

***Tetrahymena thermophila* GLUTATYON-S-  
TRANSFERAZ ZETA GENİNİN KLONLANMASI,  
BİYOİNFORMATİK VE DENEYSEL  
KARAKTERİZYONU**

Cem ÖZİÇ  
Yüksek Lisans Tezi

Biyoteknoloji Bilim Dalı  
Temmuz-2008

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Cem ÖZİÇ'in "*Tetrahymena thermophila* glutatyon-s-transferaz zeta geninin klonlanması, biyoinformatik ve deneysel karakterizasyonu" başlıklı İleri Teknolojiler Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Bilim Dalı Yüksek lisans tezi 20/06/2008 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Yard. Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU

Üye : Yard. Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA

Üye : Yard. Doç. Dr. M. Burçin MUTLU

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun.....tarih ve .....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### ***Tetrahymena thermophila* GLUTATYON S-TRANSFERAZ ZETA (GST-Z) GENİNİN KLONLANMASI, DENEYSEL VE BİYOİNFORMATİK KARAKTERİZASYONU**

Cem ÖZİÇ

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

İleri Teknolojiler Programı

Biyoteknoloji

Danışman: Yard. Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU

2008, 129 sayfa

Glutatyon-S-transferaz (GST) enzimleri canlılarda endojen ve ekzojen bileşiklerin detoksifikasyonu sağlarlar. *Tetrahymena* genomu proje sonuçları bu enzim ailesi açısından analiz edildiğinde, 4 alt-grup (theta, omega, mu, zeta) ile temsil edilen 19 farklı GST genine sahip olduğu görülmüştür. TtGSTz geninin mRNA dizisi (847 bp), genom projesinde bulunan genomik bilgi (77.m00138), EST (Expressed Sequence Tags) dizileri ve 3'RACE deney sonuçları dikkate alınarak ortaya çıkarılmıştır. TtGSTz geninin başla-dur kodonları arasında kalan protein kodlayıcı 663 bp'lik bölge cDNA olarak klonlanmış dizi analiziyle teyit edilmiştir. GSTz geninin genomik kopyasının klonlanan cDNA ile karşılaştırılması yapıldığında genom projesinde belirtildiği gibi toplamda 122 bp'lik intron içerdiği gösterilmiştir. Klonlanan TtGSTz cDNA'nın kodladığı olası amino asit dizisinden yola çıkılarak yapılan karşılaştırmalı dikey hizalama ile motif analiz sonuçları, zeta alt grubunun karakteristik motifine (SSCX[WH]RVIAL) uygun imza dizisini içerdiğini göstermiştir. TtGSTz'nin hidrojen peroksit ve soğuk (4°C) stresi altında mRNA miktarının zamana bağlı değişimi, yarı-kantitatif RT-PZR yöntemiyle analiz edilmiştir. TtGSTz geninin kodladığı proteinin, *E.coli*'de rekombinant protein olarak üretilebilmesi için gerekli olan 7 nokta mutasyonu (TAA > CAA veya TAG > CAG) cDNA üstünde gerçekleştirildikten sonra pET16b ekspresyon plazmitine aktarılmış ve *E.coli* BL21-DE3'de 6X histidin işaretli olarak üretilmiştir. Ni-NTA agaroz ve glutatyon sepharose4B kullanılarak rekombinant 6XHis-TtGSTz proteini (24 kDa) saflaştırılmış ve SDS-PAGE jeli ile üretildiği gösterilmiştir. Saflaştırılan 6xHis-TtGSTz proteinini Western protein analizinde anti-histidin antikoruna ile yapılan analiz ile üretildiği teyit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** GST, *Tetrahymena thermophila*, mRNA, biyoinformatik

## ABSTRACT

Master of Science Thesis

### CLONING, EXPERIMENTAL AND BIOINFORMATIC CHARACTERIZATION OF GLUTATHION S-TRANSFERASE ZETA (GST-Z) GENE IN *Tetrahymena thermophila*

Cem ÖZİÇ

Anadolu University

Graduate School of Sciences

Advanced Technologies Programme

Biotechnology

Supervisor: Asist. Prof. Dr. Muhittin ARSLANYOLU

2008, 129 pages

Enzymes of the Glutathione-S-transferase (GST) help to detoxificate effects of endogen and exogenous toxic compounds in living organisms. Results of the *Tetrahymena* genome project showed that *T. thermophila* has 19 different GST genes that represent members only from four subgroups as theta, omega, mu, zeta. mRNA sequences of TtGSTz gene (847 bp) was determined by using genomic sequence (77.m00138) from genome project, EST sequences of cDNAs from EST projects and experimental result of 3'RACE. The region of TtGSTz cDNA gene between start and stop codon was cloned and sequenced to confirm the existence of the gene in *T. thermophila* SB210. Comparison of genomic and cDNA sequence of TtGSTz gene by PCR and agarose gel analysis showed that there are totally 122 bp long intron in the genome copy. Multiple alignment of TtGSTz amino acid sequence with other GST zeta homologs showed the existence of conserved characteristic motif (SSCX[WH]RVIAL) of zeta subgroup in TtGSTz. Change in expression of TtGSTz mRNA level under the hydrogen peroxide and cold (4°C) stresses with time intervals was analyzed with semi-quantitative RT-PCR method. After seven necessary multiple point mutations (TAA > CAA or TAG > CAG) on mRNA protein coding region of TtGSTz gene, it was transferred to pET16b expression plasmid and recombinant 6XHis-TtGSTz protein was possible to produce in *E. coli* BL21-DE3. Recombinant 6XHis-TtGSTz protein (24 kDa) was purified not only by using nickel agarose but also by glutathion-sepharose 4B. Analysis of recombinant 6XHis-TtGSTz by SDS-PAGE showed that the protein was successfully produced by both purification methods. Analyzes of purified 6xHis-TtGSTz by using anti-His antibody in the Western blot showed that the recombinant protein was succesfully produced.

**Keywords:** GST, *Tetrahymena thermophila*, mRNA, bioinformatic

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans hayatım boyunca bilgi ve tecrübelerini samimiyeti ve doğallığıyla yılmadan aktaran ve kendi yolumu bulabilmem için gerekli özgürlüğü sağlayan değerli danışman hocam Yard. Doç Dr. Muhittin ARSLANYOLU'na teşekkür ederim.

Çalışma esnasında her aşamada bana destek veren, dostum ve abim Mehmet Taha YILDIZ'a bütün yardımları için ve benimle çabaladığı her saniye için teşekkür ederim.

Laboratuvardaki ve bu şehirdeki her türlü yardım ve desteği için Ozan KILIÇKAYA'ya teşekkür ederim.

Bu şehirdeki her türlü yardımları için Kutay Deniz ATABAY, Yüksel YILDIZ, Elif KARACA, Yemliha YILDIZ, Nurçin KÜÇÜKOĞLU, Hande Açelya AKDAMAR, Murat KAYA, Caner AYDINLI, Hülya ve Önder ALTUNTAŞ ve Ayşegül KARAPINAR'a teşekkür ederim.

Maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Semahat ve Alim YILDIZ'a teşekkür ederim.

Günümün her saniyesini sonsuz desteği, inancı ve sürekli gülücükleriyle daha anlamlı hale getirdiği, huzur sağladığı ve benimle birlikte yol aldığı için Rasime DEMİREL'e teşekkür ederim.

Bana inanmaktan hiç vazgeçmeyen ve uzakta olmalarına rağmen her türlü desteği sağlayan aileme sonsuz teşekkür ederim.

Cem ÖZİÇ

Temmuz 2008

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1.Canlılarda Antioksidan Savunma Mekanizmaları.....	1
1.2.GST (EC 2.5.1.18).....	2
1.2.1. GSH.....	2
1.2.2. GST enzim ailesinin sınıflandırılması ve isimlendirilmesi.....	2
1.2.3 Enzimin yapısı ve katalitik fonksiyonu.....	3
1.2.4. Glutatyon S Transferaz Zeta (GSTz) .....	6
1.3.Araştırma organizması <i>Tetrahymena thermophila</i> .....	9
1.3.1. <i>Tetrahymena thermophila</i> sistematığı.....	9
1.3.2. <i>Tetrahymena thermophila</i> biyolojik yapısı .....	10
1.3.3. <i>Tetrahymena thermophila</i> ' nın önemi .....	10
1.4.Amaç .....	11
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>12</b>
2.1.Materyal .....	12
2.1.1. Çalışma organizması: <i>Tetrahymena thermophila</i> .....	12
2.1.2. Çalışmada kullanılan besi yerleri .....	12
2.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	12
2.1.4. Çalışmada kullanılan cihazlar.....	13
2.1.5. Çalışmada kullanılan kitler.....	14
2.1.6. Çalışmada kullanılan DNA polimeraz setleri.....	14
2.2.Yöntemler .....	15

2.2.1. Biyoinformatik analizlerde kullanılan programlar .....	15
2.2.2. <i>T. thermophila</i> hücrelerinden genomik DNA izolasyonu .....	15
2.2.3. <i>T.thermophila</i> total RNA izolasyonu:.....	17
2.2.4. Total RNA'nın DNaz muamelesi .....	18
2.2.5. DNA ve RNA'ların spektrofotometre'de ölçümü, miktar ve kalite tayini .....	19
2.2.6. Toplam RNA'dan geri transkripsiyon (RT) reaksiyonu ile cDNA'nın üretilmesi.....	19
2.2.7. <i>T.thermophila</i> GSTz ait spesifik primerlerin tasarlanması .....	20
2.2.8. PZR Reaksiyon Koşulları:.....	21
2.2.9. Agaroz jel analizi ve jel görüntüleme işlemi.....	21
2.2.10. PZR Ürünlerinin Jelden Saflaştırılması .....	21
2.2.11. PZR ürününün plazmite ligasyonu .....	22
2.2.12. <i>E.coli</i> XL-Blue kompetent hücre hazırlığı .....	23
2.2.13. Kompetent <i>E.coli</i> 'nin transformasyonu .....	24
2.2.14. Plazmit izolasyonu .....	25
2.2.15. Restriksiyon enzimleriyle kesim.....	26
2.2.16. TtGSTz'nın PZR temelli noktasal mutasyon reaksiyonları .....	27
2.2.17. TtGSTz cDNA'sının 5' ve 3' uçlarının elde edilmesi (RACE tekniği).....	28
2.2.17.1. TtGSTz cDNA'sının 3' ucunun elde edilmesi primer tasarımı .....	28
2.2.17.2. TtGSTz cDNA'sının 3' ucunun 3' RACE reaksiyonuyla elde edilmesi.....	29
2.2.18. DNA dizi analizi .....	29
2.2.18.1. Dizi analizi için PZR .....	29
2.2.18.2. Etanol çöktürmesi.....	32
2.2.18.3. DNA dizi bilgisinin elde edilmesi .....	33
2.2.18.4. Biyoinformatik analizi .....	33
2.2.19. TtGSTz'nın <i>E.coli</i> 'de rekombinant protein olarak üretilmesi ve SDS-Page ile analizi.....	33

2.2.20. TtGSTz rekombinant proteininin Western blot analizi.....	37
2.2.21. TtGSTz'nin farklı stresler altında mRNA seviyesinin belirlenmesi .....	38
2.2.21.1. Soğuk stres (4°C) altında mRNA seviyesinin belirlenmesi.....	38
2.2.21.2. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Hidrojen peroksit) stresi altında mRNA seviyesinin belirlenmesi.....	40
2.2.22. TtGSTz'nin Dotblot yöntemi ile analizi .....	41
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>43</b>
3.1. <i>T. thermophila</i> Makronuklear Genomunda Bulunan GST Enzim Ailesi Üyelerinin Biyoinformatik Analizi.....	43
3.1.1. Tetrahymena Genomu 19 GST Geni İçerir .....	43
3.1.2. <i>T. thermophila</i> 'da bulunan GST ailesi üyeleri için yapılan hizalama ve filogenetik ağaç analizi.....	43
3.1.3. GST enzim ailesi üyeleri için yapılan filogenetik ağaç analizi .....	46
3.1.4. TtGSTz'nin Zeta'ya ait karakteristik motif bilgisini taşıdığıının belirlenmesi ve Zeta'ya ait karakteristik motif bilgisini taşıyan türlerin filogenetik ağaç analizi .....	48
3.1.5. GST Zeta'ya ait karakteristik motif bilgisini taşıyan türlerin karşılaştırılmalı olarak üç boyutlu yapı analizi .....	49
3.2. TtGSTz cDNA' sının klonlanması.....	51
3.2.1. <i>Tetrahymena</i> GST zeta'ya ait biyoinformatik analizler.....	51
3.2.2. <i>T.thermophila</i> 'dan genomik DNA izolasyonu ve cDNA'nın klonlanması .....	58
3.3. TtGSTz protein ifadesi yapılabilmesi için gerekli nokta mutasyonların PZR temelli yerleştirilmesi.....	64
3.3.1. TtGSTz noktasal mutasyonlarının gerçekleştirilmesi gereken bölgelerin belirlenmesi.....	64
3.4. TtGSTz'nin rekombinant proteininin ekspresyonu.....	69
3.5. <i>Tetrahymena thermophila</i> Glutasyon-s-Transferaz Zetanın	



farklı stresler altında mRNA seviyesinin belirlenmesi .....	72
3.5.1. Soğuk Stres (4°C) Altında mRNA Seviyesinin Analizi.....	72
3.5.2. Hidrojen Peroksit Stresi Altında mRNA Seviyesinin Belirlenmesi.....	76
3.6. İşaretlenmiş bulucu DNA'nın Dotblot yöntemi ile özgünlüğünün analizi .....	79
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>80</b>
4.1. Sonuç .....	86
4.2. Öneriler .....	86
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>87</b>
<b>Ek-1 TGD içinde bulunan GST ailesini temsil eden homolog gruplar.....</b>	<b>93</b>
<b>Ek-2 <i>Tetrahymena</i> GST'lerinin benzerlik tablosu .....</b>	<b>123</b>
<b>Ek-3 TGD içinde bulunan GSTz'ya ait EST dizileri .....</b>	<b>124</b>
<b>Ek-4 Klonlanmış pGEMTeasyGSTz plazmiti.....</b>	<b>128</b>
<b>Ek-5 pET-16bGSTz plazmiti.....</b>	<b>129</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. GSTz' nin üç boyutlu yapısı.....	7
2.1. pGEMTEasy (Promega) vektörü. ....	22
2.2. pET-16b vektörünün şekli .....	34
3.1. TGD içinde bulunan GST ailesini temsil eden homolog gruplar. ....	44
3.2.. <i>T. thermophila</i> 'da bulunan GST ailesi üyelerine ait hizalama sonuçları. ....	45
3.3. <i>T. thermophila</i> 'ya ait GST ailesi üyelerine ait ağaç analizi .....	46
3.4. GST enzim ailesi üyelerinin filogenetik ağaç analizi .....	47
3.5. GSTz motif bilgisini içeren farklı türlere ait hizalama sonuçları .....	48
3.6. GSTz motif bilgisini içeren farklı türlere ait filogenetik ağaç analizi .....	49
3.7. GSTz motif bilgisini içeren farklı türlerin karşılaştırılmalı üç boyutlu yapı analiz sonuçları.....	50
3.8. <i>TtGSTz</i> ' nin EST dizileri (www.ciliate.org). ....	51
3.9. <i>TtGSTz</i> ' ya ait EST'lerin vecscreen öncesi hizalanması sonuçları.....	53
3.10. <i>TtGSTz</i> ' ya ait EST'lerin vecscreen sonrası hizalanması sonuçları.....	54
3.11. 3'RACE sonucun agaroz jel görüntüsü.....	55
3.12. <i>TtGSTz</i> 'nin 3' bölgesi dizi analizi sonucu.....	56
3.13. <i>TtGSTz</i> cDNA'sının nükleotid ve amino asid dizi bilgisi. ....	57
3.14. GST zeta cDNA'sının restriksiyon analizi sonucu. ....	57
3.15. <i>TtGSTz</i> 'nin üç boyutlu yapısı.....	58
3.16. <i>T.thermophila</i> 'dan klasik yöntemle genomik DNA'sının agaroz jelden görüntüsü.....	59
3.17. <i>T.thermophila</i> GST zeta'nın protein kodlamayan intron bölgelerinin belirlenmesi için gDNA ve cDNA dizi bilgilerine ait dikey hizalanma sonuçları. ....	60
3.18. <i>TtGSTz</i> 'nin gDNA ve cDNA dizilerinin karşılaştırılmasının agaroz jelden görüntüsü.....	61
3.19. <i>TtGSTz</i> cDNA'nın Re-PZR sonuçlarının agaroz jelden görüntüsü.....	61
3.20. <i>TtGSTz</i> cDNA'nın Re-PZR saflaştırma sonuçlarının agaroz jelden görüntüsü.....	62

3.21. <i>Tt</i> GSTz cDNA'nın transformasyonu sonucu oluşan kolonilerin görüntüsü. ....	63
3.22. <i>Tt</i> GSTz cDNA'sını taşıdığı sanılan pGEMTeasy plazmidinin restriksiyon analizinin agaroz jel görüntüsü. ....	63
3.23. <i>Tt</i> GSTz'nin protein ifadesinin yapılabilmesi için gerçekleştirilmesi gereken nokta mutasyon bölgeleri .....	65
3.24. <i>Tt</i> GSTz'nin PZR tabanlı nokta mutasyonlarının gerçekleştirilmesi. ....	66
3.25 <i>Tt</i> GSTz' nin nokta mutasyonları içeren cDNA'sının transformasyonu sonucu .....	67
3.26 . <i>Tt</i> GSTz' nin nokta mutasyonları içeren cDNA'sının taşıdığı sanılan pGEMTeasy plazmidinin restriksiyon analizinin agaroz jel görüntüsü. ....	67
3.27. <i>Tt</i> GSTz'nin nokta mutasyonları gerçekleştirilmiş cDNA'sının dizi analizi sonuçları.....	69
3.28. Ni-NTA ile saflaştırılmış proteinlerin SDS jel görüntüsü. ....	70
3.29. Glutasyon boncukları ile saflaştırılmış proteinlerin SDS jel görüntüsü. ....	70
3.30. <i>Tt</i> GSTz rekombinant proteininin western blot analizi ile desteklenmesi. ...	71
3.31 Zamana bağlı soğuk strese maruz bırakılan <i>T. thermophila</i> hücrelerinden RNA izolasyonu ve RNA'lara DNaz uygulaması. ....	73
3.32. Zamana bağlı soğuk strese maruz bırakılan <i>T. thermophila</i> hücrelerinin DNaz uygulanmış total RNA'da 17S genine ait primerler kullanılarak, DNA kontaminasyonunun olmadığı belirlenmesi için kurulan kontrol PZR sonuçları. ....	74
3.33. <i>Tt</i> 17S kontrol geni PZR sonuçlarının jelden görüntüsü. ....	75
3.34. <i>Tt</i> GSTz geninin üç bağımsız cDNA kalıbı kullanılarak yapılan PZR sonuçlarının agaroz jel analizi. ....	75
3.35. Zamana bağlı H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> stresine maruz bırakılan <i>T. thermophila</i> hücrelerinden RNA izolasyonu ve RNA'lara DNaz uygulaması. ....	77
3.36. Zamana bağlı H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> stresine maruz bırakılan <i>T. thermophila</i> hücrelerinin DNaz uygulanmış total RNA'da 17S genine ait primerler kullanılarak, DNA kontaminasyonunun olmadığı belirlenmesi için kurulan kontrol PZR sonuçları. ....	77

<b>3.37.</b> Tt17S Kontrol geni PZR sonuçlarının jelden görüntüsü. ....	78
<b>3.38.</b> TtGSTz geninin üç bağımsız cDNA kalıbı kullanılarak yapılan PZR sonuçlarının agaroz jel analizi. ....	78
<b>3.39.</b> Dot Blot analizi sonucu .....	79

## ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. GST'lerin ana yapıları ve katalitik aktiviteleri .....	5
2.1. <i>TtGSTz'</i> nin nokta mutasyonlarının gerçekleştirilmesi gereken bölgelere özgü primerler ve çalıştığı Tm' ler. ....	28
2.2. Dizi analizine girecek örnekler için PZR kalıp miktar tablosu .....	30
2.3. DTCS karışımı bileşenleri. ....	31
2.4. <i>T.termophila</i> hücrelerinin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> stresi altında morfolojik değişimleri.....	40
2.5. Melezleme standart solüsyonu.....	41

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

cDNA	: Komplementer DNA
DNA	: Deoksiribonükleikasit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
gDNA	: Genomik DNA
GSH	: Glutatyon
GST	: Glutatyon S-transferaz
GSTz	: Glutatyon S-transferaz zeta
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen peroksit
RNA	: Ribonükleikasit
TtGSTz	: <i>Tetrahymena thermophila</i> Glutatyon S-transferaz zeta
TGD	: Tetrahymena genom bankası

## 1. GİRİŞ

Canlılar yaşamlarını sürdürebilmek için oksijene ihtiyaç duyarlar. Bunun için de karbon ve hidrojen zengin besinleri okside ederler (Yanbeyi, 1999). Oksidasyon sonucunda oksijenin dış yörüngesine bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron eklenir ve bu molekül güçlü bir toksine yani bir serbest oksijen radikaline dönüşür (Slater, 1984; Oyanagui, 1991; Frei, 1994; Yanbeyi, 1999). Bu bileşikler de son yörüngelerinde ortak kullanılan elektron içermedikleri için kolayca diğer moleküllerle reaksiyona girerek onları tahrip edebilen bileşikler oluştururlar ve organizmada çok etkili hasarlar meydana getirirler (Ames ve ark. 1993; Holley ve Cheeseman, 1993; Yanbeyi, 1999); örneğin; serbest radikaller ve oksijen türevi serbest radikaller. Bu yapılar, nükleik asitler, serbest amino asitler, proteinler, lipidler, lipoproteinler, karbonhidratlar ve bağ dokusu makromolekülleri de dahil olmak üzere, canlı organizmaların yapısında bulunan hemen hemen bütün sınıflara dahil bileşiklerle reaksiyona girerek çeşitli hasarlar meydana getirirler (Cross ve ark., 1987). Canlılarda bu hasarların oluşmasını engelleyen antioksidan savunma mekanizmaları bulunmaktadır (Ames ve ark., 1993).

### 1.1. Canlılarda Antioksidan Savunma Mekanizmaları

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı canlılarda koruyucu mekanizmalar vardır. Bu mekanizmalardan bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önler. Bu işlevleri yapan maddelerin tümüne birden genel olarak **antioksidanlar** denir (Ames ve ark. 1993; Frei, 1994; Akkuş, 1995; Bast ve ark. 1997; Yanbeyi, 1999; Dikici, 1999). Antioksidanların en belirgin özellikleri okside olan substratlara oranla çok daha az konsantrasyonlarda bile, substratın oksidasyonunu geciktirmeleri ve inhibe etmeleridir (Halliwell ve Gutteridge, 1990; Yanbeyi, 1999). Antioksidanlar, fonksiyonlarına göre sınıflandırıldığında radikal oluşumunu önleyen enzim (katalaz, glutatyon peroksidaz, **glutatyon-s-transferaz (GST)**) ve oluşan radikallerin dokudaki etkilerini önleyen enzim olmayan (E ve C vitamini) antioksidanlar olarak iki kategoride incelenirler (Yanbeyi, 1999).

## **1.2. GST (EC 2.5.1.18)**

GST çok üyeli gen ailesi 1970'li yılların başlarında tanımlanmış olup çeşitli kimyasalların toksik etkilerinin giderilmesini sağlar. GST enzimleri, Glutasyon (GSH) ile çeşitli elektrofilik komponentler arasındaki konjugasyonu katalizleyerek bu elektrofilik komponentlerin hücrel makromoleküllere karşı olan reaktif etkilerini azaltır (Wilce, M.C.J. ve ark. 1994; Strange, R.C. et al. 2000).

### **1.2.1. GSH**

Glutasyon, serbest radikallerin, metallerin ve elektrofilik komponentlerin toksik etkilerinin giderilmesini sağlar. GSH, L-glutamin, L-sistein ve glisin olmak üzere 3 amino asitten oluşan bir peptittir (Wang, W. ve ark. 1998). GSH iki aşamalı bir reaksiyon ile sentezlenir. İlk aşamada L-glutamin ile L-sistein arasındaki reaksiyon  $\gamma$ -glutamilsistein sentetaz tarafından katalizlenir, ikinci aşamada ise GSH sentetaz tarafından katalizlenen reaksiyon ile glutamin- sistein peptidine glisinin de katılması ile GSH sentezlenir (Wang, W. ve ark. 1998).

### **1.2.2. GST enzim ailesinin sınıflandırılması ve isimlendirilmesi**

GST izoenzimleri ilk defa 1960 yılının başlarında sıçan karaciğerinin sitoplazmasında 1,2-dikloro-4-nitrobenzen ve bromosülfoftalein ile GSH arasındaki konjugasyonu katalizlemesi ile bulunmuştur (Booth, J. et.al., 1960). Daha sonraki yıllarda rekombinat DNA tekniklerinin gelişmesiyle sitoplazmik GST'ler, kloroplast ve mikrozomal GST (MAPEG) üyeleri bulunmuştur. GST enzimlerinin pek çoğu sitozolik olmakla birlikte bir kısmı mikrozomal (canlının düz endoplazmik retikulumuna yerleşmiş enzimler) ve bir türü ise mitokondriyaldir (Eaton, D.L. ve ark. , 1999). Mikrozomal ve kloroplast GST'ler sitozolik enzimlerle hiç homoloji göstermeseler de, GST ailesi üyeleri olarak kabul edilmektedir (Stroombergen, M.C. ve ark. 1999). Aynı sınıf üyeleri % 60-



80 benzerlik gösterirken, farklı sınıf üyeleri % 20-30 benzerlik gösterir (Alberti, G. et al., 1996).

GST ailesine ait enzimler yaşayan tüm canlılarda bulunmaktadır. Ama canlı gruplar arasında farklı dağılımlar göstermektedirler. Zeta ve theta gibi bazı GST grupları; bakteri, bitki ve hayvanlarda yaygın dağılım gösterirler. Diğer gruplar ise sadece memelilere (alpha, mu ve pi), bitkilere (phi, tau, lamda ve DHAR), böceklere (delta) ve bakterilere (beta) özgü olup kısıtlı bir dağılım göstermektedir (Frova, C., 2006).

Hücresele GST'ler oniki sınıf altında toplanırlar; (A); Alfa, (M); Mu, (P); Pi, (S); Sigma, (T); Theta, (Z); Zeta, (F); Phi, (U); Tau, (B); Beta, (O); Omega, (L); Lambda, DHAR (Frova, C. 2006). Mikrozomal GST'ler tek formda bulunur ve MAPEG ismiyle bilinir. Kloroplastta bulunan GST'ler de tek formda olup Kappa ismiyle bilinir (Frova, C., 2006).

GST ailesi için isimlendirme 1995 yılında yapılmıştır. GST sınıfları adlandırılırken GST sınıflarının önüne konulan harfler hangi tür olduğunu belirlemektedir. Örneğin; hGST (insan=human), mGST (fare=Mouse). GST'nin sonuna eklenen T,M,Z,A harfleri sınıfları göstermektedir. Örneğin; alfa, GSTA, theta GSTT, zeta ise GSTZ ifade edilir.

### 1.2.3 Enzimin yapısı ve katalitik fonksiyonu

#### **Yapısı:**

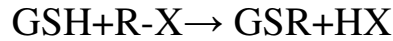
Mikrozomal GST enzimlerinin trimerik formda olduğu bilinmesine karşılık yapısı hakkında çok fazla detay henüz bilinmemektedir. Kloroplast GST'lerin yapıları hakkında ise aynı şekilde pek fazla bilgi bulunmamaktadır, sadece dimerik formda oldukları bilinmektedir. Sitoplazmik GST enzimleri ise, dimerik yapıda olup 23-30 kDa molekül ağırlığında, 200-250 adet aminoasitten oluşan 2 alt birimden oluşur. Sitoplazmik GST'lerin her dimerinde birbirinden bağımsız olarak hareket eden iki aktif bölge vardır. Bu aktif bölgelerden biri **“hidrofilik G bölgesi”** olup GSH'nin bağlandığı bölgeyi oluşturur. Diğerisi ise **“hidrofobik H bölgesi”** olup elektrofilik substratların bağlanmasını sağlar (Wilce, M.C.J. ve ark. 1994; Eklund, B.I. et al. 2002). G bölgesi GSH'ın

bağlanması için tüm GST sınıflarında korunmuştur. H bölgesi ise GST sınıfları arasında oldukça farklılık gösterir ve çok çeşitli substratları bağlama özelliğine sahiptir (Eaton, D.L. ve ark. , 1999;Sheean, D. et al., 2001).

Tüm GST ailesine ait enzimlerin üç boyutlu yapılarında thioredoxin fold yapısını göstermektedir. Thioredoxin fold yapısında N-terminal domain  $4\beta$  ve  $3\alpha$ , C-terminal domainin da ise  $\alpha$ -heliks kıvrımlarından oluşmaktadır (Allocati N.1999). Ayrıca bu iki domaini birbirine bağlayan ve 8 amino asitten oluşan bir linker dizi (85-92) bulunmakta ve 88. pozisyondaki amino asit olan lösinin (Leu) iki domainin bağlandığı noktada bulunmaktadır (Polekhina, G., 2001). Linker dizi prolin (Pro)'ce zengindir (Allocati, N., 1999).

### **Fonksiyonu:**

GST genel olarak;



reaksiyonunu katalizler (Armstrong, R.N., 1997;Eaton DL. ve ark. , 1999;). Burada GSH, substratı; R-X ise elektrofilik bir gruba sahip hidrofobik bir bileşiği göstermektedir.

Enzimin fonksiyonu, elektrofilik substrata ve GSH'a bağlanarak substratı GSH'a yakın bir konuma getirmek ve GSH'ın elektrofilik substrata bağlanması için GSH'ın sülfidril grubunu aktive etmektir. Böylece hücre içi toksik etkilerin giderilmesini sağlar.

Bu fonksiyonunun dışında çeşitli katalitik fonksiyonları da tanımlanmıştır. Bunlar; nükleofilik aromatik yer değiştirme reaksiyonları, hücre içerisinde taşıyıcı (carrier) protein olarak davranmaları, izomerizasyon reaksiyonları ve çok az GST sınıfında bulunan peroksidaz reaksiyonlarıdır (Eaton, D.L. ve ark. , 1999).

Yukarıda belirtildiği gibi GST sınıfları arasında katalitik reaksiyonları ve üç boyutlu yapıları arasında farklılıklar bulunmaktadır. Bu durum Çizelge 1.1'de daha detaylı olarak gösterilmiştir.

**Çizelge 1.1.** GST'lerin ana yapıları ve katalitik aktiviteleri (Frova, C., 2006).

<b>Sınıf</b>	<b>Üç boyutlu yapı</b>	<b>Aktif bölge</b>	<b>Katalitik aktivite</b>				
			<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>d</b>	<b>e</b>
<b>Alpha</b>	Dimer	Tirozin	+	+	+	-	-
<b>Mu</b>	Dimer	Tirozin	+	+	+	-	-
<b>Pi</b>	Dimer	Tirozin	+	+	+	-	-
<b>Sigma</b>	Dimer	Tirozin	+	+,-	+	-	-
<b>Theta</b>	Dimer	Serin	+,-	+	?	?	?
<b>Zeta</b>	Dimer	Serin	+,-	+	+	-	-
<b>Delta</b>	Dimer	Serin	+	?	?	?	?
<b>Phi</b>	Dimer	Serin	+	+	+	-	-
<b>Tau</b>	Dimer	Serin	+	+	-	-	-
<b>Beta</b>	Dimer	Serin	+	?	?	+	?
<b>Omega</b>	Dimer	Sistein	+,-	-	-	+	+
<b>Kappa</b>	Dimer	Serin	+	+	?	?	?
<b>Lamda</b>	Monomer	Sistein	-	-	?	+	?
<b>DHAR</b>	Monomer	Sistein	-	-	?	+	+
<b>Mikrozomal</b>	Trimer	Tirozin					

Katalitik aktivite: **a**, GSH transferaz; **b**, peroksidaz; **c**, izomeraz; **d**, thiol transferaz; **e**, dihidroaskorbat redüktaz

Çizelge 1.1'de görüldüğü gibi GST ailesi üyeleri aynı aile içerisinde yer almalarına rağmen çeşitli farklılıklar göstermektedir. Üç boyutlu yapıları karşılaştırıldığında alpha, mu, pi, sigma ve MAPEG aktif bölgelerinde tirozin amino asidini bulundururken; theta, zeta, beta, delta ve phi ise aktif bölgesinde serin amino asidini bulundurmaktadır. Ayrıca omega, lamda ve DHAR ise aktif

bölgesinde sisteini bulundurmaktadır. Sınıfların katalitik aktiviteleri de farklılık göstermektedir. Sınıflara ait özellikler aşağıda kısaca tanımlanmıştır:

**Alpha sınıfı;** bazı sınıflarında katalizledikleri reaksiyonlardan GSH transferaz, peroksidaz ve izomeraz aktivitesini yapmaktadır.

**Mu sınıfı;** alpha sınıfı gibi katalitik reaksiyonlardan GSH transferaz, peroksidaz ve izomeraz reaksiyonlarını katalizlemektedir.

**Pi sınıfı;** mu ve alpha sınıfı GST'lerin katalizledikleri genel reaksiyonları katalizlemektedir.

**Sigma sınıfı;** çoğu sınıfın katalizlediği reaksiyonlardan GSH transferaz ve izomeraz reaksiyonlarını gerçekleştirmektedir. Ayrıca çok fazla olmamakla beraber peroksidaz aktivitesi de göstermektedir.

**Theta sınıfı;** peroksidaz olarak görev yapar ve çok az olmakla beraber GSH transferaz fonksiyonuna sahiptir.

**Delta sınıfı;** sadece böceklerde bulunur ve GSH transferaz fonksiyonuna sahiptir.

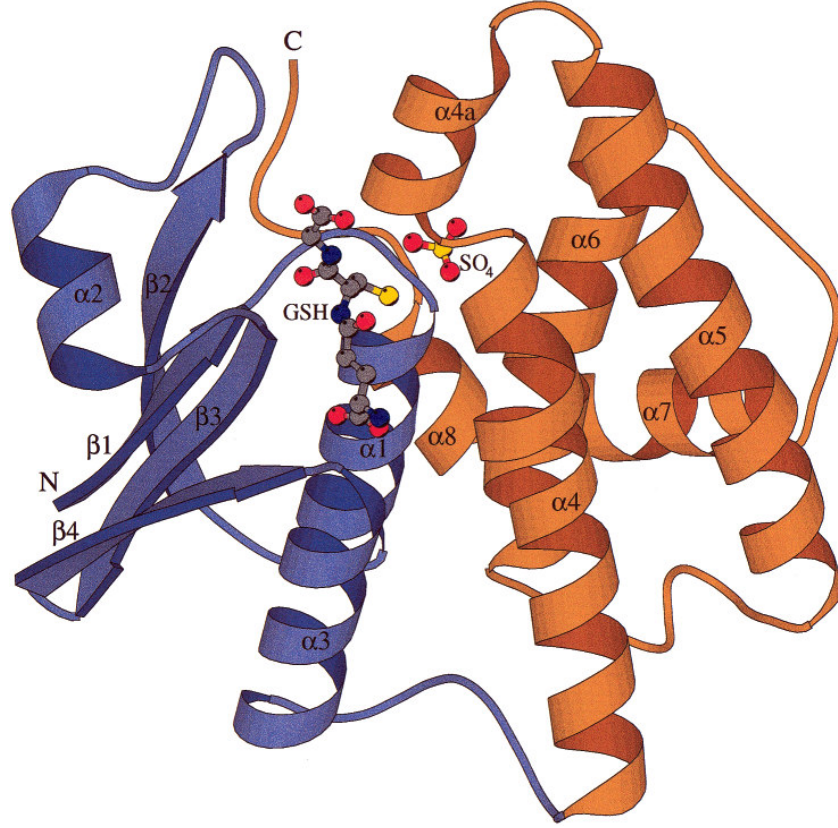
**Phi sınıfı;** GSH transferaz, peroksidaz ve izomeraz aktivitesi göstermektedir.

**Tau sınıfı;** GSH transferaz ve peroksidaz aktivitesi göstermektedir.

**Zeta sınıfı** GST'lere detaylı olarak aşağıda değinilmiştir.

#### 1.2.4. Glutasyon S Transferaz Zeta (GSTz)

Bu sınıf GST'ler diğer GST sınıflarının aksine bitkiler, böcekler ve memelilerin bulunduğu çok çeşitli türlerde bulunmaktadır (Blackburn, A.C. et al., 1998 ve 2001). Diğer sitoplazmik GST sınıfları ile kıyaslandığında, üç boyutlu yapısı ve amino asit dizi benzerliği türler arasında en iyi korunan sınıf GSTz'dir (Board, P.G. et al. , 2001). GST zeta izoenzimi, diğer GST enzimleri ile çok az dizi benzerliği gösterse de GST sınıfına ait karakteristik üç boyutlu yapıya sahip olması nedeni ile bu ailenin bir üyesi olarak kabul edilmektedir (Thom, R.et al. , 2001; Polekhina, G. et al., 2001).



**Şekil 1.1.** GSTz' nin üç boyutlu yapısı (**Mavi bölge:** N-terminal domain, **Kırmızı bölge:** C-terminal domain, **GSH:** Glutatyon, **N:** N-terminal, **C:** C terminal,  **$\alpha$ :** heliksler,  **$\beta$ :** plaklar) (Polekhina, G. et al., 2001).

GSTz proteini yaklaşık 24 kDa'lık iki alt üiteden meydana gelmiştir (Blacburn, A.C., 1998). Her alt üite de iki ayrı domainden oluşmaktadır; N-terminal ve C-terminal domainleri. N-terminal domain daha küçük olup yaklaşık olarak 84 amino asitten oluşmuştur. C-terminal domain ise daha büyük olup yaklaşık 127 amino asitten oluşmuştur. N-terminal domain hem helikal hemde  $\beta$ -zincirinden oluşmuştur, ancak C-terminal domain sadece helikal zincirlerden oluşmuştur. Bu iki domain arasında 8 amino asitten oluşan bir bağlayıcı (linker) dizi ile bulunmaktadır (Thom, R. et al., 2001; Polekhina, G. et al., 2001).

### **N-terminal Domain**

N-terminal domain yapısının merkezinde,  $\alpha$ -sarmallarının arasında sandviç gibi sıkıştırılmış 4 adet  $\beta$  tabakası bulunmaktadır.  $\beta$  zincirleri;  $\beta$ 2,  $\beta$ 1,  $\beta$ 3,  $\beta$ 4

paralel sırayla düzenlenmişlerdir ve  $\beta 3$  diğerlerine tersparalellik gösterir. N-terminal domainde bir yanda 4 tane  $\beta$  zinciri ve 2  $\alpha$  ( $\alpha 1$  ve  $\alpha 3$ ) sarmalı bulunur diğer yanda ise düzensiz bir loop bölgesi vardır.  $\alpha 3$  heliksi  $\alpha 1$  heliksine hemen hemen paralel olarak uzanmaktadır.  $\alpha 3$  heliksinin sonunda Pro 85 ile başlayan 8 amino asitten oluşan bir bağlayıcı (linker) bölge vardır. Linker dizisi proline zengin olup N-terminal domain ile C-terminal domainin bağlanmasını sağlar (Thom, R.et al., 2001; Polekhina, G. et al., 2001).

### **C-terminal Domain**

Daha büyük olan C-terminal domain tamamen helikslardan oluşmuştur. İlk iki heliks  $\alpha 4$  heliksi ve  $\alpha 5$  heliksi aşağıdan yukarı yerleşimlidirler.  $\alpha 4$  heliksinin  $\alpha 4a$  ve  $\alpha 4$  olarak adlandırılan iki heliksten oluştuğu bilinmektedir. Bunlar Pro 112 amino asiti ile  $3_{10}$  heliks kıvrımı aracılığı ile bağlanmışlardır. Bu bağlantı  $\alpha 4a$ 'nın  $\alpha 4$ 'e hemen hemen dikey olarak yönelmesine yol açmaktadır.  $\alpha 4a$  ile  $\alpha 5$  helikslerini 27 amino asitlik bir dizi birbirine bağlar.  $\alpha 5$ 'in loop bölgesindeki 13 amino asitlik bir bölge ile  $\alpha 5$  heliksi S şeklinde bir kıvrım ile  $\alpha 6$  heliksine bağlanır.  $\alpha 6$  heliksi de  $\alpha 4a$  heliksine paralel olarak uzanmaktadır.  $\alpha 6$  heliksi  $\beta$ -kıvrımı dizisi ile  $\alpha 7$  heliksine bağlanır.  $\alpha 7$  heliksi,  $\alpha 8$  ve  $\alpha 6$  helikslerinin her ikisine de dikey olarak uzanmaktadır (Thom, R.et al., 2001; Polekhina, G. et al., 2001).

### **Aktif Bölge**

Diğer GST sınıflarının üç boyutlu yapıları ile benzer şekilde yapılaşma gösteren aktif bölge GSH ile substratlarının bağlanma bölgesinden oluşmuş olup N-terminal domainde  $\alpha 1$  ve  $\alpha 3$  helikslerinin sonu ve C-terminal domainde ise  $\alpha 4$  ve  $\alpha 6$  (H bölgesi olarak) helikslerinden oluşmuştur. N-terminal bölge GSH bağlamak için çeşitli amino asitler içerir. Aktif bölgenin substrat bağlayan H-bölgesi C-terminal domainin  $\alpha 4$  ve  $\alpha 6$  amino asitlerinden oluşmuştur. Diğer GST sınıflarına oranla GST zeta H bölgesi daha az hidrofobiktir (Thom, R.et al. , 2001; Polekhina, G. et al. ,2001). Zeta dizi analizi çalışmaları bu bölgede iki tane serin (Ser 17 ve Ser 18 ), bir tane sistein (Cys 19) ve bir tane tirozin (Try 12) amino asidi olduğunu göstermiştir. Bu amino asitler tüm türlerde oldukça korunmuş olup katalitik açıdan çok önemlidir. Yapılan analizler oldukça korunmuş olan Tyr

12'nin aktif bölgeye oryantasyon açısından çok uzak olduğunu göstermiştir. Ser 17 amino asidinin bölgeye özgü mutasyon çalışmaları ile enzimin katalitik fonksiyonunda anahtar özelliğe sahip olduğu görülmüştür. Bu serin amino asitinin görevi GSH'ın sülfidril grubunu kataliz için doğru pozisyona getirmektir. Bu amino asit GST zeta enziminin anahtar amino asitidir. Oldukça korunmuş olan Ser 18 ve Cys 19 aktif bölgeye doğru yönelmiştir ancak onların rolleri tam olarak bilinmemektedir (Thom, R. et al. , 2001; Polekhina, G. et al., 2001).

### **Zetanın fonksiyonu**

Yapılan çalışmalar GST zeta'nın dikloroasetat (DCA) ve fluoroasetatında içinde bulunduğu birçok  $\alpha$ -haloasidin metabolizmasını katalizlediğini göstermiştir (Blackburn, A.C. et al., 2001). Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalar tirozin metabolizmasında önemli bir rolü olan maleyloasetoasetat izomerazın (MAAI), GSTz olduğunu göstermiştir (Lantum, H.B. et al., 2003).

## **1.3. Araştırma organizması *Tetrahymena thermophila***

### **1.3.1. *Tetrahymena thermophila* sistematigi**

*Tetrahymena thermophila*, ökaryotik protistaların ana evrimsel kolu olan Alveolatlar içerisinde yer alır (NCBI, Taxonomy ID: 312017). Alveolatlar 3 ana soya ayrılırlar: Siliatlar (Örn; *Tetrahymena* ve *Paramecium*), Dinoflagellatlar (Örn; *Symbiodinium* ve *Alexandrium*) ve yalnızca parazit olan Apicomplexa (Örn; *Plasmodium falciparum* ve *Toxoplasma gondii*). *Tetrahymena thermophila* siliatlar içerisinde yer alır (Nanney, D.L. ve ark. 1953).

*Tetrahymena*, Eukaryota; Alveolata; Ciliophora; Intramacnucleata; Oligohymenophore; Hymenostomatida; Tetrahymenina; Tetrahymenidae; Tetrahymena (NCBI, Taxonomy Browser) şeklinde sınıflandırılır. *Tetrahymena* genusu incelendiğinde yaklaşık 50 tür bulunmaktadır.

### 1.3.2. *Tetrahymena thermophila* biyolojik yapısı

*Tetrahymena thermophila* tatlı sularda serbest yaşayan bir organizmadır. Hücrelerin büyüklüğü anterior-posteriorda 40-50 µm uzunluğundadır. Diğer siliatlar gibi *Tetrahymena thermophila* da karmaşık özelleşmiş hücre yapılarına sahiptir. Hücre bölünmesi yaklaşık 2-3 saat sürmekte olup, eukaryotlarda görülen en hızlı bölünmedir. Tanımlanmamış bakteriyal veya steril besiyerlerinde kolayca ve yüksek yoğunlukla üretilmektedir. *Tetrahymena thermophila* 12–41 °C gibi büyük bir sıcaklık aralığında yaşayabilmektedir. Çok güçlü aktif taşıma mekanizmalarına sahiptir. Hayat döngüsündeki seksüel aşamayı ise konjugasyonla yapmaktadır (Nanney, D.L. ve ark.1953).

Ayrıca Mendel genetiğine uygunluğu ve özel çaprazlamalar ile tüm-genom homozigotluğunun elde edilebilirliği, tipik ökaryotik organel yapısı, küçük genom (mikronükleus  $2n=10$  ve makronükleus 45 ploid (~225 kromozom)), tek hücre yapısı, translasyon sonrası aminoasit modifikasyonları, hücre yüzeyi protein sunumu, proteinlerin hücre dışına salınabilirliği ve heterolog protein üretimine uygunluğu *Tetrahymena thermophila*'nın önemli bir ökaryotik protein üretme konakçısı olabileceğini göstermektedir (Eisen, J.A. ve ark. 2006).

### 1.3.3. *Tetrahymena thermophila*'nın önemi

*T. thermophila* serbest olarak doğada yaşamasından dolayı çevre ile tek bir hücre arasındaki etkileşimin nasıl olduğunu anlamaya yardımcı olabilecek biyolojiye sahip olmasıyla temel ve tıbbi bilimler açısından oldukça önemlidir. Tek hücreli bir hayvan olan *Tetrahymena thermophila*'nın laboratuvar şartlarında kolaylıkla üreyebilen organizma olduğu öğrenildikten sonra, ökaryotik model bir organizma olarak kullanımı yaygınlaşmıştır. Ayrıca tamamlanmış genom projesi kullanılabilirliğini artırmıştır (Eisen, J.A. ve ark. 2006).



#### **1.4. Amaç**

Bu çalışmanın amacı, tek hücreli silli ökaryotik organizma olan *T. thermophila*'dan toksisiteyi giderici Glutatyon-S-transferaz zeta geninin klonlanması ve deneysel karakterizasyonudur.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Çalışma organizması: *Tetrahymena thermophila*

Çalışmada, *Tetrahymena thermophila* SB210 hücre suşu kullanılmıştır. SB210 suşu, “Tetrahymena Genom Projesi”nde kullanılmış olan suştur ve Dr. Eduardo Orias (orias@lifesci.ucsb.edu) tarafından sağlanmıştır.

#### 2.1.2. Çalışmada kullanılan besi yerleri

**PPY:** 10 gr Proteas pepton (FLUKA Katalog no:82450), 1,5 gr Yeast extract (MERCK Katalog no:1.03753) üzerine 600 ml su içerisinde iyice karıştırılır. Daha sonra üzerine 1 ml %0,27 FeCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O solüsyonu (0.27 gr FeCl<sub>2</sub> 100 ml H<sub>2</sub>O içerisinde çözülerek hazırlanır) eklenir. Toplam hacim 1 lt olacak şekilde H<sub>2</sub>O ile tamamlanır.

**LB:** 10 gr tripton (SİGMA Katalog no: 104.K001), 5 gr Yeast extract (MERCK Katalog no:1.03753) ve 5 gr NaCl (MERCK Katalog no:1.06480) karışımı 600 ml H<sub>2</sub>O ile çözülür. Daha sonra pH: 7.4'e ayarlanır. pH ayarlamak için 5M NaOH (Riedel de haen Katalog no:0623) kullanılır. Toplam hacim 1 lt olacak şekilde H<sub>2</sub>O ile tamamlanır.

#### 2.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasallar

- **Ampisilin:** 1000x ampisilin stok solüsyonu (Harmful Katalog no:A 0104) kullanılmıştır.
- **Etidyum bromür:** 10 mg/ml stok solüsyonu hazırlandı.(SİGMA Katalog no: E 8751)
- **Tris :** MERCK Katalog no: 1.08387
- **Tris HCL:** SİGMA Katalog no:05432
- **EDTA:** FLUKA Katalog no: 03620

- **İzopropanol:** Riedel de haen Katalog no: 24137
- **NaOAc ( Sodyum orta asetat):**
- **TE:** Tris ve EDTA
- **Etanol** (Riedel de haen Katalog no:071029): Farklı konsantrasyonlarda etanoller kullanıldı (% 70, % 75, % 90 ve % 100).
- **DNaz:** PROMEGA Katalog no:M610A RQI 1U/ $\mu$ L
- **Fenol-Kloroform-İzoamilalkol:** SİGMA
- **Kloroform:** Sigma, Katalog no:C2432
- **X-Gal:** (Bio Basic Katalog no: 12872) 50 mg/ml hazırlandı (N-N dimetilformamide SİGMA Katalog no:38H0812)
- **CaCl<sub>2</sub>** (Kalsiyum Klorür): (Harmful, Katalog no:C0904) 7.34 gr CaCl<sub>2</sub> üzerine 1lt H<sub>2</sub>O eklenir.
- **Gliserol:** % 80'lik gliserol kullanıldı.
- **RNaz:** SİGMA Katalog no: 103K7660
- **10X TBE:** 108 gr trizma base (Sigma katalog no: 114K5415) ve borik asit (Fluka) 600 ml H<sub>2</sub>O da iyice çözülür. Daha sonra üzerine 40 ml 0.5M EDTA (FLUKA Katalog no: 03620) eklenir. Toplam hacim 1 lt' ye tamamlanır.

#### 2.1.4. Çalışmada kullanılan cihazlar

- **Etüv:** GENHART firmasına ait THERMO SHAKER THO 220 etüvü kullanıldı.
- **Santrifüj:** THERMO IC santrifüj, BECKMAN COULTER firmasına ait microfuge 22R türü soğutmalı santrifüj ve BECKMAN COULTER Avanti J 30I kullanıldı.
- **Otoklav:** Eastern Medical firmasına ait Vertical Autoclave tip otoklav kullanıldı.
- **PZR Aleti:** BİORAD firmasına ait iCycler thermal model PZR aleti kullanıldı.
- **Agaroz Jel Elektroforezi:** Thermo EC25090
- **UV Jel Görüntüleme:** Uvitec M02 4611

- **pH Metre:** Orion
- **Vortex:** IKA MS2
- **Su banyosu:** Memmert D-91126
- **Isı bloğu:** Thermoblock Clifton B11
- **Nanodrop spektrofotometre:** Metek ND-100
- **Spektrofotometre:** UV-2101 PC Shimadzu
- **Terazi:** Ohaus pro AV812

#### 2.1.5. Çalışmada kullanılan kitler

- **QIAquick PZR purification kiti** (QIAGEN cat no: 268106)
- **QIAGEN plazmid mini kit** (QIAGEN cat no: 12123)
- **pGEMTeasy vektorsistemi** (PROMEGA cat no: 212440)
- **RevertAid first strand cDNA sentez kiti** (Fermentas cat no: K1622).

Kit için kullanılan kimyasallar aşağıda belirtildiği gibidir:

- **Kullanılan reaksiyon tamponu:** 5x M-MLV RTase Buffer; 250 mM Tris-HCl (Promega Cat. No: M531)
- **RNazin ribonükleaz inhibitörü:** 2500 U, Konsantrasyon: 40 u/μl (Promega Cat. No: N2511)
- **M-MLV RTaze büyüklüğü:** 50 000 U, Konsantrasyon: 200 U/μl (Promega Cat. No: M1705)
- **Oligo dT18primer:** 5'CTTAATTTTTTTTTTTTTTTT3', Melting Temp: 36 °C

#### 2.1.6. Çalışmada kullanılan DNA polimeraz setleri

Fermentas Taq polimeraz seti (5u/μl) ve Pfu polimeraz seti (2,5 u/μl)

## 2.2.Yöntemler

### 2.2.1. Biyoinformatik analizlerde kullanılan programlar

*T.thermophila* Glutasyon-s-Transferaz Zeta'ya ait bilgileri değerlendirebilmek için çeşitli biyoinformatik programlar kullanılmıştır. Bunlar;

Tetrahymena Genom Veritabanı (TGD): [www.ciliate.org](http://www.ciliate.org)

GeneTool (Versiyon 1.0): Gene ait restriksiyon analizi, primer tasarımı gerçekleştirilmesi gereken nokta mutasyonlarının belirlenmesi, yatay ve dikey hizalamalarda bu program kullanılmıştır.

PepTool: Sınıflar arasındaki benzerlikleri, aa dizi bilgileri kullanılarak belirlenmiştir.

ClustalW(1.83), dikey hizalama ve ağaç analizlerinin oluşturulacağı programlara veri hazırlanmasında kullanılmıştır.

MEGA programı ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

SWISS-MODEL programı ile TtGSTz'nin üç boyutlu tahmini yapı analizi yapılmıştır.

### 2.2.2. *T. thermophila* hücrelerinden genomik DNA izolasyonu

Taze olarak hazırlanan 100 ml steril PPY besiyerine *T. thermophila*'ya ait hücre kültüründen ekim yapılmış ve 120 rpm'de 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda; izolasyon öncesi bulanıklık, koku ve mikroskopik incelemeler ile kontaminasyon varlığı kontrol edilmiştir.

#### **Genomik DNA izolasyonu protokolü:**

- 1) Hücreler 16 saat büyütülmüştür.
- 2) Gelişim istenilen düzeye erişince, 25 ml' lik hücre kültürü alınmış ve 10 mM Tris-HCl pH 7.5 ile yıkanmıştır.
- 3) 25 ml' lik yıkanmış hücre kültürü 7000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiştir.
- 4) 0.5 ml süpernat tüpte bırakılarak geri kalan süpernatant uzaklaştırılmıştır.

- 5) Pelet kalan sıvı içerisinde yavaş bir biçimde çalkalanarak homojenize edilmiştir.
- 6) Hücre süspansiyonuna kendi hacmi kadar fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) ilave edilmiş ve yavaşça ters-düz edilmiştir.
- 7) 15 dk. 3500 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- 8) Üstteki sıvı tabaka pastör pipetiyle (veya ağzı jilette kesilen 1000 µl'lik mikropipetle) alınmış ve yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- 9) Aktarılan sıvı miktarı kadar tekrar fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) ilave edilmiş ve yavaşça ters-düz edilmiştir (ikinci phenol:chloroform saflaştırması).
- 10) 15 dk. 3500 rpm.de santrifüj edilmiştir.
- 11) Üstteki sıvı tabaka pastör pipetiyle alınmış ve yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- 12) Aktarılan sıvı miktarı kadar tekrar fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) ilave edilmiş ve yavaşça çalkalanmıştır (üçüncü fenol:kloroform saflaştırması).
- 13) 15 dk. 3500 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- 14) Üstteki sıvı tabaka pastör pipetiyle alınmış ve yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- 15) Eşit hacimde izopropil alkol ilave edilmiştir.
- 16) 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir.
- 17) Süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet kurumaya bırakılmıştır.
- 18) Kurutulduktan sonra pelet 100 µl TE ile çözülmüştür.
- 19) Elde edilen genomik DNA; sırasıyla spektrofotometrik ölçüm ve % 0.8'lik agaroz jeldeki görüntüsüne göre; kalitesi, RNA kontaminasyonu ve bütünlüğü açısından kontrol edilmiştir (Gaertig et al., 1994; Christine Marsala, 1997).

### 2.2.3. *T.thermophila* total RNA izolasyonu:

Bölüm 2.2.2'de bahsedildiği şekilde büyütülen hücre kültürleri 7000 rpm'de 10 dakika santrüflülmüştür. Süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre çökeltisinde TRI reagent kullanılarak (Sigma) total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

#### **TRI solüsyonu ile total RNA izolasyonu (Tri Reagent)**

- 1) *T. thermophila* kültürü yaklaşık 20 ml PPY ortamına ekilip 37°C' de 48 saat gelişime bırakılmıştır.
- 2) Hücreler 7000 rpm'de 10 dk santrüflülmek üzere pelet haline getirilmiştir.
- 3) Süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- 4) Peletin üzerine 1ml TRI eklenmiş ve karışım sürekli pipetlenerek homojenat elde edilmiştir.
- 5) Homojenat 5 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- 6) Daha sonra, TRI'nin her 1 ml'si için homojenata 200 µl kloroform eklenmiştir.
- 7) Örneklerin ağzı sıkıca kapatılmış ve 15 sn. güçlü bir şekilde çalkalanmıştır.
- 8) Çalkalanan karışım 10 dk. oda sıcaklığında bırakılmıştır.
- 9) 12.000 g'de 15 dk. 4°C santrifüj edilmiştir.
- 10) Renksiz olan üst sıvı faz dikkatlice orta faza dokunmadan alınır ve yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- 11) Ayrılan üst faza 4. aşamada kullanılan TRI'nin her ml'si için 0,5 ml izopropanol ilave edilmiştir.
- 12) Elde edilen numuneler oda sıcaklığında 5-10 dk. bekletilmiştir.
- 13) Örnek 4°C'de, 8dk. ve 12.000 g'de santrifüj edilmiştir. RNA çökeltisinin tüpün dip kısmında jelimsi ya da beyaz bir pelet halinde oluştuğu gözlenmiştir.

- 14) Süpernatant uzaklaştırılmış ve RNA peleti 4. aşamada kullanılan TRI'nin her ml'si için en az 1 ml, %75'lik etanol ilave edilip vortekslenerek yıkanmıştır.
- 15) Yıkanan örnek, 4°C'de, 5 dk., 7500 g'de santrifüj edilmiştir.
- 16) Etanol uzaklaştırılmış ve pelet çeker ocakta 15-20 dk. kurutulmuştur.
- 17) RNA, 80 µl ddH<sub>2</sub>O ile çözülmüştür (Sigma TRI-REAGENT (T9424) Teknik Bülteni).
- 18) Elde edilen total RNA sırasıyla spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve % 0.8'lik agaroz jelde analiz edilmiştir (TRİ-SİGMA teknik bülten).

#### 2.2.4. Total RNA'nın DNaz muamelesi

İzole edilen total RNA kalitesi bakımından spektrofotometrik ve % 0.8 agaroz jelde görüntüleme işlemlerinden sonra eğer DNA ile kontamine olmuş ise DNaz muamelesi gerçekleştirilmiştir.

##### Total RNA'ya DNaz muamelesi

- 1) Hazırlanan RNA süspansiyonu RNase'dan arındırılmış dH<sub>2</sub>O kullanarak 250 µl 'ye tamamlanmıştır.
- 2) 80 µl, 50 mM Tris ( pH 8.8) ve 5.5 µl DNase RQ1 (1u/µl, Promega), enzimi eklenmiştir.
- 3) Karışım 38°C'ye ayarlı su banyosunda 20 dk inkübe edilmiştir.
- 4) İnkübasyon sonunda reaksiyon ortamına 335 µl Fenol:Kloroform:İzoamilalkol (25:24:1) eklenerek karışım vortekslenmiş ve 10 dk spin yapılmıştır.
- 5) Oluşan süpernatant yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- 6) Üzerine 35 µl 3 M Na-O-Ac ve 700 µl saf ethanol eklenmiştir.
- 7) 1-24 saat süreyle -20 °C'de inkübe edilmiştir.
- 8) İnkübasyon sonunda karışım 12.000 rpm'de 5 dk. santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- 9) Pellet çeker ocakta kurutulmuş ve 80 µl dH<sub>2</sub>O ile çözülmüştür.



### 2.2.5. DNA ve RNA'ların spektrofotometre'de ölçümü, miktar ve kalite tayini

DNA ve RNA örneklerinin nanodrop'ta 260 ve 280 nm (nanometre) dalga boylarında ölçümü yapılmıştır. Bu ölçümlerde DNA ve RNA örneklerinin peletleri hangi tampon ile çözülmüş ise o tampon kör olarak kullanılmıştır. Spektrofotometrede okunan değerler ile aşağıdaki formüller kullanılarak RNA ve DNA miktarı saptanmıştır.

$$\text{RNA miktarı} = \text{OD}_{260} \times \text{dilüsyon katsayısı} \times 40 \mu\text{l/ml}$$

$$\text{DNA miktarı} = \text{OD}_{260} \times \text{dilüsyon katsayısı} \times 50 \mu\text{l/ml}$$

### 2.2.6. Toplam RNA'dan geri transkripsiyon (RT) reaksiyonu ile cDNA'nın üretilmesi

Geri transkripsiyon mRNA'dan cDNA'nın elde edilmesi işlemidir. Bu işlem *Moloney Murine Leukemia Virüsü* tarafından kodlanan M-MLV ve *Avian myeloblastosis virus* tarafından kodlanan AMV enzimleri tarafından gerçekleştirilir. Bu enzimler RNA bağımlı DNA polimerazlardır ve bir primerin hibridize olduğu tek iplikli kalıp RNA'ya karşılık gelen cDNA'nın ilk ipliğini sentezlerler. Bu iki enzimde aynı reaksiyonları katalizlemelerine karşı MMLV enzimi AMV enzimine göre daha fazla kullanılmaktadır. Bunun iki nedeni vardır. İlki enzimlerin RNaz H aktivitesi arasındaki farklılıktır. Çünkü AMV enzimi daha yüksek RNaz H aktivitesi gösterir. Bu da normalde sentezlenecek olan toplam ürün DNA'nın boyunu kısaltmaktadır. İkinci ise; M-MLV enziminin daha yüksek sıcaklıklarda çalışmasıdır (Roth 1985; Sambrook 1989).

RT reaksiyonu için Fermentas Revert Aid First Strand cDNA synthesis Kit (# 1622) kullanılmıştır. Tüm basamaklar kit prosedürüne göre yapılmıştır.

İlk olarak RNA izolasyonundan elde edilen RNA örneğinden reaksiyona 5µg girecek şekilde 0.5'lik PZR tüplerine buz içine alınmış ve 1µl oligo dT18 eklenerek son hacim steril distile su ile 12 µl'ye tamamlanmıştır. Reaksiyon tüpü 70 °C' de 5 dk. tutulduktan sonra buza bırakılmıştır. Buz içerisinde reaksiyon tüpüne sırasıyla; 4µl 5x Reaksiyon tamponu, 1µl Ribolock Ribonukleaz inhibitör

ve 2 µl 10 mM dNTP mix eklenmiş ve 37°C' de 5 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 1µl M-MuLV revers transkriptaz enzimi eklenmiştir. Hazırlanan karışımın olduğu tüp önce 42°C' de 60 dk. bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda enzimi inhibe etmek için reaksiyon tüpü 70°C'de 10 dk. inkübe edilmiştir. Süre sonunda reaksiyon tüpü buza alınmıştır. Reaksiyon çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

### **2.2.7. *T.thermophila* GSTz ait spesifik primerlerin tasarlanması**

GSTz'nın deneysel karakterizasyonunu yapabilmek için gen spesifik primerler tasarlanmıştır. Primerler GSTz genine ait dizi bilgisinden yola çıkılarak hazırlanmıştır. Kalıp DNA dizisine tamamlayıcı olan kısımları ortalama olarak 20–30 bç arasında olan dış primerler tasarlanmıştır. Primerlerin Tm değerleri  $[2(A+T)+4(G+C)]-5$  denklemine göre hesaplanmıştır. Dış primerler için Tm değeri 67 °C olarak optimize edilmiştir. Dış primerler ATG başlangıç ve TGA dur kodonlarına karşılık gelen dizileri de içermektedirler. İlgili primerlere ait dizi bilgisi aşağıdaki gibidir:

#### **Gen Spesifik İleri Primer:**

F-TtGSTz

5'- ATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAATTACT- 3'

Tm : 50Mm Na<sup>+</sup> da 67 °C

#### **Gen Spesifik Geri Primer:**

R-TtGSTz

5'GCTGTCAGATCTTTGATTATCAGG- 3'

Tm : 50Mm Na<sup>+</sup> da 65 °C

Tasarlanan primerler üretici firma tarafından toz halinde gönderilmiştir. Bu tozlar gelen primerin bilgi formunda belirtildiği gibi 100 µM'lık stoklar halinde hazırlanmıştır ( F için 81 µl, R için 102 µl dH<sub>2</sub>O eklenmiştir). Hazırlanan stok primerlerden çalışma primerleri de 2.5 µM olacak hazırlanmıştır ( 2.5 µl stok solüsyondan alınmış ve üzerine 97.5 µl steril deiyonize su eklenmiştir). Tasarlanan primerler TtGSTz cDNA ve genomik DNA kopyalarının üretimi için kullanılmıştır.

### **2.2.8. PZR Reaksiyon Koşulları:**

#### **GSTz'nın genomik DNA kopyasının üretimi:**

PZR reaksiyonunda kaynak DNA olarak makronukleus genomik DNA'sı kullanılmıştır. PZR reaksiyonu GSTz spesifik (F ve R) primerlerle kurulmuştur; 2.5 µl 10X tampon, 2.5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µl 2.5 µM dNTP karışımı, 2.5 µl F, 2.5 µl R, 0.5 µl genomik DNA (1.220 ng/µl) , 0.2 µl Taq DNA Polimeraz enzimi (5u/µl) üzerine son hacmi 25 µl olacak biçimde 12.3µl ddH<sub>2</sub>O eklenmiştir.

#### **cDNA kopyasının üretimi:**

PZR reaksiyonunda kaynak DNA olarak daha önceden RT reaksiyonu sonucu elde edilen cDNA kullanılmıştır. PZR reaksiyonu GSTz spesifik (F ve R) primerlerle kurulmuştur; 2.5 µl 10X tampon, 2.5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µl 2.5 µM dNTP karışımı, 2.5 µl F, 2.5 µl R, 0.5 µl cDNA kalıbı (1:10 dilüe), 0.2 µl Taq DNA Polimeraz enzimi (5u/µl) üzerine son hacmi 25 µl olacak biçimde 12.3 µl ddH<sub>2</sub>O eklenmiştir.

**Her iki ürün için kullanılan PZR programı:** 94°C'de 2 dk., 94°C'de 1 dk., 67°C'de 1 dk., 72°C'de 1 dk., 72°C'de 4 dk. ve 4°C'de ∞ olacak şekilde kullanılmıştır

### **2.2.9. Agaroz jel analizi ve jel görüntüleme işlemi**

Agaroz jelde yürütülen DNA parçaları UVP transilluminator cihazında kontrol edilmiş ve UV-Photometer jel dökümantasyon cihazı (UviTec) ile veriler kaydedilmiştir.

### **2.2.10. PZR Ürünlerinin Jelden Saflaştırılması**

RT-PZR sonucu elde edilen ürün ya da ürünlerin agaroz jelde oluşturduğu bantlaşmalara ait büyüklükler uygun marker'lar (genellikle λ DNA EcoRI/HindIII) kullanılarak tespit edilmiştir. Beklenen büyüklüğe (663bç) uygun olan bant jelden kesilerek alınmış ve QIAquick Gel Extraction Kit ve protokolü kullanılarak saflaştırılması kit kullanım kılavuzuna göre gerçekleştirilmiştir.

## 2.2.11. PZR ürününün plazmite ligasyonu

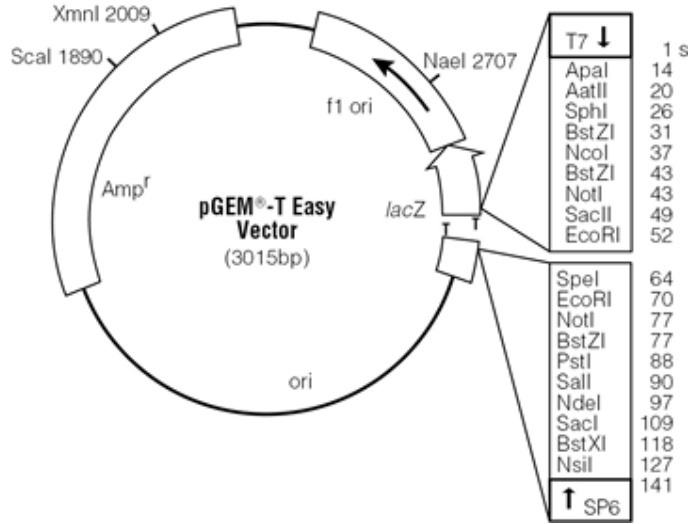
PZR ürününü taşıyıcı plazmite eklemesi T-A klonlanması (plazmitdeki T nükleotid ile Taq polimeraz tarafından PZR ürününün uçlarına eklenen A nükleotidin birleştirilmesi) temeline dayandırılmıştır.

### PZR ürünlerine A ekleme reaksiyonu:

1 µl 10X tampon, 1 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl 2.5 µM dATP, 6.5 µl PZR ürünü, 1 µl Taq DNA Polimeraz ile hazırlanan karışım 70°C 'de 30 dk. bekletilmiş ve sonra PZR ürünü ligasyona alınmıştır.

### Ligasyon:

Klonlama reaksiyonlarında genel olarak pGEMTEasy (Promega) vektörü kullanılmıştır. Vektörler ilgili firmadan temin edilmiştir.



Şekil 2.1. pGEMTEasy (Promega) vektörü.

Ayrıca bu firmanın uygun gördüğü ligasyon protokolü uygulanmıştır. Buna göre: öncelikli olarak reaksiyona girecek insert oranı ng cinsinde hesaplanmıştır. Bunun için aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\frac{\text{Vektör}(50\text{ng}) \times \text{Insert}(kb)}{0.3(kb)\text{vektör}} \times \frac{\text{Insert}(mol)}{\text{Plazmid}(mol)} = \text{kullanılması gereken insert miktarı}(ng)$$

Kullanılması gereken insert miktarı yukarıda formülle hesaplandıktan sonra ligasyon reaksiyonu kurulmuştur. Reaksiyon aşağıda belirtildiği gibidir:

2X Rapid Ligation Bufer	5 µl
pGEM-T Easy Vektör (50ng/µl)	1 µl
İnsert	X µl
T4 DNA Ligase (5u/µl)	1 µl
Deiyonize su	10µl'ye
	tamamlanmıştır.

Reaksiyon, 16 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir.

### 2.2.12. *E.coli* XL-Blue kompetent hücre hazırlığı

Aşağıda belirtilen deney protokolü uygulanmıştır;

- 1) LB agarda gelişim gösteren kolonilerden, tek bir koloni seçilerek 10 ml LB Broth içeren erlene ekilmiş ve 37°C'de 120 rpm'de 20 saat inkübe edilmiştir.
- 2) İnkübasyon sonunda kültürden 0,3 ml (300µl) alınarak 100 ml'lik taze LB Broth'a eklenmiş ve 120 rpm'de 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır.
- 3) İnkübasyon erken logaritmik faza kadar devam ettirilmiştir. Erken logaritmik faza erişen kültürün 550 nm'deki OD alınarak takip edilmiştir. Bu işlem için, inkübasyon başlamasından 70-80 dk. sonra spektrofotometrik ölçümler belirli aralıklarla yapılmaya başlanmıştır. Spektrofotometri ölçümleri için dH<sub>2</sub>O kör olarak kullanılmıştır.
- 4) Kültürün 550 nm'deki OD değeri 0.56'ya ulaştığında, kültürün 50 ml'si falkon tüpüne aktarılmış ve 4°C'de 5000 g'de 5dk. santrifüj edilmiştir. Geriye kalan 50 ml'lik kültür kullanılmak üzere muhafaz edilmiştir.
- 5) Santrifüj sonunda oluşan süpernatant uzaklaştırılmış ve tüpün üzerine bekletilen diğer 50 ml' lik kültür boşaltılmıştır. Aynı koşullarda bir kez daha santrifüj edilmiştir.
- 6) Santrifüj sonunda süpernatant tamamen uzaklaştırılmıştır.
- 7) Pelete, orijinal kültür hacminin yarısı kadar (50 ml) soğuk 50mM CaCl<sub>2</sub> ile resüspanse edilmiştir.

- 8) Karışım 15 dk. buzda bekletilmiştir.
- 9) Sürenin sonunda karışım 4°C'de 5000 g'de 10 dk. tekrar santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır.
- 10) Pelet, orijinal kültür hacminin %2.5 kadar soğuk 50mM CaCl<sub>2</sub> ile ikinci kez resüspanse edilmiş ve 0,6 ml (600 µl) gliserol (%80'lik) eklenmiştir.
- 11) Karıştırma bittikten sonra, önceden buzlukta tutularak soğutulmuş olan boş ve steril karyojenik tüplerinin her birine 0,2 ml (200 µl) aktarılmıştır.
- 12) Sürenin sonunda tüpler -80°C'de muhafazaya alınmıştır. Böylece kompetent olmayan XL1-Blue *E.coli* suşu kompetent hale getirilmiştir.

### 2.2.13. Kompetent *E.coli*'nin transformasyonu

Klasik transformasyon yöntemi kullanılmıştır. Buna göre:

- 1) Kompetent hücreler -80°C'den alınmış ve buzda 5 dk. bekletilmiştir.
- 2) Ligasyon sonunda elde edilen ürün hazırlanan kompetent hücrenin üzerine eklenmiş ve kuru buzda 30 dk. bekletilmiştir.
- 3) Süre sonunda örnekler buzdan alınmış ve 42°C'ye ayarlanan ısı bloğuna bırakılmıştır.
- 4) Isı bloğundan alınan örnekler buzda 3 dk. bekletilmiştir.
- 5) Sürenin bitiminde örneklerin üzerine 500 µl LB eklenmiş ve 37 °C'de 35 dk. inkübe edilmiştir.
- 6) Bekleme süresinde ekim yapılacak petrilere 40 µl X-Gal eklenmiştir.
- 7) Süre bittikten sonra 10000 rpm de 2 dk. santrifüj edilmiştir.
- 8) Tüp içerisinde süpernatantan 50 µl kalacak şekilde süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- 9) Pelet 50 µl içerisinde çözülmüş, sonra LB-agar-ampisilin-XGal tabağının yüzeyine dağıtılmış ve bir gece 37 °C'de inkübe edilmiştir.

Klasik transformasyon yöntemiyle gerçekleştirilen transformasyon sonrasında oluşan mavi beyaz kolonilerden beyaz renkli olan kolonilerden 10-20 adet koloni seçilerek numaralandırılmıştır. Aseptik koşullar altında öze yardımıyla

alınarak, önceden hazırlanmış olan 40 µl X-Gal içeren LB Agar Amfisilin (100 µg/µl) petrilere çizgi ekimleri yapılarak master plate oluşturulmuştur. Bu işlemi takiben, özede kalan artık ile 10 ml'lik 100 µg/µl amfisilinli LB medium besiyerine ekim yapılmıştır. X-Gal içeren LB Agar amfisilin tabakları ve LB Medium 37 °C'de bir gece inkübe edilmiştir.

#### **2.2.14. Plazmit izolasyonu**

Uygulama Adımları:

##### **A: Bakterinin büyütülmesi**

- 1) Beyaz kolonilerden plasmit izolasyonu yapılabilmesi için bir gece koloniler 120 rpm'de 37°C'de LB agar ampisilin (100 µg/µl)'de büyütülmüştür. Besiyerleri falkon tüplere aktarılmış ve 8000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- 2) Üzerlerine 1000 µl 50 mM Tris-HCl (pH:8.0) eklenmiştir.
- 3) Vorteks ve pipetleme ile pelet çözülmüş ve eppendorflara aktarılmıştır.
- 4) 1 dakika süreyle 8000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- 5) Sıvı tamamen uzaklaştırılmıştır.

##### **B: Bakteri peletinin parçalanması**

- 1) 150 µl Lizozim-Tris ve 20 µl 0.5 M EDTA (pH 8) karıştırılarak pelet üzerine aktarılmış ve pelet bu solüsyon içinde kürdan ile çözülmüştür.
- 2) 30 dakika buzda inkübe edilmiştir.

##### **C: Plazmit DNA'sının çöktürülmesi**

- 1) Her bir tüpe 400 µl 0.2 M NaOH- %1 SDS (1:1) koyulmuş ve tüpler birkaç kez ters düz edildikten sonra 5 dakika buzda bekletilmiştir
- 2) Sürenin sonunda 300 µl 7.5 M amonyum asetat eklenmiştir. Tüpler yavaş bir şekilde ters düz edilmiştir ve 10 dakika buzda inkübe edilmiştir.

##### **D: Çöken plazmitin saflaştırılması**

- 1) Süre sonunda tüpler buzdan alınarak 15 dakika boyunca 8000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

2) Süpernatant yeni ependorflara aktarılmıştır.

#### **E: Fenol-kloroform uygulaması**

- 1) Süpernatantın üzerine 800 µl fenol+ kloroform:izoamilalkol (25:24:1) eklenmiştir.
- 2) Tüpler çalkalanmış ve çalkalamalı tabla üzerinde 5 dakika karışması sağlanmıştır.
- 3) Süre sonunda tüpler 2 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- 4) Meydana gelen 3 fazdan plazmit içeren en üst faz yeni tüpe aktarılmış ve üzerine her bir süpernatantın hacminin 0.6 katı kadar 2-Propanol eklenmiştir. Tüpler ters düz edilerek karıştırılmış ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 5) Süre sonunda 10 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- 6) Süpernatant uzaklaştırılmış ve pelette kalan sıvısında kuruması çeker ocak altında sağlanmıştır.
- 7) Pelet üzerine 200 µl 0.3 M NaOAc eklenmiş ve pelet bu sıvı içinde dikkatlice çözülmüştür. Hazırlanan bu karışımın üzerine 400 µl saf etanol eklenmiş ve -20°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir.
- 8) Tüpler 10 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilmiş, süpernatant uzaklaştırılmış ve pelet çeker ocak altında iyice kurutulmuştur.
- 9) Pelet 30 µl TE ile çözülmüş ve -20°C'de muhafaza edilmiştir.

#### **2.2.15. Restriksiyon enzimleriyle kesim**

İzole edilen plazmitlerin klonlanması hedeflenen DNA parçasını içerip içermediği saptanması için; plazmit EcoRI (sigma), restriksiyon enzimiyle rutin olarak kesilmiştir. Kullanılan kesim reaksiyonu;

1 µl EcoRI (10,000 u/ml) enzimi (Fermentas)

1 µl 10X EcoRI enzim tamponu

1 µl Plazmit (1.380 ng/µl)

7 µl H<sub>2</sub>O şeklindedir.



Hazırlanan reaksiyon tüpü 37°C’de 1-16 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kesime uğrayan ve içinde klonlanmış DNA parçası içerenler “pozitif koloni” olarak tanımlanmıştır.

### 2.2.16. TtGSTz’nin PZR Temelli Noktasal Mutasyon Reaksiyonları

*T. thermophila* proteinleri, kolaylıkla *E. coli*’de üretilmemektedir. Çünkü *E. coli*’nin kullandığı genetik kodon sözlüğü siliat kodon sözlüğünden farklılık göstermektedir (www.ncbi.nlm.nih.gov). Sillilere ait bir proteinin ekspresyonu için öncelikli olarak ilgili cDNA dizisinin protein okuma çerçevesinde yönlendirilmiş nokta mutasyon yöntemiyle bazı zorunlu değişiklikler yapılması gerekmektedir. Siliat kodon sözlüğüne göre TAA ve TAG kodonları, glutamin (GLN; Q) aminoasitini kodlarken, standart kodon sözlüğünde bu kodonlar “DUR” anlamı taşımaktadırlar (Nanney, DL. 1985). Eğer *E. coli*’de bir siliat geni protein olarak ekspres edilmek istenirse; TAA ve TAG kodonları nokta mutasyonu ile CAA ve CAG’ye dönüştürülerek *E. coli*’ye göre glutamin (GLN; Q) kodlaması sağlanmış olur. Dolayısıyla da *E.coli*’de ekspres edilmesi istenilen bir siliat geninin ekspresyonu, TAA ve TAG kodonları okuma çerçevesi içerisinde bulunduğu sürece kesintiye uğramayacaktır. AT zengini bir genoma sahip olan siliatlarda TAA ve TAG kodonlarına sıklıkla rastlanıldığından, çok fazla sayıda nokta mutasyonu (bir gende yaklaşık 5–30 nokta mutasyonu) yapılma gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Noktasal mutasyonlarının gerçekleştirilmesi gereken bölgelere özgü primerlerin tasarlanırken klasik PZR primerinden farklı olarak primerler kalıp DNA’ya oturarak primer olarak görev yapabilecek özelliğe ve yetkinliğe sahip iki dizi bölgesi içermelidir. Birincisi oligonükleotidin 3’ ucuna oturacak olan priming bölgesi ki burası PZR reaksiyonunda primer olarak görev yapabilecek bölgedir. İkincisi ise oligonükleotidin 5’ ucunda bulunan örtüşme bölgesidir (Ho, S.N. 1989). Bu şekilde hazırlanan, noktasal mutasyonların gerçekleştirilmesi için gerekli primerler Çizelge 2.1’de belirtilmiştir.

**Çizelge 2.1.** *TtGSTz*'nin nokta mutasyonlarının gerçekleştirilmesi gereken bölgelere özgü primerler ve çalıştığı Tm'ler.

<b>Primer</b>	<b>Sekans</b>	<b>TM</b>
eF- Zdış	5' CGCTCGAGATGGCTGGAAAGCTCAAAGAAAATTACT 3'	50°C
eF- Z1	5' AGTGAACAAACTTCTGAAGAA 3'	52°C
eF- Z2	5' AAAATCAATCCTAACCAGGGAGTCCCTGCT 3'	60°C
eF- Z3	5' CTTTCTTTCCTCAAGATGCAGTTAAA 3'	52°C
eF- Z4	5' AGAGCTCAAATTAGAGGCTTTTGC 3'	55°C
eF- Z5	5' CACCCTCTCTCAAATTTGAGGGTGCTT 3'	55°C
eF- Z6	5' GAATATAGCCAAGACAAGATTCAATGG 3'	57°C
eR- Zdış	5' CGAATCCACTCAGATCTTGATTATCAGGATTGTCAGCTTGCTTGCT 3'	60°C
eR- Z1	5' AGAAGTTTGTTCACTCTTCAAAG 3'	52°C
eR- Z2	5' GACTCCCTGGTTAGGATTGATTT 3'	52°C
eR- Z3	5' TGCATCTTGAGGAAGAAGTGGGTGCTC 3'	60°C
eR- Z4	5' TCTAATTTGAGCTCTTAACTGC 3'	52°C
eR- Z5	5' CAAATTTGAGAGAGGGTGGATGGCAGT 3'	62°C
eR- Z6	5' AATCTTGTCTTGGCTATATTCCTTTCAAT 3'	50°C

### **2.2.17. *TtGSTz* cDNA'sının 5' ve 3' Uçlarının Elde Edilmesi (RACE tekniği)**

*T. thermophila* GST zeta'ya ait 5' ve 3' bölgeleri hakkında bilgi edinmek için gene ait EST'lerin Genetool ve Vecscreen programları ile analizleri yapılmıştır. Vecscreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) ile EST dizilerinin taşıdığı vektör parçalarının belirlenmesi sağlanmıştır. Bu parçalar hizalama sırasında kirlilik oluşturduğu için diziden silinmiştir.

#### **2.2.17.1. *TtGSTz* cDNA'sının 3' ucunun elde edilmesi için primer tasarımı**

*T. thermophila* GST zeta cDNA'sının bilinmeyen 3' ucunun elde edilmesi (RACE tekniği, Frohman 1988) için daha önceden nokta mutasyon için tasarlanan ve 3' bölgesine en yakın ileri primer olan F6 primeri kullanılmıştır. Primer sekansı aşağıda belirtildiği gibidir.

F<sub>6</sub>: 5' GAATATAGCCAAGACAAGATTCAATGG 3'  
dT: 5' GACGTCCTAGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'

### **2.2.17.2. TtGSTz cDNA'sının 3' ucunun 3' RACE reaksiyonuyla elde edilmesi**

TtGSTz cDNA'sının bilinmeyen 3'bölgesi 3' RACE tekniği (Frohman 1988; Matz ve ark. 1989; Soimato ve ark. 2001) kullanılarak elde edilmiştir. RT reaksiyonu ile oluşturulan cDNA populasyonu ile F<sub>6</sub> ve dT primer seti kullanılarak PZR yapılmıştır. PZR ürünleri jelden QIAquick Gel Extraction kiti ile saflaştırıldıktan sonra pGEM-TEasy kiti kullanılarak *E.coli*'de klonlanmış ve DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir.

#### **3'RACE Reaksiyonu (25 µl):**

5x tampon 5 µl, dNTP 2 µl, F<sub>6</sub> primer 2,5 µl, dT primer 2,5 µl, steril deiyonize su 12,25 µl, cDNA kalıbı 0,5 µl ve prime star polimeraz (2.5 u/µl) 0.25 µl kullanılarak kuruldu.

#### **3'RACE reaksiyonun PZR programı**

98°C'de 10 saniye, 51°C'de 10 saniye ve 72°C'de 1dk. ayarlı PZR programında 30 tekrarlı yapılmıştır.

### **2.2.18. DNA dizi analizi**

#### **2.2.18.1. Dizi analizi için PZR**

Plazmite eklenmiş olan ve TtGSTz geninin DNA dizisini belirlemek için; plazmit üzerinde bulunan T7 ileri primeri, (dizi bilgisi 5' CGACGTCGCATGCTCCCGGCC 3', Biobasic 100 uM) adı verilen ticari primerin tanıdığı bölgeden yararlanılarak PZR reaksiyonu kurulmuştur.

Öncelikle PZR için kullanılacak kalıp plazmit iyi kalitede saflaştırılmış olmasına ve RNA kontaminasyonun olmamasına dikkat edilmiştir. Plazmitin

konsantrasyonu ve saflık derecesi (OD 260/280 en az 1,8) spektrofotometre yardımıyla belirlenmiştir.

Plazmit ve eklenmiş olan gen parçasının toplam büyüklüğü hesaplanarak PZR reaksiyonuna eklenecek kalıp miktarı optimal değerleri gösteren çizelge 2.2'den saptanmıştır. Saflaştırılmış PZR ürünleri ve plazmitler için 50 fmol kalıp DNA kullanılmıştır.

**Çizelge 2.2.** Dizi analizine girecek örnekler için PZR kalıp miktar tablosu (Beckman Coulter CEQ8000 dizi analizi kiti teknik bülteni)

<b>Büyük­lük (kb)</b>	<b>25 fmol'e denk gelen deęer (ng)</b>	<b>50 fmol'e denk gelen deęer (ng)</b>	<b>100 fmol'e denk gelen deęer (ng)</b>
0.2	3.3	6.5	13
0.3	4.9	9.8	20
0.4	6.5	13	26
0.5	8.1	16	33
1.0	16	33	65
2.0	33	65	130
3.0	50	<b>100</b>	195
4.0	65	130	260
5.0	80	165	325
6.0	100	195	390
8.0	130	260	520
10.0	165	325	650
12.0	195	390	780
14.0	230	455	910
16.0	260	520	1040
18.0	295	585	1170
20.0	325	650	1300
48.0	790	1500	1500

Örneğin, pGEM-T Easy plazmiti 3015 bp ve TtGSTz geni 663 bp dir. Toplam 3678 bp büyüklüğündeki plazmit için kalıp miktarı Beckman Coulter CEQ8000 kitindeki çizelge'ye göre 100 fmol dür (Çizelge 2.2).

Dizi analizi için PZR'ye girecek plazmit DNA'sı 86 ng/µl konsantrasyona sahip olduğu belirlenmiştir.

1 µl stokta 86 ng DNA varsa

X µl stokta 100 ng DNA olmalıdır.

X= 1.05 µl miktarda kalıp DNA PZR için kullanılmıştır.

DNA dizi analizi PZR için (20 µl):

Kalıp DNA (100 ng) 1.05 µl

Deiyonize su 5.95 µl

Primer (T7 primeri) 2 µl

DTCS karışım (çizelge 2.2) 11 µl

Toplam: 20 µl

**DTCS karışımı:** Beckman Coulter CEQ8000 cihazı için kullanılan hazırlık kitinde bulunan bileşenler reaksiyondan önce DTCS mix hazırlığında kullanılmaktadır. Bu karışım A/T zengini veya G/C zengini diziler için farklı şekilde hazırlanır. Dizi analizi için dITP bileşenli karışım kullanılmıştır.

Çizelge 2.3. DTCS karışımı bileşenleri.

Bileşen	dITP	dGTP
10xDizileme Reaksiyon Tamoponu	200 µl	200 µl
dNTP mix	100 µl	100 µl
ddUTP Dye terminator	200 µl	200 µl
ddGTP Dye terminator	100 µl	400 µl
ddCTP Dye terminator	200 µl	200 µl
ddATP Dye terminator	200 µl	200 µl
Polimeraz Enzimi	100 µl	100 µl
Toplam hacim	<b>1100 µl</b>	1400 µl

DNA dizi analizi PCR ısı döngüsü, 0,2 ml'lik PCR tüpüne önce kalıp ve su eklenir. 86°C'de 3 dakika bekletilir ve buza alınarak 1 dakika tutulur. Bu adıma **zorunlu plazmit denatürasyon adımı** denir. Buzda sırasıyla primer ve DTCS karışımı yukarıdaki hacimlerde eklenerek aşağıdaki ısı döngüsü uygulanır.

96°C	20 sn.	} 35 siklus
50°C	20 sn.	
60°C	4 dk.	

### 2.2.18.2. Etanol çöktürmesi

Çalışmamızda kullanılan (Beckman Coulter DNA Dizi Analizi) cihazına ait dizi analizi kitinin teknik bültenine göre dizi analizine girecek PZR ürünlerinin etanolle çöktürülüp saflaştırılması yapılmıştır.

1,5 ml'lik steril ependorf tüpleri isimleriyle etiketlenmiştir. Tüplere 4 µl **stop solüsyonu** ve 1 µl 20 µg/µl glikojen (Kit'ten) eklenmiştir.

**Stop Solüsyonu:** 3M NaOAc (pH:5.2) ile 100mM Na<sub>2</sub>EDTA ( pH:8.0) eşit hacimde karıştırılmasıyla hazırlanır. Bu karışım oda ısısında yapılmış ve kullanmadan hemen önce taze olarak hazırlanır.

Yukarıda hazırlanmış solüsyon PCR ürünlerine eklenmiş ve pipetleyerek çok iyi karıştırılır. Taze olarak hazırlanmış ve -20°C'de bekletilmiş %95'lik etanolden 60 µl pelete zarar vermeden yavaşça eklenir. Tüpler 4°C'de 14,000 rpm'de 15 dk. santrifüjlenir ve dipte oluşan pelet rahatsız edilmeden süpernatant dikkatli şekilde uzaklaştırılır.

Pelete 200 µl taze olarak hazırlanmış ve -20°C'de bekletilen %70'lik etanolden pelete zarar vermeden tüplerin kenarından çok yavaş biçimde bırakılır. Tüpler 4200 µl 14,000 rpm'de 2 dk. santrifüjlenir ve dipte oluşan pelet rahatsız edilmeden süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılır. Bu işlem iki kez tekrarlanır.

Süpernatant dökülür, tüp içindeki pelet şeffaf hale gelinceye kadar 40°C'de 10 dk. konsantre edilir. Pelete 40 µl SLS (Sample Loading Solution-Kit'ten)

eklenir ve 10 dakika buzda bekletilir. İyice pipetleyerek pelet çok iyi çözülür ve santrifüjde kısa bir spin atılarak 4°C'ye kaldırılır.

### **2.2.18.3. DNA dizi bilgisinin elde edilmesi**

Cihazın içinde örnek tablası ve tampon tablası adında iki aparat bulunmaktadır. Örnek tabağına 40 µl SLS içeren örnekler sırasıyla eklenir ve üzerlerine kit içinden birer damla mineral yağ damlatılır. Tampon tablasına da yine kit içinden ayırma tamponu, kuyucukların %70'ini dolduracak kadar eklenir ve kapiller aparatı ile jel tüpü cihaza takıldıktan sonra dizi analizi işlemine başlanır. Dizi analiz sonucunda cihaz tarafından okunan veriler bir metin belgesine kaydedilir.

### **2.2.18.4. Biyoinformatik analizi**

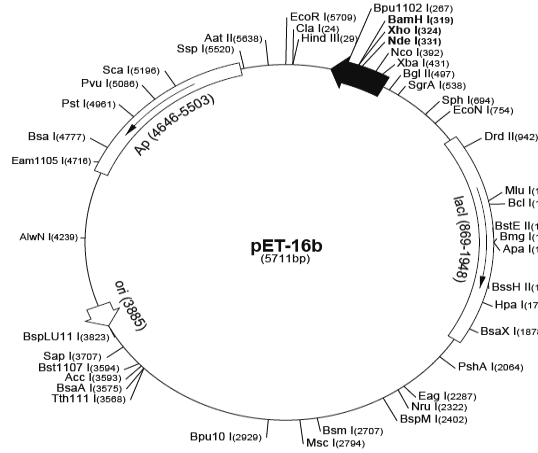
Dizi analizi sonucunda elde edilen dizi değişik biyoinformatik programlarla (GeneTool, PepTool ve İnterproscan) ile GenBankasında BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:BLAST>) (Altschul, 1990) analiz edilmiştir.

### **2.2.19. TtGSTz'nın *E.coli*'de rekombinant protein olarak üretilmesi ve SDS-Page ile analizi**

Rekombinant protein ifadesinin yapılabilmesi için gerekli nokta mutasyonları gerçekleştirilen TtGSTz protein ifadesinin yapılması birkaç adımdan oluşur. Bunlar;

#### **TtGSTz'nın ekspresyon plazmitine aktarılması:**

Ekspresyon plazmiti olarak Şekil 2.2'de belirtilmiş olan pET16b vektörü kullanılmıştır.



**Şekil 2.2.** pET-16b vektörünün şekli ( Novagen pET-16b vector (Cat. No. 69662-3)).

Bu vektörün kullanılabilmesi için öncelik olarak vektör üzerinde TtGSTz'nın oturabilmesi için uygun restriksiyon enzimleri ile yapışkan uçların oluşturulması gerekmektedir. Vektörü bu bölgelerden kesen enzimler olan BamHI ve NdeI'in TtGSTz'da yapışkan uçları oluşturması için primerler tasarlanmıştır. Primer bilgileri aşağıda belirtildiği gibidir.

FGSTzNdeI:

5'GCGCA TATGATGGCTGAAAGCTCAAAGATTACT 3'

RGSTzBamHI:

5' CGCGGAT CCTCAGATCTTTTGTGATTATCAGGATT 3'

Tasarlanan primerler kullanılarak TtGSTz üretilmiş ve pET16b vektörü ile içerisine yerleştirilerek, transforme edilmiştir. Oluşan pozitif kolonilerden protein izolasyonu yapılmıştır.

#### **Protein izolasyonu:**

- Pozitif kolonilerden 10 ml sıvı LB-amp besiyerine transfer edilmiştir. 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. 16 saat sonunda 0,1M IPTG (izopropil-beta-D-thiogalaktopiranosit)'den 100 µl eklenmiş ve toplam 3 saat olmak üzere her saat hücreler alınmıştır.
- Hücreler 6,000 rpm'de 15 dk. peletlenmiş ve 1 ml TES (100mM TrisHCL (pH: 7.5), 100mM EDTA ve 100mM NaCl ile 50 ml hazırlanmıştır) tamponu eklenerek yıkanmışlardır.



- Hücreler yıkamadan sonra 6,000 rpm'de 15 dk. yeniden peletlenmiş ve 180 µl TES ile çözülmüştür.
- Üzerlerine 10 mg/ml lizozim (0.02 gr lizozim ve 50 mM TrisHCL (pH:8) ile çözümlenir) ile 2 ml tamamlanır'den 2 µl ve 10 µl deterjan kokteyli (150 µl Tween 20 ile 150 µl TritonX100 Not: Burada kullanılacak deterjanlar non-iyonik olmalıdır) eklenmiş ve 20 dk. buzda inkübe edilmiştir.
- Süre sonunda 50 µl 50 mM TrisHCL (pH:8) , 0.8 µl Endonükleaz (Sigma kat.no:E-1014) ve 1.5 µl 1 M MgCl<sub>2</sub> eklenmiş ve 20 dk. oda ısısında bekletilmiştir.
- Süre sonunda karışım -86°C'de 20-25 dk bekletilerek, tekrar oda ısısına alınmış ve çözülmüştür. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır.
- Karışım 14,000 rpm'de 15 dk. (+4°C) santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni bir tüpe alınmış ve saflaştırma işlemine geçilmiştir.

#### **Saflaştırma:**

Saflaştırma için iki farklı saflaştırma boncuğu kullanılmıştır. Bunlar;

- Ni-NTA agarose ( QIAGEN Kat.no: 30230) Histidin affinitesi gösteren bonucuklardır ve pET16b içinde 6X His'lere affinite duymaktadır.
- Bulk GST saflaştırma kiti ( Amersham Biosciences Kat.no: 20320) GST affinitesi gösteren bonucuklardır.

Uygulama adımları:

- Ni-NTA agarose ve Glutasyon sepharoz 4B (kit içindeki)'lerin her birinden 120 µl alınmış ve 3,000 rpm'de 5 dk. (+4°C) santrifüj edilmiştir.
- Ni-NTA agarozları kitle belirtildiği gibi Buffer C (8 M urea ,100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 10 mM Tris HCl ile pH:6.3 olacak şekilde 1.000 ml tamamlanır) ile Glutasyon sepharoz 4B ise 1X PBS ( 8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 1.44 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 0.24 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> karışımı dH<sub>2</sub>O ile 800 ml'ye tamamlanır, pH:7.4'de ayarlanır ve son hacim 1,000 ml olacak şekilde dH<sub>2</sub>O eklenir)'den 500 µl ile yıkanmıştır.
- 3 dk. karıştırıcı tabla üzerinde karıştırıldıktan sonra 3,000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Bu işlem 3 defa tekrarlanmıştır.

- Boncukların üzerine protein süpernatantları eklenmiş ve gece boyunca +4°C’de karıştırıcı tabla üzerinede karıştırılmıştır.
- Süre sonunda örnekler 3,000 rpm’de 5 dk.(+4°C) santrifüj edilmiştir.
- Pelet 500 µl Buffer C (Ni-NTA için) ve 1X PBS ile yıkanmış, 3 dk. karıştırıcı tabla üzerinde karıştırıldıktan sonra 3,000 rpm’de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Bu işlem 5 defa tekrarlanmıştır.
- Son santrifüj ile birlikte süpernatant atıldıktan sonra 100 µl Leamli buffer (250 µl 0.5 M Tris HCl (pH:6.8), 200 µl %20 SDS, 200 µl Gliserol, 100 µl β-merkaptoetanol, az miktarda Bromofenolblue eklenmiş ve dH<sub>2</sub>O ile 1 ml’ye tamamlanır) eklenmiş ve 10 dk. kaynatılmıştır.
- Süre sonunda karışımdan 10 µl SDS-Page jeline yüklenmiştir.

#### **SDS Page:**

Bio-RAD firmasına ait jel sistemi kullanılmıştır. Burada iki farklı tampon kullanılmıştır. Bunlar ;

- Koşurma tamponu (Running buffer): 3.3 ml %30 Bis-akrilamid, 2.5 ml 1.5 M Tris HCl (pH:6,8), 0.1 ml %10 SDS, 4.1 ml dH<sub>2</sub>O, 5 µl TEMED ve 50 µl amonyom persülfat ile hazırlanmıştır (%10 olacak şekilde hazırlanmıştır).
- Ayırma tamponu (Stacking buffer): 1.7 ml %30 Bis-akrilamid, 2.5 ml 0.5 M Tris HCl (pH:6,8), 0.1 ml %10 SDS, 5.7 ml dH<sub>2</sub>O, 10 µl TEMED ve 50 µl amonyom persülfat ile hazırlanmıştır (%10 olacak şekilde hazırlanmıştır).

Tamponlar kullanılarak hazırlanmış olan jele örneklerden 10 µl yüklenmiş ve 80 V’da 2 saat yürütülmüştür. Marker olarak Kaleidoscope prestained standards (Bio-RAD, Kat.no:161-0324) kullanılmıştır. Bu markerin özelliği renkli olmasıdır.

## 2.2.20. TtGSTz rekombinant proteininin Western blot analizi

Western blot analizi, üretilen proteinin doğru protein olup olmadığının spesifik antikolar kullanılarak analiz edilmesi işlemidir.

### Proteinlerin membrana aktarılması:

- SDS-Page'e yüklenen jeller boyanmadan kullanılmıştır. Jel önce yıkama tamponu (3 gr TrisHCL, 14.4 gr glisin, 200 ml methanol, dH<sub>2</sub>O ile 1,000 ml tamamlanmıştır) içinde 30 dk. bekletilmiştir.
- Süre sonunda jelin alanı hesaplanmış ve blotlama aleti için uygulanan mA değeri hesaplanmıştır. Şöyleki;  
Alan x 0,8 = ?mA formülüne göre uygulayacağımız mA değeri , 6 (en) x 8 (boy) x 0.8 =24 mA olarak bulunmuştur. İki farklı jel olduğu için toplam 48 mA'de 90 dk. blotlanmıştır.

Western blot analizinde Proteo qwest kolorimetrik western blotlama kiti kullanılmıştır (Sigma kat.no: PQ0101).

- Blotlama işlemi bittikten sonra membranlar TBST ( kit içinde toz halinde bulunmakta, 500 ml dH<sub>2</sub>O ile hazırlanmaktadır) ile 1 dk. yıkanmış ve TBST ortamdan uzaklaştırılmıştır.
- Membranların üzerine Western blocker solüsyonu (kit içinde) dökülmüş 30 dk. karıştırıcı tabla üzerinde bloklanmıştır. Ni-NTA kullanılarak saflaştırılan membran için anti-Histidin antikoru (Mouse monoklonal antibody Anti-His<sub>6</sub> (Roche, Kat.no: 135508)) Glutasyon sepharoz 4B için de anti-GST antikoru (Mouse monoklonal antibody Anti-GST (Sigma, Kat.no:G1160) 1:1000 dilüsyonda western blocker solüsyonu içine eklenmiş ve 30 dk. bekletilmiştir.
- Membranlar süre sonunda TBST tamponunda 1 dk. yıkanmış ve TBST uzaklaştırılıp, ikinci bloklamaya geçilmiştir.
- Membranların üzerine ikinci defa Western blocker solüsyonu dökülmüş ama bu sefer bekletilmeden iki membran içinde ikincil antikor (Anti-mouse IgG (Sigma, Kat.no: A5225) 1:1000

dilüsyonda eklenmiş ve 30 dk. karıştırıcı tabla üzerinde inkübe edilmiştir.

- Süre sonunda membranlar 5 defa 5 dk. TBST tamponunda, karıştırıcı tabla üzerinde yıkanmıştır.
- Son TBST uzaklaştırılıp, membranlar ikinci bir plastik boyama tankına aktarılmış ve üzerlerine 4-kloro-1-naphthol (60 µl %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 20 ml methanol, 0.06 gr 4-kloro-1-naphthol ve dH<sub>2</sub>O ile 100 ml tamamlanmıştır) eklenerek 15 dk bekletilmiştir. Bantlaşmalar belirginleşince tampondan alınmış, dH<sub>2</sub>O ile yıkanarak, kurutulmuştur. Kurutulan membranlar UV fotometrede (UV ışık kullanılmadan) resim haline getirilmiştir.

## **2.2.21. TtGSTz'nın farklı stresler altında mRNA seviyesinin belirlenmesi**

### **2.2.21.1. Soğuk stres (4°C) altında mRNA seviyesinin belirlenmesi**

*T.thermophila* SB210 hücreleri stres deneyi aşağıdaki şekilde hazırlanmış ve RT-PZR deneyine alınmıştır.

Bir gün önceden 250 ml'lik PPY besiyeri içeren flaslara ekimi yapılan hücreler 130 rpm'de 37°C'ye ayarlanmış çalkalamalı etüvde gece boyu inkübe edilmiştir. Deney günü hücreler morfolojileri ve kontaminasyon riski açısından mikroskop altında kontrol edilmiştir.

#### **Hücrelerin soğuk stresine tabi tutulması;**

Hücreler sırasıyla 15, 30, 45 ve 60 dakika süre ile soğuk stresine tabi tutulmuştur. Stres uygulama işlemi başlamadan 37°C'de büyütülen hücrelerden 2 ml'lik kontrol olarak alınmıştır. Sonra santrifüjlenerek hücre peleti elde edilerek "0" zamanı olarak etiketlenir. Daha sonra hücreleri içeren flask bir buz (4°C) kutusu içine gömülmüş ve masa üstü çalkalayıcısında inkübe edilmiştir. 15, 30, 45 ve 60'ncü dakikalarda kültürden 2 ml'lik örnekler alınarak peletlenmiştir.

RNA izolasyonu, total RNA'ya DNaz muamelesi, RT reaksiyonu ve RT-PZR işlemleri bölüm 2.2.3- 2.2.6'da belirtildiği gibi hiçbir değişiklik yapılmadan uygulanmıştır.

#### **RT PZR reaksiyonları;**

Toplam reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde üç set RT-PZR reaksiyonu ve her bir set 3 kez kullanılarak tekrarlanmıştır. Bu reaksiyonlarda iki primer seti kullanılmıştır. Bunlardan ilki GSTz genine ait primerler, diğeri *T.thermophila*'da bulunan 17S geni primerleri kullanılmıştır. Her iki primer setinin annealing derecesi sırasıyla 56°C ve 50°C olup reaksiyon koşulları aşağıdaki gibidir.

10X Taq Tamponu +KCl	2.5 µl
25mM MgCl <sub>2</sub>	1.5 µl
25mM dNTP Mix	1.5 µl
2,5mM İleri Primer	2.0 µl
2,5mM Geri Primer	2.0 µl
Taq Polimeraz Enzimi	0.2 µl
Kalıp (RT ürünleri)	0.5 µl
ddH <sub>2</sub> O	14.8 µl

#### **PZR Reaksiyonu;**

94 °C	2 dk	
94 °C	50 sn	} 27siklus
50 °C-56°C	50 sn	
72 °C	2 dk	
72 °C	2 dk	
4°C	∞	

### 2.2.21.2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hidrojen peroksit) stresi altında mRNA seviyesinin belirlenmesi

#### *T.thermophila* SB210 hücrelerinin hazırlanması;

Bir gün önceden 250 ml'lik PPY besiyeri içeren flasklara ekimi yapılan hücreler 130 rpm'de 37°C'ye ayarlanmış çalkalamalı etüvde gece boyu inkübe edilmiştir. Deney günü hücreler morfolojileri ve kontaminasyon riski açısından mikroskop altında kontrol edilmiştir.

#### Hücrelerin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( Hidrojen peroksit) stresine tabi tutulması;

*T.thermophila* hücrelerinin Çizelge 2.4'te belirtildiği gibi belli zaman aralıklarında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarına bağlı morfolojik değişimleri incelenmiş ve stres için uygun olan dozun indükleyici olduğu belirlenmiştir.

**Çizelge 2.4.** *T.thermophila* hücrelerinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stresi altında morfolojik değişimleri (Anonim, 2007).

	10dk	20dk	30dk	40dk	50dk	
Hücre(ml)	+	+	+	+	+	Kontrol
Hücre + 7,5µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+	-	-	-	-	Letal
Hücre + 3,8µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+	+	+	+	-	Subletal
Hücre + 1,9µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+	+	+	+	-	Subletal
Hücre + 1µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	indükleyici
Hücre + 0,5µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	Etkisiz

Hücreler sırasıyla 0, 15, 30, 45 ve 60 dakika süre ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stresine tabi tutulmuştur. Öncelikle, hiç bir işleme tabi tutulmamış hücrelerden 2 ml'lik örnek steril koşullar altında alındıktan sonra santrifüjlenerek hücre peleti elde edilmiş ve bu pelet "0" zamanı olarak etiketlenmiştir. Hücrelerin indükleyici olduğu konsantrasyonda (Çizelge 2.4'te koyu alan) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenmiş ve masa üstü çalkalayıcısında inkübe edilmiştir. 15, 30, 45 ve 60'ıncı dakikalarda kültürden 2ml'lik örnekler alınarak peletlenmiştir.

RNA izolasyonu, total RNA'ya DNaz muamelesi, 17S rRNA primerleri ile total RNA'da DNA kontaminasyonunun kontrol PZR, RT reaksiyonu ve RT-PZR işlemleri bölüm 2.2.19.1'de belirtildiği gibi hiçbir değişiklik yapılmadan uygulanmıştır.

## 2.2.22. TtGSTz'nın Dotblot yöntemi ile analizi

### TtGSTz bulucu DNA (prob)'nın DIG (Dioksijenin) ile işaretleme reaksiyonu;

TtGSTz genini taşıyan plazmit DNA, tüm genin klonlandığı PZR reaksiyonunun ısı döngüsü ve koşullarında kalıp olarak kullanılarak bulucu DNA (prob) üretmek amacıyla olan PZR ürünü (insert) sentezlenmiştir. PZR reaksiyonundan sonra ürün % 1.4'lük agaroz jele yüklenmiş ve yürütülen jelden ilgili bant kesilerek saflaştırılmıştır. İşaretli prob için DIG-işaretleme ve tespit etme kiti kullanılmıştır.

DIG işaretleme kitine göre, 0,5 ve 1,5 ml'lik ependorf tüpler kullanılarak, 0,5-3 µg kalıp DNA ( yukarıda jelden kesilip saflaştırılan DNA parçası) toplam 15 µl'ye steril deiyonize su ile tamamlanarak 100°C'de su banyosunda denatüre edilmiştir. Tüp kısa bir spin atırılıp hemen buza konmuştur. Üzerine kitten sırasıyla 2 µl hekzonükleaz karışımı, 2 µl dNTP karışımı ve 1 µl Klenow enzimi eklenmiş ve 37°C su banyosunda 16 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyonu durdurmak için 65°C'de 10 dk. bekletilmiştir.

### Prehibridizasyon, Hibridizasyon ve Deteksiyon Aşamaları;

Öncelikli melezleme prehibridizasyon standart tamponu Çizelge 2.3'deki formüle göre distile su ile iki ayrı 20ml'lik hazırlanmıştır.

**Çizelge 2.5.** Melezleme standart solüsyonu (Prehibridizasyon Tamponu) (Temizkan ve Arda , 2004)

Prehibridizasyon Tamponu	100 ml için	20 ml için	Son konsantrasyon
20X SSC	25 ml	5 ml	5x
% 10 SDS	200 µl	40 µl	% 0.02
Na-laurylsarkozin	0,1 g	0.02 g	% 0.1
Bloklama stok solüsyonu ( Bloklama tozu ve DIG-Maleik asit tamponu ile %10'luk hazırlanır.	1 ml	200 µl	% 0.1

İlki prehibridizasyon için kullanılmıştır. İkincisi de 5 dk. 100°C'de tutulup sonra buza konularak denatüre edilmiş bulucu DNA eklenerek hibridizasyon tamponu olarak kullanılmıştır. -20°C'de bekletilen DIG işaretli bulucu DNA kullanılacağı zaman 68°C'de 10 dk. bekletilmiş ve sonrasında 10 dk. buza konularak tek zincirli kullanılabilir hale getirilmiştir (Ko, 2005).

Prehibridizasyon aşaması 68°C'de 2 saat süreyle 3 kez yapılmış ve bu işlem hibridizasyon fırınında gerçekleştirilmiştir. Hibridizasyon 16 saat 68°C'de hibridizasyon tüpü içinde gerçekleştirilmiştir. Hibridizasyon tamponu bir falkona boşaltılmış ve -20 °C'de tekrar kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir. Membran 1.yıkama tamponu (2x SSC, % 0,1 SDS) ile oda ısısında iki kere 5'er dakika hafifi harakette yıkanmış ve süzülmüştür. Tekrar membran 2. yıkama tamponu ile (0,5x SSC, % 0,1 SDS) ile 65°C'de 5 dk. yıkanmış ve süzölmüş, daha sonra 3. yıkama tamponunda (0,1x SSC, % 0,1 SDS) 68°C'de 5 dk. yıkanmıştır. 3. yıkama tamponu membrandan süzölerek uzaklaştırılmıştır.

Yıkamalardan sonra naylon membran DIG-Maleik asit tamponunda oda ısısında 5 dk. yıkanmış ve süzölmüştür. Daha sonra membran 10 ml 1x tamponu içinde oda ısısında 30 dk. yıkanmıştır.

Antikor solüsyonu (kit içinde) kullanılmadan önce 5 dk. 10000 rpm'de santrifüjlenmiş sonra antikor pipetle alınarak 1x bloklama tamponunda 1:5000 oranında dilüe olacak şekilde antikor solüsyonu eklenerek oda ısısında 30 dk. hafif sallamada yıkanmıştır.

Antikor solüsyonu uzaklaştırılıp DIG-yıkama tamponu ile 2 defa 15'er dk. yıkama yapılmış ve DIG saptama tamponu ile 5 dk dengelenmiştir.

DIG ile işaretlenmiş bulucu DNA'lara bağlanan antikorlara bağlanarak renk oluşumuna neden olan Colorsubstrate solüsyonundan 2 ml taze olarak hazırlanmıştır. Bu solüsyon kit'ten çözöndürölen vial 9 tüpünden 40 µl alınarak 2 ml saptama tamponu ile hazırlanmış ve karanlıkta tutulmuştur.

DIG saptama tamponu dököldükten sonra membranın üzerine 2 ml Colorsubstrate solüsyonu eklenmiş ve karanlıkta çalkalamadan bant oluşumu gözlenmiştir.



### 3. BULGULAR

*T.thermophila* tek hücreli silli ökaryotik organizmasında GST enzim ailesi üyelerinin bulunduğu ilk defa Overbaugh, J.M. ve ark. (1988) tarafından bildirilmiştir. *T.thermophila* makronükleer genom projesi sonuçlarına genel bakıldığında GST enzim ailesi üyeleri bulunduğu görülür. Bu enzim ailesi üyelerinin bireysel veya alt-gruplarının analizleri deneysel veya biyoinformatik olarak henüz detaylıca çalışılmamıştır. Aşağıda bu tez çalışması esnasında elde edilen bulguların tanımlaması yapılmıştır.

#### 3.1. *T. thermophila* Makronükleer Genomunda Bulunan GST Enzim Ailesi Üyelerinin Biyoinformatik Analizi

##### 3.1.1. Tetrahymena Genomu 19 GST Geni İçerir

Çalışma organizmamız olan *T.thermophila*'nın Tetrahymena Genom Bankası (TGD) adı verilen ve bu canlıya ait veri tabanını oluşturan bir gen bankası vardır. GST enzim ailesi üyeleri için de bu veri tabanında yapılan analiz sonucunda, GST enzim ailesini temsil eden Şekil 3.1'te görüldüğü gibi 15 homologun olduğu bulunmuştur. Bu homolog grupların GST ailesi üyelerinden **zeta**, **theta**, **mu** ve **omega**'yı temsil ettiği görülmüştür (Homolog gruplara ait diz bilgisi Ek.1'de belirtilmiştir).

##### 3.1.2. *T. thermophila*'da bulunan GST ailesi üyeleri için yapılan hizalama ve filogenetik ağaç analizi

*T. thermophila*'da bulunan GST ailesi üyelerinin filogenetik ilişkilerini belirlemek için, amino asit dizileri TGD içinde belirlenmiş ve bunlar EBI veritabanındaki dbcluster ile dikey hizalanmıştır. Şekil 3.2'de hizalama analizi sonucunda da bu sınıfların benzerlik oranının yaklaşık %20 (dizilerin benzerliğini gösteren çizelge Ek.2'de belirtilmiştir) olduğu bulunmuştur. *T.thermophila* GST ailesi üyelerinin amino asit dizi benzerlik oranının düşük olduğu görülmüştür. Ama TtGSTz'nın MAAI ile aynı ve diğer sınıflara göre TtOmega'ya daha fazla benzerlik gösterdiği bulunmuştur.

AT2G02390	glutathione S-transferase zeta 1 ( <b>gstZ1</b> ) ( <b>gst18</b> )	TTHERM_00575360	6.0e-47
AT5G41210	glutathione S-transferase ( <b>gst10</b> )	TTHERM_00499540	3.0e-22
		TTHERM_00260690	1.0e-21
		TTHERM_00499550	2.0e-21
D1053.1	WBGene00001790 <b>gst-42</b> glutathione S-transferase	TTHERM_00575360	2.0e-41
		TTHERM_00575390	2.0e-40
		TTHERM_00572010	6.0e-08
		TTHERM_00924320	3.0e-06
		TTHERM_00572020	1.0e-05
		TTHERM_00572000	3.0e-05
		TTHERM_00400730	7.0e-04
TTHERM_00161470	1.0e-02		
F56B3.10	WBGene00001788 <b>gst-40</b> glutathione S-transferase	TTHERM_00689990	7.0e-04
		TTHERM_00205200	1.0e-03
R03D7.6	WBGene00001753 <b>gst-5</b> glutathione S-transferase	TTHERM_00463010	3.0e-05
R107.7	WBGene00001749 <b>gst-1</b> glutathione S-transferase	TTHERM_00661650	2.0e-03
		TTHERM_00661660	3.0e-03
		TTHERM_00661620	4.0e-03
R13D7.7	WBGene00001789 <b>gst-41</b> glutathione S-transferase	TTHERM_00473230	2.0e-04
T28A11.11	WBGene00001771 <b>gst-23</b> glutathione S-transferase	TTHERM_00661640	3.0e-04
UniRef90_Q7SZ23	<b>gstm2</b> -prov protein related cluster	TTHERM_00463010	9.1e-28
		TTHERM_00516440	1.1e-24
		TTHERM_00661630	3.3e-23
		TTHERM_00077560	8.0e-13
UniRef90_Q86AH6	Similar to <i>Ralstonia solanacearum</i> ( <i>Pseudomonas solanacearum</i> ). Putative <b>gst</b> -related protein related cluster	TTHERM_00247000	3.7e-02
UniRef90_Q9FQD5	Glutathione S-transferase <b>gst 23</b> related cluster	TTHERM_00161470	2.7e-35
		TTHERM_00499550	3.1e-27
		TTHERM_00499540	4.5e-26
		TTHERM_00260690	2.0e-23
UniRef90_Q9FQE7	Glutathione S-transferase <b>gst 11</b> related cluster	TTHERM_00034950	4.4e-12
UniRef90_Q9FQE8	Glutathione S-transferase <b>gst 10</b> related cluster	TTHERM_00572000	1.6e-16
		TTHERM_00924320	8.6e-16
		TTHERM_00572010	2.6e-14
Y53F4B.31	WBGene00001776 <b>gst-28</b> glutathione S-transferase	TTHERM_00569210	5.0e-04
Y71F9AL.5	WBGene00001791 <b>gst-43</b> glutathione S-transferase	TTHERM_00034950	6.0e-05

Şekil 3.1. TGD içinde bulunan GST ailesini temsil eden homolog gruplar.

```

mu5.1 -----MTLGYWGIRGLAQPIRFLLAYLGVQYTNKAYAN--PEEWFGKDKNELGFDF 50
mu5.2 -----MATLGYWGFRGLAQPIRFLLAYLGVQYTDKHYTK--GEDWFENDKKNLGMDF 50
mu3.1 -----MSDKIILGYWNTPKAQPSRYLELSGVKYEEVRYSSYP-AAEWFGKRDYALGLPF 54
MAAI --MSENNQNIILYGNYRSSPSWRVRLALGLKKIEYKLVSIDLF--KNEQKSEVYFKVNP-N 56
GST-Z --MAESSKKITLYSYFRSSTSWRVRIALNLKKIDYNIIPINLL--KSEQTSEBYTKINP-N 56
omega1.2 --MSQ----LTLYGFLLCPYVQRVRFALEKIGVKYDYKEIDLF--KLKQKEQAYLDINP-F 52
omega1.3 --MSQ----LTLYGFLLCPYVQRVRFALENIGVKYDYKEVDLY--KFKHKEQAYLDINP-F 52
omega1.4 --MSQPH--LKLYGNILCPYVQRVRFALEALKLQDYVEIDLL--AKHLQEEYLAINP-L 54
omega --MKKP----ILYGCIVCPYTNKVRFALEMLKIDYKYQEIDIL--TGKNKNSYLQINP-Q 52
theta2.2 -----MKIFIDWISQPSRAVVTYCLIENIPHEIIQVRVN--ALEHRKPEYIQINP-S 49
theta2.3 ---MTTKPSTKLYIEWLSQPSRAIVTFCLIENIPHELVEVRK--KLENRTPEYKMFP-T 55
theta2.1 --MQDQQQTLSLYMDWMSQPSRCVAIFCMINKIPVDISEVKIL--KGQLRSEYKRINP-N 56
theta1 -----MNKLKLFYNSFSQPSRAVKCLLKIGKVDYEEKFNLA--KGQDFKPEVKSLNW-N 52
omega1.1 MDITATNEPVRFYCFVTCFYAIRVRTALELLQVPYEYNEIDLL--VNQQLTPEFLKINP-L 58
mu1 -----MSNLLSYNWLRGRTEPIRMLLNYLQLPYTYKGYDLSSYNQWKQVDKPALQSDDF 54
mu3 -----MKSQLLFGSWIQRGNAMPIRFLLEYTQTNYNEKIYSENESEWFQKDKQFKQ-F 54

mu5.1 PNIPYLID----GDLKLESSAIPIYLIRK-----HKNELLGSSADGSYSEKE 95
mu5.2 PNIPYFID----NDKISESSAIPFYIIK-----YKPELLGQNADGSFNEKE 95
mu3.1 PNLPLYLD----GEVKITESETIFDYLIQR-----LNKVELLGQNDKYIVDNL 99
MAAI QRIPALI----YGDQTLIESTAIIEFLEEN--FPQYPLLPED-RIKRAQIRGFCQVIN 107
GST-Z QGVVPALK----YGDEVIESSAILEFLEEV--FPEHPLLPQD-AVKRAQIRGFCQVIN 107
omega1.2 GKVPTIV----INNQIVYESLPLLEFLENE--FGS--VFPQD--NIRKTQQRIWTTYFD 101
omega1.3 GKVPSIS----FNNQIIYESLPLLEFLENE--FGG--VFPQD--NIRKTQQRIWYFD 101
omega1.4 GCVPTIN----INNSNVYESLVLLEFLEEQ--FGN--VFPKD--TIKRAQQRIWANYYD 103
omega GRVPSLTT----INNKNLYDSQVLLQYIEDE--YKG--LFPQD--NYAKGLQRIWQYQFD 102
theta2.2 AKVPAISDRLENGEIFNLFESHAIMRYLADR--YNKFKLYPKDNIQLRALINSYLDWHH 106
theta2.3 AKLPGMSETLENGEQFNLFESHAIMRYLADR--YNKNLYPRGNIQLKAKVDSYLDWHH 112
theta2.1 MRVPTIKD----GK--FVLYESHAILKYLIASRAQYIPEHWYPKD--IKERALVDQYLDWHH 110
theta1 CQVPFIED----NGFVVFESHTIMRYIHQR--FNLDNSLYPQKLEDKTKIDMYLDWHH 104
omega1.1 HQVPVIIN----KQGQTISESLVCLEYLNDK--YQPGLLPQD--SFQRAQIRKWITYYS 109
mu1 PNLPLYKD----GDYVLTESDAIAQYVCVK-----ANREDMIGTTIEDRIN--I 97
mu3 ANLPYIID----GDLKLTDVQTIMRYIAKR-----NSNYIQLLGQGH 92

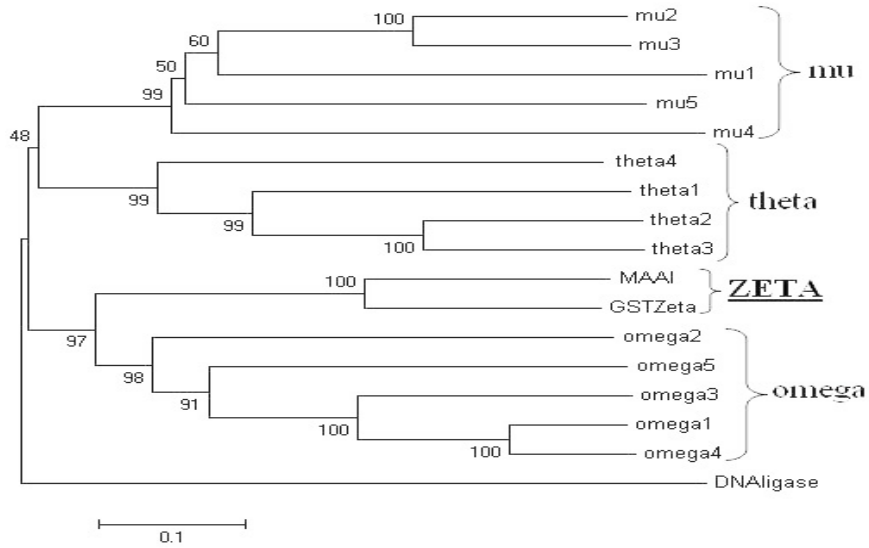
mu5.1 VRVAQIVGVIRDLFKELTGLCFNPDFKNIKEKLYTEKLEL--LIKRLGAYLGDKEFIVG-- 152
mu5.2 IKVQVIGVIKDINKELMGLCFNPDFANAKDKVYNEKLSV--GLKKLNDFLGNKDFLLG-- 152
mu3.1 KNLFSDIGTRMYIYSQKE-----GEEQTKFLSEQILP-KIRDIHKFLGQKEYLLG-- 148
MAAI SAIHP--YQNSNLIGKEKEG---NMNKLEWIKFWVTKGLTAIEELLKYHGKFCFG-D 160
GST-Z TAIHP--LQNLRVLNKIEKEY---SQDKIQWLKFWVTKGLTAIEELLKNSHGKYCFG-D 160
omega1.2 QNFISKMWGIFSLIKTKDVEGSKLANELAEILRFFTLN--SKLSERIKQNPSSYFEG-D 158
omega1.3 QNFIDKMWAILGIIKKDAEAGSKLANELAEAVRFFTKN--SKLSERIKLNPNNYFEG-D 158
omega1.4 QNVIGNIWDVFQVYKSKDEEGLKLANKLAEEIRYWVKQ--TKLSERVKANPKTFYEG-E 160
omega NNIFSKYHPALAAYQENKQDLNKLQQETFENMKFFSQN--SGITQKIKLQNCCFYEGGS 160
theta2.2 NNTRKCGAYLFDLYSSGVLGIKPKNNIETLYKEIEIILK--FIDQIWLQEGKNKFIGNNI 164
theta2.3 TNTRKCAPYLFDQYFAPVLGKPQFDVNTLFKEVESVFR--FIERVWLDQGKNKYIGNNQ 170
theta2.1 TNIRNAGMYIFNYFVLPSLGIQSKQNKETIYKLFIQSLK--MIDTIFLAD--KPYIASKE 166
theta1 SNTRRSANYVTASLLSKRTGQPSLYVEDLVHKELLKAVQ--NLNDNLLNN-PSHYIFGFQ 161
omega1.1 S-IDAKKWRILGAIRNKNKEAYRILNEIQQNLKFLSSQ--IDLPIRVEQNSKTFLFG-S 165
mu1 ARIRGIVNENIYLGQLAYSPKYKEELKANFQRFSVPFG----QLNNYLNNKEYINN-G 151
mu3 GNEDDRINQINLVISEIG-----LYVKEQFFNPKVHE----EKRDFLNRCQKFKG-- 138

mu5.1 TLTYADFLFYEALSYIRHIYP---QAICATLTAYINRF-ENLPGIKEYIASHAQELKVFL 208
mu5.2 TLTYADFLFYETLSYFKHIFP---QSITPLANYLNRF-QNLPGVKEYIAKPSVDLNAFL 208
mu3.1 YFTAADLYFLCFAGKNTLPDSYNEFAATFNPLIQRL-ENIPQIAKYISEGRHP----- 202
MAAI DITMADIFLIPQVSAVVERFGFDLTP----FPLILSVVNNLKDLPEFIAASPSNQPDYT 215
GST-Z EITLADLFLVPQVQGVVDRFQDLTP----FPNIAEVLKNLKEIPEFVAASPSKQADNP 215
omega1.2 TLTYADFALIPHVLETNYKIFFKSSLFQIENQDELIQNFKTYYQNVSSDSFKRAVT 218
omega1.3 TLTYVDFAVVPHFKMLDAMYRAFFKVNFFDQIENQDELIQNFKTYYQNVSSDSFKRTVT 218
omega1.4 QLTYVDFAVVPHTRYLEDIVRVTFNKQLFDLVEN--DDLKDFRTYINNVTISSEAYNRITH 219
omega IPTYADVAIIPHLRIMNIFWKHFLNKDLFQSNKNDEDVLS--LKQLYENIHTLESCQNVSF 219
theta2.2 QLTIADISCYEVSQMIIDS-YDFKNKTPNLYNMKRI--EQIPEIQQTHQILFKLAPKMS 222
theta2.3 QLTIADLSCYEIIQMKFDD-YDFKNKTPILYEWMQRI-EALPEIQKTHQVLFKLAPQIS 228
theta2.1 KATIADLSCYEITQVNLID-FDFS-PYPNILKWMQRLTAEYPQVLEGHQPPMKFVQKIK 224
theta1 KPTIADISCYELTELKLIN-FDFK--KYPNLDAFMNQ-SNIPEIKEVDKDFSDIALKIF 218
omega1.1 TFGMGDIAILPVLDQMIILFETAFGKHILKDNLNGKVD-DALKALYIWFENTKQQPPAYQK 224
mu1 KICYDYFYLYELMFIAHKIFKEENVFDVFNLRSHYRIQNLPQIQDYLNSDRYNSKSFVI 211
mu3 --SFVNIRAFLQFTGN-----QRLHNNRKILDAY----- 165

```

Şekil 3.2.. *T. thermophila*'da bulunan GST ailesi üyelerine ait hizalama sonuçları.

TtGST ailesi üyelerinin evrimsel yakınlığını belirlemek için hizalama sonucu elde edilen verinin cluster algoritması ve ile seç-bağla (bootstrap) yöntemi 1000 tekrarlı kullanılarak Şekil 3.3'te görülen filogenetik ağacı oluşturulmuştur. Dış grub olarak da yine *Tetrahymena* enzimlerinden biri olan DNA ligaz enzimi seçilmiştir. Ağaç analizinde de görüldüğü gibi; *TtGSTz*'nin MAAI ile aynı olduğu ve *TtOmega* yakınlık gösterdiği bulunmuştur. Dış grub olarak seçilen *TtDNA* ligaz'ın GST'ler ile benzerlik göstermediği belirlenmiştir.

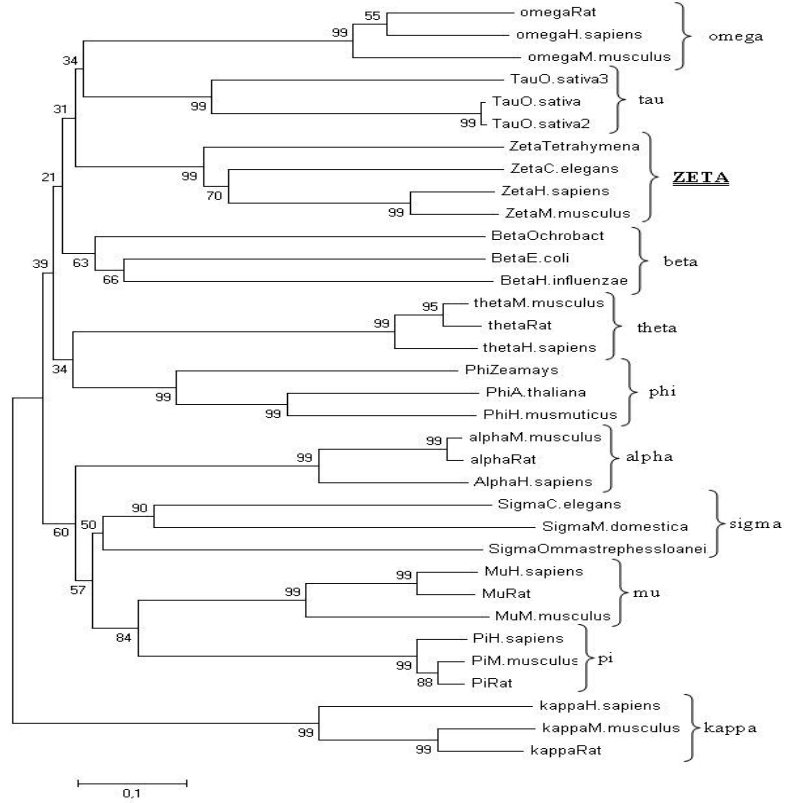


**Şekil 3.3.** *T. thermophila*'ya ait GST ailesi üyelerine ait ağaç analizi (1000 tekrarlı bootstrap ile oluşturulmuş ve Neighbor-joining yöntemi ile çalışan ClustalW ve MEGA4 programları kullanılmıştır) (**Theta 2** 63.M00175, **Theta1** 23.M00228, **Theta3** 63.M00175, **MAAI** 77.M00141 **Omega1** 76.M00233 **Omega2** 164.M00105 **Omega3** 76.M00234 **Omega 4** 76.M00232 **Omega5** 43.M00235 **Theta4** 13.M00496 **Mu1** 17.M00401 **Mu5** 98.M00153 **Mu4** 98.M00154 **Mu3** 5.M00453 **Theta4** 63.M00176 **Mu2** 76.M00153 **Dış Grup: Tth Ligase** 36.M00193).

### 3.1.3. GST enzim ailesi üyeleri için yapılan filogenetik ağaç analizi

GST enzim ailesi üyelerinin evrimsel analizi yapılmıştır. Bunun için ilk olarak GST enzim ailesi üyelerinin amino asit dizi bilgilerine (www.expasy.org.) ulaşılmıştır. Her sınıf için üç farklı türden diziler seçilmiş ve evrimsel yakınlıklarını belirlemek için seç-bağla (bootstrap) yöntemi 1000 tekrarlı

kullanılarak Şekil 3.4'te görülen filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Dış grub olarak da GST enzim ailesi üyelerinden biri olan fakat diğer GST'lerden farklı olarak klorolasta lokalize olan GST Kappa enzimi seçilmiştir. Ağaç analizinde de görüldüğü gibi; tüm GST enzim ailesi üyelerinde her sınıfın kendi içinde yakınlık gösterdiği belirlenmiştir. *TtGSTz*'nin ise GSTomega'larla yakınlık gösterdiği belirlenmiştir.



**Şekil 3.4.** GST enzim ailesi üyelerinin filogenetik ağaç analizi (1000 tekrarlı bootstrap ile oluşturulmuş (**Zeta**Homosapiens, **Zeta**Musmusculus, **Zeta** Caenorhabditiselegans, TetrahymenaGSTz, **Mu**Musmusculus, **Mu**Homo sapiens, **Mu**Rattusnorvegicus, **Alpha**Homosapiens,**Alpha**Musmusculus,**Alpha**Rattusnorvegicus,**Theta**Homosapiens,**Theta**Musmusculus,**Theta** Rattusnorvegicus, **Phi** Zea mays, **Phi** Arabidopsis thaliana, **Phi** Hyoscyamusmuticus, **Omega** Homosapiens, **Omega** Musmusculus, **Omega** Rattusnorvegicus, **Beta** Escherichia coli, **Beta** Haemophilusinfluenzae, **Beta** Ochrobactrumanthropi, **Kappa** Homosapiens, **Kappa** Musmusculus, **Kappa** Rattusnorvegicus, **Pi** Homosapiens, **Pi** Musmusculus, **Pi** Rattusnorvegicus, **Sigma** Caenorhabditis elegans, **Sigma** Muscadomestica, **Sigma** Ommastrephesloanei, **Tau** Oryzasativa, **Tau** Oryzasativa2, **Tau** Oryzasativa3).

### 3.1.4. TtGSTz'nın Zeta'ya ait karakteristik motif bilgisini taşıdığıının belirlenmesi ve Zeta'ya ait karakteristik motif bilgisini taşıyan türlerin filogenetik ağaç analizi

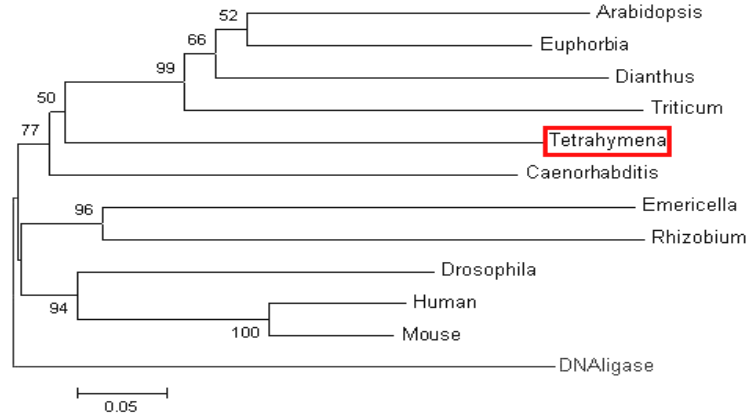
TtGSTz'nın GSTz karakteristik motifini taşıdığıını belirlemek için, ilk olarak farklı türlerdeki bulunan GSTz karakteristik motif bilgisini içeren türler (www.expasy.org.) belirlenmiştir. Bu türlerin amino asit dizi bilgisi elde edilmiş ve dbcluster ile dikey hizalanmıştır. Hizalama sonuçları Şekil 3.5'te görüldüğü gibidir. Dikey hizalama sonucunda TtGSTz'nın GSTz karakteristik motif olan SSCX[WH]VRIAL motifini taşıdığı belirlenmiştir. Diğer GSTz'lardan farklı olarak motif üzerinde 3. pozisyonda bulunan sistein amino asidi yerine threonin asidini (SSTSWRVIAL) taşıdığı belirlenmiştir.

Homosapiens	-----KPILYSYFSSSCSWRVRIALALKGIDYKTVPINLIK	40
Musmusculus	-----KPILYSYFSSSCSWRVRIALALKGIDYEIVPINLIK	40
Drosophilamelanogaster	NASSSDIQPILYSYWFSSSCSWRVRIAMNLKEIPYDIKPISLIK	50
Arabidopsisthaliana	-TDFYQAKLKLYSYWFSSCAHRVRIALHLKGLDYEYIPVNLLK	46
Dianthuscaryophyllus	SE--TQKMQLYSYSSSSCAWRVRIALHLKGLDFEYKAVDLLK	43
Euphorbiaesula	VEQPKNPKLKLKLYSYFSSCSFRVRIALNLKGLDYEYVPVNLLK	46
<b>TetrahymenaGSTz</b>	-MAESSKKITLYSYFSSSTSWRVRIALNLKKIDYNIIPINLLK	42
Caenorhabditiselegans.	---MSNQKPVLYSYWFSSSCSWRVRIALALKNVDYKYKTVDLLS	40
Rhizobiummelikatalogi	---MANETVLYDYWFSSSASYRVRIALNLCEAYRSVPVDLLA	39
Vibriocholerae.	----MMSLILYGYWFSSAAYRVRIALNLKQLVYESRAVHLSR	38
Emericellanidulans	MSTNSDLRVTLYTYFSSCSARLRRIALALRSISYTSVPINLLK	43

**Şekil 3.5.** GSTz motif bilgisini içeren farklı türlere ait hizalama sonuçları (ClustalW programı kullanılmıştır) (GSTZ *Arabidopsis thaliana* (Q9ZVQ3) GSTZ *Euphorbiaesula* (P57108), GST Z1 *Dianthus caryophyllus* (P28342), Tth GSTz 77m.00138, MAAI *Caenorhabditis elegans* (Q18938), MAAI *Homosapiens* (O43708), MAAI *Musmusculus* (Q9WVL0), MAAI *Rhizobium melioli* (Q9X4F7) GSTz *Drosophila melanogaster* (Q9VHD3), *Emericella nidulans* (O43123), *Vibrio cholerae* (Q9KSB2)

GST zeta karakteristik motifini taşıyan türlerin evrimsel yakınlığını belirlemek için seç-bağla (bootstrap) yöntemi 1000 tekrarlı kullanılarak Şekil 3.6' da görülen filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Ağaç analizinde de görüldüğü gibi;

bitki GST zetaları kendi aralarında yakınlık göstermiş ve TtGSTz'nın bunlara yakın olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 3.6.** GSTz motif bilgisini içeren farklı türlere ait filogenetik ağaç analizi (1000 tekrarlı bootstrap ile oluşturulmuş ve Neighbor-joining yöntemi ile çalışan ClustalW ve MEGA4 programları kullanılmıştır)(GSTZ *Arabidopsis thaliana* (Q9ZVQ3) GSTZ *Euphorbiaesula* (P57108), GST Z1 *Dianthus caryophyllus* (P28342), GST Z *Triticum aestivum* (O04437), Tth GSTz 77m.00138, MAAI *Caenorhabditis elegans* (Q18938), MAAI *Homosapiens* (O43708), MAAI *Musmusculus* (Q9WVL0), MAAI *Rhizobium melioli* (Q9X4F7) GSTz *Drosophila melanogaster* (Q9VHD3), *Emericella nidulans* (O43123), Dış Grup: Tth Ligase 36.M00193).

### 3.1.5. GST Zeta'ya ait karakteristik motif bilgisini taşıyan türlerin karşılaştırılmalı olarak üç boyutlu yapı analizi

Karşılaştırılmalı üç boyutlu yapı analizi Şekil 3.7'de ClustalW ile yapılan hizalama incelendiğinde proteinlerin 1-84 amino asitleri, aktif bölgeyi içeren N-terminal ve 93-221 amino asitleri ise substrat özgüllüğünü sağlayan C-terminal domaini temsil etmektedir. Tüm GST ailesine ait enzimlerin üç boyutlu yapılarında gösterdiği thioredoxin fold yapısını GSTz'ların da gösterdiği belirlenmiştir. Thioredoxin fold yapısında N-terminal domain 4 $\beta$  ve 3 $\alpha$ , C-terminal domainin da ise  $\alpha$ -heliks kıvrımlarından oluştuğu bulunmuştur. Ayrıca diğer GST'lerde olduğu gibi bu iki domaini birbirine bağlayan 8 amino asitten oluşan linker bir diziyi (85-92) içerdiği bulunmuş ve 88. pozisyondaki amino asit

olan lösinin (Leu) iki domainin bağlandığı noktada (Polekhina G. et al., 2001) bulunduğu gösterilmiştir. Linker dizinin yapısında da diğer GST'ler de olduğu gibi prolin (Pro)'ce zengin olduğu görülmüştür.

		ββββ	αααααααααα	β																																																								
Human	-----	MQAGKPILYSYF	SCS	QWVRIAL	ALKGIDYK 32																																																							
Mouse	-----	MQAGKPILYSYF	SCS	QWVRIAL	ALKGIDYE 32																																																							
Drosophila	.....	MASATQLTHRGHLAGLYRS	SWSKPLERH	LATKPILYSYWPS	SCS	QWVRIAL	AIKKIDYD 60																																																					
Dianthus	-----	-----	MSSSE---	TQKMLYSFSL	SCS	QWVRIAL	HLKGLDFE 35																																																					
Euphorbia	-----	MASVEQPMKPKL	KLYSYF	SCS	FRVRIAL	MLKGLDYE 38																																																						
Arabidopsis	-----	MSYQAKL	KLYSYWPS	SCS	HRVRIAL	TLKGLDYE 38																																																						
Triticum	-----	MA TAKPI	LYGAWIS	SCS	HRVRIAL	MLKGLDYE 32																																																						
Tetrahymena	-----	MAEKKIT	LYSYF	SCS	QWVRIAL	MLKGLDYE 32																																																						
Caenorhabditis	-----	MSNQR	PVLYSYWPS	SCS	QWVRIAL	ALKMVDYE 32																																																						
Rhizobium	-----	MANE	TVLYDYWPS	SAS	YVRIAL	NLCGEAYR 31																																																						
		βββ	α	ααααα	ββββ	ββββ	αααααααααα																																																					
Human		TVP	INLIHDR	-CQQF	SRD	FQALN	PMKQVPT	LKID-GIT	IHQSLAI	IIFYLEET	RPT	PRLLP 90																																																
Mouse		IVP	INLIKDC	-GQQF	TEEF	QTLN	PMKQV	PALKID-GIT	IVQSLAIM	EYLEET	RPT	PRLLP 90																																																
Drosophila		IKPTS	LLKTV	SCHAY	TDEYD	EWPM	QKQVPS	LKID-GHT	LCD	SVAI	IHYLEET	RPQ	PALLP 109																																															
Dianthus		YKAVD	LFKGR	---HL	TPE	FLK	MPL	GYV	PVLVHG-DIV	LADSLAI	IMYLE	EKFP	EMPLL 91																																															
Euphorbia		YVP	VNLLKGE	---QF	TPE	FLK	INPI	GYV	PALVDC-ED	VISDFAI	IMYLE	EKYP	PEHLLP 94																																															
Arabidopsis		YIP	VNLLKGD	---QSD	SD	FKK	INPM	GTVP	PALVDC-DVV	INDSFAI	IMY	LDD	KYPPPLL 94																																															
Triticum		YKAVN	---P	---RT	DP	YK	INPI	KIYI	PALVDC-D	FVLS	DSLAIM	LYLE	DKYP	QHP	LVP 84																																													
Tetrahymena		IIP	INLLKSE	---QT	SEY	YTK	INPN	QCV	PALKYC-DE	VII	ESSAI	LEF	LE	EV	FP	PEHLLP 90																																												
Caenorhabditis		YKIVD	LLS-E	---E	AKS	KL	KEIN	PA	AKVPT	FWVD-CQ	VIT	ESLAI	IIFYLE	ETH	DP	VP	LLP 87																																											
Rhizobium		SVP	VDLLAK	---A	HRA	PE	HL	ARNP	QGLV	PVLD	ID-GER	LT	QSLAI	IIFY	LAET	PDG	TC	LLP 87																																										
		αααααααααααααααα	αααα	αααα	ααα	ααα	αααααααααααααααα																																																					
Human		QDP	PKRAS	VVR	MISDL	IAG	GI	QPL	QNL	SVL---	KQV	CEM---	Q	L	T	W	A	Q	N	A	I	T	C	G	F	N	A	L	E	Q 144																														
Mouse		QDP	QKRAI	VVR	MISDL	IAG	GI	QPL	QNL	SVL---	KQV	CEM---	Q	M	Q	W	A	Q	N	A	I	T	C	G	F	N	A	L	E	Q 144																														
Drosophila		QDP	VKRAK	IREI	VELICS	GI	QPL	QNV	SVL---	DHIC	KDQ---	S	L	Q	W	A	Q	H	W	I	S	R	G	F	Q	C	L	E	K 173																															
Dianthus		QDL	OKPAL	NYQ	AANIV	TSNI	OPL	QNL	AVL	NYIE	EK	LSDE	--K	L	S	W	A	K	H	I	K	C	F	S	A	L	E	K 149																																
Euphorbia		AD	I	H	K	R	A	I	N	Y	Q	A	N	V	S	S	I	Q	P	L	Q	N	L	A	V	L	N	F	I	C	E	K	V	S	P	D	E	--K	V	P	W	Q	P	H	I	S	R	G	F	A	A	L	E	K 152						
Arabidopsis		S	Y	H	K	R	A	V	N	Y	Q	A	N	V	S	S	I	Q	P	L	Q	N	L	A	V	L	N	F	I	C	E	K	V	S	P	D	E	--K	T	A	W	I	T	N	A	I	T	R	G	F	A	L	E	K 152						
Triticum		KD	I	K	T	R	G	L	D	I	Q	A	N	V	S	S	I	Q	P	L	Q	N	L	A	V	L	N	F	I	C	E	K	V	S	P	D	E	--S	L	E	V	W	Q	P	H	I	S	R	G	F	A	A	L	E	K 142					
Tetrahymena		QD	A	V	K	R	A	I	R	C	F	Q	V	I	N	T	A	I	H	P	L	Q	N	L	A	V	L	N	F	I	C	E	K	V	S	P	D	E	--K	I	Q	W	L	R	F	W	T	R	G	L	T	A	I	E	K 147					
Caenorhabditis		KD	I	K	R	A	H	A	R	A	T	S	L	L	V	A	S	GI	Q	P	L	Q	N	L	A	V	L	N	F	I	C	E	K	V	S	P	D	E	--G	Q	F	A	K	Q	F	W	V	E	G	L	T	A	I	E	K 144					
Rhizobium		KP	I	D	Q	B	V	R	A	L	S	V	A	N	D	I	H	P	V	C	N	L	C	V	A	R	H	A	C	D	C	E	A	A	R	B	E	M	O	K	T	C	E	C	L	A	A	F	E	R 147										
		αααα	ββββββ	ααααααααααααα	α	αααααααααα	αα																																																					
Human		I	L	Q	S	T	-A	G	I	Y	C	V	G	D	E	V	T	M	A	D	L	C	L	V	P	Q	V	A	N	A	E	-R	F	K	V	D	L	T	P	Y	P	T	I	S	S	I	N	K	R	L	L	V	L	E	A	F	Q	V	S 202	
Mouse		I	L	Q	S	T	-A	G	K	Y	C	V	G	D	E	V	S	M	A	D	V	C	L	V	P	Q	V	A	N	A	E	-R	F	K	V	D	L	S	P	Y	T	I	S	H	I	N	K	R	L	L	A	L	E	V	F	Q	V	S 202		
Drosophila		V	L	S	H	S	-A	G	K	F	C	V	G	D	E	L	S	M	A	D	I	C	L	V	P	Q	V	R	N	A	E	-R	Y	K	A	D	L	T	P	Y	T	I	V	R	L	N	Q	E	L	Q	E	L	D	V	F	K	A	T 231		
Dianthus		L	L	K	G	H	-A	G	R	Y	A	T	G	D	E	V	G	L	A	D	L	F	L	A	P	Q	I	I	A	S	I	T	C	F	G	M	D	M	A	E	F	P	L	K	S	L	M	D	A	L	K	Y	Q	H	F	R	M 208			
Euphorbia		L	L	Q	G	H	-A	G	R	F	A	T	G	D	E	V	Y	L	A	D	L	F	L	E	P	Q	I	H	A	A	T	T	R	F	N	V	D	M	T	Q	F	P	L	L	R	H	E	A	Y	S	Q	L	P	E	F	Q	N	A 211		
Arabidopsis		L	L	V	S	C	-A	G	R	Y	A	T	G	D	E	V	Y	L	A	D	L	F	L	A	P	Q	I	H	A	A	F	N	R	F	H	I	D	M	E	P	F	P	T	L	A	R	F	Y	E	S	Y	N	E	L	P	A	F	Q	N	A 211
Triticum		L	L	D	G	C	-D	S	K	Y	C	V	G	D	E	V	H	L	G	D	V	C	L	A	P	Q	I	H	A	A	I	N	R	F	Q	I	D	M	T	K	Y	P	I	L	S	R	L	H	D	A	Y	N	K	I	P	A	F	Q	A	201
Tetrahymena		L	L	K	N	S	-H	G	K	Y	C	F	G	D	E	I	T	L	A	D	L	F	L	V	P	Q	V	D	R	F	Q	F	D	L	T	P	F	P	N	I	A	E	V	L	K	N	K	R	E	I	P	E	F	V	A	206				
Caenorhabditis		L	L	K	H	C	-S	K	Y	A	V	G	D	D	V	T	I	A	D	L	S	I	P	P	L	I	Y	S	A	N	-R	F	N	L	D	L	S	P	Y	T	W	R	I	N	E	T	L	A	D	I	P	A	F	I	A	202				
Rhizobium		M	L	D	H	P	A	T	G	A	F	C	H	G	D	R	E	T	M	A	D	L	C	L	V	P	Q	V	N	A	R	-R	W	D	V	L	A	A	C	P	L	V	A	I	D	R	R	C	A	G	I	D	A	F	Q	R	A 206			

Şekil 3.7. GSTz motif bilgisini içeren farklı türlerin karşılaştırılmalı üç boyutlu yapı analiz sonuçları (mor renkli alandan öncesi: N-terminal domain, mor renkli alandan sonrası: C-terminal domain, mor renkli alan: N ve C terminali birbirine bağlayan bağlayıcı dizi, mavi bölge: GSTz'yı temsil eden karakteristik motif, kırmızı boyalı S'ler: GSH bağlanmasını sağlayan bölge, α: heliksleri, β: plaklar)(ClustalW)(GSTZ Arabidopsis thaliana (Q9ZVQ3) GSTZ Euphorbiaesula (P57108), GSTZI Dianthus caryophyllus (P28342), GST Z Triticum aestivum (O04437), Tth GSTz 77m.00138, MAAI Caenorhabditis elegans (Q18938), MAAI Homosapiens (O43708), MAAI Musmusculus (Q9WVL0), MAAI Rhizobium melioli (Q9X4F7), GSTz Drosophila melanogaster (Q9VHD3) )



## 3.2. TtGSTz cDNA' sının klonlanması

### 3.2.1. Tetrahymena GST zeta'ya ait biyoinformatik analizler

TGD içerisinde yapılan analiz sonucunda elde edilen 15 homolog içinde TTHERM\_00575360 numaralı homologun, çalışılması hedeflenen GST zeta'yı temsil ettiği bulunmuştur. Bu homolog grup için yapılan analiz sonucunda da Ek 1' de belirttiği gibi GST zeta'ya ait protein, protein kodlayabilen yani intron içermeyen cDNA ve hem intron hem de ekzonlardan oluşan genomik DNA (gDNA) dizi bilgileri elde edilmiştir. Elde edilen verilere göre TtGSTz , 221 amino asitten oluşan bir protein , 663 bç'lik cDNA ve 785 bç'lik gDNA dizi bilgisine sahip olduğu belirlenmiştir. TtGSTz cDNA'nın 5' ve 3' bölgeleri gen bankası içinde kayıtlı değildi. Bu nedenle TtGSTz cDNA'sının 5' ve 3' bölgeleri dizi bilgileri araştırılmıştır. TtGSTz' nın 5' ve 3' bölgelerinin belirlenmesi için ilk olarak TGD içinde TtGSTz' ya ait EST'lere bakılmış ve Şekil 3.8'de gösterildiği üzere yaklaşık 13 EST dizisine rastlanmıştır.



Şekil 3.8. TtGSTz' nın EST dizileri (www.ciliate.org).

Genetool programı yardımıyla EST dizileri (dizi bilgileri Ek.3'te verilmiştir) yatay olarak hizalanmış ve olası 3' ve 5' bölgelere ait olası dizi

bilgilerine ulaşılmaya çalışılmıştır. Şekil 3.9’da görüldüğü üzere 5’ ve 3’ bölgelerine ait dizi bilgileri kirlilik unsuru oluşturan vektör parçaları yüzünden hizalamada istenen sonucu vermemiştir.

**A.**

```

77.m00138 ----- 0
gi|181925 -----TTTTTGGGAA 10
gi|181929 ----- 0
gi|182007 ----- 0
gi|181950 ----- 0
gi|122327 ----- 0
gi|181973 ----- 0
gi|181950 ----- 0
gi|181965 CTAGAAGTATTGGGCGTGAGCCTATATGGAGCAGCGATTAGTGCAGATCTTGGTGGT 14
gi|181995 -----AACAAAGCTGGAGCTCAC 18
gi|181972 -----AAAACTGAGCCAC 14
gi|181972 -----AAAACTGAGCCAC 14

77.m00138 ----- 0
gi|181925 AAAAGCGCAGCTTTCGGGTGGCGGCCGCTC-TAAATTAATTAATAAATATTAT-- 64
gi|181929 ---ACCGGGCTCCCCGGGTGGCGGCCGCTC-TAAA----- 32
gi|182007 -----AACGAGCCACGCGGGCGGCG-- 21
gi|181950 -----TAGTCCGCGGTGGCGGCCGCTCT-- 22
gi|122327 -----TCTAA-- 5
gi|181973 -----ACAAGCTG-AGCCACGCGGTGGCGGCCGCTCT-- 31
gi|181950 -----CACCCCCNNNNCCGATC-TGCGGCAGACCAATCTTTGTGGA-- 41
gi|181965 AGTAGCATTATTTATTTATTTATTTATTTCA-TTATTAATTAATTAATAAATATTT 170
gi|181995 GCGGTGGCGGCCGCTCTAATTTATTTATTTTCATTATTAATTAATAAATATTT 75
gi|181972 GCGGTGGCGGCCGCTCTAATTTATTTATTTTCATTATT-AATTAATTAATAAATATTT 70
gi|181972 GCGGTGGCGGCCGCTCTAATTTATTTATTTTCATTATT-AATTAATTAATAAATATTT 70

77.m00138 ----- 0
gi|181925 A-TA-AATAATCTTCAAAATTATTAATATAATAAAGATATATACAATAAACATATC 119
gi|181929 -----AAATATTAATATAATAAAGATATATACAATAAACATATC 72
gi|182007 CCTA-AAAATCTTCAAAATTATTA-TATA-TAAAGATATATACAATAAACATATC 75
gi|181950 AATA-TAATATCTTCAAAATTANNTTAAATAATAAAGATATATACAATAAACATATC 78
gi|122327 TATA-AATAATCTTCAAAATTATTAATATAATAAAGATATATACAATAAACATATC 61
gi|181973 AATATAATAATCTTCAAAAT-ATTAAATATAATAAAGATATATACAATAAACATATC 87
gi|181950 ATACCACTTCTCCGCTACTAAGGACTCGTCCCTGGGCGTTATAAATTCATTATTAT 98
gi|181965 ATATAAATAATCTTCAAAATTATTAATATAATAAAGATATATACAATAAACATATC 227
gi|181995 ATATAAATAATCTTCAAAATTATTAATATAATAAAGATATATACAATAAACATATC 132
gi|181972 ATATAAATAATCTTCAAAATTATTAATATAATAAAGATATATACAATAAACATATC 127
gi|181972 ATATAAATAATCTTCAAAATTATTAATATAATAAAGATATATACAATAAACATATC 127

77.m00138 -----ATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAA-TTACTCTTTACAG-TTATTT 41
gi|181925 AATTAATATTTTAAATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAA-TTACTCTTTACAG-TTATTT 174
gi|181929 AATTAATATTTTAAATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAA-TTACTCTTTACAG-TTATTT 127
gi|182007 AATTAATATTTTAAATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAA-TTACTCTTTACAG-TTATTT 130
gi|181950 AATTAATATTTTAAATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAA-TTACTCTTTACAG-TTATTT 133
gi|122327 AATTAATATTTTAAATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAA-TTACTCTTTACAG-TTATTT 117
gi|181973 AATTAATATTTTAAATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAA-TTACTCTTTACAG-TTATTT 142
gi|181950 AAGATTCTGACATCATAATTTAAGGGCGAGGCGAAAGAAATCCCTTACAG-TATTT- 153
gi|181965 AATTAATATTTTAAATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAA-TTACTCTTTACAGTTATTT 283
gi|181995 AATTAATATTTTAAATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAA-TTACTCTTTACAG-TTATTT 187
gi|181972 AATTAATATTTTAAATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAA-TTACTCTTTACTG-TTATTT 182
gi|181972 AATTAATATTTTAAATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAA-TTACTCTTTACTG-TTATTT 182

```

## B.

```
77.m00138 AAGT---AAGCTGACAATCCTGAT--AATCAAAAG--ATCTGA----- 663
gi|181925 ----- 691
gi|181929 ----- 644
gi|182007 AAGT---AAGCTGACAATCCTGAT--AATCAAAAG--ATCTGA AAATAAAAGCATAT 766
gi|181950 AAGTGA-AATCTGAAATCAAGGATTGAATTAAGCT--ATCTTTAAATTCGGGGACAA 774
gi|122327 ----- 636
gi|181973 AGCTGACAATCTGATATCAAAGATCTGAAATAAAGCTATTTTAAATGCGTGTAATA 789
gi|181950 AAGT---AAGCTGACAATCCTGAT--AATCAAAAG--ATCTGA AAATAAAAGCATAT 781
gi|181965 ----- 548
gi|181995 ----- 690
gi|181972 AAGTTATATG----- 808
gi|181972 AAGTTATATG----- 808
```

```
77.m00138 ----- 663
gi|181925 ----- 691
gi|181929 ----- 644
gi|182007 CTTTTAATATCTTTGTGTAAATTATACTCTGTAATAAAATTT-TTATTTTACA 822
gi|181950 AATGGACACATTTTCCGCGCGTCTTTCCTTTT----- 808
gi|122327 ----- 636
gi|181973 TAATGTA----- 796
gi|181950 CTTTTAATATTTTGTGTAAATTATAATTGTAATAAAATTTATTATTTTACA 838
gi|181965 ----- 548
gi|181995 ----- 690
gi|181972 ----- 808
gi|181972 ----- 808
```

```
77.m00138 ----- 663
gi|181925 ----- 691
gi|181929 ----- 644
gi|182007 ATTAATTCACATCATAAAAAAAAAAAAAACAAAAAGAAAAAAAAAAAAACAAAAAA 879
gi|181950 ----- 808
gi|122327 ----- 636
gi|181973 ----- 796
gi|181950 ATTAATTCAAATCACAATTTTTATTCAAAAAATAGAAAAAAAAAAAAAA 895
```

**Şekil 3.9.** TtGSTz' ya ait EST'lerin vecscreen öncesi hizalanması sonuçları (EST dizi bilgileri Ek.2'de verilmiştir). **A)** 5' bölgesi için yapılan hizalama. Yeşil kısım start kodonunu göstermekte, öncesi ise olası 5'bölgesini temsil etmektedir. **B)** Yeşil kısım stop kodonunu göstermekte, sonrası ise olası 3'bölgesini temsil etmektedir.

5' ve 3' bölgelere ait dizi bilgisilerine NCBI veri tabanında bulunan Vecscreen programı ile vektörlere ait parçalar belirlenmiş ve bu parçalar diziden çıkarılmıştır. Vektör parçaları çıkarıldıktan sonra EST dizileri tekrar hizalanmıştır. Şekil 3.10'da görüldüğü üzere temizlenmiş EST dizilerinin hizalanması sonucunda 5'bölgesine ait olası dizi bilgisine ulaşılmış (yeşil ile boyalı kısım) ama EST dizilerinin 3'bölgesine ait dizi bilgisi ise bir EST tarafından belirtildiği için yeterli görülmemiştir. 5' bölgesine ait dizi bilgisinin yeşil ile gösterilen kısım olup 81 bç uzunluğunda olduğu belirlenmiştir. Yeşil kısımdan öncesinin ise sadece iki EST dizisi tarafından desteklenmesi genelde 3 olarak kabul edilen kontrol sayısından düşük olmasından dolayı 5' bölgesine dahil edilmemiştir.

**A.**

```

TtGSTz ----- 0
gi|181925 -----TTTTGGGAAAAAAGCGCACTCTTAATTAATTAATAAAATATTTATATAA 49
gi|181929 ----- 0
gi|182007 -----AA-CGAGCCACGCGGGGCGGCGCC TAA 26
gi|181950 -----TAG-TCCGCGGTGGCGGCGCTCTAATAT 27
gi|122327 -----TCTAATA TAA 10
gi|181973 -----ACAAGCTGAGCCATATA 17
gi|181972 -----AAAACTGAGCCATTTATTTATTTTCATTATAATTAATTAATTAATAAAATATTTATATAA 56
gi|181995 -----AACATTTATTTATTTTCATTATAATTAATTAATTAATAAAATATTTATATAA 48

```

```

TtGSTz ----- 0
gi|181925 ATAATCTTCAAAATTATTAATATAATAAAGATATATACAATAAACATATCAATTAAT 107
gi|181929 -----ACCGGAAAAATATTAATATAATAAAGATATATACAATAAACATATCAATTAAT 54
gi|182007 AAANTCTTCAAAATTATTAATATAATAAAGATATATACAATAAACATATCAATTAAT 82
gi|181950 AATATCTTCAAAATTANNTTAAATAATAAAGATATATACAATAAACATATCAATTAAT 85
gi|122327 ATAATCTTCAAAATTATTAATATAATAAAGATATATACAATAAACATATCAATTAAT 68
gi|181973 ATAATCTTCAAAAT-ATTAATATAATAAAGATATATACAATAAACATATCAATTAAT 74
gi|181972 ATAATCTTCAAAATTATTAATATAATAAAGATATATACAATAAACATATCAATTAAT 114
gi|181995 ATAATCTTCAAAATTATTAATATAATAAAGATATATACAATAAACATATCAATTAAT 106

```

```

TtGSTz ATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAA-TTACTCTTTACAGTTATTTCCGCTCCTC 50
gi|181925 ATTTTAAATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAA-TTACTCTTTACAGTTATTTCCGCTCCTC 164
gi|181929 ATTTTAAATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAA-TTACTCTTTACAGTTATTTCCGCTCCTC 111
gi|182007 ATTTTAAATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAA-TTACTCTTTACAGTTATTTCCGCTCCTC 139
gi|181950 ATTTTAAATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAA-TTACTCTTTACAGTTATTTCCGCTCCTC 142
gi|122327 ATTTTAAATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAAATTACTCTTTACAGTTATTTCCGCTCCTC 126
gi|181973 ATTTTAAATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAA-TTACTCTTTACAGTTATTTCCGCTCCTC 131
gi|181972 ATTTTAAATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAA-TTACTCTTTACTGTTATTTCCGCTCCTC 171
gi|181995 ATTTTAAATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAA-TTACTCTTTACAGTTATTTCCGCTCCTC 163

```

**B.**

```

TtGSTz AATCAAAG--ATCTGA----- 663
gi|181925 ----- 672
gi|181929 ----- 619
gi|182007 AATCAAAG--ATCTGAAAAATAAAGCATATCTTTTAAATATCTTTGTGTTAAATTAT 793
gi|181950 AATTAAGCT--ATCTTAAATTCGGGGACAAAATGGACACATTTTCCGCGGCGTCTT 801
gi|122327 ----- 636
gi|181973 GAAATAAAGCTATTTTAAATGCGTGTAATATAATGTA----- 776
gi|181972 ----- 788
gi|181995 ----- 657

```

```

TtGSTz ----- 663
gi|181925 ----- 672
gi|181929 ----- 619
gi|182007 ACTCTGTAACATAAAATTTTATTTTACAATTAATTCACATCATAAAAAAAAAAAAAA 851
gi|181950 TCCTTT----- 808
gi|122327 ----- 636
gi|181973 ----- 776
gi|181972 ----- 788
gi|181995 ----- 657

```

```

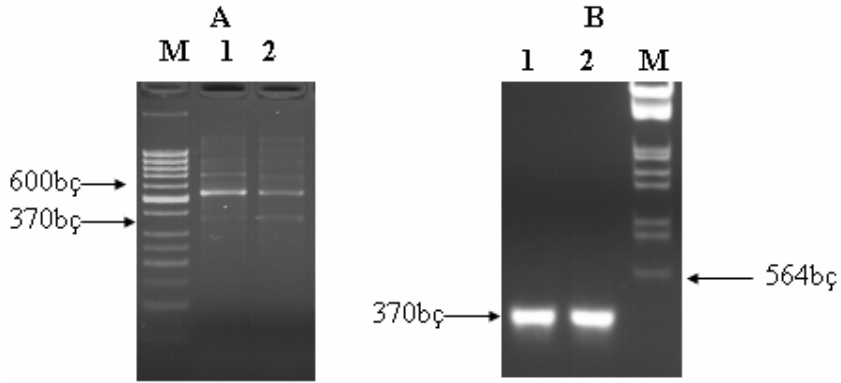
TtGSTz ----- 663
gi|181925 ----- 672
gi|181929 ----- 619
gi|182007 ACAAAAAGAAAAAAAAAAAAACAAAAAAAAAAGAAAAAACAAAAAAAAAAAAA 907
gi|181950 ----- 808
gi|122327 ----- 636
gi|181973 ----- 776
gi|181972 ----- 788
gi|181995 ----- 657

```

**Şekil 3.10.** TtGSTz' ya ait EST'lerin vecscreen sonrası hizalanması sonuçları (EST dizi bilgileri

Ek.2'de verilmiştir). **A)** 5' bölgesi için yapılan hizalama. Yeşil kısım start kodonunu göstermekte, öncesi ise olası 5'bölgesini temsil etmektedir. **B)** Yeşil kısım stop kodonunu göstermekte, sonrası ise olası 3'bölgesini temsil etmektedir.

EST dizileri 3' bölgesi hakkında yeterli bilgiyi içermediği için 3' bölgesinin elde edilmesi gerektiği düşünülmüştür. Olası 3' bölgesi RACE tekniği (bkz. Bölüm 2.2.20.2) ile elde edilmiş ve Şekil 3.11/A'da görüldüğü üzere çok sayıda bant elde edilmiştir. Elde edilen ürünler jelden kesilmiş ve beklenen tahmini ürün büyüklüğü olan 370 bç parça jelden saflaştırılmış. Diğer ürünler -20°C'de olası hata payı düşünülerek muhafaza edilmiştir. Saflaştırma sonunda Şekil 3.11/B'de görüldüğü gibi beklenen büyüklükte bant görülmüş ve saflaştırma işleminin başarılı olduğu görülmüştür.



**Şekil 3.11.** 3'RACE sonucun agaroz jel görüntüsü. **A)** 1ve 2, Glutatyon-s-transferaz zetaya ait 3' bölgeleri içeren bantlar. **B)** 1ve 2, *TtGSTz*'nin olası 3' bölgesi. (% 0.8'lik agaroz jel'e 3µl λDNA *EcoRI/Hind III* marker ile birlikte yüklenmesi ve 90 V'da 50dk. yürütülmüştür).

Toplam 5 adet plazmit Beckman Coulter CEQ8000 DNA dizi analiz aletinde dizi analizine tabii tutulmuş ve kullanılan primer bilgileri temizlenmiştir. Nükleotid dizisi belirlenen PZR ürünleri NCBI veritabanında analiz edilmiştir. Analiz sonucunda toplam 3 adet ürünün *TtGSTz* olduğu bulunmuş ve ürünlere ait dizi bilgileri birleştirilmiştir. Şekil 3.12'de görüldüğü üzere dizi analizi sonucu elde edilen dizi bilgisi ve bu dizinin verdiği pikler gösterilmiştir. Elde edilen dizi bilgisinin, gen bankası içindeki EST dizisi ile birebir aynı olduğu görülmüştür. Analiz sonucunda 3' UTR bölgesinin 97 bç uzunlukta dizi bilgisi içerdiği bulunmuştur. Böylece gen bankası içerisinde bir tane olan 3'EST dizi bilgisi ikiye çıkarılmıştır.



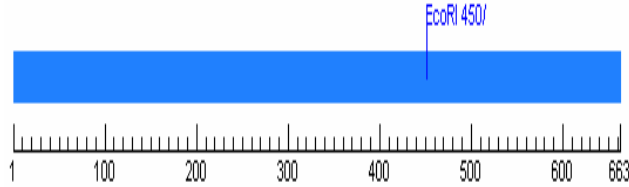
```

ttaaattaattaataaatatttatataaataat -61
cttcaaaattatttaataataataaaagatatatacaataaacaatcaatatttttaa -1
M A E S S K K I T L Y S Y F R S S T S W
ATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAATTACTCTTTACAGTTATTTCCGCTCCTCAACTTCATGG 60
R V R I A L N L K K I D Y N I I P I N L
AGAGTAAGAATAGCTCTTAATCTTAAGAAAATAGACTACAACATCATTCTTATTAACCTT 120
L K S E Q T S E E Y T K I N P N Q G V P
TTGAAGAGTGAATAAACTTCTGAAGAATATACTAAAATCAATCCTAACTAGGGAGTCCCT 180
A L K Y G D E V I I E S S A I L E F L E
GCTTTAAAGTATGGAGACGAGGTTATTATGAAAGCTCTGCTATCTTAGAGTTTTGGAA 240
E V F P E H P L L P Q D A V K R A Q I R
GAAGTATTTCTGAGCACCCTTCTTCTTAAGATGCAGTTAAAAGAGCTTAAATTAGA 300
G F C Q V I N T A I H P L Q N L R V L N
GGCTTTTGCCAAGTAATTAACACTGCCATCCACCTCTCTAAAATTTGAGGGTGCTTAAT 360
K I E K E Y S Q D K I Q W L K F W V T K
AAGATTGAAAAGGAATATAGCTAAGACAAGATTCAATGGCTCAAATTTCTGGGTACTAAG 420
G L T A I E E L L K N S H G K Y C F G D
GGTTTGACAGCAATTGAAGAATTATTAAGAATTCTCATGGAAAATATTGCTTTGGTGAT 480
E I T L A D L F L V P Q V Q G V V D R F
GAAATAACACTTGCTGACTTATTCTTGGTACCTCAAGTTCAGGAGTTGTAGATAGATTC 540
Q F D L T P F P N I A E V L K N L K E I
CAATTTGATTTAACCCCTTTCCCAATATTGCAGAAGTTTTAAAAAATTTAAAGGAAATT 600
P E F V A A S P S K Q A D N P D N Q K I
CCTGAGTTCGTTGCTGCTCACCCAGCAAGTAAGCTGACAATCCTGATAATCAAAGATC 660
*
TGAAaataaaagcatatctttttaatattttgtgtaaatataaattgtaactaaaa 720
tttattattttacaattaaattcaaatcataatt 755

```

Şekil 3.13. TtGSTz cDNA'sının nükleotid ve amino asit dizi bilgisi.

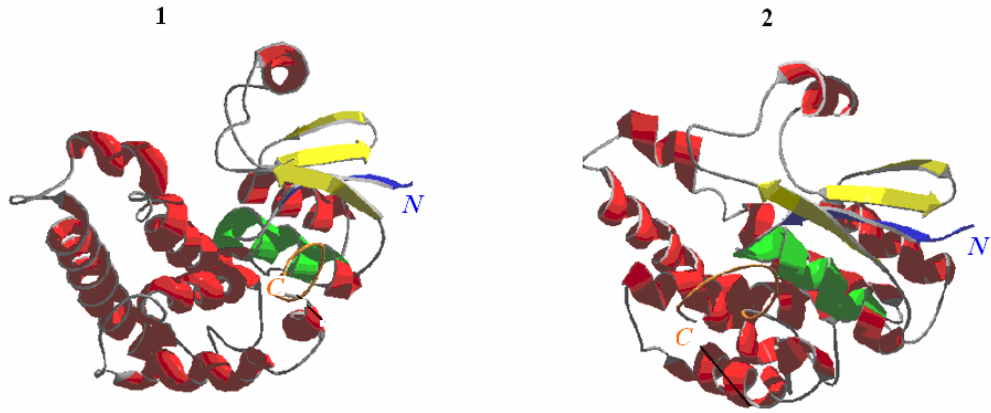
TtGSTz cDNA'sının kısmi karakterizasyonu için restriksiyon analizi yapılmıştır. Restriksiyon analizi sonucunda TtGSTz cDNA'sını içerden kesen EcoRI'nın Şekil 3.14'de görüldüğü gibi, 663 bç uzunluğundaki TtGSTz cDNA'sını, 450bç ve 213 bç'lik iki parçaya ayırdığı belirlenmiştir.



Şekil 3.14. GST zeta cDNA'sının restriksiyon analizi sonucu (Genetool programı versiyon 1.0).( ok işareti EcoRI kesim bölgesini göstermektedir.

*T. thermophila* olası üç boyutlu yapısının elde edilmesi için , TtGSTz'nin amino asit dizi bilgisi kullanılmıştır. Bu dizi bilgisi **swiss-prot** tarafından (<http://swissmodel.expasy.org/repository>) olası üç boyutlu yapısı oluşturularak,

**spdv** programı ile görünür hale getirilmiştir. Şekil 3.15’ te görüldüğü gibi olası üç boyutlu yapısı, kristal yapısı çözülmüş olan *Arabidopsis thaliana* GSTz (Thom, R. 2001 ve PDB:1e6b) ’sı ile karşılaştırılmış ve benzerlik oranının yüksek olduğu görülmüştür. GST ailesine ait enzimlerin üç boyutlu yapılarında gösterdiği thioredoxin fold yapısını TtGSTz’nın da gösterdiği bulunmuştur. Thioredoxin fold yapısında N-terminal domain  $\beta$  ve  $\alpha$ , C-terminal domainin da ise  $\alpha$ -heliks kıvrımlarından oluştuğu bilinmektedir.



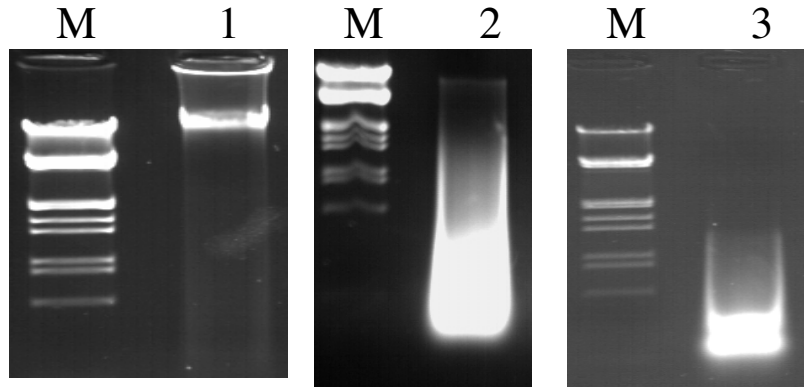
**Şekil 3.15.** TtGSTz'nın üç boyutlu yapısı. 1) Kristal yapısı çözülmüş *Arabidopsis thaliana* GSTz ait üç boyutlu yapı. 2) TtGSTz'nın olası üç boyutlu yapısı ( N: N- terminal, C: C-terminal., **Yeşil Kısım:** GSTz'ya ait motif bilgisini taşıyan bölge, **Sarı Kısım:** beta tübulin, **Kırmızı Kısım:**alfa heliks).

### 3.2.2. *T.thermophila*'dan genomik DNA izolasyonu ve cDNA'nın klonlanması

*T.thermophila*'dan sırasıyla genomik DNA izolasyonu, total RNA izolasyonu, total RNA'ya DNaz uygulanması ve RT deneyleri bölüm 2.2.1-2.2.6'da belirtilen protokollerde değişiklik yapılmadan uygulanmıştır. Buna göre deney sonuçları Şekil 3.16'da belirtilmiştir. Bu sonuçlar içinde elde edilen genomik DNA izolasyon ürününün spektrofotometrik ölçümleri yapıldığında örneğin 213 ng/ $\mu$ l yoğunlukta DNA içerdiği belirlenmiştir (Şekil 3.16/1). TRI reagent kullanılarak elde edilen total RNA izolasyon ürünlerinin spektrofotometrik ölçümleri yapıldığında örneğin yoğunluğu 645 ng/ $\mu$ l ve saflığı 1.9 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.16/2). Şekil 3.16/2'de görüldüğü gibi yapılan



RNA izolasyonu sonucunda, DNA kontaminasyonu olduğu görülmüş ve bunun için DNaz uygulaması yapılmıştır. Şekil 3.16/3'te görüldüğü üzere yapılan uygulama sonucunda kontaminasyon yaratan DNA'ların büyük bölümü ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Kalite ve saflığını belirlemek için spektrofotometrik analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda yoğunluğunun 850 ng/μl ve saflığının 1.8 olduğu belirlenmiştir. cDNA eldesi için kullanılan toplam RNA yoğunluğunun 5 μg olması için gerekli RNA miktarı 4.8 μl olarak hesaplanmış ve Revert Aid First Strand cDNA synthesis Kit (#1622) kullanılarak cDNA eldesi gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 3.16.** *T. thermophila*'dan klasik yöntemle genomik DNA'sının agaroz jelden görüntüsü. **M)** λDNA EcoRI/Hind III Marker, **1)** *T. thermophila* genomik DNA'sının agaroz jelden görüntüsü. **2)** *T. thermophila*'dan total RNA izolasyonunun agaroz jelden görüntüsü. **3)** *T. thermophila*'dan total RNA'ya DNaz uygulanmasının agaroz jelden görüntüsü ( % 0.8' lik agaroz jel'e 3μl λDNA EcoRI/Hind III marker ile birlikte yüklenmiş ve 90 V 45dk. yürütülmüştür).

*T. thermophila* GST zeta'nın protein kodlamayan intron bölgelerinin belirlenmesi için gDNA ve cDNA dizi bilgileri clustalW programı ile hizalanmıştır. Şekil 3.17'de yapılan hizalama sonuçlarına göre TtGSTz'nin 3 ekzon 2 introndan oluştuğu bulunmuştur. Bu intronlardan birincisi 172-233 nükleotid dizileri arasında kalan bölge, ikincisi ise 491-552 nükleotid dizileri arasında kalan bölgeyi kapsamaktadır. Analiz sonucunda TtGSTz'nin toplam 122 bç intron bölgesi içerdiği bulunmuştur.

```

gDNA      ATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAATTACTCTTTACAGTTATTTCCGCTCCTCAACTTCATGG 60
cDNA      ATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAATTACTCTTTACAGTTATTTCCGCTCCTCAACTTCATGG 60

gDNA      AGAGTAAGAATAGCTCTTAATCTTAAGAAAATAGACTACAACATCATTCTTATTAACCTT 120
cDNA      AGAGTAAGAATAGCTCTTAATCTTAAGAAAATAGACTACAACATCATTCTTATTAACCTT 120

gDNA      TTGAAGAGTGAATAAACTTCTGAAGAATATACTAAAATCAATCCTAACTAGGTAATTAAT 180
cDNA      TTGAAGAGTGAATAAACTTCTGAAGAATATACTAAAATCAATCCTAACTAGG----- 172
*****

gDNA      TTAATTTTTTATGAGAGTAATTATAATTCTAAGAAATATAAAACACTATTAGGGAGTCCC 240
cDNA      -----GAGTCCC 179
                Intron I (61 bç)                *****

gDNA      TGCTTTAAAGTATGGAGACGAGGTTATTATTGAAAGCTCTGCTATCTTAGAGTTTTTGGGA 300
cDNA      TGCTTTAAAGTATGGAGACGAGGTTATTATTGAAAGCTCTGCTATCTTAGAGTTTTTGGGA 239
*****

gDNA      AGAAGTATTTCTGAGCACCCTTCTCCTTAAGATGCAGTTAAAAGAGCTTAAATTAG 360
cDNA      AGAAGTATTTCTGAGCACCCTTCTCCTTAAGATGCAGTTAAAAGAGCTTAAATTAG 299
*****

gDNA      AGGCTTTTGCCAAGTAATTAACACTGCCATCCACCCTCTCTAAAATTGAGGGTGCTTAA 420
cDNA      AGGCTTTTGCCAAGTAATTAACACTGCCATCCACCCTCTCTAAAATTGAGGGTGCTTAA 359
*****

gDNA      TAAGATTGAAAAGGAATATAGCTAAGACAAGATTCAATGGCTCAAATCTGGGTTACTAA 480
cDNA      TAAGATTGAAAAGGAATATAGCTAAGACAAGATTCAATGGCTCAAATCTGGGTTACTAA 419
*****

gDNA      GGGTTTGACAGGTAATTAATTTAATTCTATTATAATGAATGAGCGTTCAATAATTTAAA 540
cDNA      GGGTTTGACAG----- 430
*****                Intron II (61 bç)

gDNA      AAATATATAAAGCAATTGAAGAATTATTAAGAATTCTCATGGAAAATATTGCTTTGGTG 600
cDNA      -----CAATTGAAGAATTATTAAGAATTCTCATGGAAAATATTGCTTTGGTG 478
*****

gDNA      ATGAAATAACACTTGCTGACTTATTCTTGGTACCTCAAGTTCAAGGAGTTGTAGATAGAT 660
cDNA      ATGAAATAACACTTGCTGACTTATTCTTGGTACCTCAAGTTCAAGGAGTTGTAGATAGAT 538
*****

gDNA      TCCAATTTGATTTAACCCCTTTCCCAATATGCAGAAGTTTTAAAAAATTTAAAGGAAA 720
cDNA      TCCAATTTGATTTAACCCCTTTCCCAATATGCAGAAGTTTTAAAAAATTTAAAGGAAA 598
*****

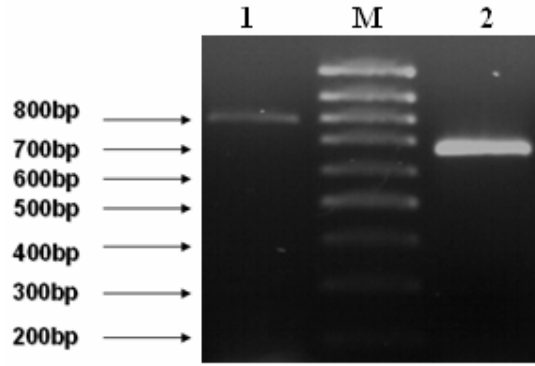
gDNA      TTCCTGAGTTCGTTGCTGCCTCACCCAGCAAGTAAGCTGACAATCCTGATAATCAAAGA 780
cDNA      TTCCTGAGTTCGTTGCTGCCTCACCCAGCAAGTAAGCTGACAATCCTGATAATCAAAGA 658
*****

gDNA      TCTGA 785
cDNA      TCTGA 663
*****

```

**Şekil 3.17.** *T.thermophila* GST zeta'nın protein kodlamayan intron bölgelerinin belirlenmesi için gDNA ve cDNA dizi bilgilerine ait dikey hizalanma sonuçları (yeşil alan: intron bölgelerini göstermektedir, ClustalW ile algoritması kullanılmıştır).

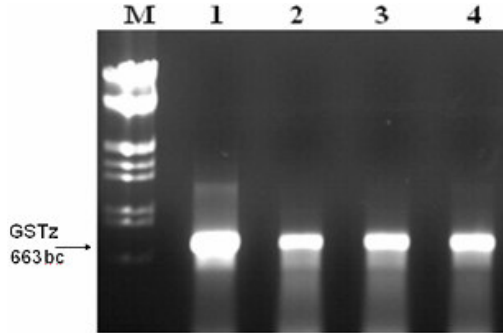
TtGSTz'da 122 bç'lik intronun varlığı biyoinformatik analizlerle belirlenmiştir. Bu intronların deneysel olarak belirlenmesi için de, klasik PZR yöntemi kullanılmıştır. Kalıp olarak da daha önceden üretilen genomik DNA ve RT (cDNA)'ler (bkz.3.2.4 ) kullanılmıştır. PZR sonucu elde edilen veriler Şekil 3.18'de gösterilmiştir. Şekil 3.18'de gDNA ve cDNA arasında intronlardan kaynaklanan baz farklılığının, biyoinformatik analizlerde belirtildiği 122 bç olduğu görülmüştür.



**Şekil 3.18.** *TtGSTz*'nin gDNA ve cDNA dizilerinin karşılaştırılmasının agaroz jelden görüntüsü.

M) Mass Ruler DNA Ladder 100 bç Marker, 1) *TtGSTz*'ya ait cDNA, 2) *TtGSTz*'ya ait gDNA (% 0.8' lik agaroz jel'e 3µl Mass Ruler DNA Ladder marker ile birlikte yüklenmesi ve 90 V'de 50dk. yürütülmüştür )

Elde edilen olan cDNA' nın klonlanması için yoğun olması gereklidir. Bunun için cDNA kalıbı kullanılarak tekrar PZR (Re-PZR) yapılmıştır. Şekil 3.19'da görüldüğü beklenen büyüklükte olan 663 bç bantlar elde edilmiştir.



**Şekil 3.19.** *TtGSTz* cDNA'nın Re-PZR sonuçlarının agaroz jelden görüntüsü. M) λDNA EcoRI/Hind III Marker 1, 2 ,3 ve 4) *TtGSTz* cDNA'nın Re-PZR sonuçlarının agaroz jelden görüntüsü (% 0.8' lik agaroz jel'e 3µl λDNA EcoRI/Hind III marker ile birlikte yüklenmesi ve 90 V'de 50dk. yürütülmüştür).

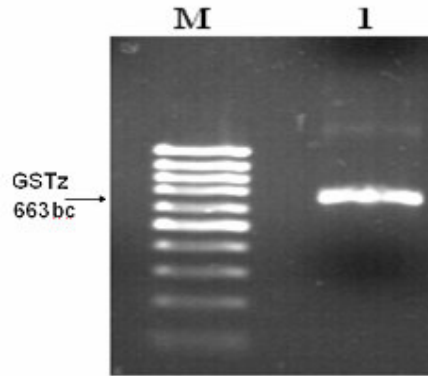
Re-PZR sonucunda elde edilen bantların saflaştırılması işlemi yapılmıştır. Burada amacımız klonlanacak parçanın PZR reaksiyonunda kullanılan maddelere ait kirliliği içermemesi ve diğer bantların ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Jelden saflaştırma işleminin de ilk olarak kesilen jelin ağırlığı belirlenmiştir. Jelin ağırlığı aşağıda belirtilen şekilde hesaplanmıştır.

Boş ependorf tüpünün ağırlığı: 0.95 gr

Jel ile birlikte ependorf ağırlığı: 1.35 gr

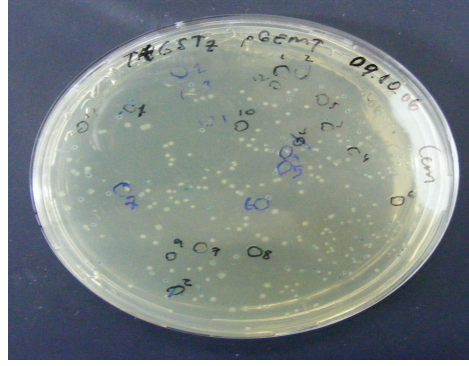
Jelin ağırlığı = 1.35 gr - 0.95 gr = 0.4 gr

Saflaştırma sonucunda Şekil 3.20' de görüldüğü gibi beklenen büyüklükte bant elde edilmiş ve saflaştırmanın başarılı olduğu görülmüştür. Spektrofotometrik analizi sonunda da saflaştırma ürününün 152 ng/μl yoğunluğa sahip olduğu bulunmuştur.



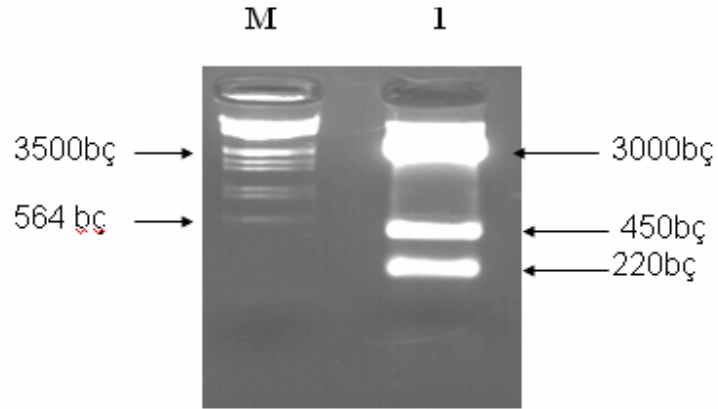
**Şekil 3.20.** *TtGSTz* cDNA'nın Re-PZR saflaştırma sonuçlarının agaroz jelden görüntüsü. **M)** Mass ruler 100 bp. marker **1)** *TtGSTz* cDNA'nın saflaştırılmış Re-PZR sonucu (% 0.8' lik agaroz jel'e 3μl λDNA EcoRI/Hind III marker ile birlikte yüklenmesi ve 90 V'de 50dk. yürütülmüştür).

Saflaştırılan cDNA'nın A ekleme (bkz.2.2.14) reaksiyonu yapılmış, 152 ng/μl olan cDNA'dan ligasyon için gerekli olan miktarın 3 μl olduğu belirlenmiş (bkz.2.2.14) ve transformasyonu yapılmıştır. Transformasyondan sonra Şekil.3.21'de görüldüğü gibi mavi-beyaz kolonilerin oluştuğu gözlenmiştir.



**Şekil 3.21.** *TtGSTz* cDNA'nın transformasyonu sonucu oluşan kolonilerin görüntüsü.

Transformasyon kontrolü için yapılan ekimlerde; inkübasyon sonrasında LB mediumlarda büyümenin olduğu gözlenmiştir. Büyüme gözlenen LB Mediumlardan ise plazmit izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonu yapılan pGEMTeasy plazmitinin *TtGSTz* cDNA'sını taşıyıp taşımadığını anlamak için, bölüm 3.1.3'de biyoinformatik analizler sonucunda belirtildiği gibi EcoRI ile kesimi yapılmıştır. Şekil 3.22'de görüldüğü gibi EcoRI ile kesimi sonucunda beklenen büyüklükler olan 450 bç ve 213 bç'lik ürünlerin elde edildiği görülmüştür.. Böylece *TtGSTz* cDNA'sının klonlama işlemi başarılı bir biçimde gerçekleştirilmiştir (Klonlanan vektörün şekli Ek.4'te belirtilmiştir).



**Şekil 3.22.** *TtGSTz* cDNA'sını taşıdığı sanılan pGEMTeasy plazmidinin restriksiyon analizinin agaroz jel görüntüsü. **M)**  $\lambda$ DNA EcoRI/Hind III Marker, **1)** *TtGSTz* cDNA'sını taşıdığı sanılan pGEMTeasy plazmidinin kesim ürünleri (% 0.8' lik agaroz jel'e 3 $\mu$ l  $\lambda$ DNA EcoRI/Hind III marker ile birlikte yüklenmesi ve 90 V'de 50dk. yürütülmüştür).

### 3.3. TtGSTz protein ifadesi yapılabilmesi için gerekli nokta mutasyonların PZR temelli yerleştirilmesi

#### 3.3.1. TtGSTz noktasal mutasyonlarının gerçekleştirilmesi gereken bölgelerin belirlenmesi

TtGSTz'nın protein ifadesinin yapılabilmesi için gerçekleştirilmesi gereken nokta mutasyon bölgeleri cDNA dizi bilgisinde yola çıkılarak genetool programı versiyon 1.0 yardımıyla belirlenmiştir. Şekil 3.23'de görüldüğü üzere TtGSTz üzerinde 7 nokta mutasyonun gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

```

M A E S S K K I T L Y S Y F R S S T S W
1 atggctgaaagctcaaagaaaattactctttacagttatctccgctcctcaacttcatgg
taccgactttcgagtttcttttaatgagaaatgtcaataaagcgaggagtgaagtacc

R V R I A L N L K K I D Y N I I P I N L
61 agagtaagaatagctcttaaatcttaagaaaatagactacaacatcattcctattaacctt
tctcattcttatcgagaattagaattctttatctgatgtttagtaaggataattggaa

L K S E * T S E E Y T K I N P N * G V P
121 ttgaagagtgaataaacttctgaagaatatactaaaatcaactcctaactaggagtcctt
aacttctcacttatttgaagacttcttatatgatttttagttaggattgatccctcagga

A L K Y G D E V I I E S S A I L E F L E
181 gctttaaagtatggagacgaggttattattgaaagctctgctatcttagagtttttgaa
cgaatttcatacctctgctccaataataactttcgagacgatagaatctcaaaaacctt

E V F P E H P L L P * D A V K R A * I R
241 gaagatcttctgagcaccacttcttctttaagatgcagttaaaagagcttaaattaga
cttcataaaggactcgtgggtgaagaaggaattctacgtcaattttctcgaatttaactt

G F C Q V I N T A I H P L * N L R V L N
301 ggcttttgccaagtaattaacactgccatccaccctctctaaaatttgagggtgcttaat
ccgaaaacggttcattaattgtgacggttagtgggagagattctaaactcccacgaatta

K I E K E Y S * D K I Q W L K F W V T K
361 aagattgaaaaggaatatagctaagacaagattcaatggctcaaatctgggttactaag
ttctaacttttcttatatcgattctgttctaagttaccgagtttaagaccaatgattc

G L T A I E E L L K N S H G K Y C F G D
421 ggtttgacagcaattgaagaattattaagaattctcatggaaaatattgctttggtgat
ccaaactgctgtaacttctaataatttcttaagagtacctttataacgaaaccacta

E I T L A D L F L V P Q V Q G V V D R F
481 gaaataacacttgctgacttattcttggtaacctcaagttcaaggagtgtagatagattc
ctttattgtgaacgactgaataagaaccatggagttcaagttcctcaacatctatctaag
```

```

Q F D L T P F P N I A E V L K N L K E I
541 caatttgatttaaccctttccccaatattgcagaagttttaaaaaatataaggaaatt
gttaaactaaattggggaagggttataacgtcttcaaaatTTTTTaaatttccttaa

P E F V A A S P S K * A D N P D N Q K I
601 cctgagttcgttgctgcctcaccagcaagTaaTgctgacaatcctgataatcaaaagatc
ggactcaagcaacgacggagtggtcgcttcactTcgactgttaggactattagtttctag

*
661 Tga
act

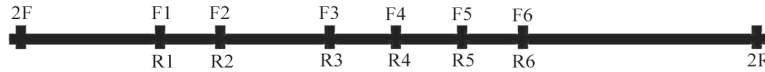
```

**Şekil 3.23.** TtGSTz'nın protein ifadesinin yapılabilmesi için gerçekleştirilmesi gereken nokta mutasyon bölgeleri (yeşil alan bu bölgeleri göstermektedir, genetool versiyon 1.0).

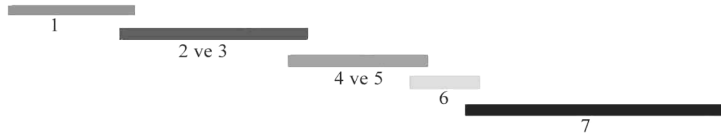
TtGSTz'nın nokta mutasyonu gerçekleştirilecek bölgeler belirlendikten sonra bu bölgelere özgü primerler tasarlanmıştır ( bkz.2.2.16). Bu mutasyonların gerçekleşmesi için Şekil 3.24-A'da görüldüğü üzere belirli bir strateji geliştirilmiştir. Şekil 3.24-B'de görüldüğü üzere ilk PZR ile parçalar elde edilmiş ve Şekil 3.24-C'de görüldüğü üzere ikinci PZR'de elde edilen bu parçalar birleştirilmiştir. Böylece protein ifadesinin gerçekleşmesi için gerekli nokta mutasyonlar gerçekleştirilmiştir.

### A.

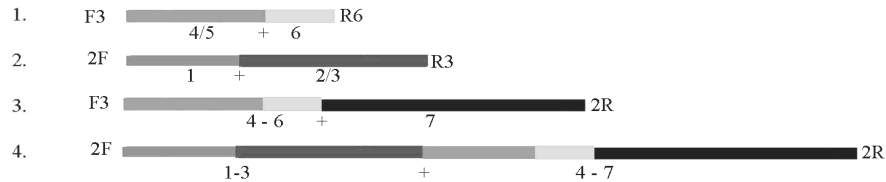
Primerler



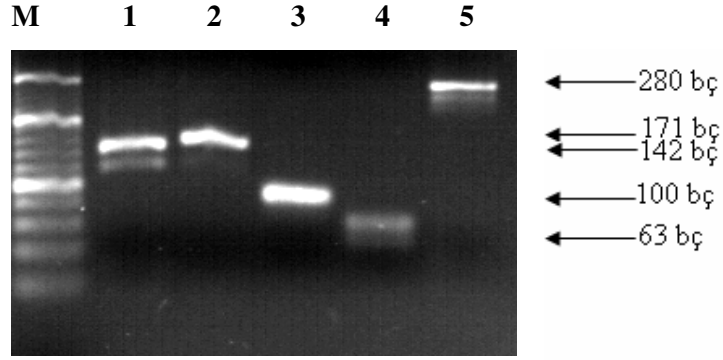
Birinci PCR



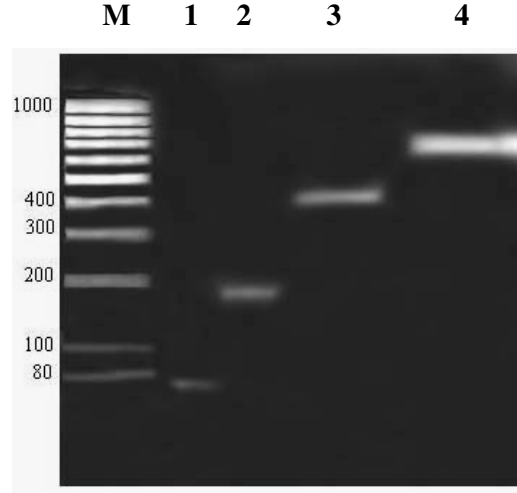
İkinci PCR



**B.**



**C.**

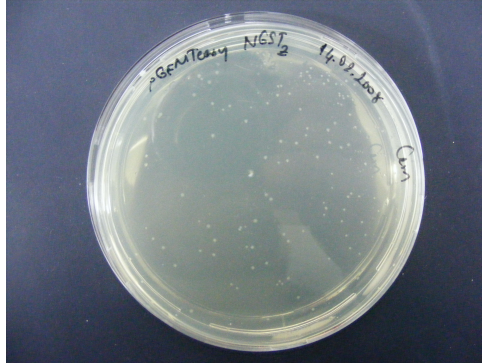


**Şekil 3.24.** TtGSTz'nin PZR tabanlı nokta mutasyonlarının gerçekleştirilmesi. **A)** TtGSTz cDNA'sına ait nokta mutasyonların dizi üzerindeki dizilişi. Birinci PZR'de elde edilecek parçalar. İkinci PZR'de elde edilecek parçaların birleştirilmesi stratejisi. **B)** Birinci PCR sonuçlarının ve **C)** İkinci PZR'de birleştirilen parçaların %2'lik agaroz jel görüntüsü **M)** 100 bp Ladder (O Gene ruler, Fermentas) **B)** 1; 2F/R1, 2; F1/R3, 3; F3/R5, 4; F5/R6, 5; F6/2R,C) 1; F3/ R6, 2; 2F / R3 , 3; F3/2R, 4; 2F/2R

Nokta mutasyonları gerçekleştirilen *TtGSTz*'nin klonlanması için 2.2.14-2.2.16'da belirtilen protokoller değiştirilmeden uygulanmıştır. Ligasyona alınması gereken örnek 2.2.14'de belirtilen formüle göre hesaplanmış ve kullanılması gereken hacmin 3 µl olması gerektiği belirlenmiştir. *TtGSTz*'nin nokta mutasyonları gerçekleştirilen cDNA'sının transformasyonu sonucu Şekil 3.25'de

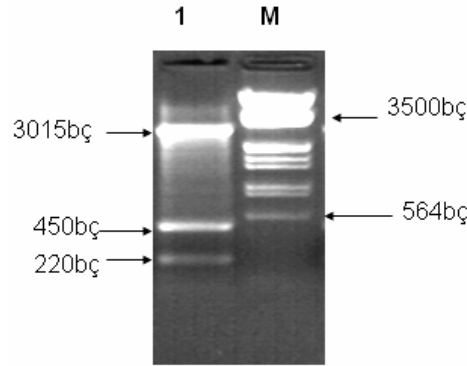


görüldüğü gibi mavi- beyaz kolonilerin oluştuğu ve transformasyonun başarılı bir biçimde gerçekleştirildiği görülmüştür.



**Şekil 3.25** *T7GSTz*' nin nokta mutasyonları içeren cDNA'sının transformasyonu sonucu .

Transformasyon kontrolü için yapılan ekimlerde; inkübasyon sonrasında LB Mediumlarda büyümenin olduğu gözlemlendi. Büyüme gözlenen LB Mediumlardan plazmit izolasyonu yapılmıştır. Plazmit izolasyonu sonucu elde edilen ürünler, EcoRI ile 24 saat kesime bırakılmış ve kesim sonucu oluşan ürün, %0.8'lik agaroz jel'e 3µl, λDNA EcoRI/Hind III marker ile birlikte yüklenmiştir. Yüklenen örnekler 90 V'de 45 dk. yürütülmüştür. Şekil 3.26' de görüldüğü gibi, beklenen büyüklükte bantlar olan 450 bç ve 213 bç'lik bantlar elde edilmiştir.



**Şekil 3.26** . *T7GSTz*' nin nokta mutasyonları içeren cDNA'sının taşıdığı sanılan pGEMTeasy plazmidinin restriksiyon analizinin agaroz jel görüntüsü. **M)** λDNA EcoRI/Hind III Marker, **1)** *T7GSTz* cDNA'sını taşıdığı sanılan pGEMTeasy plazmidinin kesim ürünleri (%0.8' lik agaroz jel'e 3µl λDNA EcoRI/Hind III marker ile birlikte yüklenmesi ve 90 V'de 50dk. yürütülmüştür).

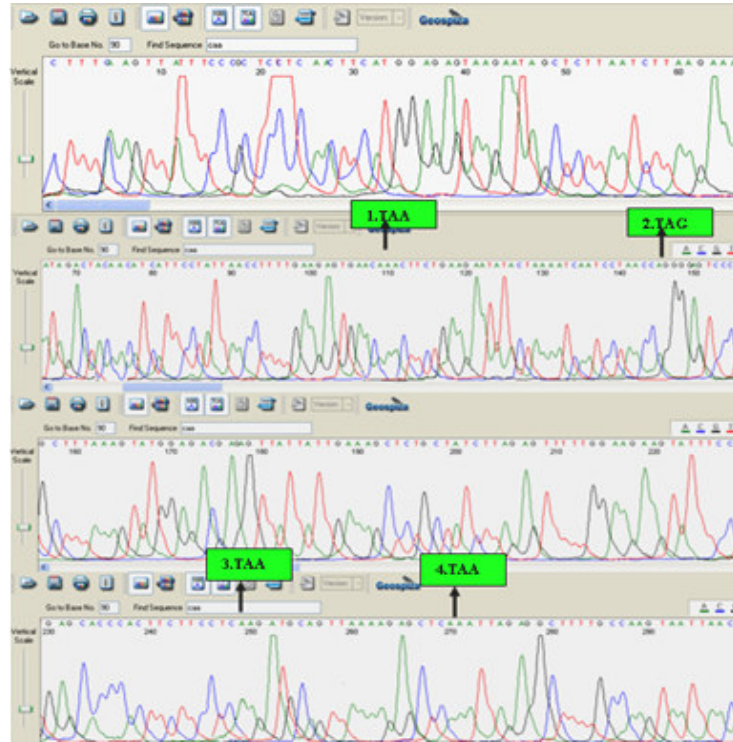
Plazmit Beckman Coulter CEQ8000 DNA dizi analiz aletinde dizi analizine tabii tutulmuş ve kullanılan primer bilgileri temizlenmiştir. Nükleotid

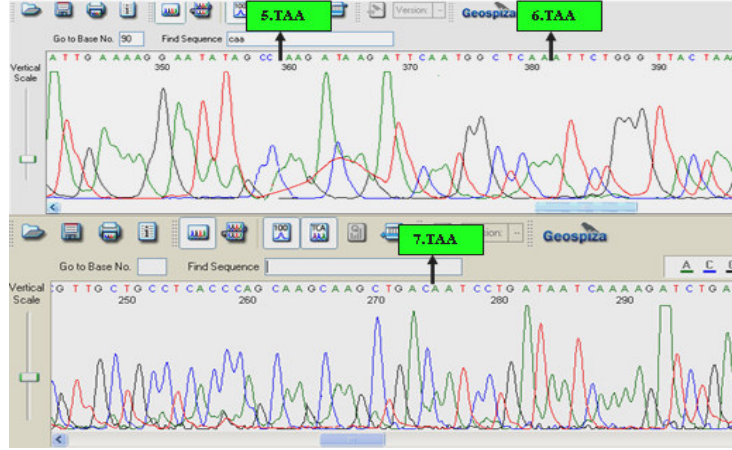
dizisi belirlenen PZR ürünü NCBI veri tabanında analiz edilmiştir. Analiz sonucunda ürünün *TtGStz* olduğu bulunmuş ve ürüne ait dizi bilgileri belirtilmiştir. Şekil 3.27’de görüldüğü gibi dizi analizi sonucu elde edilen dizi bilgisi ve bu dizinin verdiği pikler gösterilmiştir. Gerçekleştirilmesi gereken nokta mutasyonların o bölgede uygun pikleri verdiği ve nokta mutasyonların başarılı biçimde gerçekleştirildiği görülmüştür.

### A- Dizi analizi sonucu elde edilen dizi bilgisi

```
>ctttcaagttatttcccgcctctcaacttcaggagagtaagaatagctcttaacttaagaaaaagactacaacatca  
ttcctattaacctttgaagagtgaacaaactctgaagaataactaaatcaatcctaaccaggggagtcctgcttta  
aagatggagacgagagttatttgaagctctgctatcttagagttttggaagaagtatttctgagcaccactctt  
cctcaagatgcagttaaagagctcaattagaggctttgccaagtaattaactgccatccacctctccaaaatt  
gagggtgcttaataagattgaaaaggaatagccaagataagattcaatggctcaaattctgggtactaaagttga  
cagcgattgaagaattattaagaattctcatggaaaatattgcttggatgaaatacactgctgactattctgtgac  
ctcaagttcaaggagttgtagatagattccactttgattaacccttcccata
```

### B. Dizi analizi sonucuna ait pikler





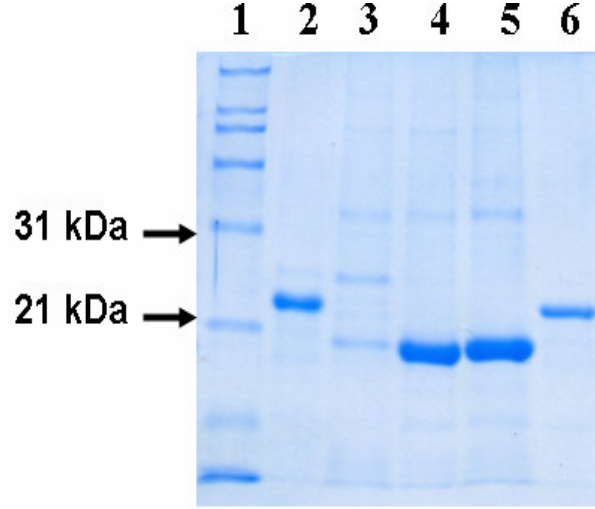
**Şekil 3.27.** TtGSTz'nın nokta mutasyonları gerçekleştirilmiş cDNA'sının dizi analizi sonuçları. **A)** TtGSTz dizi analizi sonucu elde edilen dizi bilgisi. **B)** Dizi analizi sonuçlarına ait piklerin görüntüsü (yeşil kutular nokta mutasyonların gerçekleştiği bölgeleri temsil etmektedir).

TtGSTz, *E.coli*'de ekspresyonun yapılması için gerekli olan nokta mutasyonları gerçekleştirildikten sonra, protein ekspresyonu yapılmıştır.

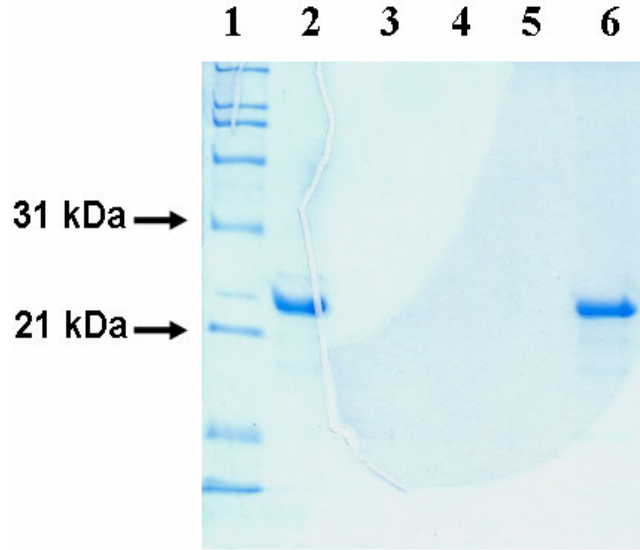
### 3.4. TtGSTz'nın rekombinant proteininin ekspresyonu

Protein ekspresyonu için His takısı bulunan pET16b vektörü (6xHis) kullanılmıştır. TtGSTz bu vektöre yerleştirilmiş (vektöre ait şekil Ek.5'tebelirtilmiştir), klonlanmış ve protein izolasyonu yapılmıştır. İki farklı koloniden gelen protein izolatları önce His affinitesi gösteren Nİ-NTA agaroz ile daha sonra piyasada ticari olarak kullanılan Glutasyon boncukları ile saflaştırılmıştır. Şekil 3.28'de görüldüğü gibi Ni-NTA ile saflaştırılan proteinlerin SDS jel elektroforezi yöntemi görünür hale getirilmiştir. Şekil 3.28'de Ni-NTA ile yapılan saflaştırmada 2 nolu örnek pozitif kontrol olarak kullanılan ticari GST'dir. Saflaştırılan proteinler ise indüklenmemiş (3 nolu örnek) ve 1, 2, 3 (sırasıyla 4, 5, 6 nolu örnekler) saatlerde indüklenmiş olarak jele yüklenmiştir. İndüklenmemiş proteinde (Şekil 3.28/3) bantlaşma görülmemiştir. IPTG genelde 3 saat sonunda etkisini gösterir ve çalışmada 3 saat indükledikten sonra istenen bant elde edilmiş, 1 ve 2 saat indüklenmenin yetersiz olduğu görülmüştür. Böylece ekspresyonun 3 saat sonunda başarılı olduğu görülmüştür. Ticari GST boncukları

ile yapılan saflandırma sonucunda da Şekil 29’da görüldüğü gibi bantlaşma olduğu ve sadece pozitif TtGSTz ile kontrol GST’yi gördüğü belirlenmiştir.



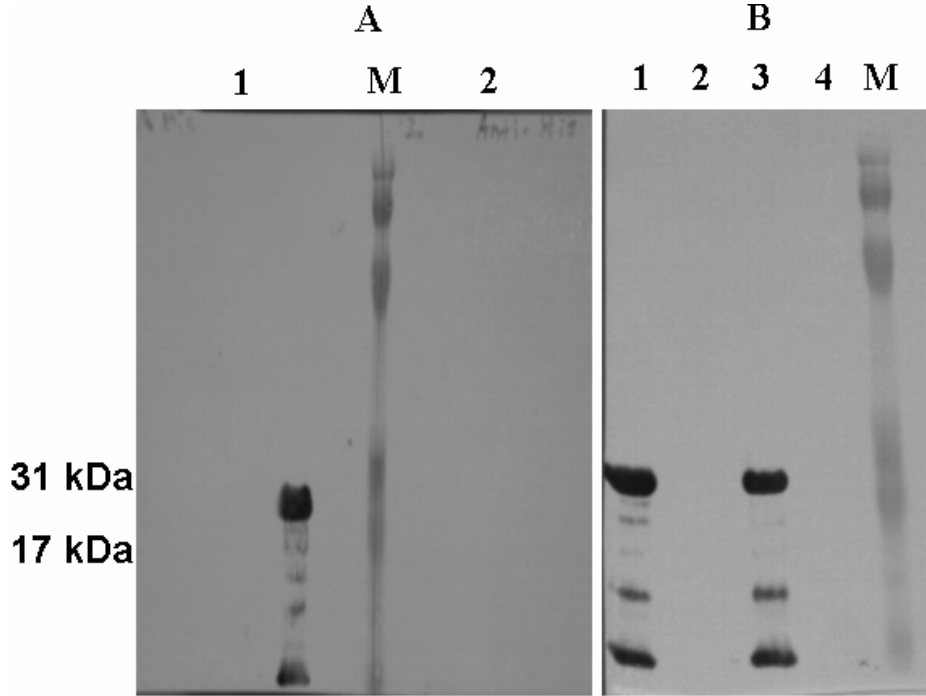
**Şekil.3.28.** Ni-NTA ile saflandırılmış proteinlerin SDS jel görüntüsü. **1.**marker (SDS-PAGE moleküler ağırlık standartları broad range (Bio-RAD, Kat.no:161-0317)) , **2.** kontrol GST, **3.** indüklenmemiş protein, **4.** 1 saat indüklenmiş, **5.** 2 saat indüklenmiş, **6.** 3 saat indüklenmiş örneklerin SDS görüntüleri.



**Şekil.3.29.** Glutasyon boncukları ile saflandırılmış proteinlerin SDS jel görüntüsü.**1.**marker (SDS-PAGE moleküler ağırlık standartları broad range (Bio-RAD, Kat.no:161-0317)), **2.** kontrol GST, **3.** indüklenmemiş protein, **4.** 1 saat indüklenmiş, **5.** 2 saat indüklenmiş, **6.** 3 saat indüklenmiş örneklerin SDS görüntüleri.

### SDS-Page sonucunun Western blot analizi ile doğrulanması

Anti-His antikor ile yapılan western analizi sonucunda saflaştırılan proteinin TtGSTz olduğu teyit edilmiştir. Böylece ekspresyonun başarılı olduğu görülmüştür. Anti-GST antikor ile yapılan analiz sonucunda da kontrol GST ve TtGSTz'nin görüntülenmesi ekspresyonun başarılı olduğunu birkez daha göstermiştir.



**Şekil 3.30.** TtGSTz rekombinant proteininin western blot analizi ile desteklenmesi. **A)** 1. Anti-histidin ve ikincil antikor kullanılarak yapılan analiz sonucu. 2. İkincil antikor kullanılarak yapılan analiz sonucunun görüntüsü. **B)** Anti-GST antikor kullanılarak yapılan analiz sonucunun görüntüsü (M: Kaleidoscope pretained Standards BİORAD)

### **3.5. *Tetrahymena thermophila* Glutasyon-s-Transferaz Zetamın farklı stresler altında mRNA seviyesinin belirlenmesi**

RT-PZR temelli stres çalışmalarında belirli kritik adımlar bulunmaktadır ( Marone ve ark. 2001; Meadus W.J., 2003) *T. thermophila*'ya uygulanacak streslerin kontrollü biçimde yapılabilmesi için de dikkat edilmesi gereken kritik adımlar vardır. Bu adımlardan birincisi; *T. thermophila* 'da değişik streslerin mRNA seviyesini etkilemediği bilinen yani mRNA'nın sürekli belirli bir seviyede üretildiği bir genin belirlenmesi gerekmektedir. İkincisi ise total RNA izolasyonlarının DNA kontaminasyonu içermediğini kontrol geni primerleri kullanılarak, DNA kontaminasyonun belirlenmesidir. Üçüncüsü; kontrol geninin, kontrol olarak kullanılabilmesi için yüksek döngülerde elde edilen sonuçları (27 döngü) ile düşük döngüden başlayarak artan döngülerde (sırasıyla 18, 21, 24) elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması gerekmektedir. Burada amaç kullanılacak döngü sayısının kontrol genine ait bant oluşumunu etkilemediğini ve mRNA seviyelerinin gerçekten değişmediğini göstermektir. Dördüncü ise; yüksek veya düşük MgCl<sub>2</sub> miktarının PZR şartlarını etkileyeceği düşünülerek farklı konsantrasyonlar denenerek PZR kurulması, böylece en uygun PZR şartlarının sağlanması gerekmektedir. Bu anlamda *Tetrahymena thermophila*'nın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve soğuk (4 °C) stresler altında mRNA seviyesindeki değişimler incelenmiştir.

#### **3.5.1. Soğuk Stres (4°C) Altında mRNA Seviyesinin Analizi**

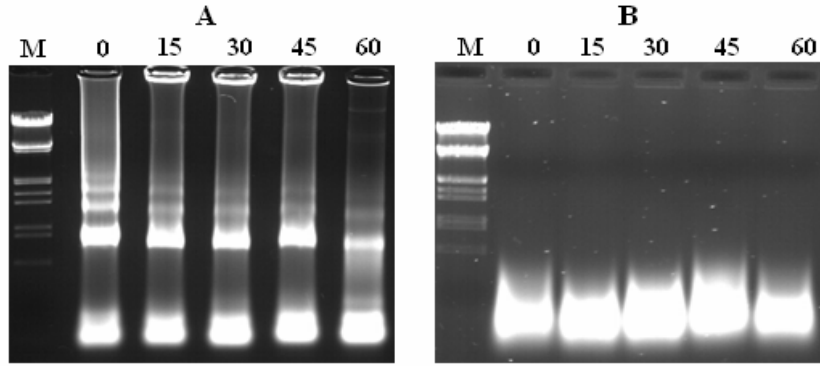
*T. thermophila*'ya buzda 4°C'lik stres uygulanmıştır. Bu uygulama yapılırken stres deneyleri için uygulanması gereken ve bölüm 3.5' te belirtilen önemli adımlar göz önüne alınmıştır. Bölüm 2.2.19'da belirtildiği gibi strese bırakılmış *T. thermophila*'dan ilk önce total RNA izole edilmiştir. Şekil 3.31-A'da görüldüğü gibi izole edilen RNA örneklerinin RNA bantlarını içerdiğini fakat DNA içermemektedir. Bu bilgi RNA izolatlarının Nanodrop ile spektrofotometik olarak ölçümleri sonucunda da desteklenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

0 zamanı RNA izolatu	2,5 µg/µl	A <sub>260/280</sub> : 2.2
15. dakika RNA izolatu	1.6 µg/µl	A <sub>260/280</sub> : 2.1
30. dakika RNA izolatu	1.2 µg/µl	A <sub>260/280</sub> : 2.1
45. dakika RNA izolatu	1.9. µg/µl	A <sub>260/280</sub> : 2.2
60. dakika RNA izolatu	1.0 µg/µl	A <sub>260/280</sub> : 2.2

Sonuçlardan görüldüğü gibi, RNA örneklerinin saflık değerinin ortalama olarak 2'ye yakın olması kontaminasyonsuz bir izolasyonun gerçekleştiğini göstermiştir. RNA izolatlarının Nanodrop ile spektrofotometrik olarak ölçümleri sonucunda beklenen saflıkta olmasına rağmen gözle görülemeyen saflıkta DNA kontaminasyonu olasılığından dolayı DNaz uygulaması yapılmıştır. Şekil 3.31-B'de görüldüğü üzere RNA'ların DNA kontaminasyonu içermediği bulunmuştur. Total RNA'ların yoğunlukları DNaz uygulanması sonucu tekrar Nanodrop ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

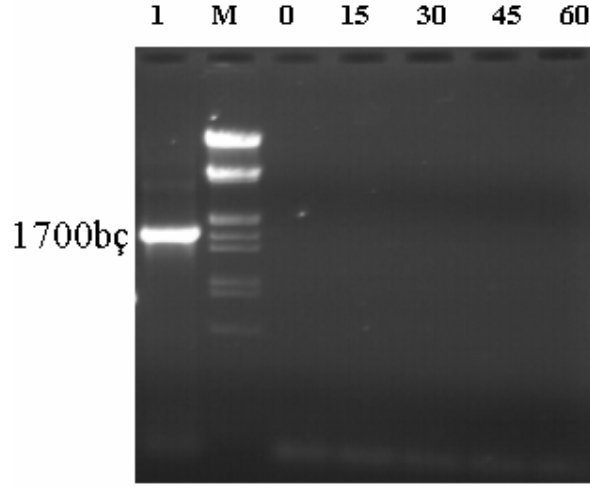
0 zamanı RNA izolatu	1.8 µg/µl	A <sub>260/280</sub> : 2.1
15. dakika RNA izolatu	1.3 µg/µl	A <sub>260/280</sub> : 2.1
30. dakika RNA izolatu	1.0 µg/µl	A <sub>260/280</sub> : 2.1
45. dakika RNA izolatu	1.6 µg/µl	A <sub>260/280</sub> : 2.2
60. dakika RNA izolatu	0.8 µg/µl	A <sub>260/280</sub> : 2.2

Bu sonuçlara göre RNA izolatlarının saflığının ve yoğunluğunun iyi olması RT reaksiyonlarında kullanılabileceğini göstermiştir.



**Şekil 3.31** Zamana bağlı soğuk strese maruz bırakılan *T. thermophila* hücrelerinden RNA izolasyonu ve RNA'lara DNaz uygulaması. **A)** 0, 15, 30 ,45 ve 60'ıncı dakikalarda izole edilmiş RNA agaroz jel görüntüsü **B)** 0, 15, 30 ,45 ve 60'ıncı dakikalarda DNaz uygulanmış RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü **M:** EcoRI HindIII Lambda Marker (%0.8'lik agaroz jel'e 2µl yüklenmiş ve 90 V'de 50dk. yürütülmüştür).

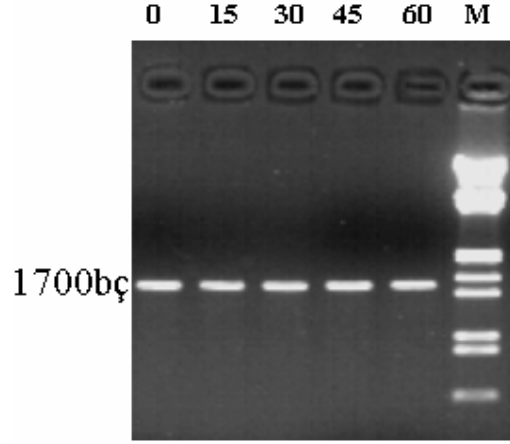
İzolasyonlar başarılı biçimde gerçekleştikten sonra, olası hata payları göz önüne alınarak kontrol olarak kullanılması düşünülen 17S genine ait primerler kullanılarak, DNaz uygulanmış total RNA'da DNA kontaminasyonunun olmadığı belirlenmesi için kontrol PZR'ı yapılmıştır (17S geni gDNA uzunluğu 1700 bç'dir). Şekil 3.32'ün 1.kuyusunda gDNA kalıbı ile kurulan PZR beklenen 1700 bç ürünü verirken; RNA'lar herhangi bir ürün vermemiştir. Bu da RNA'ların DNA kontaminasyonu içermediğini tamamen gösterilmiştir.



**Şekil 3.32.** Zamana bağlı soğuk strese maruz bırakılan *T. thermophila* hücrelerinin DNaz uygulanmış total RNA'da 17S genine ait primerler kullanılarak, DNA kontaminasyonunun olmadığı belirlenmesi için kurulan kontrol PZR sonuçları. **1:** Genomik DNA kalıbından 17S geni primerleri kullanılarak yapılan PZR sonucunun agaroz jel görüntüsü. **0, 15, 30, 45 ve 60'** ıncı dakikalarda DNaz uygulanmış RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü **M:** EcoRI HindIII Lambda Marker (%0.8'lik agaroz jel'e 2µl yüklenmiş ve 90 V'de 50dk. yürütülmüştür).

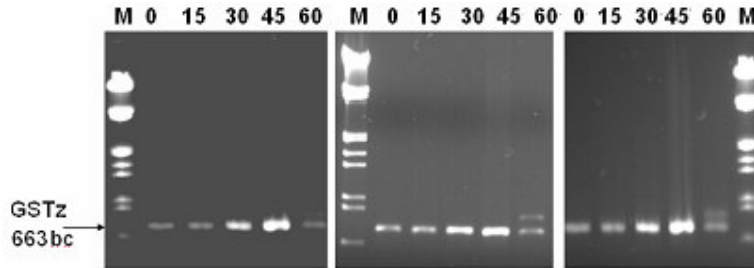
RNA'ların saflığı ve kalitesi RT reaksiyonlarında kullanılabileceğini göstermiştir. İki farklı primer seti, kullanılarak PZR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Bunlardan ilki Tt17S primerleri (FTt17S ve RTt17S) ile kurulan ve RT-PZR reaksiyonlarıdır. PZR reaksiyonu bölüm 2.2.19'da belirtildiği gibi kurulmuştur. Şekil 3.33'te görüldüğü üzere Tt17S geninin soğuk stres altında mRNA seviyesinin zamana bağlı bir değişiminin olmadığı görülmüştür.





**Şekil 3.33.** Tt17S kontrol geni PZR sonuçlarının jelden görüntüsü. Tt17S geninin soğuk stres altında 0, 15, 30 ,45 ve 60' ıncı dakikalarda mRNA seviyesinin değişmediğinin gösterilmesi. M: λDNA EcoRI/Hind III marker (%0.8'lik agaroz jel'e 2µl yüklenmiş ve 90 V'de 50dk. yürütülmüştür)

İkincisi ise TtGSTz primerleri (FTtGST ve RTtGST) ile üç farklı cDNA kalıbı kullanılarak kurulan PZR reaksiyonlarıdır. Şekil 3.34'de görüldüğü gibi TtGSTz'nın soğuk stresi altında mRNA seviyesi farklı zaman aralıklarda değişiklik göstermektedir. Burada 0- 45 dk. da TtGSTz mRNA miktarının arttığı görülmektedir fakat 60 dk. ise mRNA seviyesi, 45 dk.'ya göre düşüş göstermiştir.



**Şekil 3.34.** TtGSTz geninin üç bağımsız cDNA kalıbı kullanılarak yapılan PZR sonuçlarının agaroz jel analizi. GSTz'nın soğuk stresi altında 0, 15, 30 ,45 ve 60' ıncı dakikalarda mRNA seviyesinin değişiklikler gösterilmesi. M: λDNA EcoRI/Hind III Marker (%0.8'lik agaroz jel'e 2µl yüklenmiş ve 90 V'de 50dk. yürütülmüştür).

### 3.5.2. Hidrojen Peroksit Stresi Altında mRNA Seviyesinin Belirlenmesi

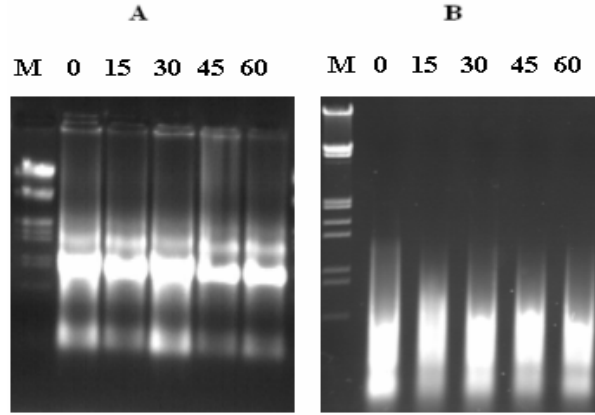
Bölüm 2.2.19’da belirtildiği üzere *T. thermophila*’nın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stresi indükleyici olduğu koşulda yani 1 ml hücre için %30’luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ‘ten 1,5 µl farklı zamanlarda stres (Kılıçkaya O. 2006, Yayınlanmamış sonuçlar) uygulanmış ve soğuk stres uygulamasında olduğu gibi kritik adımlar göz önüne alınmıştır. Strese bırakılmış *T. Thermophila*’dan öncelikli olarak total RNA izole edilmiştir. Şekil 3.35/A’da görüldüğü gibi izole edilen RNA örneklerinin beklenen büyüklükte RNA bantlarını içerdiğini ve olası DNA bantlarını içermediğini göstermiştir. Bu bilgi RNA izolatlarının Nanodrop ile spektrofotometrik olarak ölçümleri sonucunda da desteklenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

0 zamanı RNA izolatu	1,8 µg/µl	A <sub>260/280</sub> : 2.0
15. dakika RNA izolatu	1.1 µg/µl	A <sub>260/280</sub> : 2.2
30. dakika RNA izolatu	1.3 µg/µl	A <sub>260/280</sub> : 2.2
45. dakika RNA izolatu	0.9 µg/µl	A <sub>260/280</sub> : 2.1
60. dakika RNA izolatu	0.8 µg/µl	A <sub>260/280</sub> : 1.9

Sonuçlardan görüldüğü üzere, RNA öreneklerinin saflık değerinin ortalama olarak 2’ye yakın olması kontamnasyonsuz bir izolasyonun gerçekleştiğini ifade etmektedir.

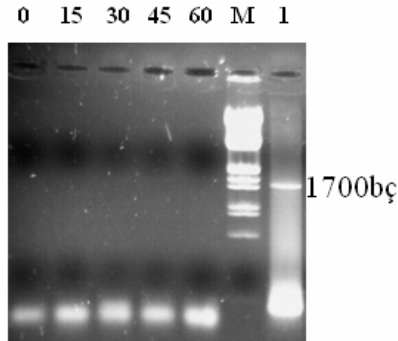
Bölüm 3.5.1’de belirtildiği gibi RNA’lara DNaz uygulanmış ve spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

0 zamanı RNA izolatu	1.8 µg/µl	A <sub>260/280</sub> : 2.1
15. dakika RNA izolatu	1.3 µg/µl	A <sub>260/280</sub> : 2.1
30. dakika RNA izolatu	1.0 µg/µl	A <sub>260/280</sub> : 2.1
45. dakika RNA izolatu	1.6 µg/µl	A <sub>260/280</sub> : 2.2
60. dakika RNA izolatu	0.8 µg/µl	A <sub>260/280</sub> : 2.2



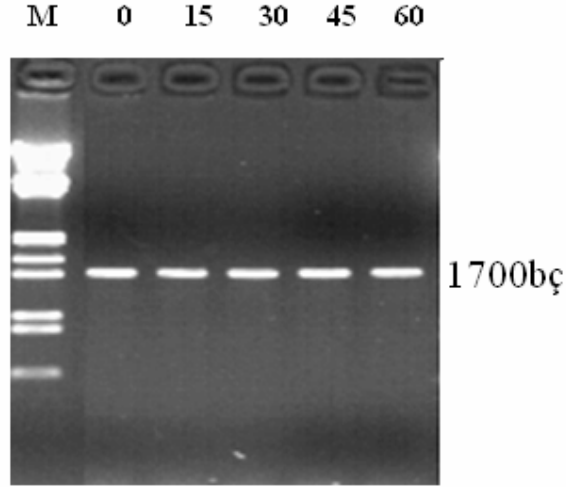
**Şekil 3.35.** Zamana bağlı  $H_2O_2$  stresine maruz bırakılan *T. thermophila* hücrelerinden RNA izolasyonu ve RNA'lara DNaz uygulaması. **A)** 0, 15, 30 ,45 ve 60'nci dakikalarda izole edilmiş RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü **B)** 0, 15, 30 ,45 ve 60'nci dakikalarda DNaz uygulanmış RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü **M:** EcoRI HindIII Lambda Marker (%0.8'lik agaroz jel'e 2 $\mu$ l yüklenmiş ve 90 V'de 50dk. yürütülmüştür).

Bölüm 3.5.1'de belirtildiği gibi DNaz uygulanmış total RNA'da DNA kontaminasyonunun olmadığı belirlenmesi için PZR kuruldu ve sonuçlar Şekil 3.36'da belirtildiği gibidir. Bu sonuçla RNA'ların DNA kontaminasyonu içermediğini tamamen gösterilmiştir.



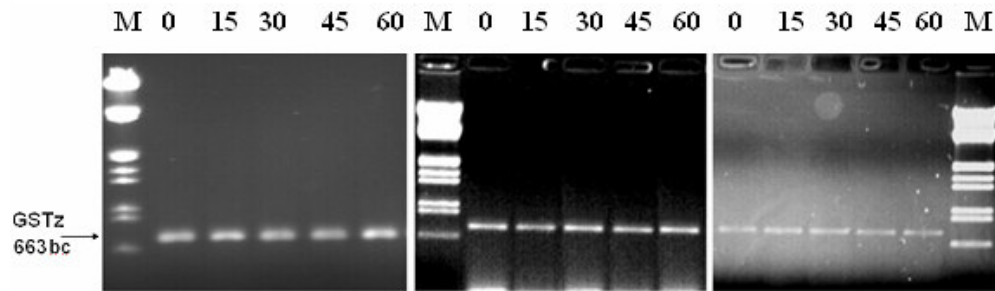
**Şekil 3.36.** Zamana bağlı  $H_2O_2$  stresine maruz bırakılan *T. thermophila* hücrelerinin DNaz uygulanmış total RNA'da 17S genine ait primerler kullanılarak, DNA kontaminasyonunun olmadığı belirlenmesi için kurulan kontrol PZR sonuçları. **1:** Genomik DNA kalıbından 17S geni primerleri kullanılarak yapılan PZR sonucunun agaroz jel görüntüsü. **0, 15, 30 ,45 ve 60'** inci dakikalarda DNaz uygulanmış RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü **M:** EcoRI HindIII Lambda Marker (%0.8'lik agaroz jel'e 2 $\mu$ l yüklenmiş ve 90 V'de 50dk. yürütülmüştür).

RNA'ların saflığı ve kalitesi RT reaksiyonlarında kullanılabileceğini göstermiştir. Bölüm 3.5.1'de kurulan PZR reaksiyonu aynı koşullarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stresi içinde kurulmuştur. Şekil 3.37'de görüldüğü gibi Tt17S geninin soğuk stres altında mRNA seviyesinin zamana bağlı bir değişiminin olmadığı görülmüştür.



**Şekil 3.37.** Tt17S Kontrol geni PZR sonuçlarının jelden görüntüsü. Tt17S geninin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stresi altında farklı zaman aralıklarında mRNA seviyesinin değişmediğinin gösterilmesi (%0.8'lik agaroz jel'e 2µl λDNA EcoRI/Hind III marker ile birlikte yüklenmiş ve 90 V'de 50dk. yürütülmüştür).

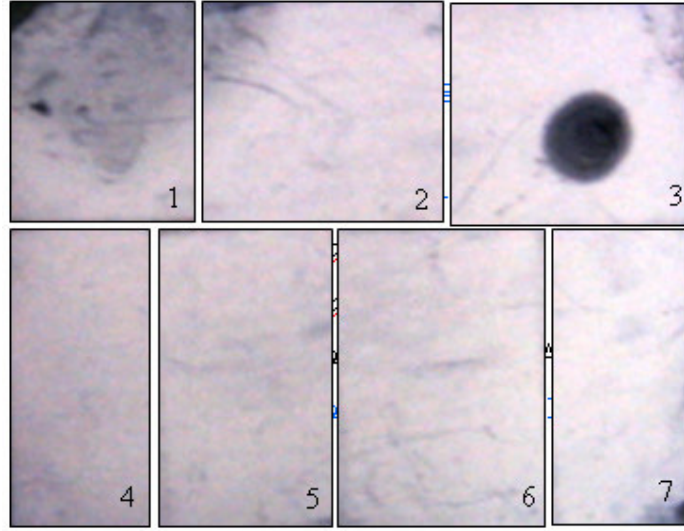
İkincisi ise TtGSTz primerleri ile üç farklı cDNA kalıbı kullanılarak kurulan PZR reaksiyonlarıdır. Şekil 3.38'de görüldüğü gibi TtGSTz'nın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stresi altında mRNA seviyesi farklı zaman aralıklarda değişiklik göstermemektedir.



**Şekil 3.38.** TtGSTz geninin üç bağımsız cDNA kalıbı kullanılarak yapılan PZR sonuçlarının agaroz jel analizi. GSTz'nın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stresi altında 0, 15, 30, 45 ve 60' ıncı dakikalarda mRNA seviyesinin değişiklikler gösterilmesi. M: λDNA EcoRI/Hind III Marker (%0.8'lik agaroz jel'e 2µl yüklenmiş ve 90 V'de 50dk. yürütülmüştür).

### 3.6. İşaretlenmiş bulucu DNA'nın Dotblot yöntemi ile özgünlüğünün analizi

Southern blotlamada kullanılmak üzere yaklaşık 670 bç'lik gen ürünü jelden saflaştırılarak DIG DNA labelling kiti ile işaretlenmiş ve bulucu DNA (prob) haline getirilmiştir. Probun çalışıp çalışmadığını test etmek amacıyla +yükü membran parçası üzerine DNA ile *T. thermophila* genomik DNA'sı kontroller emdirilerek tespit edilmiştir. Şekil 3.39'da görüldüğü üzere prob DNA'yı taşıyan pGEMT-Easy plazmitinin bulunduğu bölgede bantlaşma meydana gelmiştir (Şekil 3.39/3). Negatif kontrol olarak kullanılan boş klonlama plazmiti pGEMT-Easy'de herhangi bir bantlaşma görülmemiştir (Şekil 3.39/3). Ayrıca diğer negatif kontrollerde de herhangi bir bantlaşma görülmemiştir. Böylece probun başarılı biçimde işaretlendiği gösterilmesine karşılık *T.thermophila* gDNA'sını görmemiştir.



Şekil 3.39. Dot Blot analizi sonucu. 1. *Tetrahymena* genomik DNA, 2. pGEMT-Easy boş plazmiti, 3. pGEMT-Easy-GST zeta, 4. *Agrobacterium sp.* 5. *Origanium onites* gDNA, 6. *Tetrahymena* total RNA 7. *Tetrahymena* genomik DNA

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

*T. thermophila* serbest olarak doğada yaşamasından dolayı çevre ile tek bir hücre arasındaki etkileşimin nasıl olduğunu anlamaya yardımcı olabilecek biyolojiye sahip olmasıyla, temel ve tıbbi bilimler açısından oldukça önemlidir (Cech, T.R., 1990). Ayrıca tamamlanmış genom projesi *T. thermophila*'da yapılacak çalışmaların temel bilimlere ve özellikle gelişmekte olan biyoteknoloji, biyoinformatik ve genetik mühendisliği gibi bilim dallarına destek olabileceğini düşündürmektedir. GST enzim ailesi üyelerinden GST zeta geninin *T. thermophila*'dan elde edilmesi ve biyoteknolojide işaretçi olarak kullanılan GST'ler gibi takı olarak kullanılabilirliğinin araştırılması bu çalışmanın hedeflerini oluşturmaktadır.

Bu hedefler doğrultusunda öncelikli olarak *T. thermophila*'da GST varlığı araştırılmıştır. GST ailesine ait enzimler yaşayan tüm canlılarda bulunmaktadır (Board ve ark. 1997). Ama canlı grupları arasında farklı dağılım göstermektedir. Bu enzim ailesinin bu kadar geniş dağılım göstermesi *Tetrahymena*'da da bu enzimin bulunabileceğini düşündürmüştür. Nitekim yapılan literatür çalışmasında Overbaugh ve ark. 1988'de *T. thermophila*'da bu enzimin bulunduğunu belirtmişlerdir. Overbaugh ve ark. enzim ailesinin kullandığı genel ve spesifik substratlarını kullanarak *T. thermophila*'nın bu substratlara gösterdiği affiniteleri belirlenmiş ve *T. thermophila*'nın GST enzim ailesinin genel substratı olan 1-kloro-2,4 dinitrobenzene çok yüksek affinite gösterdiği belirtilmiştir. Fakat bu çalışmada hangi GST sınıfının *T. thermophila*'da bulunduğunu hakkında bir bilgi vermemiştir. Ayrıca çalışmada GSTz'nin kullandığı substratlardan kumene hidroperoksite (Board, P.G. et.al. 1997)'de *T. thermophila*'nın affinite göstermiş, ve bu sonuç GSTz'nin *T. thermophila*'da bulunabileceğini göstermiştir. 2006'da tamamlanan *Tetrahymena* makronükleer genom projesi ile de GST enzim ailesinin varlığı kesin olarak gösterilmiştir (Eisen ve ark. 2006). Bu anlamda *Tetrahymena* genomu içinde genom tabanlı yapılan analiz sonucunda GST ailesine ait enzimleri temsil eden 15 homolog grubun bulunduğu belirlenmiştir (bkz. Şekil 3.1 ). Bu homolog grupların GST ailesi üyelerinden **zeta**, **theta**, **mu** ve **omega**'yı temsil ettiği görülmüştür. *Tetrahymena* GST'leri (zeta, theta, mu ve

omega) aa dizilerinin analizi (peptol programı ile) yapılmış, bu sınıfların % 20 benzerlik gösterdiği bulunmuştur. . Alberti ve ark. 1996'da yaptıkları çalışmada da aynı sınıf GST üyelerinin %60–80 benzerlik gösterdiğini, farklı sınıf üyelerinin ise %20–30 benzerlik gösterdiklerini belirtmişlerdir *Tetrahymena* GST'leri arasındaki benzerlik bu veriyi desteklemiş ve sınıflar arasındaki benzerlik oranının literatür de belirtildiği gibi % 20 olduğu gösterilmiştir. Filogenetik analizlerde TtGST zeta'nın, TtGST omega'ya yakınlık gösterdiği bulunmuştur. Çeşitli çalışmalarda da (Board ve ark. 1997, David ve ark. 2001) yapılan filogenetik ağaçlarda bu veriyi desteklemiş ve zeta sınıfı GST'lerin omega sınıfı GST'lere yakınlık gösterdiği görülmüştür.

TtGSTzeta'nın klonlanma öncesi yapılan biyoinformatik analizleri sonucunda. TtGSTzeta'nın 3 ekzon ve 2 intron içerdiği bulunmuştur. Bu durum deneysel olarak da elde edilmiştir. Canlılar alemi incelendiğinde GSTz'nın ekzon ve intron sayısının türler arasında değişkenlik göstermektedir. Örneğin; İnsan GSTz'sı 8 ekzon, 7 intron, *A.thaliana* GSTz'sı 10 ekzon, 9 intron ve *C.elegans* GSTz'sı 6 ekzon, 5 introndan oluştuğu belirtilmiştir (www.expasy.org). GSTz sınıfının bütün türlerde intron içerdiği belirtilmiştir (Frova, C., 2006). TtGSTz'nın yapılan analizi sonucunda ise bu canlı gruplarına benzer şekilde intron içerdiği bulunmuş ve TtGSTz'nında diğer zetalara intron içermesi açısından benzediği görülmüştür.

Canlılar büyük bölümünde GSTz'ya ait **SSCX[WH]RVIAL** motifi karakteristik motifidir (Russell T. 2001). TtGSTzeta'nın bu motifi taşıyıp taşımadığını anlamak için amino asit dizisi, EBI veritabanındaki clustal programı kullanılarak, GSTz'ya ait karakteristik motifi taşıyan türlerin amino asit dizileriyle birlikte dikey hizalanmış (bkz. Şekil 3.5) ve TtGSTzeta'nın da **SSTSWVRIAL** motifini taşıdığı bulunmuştur. Ancak TtGSTz ait motif incelendiğinde 17. pozisyonda diğer türlerden farklı olarak sistein yerine treonin amino asiti bulunduğu görülmüştür. Oldukça korunmuş olan sistein aktif bölgeye doğru yönelmiştir ancak rolü tam olarak bilinmemektedir (Thom, R.et al. , 2001; Polekhina, G. et al., 2001). Bu yüzden TtGSTz'nın içerdiği treoninin biyolojik olarak ne anlama geldiği bilinmemektedir. Ama diğer zetalar gibi TtGSTz'nında 14. pozisyondaki amino asit serindir. Bu amino asit GST zeta enziminin anahtar

amino asitidir. Serinin görevi GSH'ın sülfidril grubunu kataliz için doğru pozisyona getirmektir. Ser 14 amino asidinin bölgeye özgü mutasyon çalışmaları ile enzimin katalitik fonksiyonunda anahtar özelliğe sahip olduğu görülmüştür (Polekhina, G. et al., 2001). TtGSTz'nında GSH'ın bağlanmasında etkin rol üstlenen serini içermesi diğer zetalarla olan benzerliğini göstermektedir. Hizalama sonucu elde edilen verinin filogenetik ağacı çizilmiştir (bkz. Şekil 3.6) ve filogenetik ağaçtan elde edilen veri sonucunda TtGSTzeta'nın bitki GSTz'larına yakınlık gösterdiği gözlenmiştir. Filogenetik ağacın *Tetrahymena* için yapılan genel filogenetik ağaçlarla da benzerlik gösterdiği bulunmuştur (Wainwright *et al.* 1993). Bu sonuçla birlikte TtGSTz'nın bitkisel GSTz'lara yakın olduğu düşüncesi ortaya çıkarılmıştır. Yapılan genom tabanlı tüm analizler ile, *T. thermophila*'da GSTz'nın bulunduğu ve ayrıca TtGSTz'nın diğer GST zetalara yapısal benzerlik gösterdiği bulunmuştur.

Genom tabanlı yapılan biyoinformatik analizler ile TtGSTz'nın varlığını belirlendikten sonra TtGSTz geni rekombinant olarak elde edilmiş ve mRNA'ya komplementer olan cDNA, RACE tekniği ve biyoinformatik analizlerle oluşturulmuştur (bkz. Şekil 3.13). Elde edilen bu veri yapılmış çalışmalarla karşılaştırılınca aynı yöntemler kullanılarak mRNA oluşturulduğu belirlenmiştir. Örneğin, Zhang ve ark. 2006'da bitkilerde RACE tekniğini kullanarak 3'UTR bölgesini elde etmişlerdir. Başka bir çalışmada, Subramaniam ve ark. 1999'da buğday zetasının 3' UTR bölgesini yine bu teknikle elde etmiş ve yaklaşık 87 bç olduğu belirtmişlerdir. Oluşturulan mRNA dizi bilgisinin, genom bankası içinde tek bir veriden oluşan mRNA dizisine destek olacağı düşünülmektedir.

Rekombinant olarak üretilen TtGSTz'nın ekspresyon seviyesini değiştirebilecek etkenler araştırılmıştır. Bu amaçla *T.thermophila*'da farklı stresler altında GSTz'nın mRNA seviyelerine PZR temelli metod ile bakılmıştır. Bu stresler belirlenmeden önce kullanılacak stresler araştırılmıştır. *T.thermophila* için yapılan incelemelerde bu konuyla ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ama canlılarda alemine bakıldığında Zhang ve ark. 2006'da bazı bitki türlerinde 4°C'in soğuk stres oluşturduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca *T.thermophila*'nın doğal yaşam ortamında yapılan populasyon analizinde (Doorder, F.P., et.al. 1995) 10-26°C örnekler alınmış ve *T.thermophila*'nın bu sıcaklık aralığının doğal yaşam ortamını



temsil ettiği belirlenmiştir. Başka bir analizde ise (Nanney, D.L., 1953) *T.thermophila*'nın uygun optimum sıcaklığının 12–41°C olduğunu belirlemiştir. Bir başka analizde ise soğuk stresinin biyolojik membranlarda serbest radikal üretimini artırdığını belirtilmiştir (Gülen, İ. et.al. 2003) Bu bilgilerden yola çıkılarak *T.thermophila*'nında 4°C'de strese girmiş olabileceği düşünülenerek, *T.thermophila*'ya buzda 4°C'lik stres uygulanmıştır. Bu kriterlerden dikkate alındığı elde edilen sonuçlara göre; TtGSTz'nın 0 zaman ile 45 zaman aralığında mRNA seviyesinin arttığı bulunmuştur. Bu TtGSTz'nın 4 °C'lik soğuk stresten etkilendiğini göstermiştir. Gülen ve ark. yaptığı çalışma bu sonucu desteklemektedir. Çünkü artan serbest radikal miktarına karşı TtGSTz'nın aktivite göstermiş olabileceği ve bu nedenle mRNA seviyesinin artmış olabileceği düşünülmektedir.

TtGSTz'ya ikinci bir stres olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanılmıştır. Bu stresin uygulanma nedeni ise GSTz enzim ailesi üyelerinden alpha, mu, phi, theta, sigma, tau, pi, kappa ve **zeta**'nin peroksidaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir (Frova, C., 2006). TtGSTz'ın diğer zetalardan gösterdiği gibi peroksidaz aktivitesi gösterip göstermediği anlaşılması için H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stresi uygulanmıştır. Bu durumda GSTz'nın *T.thermophila*'nın indükleyici olduğu koşulda (bkz. Çizelge 2.4) yani 1 ml hücre için %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ten 1,5µl farklı zamanlarda stres uygulanmış ve TtGSTz'nın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stresinden etkilenmediğinin görülmüştür. Bu sonucun biyolojik olarak ne anlama geldiği henüz bilinmemektedir. Ama TtGSTz'nın diğer GSTz'lar gibi peroksidaz aktivitesi göstermediğini düşündürmektedir.

TtGSTz'nın kopya sayısının belirlenmesinde kullanılacak Southern blotlamada ön veri oluşturmak için cDNA, DIG yöntemiyle işaretlenmiştir. Membrana emdirilerek bulucu DNA'nın etkinliğine bakılmıştır (Şekil 3.39). Elde edilen sonuca göre; bulucu DNA, TtGSTz'yi taşıyan ve pozitif kontrol olarak kullanılan plazmidi tanıyıp ve bu sayede o bölgede yoğun bir koyulaşma görülmüştür (Şekil 3.39/3). Negatif kontrol olarak kullanılan boş plazmidi görmemiş ve ayrıca diğer negatif kontroller olan *T.thermophila* RNA'sı (Şekil 3.39/4), *O.onites* (Şekil 3.39/5) ve *A.tumafasiens* (Şekil 3.39/6) genomik DNA'larını da görmemiş ve bu bölgelerde herhangi bir sonuç alınamamıştır. Bu sonuç bulucu DNA'nın TtGSTz için işaretlenmiş olduğunu göstermiştir. Fakat

pozitif kontrol olarak kullanılan *T.thermophila* genomik DNA (şekil 3.39/1 ve 7)'yi bulucu DNA'nın görmesi gerekirken o bölgede herhangi bir koyulaşma görülmemiştir. Bunun birbirinden bağımsız iki nedenden kaynaklandığı düşünülmektedir. Birincisi, genomik DNA izolasyonun iyi yapılmadığı ve kirlilik içermesidir. Doulis ve ark. 2000'de çeşitli kirleticilerin DNA'nın izole edilmesini, klonlanmasını ve restriksiyon enzimleriyle kesilmesini engellediğini belirtmişlerdir. İkincisi ise, DIG işaretleme kitinin tavsiye ettiği ticari hibridizasyon tamponu (DIG Easy Hyb) yerine laboratuvarımızda hazırlanan hibridizasyon tamponu kullanılmasından dolayı hibridizasyon için optimum şartların sağlamamış olabileceği düşünülmüştür.

Rekombinant olarak üretilen TtGSTz geninin *E.coli*'de protein ifadesinin yapılması için gerekli olan nokta mutasyonlar gerçekleştirilmiş ve protein ekspresyonu yapılarak TtGSTz'nın 24 kDa molekül ağırlığında olduğu SDS-Page ile gösterilmiş ve Western blot analizi ile doğrulanmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda da sitoplazmik GST enzimlerinin genelde 23-30 kDa molekül ağırlığında oldukları belirtilmiştir (Frova, C., 2006; Wilce, M.C.J. ve ark. 1994; Eklund, B.I. et al. 2002; Polekhina, G., 2001). GSTz ile ilgili yapılan ekspresyon çalışmalarında da insan zetasının 24 kDa (Board, P.G. et.al. 1997), buğday zetasının 23 kDa (Subramaniam, K. et.al. 1999), ve *Arabidopsis thaliana* zetasının 24kDa(Thom, R.et al. 2001) olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmalar ile TtGSTz'nın protein ifadesinin doğru biçimde gerçekleştirildiği desteklenmiştir. Şu ana kadar yapılan çalışmalar tamamen rekombinant DNA teknolojileri kullanılarak hazırlanmış ve literatüre destek olacağı düşünülmüştür.

Biyoteknolojinin önemli bir kolu olan rekombinant DNA teknoloji ile yapılan çalışmalar ürünlere dönüştürülerek ticari olarak kullanılabilir. GST'lerin ticari olarak protein saflaştırma işlemlerinde işaretçi olarak kullanılabilirdiği bilinmektedir. Birçok firma GST'leri işaretçi olarak kullanıp kendi vektörlerini üretmiş (pGEX, pQE) ve ticari bir kazanç elde etmişlerdir. Bu çalışma sonucunda üretilmiş olan TtGSTz'nın da bu şekilde ticari olarak kullanılabilirdiği araştırılmış ve ticari olarak kullanılan GST'ler (glutasyon sepharose 4B) ile saflaştırıldığı görülmüştür (bkz. Şekil 3.29). Bu sonuç ticari olarak kullanılan bir GST'nin, rekombinant olarak ürettiğimiz TtGSTz'yı tanıyıp

saflaştırmasının, TtGSTz'nin ticari olarak kullanılabilirliğini düşüncesini ortaya çıkarmıştır. Bu çalışma ile TtGSTz'nin, protein saflaştırma işlemlerinde işaretçi olarak kullanılabilirliği ortaya çıkarılmıştır.

#### 4.1. Sonuç

Bu çalışmada model organizma olan *Tetrahymena*'dan, GST enzim ailesi üyelerinden biri olan GSTz'nın, UTR bölgeleriyle birlikte 847 bç'lik tüm cDNA'sı klonlanmış ve biyoinformatik analizlerle GSTz'ya ait motifleri içerdiği gösterilmiştir. Diğer *Tetrahymena* GST'leri ile karşılaştırıldığında en yüksek benzerliği TtGSTomega ile gösterdiği saptanmıştır. TtGSTz'nın cDNA'sının protein ifadesinin yapılabilmesi için gerekli nokta mutasyonlar gerçekleştirilmiştir. Nokta mutasyonu gerçekleştirilmiş TtGSTz'nın pET-16b'ye ekspresyonu sağlanmış ve SDS-Page ile ekspresyonu gerçekleştirilmiş protein görüntülenmiştir. Üretilen proteinin TtGSTz olduğu Western blot analizi ile teyit edilmiştir. Ticari olarak kullanılan GST boncukları ile de saflaştırılma yapılmış ve TtGSTz'nın ticari olarak kullanılabilceği bulunmuştur. TtGSTz'nın kopya sayısını belirlemede yapılacak olan Southern blotlama için gerekli bulucu DNA (prob) hazırlanmıştır. TtGSTz'nın farklı soğuk stres altında mRNA seviyesinde zamana bağlı bir artış olduğu belirlenmiş fakat %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stresi altında mRNA seviyesinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir.

Yapılan literatür taramasında tek hücrelilerde bu çalışma dışında GSTz ile ilgili çok fazla moleküler biyolojik çalışmaya rastlanmamıştır.

#### 4.2. Öneriler

Çalışmamızda elde edilen verilerde, DIG ile işaretlenmiş TtGSTz cDNA'nın genom yapılaşmasının belirlenmesi ve rekombinant 6XHisTtGSTz'nın araştırılmasının çalışma açısından önemli olduğu düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Akkuş, İ. (1995), *Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri*, Mimoza yayınları, Konya.
- Alberti, G., Oguni, M., Podgor, M., Sperduto, R.D., Tomarev, S., Grassi, C., Williams, S., Kaiser-Kupfer, M., Maraini, G. ve Hejtmancik, F. (1996), "Glutathione S-transferase M1 genotype and age-related cataracts lack of association in an Italian population," *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, **37**(6), 1167-1173.
- Allocati, N., Casalone, E., Masulli, M., Ceccarelli, I., Carletti, E., Parker, M.W. ve Ilio, C.D. (1999), "Functional analysis of the evolutionarily conserved proline 53 residue in *Proteus mirabilis* glutathione transferase B1-1," *FEBS Lett.*, **445**(2-3), 347-350.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. ve Lipman, D. J. (1990), "Basic Local Alignment Search Tool," *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. (1993), "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging," *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **90**(17), 7915-7922.
- Armstrong, R.N. (1997), "Structure, catalytic mechanism and evolution of glutathione transferases," *Chem Res Toxicol.*, **10**, 2-18.
- Basaga, H.S. (1990), "Biochemical aspects of free radicals," *Biochem. Cell Biol.*, **68**, 989-998.
- Bast, A., Haenen, G. ve Cees, J. (1997), "Oxidants and antioxidants: State of the art," *The American Journal of Medicine.*, **91**(Suppl 3C), 30,3C-2S\_3C-13S.
- Blackburn, A.C., Woollatt, E., Sutherland, G.R. ve Board, P.G. (1998), "Characterization and chromosome location of gene GSTZ1 encoding the human Zeta class glutathione transferase and maleylacetoacetate isomerase," *Cytogenet Cell Genet.*, **83**, 109-114.
- Blackburn, A.C., Coggan, M., Tzeng, H.F., Lantum, H., Polekhina, G., Parker, M.W., Anders, M.W. ve Board, P.G. (2001), "GSTZ1d: a new allele of glutathione transferase zeta and maleylacetoacetate isomerase," *Pharmacogenetics.*, **11**, 671-678.

- Board, P.G., Baker, R.T., Chelvanayagam G., ve Jermun L.S., (1997), "Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans," *Biochem. J.*, **328**, 929-935.
- Board, P.G., Chelvanayagam, G., Jermun, L.S., Tetlow, N., Tzeng, H.F., Anders, M.W. ve Blackburn, A.C. (2001), "Identification of novel glutathione transferases and polymorphic variants by expressed sequence tag database analysis," *Drug Metab Dispos.*, **29**(4), 544-547.
- Booth, J., Boyland, E. ve Sims P.(1961), " An Enzyme from Rat Liver Catalysing Conjugations with Glutathione " *Biochem. J.* **79**, 516
- Cech, T.R. (1990), "Nobel lecture. Self-splicing and enzymatic activity of an intervening sequence RNA from Tetrahymena," *Biosci Rep.*, **10**(3), 239-261.
- Cheeseman, K.H. ve Slater, TF. (1993), "An introduction to free radical biochemistry," *Br Med Bull.*, **49**(3), 481-493.
- Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L., Mccord ve J.M., Harman, D. (1987), "Oxygen radicals and human disease," *Ann Intern Med.*, **107**(4), 526-545.
- Cummins I., Cole D.J. ve Edwards R.(1999), "A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass," *The Plant Journal.*, **18**(3), 285–292.
- Dı Mascio, P., Murphy, M.E. ve Sies, H. (1991), "Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols," *Am J Clin Nutr.*, **53**(1), 194-200.
- Dikici, İ. (1999), *Akut viral hepatitlerle interferon tedavisi görmüş kronik viral hepatitlerde oksidatif stresin araştırılması*, Uzmanlık Tezi, Selçuk Üniversitesi Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, Konya.
- Dixon, D.P., Laphorn, A. ve Edwards R. (2002a ), "Protein family review: Plant glutathione transferases," *Genome Biology*, **3**(3), 3004.1–3004.10
- Dixon, D. P., Davis, B. G., ve Edwards, E. (2002b), "Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants," *J. Biol. Chem.*, **277**, 30859–30869

- Doerder, F.P., Gates, M.A., Eberhardt, F.P. ve Arslanyolu, M. (1995), "High frequency of sex and equal frequencies of mating types in natural populations of the ciliate *Tetrahymena thermophila*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **92**(19), 8715-8718.
- Doulis, A.G., Harfouche, A.L. ve Aravanopoulos, F.A. (2000), "Rapid, High Quality DNA Isolation from Cypress (*Cupressus sempervirens* L.) Needles and Optimization of the RAPD Marker Technique," *Plant Molecular Biology Reporter.*,**17**, 1-14.
- Eaton, D.L. ve Bammler, T.K. (1999), "Concise review of glutathione s-transferase and their significance to toxicology," *Toxicol Sci.*, **49**, 156-164.
- Eisen, J.A., Coyne, R.S., Wu, M., Wu, D., Thiagarajan, M., Wortman, J.R., Badger, J.H., Ren, Q., Amedeo, P. ve Jones, K.M. *et al.* (2006), "Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote," *PLoS biology.*, **4**(9):e286.
- Eklund, B.I., Edalat, M., Stenberg, G. ve Mannervik, B. (2002), "Screening for recombinant glutathione transferases active with monochlorobimane," *AnalBiochem.*, **309**, 102-108
- Firat, S. (1997), *Kobaylarda radyasyonla oluşan akciğer hasarında doku glutatyon , glutatyon peroksidaz, glutatyon- S-transferaz düzeyleri ve N-asetil sistein'in bu sistem üzerindeki etkisi*, Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara.
- Frohman, M. A., Dush, M. K. ve Martin, G. R. (1988), "Rapid production of full-length *cDNAs* from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer," *G. R. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 8998-9002.
- Frova, C. (2006), "Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives," *Biomolecular Engineering.*, **23**, 149–169.
- Frei, B. (1994), "Reactive oxgen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of Action," *The American Journal of Medicine.*, **97**(3A), 26,3A-5S-3A-12S.

- Gaertig, J., Gu, L., Hal, B. ve Gorovsky, M. A. (1994), "High frequency vector-mediated transformation and gene replacement in Tetrahymena," *Nucl Acid Res*, **22**, 5391-5398.
- Gutteridge, J. M. (1995), "Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage," *Clin Chem.*, **41**(12), 1819-1828.
- Güneli, E., Çiçek, R., Canoruç, N., Kelle, İ., Akkoç, H., ve Dursun, M.(2003), "İmmobilizasyon+soğuk Stresine Maruz Kalan sıçanlarda Karaciğer Lipit Peroksidasyonu Düzeyine Vitamin E, Selenyum Ve Allopurinolün Etkileri," *Gastroenterohepatoloji der.*, **14**, 3
- Hallwell, B. (1987), "Free radicals and metal ions in health and disease," *Proc Nutr Soc.*, **46**(1), 13-26.
- Hallwell, B., ve Gutteridge, J. M. (1990), "The antioxidants of human extracellular fluids," *Arch Biochem Biophys.*, **280**(1), 1-8.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M, Pullen, J. K. ve Pease, L.R (1989), "Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction," *Gene.*, **77**, 51-59
- Holley, A. E. ve Cheeseman, KH. (1993), "Measuring free radical reactions in vivo," *Br Med Bull.*, **49**(3), 494-505.
- Kampranis, S.C., Damianova, R., Atallah, M., Toby, G., Kondi, G., Tsihli, P.N., ve Makris, A.M. (2000), "A novel plant glutathione S-transferase/peroxidase suppresses Bax lethality in yeast," *J. Biol. Chem.*, **275**, 29207-29216.
- Ko, Y. P. (2005), *Analysis of matrilin function in knockout mice and knockdown zebrafish*, Doktorgrades, der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln, Deutschland.
- Lantum, H. B., Cornejo, J., Pierce, R. H. ve Anders, M. W. (2003) "Perturbation of maleylacetoacetic acid metabolism in rats with dichloroacetic acid-induced glutathione transferase zeta deficiency," *Toxicol Sci.*, 1-44.
- Marone, M., Mozzetti, S., Ritis, D., Pierelli, L., Scambia, G. (2001), "Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample," *Biol. Proced. Online.*, **3**(1), 19-25



- Matz, M., Shagin, D., Bogdanava, E., Britanova, O., Lukyanov, S., Diatchenko, L. ve Chenchik, A. (1999), “ Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR,” *Nucleic Acids Research.*, **27**, 1558-1560
- Meadus1, W.J. (2003) “A semi-quantitative RT-PCR method to measure the *in vivo* effect of dietary conjugated linoleic acid on porcine muscle PPAR gene expression,” *Biol. Proced. Online* **5**(1), 20-28.
- Mueller L., Goodman, C.D., Silady, R.A. ve Walbot, V. (2000), “AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration is a flavonoid-binding protein,” *Plant Physiol.*, **123**, 1561–1570.
- Nanney, D.L. ve Caughey, P.A. (1953), “Mating type determination in *Tetrahymena Pyriformis*,” *Proc Natl Acad Sci USA.*, **39**, 1057-1063.
- Oyanagu, Y. (1991), “Active oxygen research of today future,” *The journal of toxicological Sciences.*, **16**, 65-69.
- Polekhina, G., Board, P.G., Blackburn, A.C. ve Parker, M.W. (2001), “Crystal structure of malayleacetoacetate isomerase/glutathione transferase zeta reveals the molecular basisi for its remarkable catalytic promiscuity,” *Biochemistry.*, **40**, 1567-1576.
- Roth, J. R., ve Hughes, K.T. (1985), “Directed formation of deletions and duplications using *Mud(Ap, lac)* ,” *Genetics.*, **109**, 263-282
- Roxas, V.P., Smith, R.K., Allen, E.R. ve Allen, R.D. (1997), “Overexpression of glutathione S-transferase/glutathioneperoxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress,” *Nature Biotechnology.*, **15**, 988 – 991.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F.ve Maniatis, T. (1989), *Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Edition*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sheean, D., Meade, G., Foley, V.M. ve Dowd, C.A. (2001), “Structure, function and *evolution* of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily,” *Biochem J.*, **360**, 1-16

- Slater, T.F. (1984), "Free-radical mechanisms in tissue injury," *Biochem J.*, **222**, 1-15.
- Soimato, A. J., Raberg, C. M. I., Gassmann, M., Sistonen, L. ve Nikinmaa, M. (2001), "Characterization of a Hypoxia-inducible Factor (HIF-1a) from Rainbow Trout," *The Journal of Biochemical Chemistry.*, 276, 19699-19705.
- Strange, R.C., Jones, P.W. ve Fryer, A.A. (2000), "Glutathione S-transferase: genetics role in toxicology," *Toxicol Lett.*, **112**(113), 357-363.
- Stroombergen, M.C. ve Waring, R.H. (1999), "Determination of glutathione S-transferase  $\mu$  and  $\theta$  polymorphism in neurological disease," *Hum Exp Toxicol.*, **18**, 141-145.
- Subramaniam, K., Ye, Z., Buechley, G., Shaner, G., Solomos, T. ve Ueng, P. (1999), "Isolation of a Zeta class wheat glutathione S-transferase gene," *Biochimica et Biophysica Acta.*, **1447**, 348-356
- Thom, R., Dixon, D.P., Edwards, R., Cole, D.J. ve Laphorn, A.J. (2001), "The Structure of a Zeta Class Glutathione S-transferase from Arabidopsis thaliana: Characterisation of a GST with novel active-site architecture and a putative role in tyrosine catabolism," *J.Mol Biol.*, **308**, 949-962.
- Wang, W. ve Ballatorini, N. (1998), "Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological function," *Pharmacol Rev.*, **50**(10), 335-355.
- Wainwright, P.O., Hinkle, G., Sogin, M.L. ve Stickel, S.K. (1993), "Monophyletic origins of the metazoa: An evolutionary link with the fungi," *Science.*, **260**, 340-343.
- Wilce, M.C.J. ve Parker, M.W. (1994), "Structure and function of glutathione S-transferases," *Biochem Biophys Acta.*, **1205**, 1-8.
- Yanbeyi, S. (1999), *Aspirin ve antioksidant butylated hydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri*, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.

## Ek-1 TGD içinde bulunan GST ailesini temsil eden homolog gruplar

### TtGSTz genomik DNA, açık okuma çerçevesi ve protein dizi bilgileri

#### Genomik dizi uzunluğu: 785 nükleotid

>77.t00018

```
ATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAATTACTCTTTACAGTTATTTCCGCTCCTCAACTTCATGG
AGAGTAAGAATAGCTCTTAATCTTAAGAAAATAGACTACAACATCATTCTATTAACCTT
TTGAAGAGTGAATAAACTTCTGAAGAATATACTAAAATCAATCCTAACTAGGTAATTAAT
TTAATTTTTTATGAGAGTAATTATAATTCTAAGAAATATAAAACACTATTAGGGAGTCCC
TGCTTTAAAGTATGGAGACGAGGTTATTATTGAAAGCTCTGCTATCTTAGAGTTTTGGGA
AGAAGTATTTCCCTGAGCACCCTTCTTCCCTAAGATGCAGTTAAAAGAGCTTAAATTAG
AGGCTTTTGCCAAGTAATTAACACTGCCATCCACCCTCTCTAAAATTTGAGGGTGCTTAA
TAAGATTGAAAAGGAATATAGCTAAGACAAGATTCAATGGCTCAAATTCGCGTTACTAA
GGGTTTGACAGTAATTAATTTAATCTATTATAATGAATGAGCGTTCAATAATTTAAA
AAATATATAAGCAATTGAAGAATTATTAAGAATTCTCATGGAAAATATTGCTTTGGTG
ATGAAATAACACTTGCTGACTTATTCTTGGTACCTCAAGTTCAAGGAGTTGTAGATAGAT
TCCAATTTGATTTAACCCCTTTCCCAATATTGCAGAAGTTTTAAAAAATTTAAAGGAAA
TTCCTGAGTTCGTTGCTGCCTCACCAGCAAGTAAGCTGACAATCCTGATAATCAAAGA
TCTGA
```

#### CDS uzunluğu: 663 nükleotid

>77.m00138

```
ATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAATTACTCTTTACAGTTATTTCCGCTCCTCAACTTCATGG
AGAGTAAGAATAGCTCTTAATCTTAAGAAAATAGACTACAACATCATTCTATTAACCTT
TTGAAGAGTGAATAAACTTCTGAAGAATATACTAAAATCAATCCTAACTAGGGAGTCCCT
GCTTTAAAGTATGGAGACGAGGTTATTATTGAAAGCTCTGCTATCTTAGAGTTTTGGAA
GAAGTATTTCCCTGAGCACCCTTCTTCCCTAAGATGCAGTTAAAAGAGCTTAAATTAGA
GGCTTTTGCCAAGTAATTAACACTGCCATCCACCCTCTCTAAAATTTGAGGGTGCTTAA
AAGATTGAAAAGGAATATAGCTAAGACAAGATTCAATGGCTCAAATTCGCGTTACTAAG
GGTTTGACAGCAATTGAAGAATTATTAAGAATTCTCATGGAAAATATTGCTTTGGTGAT
GAAATAACACTTGCTGACTTATTCTTGGTACCTCAAGTTCAAGGAGTTGTAGATAGATTC
CAATTTGATTTAACCCCTTTCCCAATATTGCAGAAGTTTTAAAAAATTTAAAGGAAATT
CCTGAGTTCGTTGCTGCCTCACCAGCAAGTAAGCTGACAATCCTGATAATCAAAGATC
TGA
```

#### Protein uzunluğu: 220 amino asit

>77.m00138

```
MAESSKKITLYSYFRSSTSWRVRIALNLKIDYNIIPINLLKSEQTSEEYTKINPNQGV
ALKYGVDEVIIESSAILEFLEEVFPEHPLLPQDAVKRAQIRGFCQVINTAIHPLQNLRLVN
KIEKEYSQDKIQWLKFWVTKGLTAIEELLKNSHGKYCFGDEITLADLFLVPVQGVVDRF
QFDLTPFPNIAEVLKLNKEIPEFVAASPSKQADNPDNQKI*
```

**TTHERM\_00499540**

**Genomik dizi uzunluğu:** 711

**Açık okuma çerçevesi:** 711

**Protein uzunluğu:** 236

---

**Genomik dizi uzunluğu:**

>63.t00029

```
ATGACAACAAAACCAAGCACTAAACTTTATATTGAATGGCTTAGTTAGCCATCTAGAGCT
ATTGTAACTTTTGCTTAATTGAAAATATTCCTCATGAGTTGGTAGAAGTTAGAATTAAA
AAGTTAGAAAACAGAACTCCAGAATATAAAAAAATGTTCCCCACTGCTAAGTTGCCTGGA
ATGCTGAAAACCTTGAAAACGGCGAATAATTTAATTTATTGAAAGCCATGCAATCATG
AGATACTTAGCAGACAGATATAACAAATCTAATCTTTATCCAAGAGGAAATATTTAGCTA
AAGGCTAAAGTTGATTCTTACTTAGATTGGCATCATACAAATACAAGAAAATGCGCTCCT
TATCTTTTTGATCAATACTTCGCTCCTGTTTTAGGTATTAAGCCTTAATTTGATGTGAAC
ACATTATTTAAAGAAGTTGAAAGTGTTCAGGTTTATTGAGAGGGTTGGTTAGATCAA
GGAAAGAATAAATATATAGGTAATAACTAACAGTTAACAATAGCTGACTTATCATGCTAT
TCTGAGATTATTTAAATGAAATTTGATGATTATGATTTCAAAAACAAGACTCCTATTTTA
TATGAATGGATGTAGAGAATAGAAGCTCTCCAGAAATATAAAAAACTCATCAAGTTTAA
TTTAAGTTAGCTCCTTAAATTTCTAAGAACAAATAAAAAGCAAAATATGA
```

---

**Açık okuma çerçevesi:**

>63.m00175

```
ATGACAACAAAACCAAGCACTAAACTTTATATTGAATGGCTTAGTTAGCCATCTAGAGCT
ATTGTAACTTTTGCTTAATTGAAAATATTCCTCATGAGTTGGTAGAAGTTAGAATTAAA
AAGTTAGAAAACAGAACTCCAGAATATAAAAAAATGTTCCCCACTGCTAAGTTGCCTGGA
ATGCTGAAAACCTTGAAAACGGCGAATAATTTAATTTATTGAAAGCCATGCAATCATG
AGATACTTAGCAGACAGATATAACAAATCTAATCTTTATCCAAGAGGAAATATTTAGCTA
AAGGCTAAAGTTGATTCTTACTTAGATTGGCATCATACAAATACAAGAAAATGCGCTCCT
TATCTTTTTGATCAATACTTCGCTCCTGTTTTAGGTATTAAGCCTTAATTTGATGTGAAC
ACATTATTTAAAGAAGTTGAAAGTGTTCAGGTTTATTGAGAGGGTTGGTTAGATCAA
GGAAAGAATAAATATATAGGTAATAACTAACAGTTAACAATAGCTGACTTATCATGCTAT
TCTGAGATTATTTAAATGAAATTTGATGATTATGATTTCAAAAACAAGACTCCTATTTTA
TATGAATGGATGTAGAGAATAGAAGCTCTCCAGAAATATAAAAAACTCATCAAGTTTAA
TTTAAGTTAGCTCCTTAAATTTCTAAGAACAAATAAAAAGCAAAATATGA
```

---

**Protein uzunluğu:**

>63.m00175

```
MTTKPSTKLYIEWLSQPSRAIVTFCLIEIPHELVEVRIKKLENRTPEYKMFPTAKLPG
MSETLENGEQFNLFESHAIMRYLADRYNKSNLVPRGNIQLKAKVDSYLDWHHTNTRKCAP
YLFQYFAPVVLGKPKQFDVNTLFKEVESVFRFIERVWLDQGNKYIGNNQQLTIADLSCY
SEIIQMKFDDYDFKKNKTPILYEWMQRIEALPEIQKTHQVLFKLPQISKNKQKAKL*
```

**TTHERM\_00260690**

**Genomik dizi uzunluğu:** 669

**Açık okuma çerçevesi :** 669

**Protein uzunluğu :** 222

---

**Genomik dizi uzunluğu:**

>23.t00043

ATGAACAACTCAAATTATTTTACAACCTTTTTCTCAACCTTCTCGCGCTGTAAAATGT  
CTTTTAAAGATTGGCAAAGTTGACTATGAAGAGAAATTTGTAACTTGGCTAAAGGCGAC  
TAATTTAAACCTGAAGTAAAGAGCTTAAATGGAACTGTTAAGTACCTTTTATTGAGGAT  
AATGGATTCGTAGTTTTTGAATCCCATACAATAATGAGGTACATACATCAAAGATTTAAC  
CTAGACAATTCTTTATACCCTCAAAGCTAGAAGATAAAACAAAAATTGATATGTACTTA  
GACTGGCATCACTCAAATACAAGAAGATCTGCAAATTATGTGACCGCAAGTCTTTTATCA  
AAAAGAACTGGTTAACCATCATTATATGTAGAAGATTAGTTCATAAAGAACCTCTAAAG  
GCAGTGCAAATTTAAATGATAATTTATTAATAATCCTTCACATTATATCTTTGGATTC  
TAAAAGCCAACTATCGCTGATATCAGCTGCTACTAAGAACTTACTGAACCTCAAATTGATA  
AATTTTGATTTCAAAAAATACCCTAATCTTGATGCTTTTATGAATCAGATGTCTAATATT  
CCTGAAATCAAAGAAGTTGATAAAGATTTTTCTGATATCGCTTTAAAGATATTCAAAGTA  
AATCTTTGA

---

**Açık okuma çerçevesi :**

>23.m00228

ATGAACAACTCAAATTATTTTACAACCTTTTTCTCAACCTTCTCGCGCTGTAAAATGT  
CTTTTAAAGATTGGCAAAGTTGACTATGAAGAGAAATTTGTAACTTGGCTAAAGGCGAC  
TAATTTAAACCTGAAGTAAAGAGCTTAAATGGAACTGTTAAGTACCTTTTATTGAGGAT  
AATGGATTCGTAGTTTTTGAATCCCATACAATAATGAGGTACATACATCAAAGATTTAAC  
CTAGACAATTCTTTATACCCTCAAAGCTAGAAGATAAAACAAAAATTGATATGTACTTA  
GACTGGCATCACTCAAATACAAGAAGATCTGCAAATTATGTGACCGCAAGTCTTTTATCA  
AAAAGAACTGGTTAACCATCATTATATGTAGAAGATTAGTTCATAAAGAACCTCTAAAG  
GCAGTGCAAATTTAAATGATAATTTATTAATAATCCTTCACATTATATCTTTGGATTC  
TAAAAGCCAACTATCGCTGATATCAGCTGCTACTAAGAACTTACTGAACCTCAAATTGATA  
AATTTTGATTTCAAAAAATACCCTAATCTTGATGCTTTTATGAATCAGATGTCTAATATT  
CCTGAAATCAAAGAAGTTGATAAAGATTTTTCTGATATCGCTTTAAAGATATTCAAAGTA  
AATCTTTGA

---

**Protein uzunluğu :**

>23.m00228

MNKLKLFYNSFSQPSRAVKCLLKIGKVDYEEKFVNLAKGDFKPEVKSLNWNQVVPFIED  
NGFVVFESHIMRYIHQRFNLDNSLYPQKLEDKTKIDMYLDWHHSNTRRSANYVTASLLS  
KRTGQPSLYVEDLVHKELLKAVQNLNDNLLNPNPUSHYIFGFQKPTIADISCYQELTELKLI  
NFDFFKYPNLDAFMNQMSNIPEIKEVDKDFSDIALKIFKVN\*

**TTHERM\_00499550**

**Genomik dizi uzunluğu:** 693

**Açık okuma çerçevesi:** 693

**Protein uzunluğu:** 230

---

**Genomik dizi uzunluğu:**

>63.t00030

ATGAAAATCTTTATTGATTGGATTAGCTAGCCATCTCGAGCAGTAGTTACTTACTGCTTA  
ATTGAAAATATACCACATGAGATTATACAAGTTAGAGTAAATGCTTTAGAGCATCGCAA  
CCAGAGTATATTTAAATAAATCCAAGCGCAAAGTTCAGCTATTTAGATAGATTAGAA  
AATGGAGAAAATATTTAACTTATTTGAAAGCCATGCTATCATGAGATATTTAGCAGATAGA  
TATAATAAGTTTAAAGCTTTATCCCAAAGATAATTTAGCTAAGAGCTCTAATAAATAGT  
TATTTAGACTGGCACCATAATAACACAAGAAAGTGTGGAGCTTATTTATTTGACTTATAT  
TCATCAGGTGTACTAGGAATAAAACCAAAGAATAACATTGAAACGCTATATAAAGAAATT  
GAAATTATTTTAAATTCATTGATTAAATTTGGCTTCAAGAAGGAAAAATAAGTTTATT  
GGAAATAATATTTAGCTTACAATAGCTGACATATCTTGCTATTGCGAAGTATCTCAAATG  
ATAATAGATTCTTATGATTTTAAAAATAAAACACCTAATTTATACAACCTGGATGAAAAGA  
ATTGAATAAATACCAGAAATTTAGTAAACCCATTAAATTTTATTCAAACCTAGCTCCAAA  
ATGTCATAAAACAAAATAAAACCTAATCTTTGA

---

**Açık okuma çerçevesi :**

>63.m00176

ATGAAAATCTTTATTGATTGGATTAGCTAGCCATCTCGAGCAGTAGTTACTTACTGCTTA  
ATTGAAAATATACCACATGAGATTATACAAGTTAGAGTAAATGCTTTAGAGCATCGCAA  
CCAGAGTATATTTAAATAAATCCAAGCGCAAAGTTCAGCTATTTAGATAGATTAGAA  
AATGGAGAAAATATTTAACTTATTTGAAAGCCATGCTATCATGAGATATTTAGCAGATAGA  
TATAATAAGTTTAAAGCTTTATCCCAAAGATAATTTAGCTAAGAGCTCTAATAAATAGT  
TATTTAGACTGGCACCATAATAACACAAGAAAGTGTGGAGCTTATTTATTTGACTTATAT  
TCATCAGGTGTACTAGGAATAAAACCAAAGAATAACATTGAAACGCTATATAAAGAAATT  
GAAATTATTTTAAATTCATTGATTAAATTTGGCTTCAAGAAGGAAAAATAAGTTTATT  
GGAAATAATATTTAGCTTACAATAGCTGACATATCTTGCTATTGCGAAGTATCTCAAATG  
ATAATAGATTCTTATGATTTTAAAAATAAAACACCTAATTTATACAACCTGGATGAAAAGA  
ATTGAATAAATACCAGAAATTTAGTAAACCCATTAAATTTTATTCAAACCTAGCTCCAAA  
ATGTCATAAAACAAAATAAAACCTAATCTTTGA

---

**Protein uzunluğu :**

>63.m00176

MKIFIDWISQPSRAVVITYCLIENIPHEIIQVRVNALEHRKPEYIQINPSAKVPAISDRLE  
NGEIFNLFESHAIMRYLADRYNKFPLYPKDNIQLRALINSYLDWHNNRKRKCGAYLFDLY  
SSGLVGIKPKNNIETLYKEIEIILKFIDQIWLQEGKNKFIGNNIQLTIADISCYEVSQM  
IIDSDFKNKTPNLYNWMKRIEQIPEIQQTHQILFKLAPKMSQNKIKPNL\*

**TTHERM\_00575390 sequence information**

**Genomik dizi uzunluğu:** 773

**Açık okuma çerçevesi:** 660

**Protein uzunluğu:** 219

---

**Genomik dizi uzunluğu:**

>77.t00021

```
ATGAGTGAAAATAATTTAAAATATTATCCTTTATGGCAATTACCGTTCTTCACCTTCTTGG
CGAGTAAGATTAGCACTTGGTTTAAAAAAGATAGAATACAAATTAGTTTCAATTGACCTT
TTTTAAAATGAGTAAAAATCTGAAGTATACTTCAAGGTTAATCCAAATTAAGTAAATTA
TTTTTCTCAAATATTATATTAATTTTGAAGTAATTTATCTATAAAGCGTATCCCTGCTCT
TATATATGGAGATCAAACATTGATAGAAAGCACTGCAATAATCGAGTTCTTAGAAGAAAA
TTTTCTTAGTATCCTTTACTTCCCAGGATAGAATTAAGAGAGCTTAGATTAGAGGCTT
TTGCTAAGTCATAAACAGTGTATTTCATCCCTATTAGAATTCAAATTTAATAGGAAAAAT
TGAAAAAGAAGGCAATATGAATAAGTTAGAATGGATTAAATCTGGGTGACTAAGGGGTT
GACAGGTAACAATAATCTTTTTCTATAATTTTTTAATAAATAATATTCTTATATTT
CAGCTATAGAAGAACTTTGAAGAAATATCATGGAAAAATTTGCTTTGGTGATGATATA
CGATGGCAGATATTTCTTAATCCCTTAAGTATCTGCAGTAGTAGAAAGATTTGGATTCCG
ATTTAACACCTTTTCTCTTATCTTAAGTGTGTAAATAACTTAAAGGATCTTCCAGAAAT
TTATTGCTGCTTCCCCTAGTAATTAACCAGATTATACTGAATAAAAAAATTGA
```

---

**Açık okuma çerçevesi:**

>77.m00141

```
ATGAGTGAAAATAATTTAAAATATTATCCTTTATGGCAATTACCGTTCTTCACCTTCTTGG
CGAGTAAGATTAGCACTTGGTTTAAAAAAGATAGAATACAAATTAGTTTCAATTGACCTT
TTTTAAAATGAGTAAAAATCTGAAGTATACTTCAAGGTTAATCCAAATTAACGTATCCCT
GCTCTTATATATGGAGATCAAACATTGATAGAAAGCACTGCAATAATCGAGTTCTTAGAA
GAAAAATTTCTTAGTATCCTTTACTTCCCAGGATAGAATTAAGAGAGCTTAGATTAGA
GGCTTTTGCTAAGTCATAAACAGTGTATTTCATCCCTATTAGAATTCAAATTTAATAGGA
AAAATTGAAAAAGAAGGCAATATGAATAAGTTAGAATGGATTAAATCTGGGTGACTAAG
GGGTTGACAGCTATAGAAGAACTTTGAAGAAATATCATGGAAAAATTTGCTTTGGTGAT
GATATAACGATGGCAGATATTTCTTAATCCCTTAAGTATCTGCAGTAGTAGAAAGATTT
GGATTGATTTAACACCTTTTCTCTTATCTTAAGTGTGTAAATAACTTAAAGGATCTT
CCAGAAATTTATTGCTGCTTCCCCTAGTAATTAACCAGATTATACTGAATAAAAAAATTGA
```

---

**Protein uzunluğu:**

>77.m00141

```
MSENNQNIILYGNYSRSPSWRVRLALGLKKIEYKLVSIDLFKNEQKSEVYFKVNPQRIP
ALIYGDQTLIESTAIIEFLEENFPQYPLLPEDRIKRAQIRGFCQVINSAIHPYQNSNLIG
KIEKEGNMKNLEWIKFVWTKGLTAIEELLKKYHGKFCFGDDITMADIFLIPQVSAVVERF
GFDLTPFPLILSVVNNLKDLPFIAASPSNQPDYTEQKN*
```

**TTHERM\_00572010**

**Genomik dizi uzunluğu:** 842

**Açık okuma çerçevesi:** 780

**Protein uzunluğu:** 259

---

**Genomik dizi uzunluğu:**

>76.t00107

ATGTCTTAATTAACATTATATGGCTTTCTCCTCTGCCCTTATGTATAAAGAGTGAGATTC  
GCTTTAGAAAAAATTGGAGTTAAGTATGACTACAAAGAAATGACCTCTCAAGCTTAAA  
TAGAAAGAATAGGCCTACTTAGATATTAACCCCTTTGGAAAGGTTCCCTACAATAGTTATT  
AATAACCAGGTATTTATTTATAAATTTACAGTCTTTAAATCTTCTAACTTAACATTTATT  
ATATTAATTAGATTGTATATGAAAGTCTTCCCTCTTCTGAATTCCTTGAAAAATGAATTTG  
GCAGCGTCTCCCTTAAGATAACATCAGAAAACTTAATAGAGAATTTGGACAACCTATT  
TTGATTAATAATTTTATTAGTAAATGTGGGAATCTTTAGTCTTATAAAAAACAAAGGATG  
TTGAAGGATCTAAAAAAGTCTAACGAAGTACTGAAATATTGAGATTCTTTACTTTAA  
ATTCAAAATATCTGAAAGAATTAATAGAATCCTAGCAGCTATTTGAAGGAGATACTT  
TAACCTATGCTGATTTTGTCTATTATCCCTCATGTTAAAGTACTAGAACTAACTATAAAA  
TATTCTTTAAAAGCAGTTTATTGAATAAATGAAAACTAGGATGAGTTAATCTAGAATT  
TCAAAACCTATTATTAATAATGTTGTTTCTTCTGATTCACTCAAAAGGGCTGTAACCTAATC  
CTGTACACTACCTCCATAAGGAGACAATTCGTTTTAGATGAGTTATAATACACAACCTG  
AAAACCTTAATTATGAAAACCTTTTCAGAAACTTACATGAATAAAAAAATTCGCATAAGCTT

---

**Açık okuma çerçevesi:**

>76.m00233

ATGTCTTAATTAACATTATATGGCTTTCTCCTCTGCCCTTATGTATAAAGAGTGAGATTC  
GCTTTAGAAAAAATTGGAGTTAAGTATGACTACAAAGAAATGACCTCTCAAGCTTAAA  
TAGAAAGAATAGGCCTACTTAGATATTAACCCCTTTGGAAAGGTTCCCTACAATAGTTATT  
AATAACCAGATTGTATATGAAAGTCTTCCCTCTTCTGAATTCCTTGAAAAATGAATTTGGC  
AGCGTCTTCCCTTAAGATAACATCAGAAAACTTAATAGAGAATTTGGACAACCTATTTT  
GATTAATAATTTTATTAGTAAATGTGGGAATCTTTAGTCTTATAAAAAACAAAGGATGTT  
GAAGGATCTAAAAAAGTCTAACGAAGTACTGAAATATTGAGATTCTTTACTTTAAAT  
TCAAAATATCTGAAAGAATTAATAGAATCCTAGCAGCTATTTGAAGGAGATACTTTA  
ACTTATGCTGATTTTGTCTATTATCCCTCATGTTAAAGTACTAGAACTAACTATAAAATA  
TTCTTTAAAAGCAGTTTATTGAATAAATGAAAACTAGGATGAGTTAATCTAGAATTTT  
AAAACCTATTATTAATAATGTTGTTTCTTCTGATTCACTCAAAAGGGCTGTAACCTAATCCT  
GTTACACTACCTCCATAAGGAGACAATTCGTTTTAGATGAGTTATAATACACAACCTGAA  
AACTTTAATTATGAAAACCTTTTCAGAAACTTACATGAATAAAAAAATTCGCATAAGCTTGA

---

**Protein uzunluğu:**

>76.m00233

MSQLTLYGFLLCYPVQRVRFALFKIGVKYDYKEIDFLKQKEQAYLDINPFGKVPITVI  
NNQIVYESLPLLEFLNEFSGVFPQDNIRKQQRIWTTYFDQNFISKMWGIFSLIKTKDV  
EGSKKLANELAEILRFFTLNSKLSERIKQNPSSYFEGDTLTYADFAIIPHVKVLETNYKI  
FFKSSLFEQIENQDELIQNFKTYQNVVSDSFKRAVTPVTLPPQGDNFVLDLQYTTTE  
NFNYENLSETYMKNKFAQA\*



**TTHERM\_00924320**

**Genomik dizi uzunluğu:** 928

**Açık okuma çerçevesi:** 813

**Protein uzunluğu:** 270

---

**Genomik dizi uzunluğu:**

>164.t00052

ATGGATATTACTGCTACTAACGAACCTGTAAGATTCTACTGCTTTGTTACTTGTCCCTTAC  
GCCATCAGGGTAAGAACCGCTTTAGAACCCTCTAAGTACCATATGAATATAATGAAATT  
GATCTATTGGTAAATTAATAACTTACTCCTGAGTTCCTAAAAATAAATCCCCTCCATTAA  
GTACCAGTGATTATTAACAAGCAAGGATAGGTAGATTATAAATATTCTTATAATTAATG  
TAATTTATTATTTTATTAGACTATATCAGAAAGCTTGGTCTGCTTAGAGTATCTCAATGA  
TAAATACTAACCTGGCTTGCTTCTTAAGACAGTTTCTAAAGAGCCCAATCAGAAAATG  
GATCACATATTATAGTTCTATTGACGCAAGAAATGGAGAATTTTAGGTGCTATTAGAAA  
CAAAAATAAGAAGAAGCTTATCGTATTCTAAATGAAATTTAATAAAATTTAAAATCTT  
GTCATCTTAAATGATTGCCAATTAGAGTTGAATAAAATTCAAAAACCTTCTGTGTTGG  
TTCTACTTTTGGGATGGGTGATATTGCTATTCTACCAGTTTATAGATTAATGATTATATT  
ATTTGAACTGCATTTGAAAAGTAATTTATTTTAAAAATGTTAATTTTGTAAAAAT  
AAATATCTAACTTTTTATTTTAAAGCATATTTAAAAAGATAATTGAAATGGAAAAGA  
TGTTGATGCACTAAAAGCACTTTATATTGGTTGAAAATACCAAATAGTAACCTGCATA  
CTAAAAGTCAACATACAAGCTTTAGAGTCTACCATAAAATCCTCTAATTGATGAACTTAA  
CTTAAGAAATAACTGGCAATTCGATAAATATTACATAAACTTTGCATAAAGAAAGTTCTT  
CCCTAGTGGTTAAATCCCAAATTATGA

---

**Açık okuma çerçevesi:**

>164.m00105

ATGGATATTACTGCTACTAACGAACCTGTAAGATTCTACTGCTTTGTTACTTGTCCCTTAC  
GCCATCAGGGTAAGAACCGCTTTAGAACCCTCTAAGTACCATATGAATATAATGAAATT  
GATCTATTGGTAAATTAATAACTTACTCCTGAGTTCCTAAAAATAAATCCCCTCCATTAA  
GTACCAGTGATTATTAACAAGCAAGGATAGACTATATCAGAAAGCTTGGTCTGCTTAGAG  
TATCTCAATGATAAATACTAACCTGGCTTCTCCTAAGACAGTTTCTAAAGAGCCCAA  
ATCAGAAAATGGATCACATATTATAGTTCTATTGACGCAAGAAATGGAGAATTTTAGGT  
GCTATTAGAAAACAAAATAAGAAGAAGCTTATCGTATTCTAAATGAAATTTAATAAAAT  
TTAAAATCTTGTCACTTAAATGATTGCCAATTAGAGTTGAATAAAATTCAAAAACC  
TTCTGTGTTGTTCTACTTTTGGGATGGGTGATATTGCTATTCTACCAGTTTATAGATTAA  
ATGATTATATTATTGAACTGCATTTGAAAAGCATATTTAAAAAGATAATTGAAATGGA  
AAAGATGTTGATGCACTAAAAGCACTTTATATTGGTTGAAAATACCAAATAGTAACCT  
GCATACTAAAAGTCAACATACAAGCTTTAGAGTCTACCATAAAATCCTCTAATTGATGAA  
CTTAACCTAAGAATAACTGGCAATTCGATAAATATTACATAAACTTTGCATAAAGAAAG  
TTCTTCCCTAGTGGTTAAATCCCAAATTATGA

---

**Protein uzunluğu:**

>164.m00105

MDITATNEPVRFYCFVTCOPYAIRVRTALELLQVPYNEYNEIDLLVNQQLTPEFLKINPLHQ  
VPVIINKQGQTSISESLVCLLEYLNDKYQPGLLPQDSFQRAQIRKWIYYSSIDAKKWRILG  
AIRNKNKEEAYRILNEIQNLKFLSSQIDLPIRVEQNSKTFLEFGSTFGMGDIAILPVLQD  
MIILFETAFGKHILKDNLNGKDVLDALKALYIWFENTKQQPAYQKSTYKLSLPLQNLIDE  
LNLNRNWQFDKYYINFAQRKFFPSGQIPKL\*

**TTHERM\_00572020**

**Genomik dizi uzunluğu:**833

**Açık okuma çerçevesi:** 780

**Protein uzunluğu:** 259

---

**Genomik dizi uzunluğu:**

>76.t00108

ATGTCATAACCCACCTTAAATTATACGGAAATATACTTTGTCCTTATGTACAAAGAGTG  
AGATTTGCTTTGGAAGCCTTGAACTTTAATACGATTATGTAGAAATAGATTTGTTAGCT  
AAAAAGCATTTATAAGAAGAATATCTTGCTATTAATCCCTTGGGATGTGTCCCAACAATT  
AACATTAATAACTCAGTAAAATAAATTAATAAATGTTTAAATTTTTCTAATTTTTTATT  
AAAAACAGAATGTTTATGAAAGTCTTGCTTGCTAGAGTTCCCTCGAAGAGTAATTTGGAA  
ATGTTTTCCAAAAGATACTATAAAAAGAGCTCAGCAGAGAATATGGGCAAACATTATG  
ATTAATAATGTGATTGGAATATTTGGGATGTATTCTAAGTCTACAAGAGCAAGGACGAAG  
AGGGCTTAAAAAGTTGGCCAATAAAGTGCAGAAGAAATCAGGACTGGGTTAAGCAAA  
CTAAATTATCAGAAAGAGTAAAGGCTAACCTAAAACTTTCTATGAAGGTGAATAACTTA  
CCTATGTTGACTTTGCTGTCGTTCCCTCATAACAAGATACTTAGAAGATATTGTTGCTGTC  
CATTCAACAAATAATTTATTTGATTTGGTTGAAAATGATGATCTAATTAAGATTTTAGAA  
CCTACATTAACAACGTAACCTCTTCTGAAGCTTATAATAGAATAACCCATAAGCTTCCAT  
CATTACCAGCCCACGGAGAAAACCTCCCTCCTTGATAGCCTTAACTTTACTCCCAGAACTT  
ATGACTACAGTAAACTCGTAAGAGCTTATCTTTCCAAAAGATTTGAATCCTGA

---

**Açık okuma çerçevesi:**

>76.m00234

ATGTCATAACCCACCTTAAATTATACGGAAATATACTTTGTCCTTATGTACAAAGAGTG  
AGATTTGCTTTGGAAGCCTTGAACTTTAATACGATTATGTAGAAATAGATTTGTTAGCT  
AAAAAGCATTTATAAGAAGAATATCTTGCTATTAATCCCTTGGGATGTGTCCCAACAATT  
AACATTAATAACTCAAATGTTTATGAAAGTCTTGCTTGCTAGAGTTCCCTCGAAGAGTAA  
TTTGAAAATGTTTTCCAAAAGATACTATAAAAAGAGCTCAGCAGAGAATATGGGCAAC  
TATTATGATTAAATGTGATTGGAATATTTGGGATGTATTCTAAGTCTACAAGAGCAAG  
GACGAAGAGGGCTTAAAAAGTTGGCCAATAAAGTGCAGAAGAAATCAGGACTGGGTT  
AAGCAAATAAATTATCAGAAAGAGTAAAGGCTAACCTAAAACTTTCTATGAAGGTGAA  
TAACCTACCTATGTTGACTTTGCTGTCGTTCCCTCATAACAAGATACTTAGAAGATATTGTT  
CGTGTACATTCAACAAATAATTTATTTGATTTGGTTGAAAATGATGATCTAATTAAGAT  
TTTAGAACCTACATTAACAACGTAACCTCTTCTGAAGCTTATAATAGAATAACCCATAAG  
CTTCCATCATTACCAGCCCACGGAGAAAACCTCCCTCCTTGATAGCCTTAACTTTACTCCC  
GAAACTTATGACTACAGTAAACTCGTAAGAGCTTATCTTTCCAAAAGATTTGAATCCTGA

---

**Protein uzunluğu:**

>76.m00234

MSQPHLKLYGNILCPYVQVRVFALEALKQYDYVEIDLLAKKHLQEYLA INPLGCVPTI  
NINNSNVYESLVLEEFLEEQFGNVFPKDIKRAQQRIWANYDQNVIGNIWDVFQVYKSK  
DEEGLKLANLAAEIRYWVKQTKLSERVKANPKTFYEGEQLTYVDFAVVPHTRYLEDIV  
RVTFNKQLFDLVENDDLIKDFRTYINNVTSSEAYNRI THKLPSPHAGENSLDLSLNFPT  
ETYDYSKLVRAYLSKRFES

**TTHERM\_00572000**

**Genomik dizi uzunluğu:** 843

**Açık okuma çerçevesi:** 780

**Protein uzunluğu:** 259

---

**Genomik dizi uzunluğu:**

>76.t00106

```
ATGTCCTTAATTAACATTATACGGTTTTCTCCTCTGCCCTTATGTTTAAAGAGTGAGATTT
GCTTTAGAAAACATTGGAGTTAAGTATGACTACAAAGAAGTTGATCTGTATAAAATTTAAA
CATAAAGAGTAGGCATATTTAGATATCAATCCTTTTGGAAAGGTTCCCTTCAATATCTTTC
AACAACTAGGTATTTATAATTTCTTGAACAATTAATCAAACCTAACTAAATATATATTCAA
TTAACTAATTAGATTATCTATGAAAGTCTCCCTCTTCTGAATTCTTAGAAAATGAATTT
GGTGGTGTTTCCCTTAAGATAACATTAGAAAGACATAATAGAGAATATGGGCAAATTAC
TTTGATTAAAAATTTATTGATAAAATGTGGGCTATACTTGAATTATAAAAAAAAAGGAT
GCTGAAGGATCTAAGAAGCTTGCTAACGAATTAGCTGAAGCTGTGAGATTCTTTACAAAA
AATTCAAAGCTATCTGAAAGAATTAATTAACCCAAACAACCTATTTTGAAGGAGACACA
TTAACTTATGTTGATTTTGCCTGTTTCCCTCATTTCAAAATGCTTGATGCTATGTATAGA
GCATTTCTTAAAGTCAATTTCTTTGATTAAATGAAAATTAGGATGAACATAATAGAAAT
TTCAAACTTACTATCAAAATGTTATTTTCCGACTCTTTTCAAAAGGACTGTAACATAAT
CCTCTTAATCTTCTGCCTAAGGAGATAACTTCTTTTAGATCAATTATAATACACTCCT
GAAAGCTATCATTTTGATAATTTTATAGAAATTTATATTACTAAAAAATTTGTAGAAGCT
TGA
```

---

**Açık okuma çerçevesi:**

>76.m00232

```
ATGTCCTTAATTAACATTATACGGTTTTCTCCTCTGCCCTTATGTTTAAAGAGTGAGATTT
GCTTTAGAAAACATTGGAGTTAAGTATGACTACAAAGAAGTTGATCTGTATAAAATTTAAA
CATAAAGAGTAGGCATATTTAGATATCAATCCTTTTGGAAAGGTTCCCTTCAATATCTTTC
AACAACTAGATTATCTATGAAAGTCTCCCTCTTCTTGAATTCTTAGAAAATGAATTTGGT
GGTGTTTCCCTTAAGATAACATTAGAAAGACATAATAGAGAATATGGGCAAATTACTTT
GATTAATAATTTTATTGATAAAATGTGGGCTATACTTGAATTATAAAAAAAAAGGATGCT
GAAGGATCTAAGAAGCTTGCTAACGAATTAGCTGAAGCTGTGAGATTCTTTACAAAAAAT
TCAAAGCTATCTGAAAGAATTAATTAACCCAAACAACCTATTTTGAAGGAGACACATTA
ACTTATGTTGATTTTGCCTGTTTCCCTCATTTCAAAATGCTTGATGCTATGTATAGAGCA
TTCTTTAAAGTCAATTTCTTTGATTAAATGAAAATTAGGATGAACATAATAGAAATTTT
AAACTTACTATCAAAATGTTATTTTCCGACTCTTTTCAAAAGGACTGTAACATAATCCT
CTTAATCTTCTGCCTAAGGAGATAACTTCTTTTAGATCAATTATAATACACTCCTGAA
AGCTATCATTTTGATAATTTTATAGAAATTTATATTACTAAAAAATTTGTAGAAGCTTGA
```

---

**Protein uzunluğu:** >76.m00232

```
MSQLTLYGFLLCYPVQRVRFALENIGVKYDYKEVDLYKFKHKEQAYLDINPFGKVPISIF
NNQIIYESLPLEFLENEFGVFPQDNIRKTQQRWANYFDQNFIDKMWAILGI IKKKDA
EGSKKLANELAEAVRFFTKNSKLSERIKLNPNNYFEGDTLTYVDFAVVPHFKMLDAMYRA
FFKVNFFDQIENQDELIQNFKTYQNVISSDSFKRTVTNPLNLPAGQDNFLDLQLQYTPE
SYHFDNFIEIYITKKFVEA
```

**TTHERM\_00400730**

**Genomik dizi uzunluğu:** 839

**Açık okuma çerçevesi:** 780

**Protein uzunluğu:** 259

---

**Genomik dizi uzunluğu:**

>43.t00067

ATGTCCTAATTAACATTATACGGTTTTCTCCTCTGCCCTTATGTATAAAGAGCGAGATT  
GCTTTAGAAAACATTGGAGTTAAGTATGACTACAAAGAAATGATATATATAAAATTTAAA  
CATAGAGAGTAGGCATATTTAGATATCAATCCTTTTGGAAAGGTTCCCTTCAATATCTTTC  
AACAACTAGGTATTTATAAATCTTGAACAATTAATCAATCTAACTAAATATATACTCAA  
ATAATTAGATTATTTAGAAAGTCTCCCCCTTCTTGAATTCCTAGAAAATGAATTTGGTG  
GTGTCTTCCCTTAAGATAACATTAGAAAAACATAATAGAGAATATGGGCAAATTACTTTA  
ATTCAAATTTTATTGATAGAATGTGGGCTATCTTTGGAATTATAAAAAAAGGATGCTG  
AAGGATCTAAGAAGCTTGCTAACGAATTAGCTGAAGTCTGAGATCTTTACAAAAAAT  
CCAAGCTATCTGAAAGAATTAATTAACCCAAATAGCTATTTTGAAGGAGAAACATTAA  
CTTATGTTGATTTTGTATTGGTCTCATTTCAAAATGCTTGATGCTATGTATAGAGTAT  
TCTTTAAAGTCAACTTCTTTGATTAAATGAAAATTAGGATGAACTAATCTAGAATTTCA  
AAATTTACTTTCAAATGTTGTTTCATCCGACTCTTTCAAAGGACTGTAACCTAATCCTC  
TTAATCTTCTGCCTAAGGAGATAACTTCCCTTTTAGATCAATTATAATACACTCCTAAAA  
GCTATCATTTTGATAATTTTATAGAATTTTATATTACTAAAAGATACGTAGAAGCTTGA

---

**Açık okuma çerçevesi:**

>43.m00235

ATGTCCTAATTAACATTATACGGTTTTCTCCTCTGCCCTTATGTATAAAGAGCGAGATT  
GCTTTAGAAAACATTGGAGTTAAGTATGACTACAAAGAAATGATATATATAAAATTTAAA  
CATAGAGAGTAGGCATATTTAGATATCAATCCTTTTGGAAAGGTTCCCTTCAATATCTTTC  
AACAACTAGATTATTTAGAAAGTCTCCCCCTTCTTGAATTCCTAGAAAATGAATTTGGT  
GGTGTCTTCCCTTAAGATAACATTAGAAAAACATAATAGAGAATATGGGCAAATTACTTT  
AATTCAAATTTTATTGATAGAATGTGGGCTATCTTTGGAATTATAAAAAAAGGATGCT  
GAAGGATCTAAGAAGCTTGCTAACGAATTAGCTGAAGTCTGAGATCTTTACAAAAAAT  
TCCAAGCTATCTGAAAGAATTAATTAACCCAAATAGCTATTTTGAAGGAGAAACATTA  
ACTTATGTTGATTTTGTATTGGTCTCATTTCAAAATGCTTGATGCTATGTATAGAGTA  
TTCTTTAAAGTCAACTTCTTTGATTAAATGAAAATTAGGATGAACTAATCTAGAATTTT  
AAAATTTACTTTCAAATGTTGTTTCATCCGACTCTTTCAAAGGACTGTAACCTAATCCT  
CTAATCTTCTGCCTAAGGAGATAACTTCCCTTTTAGATCAATTATAATACACTCCTAAA  
AGCTATCATTTTGATAATTTTATAGAATTTTATATTACTAAAAGATACGTAGAAGCTTGA

---

**Protein uzunluğu:**

>43.m00235

MSQLTLYGFLLCPPVQRARFALENIGVKYDYKEIDYKFKHREQAYLDINPFGKVPISIF  
NNQIIYESLPLEFLENEFGVFPQDNIRKTQQRIWANYFNNSNFIDRMWAI FGI IKKKDA  
EGSKKLANELAEVLRFFTKNSKLSERIKLPNSYFEGETLTYVDFAI GPHFKMLDAMYRV  
FFKVNFFDQIENQDELIQNFKIYFQNVVSDSFKRTVTNPLNLPAGQDNFLDLQLQYTPK  
SYHFDNFIEFYITKRYVEA\*

**TTHERM\_00161470**

**Genomik dizi uzunluğu:**690

**Açık okuma çerçevesi:** 690

**Protein uzunluğu:** 229

---

**Genomik dizi uzunluğu:**

>13.t00228

ATGTAAGATTAACAACAACCCTAAGTCTTTATATGGACTGGATGTCTTAGCCTTCTAGA  
TGCGTTGCAATTTTTGCATGATAAATAAAATCCCTGTTGATATCTCAGAGGTAAAAATT  
CTCAAAGGATAGCTCAGAAGTCAAGAATACAAAAGAATCAATCCTAATATGAGAGTTCCT  
ACTATTAAGACGGTAAATTCGTGCTTTATGAGTCTCATGCAATACTTAAATATTTGATA  
GCTTCAAGGGCATAATATATTCCTGAACATTGGTATCCTAAGGATATAAAAAGAACGTGCA  
TTAGTAGATTAATATTTAGACTGGCACCACACAAATATCAGAAACGCAGGAATGTATATT  
TTCAACTACTTTGTGCTTCCAAGTTTAGGTATTTAGTCTAAGTAGAATAAAGAACTATT  
TACAAATTGTTTATCTAATCCTTGAAAATGATTGATACAATATTTTAGCTGATAAGCCA  
TATATTGCTTCAAAGGAAAAAGCAACTATCGCTGATCTCTCCTGCTATTGCGAAATTACC  
TAAGTTAATTTAATTGATTTTGATTTCTCTCCTTATCCTAACATTCTTAAGTGGATGTAA  
AGACTTACTGCTGAATATCCATAGCTAGTTGAAGGACATCAACCTTTTATGAAATTTGTT  
TAGAAGATTAAGAAAAATAAAATTTATGA

---

**Açık okuma çerçevesi:**

>13.m00496

ATGTAAGATTAACAACAACCCTAAGTCTTTATATGGACTGGATGTCTTAGCCTTCTAGA  
TGCGTTGCAATTTTTGCATGATAAATAAAATCCCTGTTGATATCTCAGAGGTAAAAATT  
CTCAAAGGATAGCTCAGAAGTCAAGAATACAAAAGAATCAATCCTAATATGAGAGTTCCT  
ACTATTAAGACGGTAAATTCGTGCTTTATGAGTCTCATGCAATACTTAAATATTTGATA  
GCTTCAAGGGCATAATATATTCCTGAACATTGGTATCCTAAGGATATAAAAAGAACGTGCA  
TTAGTAGATTAATATTTAGACTGGCACCACACAAATATCAGAAACGCAGGAATGTATATT  
TTCAACTACTTTGTGCTTCCAAGTTTAGGTATTTAGTCTAAGTAGAATAAAGAACTATT  
TACAAATTGTTTATCTAATCCTTGAAAATGATTGATACAATATTTTAGCTGATAAGCCA  
TATATTGCTTCAAAGGAAAAAGCAACTATCGCTGATCTCTCCTGCTATTGCGAAATTACC  
TAAGTTAATTTAATTGATTTTGATTTCTCTCCTTATCCTAACATTCTTAAGTGGATGTAA  
AGACTTACTGCTGAATATCCATAGCTAGTTGAAGGACATCAACCTTTTATGAAATTTGTT  
TAGAAGATTAAGAAAAATAAAATTTATGA

---

**Protein uzunluğu:**

>13.m00496

MQDQQQTLISLYMDWMSQPSRCVAIFCMINKIPVDISEVKILKGQLRSQEYKRINPNMRVP  
TIKDKGFVLYESHAILKYLIAIRAQYIPEHWYPKDIKERALVDQYLDWHHTNIRNAGMYI  
FNYFVLPISLGIQSKQNKETIYKLFIQSLKMIDTIFLADKPYIASKEKAT IADLSCYCEIT  
QVNLIDFDFSPYPNLIKWMQRLTAEYPQLVEGHQPFMKFVQKIKEKQNL\*

**TTHERM\_00689990**

**Genomik dizi uzunluğu:** 723

**Açık okuma çerçevesi:** 723

**Protein uzunluğu:** 240

---

**Genomik dizi uzunluğu:**

>105.t00076

ATGTCCAATACAGAAGATAAAATAATACTTGGATATTGGGATTACAGAGGTCGTCATAG  
CCTCTAAAGTTTTATTGGAGTATATGGGTATTCCTTTCGAATAGAAGTATTATTCATAT  
GATAACCCGTGATGAATGGTATGAAAAAGATAAAAAGACAATTAACCATTTTCTAACCTT  
CCTTATCTCTAAACCAAAGATGGAATTCTAACAGAGACGTGTCCATAATTAATATTTG  
TTAAAGCGTTTTCTTAATTCAAAGACCTTTTAGGTAAAGAGTAAGATGAAATATTTGTA  
GACTAAATGCTTAGTGTTATGAATGATTTAAGAGATGCTTAAAAGCTTTCATTTCAAC  
CCAGATGTTCCACAAAGTCAAGAGAGATACTTTTATAACAATCTTCCAAGATGCTTGAC  
TTTAAAGATATACGAGGAGATAAATAGTTCTTATTGCCTTATTTAACTATTGCTGATTTT  
GAGCTTGAGAAATTTATTACTTTTCAAGCATTAGATTCAGAATATTGACTAACAT  
CTATCAAGCTTTGAAAAATTTCTTTAAGATTTTCATAATCTTCCAAGAATAAAAAGATAT  
GTTAGGTCAGATAAATACTAAAACTACTCACTTTCTTTGCTAAACCTAAAGCTTACCTT  
TAAAGTGATAAATTTATCATCGAATACAATAAATAGTTTTTGCAAAATAACACAAAATTG  
TGA

---

**Açık okuma çerçevesi:**

>105.m00162

ATGTCCAATACAGAAGATAAAATAATACTTGGATATTGGGATTACAGAGGTCGTCATAG  
CCTCTAAAGTTTTATTGGAGTATATGGGTATTCCTTTCGAATAGAAGTATTATTCATAT  
GATAACCCGTGATGAATGGTATGAAAAAGATAAAAAGACAATTAACCATTTTCTAACCTT  
CCTTATCTCTAAACCAAAGATGGAATTCTAACAGAGACGTGTCCATAATTAATATTTG  
TTAAAGCGTTTTCTTAATTCAAAGACCTTTTAGGTAAAGAGTAAGATGAAATATTTGTA  
GACTAAATGCTTAGTGTTATGAATGATTTAAGAGATGCTTAAAAGCTTTCATTTCAAC  
CCAGATGTTCCACAAAGTCAAGAGAGATACTTTTATAACAATCTTCCAAGATGCTTGAC  
TTTAAAGATATACGAGGAGATAAATAGTTCTTATTGCCTTATTTAACTATTGCTGATTTT  
GAGCTTGAGAAATTTATTACTTTTCAAGCATTAGATTCAGAATATTGACTAACAT  
CTATCAAGCTTTGAAAAATTTCTTTAAGATTTTCATAATCTTCCAAGAATAAAAAGATAT  
GTTAGGTCAGATAAATACTAAAACTACTCACTTTCTTTGCTAAACCTAAAGCTTACCTT  
TAAAGTGATAAATTTATCATCGAATACAATAAATAGTTTTTGCAAAATAACACAAAATTG  
TGA

---

**Protein uzunluğu:**

>105.m00162

MSNTEDIILGYWYRGRPQLKFLLEYMGIPFEQKYYSYDNPDEWEYKDKTIKPFNL  
PYLQTKDGLTETCSIIKYLKRFQPKDLLGKEQDEIFVDQMLSVMNDRDLVKALHFN  
PDVHKVRDITLLTILPKMLDFKDIRGDKQFLPYLTIADFELVEILLFKHLDSELDQD  
LSSFELQDFHNLPRKEYVRSKYQKLLTFFAKPKAYLQSDKFIIEYNKQFLQNNTKL

\*

**TTHERM\_00205200**

**Genomik dizi uzunluğu:**675

**Açık okuma çerçevesi:** 675

**Protein uzunluğu:** 224

---

**Genomik dizi uzunluğu:**

>17.t00162

ATGAGCAATTTAATTTTAAAGCTATTGGAACCTAAGAGGTAGAAGCTGAGCCTATCAGAATG  
CTCTTAAATATCTATAATTACCTTACACCTATAAGGGATACGATCTTTCTAGCTATAAT  
TAGTGGAAAGTAAGTTGACAAACCTGCTCTTTAGTCTGATTTCCCTAATTTACCCATCTT  
AAAGATGGAGACTATGTTTTAACAGAGTCAGATGCAATAGCTCAATACGTTTGTGTA  
GCTAACAGAGAAGACATGATTGGCACAACCATTGAGGACAGAATCAATATTGCTAGAATC  
AGAGGGATTGTAATGAAAATATATACTTGATTGGACAGCTTGCTTATAGCCCTAAATAC  
AAAGAAGAAATTAAGCAAACCTTCTAAAGATTCTCAGTCCCTTTGGCTAATTAATAAT  
TATTTAAATAAAGAGTATATCAATAATGGTAAAATTTGCTATTATGACTTCTACCTT  
TATGAGCTTATGTTTCATCGCTCATAAAAATTTAAAGAAGAAAATGTCTTTGATGTTTT  
CCAAATCTTCGTAGTCACTACTACAGAATCTAGAATTTACCCTAAATATAAGACTATTTG  
AATTCGGATAGATACAACAAATCATTCGTTATCTACGGGCCAACTTCTGTATGGAATCT  
GATTCAACTCTTTGA

---

**Açık okuma çerçevesi:**

>17.m00401

ATGAGCAATTTAATTTTAAAGCTATTGGAACCTAAGAGGTAGAAGCTGAGCCTATCAGAATG  
CTCTTAAATATCTATAATTACCTTACACCTATAAGGGATACGATCTTTCTAGCTATAAT  
TAGTGGAAAGTAAGTTGACAAACCTGCTCTTTAGTCTGATTTCCCTAATTTACCCATCTT  
AAAGATGGAGACTATGTTTTAACAGAGTCAGATGCAATAGCTCAATACGTTTGTGTA  
GCTAACAGAGAAGACATGATTGGCACAACCATTGAGGACAGAATCAATATTGCTAGAATC  
AGAGGGATTGTAATGAAAATATATACTTGATTGGACAGCTTGCTTATAGCCCTAAATAC  
AAAGAAGAAATTAAGCAAACCTTCTAAAGATTCTCAGTCCCTTTGGCTAATTAATAAT  
TATTTAAATAAAGAGTATATCAATAATGGTAAAATTTGCTATTATGACTTCTACCTT  
TATGAGCTTATGTTTCATCGCTCATAAAAATTTAAAGAAGAAAATGTCTTTGATGTTTT  
CCAAATCTTCGTAGTCACTACTACAGAATCTAGAATTTACCCTAAATATAAGACTATTTG  
AATTCGGATAGATACAACAAATCATTCGTTATCTACGGGCCAACTTCTGTATGGAATCT  
GATTCAACTCTTTGA

---

**Protein uzunluğu:**

>17.m00401

MSNLIILSYWNLGRTEPIRMLLNLYQLPYTYKGYDLSSYNQWKQVDKPALQSDFPNLPYL  
KGDYVLTESDAIAQYVCVKANREDMIGTTIEDRINIARIRGIVNENIYLIGQLAYSPKY  
KEELKANFQRFVFPFGLNNYLNNKEYINNGKICYDFYLYELMFIAHKIFKEENVFDFV  
PNLRSHYYRIQNLPIQDYLNDRYNKSFVIYGPTSVWNSDSTL\*

**TTHERM\_00463010**

**Genomik dizi uzunluğu:**684

**Açık okuma çerçevesi:** 684

**Protein uzunluğu:** 227

---

**Genomik dizi uzunluğu:**

>54.t00058

ATGGCTGAAAAAATTAGATTACATTAGGGTATTGGAATATAAGAGGTTTAGGTTAGCTA  
AGCAGATATCTTCTGAATACACTGGTCTTAAGTACAAGGAAAAGAGATATTTAAAGCTT  
GAGGAATGGTTCTAAAAGGATAAGTAAGGATTAGGAATAGAATTTGCAAACCTACCTTAT  
TTAATAGATGGAGATTTAAAATTAACCGAAAGCCACGCAGTAAATCTGTACATTATAAGA  
AAGAGCGGCAAGAATGAATTGCTAGGAACTAATCTGATCGAGGAATCTAAAATTAGAGAG  
CTTATTGGATATTTAGAAGATTTTTTCAGATAAATATTAACCTTTGTGCTTTAATCCTTAA  
TTTAGTATCATTAAAGTAACAAAAGTATAATGATGACTTTAGCCTAAGATTGCAAAGATTG  
GAAAATCAGCTCACTAAAGACAACGAAAATGGCTTAATGGTCAATCACTTAGCCTTCTCT  
GATTTTATATCTATGAAATTAGTTAATACATTAAAGGAATCTATCCCGAAGAATTTAAA  
AAACTGCCAAAAATCTAAGCCTTCCAAGCCCGTTTTGAAGAAATGAGTAAATATAAGAC  
TATATGATGTCTGAAGAGTACATTTATGCTCCATTCTTAGCAGTTGGTCATGGAGCCTAA  
TGGACTGGCTTAAAATAAAAATGA

---

**Açık okuma çerçevesi:**

>54.m00209

ATGGCTGAAAAAATTAGATTACATTAGGGTATTGGAATATAAGAGGTTTAGGTTAGCTA  
AGCAGATATCTTCTGAATACACTGGTCTTAAGTACAAGGAAAAGAGATATTTAAAGCTT  
GAGGAATGGTTCTAAAAGGATAAGTAAGGATTAGGAATAGAATTTGCAAACCTACCTTAT  
TTAATAGATGGAGATTTAAAATTAACCGAAAGCCACGCAGTAAATCTGTACATTATAAGA  
AAGAGCGGCAAGAATGAATTGCTAGGAACTAATCTGATCGAGGAATCTAAAATTAGAGAG  
CTTATTGGATATTTAGAAGATTTTTTCAGATAAATATTAACCTTTGTGCTTTAATCCTTAA  
TTTAGTATCATTAAAGTAACAAAAGTATAATGATGACTTTAGCCTAAGATTGCAAAGATTG  
GAAAATCAGCTCACTAAAGACAACGAAAATGGCTTAATGGTCAATCACTTAGCCTTCTCT  
GATTTTATATCTATGAAATTAGTTAATACATTAAAGGAATCTATCCCGAAGAATTTAAA  
AAACTGCCAAAAATCTAAGCCTTCCAAGCCCGTTTTGAAGAAATGAGTAAATATAAGAC  
TATATGATGTCTGAAGAGTACATTTATGCTCCATTCTTAGCAGTTGGTCATGGAGCCTAA  
TGGACTGGCTTAAAATAAAAATGA

---

**Protein uzunluğu:**

>54.m00209

MAEKNIITLGYWNIIRGLQLSRYLLEYTGLKYKEKRYQKLEEFQKDKQGLGIEFANLPY  
LIDGLKLTESHAVNLYIIRKSGKNELLGTNLIEESKIRELIGYLEDFRQILTLFCFNPQ  
FSIIKQKYNDLDFSLRQLRLENQLTKDNRKWLNGQSLSLPDFIFYEISQYIKGIYPEEFK  
KLPKIQAFQARFEEIEQIQDYMMSEYIYAPFLAVGHGAQWTGLKQK\*



**TTHERM\_00661650**

**Genomik dizi uzunluğu:** 660

**Açık okuma çerçevesi:** 660

**Protein uzunluğu:** 219

---

**Genomik dizi uzunluğu:**

>98.t00054

ATGACAACCTTTGGTTACTGGGGCATCAGAGGTTTGGCTCAACCTATCCGTTTCTTACTT  
GCCTACTTAGGTGTCTAATACTAATAAGGCCTACGCCAATCCTGAAGAATGGTTCGGA  
AAGGATAAGAATGAACTCGGCTTTGACTTCCCCAACATTCCTACTTAATTGATGGTGAT  
CTTAAACTTACTGAATCTTCTGCTATTCTATTATCTTATCAGAAAGCACAAAAGAAAC  
GAGTTGTTAGGATCTTCTGCTGACGGTTCTTACAGTGAAAAGGAAGTTAGAGTCGCTTAA  
ATTGTTGGTGTTATTAGAGATCTTTTAAAGAACTCACAGGCTTATGTTTCAACCCTGAC  
TTCAAAAACATTAAGAAAAGCTCTACACTGAAAAGCTCGAACTCTTAATTAAGAGACTC  
GGTGCTTATCTTGGTGATAAGGAATTCATAGTTGGTACCTTGACTTATGCTGATTTTCTT  
TTCTATGAAGCCCTCAGCTATATTAGACATATTATCCCCAAGCCATTTGTGCTACTCTT  
ACTGCTTATATCAACAGATTTGAAAACCTCCCTGGTATTAAGGAATACATTGCTAGCCAT  
GCCTAAGAACCTAAGGTTTCTTACCTCCTCAAAGAGCTACCTGGTCTGGTCTTAATGA

---

**Açık okuma çerçevesi:**

>98.m00153

ATGACAACCTTTGGTTACTGGGGCATCAGAGGTTTGGCTCAACCTATCCGTTTCTTACTT  
GCCTACTTAGGTGTCTAATACTAATAAGGCCTACGCCAATCCTGAAGAATGGTTCGGA  
AAGGATAAGAATGAACTCGGCTTTGACTTCCCCAACATTCCTACTTAATTGATGGTGAT  
CTTAAACTTACTGAATCTTCTGCTATTCTATTATCTTATCAGAAAGCACAAAAGAAAC  
GAGTTGTTAGGATCTTCTGCTGACGGTTCTTACAGTGAAAAGGAAGTTAGAGTCGCTTAA  
ATTGTTGGTGTTATTAGAGATCTTTTAAAGAACTCACAGGCTTATGTTTCAACCCTGAC  
TTCAAAAACATTAAGAAAAGCTCTACACTGAAAAGCTCGAACTCTTAATTAAGAGACTC  
GGTGCTTATCTTGGTGATAAGGAATTCATAGTTGGTACCTTGACTTATGCTGATTTTCTT  
TTCTATGAAGCCCTCAGCTATATTAGACATATTATCCCCAAGCCATTTGTGCTACTCTT  
ACTGCTTATATCAACAGATTTGAAAACCTCCCTGGTATTAAGGAATACATTGCTAGCCAT  
GCCTAAGAACCTAAGGTTTCTTACCTCCTCAAAGAGCTACCTGGTCTGGTCTTAATGA

---

**Protein uzunluğu:**

>98.m00153

MTTLGYWGI RGLAQP I RFL LAYLGVQYTNKAYANPEEWF GKDKNELGFDFPNIPYLIDGD  
LKLTESSAIP IYLRKHKRNEL LGSSADGSYSEKEVRVAQIVGVIRDLF KELTGLCFNPD  
FKNIKEKLYTEKLELLIKRLGAYLGDKEF IVGTLTYADFLFYEALSYIRHIYPQAICATL  
TAYINRFENLPGIKEYIASHAQELKVFLPPQRATWSGPQ\*

**TTHERM\_00661660**

**Genomik dizi uzunluğu:** 787

**Açık okuma çerçevesi:** 660

**Protein uzunluğu:** 219

---

**Genomik dizi uzunluğu:**

>98.t00055

```
ATGGCTACTTTAGGATATTGGGGTTTTAGAGGTTTAGCATAACCTATTCGTTTTTTATTA
GCTTATTTGGGTGTACAATATACTGATAAACTACACAAAAGGAGAAGATTGGTTTGAA
AATGATAAAAAGAATTTAGGAATGGACTTTCCTAATATTCCTTATTTTCATTGATAACGAT
ATTAATAATAGCGAATCATCTGCAATCCCTTTCTATATAATCAAGAAGTATAAAAAACCC
GAACTATTAGGCTAGAATGCCGACGGATCTTCAACGAAAAGGAAATTAAGTTCAATAA
GTGATCGGCGTTATTAAGATATCAATAAAGAATTGATGGGACTTTGCTTCAATCCTGAC
TTTGCTAATGCCAAAGACAAGGTTTACAACGAAAACCTTCAGTAGGCTTAAAGTAAAT
ATTCATGTTTATCTCAATTAATAAACTATGTTTAAATATTATATTTTTAAATCTTAA
AAATAAATGCAAGCATGTTTGTAATAAATATATAAAATATTTAATCTGTTTAATA
GAAATTAATGACTTCTTAGGCAACAAAGATTTCTTGCTTGGTACTCTAACATATGCAGA
TTTCTTATCTATGAGACACTTCTTACTTCAAACACATTTCCCTTAAAGTATTACTCC
TACCCTTGCAAATTACTTAAATAGATTCCAAAATCTTCTGGAGTCAAGGAATATATTGC
TAAACCTTCAGTAGATCTTAATGCCTTTTTACCTCCCTAAAGAGCTGCTTGGCATGGTCC
TAAATGA
```

---

**Açık okuma çerçevesi:**

>98.m00154

```
ATGGCTACTTTAGGATATTGGGGTTTTAGAGGTTTAGCATAACCTATTCGTTTTTTATTA
GCTTATTTGGGTGTACAATATACTGATAAACTACACAAAAGGAGAAGATTGGTTTGAA
AATGATAAAAAGAATTTAGGAATGGACTTTCCTAATATTCCTTATTTTCATTGATAACGAT
ATTAATAATAGCGAATCATCTGCAATCCCTTTCTATATAATCAAGAAGTATAAAAAACCC
GAACTATTAGGCTAGAATGCCGACGGATCTTCAACGAAAAGGAAATTAAGTTCAATAA
GTGATCGGCGTTATTAAGATATCAATAAAGAATTGATGGGACTTTGCTTCAATCCTGAC
TTTGCTAATGCCAAAGACAAGGTTTACAACGAAAACCTTCAGTAGGCTTAAAAATTA
AATGACTTCTTAGGCAACAAAGATTTCTTGCTTGGTACTCTAACATATGCAGATTTCTTA
TTCTATGAGACACTTCTTACTTCAAACACATTTCCCTTAAAGTATTACTCCTACCCTT
GCAAATTACTTAAATAGATTCCAAAATCTTCTGGAGTCAAGGAATATATTGCTAAACCT
TCAGTAGATCTTAATGCCTTTTTACCTCCCTAAAGAGCTGCTTGGCATGGTCCATAATGA
```

---

**Protein uzunluğu:**

>98.m00154

```
MATLGYWGRGLAQP I RFL LAYLGVQYTDKHYTKGEDWFENDKKNLGMDFPNIPYFIDND
IKI SESSAIPFYI IKKYKPELLGQNADGSFNEKEIKVQVIGVIKDINKELMGLCFNPD
FANAKDKVYNEKLSVGLKLLNDFLGNKDFLLGLTYADFLFYETLSYFKHIFPQSITPTL
ANYLNRFNLPVKEYIAKPSVDLNAFLPPQRAAWHGPK*
```

**TTHERM\_00661620**

**Genomik dizi uzunluğu:** 657

**Açık okuma çerçevesi:** 657

**Protein uzunluğu:** 218

---

**Genomik dizi uzunluğu:**

>98.t00051

ATGATTACTCTGGCTACTGGAATGTTAGAGGATTAGGATAGTCTATCCGTTTCTTACTT  
GCTTATTTGGGTGTAGAATAAATAGTAAGGTTTATAGCACAGCAGAAGAATGGTTTGGT  
AAAGATAAAAATAACTTAGGTTTAGAATTCCAAATATTCCTTATATTATCGATGGGGAA  
TTTAAGCTTACTGAATCTTCAGCCATTCCTATCTATTTACTCAGGAAATACAAAAGAGCT  
GATTTATTAGGTTTTCTAATGATGGAAGCTACAGTGAGAGAGAAGTTAGAGTTGCTCAG  
CTTATTGGTGTTATAAAAGATATCTATAAAGAAACAATCCAGTATGTTTCAGCCCTGAT  
TTCGATAAAAATAAAAGATTAAGCTTTTGCTAAGGGTGAAGTTTACTTAAAAAACTTGTA  
AGTTTTCTTGGAGATAAAGAGTTTTTGCTTAGTACTTTGACTTATGCTGATTTTCTCTTA  
TATGAAGTACTATGCTATTATAAGTATATTTATCCTTAAGCTATAACACCTACACTAACG  
GCTTATATGAACAGATTTGAGAATTTACCAGGAATTAATAGTACATAGCAAACCCAAGC  
ATAAATCTCAAAGCTTTCCTTCTACATTCAAATCTACATGGTCAGGTCCTCAATGA

---

**Açık okuma çerçevesi:**

>98.m00150

ATGATTACTCTGGCTACTGGAATGTTAGAGGATTAGGATAGTCTATCCGTTTCTTACTT  
GCTTATTTGGGTGTAGAATAAATAGTAAGGTTTATAGCACAGCAGAAGAATGGTTTGGT  
AAAGATAAAAATAACTTAGGTTTAGAATTCCAAATATTCCTTATATTATCGATGGGGAA  
TTTAAGCTTACTGAATCTTCAGCCATTCCTATCTATTTACTCAGGAAATACAAAAGAGCT  
GATTTATTAGGTTTTCTAATGATGGAAGCTACAGTGAGAGAGAAGTTAGAGTTGCTCAG  
CTTATTGGTGTTATAAAAGATATCTATAAAGAAACAATCCAGTATGTTTCAGCCCTGAT  
TTCGATAAAAATAAAAGATTAAGCTTTTGCTAAGGGTGAAGTTTACTTAAAAAACTTGTA  
AGTTTTCTTGGAGATAAAGAGTTTTTGCTTAGTACTTTGACTTATGCTGATTTTCTCTTA  
TATGAAGTACTATGCTATTATAAGTATATTTATCCTTAAGCTATAACACCTACACTAACG  
GCTTATATGAACAGATTTGAGAATTTACCAGGAATTAATAGTACATAGCAAACCCAAGC  
ATAAATCTCAAAGCTTTCCTTCTACATTCAAATCTACATGGTCAGGTCCTCAATGA

---

**Protein uzunluğu:**

>98.m00150

MITLGYNVNRGLGQSIRFLLAYLGVYNSKVYSTAEWFVKDKNNLGLFNPYIIDGE  
FKLTESSAIPYLLRKYKRADLLGFSNDGSYSEREVRVAQLIGVIKDIYKETIPVCFSPD  
FDKIKDQAFKGEVLLKLVSLGDKFLLSTLTYADFLLYEVLCCYKYIYPQAITPTLT  
AYMNRFENLPGIKQYIANPSINLKAFLPTFKSTWSGPQ\*

**TTHERM\_00473230**

**Genomik dizi uzunluğu:**675

**Açık okuma çerçevesi:** 675

**Protein uzunluğu:** 224

---

**Genomik dizi uzunluğu:**

>57.t00023

```
ATGCAGTAACAACAGTAGAGTAAAATAAAATTAGGGTATTGGGACGTTAGAGGAAGAGGT
GAGCCTATTAGATTACTTCTAAATTACTTAAAGCTAGAATATGAAGATGAAATATACCCCT
TTGAGTGATAGGGAAAAATGGTTC AATTTCAAAGAAACTCCTAAGAATTATTTATAAAAT
CTGCCATATGTTTAGATTGAAAGTAAGGAGACATAAAGTAAATCAATTTATGTTGAGAGC
GATAGTATTAGCATT TTTTATTTGTTAAAATTTGGAGGAGAGCAATTACTAGGCAAAGAT
TTAGTTTTACTTAGTAAAATGAGAGGAGTAACTGAAGATGTTAAGCTTTATTTAAGCAGA
TATGCTTATCACAATGATTTTGCTGAAGCAGATCAGCTCTTCCTCTAAAAAAGACTTTAA
CCAATCTCTTAAGGTTAAACACTTATCTTTAAAATTATAAATATTTATTAGGAAGCAAC
ATTTCTTATCTAGATTTTGTCTTTATGAGTCATTGAAGACATTAGAAAAATAAAAAAG
GAGTATTACAATCTCATAATATCTAGTATAATACATAAAAAATATTGAAAATATTCCT
TAGATTAAGCCTATCTTTCTTCTGAAAGATTTACAAAAGATTTTTTATTTTATGGAGAT
CCTTCTCCTATTTGA
```

---

**Açık okuma çerçevesi:**

>57.m00162

```
ATGCAGTAACAACAGTAGAGTAAAATAAAATTAGGGTATTGGGACGTTAGAGGAAGAGGT
GAGCCTATTAGATTACTTCTAAATTACTTAAAGCTAGAATATGAAGATGAAATATACCCCT
TTGAGTGATAGGGAAAAATGGTTC AATTTCAAAGAAACTCCTAAGAATTATTTATAAAAT
CTGCCATATGTTTAGATTGAAAGTAAGGAGACATAAAGTAAATCAATTTATGTTGAGAGC
GATAGTATTAGCATT TTTTATTTGTTAAAATTTGGAGGAGAGCAATTACTAGGCAAAGAT
TTAGTTTTACTTAGTAAAATGAGAGGAGTAACTGAAGATGTTAAGCTTTATTTAAGCAGA
TATGCTTATCACAATGATTTTGCTGAAGCAGATCAGCTCTTCCTCTAAAAAAGACTTTAA
CCAATCTCTTAAGGTTAAACACTTATCTTTAAAATTATAAATATTTATTAGGAAGCAAC
ATTTCTTATCTAGATTTTGTCTTTATGAGTCATTGAAGACATTAGAAAAATAAAAAAG
GAGTATTACAATCTCATAATATCTAGTATAATACATAAAAAATATTGAAAATATTCCT
TAGATTAAGCCTATCTTTCTTCTGAAAGATTTACAAAAGATTTTTTATTTTATGGAGAT
CCTTCTCCTATTTGA
```

---

**Protein uzunluğu:**

>57.m00162

```
MQQQQQSKIKLGYWDVVRGRGEP IRLLLNLYLKLEYEDEIYPLSDREKWFNFKRNSQELFIN
LPYVQIESKETQSQSIYVESDSISIFICQNFQGEQLLGKDLVLLSKMRGVTEDEVKLYLSR
YAYHNDFAEADQLFLQKRLQPILLRLNTYLQNYKYLGSNISYLDVFLYESLKTLEKIKK
EYLSQSHYLVQYIKNIENIPQIKAYLSSERFHKDFLFYGDPSPI*
```

TTHERM\_00661640

Genomik dizi uzunluğu: 2789

Açık okuma çerçevesi: 1107

Protein uzunluğu: 368

---

Genomik dizi uzunluğu:

>98.t00053

ATGGATAAGTTATCAAAATAATAAATAAGTCACAAGCTTATGCTAATTCAGTTAAAGAT  
ATAGAGCAGTTATGCTTTGAAAAAATTAATGAAAAGTAAGAAAATTCAAATTAAGTTAAC  
TAAATTATGACTATTTGGCATAGACCCAAAGAAGAGCACTTGTATGCTCTGAAAGAAAGA  
AAAAATCTAAGCGTAGTTATTACTTTATAATCATAGAGTGAGGATATAGAATTTATTTAA  
AATATTTGCAAAAAGCCTGAAAATAGGCTGGATTAATATTTAACTACACCACAAGGGCAAT  
TAAGATATTTTTGAAAAGAAAAGATGTAGATTAATTTATATAAAATGGAATAGCTTCTCTT  
CGTAATATTTTAGACTAAAATAAAAATGAGGTAATACTTATTCATGTTTCAGCTGGCATA  
CATAGATCAGGAGTATTTAGCTATGCTATCTGAGGAGTCTTCTTATGATAGAAATGAA  
TCACCTCAAAAAGATAAAATCTATTAGGAAAATGACTTCAATGGATTAAGAAATATAAA  
TTAGACTATATTGATTAATAATAATAATATATGAAACAATGTAGAGATTAATAAAG  
ATATATATATACTTCTCCCTACTTTAAATTTTAACTTAATTTTTTAGCTAAATATTT  
TATATTTCAAAAAATGCTAGATGAGAAATTAATTTTGAATTAATAAATATATTACATA  
TTCATTTATCAATAGAGTTGTCTACAAATAAATCCAAATATTTAAGTAAAAAGAAATTTG  
ACTCAGTCTAATCTATCCTAATAATTAGTTATAAAAAATTTATAAATAATATTTTATTA  
ATTTTAAATTTTTTATATCATTGTTATGTATTAGGGGCTTACTGCTTGGATTGTTTGCAA  
AGTCAGCTTTCTTTTGAGAGATTCTAATCCAAATTTTATAATTAATTAATAATTTTA  
TTTATTAATTTCTGAAAAGATTCAATCGAGAGCTATTTGAAATAAGACAGACACCAAT  
AGATTATCTAAAAATTAATTTAATTTAAATAAATCCTAATAATAATTTAAGTTTTTTA  
TTTATTAGAATTTCTATTAATAATGTCAGATTTTATATTACCAATTACAATAGTTAAAT  
TTAATAATCTTTTTGATTTGAGAAATCAAAATGATTCATTTTACAAAATCTTAGTTACT  
TAAATTTATAAATTAATAATTTAATTCAGATTACATTTAGCTAAACATGAAAGCAATATT  
TTAAAAACTAATTTATTATTCTAAGAAATTAATGAATTTAATGTAAGATTTAATTTTTT  
AAGAAAAAATAATAATAATAACTAAATGATTATTTATTTATTTATTTATTTATTTA  
TTTATTTTATTGAGAATTTAAAAATAAATAGATTTTACTTTTTTATTTATTTATTTAA  
GATTTGGTATAAAATTTATTTTACTAAATAATGATTGATTTTTTAAATTAATTTTATT  
TATTTTTAATTTGATTTGATTTGTAATTTCTAATGAATTTCTATCAAACAATTAATTTT  
TGATTTACAAAAATCTTTGAAATTTCTAAATCATAAATCAAAATGATTTATTTATTTT  
ACAAAATCTTAGTTACTTAAATTTATAAATTAATAAATTAATTCATATTGCATTTAGATA  
TTCATGAAAGCAATATTTTAAACATGAATTTATTTCTAAGAAATGAATGAATTTTAA  
GTAAGATTTAATTTATTAAGAAAAAATAATAATAAATAACTACATTGATGATTTATT  
TATACTTATTAAGAATTTAAAAAATAAGATTTTACTTTTTATTATTATTTAAAGAT  
TGATATGAATTTTACTAAGTATTTTATTGATTTTTTAAATTAATTTTATTTATTTT  
TATTTGATTTGTAATTTACTAATTAATTTCTATCAAACATTTAAATTTTTGATTAATAAA  
AAATATTGAAATTTTAAATCTATTTACATTTTATTTACTTAATTTTATAACCTTTTGC  
TGTGCTTTTAAACTGATGATTTTACAATAGTATAATTAATTAATAACTAAAAAGATC  
AATACAAATATCAACAAAAATAAATTAAGAAATGATTACTCTGGCTACTGGAATG  
CTAGAGGATTAGGATAGTCTATCCGTTTCTTACTTGCCTATTTAGGTGTAGAATATACTA  
ATAAGGCATACAGCACACCAGAAGATGGTTTGGTAAAGATAAAAAATACTTAGGTTTAG  
AATTTCCAAATCTTCTTATATTATCGATGGGAATTTAAGCTTACTGAATCTTAAGCAA

TTCCTATCTATCTACTCAAGAAATACAAAAGAGTCGATTTATTAGGTTTATCTAATGATG  
GAAGCAACAGTGAGAGAGAAGTTAGAGTTGCTTAGCTTACTGGAGTTATCAAAGATATAT  
ACAAAGAAACACTTCCAGTATGTTTCAGCCCTGATTTTCGATAAAAATAAAAGATTAAGCTT  
TTGCTAAGGGTGAAGTTTTACTTAAAAAACTTGTAAGTTTTCTAGGTGATAAAGAATTTT  
TGCTCACTACTTTGACTTATGCTGATTTTCTCTTATATGAAATACTATGCTATTATAAGT  
ATATTTATCCTTAAGCTATAACTCCTACATTAACAGCTTATATGAATAGATTTGAGAATT  
TACCTGGTATTAATAATACATAGCAAACCCAAACATAAATCTCAAAGCTTTTCTTCTCTC  
CATTCGCTACTTGGTCAGGTCCTCAGTGA

---

**Açık okuma çerçevesi:**

>98.m00152

ATGGATAAGTTATCAAATATAATAAATAAGTCACAAGCTTATGCTAATTCAGTTAAAGAT  
ATAGAGCAGTTATGCTTTGAAAAAATTAATGAAAAGTAAGAAAATCAAATTAAGTTAAC  
TAAATTATGACTATTTGGCATAGACCCAAAGAAGAGCACTTGATGCTCTGAAAGAAAGA  
AAAAATCTAAGCGTAGTTATTACTTTATAATCATAGAGTGAGGATATAGAATTTATTTAA  
AATATTTGCAAAAGCCTGAAAATAGGCTGGATTAATATTTAACTACACCACAAGGGCAAT  
TAAGATATTTTGAAGAAAGATGTAGATTAATTTATAAAAATGGAATAGCTTCTCTT  
CGTAATATTTTAGACTAAAAATAAAAATGAGTATAATTAATTATAAACTAAAAAAGATCAA  
TACAAATATCAACAAAAATAAAAATAAAAGAAATGATTACTCTTGGCTACTGGAATGCT  
AGAGGATTAGGATAGTCTATCCGTTTCTTACTTGCCTATTTAGGTGAGAATATACTAAT  
AAGGCATACAGCACACCAGAAGAATGGTTTGGTAAAGATAAAAAATAACTTAGGTTTAGAA  
TTCCAAATCTTCTTATATTATCGATGGGAATTTAAGCTTACTGAATCTTAAGCAATT  
CCTATCTATCTACTCAAGAAATACAAAAGAGTCGATTTATTAGGTTTATCTAATGATGGA  
AGCAACAGTGAGAGAGAAGTTAGAGTTGCTTAGCTTACTGGAGTTATCAAAGATATATAC  
AAAGAAACACTTCCAGTATGTTTCAGCCCTGATTTTCGATAAAAATAAAAGATTAAGCTTTT  
GCTAAGGGTGAAGTTTTACTTAAAAAACTTGTAAGTTTTCTAGGTGATAAAGAATTTTGG  
CTCACTACTTTGACTTATGCTGATTTTCTCTTATATGAAATACTATGCTATTATAAGTAT  
ATTTATCCTTAAGCTATAACTCCTACATTAACAGCTTATATGAATAGATTTGAGAATTTA  
CCTGGTATTAATAATACATAGCAAACCCAAACATAAATCTCAAAGCTTTTCTTCTCTCCA  
TTCGCTACTTGGTCAGGTCCTCAGTGA

---

**Protein uzunluğu:**

>98.m00152

MDKLSNI INKSQAYANSVKDIEQLCFEKINEKQENSQVNIQIMTIWHRPKEEHLYALKER  
KNLSVVITLQSQSEDIQNIQICKSLKIGWINIQLHHKGNQDIFEKKDQVQIIQNGIASL  
RNILDQNKNEYNLQTKKQYQYQKIKLKEMITLGYWNARGLGQSIRFLLAYLGVEYTN  
KAYSTPEEWFQKDKNNLGLFNPYPYIDGFEKLTESQAIPIYLLKYYKRVDDLGLSNDG  
SNSEREVRVAQLTGVIKDIYKETLPVCFSPDFDKIKDQAFKGEVLLKLVSF LGDKREFL  
LTTLYADFLLYEILCYKYIYPQAITPILTYMNRNFENLPGIKQYIANPNINLKAFLPP  
FATWSGPQ\*

**TTHERM\_00463010**

**Genomik dizi uzunluğu:**684

**Açık okuma çerçevesi:** 684

**Protein uzunluğu:** 227

---

**Genomik dizi uzunluğu:**

>54.t00058

ATGGCTGAAAAAATTAGATTACATTAGGGTATTGGAATATAAGAGGTTTAGGTTAGCTA  
AGCAGATATCTTCTGAATACACTGGTCTTAAGTACAAGGAAAAGAGATATTTAAAGCTT  
GAGGAATGGTTCTAAAAGGATAAGTAAGGATTAGGAATAGAATTTGCAAACCTACCTTAT  
TTAATAGATGGAGATTTAAAATTAACCGAAAGCCACGCAGTAAATCTGTACATTATAAGA  
AAGAGCGGCAAGAATGAATTGCTAGGAACTAATCTGATCGAGGAATCTAAAATTAGAGAG  
CTTATTGGATATTTAGAAGATTTTTTCAGATAAATATTAACCTTTGTGCTTTAATCCTTAA  
TTTAGTATCATTAAAGTAACAAAAGTATAATGATGACTTTAGCCTAAGATTGCAAAGATTG  
GAAAATCAGCTCACTAAAGACAACGAAAATGGCTTAATGGTCAATCACTTAGCCTTCTCT  
GATTTTATATCTATGAAATTAGTTAATACATTAAAGGAATCTATCCCGAAGAATTTAAA  
AAACTGCCAAAAATCTAAGCCTTCCAAGCCCGTTTTGAAGAAATGAGTAAATATAAGAC  
TATATGATGTCTGAAGAGTACATTTATGCTCCATTCTTAGCAGTTGGTCATGGAGCCTAA  
TGGACTGGCTTAAAATAAAAATGA

---

**Açık okuma çerçevesi:**

>54.m00209

ATGGCTGAAAAAATTAGATTACATTAGGGTATTGGAATATAAGAGGTTTAGGTTAGCTA  
AGCAGATATCTTCTGAATACACTGGTCTTAAGTACAAGGAAAAGAGATATTTAAAGCTT  
GAGGAATGGTTCTAAAAGGATAAGTAAGGATTAGGAATAGAATTTGCAAACCTACCTTAT  
TTAATAGATGGAGATTTAAAATTAACCGAAAGCCACGCAGTAAATCTGTACATTATAAGA  
AAGAGCGGCAAGAATGAATTGCTAGGAACTAATCTGATCGAGGAATCTAAAATTAGAGAG  
CTTATTGGATATTTAGAAGATTTTTTCAGATAAATATTAACCTTTGTGCTTTAATCCTTAA  
TTTAGTATCATTAAAGTAACAAAAGTATAATGATGACTTTAGCCTAAGATTGCAAAGATTG  
GAAAATCAGCTCACTAAAGACAACGAAAATGGCTTAATGGTCAATCACTTAGCCTTCTCT  
GATTTTATATCTATGAAATTAGTTAATACATTAAAGGAATCTATCCCGAAGAATTTAAA  
AAACTGCCAAAAATCTAAGCCTTCCAAGCCCGTTTTGAAGAAATGAGTAAATATAAGAC  
TATATGATGTCTGAAGAGTACATTTATGCTCCATTCTTAGCAGTTGGTCATGGAGCCTAA  
TGGACTGGCTTAAAATAAAAATGA

---

**Protein uzunluğu:**

>54.m00209

MAEKNIITLGYWNIIRGLQLSRYLLEYTGLKYKEKRYQKLEEFQKDKQGLGIEFANLPY  
LIDGLKLTESHAVNLYIIRKSGKNELLGTNLIEESKIRELIGYLEDFRQILTLFCFNPQ  
FSIIKQKYNDLDFSLRQLRLENQLTKDNRKWLNGQSLSLPDFIFYEISQYIKGIYPEEFK  
KLPKIQAFQARFEEIEQIQDYMMSEYIYAPFLAVGHGAQWTGLKQK\*

**TTHERM\_00516440**

**Genomik dizi uzunluğu:**2482

**Açık okuma çerçevesi:** 1170

**Protein uzunluğu:** : 389

---

**Genomik dizi uzunluğu:**

>64.t00084

ATGAATATCTTGAAGAATAACTTTAAATTGGCTTGCCTATAGGAGCTGGGATCACTGGT  
ATAGTATCTGGTATCTATTGGTATCATGGTGCTTTTTCTGATATAGAGTTTAGAGATTCA  
AAGTATGGTCCTTATGATTTCTGCTACTATAAGAGAGTAGGAAGCTATTAACTTTAGGT  
AGTGAATGGTCAAAGATGAGTAATGAAGTTCAAAAATAGTTTAGCAGCTGTACATTTTATT  
GGCATATACTACGATAACCCTGAACAGCTAAAAGATCCAAATCAAGCAAGAGCAGCTCTT  
GGTTTTGCTGTTGGAACTGTGAAAAGGATAAGATTAAGGCTTTCTTAGATAGTCACCCA  
AATTACAAATTTACTGAGCTTCCCTGAAGTGCAAAGTCATTCTACGAGCTTCCCTTCAA  
TCTTATTTTTCATTTAAAATAGTAAAAGATAAAAATATATCCCAAAGTAAGAGACTTTGTA  
TTTGAGAAAAAACTTAAATCATATTGTTTAAATAGAGCTTACTTATTTTAGGTTAAAAAT  
AAAAAATAAAATTTGATATCCCCATTGGAAATAATTCATAAAGCTACTTATTATTTTGA  
TTGAATATAGTTAGAAGGTATATATATAAAACTTCTACTAATACAAATATAATCAAT  
CAAAGACTCTATATAATTATATATAGAATAGAATAGATCATTATTATATTTTTTCATAAAC  
TATTGATTAGTATAAACATATTTTATAAATACATTTATTTTGCTTATTTTTTTTTGAAT  
TTTATCATTAAAGTCTTATTATTTATAAAAATCTATTTTAAATAGTTTTCAAACACTT  
TGAAAAATAATAAATGGATTGAAAAATATAATCTGAATCCTTTTCAATAAATAAAATTT  
AGATAAAAAGTAGAATATATTTGAGATATTTATATAAACTATATTTGTAATTAAGAA  
AATTTAATTTTATTTTAAATTTTAAATTTAGATATGAAAATATTATCAAAAAATGTT  
AAAGGTGTTTATAGTCTTACTTTCTAATTAGTATGAATTTAACAATTTAATACATATAT  
AAAGACGATTTTCTTTGATTGAAAAAGAAATAGAAATATAGAGTTGTTTAGGAGATAAA  
AAATTTCTTTTAAATTTATTTATCTTAAAATATTACAATTTTATAATAAAATTTGTT  
TTGAATATCTTAAATATTTTAAACTTTGATATTTAAAATGAAAATATTGGAAGCCTT  
TTTAGTCTTTTCTTCTAATTAGTATGAATTTAACAATTTAAAATTTGTAAGCCTATTT  
TCTTTTAGGTTTATCTTGAGTAAATAGAACTATAGAGTAGTTAGGGAGATATAAAAT  
TTATTTTAACTTACTTTATCTTAAAGAAGAACCTTTATATAATAAAATTTGCTTTAAG  
AAAAATGCTTAAAGATACTAAAATATTTTAAAATAGATTTTCAATTTAAAATATCTTTT  
TTATTTTATTTAAATTTTCTAGAACTACTTTTGTAATCTTCTTTTTTTTTCTAAGAAAT  
ATTAAGCTTAAAGATTTTGAATAAATAAAATTAAGCGCAATTTTTGATAATTTAGAGGA  
AAATACAAAATAATTTATTTCTCTCGAATAGATATTTTAAATTTATCAGAAATCATTCT  
TCTATATTTCTGTTATTCGCTTTAAAATGAATAAATAATTTATTTAAAATATATAATA  
AATATTAATAAAAAACAATCAAATAATTTAAATAGCATGATAATCCTTGGTTACTGGAA  
TCTAAGAGGCTACGCTTAACCTATTTCGTCTCCTCTAGAATATTGTAAGTAGATTATAA  
GGAAAACTTTATACTAAGATGGAGAAGAATGGTTAAATGTTGATAAATAAATAACTTAA  
AACTAATTTCCCTAACTTACCTTATATAATTGATGGAGATATTGTTGTAACAGAATCAA  
AGTTATTCCTATTACTTGGCCAAGAAATCAAATAATATGAGCTTATTGGCTAAAATCC  
TGATGGGTCTTTAATTTGAATGAAATTACATTCCTTTAAATCTTAGAAATTTTGAAAGA  
ACTCAGAGATTCGTTATTGAATTCAGCAAAAAGTACCATCTTTCAAAGAAGAAAAAGATTA  
AATTTTCAATGAAAATTCAACATTAATTTGAGGTATTGAAATACAATTTTTTTAATTT  
ACTAAATATTTAATTTATTTATAAACATAGAAAATAAAGAAACAACCTTGGAGAGAACAA  
ATACCTGCTTGGAAATCTTTCATTTATAGATTTCTATTTTTATGAAGTTTGAATTTTT



CTAATTCCTTTATCCAAAACCTTCAATCTTTACCGACTATATTGATAGAATAGAAAATAT  
TCCTCAAATAAAAACTATCTTGAAACAAAAGAAAACAAAATCTTTATTCTTGATAGAAT  
GAAAAGCTATTTTTATTATTGA

---

**Açık okuma çerçevesi:**

>64.m00216

ATGAATATCTTGAAGAATAACTTTAAATTGGCTTGCCTATAGGAGCTGGGATCACTGGT  
ATAGTATCTGGTATCTATTGGTATCATGGTGCTTTTTCTGATATAGAGTTTAGAGATTCA  
AAGTATGGTCCTTATGATTTTCGTCTACTATAAGAGAGTAGGAAGCTATTAACCTTTAGGT  
AGTGAATGGTCAAAGATGAGTAATGAAGTTCAAAAATAGTTTAGCAGCTGTACATTTTATT  
GGCATATACTACGATAACCCTGAACAGCTAAAAGATCCAAATCAAGCAAGAGCAGCTCTT  
GGTTTTGCTGTTGGAAACTGTGAAAAGGATAAGATTAAGGCTTTCTTAGATAGTCACCCA  
AATTACAAATTTACTGAGCTTCCTGAAGTGCAAAGTCATTCTACGAGCTTCCCTTCAA  
TCTTATTTTTTCATTTAAAATAGTAAAAGATAAAAATATATCCCAAATATGAATTTAACAAT  
TTAAAAATTGTAAGCCTATTTCTTTTAGGTTTATCTTGACATGATAATCCTTGGTTAC  
TGGAATCTAAGAGGCTACGCTTAACCTATTCGTCTCCTTCTAGAATATTTGTAAGTAGAT  
TATAAGGAAAACTTTATACTAAGATGGAGAAGAATGGTTAAATGTTGATAAATAATA  
CTTAAAACTAATTTCCCTAACTTACCTTATATAATTGATGGAGATATTGTTGTAACAGAA  
TCAAAAGTTATTCTATTTACTTGGCCAAGAAATTCAAAAATTATGAGCTTATTGGCTAA  
AATCCTGATGGGTCTTTAATTGAAATGAAATTACATTCCTTTAAATCTTAGAAATTTG  
AAAGAACTCAGAGATTCGTTATTGAATTCAGCAAAAGTACCATCTTCAAAGAAGAAAA  
GATTAATTTTCAATGAAAAATTCACATTACTTTTGAGAAAATAAAGAAACAACTTGGA  
GAGAACAAATACCTGCTTGAAATCTTTCATTTATAGATTTCTATTTTTATGAAGTTTG  
AAATTTTTCTAATCTTTTATCCAAAACCTTCAATCTTTACCGACTATATTGATAGAATA  
GAAAATATTCCTCAAATAAAAACTATCTTGAAACAAAAGAAAACAAAATCTTTATTCTT  
GATAGAATGAAAAGCTATTTTTATTATTGA

---

**Protein uzunluğu:**

>64.m00216

MNLIKNNFKLACAIGAGITGIVSGIYWHGAFSDIEFRDSKYGPYDFVYKRVGSYQTLG  
SEWSKMSNEVQKQFSTVHFIGIYYDNPEQLKDPNQARAALGFAVGNCEKDKIKAFLDShP  
NYKFTelPEVQSHSTSFpFKSYFSFKIVKDKIYPKYEFNNLKIVKPIFFQVYLDMIILGY  
WNLRGYAQPIRLLLEYLQVDYKEKLYNQDGEELNVDKQQLKTNFNLPIIIDGDIVVTE  
SKVIPiYLAKKFKNYELIGQNPdGSFNlNEITFLQILEILKELRDSLlNSAKVPSFKEEK  
DQIFNEKFNITFEKIKQLGENKYLlGNLSFIDFYFYEVlKFFQFFYPKLSIFTDYIDRI  
ENIPQIKNYLETkENKIFILDRMKSYFY\*

**TTHERM\_00661630**

**Genomik dizi uzunluğu:**1503

**Açık okuma çerçevesi:** 735

**Protein uzunluğu:** 244

---

**Genomik dizi uzunluğu:**

>98.t00052

ATGAATGAATTA AAAAGATAAAGATTTTTAGATATGACTTTTCTTAGCATTAAATAAAC  
AAAAAATAATAAAAAGTATTCAAAAATAATCTTAAATTTATCTAAGATAATTTTTTTA  
AATATATATTAATTTTTATTGATTGTTTCATATTTATGGGTATGATTTTTTCTTACCTTG  
TTACATAATTTAGATGCAAAATATAGAGCTACAAAAGTTTAGACATTTTCATTAATAATTA  
TCATGGATAAGATTTTTTTTTAAATTTACTGAATTAATAAAAAATTAATTTAAAAAAG  
CTTTTTGAAGAATTTACAAAAATAACTCAAACAAAATTTATTCATATTCATGAATGCAAA  
ACTAAAAAATTTATTTTTGCTTGAAGATCCAAGAGTATGCTAATATAATTATTAAGGT  
AACACTCAAATTAATAATAATGATAAAAAATCATAATCAACCATAAATTAATTAATTT  
TTATAAAAGTAACAAAATTTTTTTAATTTTCTGGCGATTTCTGGGAACGGATTACT  
TGTAATAAATTTAATTAGATAAATGAAACTAAAAAGGATCTTTCTTTATTAAGAATA  
TTATTCGCTGATTTAATTAATTTCTAAAAATGGAAAACAATCTATAAAATCTTAAATAATT  
ACTAATTTAATTTAATTTAATTTTTAAGTTCTTTAATTTTTCTAATTTCTCATTAAAT  
AGCAAATAGAAAATCTGTAGTTAGCTTTTTAATATAAAATATTGTAATTAATTTCAAGA  
TTTTAAAAAATCAAAACAAGATAAACTTAATATAAAAGCTCAAGATTTATGATAACT  
CTAGGATATGGGGAGTTAGAGGTTTAGGAGAATCTGTTAGATATTTACTTGCCTATTTA  
AATGTAGATTATAAACACTAAGCTTATTATAATCCTTAAGATTGGTTTGCTAAGGACAAG  
GCTTAACTTAAATAGAGTTTTCAAATCTCCCTATCTAATAGATGGAGAGTAGAAAATT  
ACTGATTCCTATGCAATATCGATCTACATCATAAGAAAGTATCATAGAGAAGACTTATTA  
GGATATTCAGAAGACGGAAGCTACAATGAAAGAGAAGTAAAAATTGCTTAGCTAATCGGC  
GTTACAAGAGATATATTTAATAAATAGTACATATCTGTTTCAGCCCTTAATTTGATAAG  
ATAAAGGATTAGGCTTTCGAAAAAGGACAAATATTTCTCAATCAGCTAACTGATTTTCTT  
GGTGACAAACAATTTTTACTTGGTCATTTAAGTTTAGCAGATTTTCTGTTTTATGAAGCA  
CTCATTATTATTAAGTCCTTCAATCTTAATCTATTACCTAAAGGCATGAAGAGTATATG  
CATTAATTTGAAAGCTTCCGGTATTAATAATATTTAACTATGCTAGCAAAAATTT  
AATTCGTTTTGTAAATTTAAAGTAATAGTAACAGTAATAACAATAAAAAATTTCTTTA  
TGA

---

**Açık okuma çerçevesi:**

>98.m00151

ATGAATGAATTA AAAAGATAAAGATTTTTAGATATGACTTTTCTTAGCATTAAATAAAC  
AAAAAATAATAAAAAGATATGGGGAGTTAGAGGTTTAGGAGAATCTGTTAGATATTTA  
CTTGCCTATTTAAATGTAGATTATAAACACTAAGCTTATTATAATCCTTAAGATTGGTTT  
GCTAAGGACAAGGCTTAACTTAAATAGAGTTTTCAAATCTCCCTATCTAATAGATGGA  
GAGTAGAAAATTACTGATTCCTATGCAATATCGATCTACATCATAAGAAAGTATCATAGA  
GAAGACTTATTAGGATATTCAGAAGACGGAAGCTACAATGAAAGAGAAGTAAAAATTGCT  
TAGCTAATCGGCGTTACAAGAGATATATTTAATAAATAGTACATATCTGTTTCAGCCCT  
TAATTTGATAAGATAAAGGATTAGGCTTTCGAAAAAGGACAAATATTTCTCAATCAGCTA  
ACTGATTTTCTGGTGACAAACAATTTTTACTTGGTCATTTAAGTTTAGCAGATTTTCTG  
TTTTATGAAGCACTCACTTATTATTAAGTCCTTCAATCTTAATCTATTACCTAAAGGCAT

GAAGAGTATATGCATTAATTTGAAAGTCTTCTGGTATTAATAATATTTAAACTATGCT  
AGCAAAAACCTTTAATTCGTTTTTGTAAATTTAAAGTAATAGTAACAGTAATAACAATAA  
AAAATTTCTTTATGA

---

**Protein uzunluğu:**

>98.m00151

MNELKRQRFFRYDFSQHQINKKIIKRYWGVRLGESVRYLLAYLNVDYKHQAYYNPQDWF  
AKDKAQLKIEFSNLPYLIDGEQKITDSYAISIYIIRKYHREDLLGYSEDGSYNEREVKIA  
QLIGVTRDIFQQIVHICFSPQFDKIKDQAFKGGQIFLNQLTDFLGDKQFLGHLSDLADFL  
FYEALTYQVLHSQSITQRHEEYMHQFESLPGIKQYLYASKNFNSFLNLKQQQQQQQQ  
KISL\*

**TTHERM\_00077560**

**Genomik dizi uzunluğu:** 629

**Açık okuma çerçevesi:** 498

**Protein uzunluğu:** 165

---

**Genomik dizi uzunluğu:**

>5.t00148

ATGAAATCATAACTTTTATTTGGGTCCTGGATTAAAGAGGAAATGCTATGCCTATAAGA  
TTTCTTTTAGAATATACCTAAACCAATTATAATGAAAAATATATTATTCAGAAAATGAG  
AGTGAGTGGTTTTAAAAAGATTAAAAATAATCAAACAATTTGCAAATTTGCCCTACATT  
ATAGATGGAGATTTAAATTAACAGATGTACAACTATTATGAGATATATAGCAAAACGT  
AATTCTAATTATATCTAATTGCTTGGTTAAGGACATGGAAACGATGAAGACAGAATTAAC  
TAGATTAATCTTGTAATATCTGAAATAGGACTTTATGTTAAAGAACAATTTTTAATCCA  
AAGGTTTCATGAAGAAAAAGAGATTTCTAAACAGATGCTAAAAAAATTTGGAAGTTT  
GTTAACATAAGAGGTAATAAATTTATTTTCTTATGTAACCACAGCTGATTTAAT  
TTAGTTGAGCTTCTTTTGCATTATAAATGTTTAGACAATGAACTTTTGAAAAAATCTT  
CCCAGTTTAAATGAATATATATAGCATTTTTACAATTTACCGGCAATTAAGATTACACA  
ATAACAGAAAAGATATTAGATGCATACTGA

---

**Açık okuma çerçevesi:**

>5.m00453

ATGAAATCATAACTTTTATTTGGGTCCTGGATTAAAGAGGAAATGCTATGCCTATAAGA  
TTTCTTTTAGAATATACCTAAACCAATTATAATGAAAAATATATTATTCAGAAAATGAG  
AGTGAGTGGTTTTAAAAAGATTAAAAATAATCAAACAATTTGCAAATTTGCCCTACATT  
ATAGATGGAGATTTAAATTAACAGATGTACAACTATTATGAGATATATAGCAAAACGT  
AATTCTAATTATATCTAATTGCTTGGTTAAGGACATGGAAACGATGAAGACAGAATTAAC  
TAGATTAATCTTGTAATATCTGAAATAGGACTTTATGTTAAAGAACAATTTTTAATCCA  
AAGGTTTCATGAAGAAAAAGAGATTTCTAAACAGATGCTAAAAAAATTTGGAAGTTT  
GTTAACATAAGAGCATTTTTACAATTTACCGGCAATTAAGATTACACAATAACAGAAAG  
ATATTAGATGCATACTGA

---

**Protein uzunluğu:**

>5.m00453

MKSQLLFQSWIQRGNAMPPIRFLLEYTQTNYNEKIYYSENESEWFQKDQKQKQFANLPYI  
IDGDLKLTVDVQTIMRYIAKRNSNYIQLLGQGHGNDREDRINQINLVISEIGLYVKEQFFNP  
KVHEEKRDFLNRCQKFGSFVNIRAFQFTGNQRLHNNRKILDAY\*

**TTHERM\_00247000**

**Genomik dizi uzunluğu:**1650

**Açık okuma çerçevesi:** 1173

**Protein uzunluğu:** 390

---

**Genomik dizi uzunluğu:**

>21.t00135

ATGTAAGTTGCTCCATTTTGCTTATTCGCTGTCAACTCGTTTGTTACAAAAATTTTCAA  
GGGAAAGTTATTTACAACAAGAATCATGTTAGAGCTCTAGTTCATCCAGTCCTTTTATAC  
CAATAAAATGATGACCCTATTCTAATGAAATTATACAGAGAAAATTTTGTATACAACA  
GCTTGGTAAATGTTAATTAATAGAAAATATTACTGATTTATTATTTTTGTAATTTCCCA  
ATTAATTAATTTCTTCTATTTTTTTAATTATAATAATTTCTATTACATATTACTATG  
AATTAATAATTAAGATAGATTATTAGATATTATTAATTTTATAAAATAGCTTTAGAATTA  
CATTATTTTACTTAAATAAAATGTTTAGGATAGAAAAGATAATAAAATAAAATAAAAT  
AAAATAAAAAAATTTACAAAATAAATATTTATTTTTTCATTTTTTAATAAATTTCAA  
TAGGTATCAATAGAATTCTACTACTATAGATGGTTAGATAGTGAGGCTTAATAATTAAT  
TCTAAATATGTATAAACTAACTCCCTTGATGAGAGCTATATAAAACGAAAATAAATTTAA  
TCCAGGTTAAAGTACAGATTATCTTCTCTTAATTAAGTGGGTTTTGGATTTCGAGTTCGA  
AGGATTGATGTTTATGAATTTTCTTAATAGTTCTATGAGTAAAGTGGACGTACCAGGGTG  
TTACTAAGGAAAGTTTTATTTATGATCCTAGATGTAACTTTGGTATCTTGATGCTTCTAA  
ATTTCTTCGTTTTCTATATTACAACCAAGAATAACAATAACTCCTCCTCAAGCCCATAT  
TTCTCAGTAAGAGTGTTAAAGAGTTAGACATTACAACCTCAACTACTAAAAAAACGAGCT  
TAAACATATAGTGTGCTTAGATGTCATTCTATCCACTTGATGATTTATTTAGCAATGT  
AGTTAAATCTACTAAATAATATTATATCATAGATCCTAGATCATAATCAATAATCTATAA  
TTCAAAAAAGGATTTTTCGTTCGATCAATTATAAATTGATAATTTTTCTGATTTAGAGCT  
TACATTTCTATAATCATAAGATGATGCAAACTACTTAATGATACTATTAATAAATACTA  
CAACACATGGTCACTTGACTAGCTGCCTTATGCAGATAGTTAAAATTTATTTAATTATAC  
TAATTAATATAAATTAATCCCTACAATAGAAATGGTACTTTGCATTAGGTTATTTTGAA  
TCCAATTATTTAAGATAGAATTCCTTATTACATAAGTGAAGTAGAAAAAGTTTATGG  
AACATAAATGAGTTTAGCATACTTATAAATAAATATGATTTCAAATGAAGATTGTAAATA  
ATAATCACAAAGATCTCTTAAAGCTTTAAAATCTTATATAGTTGACTGTTAGCATAATTTT  
ATTAGTGTTAAGCTTAATTTCAATATTTATTTCTATTTATTATGCACTACAAAATTTTAA  
CCTGGTTAATAGCCTATTTACATCTTTGCTCAATTTTAAAGAAAATTCAGAGACAAAA  
TAAACATTGTGACATGCAATAAATTTGTCAGTAGTATGAAAATAGGGCGACGGAGATTTT  
TCTATCACAAGAAACGAAGGAACCTCTATGA

---

**Açık okuma çerçevesi:**

>21.m00326

ATGTAAGTTGCTCCATTTTGCTTATTCGCTGTCAACTCGTTTGTTACAAAAATTTTCAA  
GGGAAAGTTATTTACAACAAGAATCATGTTAGAGCTCTAGTTCATCCAGTCCTTTTATAC  
CAATAAAATGATGACCCTATTCTAATGAAATTATACAGAGAAAATTTTGTATACAACA  
GCTTGGTATCAATAGAATTCTACTACTATAGATGGTTAGATAGTGAGGCTTAATAATTA  
ATTCTAAATATGTATAAACTAACTCCCTTGATGAGAGCTATATAAAACGAAAATAAATTT  
AATCCAGGTTAAAGTACAGATTATCTTCTCTTAATTAAGTGGGTTTTGGATTTCGAGTTC  
GAAGGATTGATGTTTATGAATTTTCTTAATAGTTCTATGAGTAAAGTGGACGTACCAGGG  
TGTTACTAAGGAAAGTTTTATTTATGATCCTAGATGTAACTTTGGTATCTTGATGCTTCT

AAATTTCCTTCGTTTTCTATATTACAACCAAGAATAACAATAACTCCTCCTCAAGCCCAT  
ATTTCTCAGTAAGAGTGTAAAAGAGTTAGACATTACAACCTCAACTACTAAAAAACGAG  
CTTAAACATATAGTGTGCTTAGATGTCATTCTATCCACACTTGATGATTTATTTAGCAAT  
GTAGTTAAATCTACTAAATAATATTATATCATAGATCCTAGATCATAATCAATAATCTAT  
AATTCAAAAAGGATTTTCGTTTCGATCAATTATAAATTGATAATTTTTCTGATTTAGAG  
CTTACATTTCTATAATCATAAGATGATGCAAACTACTTAATGATACTATTAATAATAAC  
TACAACACATGGTCACTTGACTAGCTGCCTTATGCAGATAGTTAAAATTTATTTAATTAT  
ACTAATTAATATAAATTAATCCCTACAATAGAAATGGTACTTTGCATTAGGTTATTTG  
AATCCAATTATTATTTAAGATAGAATTCCTTATTACATAAGTGAAGTAGAAAAAGTTTAT  
GGAACATAAATGAGTTTAGCATACTTATAAATAAATATGATTTCAAATGAAGATTTGTAA  
TAATAATCACAAGATCTCTTAAAGCTTTAAAATCTTATATAGTTGACTGGCGACGGAGAT  
TTTTCTATCACAAGAAACGAAGGAACCTCTATGA

---

**Protein uzunluğu:**

>21.m00326

MQVAPFCLFAVNSFVTKIFQGKVIYNKNHVRALVHPVLLYQQNDPILMKLYRENYLYTT  
AWYQQNSTTIDGLDSEAQQILINMYKLTPLMRAIQENKFNPGQSTDYLPNQVGFGEF  
EGLMFMNFLNSSMSKVDVPGCYQGKFIYDPRCKLWYLDASKFLSFSILQPRITITPPQAH  
ISQQEQVRVRYNSTTKKNELKHIVCLDVLSTLDDLFSNVVKSTKQYYIIDPRSQSIY  
NSKKDFSFDQLQIDNFSDELELTFLQSQDDAKLLNDTINNNYNTWSLDQLPYADSQNLFN  
TNQYKLIPYNRNGLHQLVILNPIIIQDRIPYYISEVEKVYGTQMSLAYLQINMISNEDLQ  
QQSQDLLKLQNLIQLTGDGDFSITRNEGTL\*

**TTHERM\_00034950**

**Genomik dizi uzunluğu:** 780

**Açık okuma çerçevesi:** 780

**Protein uzunluğu:** 259

---

**Genomik dizi uzunluğu:**

>2.t00321

ATGAAAAACCTATTTTATATGGTTGCATAGTATGCCCTTATACAAACAAAGTAAGATTT  
GCTTTAGAAATGCTTAAAATTGACTATAAATATCAAGAAATTGACATTCCTACTGGAAAA  
AATAAAAAATAATCTTATCTATAAATTAATCCTTAAGGTAGAGTTCCTTCATTAAGTACG  
ATTAATAACAAAAATTTATATGACAGCTAAGTCTCTTATAGTACATAGAGGATGAATAT  
AAAGGTTTGTTCCTTAAGATAACTATGCTAAAGGTCTCCAAAGAATATGGGTTTAGTAC  
TTTGATAATAACATATTTTCAAATATCATCCTGCACTAGCTGCATATTAAGAAAAATAA  
TAAGACTTATTAATAAGCTATAATAAGAAACATTTGAAAAATGAAATCTTTTCATAG  
AATTCTGGAATCACATAAAAAATAAAATTAATAAAACTGTTTTATGAAGGAGGAAGC  
ATTCCTACATATGCAGATGTAGCAATAATCCTCATTAAAGAATTATGAATATATTTTGG  
AAGCACTTTTAAACAAAGATTTATCTAATCAAATAAAAAATGATGAAGATGTATTATCC  
TTAAAGCAATTATATGAAAAATACATACATTGGAAAGTTGTTAAAAATGTTCTTTTAA  
TTTAAATAAATACCAACAAAAGGAGATAACCAATTAGTTGATGATTTAATCAATAAAAAAC  
TCTTTCAATTTTAAAAATTATATTGTAAATTTTTTAAAAATTAATAAGTTAAAGTGA

---

**Açık okuma çerçevesi:**

>2.m02344

ATGAAAAACCTATTTTATATGGTTGCATAGTATGCCCTTATACAAACAAAGTAAGATTT  
GCTTTAGAAATGCTTAAAATTGACTATAAATATCAAGAAATTGACATTCCTACTGGAAAA  
AATAAAAAATAATCTTATCTATAAATTAATCCTTAAGGTAGAGTTCCTTCATTAAGTACG  
ATTAATAACAAAAATTTATATGACAGCTAAGTCTCTTATAGTACATAGAGGATGAATAT  
AAAGGTTTGTTCCTTAAGATAACTATGCTAAAGGTCTCCAAAGAATATGGGTTTAGTAC  
TTTGATAATAACATATTTTCAAATATCATCCTGCACTAGCTGCATATTAAGAAAAATAA  
TAAGACTTATTAATAAGCTATAATAAGAAACATTTGAAAAATGAAATCTTTTCATAG  
AATTCTGGAATCACATAAAAAATAAAATTAATAAAACTGTTTTATGAAGGAGGAAGC  
ATTCCTACATATGCAGATGTAGCAATAATCCTCATTAAAGAATTATGAATATATTTTGG  
AAGCACTTTTAAACAAAGATTTATCTAATCAAATAAAAAATGATGAAGATGTATTATCC  
TTAAAGCAATTATATGAAAAATACATACATTGGAAAGTTGTTAAAAATGTTCTTTTAA  
TTTAAATAAATACCAACAAAAGGAGATAACCAATTAGTTGATGATTTAATCAATAAAAAAC  
TCTTTCAATTTTAAAAATTATATTGTAAATTTTTTAAAAATTAATAAGTTAAAGTGA

---

**Protein uzunluğu:**

>2.m02344

MKPKILYGCIVCPYTNKVRFALEMLKIDYKQEIDILTGKKNNSYLQINPQGRVPSLTT  
INNKNLYDSQVLLQYIEDEYKGLFPQDNYAKGLQRIWVQYFDNNIFSKYHPALAAAYQENK  
QDLLNKLQOETFENMKFFSQNSGITQKIKLKQNCFYEGGSIPTYADVAIIPHLRIMNIFW  
KHFLNKDLFQSNKNDVLSLKQLYENIHTLESCQNVSFQFKQIPKGDNLVDDLINKN  
SFFNFENYIVNFLKIKLSQK\*

**TTHERM\_00569210**

**Genomik dizi uzunluğu:** 609

**Açık okuma çerçevesi:** 609

**Protein uzunluğu:** 202

---

**Genomik dizi uzunluğu:**

>76.t00027

ATGTCAGATAAAATTATCCTTGGTTATTGGAATACACCTGGCAAAGCTCAACCTTCAAGA  
TACTTACTTGAACATATCGGGAGTTAAATATGAAGAAGTGAGATACTTATCCTGCTGCA  
GAATGGTTTGGTAGAGACAAATATGCTTTGGGATTACCTTTTCCTAATTTGCCTTATCTC  
TTAGATGGGGAAGTAAAAATCACTGAGAGTGAAACCATTTTGGACTATTTAATTTAAAGA  
TTAAATAAAGTTGAGCTTTTAGGTTAGGGAAACGATAAAATACATTGTTGATAATCTTAAA  
AACCTGTTTTCTGATATTGGAACAAGAATGTACATTTATAGCTAGAAGGAGGGAGAAGAA  
TAACTAAATTCCTAAGTGAGTAAATCCTTCCTAAAAATAAGAGACATTCATAAATTTTAA  
GGATAAAAAGAGTACTTACTAGGATATTTTACAGCTGCTGATTTGTATTTTTATGCTTT  
GCAAAAGGTTTTAAAAATACCTTCCTGATTCTTACAATGAATTTGCTGCAACTTTTAAAT  
CCATTGATATAAAGACTTGAGAATATCCCCTAAATTGCCAAGTATATTTCTGAAGGTCGT  
CATCCATGA

---

**Açık okuma çerçevesi:**

>76.m00153

ATGTCAGATAAAATTATCCTTGGTTATTGGAATACACCTGGCAAAGCTCAACCTTCAAGA  
TACTTACTTGAACATATCGGGAGTTAAATATGAAGAAGTGAGATACTTATCCTGCTGCA  
GAATGGTTTGGTAGAGACAAATATGCTTTGGGATTACCTTTTCCTAATTTGCCTTATCTC  
TTAGATGGGGAAGTAAAAATCACTGAGAGTGAAACCATTTTGGACTATTTAATTTAAAGA  
TTAAATAAAGTTGAGCTTTTAGGTTAGGGAAACGATAAAATACATTGTTGATAATCTTAAA  
AACCTGTTTTCTGATATTGGAACAAGAATGTACATTTATAGCTAGAAGGAGGGAGAAGAA  
TAACTAAATTCCTAAGTGAGTAAATCCTTCCTAAAAATAAGAGACATTCATAAATTTTAA  
GGATAAAAAGAGTACTTACTAGGATATTTTACAGCTGCTGATTTGTATTTTTATGCTTT  
GCAAAAGGTTTTAAAAATACCTTCCTGATTCTTACAATGAATTTGCTGCAACTTTTAAAT  
CCATTGATATAAAGACTTGAGAATATCCCCTAAATTGCCAAGTATATTTCTGAAGGTCGT  
CATCCATGA

---

**Protein uzunluğu:**

>76.m00153

MSDKIILGYWNTPGKAQPSRYLLELSGVKYEYEVRSYPAAEWFGRDKYALGLPFPNLPYL  
LDGEVKITESETIFDYLIQRLNKVELLQGNDKYIVDNLKNLFSDIGTRMYIYSQKEGEE  
QTKFLSEQILPKIRD IHKFLGQKEYLLGYFTAADLYFLCFAKGFKNLTPDSYNEFAATFN  
PLIQRLNIPQIAKYISEGRHP\*



**Ek-2 *Tetrahymena* GST'lerinin benzerlik tablosu**

	Zeta	Mu	Omega	Theta
Zeta		26.8	17.4	21.0
Mu	26.8		18.6	19.2
Omega	17.4	18.6		17.8
Theta	21.0	19.2	17.8	

### Ek-3 TGD içinde bulunan GSTz'ya ait EST dizileri

>gi|18194335|gb|BM394282.1|BM394282 50072-2-2-H11.r.1 Chilcoat/Turkewitz cDNA  
(large fraction) Tetrahymena thermophila cDNA, mRNA sequence

```
GTACGGGCCCCCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTAATTTATTTTTGAATAAAAAATATGATTGAATTTA
ATTGTAATAATAATAAATTTAGTTACAAATTATAATTTAACACAAAAATATTAATAAAGATATGCTTTTA
TTTTAGATCTTTGATTATCAGGATTGTCAGCTTACTTGCTGGGTGAGGCAGCAACGAACCTCAGGAATT
TCCTTTAAATTTTTAAACTTCTGCAATATTGGGAAAGGGTTAAATCAAATTGGAATCTATCTACAA
CTCCTTGAACCTTGAGGTACCAAGAATAAGTCAGCAAGTGTATTTCATCACCAAAGCAATATTTCCATG
AGAAATCTTTTATTAATTCCTCCATTTGCTGTTCAAACCTTTAGTAACCCAAAAATTTGGAGCCCTTGGAA
TCTTGGTCTTAAGCTATATTTCCCTTTCCACTCTTTATTAAGGCACCCTCCAATTTTCAGAGAAGGTGGA
TGGGCAGTGTACTTAACTGGGGCAAAAGCCTCTTATTAAGGTTTTTTAACTGGATTTTTAGGGGAAGAA
GTGGGTGGTCAGGAAATAATCTTCCAAAAATCTAAGAATAAGCGAGCTTCCAATAATAACTTGGTATCC
ATACTTAAGCAGGACTCCCAATTAGGATGATTTAAGATATCTTCAAATTTATTCGCTTCAAAGGTTA
TGGGAATGAGTGAAACAATTTATAAATAAACTATTTAATCTCAGAAATGAGGAGGATACGTAAGAGAT
TTTTGAATTGGCTAATTTCTGTTGTCGGATACTATAATAG
```

>gi|18195972|gb|BM395919.1|BM395919 5009-0-14-B08.t.1 Chilcoat/Turkewitz cDNA  
(large fraction) Tetrahymena thermophila cDNA, mRNA sequence

```
CCGGGGGCGCCTAAAATATTATAATATTATATAAATAATCTTCAAAATTATTAATATAATAAGATATAT
ACAATAAACATATCAATTAATTTTTAAATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAATTACTCTTTACAGTTATTTTC
CGCTCCTCAACTTCATGGAGAGTAAGAATAGCTCTTAATCTTAAGAAAATAGACTACAACATCATTCCTA
TTAACCTTTTGAAGAGTGAATAAACTTCTGAAGAATATACTAAAATCAATCCTAACTAGGGGAAGTCCCC
TGGCTTTAAAGGTATGGGGAAGAGGGTTATTATTGAAAGCTCTGGTAATCTTAAAAGTTATGGAAGAAA
GTTATTTCTGGAAGCACCCATTATTCCTTAAAGATGGCGGTTAAAAGAGACTTAAATTAAGGGCTTTG
GCCAGTAATTAACACTGGCATTCAACACTCTCTTAAATTTGGAGGTGGCCTTATAAGAATGAAACAGGGA
ATTATTGCCTAGAACAGAATCAAGGGTCCAAATCCGGGGTCCACATAGGCTTGGACAGCAATGCAGCATC
TTCAAGGAATCTCTGAAAATATTGGTTGGGTGATGAAATACACTGCTGACTAATCTCGGTACCTCAAGT
CAAGAGTTGTAGATAGATCCAGTTGATTACCCCTATCCCATATGCAAAGTTAAAATTAAGGAAATCGAGT
AGTGAGCTAACAGAGAGCGAATCGAAGAAGATTGAAAAAATTTAAAATGGAGAGATCTGAGGTCCATGC
TAGTAAAAAAGGGGGCAAGACAAGAAAAGAGAAAAGAGAAGAAACAACAAGAAGAAGAGCGGACTAA
AAGATAACAGACAAAGAAAAGAACACGAGAACAAGGAAGA
```

>gi|18194710|gb|BM394657.1|BM394657 50072-2-5-C11.r.1 Chilcoat/Turkewitz cDNA  
(large fraction) Tetrahymena thermophila cDNA, mRNA sequence

```
CCTACTGCTAGCAAGGTACGGGCCCCCTCAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTTTAATTTTTTGAATTAATAAATATGATTCTGAATTATAATTGTAATAATAATAAATTTTATTT
ACAAATTATATTTTACACAAAAATATTAATAAATAATGCTTTAATTTCCAAATCTTTGGATTATCAGGAT
TGTCAGCTTACTTGCTGGGTGAGGCAGCAACGAACCTCAGGATATTCCTTTAAATTTTTTAAATTTCTG
CAATATTGGGGAACGGGGTTAAATCAAATGGAATCTATCTACAACCTCTGAACTTGAGGTACCAAGAA
TAAGTCAGCAAGTTGTATTTATCACCAAAAGCAATATTTCCCATGAGAATCTTTAATAATTTCTCAATT
GCTGTCAAACCCCTAGTAACCCAGAATTTGACCCATTGAATCTTGCTTTAGCTATATTCCTTTCAATCT
TATTAAGCACCCCTCAAATTTTAGAGAGGGTGGATGGCAGTGTAAATTAAGTGGCAAAAGCCCTCAATTTA
AGCTCTTTAACTGCATCTTAAAGGAAGAAGTGGGTGCTCAGGAAATACTTCTTCAAAAACTCTAAGATA
GCAGAGCTTTCAATAATAACCTCGTCTCCATACTTTAAAGCAGGAACTCCCTAGTAAGGATTGATTTGAG
TATATTTCTCAGAAGTTTATCACTCTTCAAAAGGTTACAGGAATGATGTGAGCTATTTCTAAGATAAG
AGCATCTTACCCAGAAGTGAAGACGAAACGTAGCGTATTTCTATCCTTCGCNTTAAATAATGATGTAAG
GAAACGCA
```

>gi|18196578|gb|BM396525.1|BM396525 5009-0-21-H09.t.2 Chilcoat/Turkewitz cDNA  
(large fraction) Tetrahymena thermophila cDNA, mRNA sequence

```
CTGAGCCACGGGGCGGGCTCTAAGGCTTGATGAGTAGGAGGGCGTGATCGTTGCCCTAGAAGTATTGG
CGGTGAGCCTATATGGAGCAGGATTAGTGCAGATCTTGGTGGTAGTAGCATTATTTATTTATTTATTTA
```

```

TTTCATTATTAATTAATTAATAAATATTTATATAAATAATCTTCAAAATATTAATAATAAAGATA
TATAACAATAAACATATCAATTAATATTTTAAATGGCTGAAAGCTCGAAGAAAATTAATCTTTACAGGTTA
TTCCGCTCCTCAACTTCATGGAGAGTAAGAATAGCTCTTAATCTTAAGAAAATAGACTAACAACATCAT
TCCTATTAACCCCTTTGAAAGAGTGAATAAACTTCTGAAGAATATACTTAAATCAATCCTAACTAGGGA
GTCCCTGCCTTCAAAGTATGAAACGAGGTTATCTTGGAAAGCTCGGTATCTAGAAGTTTGTGGAAAA
AATATCCCTGAGAACCCTCTTTCCCTTAAATGCGTTTAAAAAGCTTAAATCAAA
>gi|18195007|gb|BM394954.1|BM394954 50072-2-6-G08.r.1 Chilcoat/Turkewitz cDNA
(large fraction) Tetrahymena thermophila cDNA, mRNA sequence
TACGGGCCCCCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTATTTTTTTGAATAAAAAATGTGATTTGA
ATTTAATGTAAAAATAATAAATTTTAGTTACAAATATAATTTAACACAAAAATATAAAAAGATATGC
TTTTATTTTTCAGATCTTTTGATTATCAGGATTGTCAGCTTACTTGTGGGTGAGGCAGCAACGAACCTCAG
GAATTTCTTTAAATTTTTTAAACTTCTGCAATATTGGGAAAGGGTTAAATCAAAATGGAATCTATC
TACAACTCCTTGAACCTGAGGTACCAAGAATAAGTCAGCAAGTGTATTTCATCACCAAAGCAATATTTT
CCATGAGAATCTTTAATAATCTTCAATGCTGTCAAACCCTTAGTAACCCAGAATTTGAGCCATTGAA
TCTTGTCTTAGCTATATCCTTTTCAATCTTATTAAGCACCCCTCAAATTTAGAGAGGGTGGATGGCAGT
GTTAATTAATGGCAAAAGCCTCTAATTTAAGCTCTTTAACTGCATCTTAAGGAAGAAGTGGGTGCTCA
GGAATACTTCTTCCAAAACTCTAAGATAGCAGAGCTTCAATAATAACCTCGTCTCCATACTTTAAAG
CAGGGACTCCCTAGTTAGGATTGATTTTAGTATATCTTTCAGAAAAGTTATTCACTCTTCAAAGGTTATA
CGAATGATGTTGTAGCTAATTTCTTAGAAAATAGAGCTATCTTATCTCCAGGAATTAGGACCGAAATCTG
TAAGGGATTCTTTGCGCTCGCCCTTAAATTTATGATGTCAGAATCTTATAATAATGAATTTATAACGCC
AGGGACGAGTCCCTAGTAGCCGAGAAGTGGTATCCACAAGATGGTCTGCCGAGATCGNNNNNGGG
GGTG
>gi|18197392|gb|BM397339.1|BM397339 5009-0-31-C08.t.1 Chilcoat/Turkewitz cDNA
(large fraction) Tetrahymena thermophila cDNA, mRNA sequence
ACAAGCTGAGCCACGCGGTGGCGGCGCTCTAATAATAAATCTTCAAATATTAATAATAAAGATA
TATAACAATAAACATATCAATTAATATTTTAAATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAATTAATCTTTACAGTTAT
TTCCGCTCCTCAACTTCATGGAGAGTAAGAATAGCTCTTAATCTTAAGAAAATAGACTACAACATCATTCT
CTATTAACCTTTTGAAGAGTGAATAAACTTCTGAAGAATATACTAAAATCAATCCTAACTAGGGAGTCCC
TGCTTTAAAGTATGGAGACGAGGTTATTATTGAAAGCTCTGCTATCTTAGAGTTTTTGAAGAAGTATCT
CCTGAGCACCCACTTCTCCTTAAGATGCAGTTAAAAGAGCTTAAATTAGAGGCTTTTGCCAAGTAATAA
ACACTGCCATCCACCCTCTCTAAAATTTGAGGGTGCCTAATTAAGATTGACCAGGGAATATAGCTAAAAC
AAGATCCATTGGCTCAAATTTGGGTTACTAGGGGTTGACAGCAATTGACGAATTTACAGAATTTCTC
ATGAAAAATATTGCTTGGGTGGATGAAATAACACTTGCTGACTTATTCTTGGTACCTCAAGTTCAAGGAG
TGGTAGATAGATTCCCATTTGATTTAACCCCTTTCCCAATATTGCAGAAGTTAAAACAATTTAAGGAA
ATCCTGAGTTCGTTGCTGCATCACCAGCAAGTAGCTGACAACTGATATCAAAGATCTGAAATAAAGCTA
TTTTAAAATGCGTGTAATATAATGTA
>gi|18200704|gb|BM400651.1|BM400651 5009-0-77-A08.t.1 Chilcoat/Turkewitz cDNA
(large fraction) Tetrahymena thermophila cDNA, mRNA sequence
AACGAGCCACGCGGGCGGCGCTAAAANTCTTCAAATATTAATATATAAAGATATATACAATAAAC
ATATCAATTAATATTTTAAATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAATTAATCTTTACAGTTATTTCCGCTCCTCA
ACTTCATGGAGAGTAAGAATAGCTCTTAATCTTAAGAAAATAGACTACAACATCATTCTATTAACCTTT
TGAAGAGTGAATAAACTTCTGAAGAATATACTAAAATCAATCCTAACTAGGGAGTCCCTGCCTTTAAAGTA
TGGAGACGAGGTTATTATTGAAAGCTCTGCTATCTTAGAGTTTTTGAAGAAGTATTTCTGAGCACCCA
CTTCTTCTTAAGATGCAGTTAAAAGAGCTTAAATTAGAGGCTTTTGCCAAGTAATTAACACTGCCATCC
ACCCTCTCTAAAATTTGAGGGTGCCTAATAAGATTGAAAAGGAATATAGCTAAGACAAGATTCAATGGCT
CAAATCTGGGTTACTAAGGTTTGACAGCAATTGAAGAATTATTAAGAATTTCTCATGGAAAATATTGC
TTTGGTGATGAAATAACACTTGCTGACTTATTCTTGGTACCTCAAGTTCAAGGAGTTGTAGATAGATTCC
AATTTGATTTAACCCCTTTCCCAATATTGCAGAAGTTTTAAAAATTTAAAGGAAATTCCTGAGTTCGT
TGCTGCCTCACCCAGCAAGTAAGCTGACAACTCTGATAATCAAAGATCTGAAAATAAAGCATATCTTT

```

TTAATATCTTTGTGTTAAATTATACTCTGTAACATAAAATTTTTATTTTTACAATTAATTCACATCATAA  
 AAAAAAAAAAAAAAAGAAA

>gi|18195006|gb|BM394953.1|BM394953 50072-2-6-G08.f.2 Chilcoat/Turkewitz cDNA  
 (large fraction) Tetrahymena thermophila cDNA, mRNA sequence

TAGTCCGCGGTGGCGGCTCTAATATAATATCTTCAAATTTANNTAAATAATAAAGATATATACAATA  
 AACATATCAATTAATATTTTAAATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAATTACTCTTTACAGTTATTTCCGCTCC  
 TCAACTTCATGGAGAGTAAGAATAGCTCTTAATCTTAAGAAAATAGACTACAACATCATTCTTATAACC  
 TTTTGAAGAGTGAATAAACTTCTGAAGAATATACTAAAATCAATCCTAACTAGGGAGTCCCTGCTTTAAA  
 GTATGGAGACGAGGTTATTATTGAAAGCTCTGTATCTTAGAGTTTTTGAAGAAGTATTTCTGAGCAC  
 CCACCTTCTCTTAAGATGCAGTAAAAGAGCTTAAATTAGAGGCTTTTGCCAAGTAATTAACACTGCCA  
 TCCACCCTCTCTAAAATTTGAGGGTGTCTAATAAGATTGAAAAGGAATATAGCTAAGACAAGATTCAATG  
 GCTCAAATTCGGGTTACTAAGGGTTGACAGCAATTGAAGAATTATTAAGAATTCTCATGGAAAAATAT  
 TGCTTTGGTGATGAAATAACACTTGCTGACTTATTCTTGGTACCTCAAGTTCAAGGAGTNGTAGATAGAT  
 TCCAATTTGATTTAACCGCTTTCCCAATAATGCAGAAGTTTTAAAAAATTTACGGAATTTCTGAATTC  
 GTGGTGGCTAACAGCAGGTAAGTGAATCTGAAATCAAGGATTGAATTAAGCTATCTTTAAATTCGGGG  
 ACAAATGGACACATTTTTCCGCGGCTCTTTCCTTTT

>gi|18192570|gb|BM392532.1|BM392532 50071-2-1-H11.f.1 Chilcoat/Turkewitz cDNA  
 (small fraction) Tetrahymena thermophila cDNA, mRNA sequence

TTTTTGGGAAAAAGCGCCTCTTCGCGGTGGCGGCGCTCTAAATTAATTAATAAATATTTATATAAAT  
 AATCTTCAAATTTATAAATAATAAAGATATATACAATAAACATATCAATTAATATTTTAAATGGCTG  
 AAAGCTCAAAGAAAATTACTCTTTACAGTTATTTCCGCTCCTCAACTTCATGGAGAGTAAGAATAGCTCT  
 TAATCTTAAGAAAATAGACTACAACATCATTCTTAACTTTTGAAGAGTGAATAAACTTCTGAAGAA  
 TATACTAAAATCAATCCTAACTAGGGAGTCCCTGCTTTAAAGTATGGAGACGAGGTTATTATTGAAAGCT  
 CTGTATCTTAGAGTTTTTGAAGAAGTATTTCTGAGCACCCTTCTTCTTAAGATGCAGTTAAAAG  
 AGCTTAAATTAGAGGCTTTTGCCAAGTAATTAACACTGCCATCCACCCTCTCTAAAATTTGAGGGTGTCT  
 AATAAGATTGAAAAGGAATATAGCTAAGACAAGATTCAATGGCTCAAATTCGGGTTACTAAGGGTTTGA  
 CAGCAATTGAAGAATTATTAAGAATTCTCATGGAAAAATTTGCTTTGGTGATGAAATAACACTTGCTGA  
 CTTATTCTTGGTACCTCAAGTTCAAGGAGTTGTAGATAGATTCCAATTTGATTTAACCCCT

>gi|18192945|gb|BM392892.1|BM392892 50071-2-2-H11.f.1 Chilcoat/Turkewitz cDNA  
 (small fraction) Tetrahymena thermophila cDNA, mRNA sequence

ACCGGGTCCCCGCGGTGGCGGCGCTCTAAAAATATTAATATAATAAAGATATATACAATAAACATA  
 TCAATTAATATTTTAAATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAATTACTCTTTACAGTTATTTCCGCTCCTCAACT  
 TCATGGAGAGTAAGAATAGCTCTTAATCTTAAGAAAATAGACTACAACATCATTCTTATAACCTTTTGA  
 AGAGTGAATAAACTTCTGAAGAATATACTAAAATCAATCCTAACTAGGGAGTCCCTGCTTTAAAGTATGG  
 AGACGAGGTTATTATTGAAAGCTCTGTATCTTAGAGTTTTTGAAGAAGTATTTCTGAGCACCCTTCT  
 CTTCTTAAGATGCAGTTAAAAGAGCTTAAATTAGAGGCTTTTGCCAAGTAATTAACACTGCCATCCACC  
 CTCTCTAAAATTTGAGGGTGTCTAATAAGATTGAAAAGGAATATAGCTAAGACAAGATTCAATGGCTCAA  
 ATTCTGGGTTACTAAGGGTTGACAGCAATTGAAGAATTATTAAGAATTCTCATGGAAAAATTTGCTTT  
 GGTGATGAAATAACACTTGCTGACTTATTCTTGGTACCTCAAGTTCAAGGAGTTGTAGATAGATTCCAAT  
 TTGATTTAACCCCT

>gi|12232721|gb|BF845523.1|BF845523 216T3 Tetrahymena 2 Tetrahymena thermophila  
 cDNA clone 216T3 similar to glutathione S-transferase, mRNA sequence

TCTAATATAAATAATCTTCAAATTTATAAATAATAAAGATATATACAATAAACATATCAATTAATAT  
 TTTAAATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAATTACTCTTTACAGTTATTTCCGCTCCCCAACTTCATGGAGAG  
 TAAGAATAGCTCTTAATCTTAAGAAAATAGACTACAACATCATTCTTAACTTTTGAAGAGTGAATA  
 AACTTCTGAAGAATATACTAAAATCAATCCTAACTAGGGAGTCCCTGCTTTAAAGTATGGAGACGAGGTT  
 ATTATTGAAAGCTCTGTATCTTAGAGTTTTTGAAGAAGTATTTCTGAGCACCCTTCTTCTTAAG  
 ATGCAGTTAAAAGAGCTTAAATTAGAGGCTTTTGCCAAGTTAATTAACACTGCCATCCACCCTCTCTAAA  
 ATTTGAGGGTGTCTAATAAGATTGAAAAGGAATATAGCTAAGACAAGATTCAATGGCTCAAATTCCTG

GGTTTACTAAGGGGTTTGACAGCAATTGGAAGAATTATTAAGAATTCTCATGGGAAAAATATGGCTTTG  
GGTGAATGAAATAACACTTGGCTGGACTTTATCCTTGGGTACCCTCATGTTTCCAGGAGTTGTTAGATAG  
ATTCCC

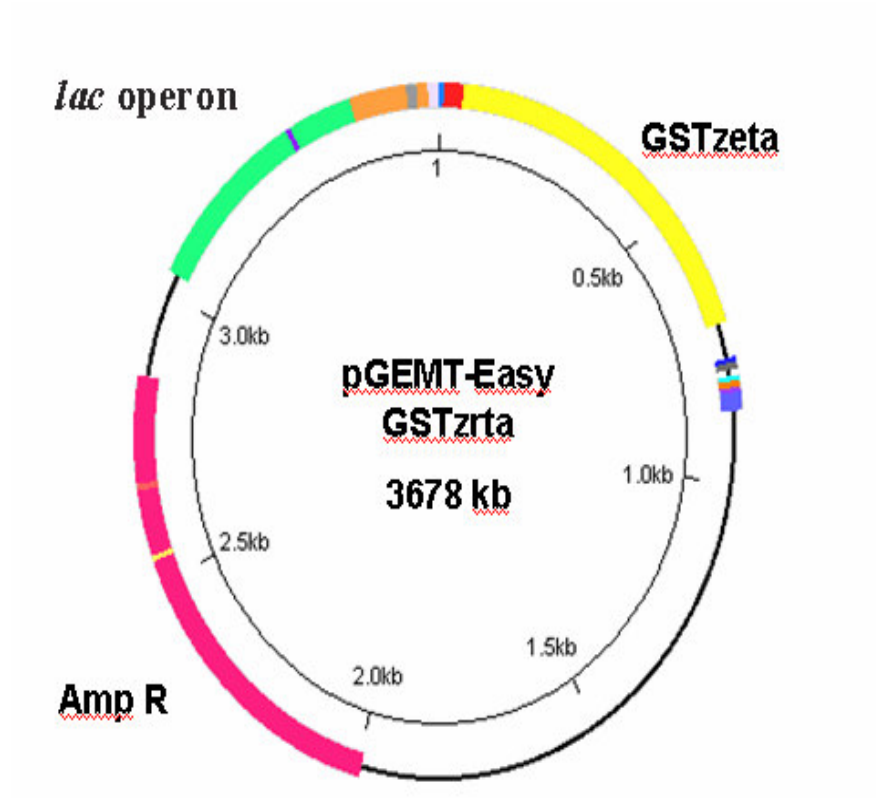
>gi|18199570|gb|BM399517.1|BM399517 5009-0-58-G03.t.1 Chilcoat/Turkewitz cDNA  
(large fraction) Tetrahymena thermophila cDNA, mRNA sequence

AACAAAGCTGGAGCTCACGCGGTGGCGGCCGCTCTAATTTATTTTTCATTATTAATTAATAATAAA  
TATTTATATAAATAATCTTCAAATTTATTAATATAATAAAGATATATACAATAAACATATCAATTAATA  
TTTTAAATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAATTACTCTTTACAGTTATTTCCGCTCCTCAACTTCATGGAGAG  
TAAGAAATAGCTCTTAATCTTAAGAAAATAGACTACAACATCATTCTATTAACCTTTTGAAGAGTGAATA  
AACTTCTGAAGAATATACTAAAATCAATCCTAACTAGGGAGTCCCTGCTTTAAAGTATGGAGACGAGGTT  
ATTATTGAAAGCTCTGCTATCTTAGAGATTTTGGGAAGAAGTATATCCTGAGCACCCACTTTCTTCCTTA  
AAATGCAGTTAAAAAGAGCTTAAATTACAGGCTTTTGCCAAGTAATTAACACTGGCATCCACCCTCTCTA  
AAAATTTGACGGTGGCTACTAAGACTTGAAAANGAATATAGCTAAGACAAGACTTCATTGGTCACATTCT  
GGGTAACCTAAGGTTTGAAGCCATTGAAGCAATATTCAAGAACTCCTGGGACAATAATGCGTAGGTAATG  
AATTAACCTGCTTGATTATACATGGTAGCTCAAGTCCAAGGAGTTGTAATAAATAACAA

>gi|18197206|gb|BM397153.1|BM397153 5009-0-29-F03.t.1 Chilcoat/Turkewitz cDNA  
(large fraction) Tetrahymena thermophila cDNA, mRNA sequence

AAAACTGAGCCACGCGGTGGCGGCCGCTCTAATTTATTTTTCATTATTAATTAATAAATAAATATTT  
ATATAAATAATCTTCAAATTTATTAATATAATAAAGATATATACAATAAACATATCAATTAATATTTTA  
AATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAATTACTCTTTACTGTTATTTCCGCTCCTCAACTTCATGGAGAGTAAGA  
ATAGCTCTTAATCTTAAGAAAATAGACTACAACATCATTCTATTAACCTTTTGAAGAGTGAATAAACTT  
CTGAAGAATATACTAAAATCAATCCTAACTAGGGAGTCCCTGCTTTAAAGTATGGAGACGAGGTTATTAT  
TGAAAGCTCTGCTATCTTAGAGTTTTTGGGAAGAAGTATTTCTGAGCACCCACTTTCTTCCTTAAGATGC  
AGTTAAAAGAGCTTAAATTAGAGGCTTTTGCCAAGTAATTAACACTGCCATCCAACCTCTCTAAAATTTG  
AGGGTGCTTAATAAGATTGAAAAGGAATTATAGCCTAGAACAGATCCATGGGCTCAATCCCGTGTACTA  
GGGTATGGACAGCATTGAAGAATAATTAAGAATTCTCTGAAAATTATGCTTGGTGATAAATACCCTGGTG  
AATATCTGGGACCTCAGTTAAGAATGGAATGATTCATTGATTACCCTTGCCATATGGAAGTTTAAAATT  
AAGAATCCAAATGAGGAACACAGAATAACGAAACGAATAAAGATGAATAAATTTTAATAGGTACAATGGA  
TAATTTCTTTTTGCGCAAAACGGGGTAAGTTATATG

Ek-4 Klonlanmış pGEMTeasyGSTz plazmiti



Ek-5 pET-16bGSTz plazmiti

