kDa aralığında olan protein markır karışımı (Thermo Scientific, PageRuler™ Unstained Protein Ladder) ve diğerine 6.5-66 kDa aralığında olan protein marker karışımı (SigmaMarker™ Low Range) uygulandı.

Elektroforez sistemine önce 100 V, daha sonra 200 V voltaj uygulayarak Bromofenol mavisine ait bant, jelin alt kenarına 2-3 mm kalana dek yürüdükten sonra (yaklaşık 45 dak) yürütme işlemine son verildi (Walker, 2002). Jeldeki bantlar, Coomassie Boyama ve Hızlı Gümüş Boyama ile görünür hale getirildi.

3.10. BOYAMA YÖNTEMLERİ

3.10.1. Coomassie Boyama

Proteinler için boyar madde olan Coomassie parlak mavisi ("brilliant blue") ile yapılan boyama işlemi için, elektroforez işlemi sonrasında sadece total alg ekstresinin ayrıldığı jel kasetinden çıkarılarak aside ve alkole dayanıklı plastik kaba aktarıldı ve Ausubel ve diğ. (1989)'nin önerdiği yönteme göre Coomassie boyama işlemi gerçekleştirildi. Boyama işleminde kullanılacak olan fiksasyon çözeltisi, %50 (v/v) metanol, %10 (v/v) asetik asit (glasiyel) içerecek şekilde distile su ile hazırlandı. Boyama çözeltisi 1 g Coomassie brillant blue R-250 boyasının 1 litre fiksasyon çözeltisinde çözündürülmesiyle hazırlandı. Yıkama çözeltisi %12.5 (v/v) metanol ve %17.5 (v/v) asetik asit içerecek şekilde distile su ile hazırlandı.

Jel, üzerini kapatacak kadar eklenen fiksasyon çözeltisi içinde, oda sıcaklığında, düşük hızda (20 devir/dak), 2 saat boyunca çalkalayıcıda (Heidolph Unimax 1010) bekletildi. Fiksatif

uzaklaştırıldıktan sonra jel, boyama çözeltisi içinde düşük hızda 30 dakika çalkalandı. Boyama çözeltisinin uzaklaştırılmasını takiben, yıkama çözeltisi eklendi ve jel, belirgin bantlar elde edilene kadar çalkalandı. İstenilen görüntü elde edildiğinde görüntüleme cihazı (Bio-Rad, GS-800) kullanılarak görüntü kaydedildi ve Image Lab Programı (Bio-Rad) ile analiz edildi.

3.10.2. Hızlı Gümüş Boyama

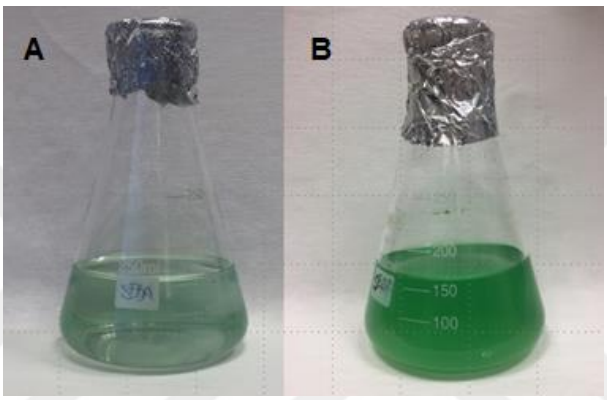
Boyama işleminde kullanılacak olan formaldehitli fiksasyon çözeltisi, son hacmi 1 L olmak üzere %40 (v/v) metanol çözeltisine 500 µL %37'lik formaldehit eklenerek hazırlandı. Yöntem sırasında kullanılacak diğer çözeltiler [%0.2 (w/v) sodyum tiyosülfat ($Na_2S_2O_3$) çözeltisi, %0.1'lik (w/v) gümüş nitrat çözeltisi, 2.3 M sitrik asit çözeltisi] ise distile su ile hazırlandı. Tiyosülfatlı görüntü oluşturma çözeltisini hazırlamak için ilk önce 30 g sodyum karbonat (Na_2CO_3) 20 mL sodyum tiyosülfat çözeltisinde çözündürülerek son hacim 1 litreye tamamlandı; boyama sırasında bu çözeltinin 50 mL'sine 25 µL %37'lik formaldehit eklendi (Heukeshoven ve Dernick,1985).

Elektroforez işlemi sonrasında total alg ekstresi ve HPLC ile toplanan fraksiyonların yürütüldüğü jel, kasetten çıkarılarak aside ve alkole dayanıklı plastik kaba aktarıldı ve üzerine 50 mL formaldehitli fiksatif çözeltisi eklenerek 20 dakika oda sıcaklığında çalkalandı. Fiksatif çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra jel 2 kere 10'ar dak saf su ile çalkalayıcıda, düşük hızda yıkandı. Son yıkama suyunun uzaklaştırılmasının ardından, 50 mL sodyum tiyosülfat çözeltisi eklenerek 2 dak düşük devirde çalkalandı. Çözeltinin dökülmesinin ardından 2 defa 40'ar saniye saf su ile yıkamayı takiben koyu renk şişede taze hazırlanmış %0.1 (v/v)'lik gümüş nitrat çözeltisinden 50 mL eklenerek, düşük devirde 20 dak çalkalandı ve işlem tamamlandıktan sonra eklenen çözelti uzaklaştırılıp jel distile su ile yıkandı. Jel 25 µL %37'lik formaldehit eklenmiş 50 mL tiyosülfatlı görüntü oluşturma çözeltisi ile kahverengi bantlar oluşana dek (8-10 dak) düşük hızda çalkalandı. Bant oluşumu gözlendikten sonra jelin bulunduğu kaba 2.5 mL 2.3 M sitrik asit çözeltisi eklenip pH nötralize edilerek reaksiyon durduruldu. Bant oluşumu tamamlandıktan sonra çözelti dökülerek jel saf su ile yıkandı ve görüntüleme cihazı (Bio-Rad, GS-800) kullanılarak kaydedilen görüntü Image Lab Programı (Bio-Rad) ile analiz edildi.

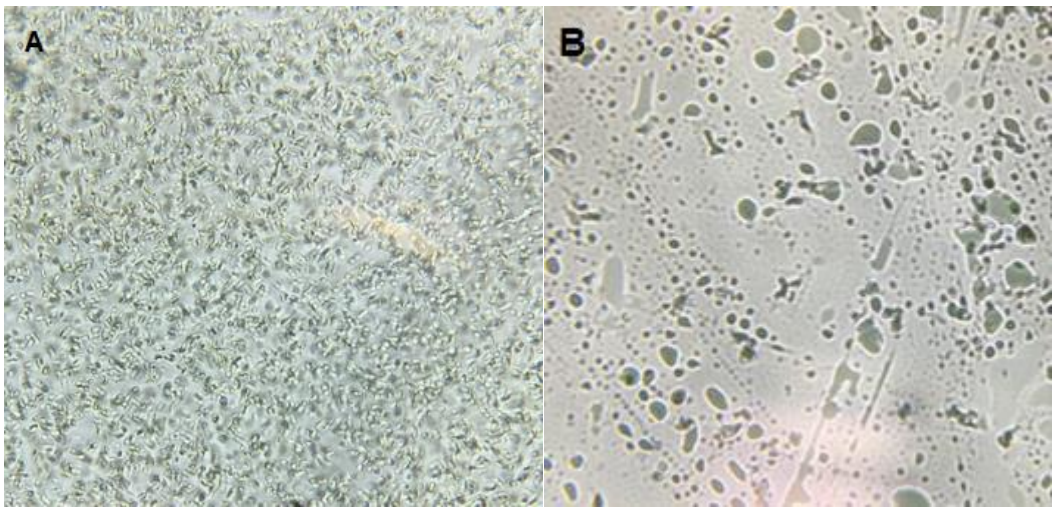
4. BULGULAR

4.1. ALG KÜLTÜRÜNÜN KURULMASI VE EKSTRE HAZIRLAMA

M. aeruginosa, pH'ı 7.1 olmak üzere BG-11 besiyerinde 28˚ C'ta 110 rpm'de çalkalamalı inkübatörde sürekli ışık kaynağı altında 28 gün süre ile kültüre edildi (Şekil 4.1). Kültürden ayrılan hücrelerin homojenizatörde parçalanması ile elde edilen, *M. aeruginosa* (alg) ekstresi ışık mikroskobunda 40X objektif altında incelendi. (Şekil 4.2).



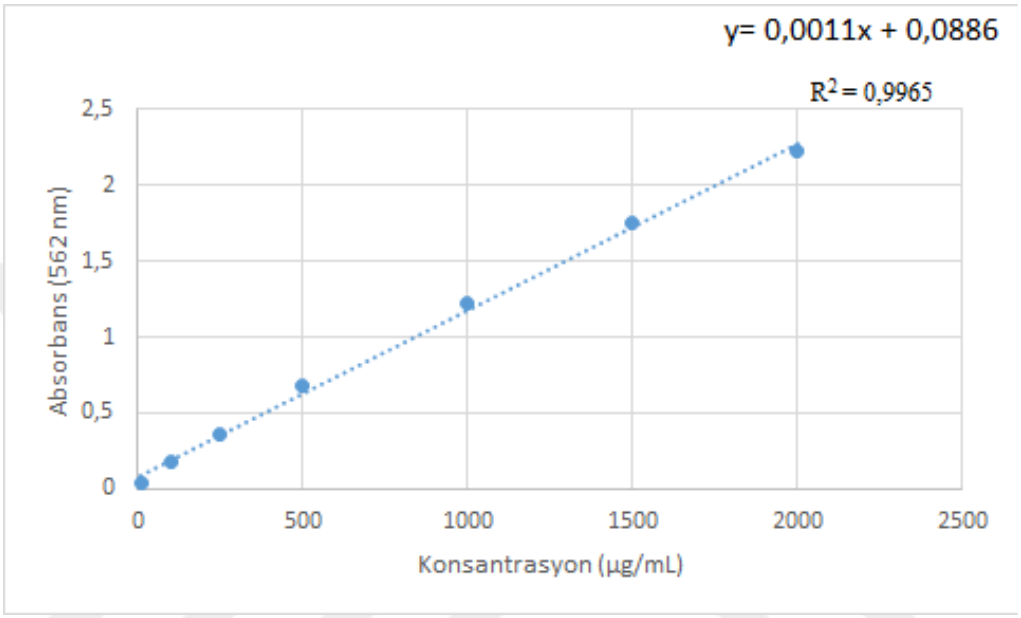
Şekil 4.1: *M. aeruginosa*'nın sıvı besiyerine ekiminin birinci gününe (A) ve yirmi sekizinci gününe (B) ait görüntüler.



Şekil 4.2: Parçalanmamış (A) ve parçalanmış (B) *M. aeruginosa* hücrelerinin mikroskoptaki görüntüsü (40X büyütme).

4.2. ALG EKSTRESİNİN PROTEİN KONSANTRASYONU

M. aeruginosa ekstresindeki protein konsantrasyonunu belirlemek için önce BCA kitinin içerisinde bulunan sığır serum albümin (BSA) ile hazırlanmış standart protein çözeltileri (500, 1000, 1500, 2000 ve 2500 µg/mL) ile standart grafik (Şekil 4.3) oluşturuldu.



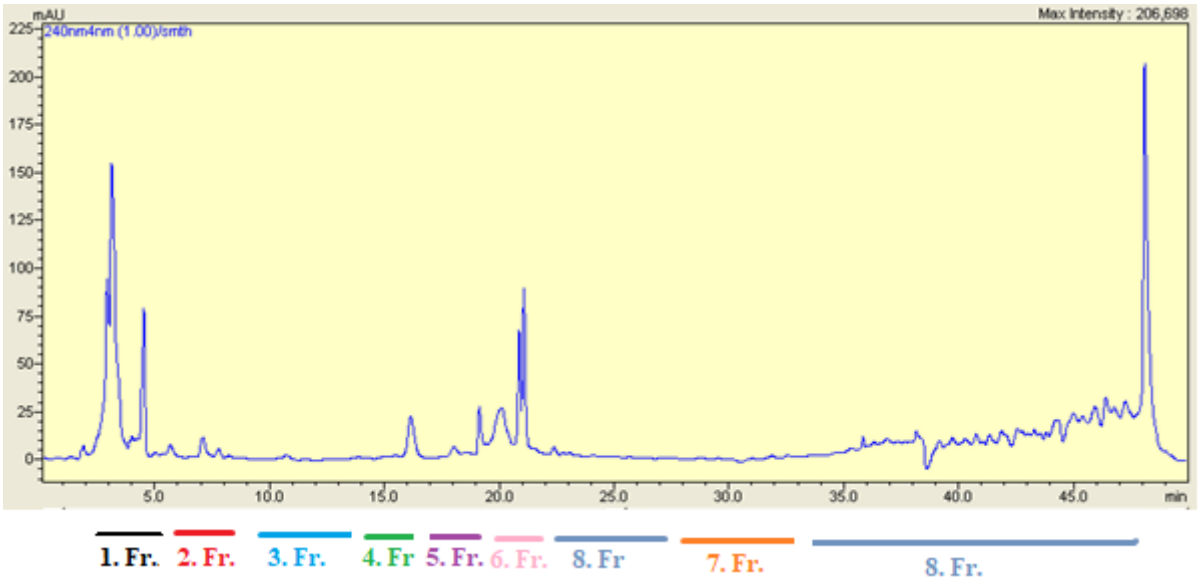
Şekil 4.3: Protein konsantrasyonunu belirlemede kullanılan standart grafik.

Bu grafikteki eğri denklemi kullanılarak alg ekstresinin 1:10 ve 1:50 seyreltme ile hazırlanan dilüsyonlarının konsantrasyonu belirlendi. Aynı ekstreye ait farklı dilüsyonlarda hazırlanmış örneklerin konsantrasyonlarının birbirini doğruladığı gözlemlendi. Kuru ağırlığı 48 mg olan total alg ekstresinin üç tekrarlı 2 bağımsız çalışma sonunda protein konsantrasyonunun ortalama 13.06 mg/mL olduğu belirlendi.

HPLC'den toplanan fraksiyonlarda BCA testi ile herhangi bir sonuç alınamadığı, dolayısıyla protein konsantrasyonu belirlenemedi.

4.3. KOLON KROMATOGRAFİSİ İLE ELDE EDİLEN FRAKSİYONLAR

Protein konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde PBS ile seyreltilmiş olan alg ekstresinin kromatografik ayrımı HPLC'de gerçekleştirildi ve Şekil 4.4'te verilen kromatogram elde edildi.



Şekil 4.4: Alg ekstresinin HPLC sonrası kromatogramı (1. Fr.; 2-5 dak arası, 2. Fr.; 5-8 dak arası, 3.Fr.; 9-14 dak arası, 4.Fr., 14-16 dak arası, 5. Fr.; 16-18.5 dak arası, 6. Fr.; 18.5-23 dak arası, 7. Fr.; 27-33 dak arası, 8. Fr.; 23-27 ve 33-50 dak arası).

Kromatogramdaki pikler, ordinattaki absorbans ve absisteki alıkonma zamanları incelenerek analiz edildi ve fraksiyon toplama işleminin Şekil 4.4'te verildiği şekilde yapılmasına karar verildi. Ayırma işlemi 13 kez tekrarlandı ve 8 fraksiyon, daha önce daraları alınıp kaydedilmiş falkonlar içinde toplandı.

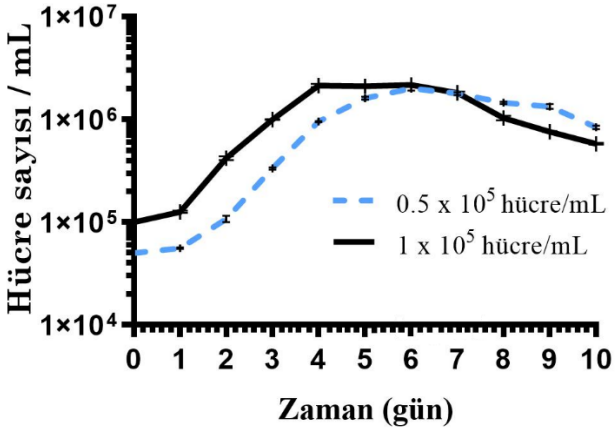
Fraksiyonlama işlemi tamamlanan örneklerin içinde bulundukları çözücülerin uzaklaştırılması için, liyofilizatörde kurutma işlemi gerçekleştirildi. İşlem sonrası tartım yapılarak örnek miktarları kayıt altına alındı (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: HPLC'de toplanan fraksiyonlar ve liyofilize edildikten sonraki ağırlıkları.

Fraksiyon numarası	Toplanma zaman aralığı	Liyofilizasyon sonrası örnek miktarı
1	2-5 dak	9.6 mg
2	5-8 dak	4.8 mg
3	9-14 dak	4.9 mg
4	14-16 dak	6.3 mg
5	16-18.5 dak	6.2 mg
6	18.5-23 dak	6.1 mg
7	27-33 dak	1.2 mg
8	23-27 ve 33-50 dak	1.8 mg

4.4. ECV304 HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA EĞRİSİ

ECV304 hücre hattının jenerasyon süresinin belirlenmesi ve çoğalma eğrisinin çıkartılması için, 24 kuyucuklu kültür kaplarında 10^5 hücre/mL ve $5x10^4$ hücre/mL olacak şekilde ekimler ve takip eden 10 gün boyunca hücre sayımları yapıldı. Elde edilen grafik Şekil 4.5'te gösterildi ve bu grafiğe göre ekimi yapılan 2 kültürün de logaritmik faza birinci gün geçtikleri belirlendi. Başlangıç sayısı 10^5 hücre/mL olan kültürün logaritmik fazdan durağan faza geçtiği zaman 4. gün, $5x10^4$ hücre/mL olan kültürün ise 5. gün olarak belirlendi. Elde edilen grafiğe göre, ECV304 hücrelerinin jenerasyon süreleri yaklaşık 15 saat olarak belirlendi (Barba ve diğ., 1999).



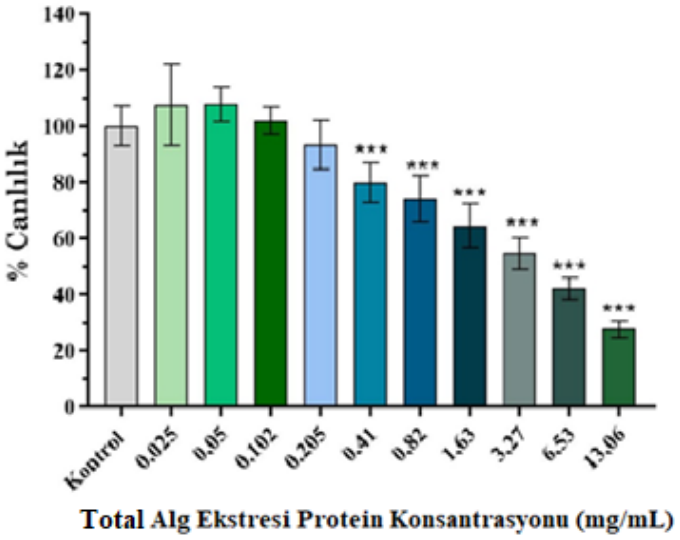
Şekil 4.5: Başlangıç sayısı $0.5x10^5$ hücre/mL ve $1x10^5$ hücre/mL olan ECV304 hücrelerinin çoğalma eğrileri (Eğrilerin üzerindeki dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir).

4.5. ALG EKSTRESİ VE HPLC İLE TOPLANAN FRAKSİYONLARIN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Tez kapsamında kullanılan alg ekstresinin ve HPLC ile elde edilen fraksiyonların ECV304 hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için yapılan MTT testleri sonucunda elde edilen veriler arasındaki tutarlılığın analizi için tek-yönlü ANOVA (one-way ANOVA) testi uygulandı. Deney gruplarının kontrol grubuna göre anlamlılıkları Dunnett's testi ile analiz edildi. GraphPad Prism® 7.0 programında apsise uygulanan konsantrasyonlar (total alg ekstresi için protein konsantrasyonu, fraksiyonlar için ağırlıkça konsantrasyonlar), ordinata ise hücre canlılığı (%) verileri yerleştirilerek grafik çizildi. Sonuçlar aşağıda ayrı başlıklar halinde verildi.

4.5.1. Alg Ekstresinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Başlangıç protein konsantrasyonu 13.06 mg/mL olan alg ekstresi ile farklı sulandırımlarının (6.53, 3.27, 1.63, 0.82, 0.41, 0.205, 0.102, 0.05 ve 0.025 mg/mL) ECV304 hücre canlılığı üzerindeki etkileri Şekil 4.6'da verilen karşılaştırmalı grafikteki gibidir.

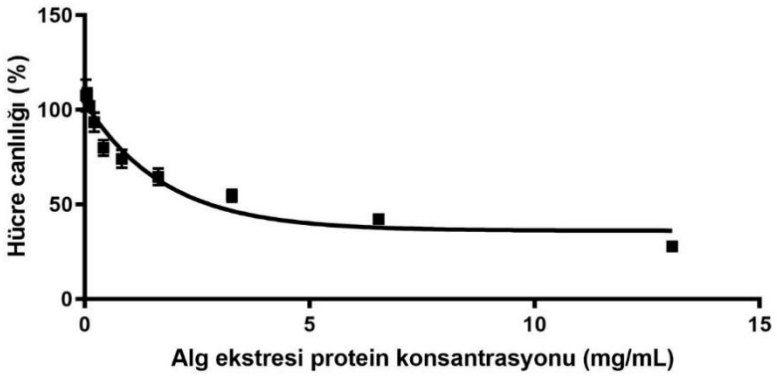


Şekil 4.6: ECV304 hücreleri üzerine 48 saat süreyle uygulanmış farklı protein konsantrasyonuna sahip total alg ekstrelerinin %canlılık üzerine etkilerinin karşılaştırılması (***P<0.001, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir).

Protein konsantrasyonu 13.06 mg/mL olan ekstrenin ECV304 hücreleri üzerinde ~%70 oranında sitotoksik etki gösterdiği, diğer sulandırımlar için de sitotoksik etkinin azalan protein konsantrasyonuna bağlı olarak düştüğü (6.53 mg/mL için ~%55, 3.27 mg/mL için ~%40, 1.63

mg/mL için ~%30, 0.82 mg/mL için ~%20 ve 0.41 mg/mL için ~%18) ve bu etkilerin kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlendi (***P<0.001). Protein konsantrasyonu 0.41 mg/mL'den küçük olan sulandırımların (0.205, 0.102, 0.05 ve 0.025 mg/mL) hücre canlılığı üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı herhangi bir etkisinin olmadığı belirlendi (P>0.05).

Alg ekstresine ait IC_{50} değeri, Şekil 4.7'de verilen dağılım grafiğinden 5.737 mg/mL olarak belirlendi.

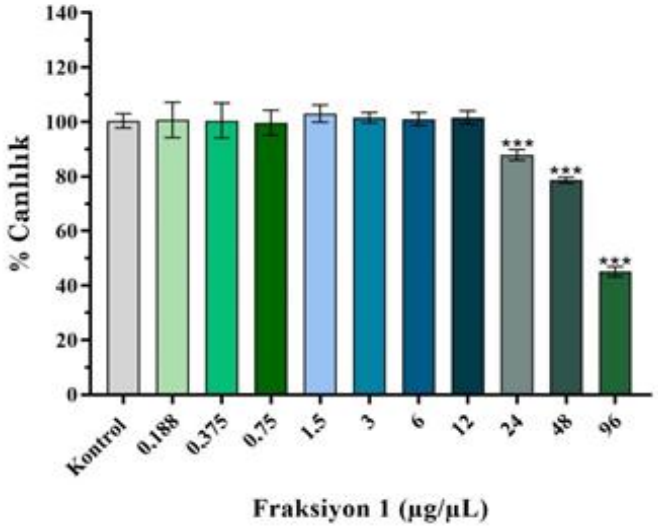


Şekil 4.7: Farklı konsantrasyonlarda protein içeren total alg ekstresinin sitotoksik etkisi (R^2=0.9012).

4.5.2. HPLC'den Toplanan Birinci Fraksiyonun Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

HPLC kromatogramına göre sistemde alıkonma süresi 2-5 dakika ve ağırlıkça başlangıç konsantrasyonu 96 µg/µL olan 1. fraksiyon ile farklı sulandırımlarının (48, 24, 12, 6, 3, 1.5, 0.75, 0.375 ve 0.188 µg/µL) ECV304 hücre canlılığı üzerindeki etkileri Şekil 4.8'de verilen karşılaştırmalı grafikteki gibidir.

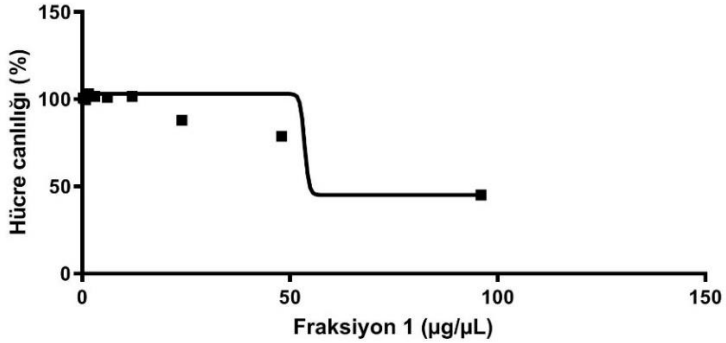
En yüksek uygulama konsantrasyonu olan 96 µg/µL'nin ECV304 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ~%50 olarak bulundu. Sadece 2 sulandırım için sitotoksik aktivitenin istatistiksel olarak anlamlı şekilde düştüğü (48 µg/µL için %20 ve 24 µg/µL için %10) gözlendi (***P<0.001).



Şekil 4.8: ECV304 hücreleri üzerine 48 saat süreyle ağırlıkça farklı konsantrasyonlarda uygulanmış 1. fraksiyonun %canlılık üzerine etkilerinin karşılaştırılması (***P<0.001, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir).

Uygulanan diğer konsantrasyonların, ECV304 hücreleri üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı herhangi bir etkisinin olmadığı belirlendi (P>0.05).

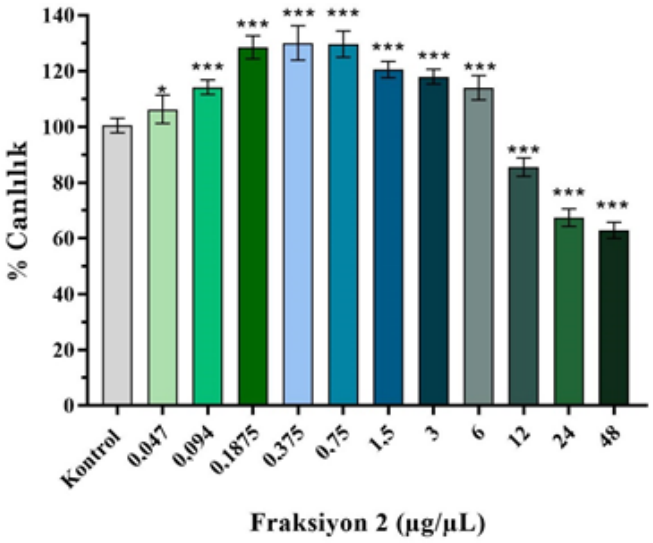
Şekil 4.9'da verilen dağılım grafiğinde görüldüğü gibi 1. fraksiyona ait IC_{50} değeri uygulanan konsantrasyonun az olması sebebiyle belirlenemedi, ancak hücrelerin %48'ini öldüren dozun 96 µg/µL olduğu belirlendi.



Şekil 4.9: Farklı konsantrasyonlardaki 1. fraksiyonun sitotoksik etkisi (R^2=0.6882).

4.5.3. HPLC'den Toplanan İkinci Fraksiyonun Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

HPLC kromatogramına göre, sistemden alıkonma süresi 5-8 dakika olan ve ağırlıkça başlangıç konsantrasyonu 48 µg/µL olarak belirlenen 2. fraksiyon ile farklı sulandırımlarının (24, 12, 6, 3, 1.5, 0.75, 0.375, 0.1875, 0.094 ve 0,047 µg/µL) ECV304 hücre canlılığı üzerindeki etkileri Şekil 4.10'da verilen karşılaştırmalı grafikteki gibidir.

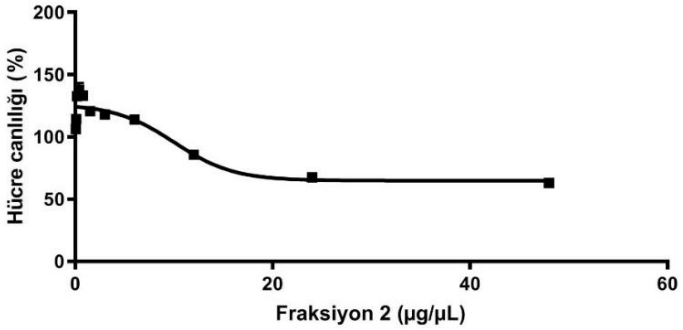


Şekil 4.10: ECV304 hücreleri üzerine 48 saat süreyle ağırlıkça farklı konsantrasyonlarda uygulanmış 2. fraksiyonun %canlılık üzerine etkilerinin karşılaştırılması (***P<0.001, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir).

En yüksek uygulama dozu olan 48 µg/µL'nin ECV304 üzerindeki sitotoksik etkisi, ~ %35; 24 µg/µL ve 12 µg/µL'nin sitotoksik etkisi sırasıyla ~%30 ve ~%10 olarak belirlendi. Sitotoksik aktivitenin istatistiksel olarak anlamlı şekilde düştüğü gözlendi (***P<0.001).

Uygulanan diğer konsantrasyonların (6, 3, 1.5 ve 0.094 µg/µL) ECV304 üzerine istatistiksel açıdan anlamlı ~%20 proliferatif etkisi olduğu gözlendi (***P<0.001). uygulanan konsantrasyonlardan 0.75, 0.375 ve 0.1875 µg/µL'nin ~%30 (***P<0.001) ve.047 µg/µL'nin ise, istatistiksel açıdan anlamlı ~%10 proliferatif etkiye sahip olduğu gözlenlendi (*P<0.05).

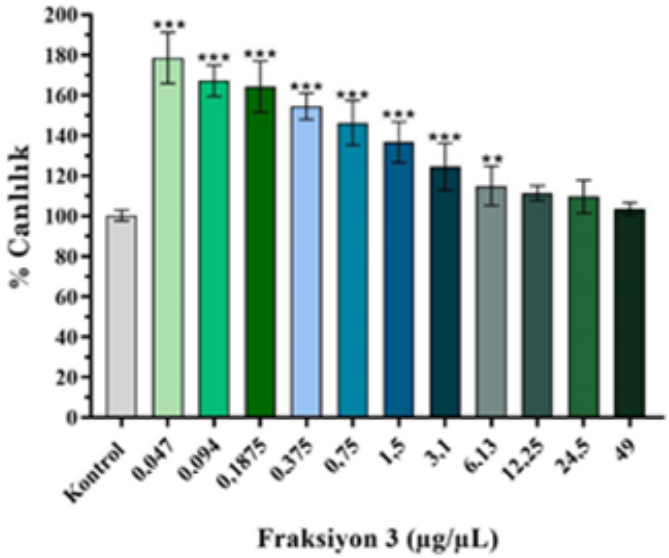
Şekil 4.11'de verilen dağılım grafiğinde görüldüğü gibi 2. fraksiyona ait IC_{50} değeri uygulanan konsantrasyonun az olması sebebiyle belirlenemedi, ancak hücrelerin %35'ini öldüren dozun 48 µg/µL olduğu belirlendi.



Şekil 4.11: Farklı konsantrasyonlardaki 2. fraksiyonun sitotoksik etkisi (R^2=0.8361).

4.5.4. HPLC'den Toplanan Üçüncü Fraksiyonun Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

HPLC kromatogramına göre, sistemde alıkonma süresi 9-14 dakika olan ve ağırlıkça başlangıç konsantrasyonu 49 µg/µL konsantrasyonundaki 3. fraksiyon ile farklı sulandırımlarının (24.5, 12.25, 6.13, 3.1, 1.5, 0.75, 0.375, 0.1875, 0.094, 0.047 µg/µL) ECV304 hücre canlılığı üzerindeki etkileri Şekil 4.12'de verilen karşılaştırmalı grafikteki gibidir.



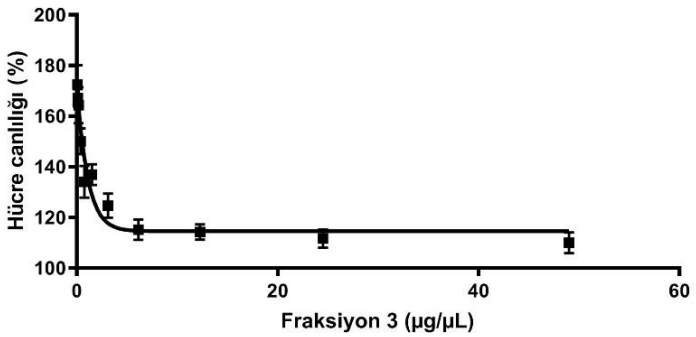
Şekil 4.12: ECV304 hücreleri üzerine 48 saat süreyle ağırlıkça farklı konsantrasyonlarda uygulanmış 3. fraksiyonun %canlılık üzerine etkilerinin karşılaştırılması (**P<0.01, ***P<0.001, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir).

En yüksek uygulama konsantrasyonu olan 49 µg/µL ve takip eden sulandırımlarının (24.5 ve 12.25 µg/µL), hücreleri üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı herhangi bir etkisinin olmadığı belirlendi (P>0.05).

Üçüncü fraksiyona ait 6,13 µg/µL'lik konsantrasyonunun istatistiksel açıdan anlamlı ~%20 proliferatif etki gösterdiği gözlendi (**P<0.01).

Uygulanan diğer konsantrasyonların (3.1 µg/µL için ~%30, 1.5 µg/µL için ~%40, 0.75 µg/µL için ~%50, 0.375 µg/µL için ~%60, 0.1875 ve 0.094 µg/µL için ~%70 ve 0.047 µg/µL için ~%80) istatistiksel olarak anlamlı proliferatif etkiye sahip olduğu gözlendi (***P<0.001).

Şekil 4.13'te verilen dağılım grafiğinde görüldüğü gibi 3. fraksiyona ait IC_{50} değeri uygulanan konsantrasyonun proliferatif etkisi sebebiyle belirlenemedi.

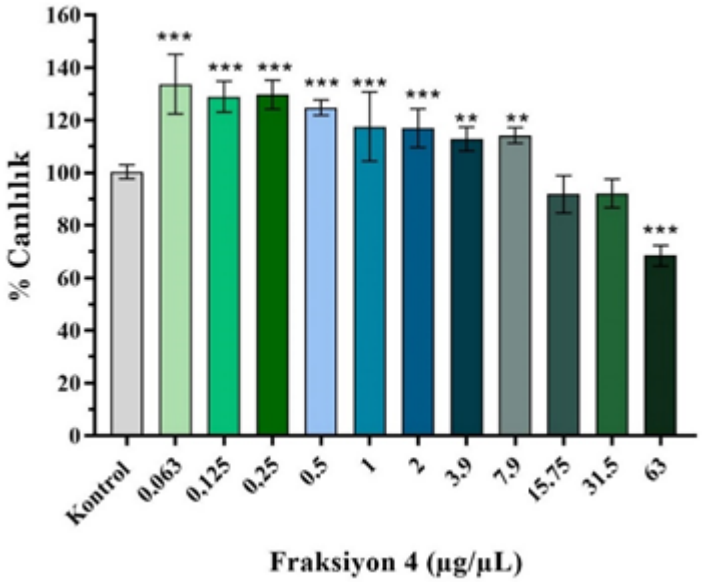


Şekil 4.13: Farklı konsantrasyonlardaki 3. fraksiyonun sitotoksik etkisi (R^2=0.7581).

4.5.5. HPLC'den Toplanan Dördüncü Fraksiyonun Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

HPLC kromatogramına göre sistemde alıkonma süresi 14-16 dakika olan ve ağırlıkça konsantrasyonu 63 µg/µL olan dördüncü fraksiyon ile farklı sulandırımlarının (31.5, 15.75, 7.9, 3.9, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 ve 0.063 µg/µL) ECV304 hücre canlılığı üzerindeki etkileri Şekil 4.14'de verilen karşılaştırmalı grafikteki gibidir.

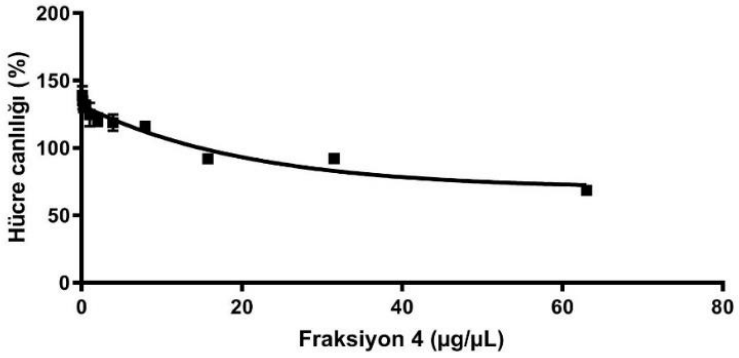
En yüksek uygulama konsantrasyonu olan 63 µg/µL'nin ECV304 hücreleri üzerinde anlamlı %28 sitotoksik etki gösterdiği (**P<0.01), uygulanan 31.5 µg/µL ve 15.75 µg/µL'lik konsantrasyonların ise hücre canlılığı üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı herhangi bir etkisinin olmadığı belirlendi (P>0.05).



Şekil 4.14: ECV304 hücreleri üzerine 48 saat süreyle ağırlıkça farklı konsantrasyonlarda uygulanmış 4. fraksiyonun %canlılık üzerine etkilerinin karşılaştırılması (**P<0.01, ***P<0.001, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir).

Uygulanan konsantrasyonlardan 7.9, 3.9, 2 ve 1 µg/µL'nin, istatistiksel açıdan anlamlı ~%20 proliferatif etkisiye sahip olduğu gözlendi (Sırasıyla; **P<0.01, **P<0.01, ***P<0.001, ***P<0.001). Diğer konsantrasyonların ise (0.5, 0.025, 0.125 ve 0.063 µg/µL) istatistiksel açıdan anlamlı ~%30 proliferatif etkiye sahip olduğu belirlendi (***P<0.001) (Şekil 4.14).

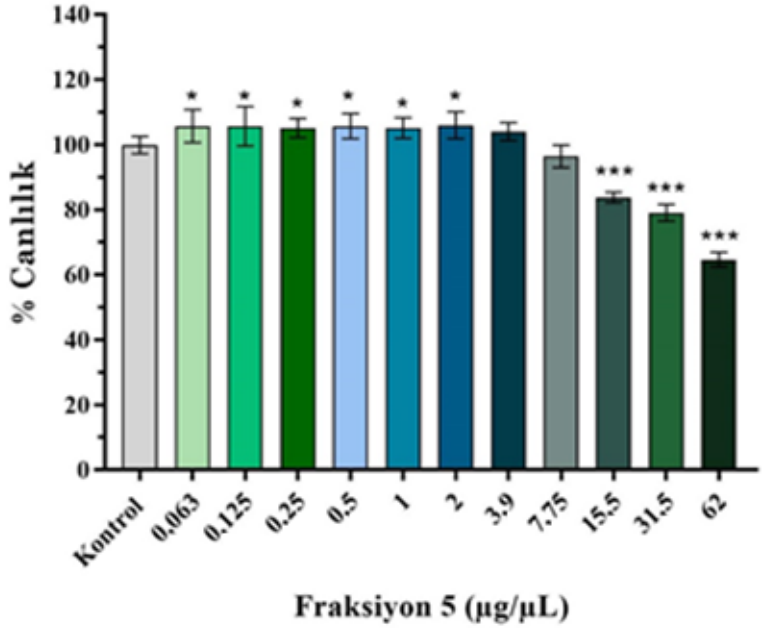
Şekil 4.15'de verilen dağılım grafiğinde görüldüğü gibi 4. fraksiyona ait IC_{50} değeri uygulanan konsantrasyonun az olması sebebiyle belirlenemedi, ancak hücrelerin %28'ini öldüren dozun 63 µg/µL olduğu belirlendi.



Şekil 4.15: Farklı konsantrasyonlardaki 4. fraksiyonun sitotoksik etkisi (R^2=0.7472).

4.5.6. HPLC'den Toplanan Beşinci Fraksiyonun Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

HPLC kromatogramına göre sistemde alıkonma süresi 16-18.5 dakika olan ve ağırlıkça konsantrasyonu 62 µg/µL olan beşinci fraksiyon ile farklı sulandırımlarının (31.5, 15.5, 7.75, 3.9, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 ve 0.063 µg/µL) ECV304 hücre canlılığı üzerindeki etkileri Şekil 4.16'te verilen karşılaştırmalı grafikteki gibidir.



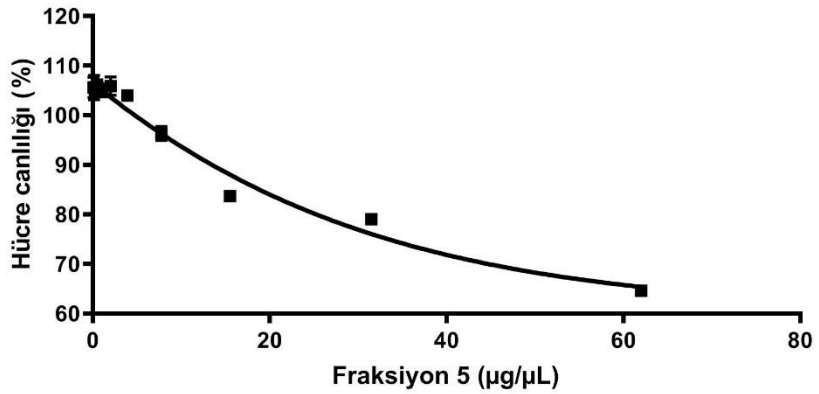
Şekil 4.16: ECV304 hücreleri üzerine 48 saat süreyle ağırlıkça farklı konsantrasyonlarda uygulanmış 5. fraksiyonun %canlılık üzerine etkilerinin karşılaştırılması (*P<0.05, ***P<0.001, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir).

En yüksek uygulama konsantrasyonu olan 62 µg/µL'nin ECV304 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi %35 olarak belirlendi. Sadece 2 sulandırım (31.5 ve 15.55 µg/µL) için sitotoksik aktivitenin istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı (~%20) gözlendi (***P<0.001).

Uygulanan konsantrasyonlardan 2, 1, 0.5, 0.025, 0.125 ve 0.063 µg/µL'nin istatistiksel açıdan anlamlı ~%5 proliferatif etkiye sahip olduğu gözlendi (*P<0.05).

Diğer konsantrasyonların (7.75 vee 3.9 µg/µL) ECV304 hücre canlılığı üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı herhangi bir etkisinin olmadığı belirlendi (P>0.05).

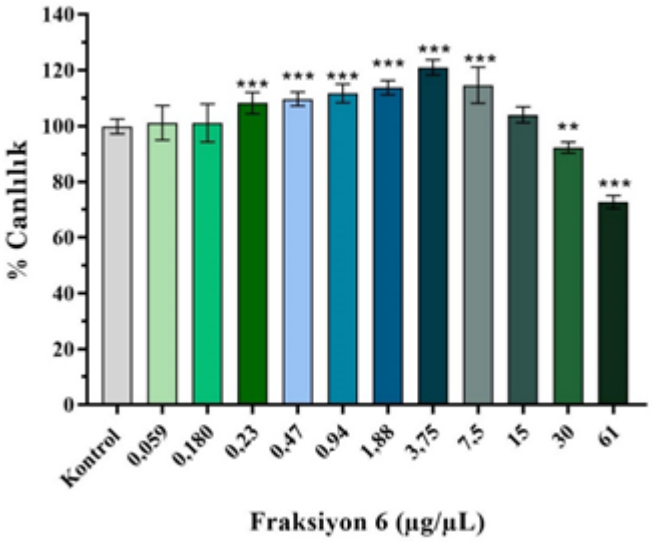
Şekil 4.17'de verilen dağılım grafiğinde görüldüğü gibi 5. fraksiyona ait IC_{50} değeri uygulanan konsantrasyonun az olması sebebiyle belirlenemedi, ancak hücrelerin %35'ini öldüren dozun 62 µg/µL olduğu belirlendi.



Şekil 4.17: Farklı konsantrasyonlardaki 5. fraksiyonun sitotoksik etkisi (R^2=0.9236).

4.5.7. HPLC'den Toplanan Altıncı Fraksiyonun Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

HPLC kromatogramına göre sistemde alıkonma süresi 18.5-23 dakika olan ve ağırlıkça konsantrasyonu 61 µg/µL olan altıncı fraksiyon ile farklı sulandırımlarının (30, 15, 7.5, 3.75, 1.88, 0.94, 0.47, 0.180 ve 0.059 µg/µL) ECV304 hücre canlılığı üzerindeki etkileri Şekil 4.18'de verilen karşılaştırmalı grafikteki gibidir.



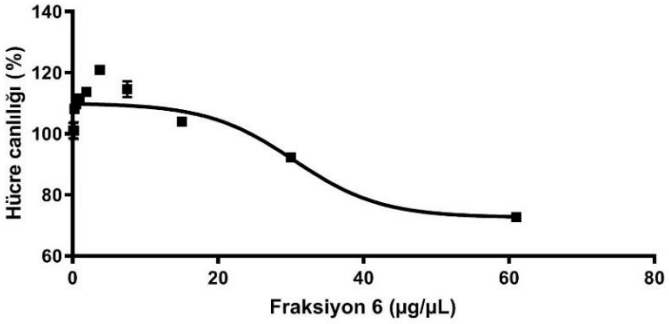
Şekil 4.18: ECV304 hücreleri üzerine 48 saat süreyle ağırlıkça farklı konsantrasyonlarda uygulanmış 6. fraksiyonun %canlılık üzerine etkilerinin karşılaştırılması (**P<0.01, ***P<0.001, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir).

Altıncı fraksiyona ait en yüksek uygulama konsantrasyonunun (61 µg/µL) ECV304 hücreleri üzerinde %28 sitotoksik etki gösterdiği belirlendi (***P<0.001). Uygulanan 30 µg/µL'nin istatistiksel açıdan anlamlı ~%10 sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlendi (**P<0.01).

ECV304 hücrelerinde 7.5, 1.88, 0.94, 0.47 ve 0.23 µg/µL'lik konsantrasyonların ~%10, 3.75 µg/µL konsantrasyonun ise ~%20 proliferatif etkiye sahip olduğu gözlendi (***P<0.001).

Uygulanan diğer konsantrasyonların (15, 0.180 ve 0.059 µg/µL) ECV304 hücreleri üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı herhangi bir etkisinin olmadığı belirlendi (P>0.05).

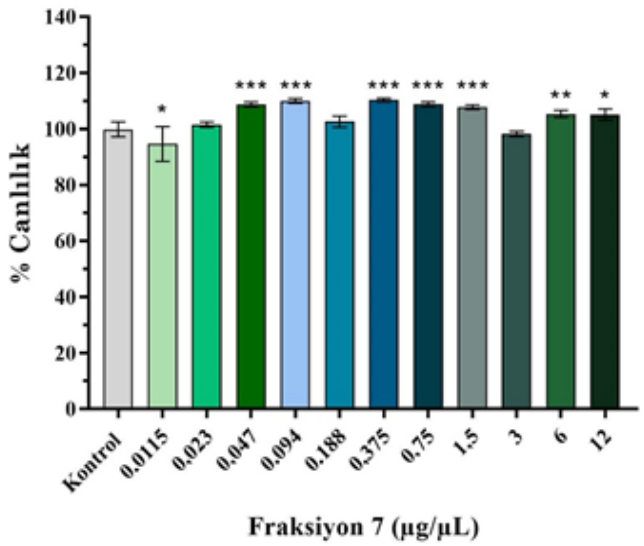
Şekil 4.19'da verilen dağılım grafiğinde görüldüğü gibi 6. fraksiyona ait IC_{50} değeri uygulanan konsantrasyonun az olması sebebiyle belirlenemedi, ancak hücrelerin %28'ini öldüren dozun 61 µg/µL olduğu belirlendi.



Şekil 4.19: Farklı konsantrasyonlardaki 6. fraksiyonun sitotoksik etkisi (R^2=0.7342).

4.5.8. HPLC'den Toplanan Yedinci Fraksiyonun Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

HPLC kromatogramına göre sistemde alıkonma süresi 27-33 dakika olan ve ağırlıkça konsantrasyonu 12 µg/µL olarak belirlenen yedinci fraksiyon ile farklı sulandırımlarının (6, 3, 1.5, 0.75, 0.375, 0.188, 0.094, 0.047, 0.023 ve 0.0115 µg/µL) ECV304 hücre canlılığı üzerindeki etkileri Şekil 4.20'de verilen karşılaştırmalı grafikteki gibidir.

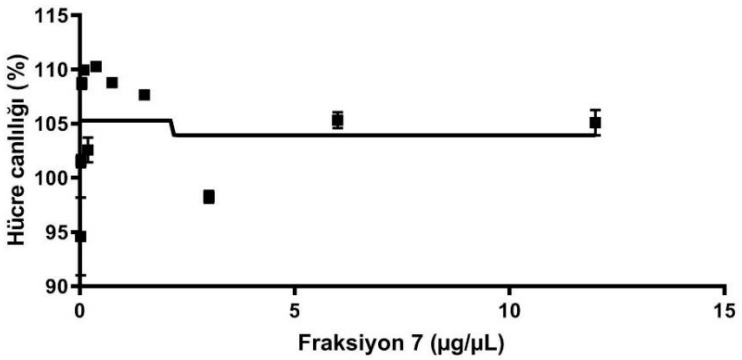


Şekil 4.20: ECV304 hücreleri üzerine 48 saat süreyle ağırlıkça farklı konsantrasyonlarda uygulanmış 7. fraksiyonun %canlılık üzerine etkilerinin karşılaştırılması (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir).

ECV304 hücreleri üzerine uygulanan 12, 6, 1.5, 0.75, 0.375, 0.094 ve 0.047 µg/µL'lik konsantrasyonların istatistiksel açıdan anlamlı ~%10 proliferatif etki gösterdiği belirlendi (***P<0.001).

Yedinci fraksiyonun 0.018 µg/µL'lik konsantrasyonun hücreler üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı ~%5 sitotoksik etkiye sahip olduğu (*P<0.05) ve uygulanan diğer konsantrasyonların (3, 0.115 ve 0.023 µg/µL) hücre canlılığı üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı herhangi bir etkisinin olmadığı gözlendi (P>0.05) (Şekil 4.19).

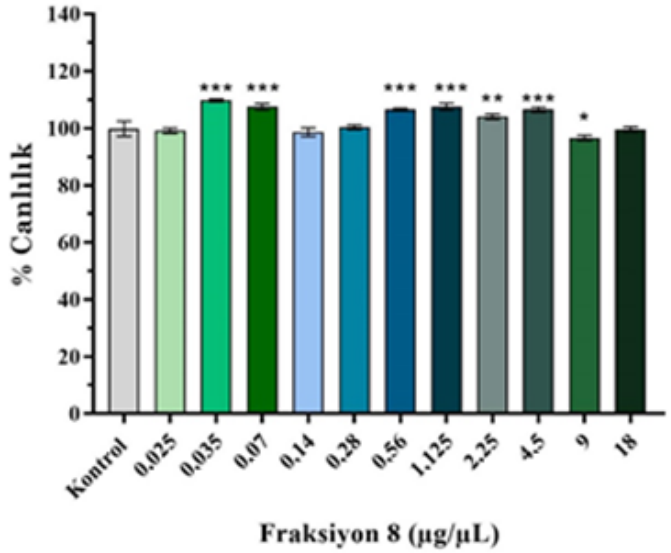
Şekil 4.21'de verilen dağılım grafiğinde görüldüğü gibi 7. fraksiyona ait IC_{50} değeri uygulanan konsantrasyonların proliferatif etkisi sebebiyle belirlenemedi.



Şekil 4.21: Farklı konsantrasyonlardaki 7. fraksiyonun sitotoksik etkisi (R^2=0.03870).

4.5.9. HPLC'den Toplanan Sekizinci Fraksiyonun Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

HPLC kromatogramına göre sistemde alıkonma süresi 23-27 ve 33-50 dakikalar olan ve ağırlıkça konsantrasyonu 18 µg/µL olan sekizinci fraksiyon ile farklı sulandırımlarının (9, 4.5, 2.25, 1.125, 0.56, 0.28, 0.14, 0.07, 0.035 ve 0.025 µg/µL) ECV304 hücre canlılığı üzerindeki etkileri Şekil 4.22'de verilen karşılaştırmalı grafikteki gibidir.

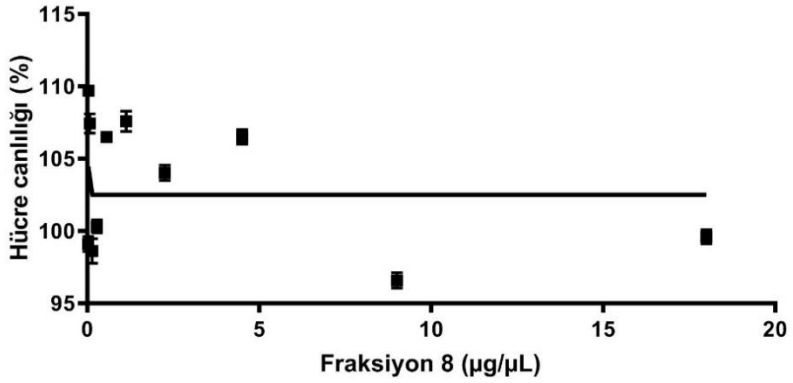


Şekil 4.22: ECV304 hücreleri üzerine 48 saat süreyle ağırlıkça farklı konsantrasyonlarda uygulanmış 8. fraksiyonun %canlılık üzerine etkilerinin karşılaştırılması (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir).

Uygulanan konsantrasyonlardan 9 µg/µL'nin ECV304 hücreleri üzerinde anlamlı ~%5 sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlendi (*P<0.05).

Sekizinci fraksiyona ait 18, 0.28, 0.14 ve 0.025 µg/µL'lik konsantrasyonların hücre canlılığı üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı herhangi bir etkisinin olmadığı gözlendi (P>0.05).

Şekil 4.23'de verilen dağılım grafiğinde görüldüğü gibi 7. fraksiyona ait IC_{50} değeri uygulanan konsantrasyonların proliferatif etkisi sebebiyle belirlenemedi.



Şekil 4.23: Farklı konsantrasyonlardaki 8. fraksiyonun sitotoksik etkisi (R^2=0.07665).

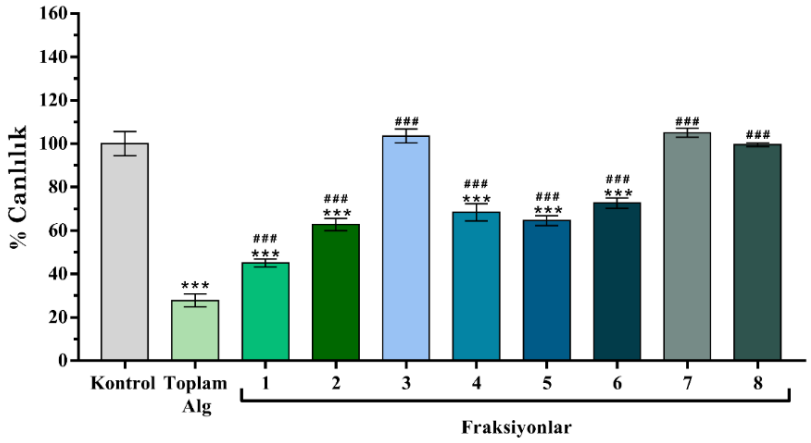
4.5.10. HPLC'den Toplanan Fraksiyonların Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Karşılaştırılması

ECV304 hücreleri üzerine uygulanan total alg ekstresinin ve toplanan tüm fraksiyonların, doğrudan sitotoksik etkileri değerlendirildiğinde (Şekil 4.24), en yüksek sitotoksik etkiyi %70 inhibisyonla total alg ekstresinin gösterdiği ve bu ekstreye ait sitotoksik etkinin tüm fraksiyonlardan istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlendi ($^{###}P<0.001$)

Fraksiyonlar arasında kontrole göre en yüksek toksik etkiye (~%50) sahip fraksiyonun 1. fraksiyon olduğu (***P<0.001), ancak bu fraksiyonun total alg ekstresine göre istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde düşük sitotoksik etki gösterdiği belirlendi ($^{###}P<0.001$).

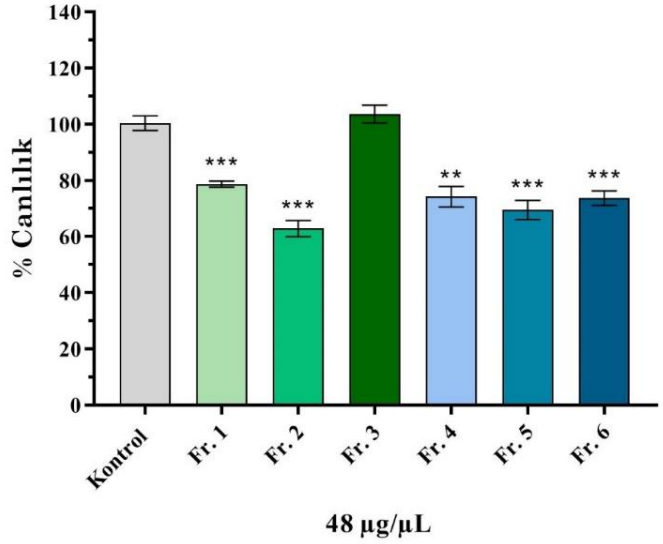
Fraksiyon 2, 4, 5 ve 6'nın ~%30 sitotoksik etkiye sahip olduğu ve bu etkilerin kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu (***P<0.001) belirlendi.

Fraksiyon 3, 7 ve 8 hücre canlılığı üzerindeki etkisi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı herhangi bir fark bulunmadığı (P>0.05) belirlendi, dolayısıyla en azından bu çalışmada 48 saat süreyle uygulanan konsantrasyonlarda (sırasıyla 4.9, 1.2 ve 1.8) non-toksik olduğu gözlendi.



Şekil 4.24: ECV304 hücreleri üzerine 48 saat süreyle uygulanan 48 mg total alg ekstresi ile bu ekstreden elde edilen farklı miktarlardaki (sırasıyla 9.6, 4.8, 4.9, 6.3, 6.2, 6.1, 1.2 ve1.8 mg) 1-8 no.lu fraksiyonların hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması (**P<0.01, ***P<0.001, ###P<0.001, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir).

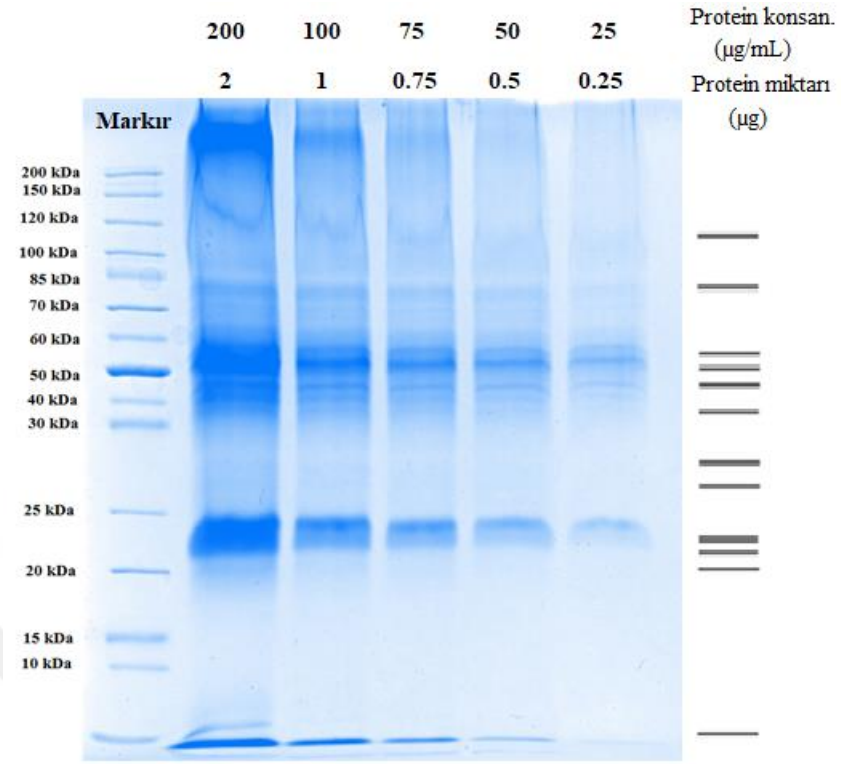
ECV304 hücreleri üzerine aynı konsantrasyonda (48 µg/µL) uygulanan 1-6 no.lu fraksiyonların sitotoksik etkileri değerlendirildiğinde (Şekil 4.25), 3. fraksiyon hariç (P>0.05) tüm fraksiyonların kontrole göre anlamlı sitotoksik aktivite gösterdiği, en aktif fraksiyonun hücre çoğalmasını ~%40 inhibe eden 2. fraksiyon olduğu (***P<0.001), 5. fraksiyonun ~%30 sitotoksik aktiviteye sahip olduğu (***P<0.001), 1, 4 ve 6. fraksiyonların benzer sitotoksik etkiye (~%22) sahip olduğu (sırasıyla; ***P<0.001, **P<0.01 ve ***P<0.001) belirlendi.



Şekil 4.25: ECV304 hücreleri üzerine 48 saat süreyle aynı konsantrasyonda (48 µg/µL) uygulanan 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 numaralı fraksiyonların hücre canlılığı üzerine etkilerinin karşılaştırılması (**P<0.01 ve ***P<0.001, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir.

4.6. ALG EKSTRESİ VE HPLC İLE TOPLANAN FRAKSİYONLARIN SODYUM DODESİL SÜLFAT POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ

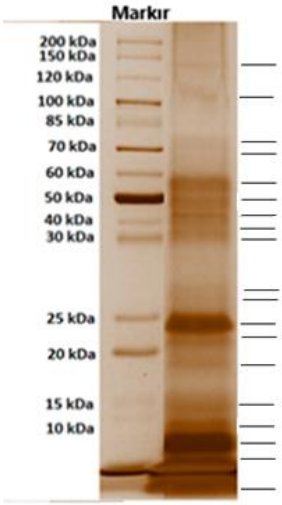
Protein konsantrasyonu belirlenmiş total alg ekstresinden PBS ile hazırlanan 2, 1, 0.75, 0.5 ve 0.25 µg protein içeren alg ekstrelerinden 10 µL alındı ve 10 µL örnek yükleme tamponu ile karıştırıldı. Karışımın tamamı 1D-SDS-PAGE jeline yüklendi ve proteinlerin ayrıştırılma işlemi tamamlandıktan sonra jel üzerindeki proteinler Coomassie boyama yöntemleri ile görünür hale getirildi (Şekil 4.26).



Şekil 4.26: Total alg ekstresindeki proteinlerin Coomassie boyama yöntemi ile boyanmış SDS-PAGE jelindeki görüntüsü.

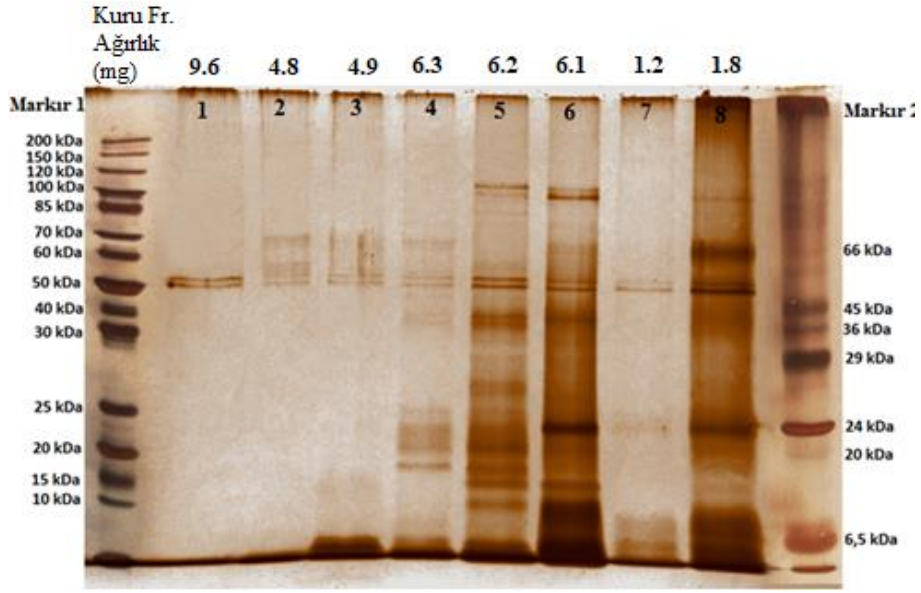
Ön elektroforez çalışmaları sonunda, hızlı gümüş boyama yöntemi ile boyanacak jellere 0.3 µg protein yüklemek için protein konsantrasyonu 30 µg/mL olan alg ekstresinin kullanılmasının uygun olduğuna karar verildi ve bu jele ait örnek görüntü Şekil 4.27'da verildi.

Coomassie ile boyanan jelde total alg ekstresine ait bant sayısının 12 (105, 85, 60, 55, 50, 40, 28, 26, 24, 23, 22 ve 10 kDa'dan küçük 1 bant), hızlı gümüş boyama uygulanan jelde ise total alg ekstresine ait bant sayısının 19 (140, 105, 75, 70, 60, 50, 43, 35, 30, 28, 26, 24, 22, 18, 15, 10 ve 10 kDa'dan küçük 3 bant) olduğu belirlendi.



Şekil 4.27: 0.3 µg protein içeren total alg ekstresi uygulanmış ve hızlı gümüş boyama yöntemi ile boyanmış örnek jel görüntüsü.

Liyofilize haldeki 8 fraksiyon (kuru ağırlıkları sırasıyla 9.6, 4.8, 4.9, 6.3, 6.2, 6.1, 1.2 ve 1.8 mg) 100'er µL PBS'de çözündürüldü. Elde edilen solüsyonlardan 10'ar µL alındı ve eşit hacimde örnek uygulama tamponu ile karıştırılarak karışımın tamamı 1D-SDS-PAGE jeline uygulandı. Elde edilen jel hızlı gümüş boyama yöntemi ile boyanarak görüntülendi (Şekil 4.28).



Şekil 4.28: Hızlı gümüş boyama yöntemi ile boyanmış fraksiyonlara (1-8) ait jel görüntüsü.

Birinci fraksiyonda, ~50 kDa ve 52 kDa civarında 2 bant gözlendi. Bu 2 bantın tüm fraksiyonlarda ortak olarak bulunduğu tespit edildi. İkinci fraksiyonda, 50-60 kDa arasında

olmak üzere, 4 bant tespit edildi. Ek olarak, 70 kDa moleküler ağırlığa sahip beşinci bant gözlendi. Üçüncü fraksiyona ait bant profilinin ikinci fraksiyona ait bant profili ile aynı olduğu ancak ek olarak, 6.5 kDa moleküler ağırlıkta bir bantın daha varlığı tespit edildi. Dördüncü fraksiyonda, 70 kDa boyutunda bir bant, 52 kDa, 50 kDa, 30-40 kDa arası 2 bant, 15-25 kDa arası 4 bant, ~8 kDa civarı 1 bant ve 6.5 kDa arası 1 bant gözlendi. Beşinci fraksiyonda, 110 kDa, 100 kDa, 85 kDa, 80 kDa, 55 kDa, 52 kDa, 50 kDa, 40 kDa, 30 kDa boyutlarında birer bant, 25-30 kDa arası 6 bant, 20-25 kDa arası 3 bant, 16 kDa, 15 kDa, 10 kDa boyutlarında birer bant ve 6.5 kDa'dan küçük 1 bant gözlendi. Altında fraksiyonda, 110 kDa, 100 kDa, 85 kDa, 80 kDa, 70 kDa, 65 kDa, 52 kDa, 50 kDa, 45 kDa boyutlarında birer bant, 40 kDa, 25-30 kDa arasında 2 bant, 20-25 kDa arası 3 bant, 18 kDa, 15 kDa boyutlarında birer bant ve 10 kDa'dan daha küçük moleküler ağırlığa sahip 4 bant gözlendi. Yedinci fraksiyonda, tüm fraksiyonlarda ortak olan 50 kDa ve 52 kDa boyutunda 2 bant dışında, 25 kDa boyutunda 1 bant, ~8 kDa boyutunda 1 bant ve 6.5 kDa boyutunda 1 bant olmak üzere, toplam 5 bant gözlendi. Sekizinci fraksiyona ait bant profilinde, yedinci fraksiyonda bulunan bantlara ek olarak, 100 kDa, 70 kDa ve 15 kDa olmak üzere 3 bant ve moleküler ağırlığı 6.5 kDa'dan küçük 1 bant gözlendi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde hızla artan dünya nüfusuna bağlı olarak, tatlı su kaynaklarının önemi de giderek artmaktadır. Dünya çapında bütün içilebilir tatlı su habitatlarında yaşayabilen siyanobakteriler, aşırı çoğaldıklarında kontaminasyona sebep olmakta ve bu nedenle su kalitesi için biyobelirteç olarak kullanılmaktadır.

Dünyanın farklı bölgelerindeki su kaynaklarında rapor edilen *M. aeruginosa* kontaminasyonu, bu sular ile temas eden başta insanlar olmak üzere, o bölgede yaşayan bütün canlılar için hayati tehdit oluşturmaktadır. Ülkemiz ve tüm dünya için tehlike arz eden *M. aeruginosa'*nın coğrafi dağılımı, toksinleri ve genomu ile ilgili çalışmaları rapor eden derlemeler (Pearson ve diğ., 2010; Harke ve diğ., 2016), konunun ciddiyetini gözler önüne sermekte ve *M. aeruginosa* ile ilgili toksisite çalışmalarının önemine dikkat çekmektedir.

Halk sağlığı ve ekolojik sistem için tehdit olan *M. aeruginosa*'nın toksisitesine ilişkin çalışmalarda çoğunlukla total alg ekstresindeki majör toksinin (MC-LR veya MC-RR mikrosistin formlarının) referans alındığı görülmektedir (Chong ve diğ., 2000; Dias ve diğ., 2009; Alverca ve diğ., 2009; Piyathilaka, ve diğ., 2015; Ramos ve diğ., 2015; Herrera ve diğ., 2018; Gutiérrez-Praena ve diğ., 2019). Bu konuda daha önce yayımlanmış kaynaklar incelendiğinde, *M. aeruginosa*'nın sitotoksisitesine dair pek çok çalışmaya rastlanmasına rağmen, bu siyanobakterinin toksik peptidleriyle yapılan kromatografik ve elektroforetik çalışmaların sınırlı kaldığı görülmektedir.

M. aeruginosa ekstresinin, böbrek hücre hattı (Vero-E6) üzerine sitotoksik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada (Dias ve diğ., 2009), MC-LR içeriği 175 µM olan alg ekstresinin hücre canlılığını %80 oranında ve 1.4 µM MC-LR içeren ekstrenin ise %30 oranında inhibe ettiği, dolayısıyla nefrotoksik olduğu bildirilmiştir.

MC-LR varlığı HPLC-DAD ile tespit edilen *M. aeruginosa* ekstresinden hazırlanan ve 40 µM MC-LR içeren alg ekstresinin Vero-E6 hücreleri üzerine 24, 48 ve 72 saat uygulanmasının ardından sitotoksik etkisinin MTT testiyle belirlendiği bir çalışmada (Alverca ve diğ., 2009), hücre canlılığının sırasıyla %40, %60 ve %65 oranında azaldığı belirlenmiştir.

Kolombiya'da bulunan Porce II ve Riogrande I adlı su depolarından alınan su örneklerindeki *M. aeruginosa* kaynaklı MC-LR'nin kalitatif ve kantitatif tespiti için HPLC-MS'in kullanıldığı

bir çalışmada (Herrera ve diğ., 2018), HepG2 hücre hattı 50, 125 ve 500 µg/mL MC-LR içeren alg ekstreleri ile 24 ve 48 saat inkübe edilmiştir. Yirmidört saatlik inkübasyonun ardından, 50 µg/mL MC-LR içeren ekstrenin HepG2 hücre hattında DNA hasarına neden olmadığı, 125 µg/mL'nin düşük ve 500 µg/mL'nin ise en yüksek DNA hasarına neden olduğu, ancak inkübasyon süresi 48 saat olduğunda 3 uygulama konsantrasyonunda da yüksek DNA hasarının meydana geldiği rapor edilmiştir.

M. aeruginosa ekstresinin ağırlıkça farklı konsantrasyonlarının (1, 5, 10, 50 ve 500 µg/mL) ECV304 hücrelerine 48 saat süreyle uygulandığı bir çalışmada (Atasever-Arslan ve diğ., 2016), 10, 50 ve 500 µg/mL'lik konsantrasyonların hücre çoğalmasını sırasıyla %8, %10 ve %12 oranında inhibe ettiği, 1 ve 5 µg/mL'lik konsantrasyonların ise, hücre canlılığı üzerine etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir. Bu tezde uygulanan konsantrasyonlardan biri olan 500 µg/mL'nin ortaya koyduğu sitotoksik aktivite (%9), Atasever-Arslan ve diğ. (2016) tarafından bildirilen değere (%12) yakın çıkmıştır.

Bu tez *Microcystis aeruginosa* alg ekstresi ile bu ekstreden HPLC ile kromatografik olarak ayrılan fraksiyonların ECV304 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini rapor eden ilk çalışmadır.

Bu çalışmanın ilk aşamasında total alg ekstresini fraksiyonlarına ayırmak için C-18 kolonda ters-faz HPLC yöntemi optimize edilmiş ve kromatogramdaki pikler göz önüne alınarak 8 farklı fraksiyon toplanmıştır. Tez kapsamında yapılan ön HPLC çalışmasında Lawton ve diğ. (1994) tarafından yayımlanan makale referans alınmış ve enjeksiyon hacmi olarak 25 µL kullanılmıştır. Ancak daha sonra mobil faz içerikleri, gradient koşulları ve enjeksiyon hacmi (50 µL) değiştirilerek geliştirilen özgün HPLC yöntemi kullanılmıştır. Enjeksiyon hacminin 50 µL olarak değiştirilmesi kromatogramda daha keskin pikler elde edilmesini sağlamıştır.

*M. aeruginosa'*nın toksik polipeptidlerinin hidrofobisitelerine göre başarılı bir şekilde kromatografik ayrımını sağlayan ve bu tez kapsamında da kullanılan C-18 kolonu ve Ters-Faz HPLC yöntemi araştırmacılar tarafından sıklıkla tercih edilmektedir.

Mobil faz olarak, bizim çalışmamız ile aynı kimyasalların (asetonitril ve TFA) kullanıldığı bir çalışmada (Campo ve Ouahid, 2010), *M. aeruginosa* ekstresine ait HPLC kromatogramı incelendiğinde, 39-50 dakika arasında MC-YL, MC-YM ve MC-XZ'nin bulunduğu ve tanımlaması yapılan bileşenlere ek olarak çok sayıda küçük piklerin de olduğu belirlenmiştir.

Benzer piklerin bizim elde ettiğimiz kromatogramda da bulunuyor olması, 33-50 dakika arasında ayrımı sağlanan sekizinci fraksiyonda bu bileşenlerin (MC-YL, MC-YM ve MC-XZ) olduğunu düşündürmektedir. Sitotoksisite bulgulamız, ilgili makalede 14. dakikada sistem tarafından okunan ve tanımlaması yapılan MC-LR'nin, bu tezdeki 14-16 dakika aralığını içeren 4. fraksiyonda veya 16-18.5 dakika aralığını içeren 5. fraksiyonda veya 18.5-23 dakika aralığını içeren 6. fraksiyonda olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda 9-14 dakika aralığını içeren ve kromatogramda belirgin bir pik gözlemeyen 3. fraksiyon toksik etki de göstermediğinden, bu fraksiyonda herhangi bir toksik bileşen bulunmadığı anlaşılmaktadır. Campo ve Ouahid (2010)'in çalışmasındaki veriler daha öndeki fraksiyonları yorumlayabilecek bir bilgi içermemektedir. Bununla birlikte, mikrosistinin en yaygın formlarını (MC-RR, MC-YR ve MC-LR) RP-HPLC ile analiz eden birçok çalışma, kolonu ilk terkeden bileşenin, hidrofilik özelliği diğerlerine göre daha yüksek olan MC-RR olduğunu, ardından MC-YR ve en son MC-LR'nin kolondan ayrıldığını bildirmektedir (Rinegart ve diğ., 1988; Ikawa ve diğ., 1998; Robillot ve diğ., 2000; Aguete ve diğ., 2003). *M. aeruginosa* ekstresinin RP-HPLC ile analizinin MC-RR, MC-YR ve MC-LR'nin standart çözeltileri kullanılarak yapıldığı bir çalışmada (Rinegart ve diğ., 1988), kolondan sırasıyla MC-RR (8. dak), MC-YR (11. dak) ve MC-LR (15. dak)'nin kromatogramda keskin pikler göstererek ayrıldığı gözlenmiştir. Bu piklere ek olarak, keskin olmayan, kısa ve çok sayıda başka piklerin de olduğu görülmüştür. *M. aeruginosa* ekstresinin 20 dakikalık HPLC-DAD metodu ile analizi sonucu elde edilen HPLC kromatogramı incelendiğinde (Paiva ve diğ., 2017), MC-RR'nin kolondan ilk ayrılan (9. dak) bileşen olduğu, son çıkan (16. dak) bileşenin ise MC-LR ve bu pike çok yakın (15 ve 16. dakikalar) elde edilen piklerin mikrojinin olduğu rapor edilmiştir. LC-MS ile tanımlaması yapılan bu piklere ek olarak, kromatogram boyunca, 6. dakikadan 19. dakikaya kadar çok sayıda kısa pikler de elde edilmiş, ancak bunların tanımlanması yapılmamıştır.

*M. aeruginosa'*nın HPLC ile analiz edildiği birçok çalışmanın referans olarak verdiği 1994 yılında Lawton ve diğ. tarafından yayımlanmış makalede, başlangıç konsantrasyonu verilmeyen mikrosistinin 9 varyantı ve nodülarine ait standart çözeltiler ve C18 kolonu ile fotodiod (PDA) detektörüne sahip Ters-Faz HPLC kullanılmıştır. HPLC kromatogramına göre, MC-RR'nin, yaklaşık 12.5 ve 15. dakikalarda iki pik, nodülarin'in 17. dakikada bir pik, MC-YR, MC-LR ve MC-FR'nin 20 ve 24. dakikalar arasında birbirine çok yakın pikler, MC-LA ve MC-LY'nin 28 ve 30. dakikalar arasında birbirine yakın iki pik ve MC-LW ve MC-LF'nin 34. dakikada birbirine yakın 2 pik verdiği rapor edilmiştir. Aynı yöntemle *M. aeruginosa* ekstresi

analiz edilmiş ve sadece MC-LR, MC-LY, MC-LW ve MC-LF'nin keskin pikler verdiği, diğer 5 mikrosistin varyantının net pikler vermediği belirlenmiştir. Kolon ve çözücü sistemleri bizim çalışmamızla uyumlu olan referanslarda (Lawton ve diğ., 1994; Robillot ve diğ., 2000; Aguete ve diğ., 2003) sunulan kromatografik bilgiler, bizim çalışmamızda MC-RR'nin 2. fraksiyonda, MC-YR'nin ise 3. fraksiyonda yer alabileceğini düşündürmüştür. Ancak saf standartlarla doğrulama yapılmadan böyle bir öngörüde bulunulması mümkün değildir. Bu fraksiyonlarla yapılan sitotoksisite çalışmaları, en yüksek toksisitenin (%56) 1. fraksiyonda bulunduğunu, 2. fraksiyonun ise %35 sitotoksik aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu da mikrosistinlerin de (MC-RR ve MC-YR) içinde bulunduğu toksik bileşenlerin bu fraksiyonlarda yoğunlaştığını düşündürmektedir.

Bu tez kapsamında elde edilen HPLC kromatogramı incelendiğinde, çok sayıda küçük piklerin olduğu ve bu piklerin sadece peptid ve/veya proteinlerden kaynaklı olmadığı öngörülmektedir. Bu sebeple, gelecek çalışmalarda *M. aeruginosa*'daki toksik peptidlerin daha iyi tanımlanabilmesi için, total alg ekstresi yerine bu ekstreden çöktürülerek ayrılan total proteinlerin referans mikrosistinlerle birlikte incelenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Çalışmanın ikinci aşamasında total alg ekstresi ve fraksiyonların sitotoksik aktivitesi ECV304 hücre hattında test edilmiştir. Her bir döngüde 3.7 mg total ekstre olmak üzere 13 döngüde uygulanan toplam 48.1 mg ekstreden elde edilen 1-8 no.lu fraksiyonların ağırlıklarının sırasıyla 9.6, 4.8, 4.9, 6.3, 6.2, 6.1, 1.2 ve 1.8 mg olduğu belirlenmiştir. Bu değerler ilgili fraksiyonlardaki bileşenlerin total ekstredeki oranlarına bağlı olduğundan, fraksiyonların başlangıç konsantrasyonları olarak seçilmiş ve bu miktarlardan başlamak üzere hazırlanan seri sulandırımların toksisiteleri değerlendirilmiştir (Şekil 4.24). Bu analizlerde en toksik fraksiyonun, hücre çoğalmasını %56 oranında inhibe eden 1. fraksiyon olduğu gözlenmiştir. 9-14 dakika aralığında toplanan 3. fraksiyon hücreler üzerinde herhangi bir toksik etki göstermemiştir. Fraksiyonların sitotoksisite sıralaması Fr.1 (%56) > Fr.2 ve Fr.5 (%35) > Fr.4 ve Fr.6 (%28) şeklindedir. Bu fraksiyonları ortaya koyan total ekstrenin ise hücre çoğalmasını %70 oranında inhibe ettiği belirlenmiştir. Bu da toksik bileşenlerin sinerjistik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Genelde sağlıklı hücreler üzerindeki toksik etkileri nedeniyle "zararlı" olarak öne çıkan siklik peptidlerin "yararlı" biyoaktivitelere (antikanser, antibakteriyel, immün baskılayıcı vb.) de sahip oldukları ve terapötik ajan olarak değerlendirilebilecekleri ileri sürülmektedir (Joo, 2012;

Adamovsky ve diğ., 2015; Kounnis ve diğ., 2015; Ramos ve diğ., 2015). Kolon kromatografisi ile ayrımı sağlanan *M. aeruginosa* ekstresine ait 1-6 no.lu fraksiyonların bu potansiyelini değerlendirmek için, ağırlıkça konsantrasyonları eşitlenerek (48 µg/µL) ECV304 hücreleri üzerindeki sitotoksisiteleri de incelenmiştir. Bu analizde 7 ve 8. fraksiyonlar, ekstredeki oranları, dolayısıyla elde edilen miktarları çok düşük olduğundan saf dışı bırakılmıştır. Bulgular incelendiğinde (Şekil 4.25), 2. fraksiyonun %35, 5. fraksiyonun %30, 1, 4 ve 6. fraksiyonların %22 oranında hücre ölümüne yol açtığı, buna karşılık 3. fraksiyonun ise, hücrelerin çoğalması üzerine istatistiksel açıdan anlamlı bir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. Buna göre hücreler üzerine eşit konsantrasyonda uygulanan fraksiyonların sitotoksisite sıralaması Fr.2 (%35) > Fr.5 (%30) > Fr.1, Fr.4 ve Fr.6 (%22) şeklindedir. İlk yaklaşımda sitotosik aktivitesi %56 bulunan 1 numaralı fraksiyonun aktivitesinin bu yaklaşımla %22'ye düşmesinin nedeni uygulanan konsantrasyonun yarıya düşürülmüş olmasıdır. Bu ve diğer fraksiyonlar için elde edilen bulgular doza-bağlı sitotoksik aktiviteyi doğrulamaktadır.

Sitotoksik analizlerde gözlenen ilginç bir durum da bazı fraksiyonların (2, 3, 4, 6, 7 ve 8 no.lu fraksiyonlar), belli konsantrasyonlarda iken proliferatif etki göstermeleridir. Aynı fraksiyona ait farklı uygulama konsantrasyonlarının hücre çoğalması üzerine indükleyici ya da inhibe edici etki göstermesi literatürde hormetik doz cevabı ("hormetic dose response") olarak tanımlanmaktadır (Hayes, 2007; Bao ve diğ., 2014; Wang ve diğ., 2018). Hormetik doz cevabı, kimyasal maddelerin hücre/canlı bünyesine farklı miktarda alınması sonucu canlıda farklı etki göstermesi şeklinde ifade edilmektedir. İzotiosiyat molekülünün, mesane kanseri (T24), hepatoma (HepG2), kolon kanseri (Caco-2), hepatosit (HHL-5), kolon epiteli (CCD841) ve deri fibroblast (CCD-1092SK) hücre hatları üzerine farklı konsantrasyonların uygulandığı bir çalışmada (Bao ve diğ., 2014), hücre çoğalması üzerinde yüksek konsantrasyonların inhibe edici, düşük konsantrasyonların ise aktive edici etki gösterdiği rapor edilmiştir. Aynı molekülün farklı uygulama konsantrasyonlarının hücrede farklı cevaplara neden olduğu başka çalışmalarla da desteklenmektedir (Hayes, 2007; Wang ve diğ., 2018).

Çalışmanın son aşamasında total alg ekstresi ve HPLC fraksiyonlarının elektroforetik analizi gerçekleştirilmiştir. Kuru ağırlığı 48 µg olan total alg ekstresinin protein konsantrasyonu 13.06 mg/mL olarak belirlenmiş, ancak fraksiyonların içerdiği peptid ve protein miktarlarının muhtemelen az olması sebebiyle, fraksiyonlara ait protein konsantrasyonları belirlenememiştir.

Bu sebeple, fraksiyonların elektroforetik analizleri kuru ağırlıkları (Tablo 4.1) baz alınarak yapılmıştır. Elde edilen SDS-PAGE görüntüsü Şekil 4.28'de verilmiştir.

Daha önce rapor edilen bir çalışmada, *M. aeruginosa'*nın büyük molekül ağırlıklı proteinlerinin elektroforetik analizi yapılmış ve 210±30, 270±50, 310±50, 440±80 ve 500±100 kDa molekül ağırlığına sahip proteinlerin varlığı %5'lik SDS-PAGE ile gösterilmiştir (Tillet ve diğ., 2000). Çalışmamızda kullandığımız %10'luk SDS-PAGE verileri incelendiğinde, total alg ekstresinde ve 8. fraksiyonda görünen molekül ağırlığı 200 kDa'dan büyük olan yoğun protein bantının ilgili makalede molekül ağırlığı belirlenmiş olan büyük molekül ağırlıklı proteinleri içerdiği düşünülmektedir. Diğer fraksiyonlarda büyük polipeptidlere ait bant(lar) gözlenmemiştir.

Literatürde siklik peptidlerin 500-2000 Da molekül ağırlığında ve genellikle 5-14 amino asit içerdiği bildirilmektedir (Gang ve diğ., 2018). *M. aeruginosa'*daki toksik peptidlerin ise 800-1000 Da ağırlığında olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya koyulmuştur (Tablo 2.1).

Tek boyutlu SDS-PAGE'yi takiben hızlı gümüş boyama yapılarak elde edilen jel görüntülerinin incelenmesi sonucunda, molekül ağırlıkları yakın (~50 kDa ve 55 kDa) 2 bantın total alg ekstresinde ve tüm fraksiyonlarda ortak olduğu tespit edilmiştir.

Net piklerin gözlemlenemediği 8 no.lu fraksiyona ait bant profili incelendiğinde, farklı molekül ağırlığında ve diğer fraksiyonlarla ortak toplam 11 bantın bulunduğu gözlenmiştir. Jelde gözlenen bu durumun, kullanılan HPLC metodundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu bantlar, bu süre aralığında kolondan geçen asetonitril konsantrasyonunun yüksek olması nedeniyle sürüklenen, diğer fraksiyonlardaki polar moleküllere ait olabilir.

Jeldeki bulgular incelendiğinde, fraksiyonlardaki toksik peptidleri jelde daha belirgin bir şekilde görüntüleyebilmek için siklik veya kısa peptidlere özel 1- ve 2-boyutlu PAGE sistemlerinin daha iyi sonuç verebileceği ve referans toksinlerin de jele uygulanması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak bu tez kapsamında geliştirilen HPLC metodunun *M. aeruginosa* ve diğer siyanobakterilerin kromatografik ayrımında araştırıcılar tarafından kullanılabileceği öngörülmektedir. Hücreler üzerinde düşük konsantrasyonlarda da sitotoksik etkiye sahip olmaları sebebiyle su kalitesinin değerlendirilmesinde 1, 2, 4, 5 ve 6 no.lu fraksiyonların ve bu fraksiyonlardaki toksik bileşenlerin dikkate alınması gerektiği düşünülmektedir. Belirlenen bu

fraksiyonların, *M. aeruginosa*'ya bağlı toksisitenin ortadan kaldırılması ve/veya bu toksisiteye ait tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde de hedef belirleme bakımından yol gösterici olduğu düşünülmektedir.

Bu tez kapsamında elde edilen verilerin, su kalitesi ve güvenliğine ilişkin biyolojik markırların ve *M. aeruginosa*'ya bağlı toksisitenin önlenmesinde/tedavisinde hedeflenecek toksik maddelerin araştırılmasına yönelik gelecek çalışmalara katkı sağlaması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

Adamovsky, O., Moosova, Z., Pekarova, M., Basu, A., Babica, P., Sindlerova, L.S., Kubala, L., Blaha, L., 2015, Immunomodulatory potency of microcystin, an important water-polluting cyanobacterial toxin, *Environmental Science & Technology*, 49(20), 12457-12464.

Albay, M., Akcaalan, R., Tufekci, H., Metcalf, J.S., Beattie, K.A., Codd, G.A., 2003, Depth profiles of cyanobacterial hepatotoxins (microcystins) in three Turkish freshwater lakes, *Hydrobiologia*, 505, 89–95.

Albay, M., Matthiensen, A., Codd, G.A., 2005, Occurrence of toxic blue-green algae in the Kucukcekmece lagoon (Istanbul, Turkey), *Environmental Microbiology*, 20, 277–284.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2015, *Molecular Biology of the Cell*, 6th ed., Garland-Norton, New York, ISBN: 9780815344322.

Alexova, R., Fujii, M., Birch, D., Cheng, J., Waite, T. D., Ferrari, B.C., Neilan, B.A., 2011, Iron uptake and toxin synthesis in the bloom-forming *Microcystis aeruginosa* under iron limitation, *Environmental Microbiology*, 13, 1064 –1077.

Alverca, E., Andrade, M., Dias, E., Bento, F.S., Batoreu, M.C.C., Jordan, P., Silva, M.J., Pereiraa, P., 2009, Morphological and ultrastructural effects of microcystin-LR from *Microcystis aeruginosa* extract on a kidney cell line, *Toxicon*, 54(3), 283-294.

Arda, N., Ertan, H., 2017, *Proteinlerin Kromatografik Ayrımı ve Saflaştırılması*, Temel ve İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri Genomik ve Proteomik Analizler, In: Temizkan, G., Arda, N. (ed.), Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, ISBN: 9786053353621, 573-589.

Arda, N., Önay Uçar, E., Ertan, H., 2017, *Tek Boyutlu Protein Elektroforezi ve Protein Saptama Yöntemleri,* Temel ve İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri Genomik ve Proteomik Analizler, In: Temizkan, G., Arda, N. (ed.), Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, ISBN: 9786053353621, 528-568.

Atasever-Arslan, B., Yilancioglu, K., Kalkan, Z., Timucin, A.C., Gür, H., Isik, F.B., Deniz, E., Erman, B., Cetiner, S., 2016, Screening of new antileukemic agents fromessential oils of algae extracts and computational modeling of their interactions with intracellular signaling nodes, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83, 120–131.

Ausubel, F.M. Brent, R., Kıngston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl K., 1989, Protein expression, *Current Protocols in Molecular Biology*, 2, 16-24.

Babica, P., Kohoutek, J., Bláha, L., Adamovský, O., Maršálek B., 2006, Evaluation of extraction approaches linked to ELISA and HPLC for analyses of microcystin-LR, -RR and -YR in freshwater sediments with different organic material contents, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385, 1545–1551.

Bagu, J.R., Sykes, B.D., Craig, M.M., Holmes, C.F., 1997, A molecular basis for different interactions of marine toxins with protein phosphatase-1, Molecular models for bound motuporin, microcystins, okadaic acid, and calyculin A., *Journal of Biological Chemistry*, 272, 5087–5097.

Baker R.J., Fane A.G., Fell C.J.D., Yoo B.H., 1985, Factors affecting flux in crossflow filtration, *Desalination*, 53, 81-93.

Bao, Y., Wang W., Zhou, Z., Sun, C., 2014, Benefits and Risks of the Hormetic Effects of Dietary Isothiocyanates on Cancer Prevention, *PLoS oNE*, 9(12), 1-19.

Barba, I., Cabañas, M.E., Arús, C., 1999, The relationship between nuclear magnetic resonance-visible lipids, lipid droplets, and cell proliferation in cultured C6 cells, *Cancer Research*, 59(8), 1861-1868.

Birungi, G., Li, S.F., 2009, Determination of cyanobacterial cyclic peptide hepatotoxins in drinking water using CE, *Electrophoresis*, 30(15), 2737-2742.

Bryant, D.A., 1994, Gene nomenclature recommendations for green photosynthetic bacteria and heliobacterial, *Photosynthesis Research*, 41, 27-28.

Buratti, F.M., Scardala, S., Funari, E., Testai, E., 2013, The conjugation of microcystin-RR by human recombinant GSTs and hepatic cytosol, *Toxicology Letters*, 219(3), 231-238.

Campos, A., Vasconcelos, V., 2010, Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells., *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 268-287.

Carmichael, W.W., 1988, *Marine Toxins and Venoms*, Handbook of Natural Toxins and Venoms, In: Tu, A. (ed), CRC Press, New York, ISBN: 9780824783761, 557-562.

Carmichael, W.W., 1994, The toxins of cyanobacteria. *Scientific American*, 270(1), 78-86.

Carmichael, W.W., 2001, Health effects of toxin-producing cyanobacteria: "The CyanoHABs", *Human and Ecological Risk Assessment*, 7, 1393-140.

Cavalier-Smith, T., 2002, The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(2), 297-354.

Celik, K., Ongun, T., 2008, Spatial and temporal dynamics of the steady-state phytoplankton assemblages in a temperate shallow hypertrophic lake, *Limnology*, 9, 115–123.

Chen, H., Zhao, J., Li, Y., He, L.X., Huang, Y.J., Shu, W.Q., Cao, J., Liu, W.B., Liu, J.Y., 2018, Gene expression network regulated by DNA methylation and microRNA during microcystin-leucine arginine induced malignant transformation in human hepatocyte L02 cells, *Toxicology Letters*, 289(1), 42-53.

Chong, M.W.K., Gu, K.D., Lam, P.K.S., Yang, M., Fong, W.F., 2000, Study on the cytotoxicity of microcystin-LR on cultured cells, *Chemosphere*, 41, 143-147.

Chorus, I., 2001, *Cyanotoxins occurrence, causes, consequences* ǁ, Springer–verlag, Berlin Heidelberg, ISBN: 9783642595141.

Codd, G.A., Bell, S.G., Brooks, P., 1989, Cyanobacterial toxins in water, *Water Science and Technology*, 21(3), 1-13.

Cohen, Y., Gurevitz, M., 2006, The cyanobacteria-ecology, physiology and molecular genetics, *Prokaryotes*, 4, 1074-1098.

Campo, F.D., Ouahid, Y., 2010, Identification of microcystins from three collection strains of *Microcystis aeruginosa*, *Environmental Pollution*, 158(9), 2906-2914.

Crush, J.R., Briggs, L.R., Sprosen, J.M., Nichols, S.N., 2008, Effect of irrigation with lake water containing microcystins on microcystin content and growth of ryegrass, clover, rape, and lettuce, *Environmental Toxicology*, 23, 246–252.

Dias, E., Andrade, M., Alverca, E., Pereira, P., Batore´u, M.C., Jordan, P., Silva, M.J., 2009, Comparative study of the cytotoxic effect of microcistin-LR and purified extracts from *Microcystis aeruginosa* on a kidney cell line, *Toxicon*, 53, 487–495.

Dvoráková, D., Dvoráková, K., Bláha, L., Maršálek, B., Knotková, Z., 2002, Effects of cyanobacterial biomass and purified microcystins on malformations in *Xenopus laevis* teratogenesis assay (FETAX), *Environmental Toxicology*, 17, 547–555.

Enginün, M., 1996, İyon-Değişim Kromatografisi ve Kromatofokuslama, *Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu Protein Saflaştırılması ve Karakterizasyonu,* İzmir, 109–125.

Entfellner, E., Frei1, M., Christiansen, G., Deng, L., Blom, J., Kurmayer, R., 2017, Evolution of anabaenopeptin peptide structural variability in the cyanobacterium planktothrix, *Frontier in Microbiology*, 8, 1-13.

Faassen, E.J., Lürling, M., 2013, Occurrence of the microcystins MC-LW and MC-LF in dutch surface waters and their contribution to total microcystin toxicity, *Marine Drugs*, 11(7), 2643-2654.

Falconer, I.R., 1991, Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria, *Environmental Toxicology Water Quality*, 6, 177–184.

Fane A.G., and Fell C.J.D., 1987, A review of fouling and fouling control in ultrafiltration, *Desalination*, 62, 117-125.

Fields, G.B., 2007, *Peptide Characterization and Application Protocols*, Humana Press, Florida, ISBN: 9781588295507.

Fischer, W.J., Dietrich, D.R., 2000, Toxicity of the cyanobacterial cyclic heptapeptide toxins microcystin-LR and -RR in early life-stages of the African clawed frog (*Xenopus laevis*), *Aquatic Toxicology*, 49(3), 189-198.

Ford T.C., Graham, J.M., 1991, *An Introduction to Centrifugation*, Bios Scientific Publishers Ltd., Oxford, ISBN: 1872748406.

Galey, F.D., Beasley, V.R., Carmichael, W.W., 1987, Blue-green algae hepatotoxicosis in dairy cows, *American Journal of Veterinary Research*, 4, 1415-1420.

Gang, D., Kim, D.W., Park, H.S., 2018, Cyclic peptides promising scaffolds for biopharmaceuticals, *Genes*, 9, 557-572.

Gunsen, U., 2016, Chromatographic methods used in food analysis-I: HPLC, *Jood Food Hygiene Technology-Special Topics*, 2(1), 23-32.

Gurbuz, F., Metcalf, J.S., Karahan, A.G., Codd, G.A., 2009, Analysis of dissolved microcystins in surface water samples from Kovada Lake, Turkey, *Science of the Total Environment*, 407, 4038–4046.

Gutiérrez-Praena, D., Guzmán-Guillén, R., Pichardo, S., Moreno, F.J., 2019, Cytotoxic and morphological effects of microcystin-LR, cylindrospermopsin, and their combinations on the human hepatic cell line HepG2, *Environmental Toxicology*, 34, 240–251.

Gürevin, C., Erturk, A., Albay, M., 2017, Predicting the effects of sediment based internal nutrient loads oneutrophication in Küçükçekmece Lagoon for rehabilitation planning, *International Journal of Sediment Research*, 32, 527–554.

Harke, M.J., Steffen, M.M., Gobler, C.J., Otten, T.G., Wilhelm, S.W., Wood, S.A., Paerl, H.W., 2016, A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* sp., *Harmful Algae*, 54, 4–20.

Harris, E.L.V., Angal, S., 1989, *Protein Purification Methods A Practical Approach*, IRL Press Oxford, ISBN: 0199630038.

Hayes, D.P., 2007, Nutritional hormesis, *European Journal of Clinical Nutrition*, 61, 147–159.

Herrera, N., Herrera, C., Ortíz, I., Orozco, L., Robledo, S., Agudelo, D., Echeverria, F., 2018, Genotoxicity and cytotoxicity of three microcystin-LR containing cyanobacterial samples from Antioquia, Colombia, *Toxicon,* 154, 50-59.

Hesse, K., Kohl, J.G., 2001, *Effects of light and nutrient supply on growth and microcystin content of different strains of Microcystis aeruginosa,* Cyanotoxins: Occurrence, Causes, Consequences, In: Chorus, I. (ed.), Springer-Verlag KG, Berlin, ISBN: 9783642595141, 152–158.

Heukeshoven, J. and Dernick, R., 1985, Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining, *Electrophoresis*, 103–112.

Hiatt, J.R, Gabbay, J, Busuttil, R.W., 1994, Surgical anatomy of the hepatic arteries in 1000 cases, *Annals of Surgery,* 220, 50–52.

Hitzfeld, B.C., Hoger, S.J., Dietrich, D.R., 2000, Cyanobacterial toxins removal during drinking water treatment, and human risk assessment, *Environmental Health Perspectives*, 1(8), 113-122.

Hughes, S.E., 1996, Functional characterization of the spontaneously transformed human umbilical vein endothelial cell line ECV304 use in an *in vitro* model of angiogenesis, *Experimental Cell Research*, 225, 171–185.

Ikawa, M., Yamada, S., Nakanishi, T., Okabe, M., 1998, Green mice and their potential usage in biological research, *FEBS Letters*, 430(1-2), 83-7.

Joo, S.H., 2012, Cyclic peptides as therapeutic agents and biochemical tools, *Biomolecules & Therapeutics,* 20(1), 19-26.

Kaebernick, M., Neilan, B.A., 2001, Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production, *FEMS Microbiology Ecology*, 35, 1–9.

Kahraman, S.D., Küplülü, Ö., 2012, Siyanobakteriler ve toksinleri, *Veteriner Hekim Derneği Dergisi*, 83(2), 36-47.

Karan, T., Koyuncu, M., Parmaksız, İ., Pabuçcu, K., Altuner, Z., 2015, Siyanotoksinler ve biyosentezlerinden sorumlu genlerin düzenlenmesi, *Gaziosmanpaşa Journal of Scientific Research,* 54-69.

Karjalainen, M., Engstrom-Ost, J., Korpinen, S., Peltonen, H., Paakkonen, J.P., Ronkkonen, S., Suikkanen, S., Viitasalo, M., 2007, Ecosystem consequences of cyanobacteria in the northern Baltic Sea, *Ambio*, 36, 195–202.

Kim, S.K., Chojnacka, K., 2015, *Marine Algae Extracts Processes, Products, and Applications*, Wiley-VCN, Wroclaw, ISBN: 9783527337088

Kiessling, F., Kartenbeck, J., Haller, C., 1999, Cell-cell contacts in the human cell line ECV304 exhibit both endothelial and epithelial characteristics, *Cell and Tissue Research*, 297, 131–140.

Kleinkauf, H., Von Dohren, H., 1996, A non-ribosomal system of peptide biosynthesis, *European Journal of Biochemistry*, 236, 335–351.

Kleinteich, J., Puddick, J., Wood, S.A., Hildebrand, F., Laughinghouse, H.D., Pearce, D.A., Dietrich, D.R., Wilmotte, A., 2018, Toxic syanobacteria in Svalbard chemical diversity of microcystins detected using a liquid chromatography mass spectrometry precursor ion screening method, *Toxins*, 10(4), 147.

Kotak, B.G., Lam, A.K., Prepas, E.E., Kenefi, S.L., Hrudey, S.E., 1995, Variability of the hepatotoxin, microcystin-LR, in hypereurophic drinking water lakes, *Journal Phycology*, 31, 248-263.

Kounnis, V., Chondrogiannis, G., Mantzaris, M.D., Tzakos, A.G., Fokas, D., Papanikolaou N.A., Galani, V., Sainis, I., Briasoulis, E., 2015, Microcystin LR shows cytotoxic activity against pancreatic cancer cells expressing the membrane OATP1B1 and OATP1B3 transporters, *Anticancer Research*, 35(11), 5857-65.

Kurmayer, R., 2011, The Toxic Cyanobacterium *Nostoc* sp. strain 152 produces highest amounts of microcystin and nostophycin under stress conditions, *Journal of Phycology*, 47, 200–207.

Lawton, L.A., Edwards, C., Codd, G.A., 1994, Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters, *Analyst*, 11(9), 1525- 1530.

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., Martin, K.C., 2016, *Molecular Cell Biology*, 8th ed., W.H. Freeman Publishers, New York, ISBN: 978146418339-3.

Long, E.G., White, E.H., Carmiehael, W.W., 1991, Morphologic and staining characteristics of a cyanobacterium like organism associated with diarrhea, *The Journal of Infectious Diseases*, 164(1), 199-202.

Lonsdale H. K., 1982, The growth of membrane technology, *Journal of Membrane Science*, 10(2), 81-181.

Machu, L., Misurcova, L., Ambrozova, JW., Orsavova, J., Mlcek, J., Sochor, J., Jurikova, T., 2015, Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products, *Molecules*, 20(1), 1118-1133.

MacKintosh, C., Beattie, K. A., Klumps, S., Cohen, P., Codd, GA., 1990, Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants, *FEBS Letters*, 264(2), 187-192.

Martin, C., Oberer, L., Inoc, T., König, W.A., Busch, M., Weckesser, J., 1993, Cyanopeptolins, new depsipeptides from the cyanobacterium *microcystis* sp. PCC 7806, *The Journal of Antibiotics*, 46(10), 1550- 1556.

Mather, J.P., Roberts, P.E., 1998, *Introduction to Cell and Tissue Culture Theory and Technique*, Plenum Press, New York, ISBN: 0306458594.

McGregor, W.C., 1986, *Membrane Separations in Biotechnology Bioprocess Technology*, Bennett Books Ltd, San Diego, ISBN 10: 0824774655.

Moat, A.G., Foster, J.W., Spector, M.P., 2002, 4th Ed., *Introduction to Microbial Physiology*, Wiley-Liss, Amerika, ISBN: 0471394831.

Moreno, I.M., Maraver, J., Aguete, E.C., Leao, M., Gago-Martínez, A., Cameán, A.M., 2004, Decomposition of microcystin-LR, microcystin-RR, and microcystin-YR in water samples submitted to *in vitro* dissolution tests, *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 52(19), 5933-5938.

Mur, L.R., Gons, H.J., Van Liere, L., 1978, Competition of the green alga scenedesmus and the blue green alga *Oscillatoria* in light limited environments, *FEMS Microbiology Letters*, 1, 335-338.

Nishiwaki-Matsushima, R., Ohta, T., Nishiwaki, S., Suganuma, M., Kohyama, K., Ishikawa, T., Carmichael, WW., Fujiki, H.,1992, Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 118, 420-424.

Oh, H.M., Lee, S.J., Jang, M.H., Yoon, B.D., 2000, Microcystin Production by *Microcystis aeruginosa* in a phosphorus-limited chemostat, *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 176–179.

Ohta, T., Sueoka, E., Iida, N., Komori, A., Suganuma, M., Nishiwaki, R., Tatematsu, M., Kim, S., Carmichael, W., Fujiki, H., 1994, Nodularin, a potent inhibitor of protein phosphatases

1 and 2A, is a new environmental carcinogen in male F344 rat liver, *Cancer Research*, 54, 6402–6406.

Özer, N., Ögüs, H., Salnikov, J., Zihnioglu, F., Kılınç, A., 2000, Elektroforez ve İzoelektrik Odaklama, *Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu Biyokimyada Temel ve Modern Teknikler*, İzmir, 251-267.

Özel, D.D., İğci, N., Peker, S., Ayhan, B., 2013, *Temel Proteomik Stratejiler*, Ankara Üniversitesi Yayınevi, ISBN: 9786051361178.

Paiva, L., Lima, E., Neto, A.I., Baptista, J., 2017, Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity, antioxidant properties, Phenolic Content and Amino Acid Profiles of *Fucus spiralis* Protein Hydrolysate Fractions, *Marine Drugs*, 15(10), 311.

Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R., Neilan, B., 2010, On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin, *Marine Drugs*, 8, 1650-1680.

Penfold, P.L., Wen, L., Madigan, M.C., Gillies, M.C., King, N.J.C., Provis, J.M., 2000, Triamcinolone acetonide modulates permeability and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression of the ECV304 cell line implications for macular degeneration, *Clinical and Experimental Immunology*, 121, 458-465.

Pereira, L., 2018, *Therapeutic and Nutritional Uses of Algae*, 1st. Ed., CRC Press, Coimbra, ISBN: 9781498755382.

Piyathilaka, M.A.P.C., Pathmalal, M.M., Tennekoon, K.H., De Silva, B.G.D.N.K., Samarakoon, S.R., Chanthirika, S., 2015, Microcystin-LR-induced cytotoxicity and apoptosis in human embryonic kidney and human kidney adenocarcinoma cell lines, *Microbiology*, 161, 819–828.

Prieto, A., Campos, A., Camean, A., Vasconcelos, V., 2011, Effects on growth and oxidative stress status of rice plants (*Oryza sativa*) exposed to two extracts of toxin-producing cyanobacteria (*Aphanizomenon ovalisporum* and *Microcystis aeruginosa*), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(7), 1973–1980.

Qu, J., Shen, L., Zhao, M., Wentong, L., Chengxia, J., Zhu, H., Zhang, Q., 2018, Determination of the Role of *Microcystis aeruginosa* in toxin generation based on phosphoproteomic Profiles, *Toxins*, 10(7), 304-318.

Quellette, A.J.A., Handy, S.M., Wilhelm, S.W., 2006, Toxic microcystis is widespread in Lake Erie PCR detection of toxin genes and molecular characterization of associated Cyanobacterial Communities, *Microbial Ecology*, 51(2), 154–165.

Ramanan, S., Tang, J., Velayudhan, A., 2000, Isolation and preparative purification of microcystin variants, *Journal of Chromatography A*, 883(1-2), 103-112.

Ramos, D.F., Matthiensen, A., Colvara, W., Votto, A.P.S., Trindade, G.S., Silva, P.E.A., Yunes, J.S., 2015, Antimycobacterial and cytotoxicity activity of microcystins, *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 21(9), 1-7.

Rantala A, Fewer D.P, Hisbergues M, Rouhiainen L, Vaitomaa J, 2004, Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 568–573.

Rao, P.V.L., Bhattacharya, R., Parida, M.M., Jana, A.M., Bhaskar, A.S.B., 1998, Freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UTEX 2385) induced DNA damage *in vivo* and *in vitro*, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 1–6.

Rapala, J., Lahtia, K., Leena, A., Esalab, A., Niemel, S., Sivonenb, K., 2002, Endotoxins associated with cyanobacteria and their removal during drinking water treatment, *Water Research*, 2, 2627-2632.

Rickwood D., 1984, *Centrifugation: A Practical Approach*, 3nd ed., IRL Pres, Oxford/ Washington DC.

Rinehart, K.L, Harada, K., Namikoshi, M., Chen, C., Harvis, M., Munro, J., Blunt, P., 1988, Nodularin, microcystin, and the configuration of adda, *Journal of the American Chemical Society*, 110, 25, 8557-8558.

Rinehart, K.L., Namikoshi, N., Choi, B., 1994, Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria), *Journal of Applied Phycology*, 6, 159–176

Robillot, C., Vinh, J., Puiseux-Daos, S., Hennion, M.C., 2000, Hepatotoxin production kinetics of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, as determined by HPLC−mass spectrometry and protein phosphatase bioassay, *Environmental Science and Technology*, 34(16), 3372–3378.

Rounge, T.B., Rohrlack, T., Tooming-Klunderud , A., Kristensen, T., Jakobsen, K.S., 2007, Comparison of cyanopeptolin genes in planktothrix, microcystis, and anabaena strains evidence for independent evolution within each genus, *Applied and Environmental Microbiology*, 73(22), 7322–7330.

Runnegar, M., Berndt, N., Kong, S.M., Lee, E.Y., Zhang, L., 1995, *in vivo* and *in vitro* binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A, *Biochemical and biophysical Research Communications*, 216, 162–169.

Scopes, R.K., 1987, *Protein Purification, Principles and Practice*, 2nd ed., Springer, New York, ISBN: 9781475717709.

Shunzhang, Y., Gang, C., 1994, Blue-green algae toxins and liver cancer, *Chineese Journal of Cancer Research*, 6(1), 9-17.

Skoog, D.A., West, D.M., 1981, *Principles of Instrumental Analysis*, 2nd. Ed., Saunders Publishing, Philadelphia, ISBN-13: 9780495012016.

Sömek, H., Ustaoğlu, M.R., Yağci, M., 2008, A case report algal bloom of *Microcystis aeruginosa* in a drinking-water body, Eğirdir Lake, Turkey, *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 8, 177-179.

Spoof, L., Catherine, A., 2017, *Tables of Microcystins and Nodularins*, Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis, In: Meriluoto, J., Spoof, L., Codd, G.A. (ed.), John Wiley & Sons, New Jersey, ISBN: 9781119068686, 526-537.

Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M., Cohen-Bazire, G., 1971, Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales), *Bacterological Reviews*, 35, 171-205.

Straub, C., Quillardet, P., Vergalli, P., Tandeau de Marsac, N., Humbert, J., 2011, A day in the life of *Microcystis aeruginosa* strain PCC 7806 as revealed by a transcriptomic analysis, *PLoS oNE*, 6(1), e16208.

Suda, K., Rothen-Rutishauser, B., Günthert, M., Wunderli-Allenspach, H., 2001, Phenotypic characterization of human umbilical vein endothelial (ECV304) and urinary carcinoma (T24) cells endothelial versus epithelial features, *In Vitro Cellular and Developmental Biology–Animal*, 37(8), 505-14.

Suki A., Fane A.G., and Fell C.J.D., 1984, Flux decline in protein ultrafiltration, *Journal of Membrane Science*, 21, 269-283.

Tang, ZY., 1985, *Subclinical Hepatocellular Carcinoma*, China academic publishers, Berlin, ISBN: 3540126643.

Tarhan, L., Zihnioglu, F., Kılınç, A., 2000, Ekstraksiyon ve ön ayırma teknikleri, *Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu Biyokimyada Temel ve Modern Teknikler,* İzmir, 27-115.

Takahashi, K., Sawasaki, Y., Hata, J., Mukai, K., Goto, T., 1990, Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial, *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 25, 265-274.

Tas, B., Gonulol, A., 2007, An ecologic and taxonomic study on phytoplankton of a shallow lake, Turkey, *Journal of Environmental Biology*, 28(2), 439-445.

Telefoncu, A., 1996, Protein saflaştırma stratejisi ve amacı, *Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu Protein Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, İzmir,* 1-12.

Temizkan, G., 2017, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemlere Genel Bakış, In: Temel ve İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri: Genomik ve Proteomik Analizler, Temizkan, G., Arda, N. (ed.), Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, ISBN: 9786053353621, 3-66.

Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., Döhren, H., Börner, T., Neila, B., 2000, Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806 an integrated peptide–polyketide synthetase system, *Chemistry & Biology*, 7(10), 753-764.

Tonk, L., Visser, P.M., Christiansen, G., Dittmann, E., Snelder, E.O., Wiedner, C., Mur, L.R., Huisman, J., 2005, The microcystin composition of the cyanobacterium *Planktothrix agardhii* changes toward a more toxic variant with increasing light intensity, *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 5177–5181.

Tung, S.L., McCann, M., Azarin, S.M., Hu, W.S., 2016, An Introduction to mammalian cell culture, *Chemical Engineering Progress*, 112 (4), 34-40.

Turner, A.D., Waack, J., Lewis, A., Edwards, C., Lawton, L., 2018, Development and single-laboratory validation of a UHPLC-MS/MS method for quantitation of microcystins and nodularin in natural water, cyanobacteria, shellfish and algal supplement tablet powders, *Journal of Chromatography B*, 1074, 111-123.

Velzeboer, R., Baker, P., Rositano, J., Heresztyn, T., Codd, G., Raggett, S., 2000, Geographical patterns of occurrence and composition of saxitoxins in the cyanobacterial genus *Anabaena* (Nostocales, Cyanophyta) in Australia, *Phycologia* 39, 395–407.

Walker, J.M., 2002, *The Protein Protocols Handbook*, 2nd ed., Humana press, ISBN: 9781597451987.

Walsby, A.E., 1987, Mechanisms of buoyancy regulation by planktonic cyanobacteria with gas vesicles, *The Cyanobacterial*, 377-414.

Wang, D., Calabrese, E.J., Lian, B., Lina, Z., Calabrese, V., 2018, Hormesis as a mechanistic approach to understanding herbal treatments in traditional Chinese medicine, *Pharmacology and Therapeutics*, 184, 42–50.

Watanabe, M.F., Oishi, S., Harda, K., Matsuura, K., Kawai, H., Suzuki, M., 1988, Toxins contained in *Microcystis* species of cyanobacteria (blue-green algae), *Toxicon*, 26, 1017–1025.

Wei, N., Hu, L., Song, L., Gan, N., 2016, Microcystin-bound protein patterns in different cultures of *Microcystis aeruginosa* and field samples, *Toxins*, 8(10), 293.

Welker, M., von Dohren, H., 2006, Cyanobacterial peptides-nature's own combinatorial biosynthesis, *FEMS Microbiology Ecology*, 30, 530–563.

WHO, 1998, Guidelines for drinking water quality, *World Health Organisation*, Geneva.

WHO, 2003, *Guidelines for Safe Recreational Water Environments, Coastal and Fresh Waters*, World Health Organization, ISBN: 9241545801.

WHO, 2011, *Guidelines for Drinking-water Quality*, 4th. Ed, WHO library cataloguing-in-publication data guidelines for drinking-water quality, I. World Health Organization, ISBN 9789241548151.

Yalçın, S., 2012, Mikrosistin biyosentez yolaklarının düzenlenmesi ve genetik mekanizmalar, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69(3), 169 – 178.

Yerli, S.V., Kıvrak, E., Gürbüz, H., Manav, E., Mangıt, F., Türkecan, O., 2012, Phytoplankton community, nutrients and chlorophyll a in Lake Mogan (Turkey); with comparison between current and old data, *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12, 95-104.

Yoshizawa, S., Matsushima, R., Watanabe, M.F., Harada, K.I., Ichihara, A., Dittmann, E., Neilan, B.A., Erhard, M., Von Döhren, H., Börner, T., 1997, Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, *Molecular Microbiology*, 26, 779-787.

Yu, S., 1995, Primary prevention of hepatocellular carcinoma, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 10, 674–682.

Yu, H., Clark, K.D., Anderson, J.L, 2015, Rapid and sensitive analysis of microcystins using ionic liquid-based in situ dispersive liquid-liquid microextracton, *Journal of Chromatography A*, 1406, 10-18.

Zegura, B., Sedmak, B., Filipic, M., 2003, Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2, *Toxicon*, 41, 41–48.

Zihnioğlu, F., 1996, Elektroforetik Yöntemler, *Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu Protein Saflaştırılması ve Karakterizasyonu*, İzmir, 150-165.

Zhan, L., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Wu, D., Zhang, L.S., Suzuki, T., Hayashi, M., Honma, M., 2004, Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells, *Mutation Research*, 557, 1–6.

Zhong, Q., Sun, F., Wang, W., Xiao, W., Zhao, X., Gu, K., 2017, Water metabolism dysfunction via renin-angiotensin system activation caused by liver damage in mice treated with microcystin-RR, *Toxicology Letters*, 273(5), 86-96.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Seda Kuşoğlu
Doğum Yeri	İstanbul
Doğum Tarihi	08.01.1992
Uyruğu	☑ T.C. ❒ Diğer:
Telefon	545 374 09 55
E-Posta Adresi	sedakusoglu@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	2014

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik

Makale ve Bildiriler

Kusoglu, S., Mertoglu, E., Yilancioglu, K., Onay-Ucar, E., Arda, N., Chromatographic Separation of Peptides-Proteins From *Microcystis aeruginosa, The 5th International Conference on Innovation in Science and Technology*, İspanya (2018).

Yılancıoğlu, K., Yönet, N., Keskin, B., Kuşoğlu, S., Kaplan, E., Biyodizel Üretimi için Mikroalg Hücresel Yağ Miktarını Arttırmada Yeni Bir Yaklaşım; Oksidatif Stres, *Su Bilimlerinde Biyoteknoloji Çalıştayı*, Türkiye (2018).

Kusoglu S., Kaplan Coban E., Yilancioglu K., Optimization of Cultivation Conditions of *Microcystis aeruginosa* by Using Mathematical Modeling for Secondary Metabolite Production, *ICHAE International Conference on Healthcare, Applied Science and Engineering*, İtalya (2017).