

**DNA İLE BESLENEN AÇ *Tetrahymena thermophila* HÜCRELERİNDE
DEOKSİRİBONÜKLEAZ (DNaz) AKTİVİTESİNİN GEN İFADESİ
AÇISINDAN KARAKTERİZASYONU**

Erhan Aslan

Yüksek Lisans Tezi

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Temmuz - 2013

**Bu tez çalışması 110T992 no'lu TÜBİTAK ve 1105F089 no'lu Anadolu Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projesi tarafından desteklenmiştir.**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Erhan Aslan'ın “DNA ile Beslenmiş Aç *Tetrahymena thermophila* Hücrelerinde Deoksiribonükleaz (DNaz) Aktivitesinin Gen İfadesi Açısından Karakterizasyonu” başlıklı İleri Teknolojiler Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Bilim Dalındaki Yüksek Lisans Tezi 04/07/2013 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı		İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Yrd. Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU	
Üye :	Prof. Dr. Sezai TÜRKEL	
Üye :	Doç. Dr. AZMİ YERLİKAYA	

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

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DNA İLE BESLENEN AÇ *Tetrahymena thermophila* HÜCRELERİNDE DEOKSİRİBONÜKLEAZ (DNaz) AKTİVİTESİNİN GEN İFADESİ AÇISINDAN KARAKTERİZASYONU

Erhan Aslan

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Danışman: Yard. Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU
2013, 45 sayfa

Deoksiribonükleazlar, çift ya da tek iplikli DNA moleküllerini kesen dizi bağımsız enzim grubudur. Bu enzimlerin *in vivo* da, apoptosis sırasında DNA parçalanması ve yabancı DNA'ların hücre içine girişini önlemek gibi çeşitli biyolojik görevleri vardır. *In vitro*'da ise RNA ve protein izolasyonu gibi rutin laboratuvar çalışmalarında DNA kontaminasyonunu önlemek için DNaz kullanılır. Tek hücreli ökaryotik silli *Tetrahymena thermophila*, sistem ve moleküler biyoloji çalışmalarında yaygın şekilde kullanılan iyi tanımlanmış, ancak DNaz enzimleri yeterince araştırılmamış bir model organizmadır. Yaşam döngüsü; vejetatif, açlık ve konjugasyon olmak üzere üç evreden oluşmaktadır. Son yıllarda *Tetrahymena*'nın ökaryotik protein üretim konakçısı olma potansiyelinin artması nedeniyle, DNaz aktivite tanımlamasının yapılması önem arz etmektedir. Çünkü yüksek DNaz aktivitesi bir organizmanın DNA ile transformasyonunu zorlaştıran bir parametredir. Bu tez çalışması kapsamında *Tetrahymena* genomunda yapılan biyoinformatik taramalarla olası 5 adet DNaz II genlerinin DNaz II'lere özgü katalitik TxDHSKW motifi taşıdığı bulunmuştur. *Tetrahymena* DNaz II proteinleri ile yapılan filogenetik analizler ise bu grubun yüksek ökaryotların DNaz II'lerine göre atasal karakterler taşıdığını ortaya koymuştur. Deneysel olarak; aç ve vejetatif (tok) *Tetrahymena* hücrelerinin DNaz aktivite karakterizasyonu toplam protein üzerinden zimogram analizi ile gerçekleştirilmiş ve 28-69 kDa aralığında 5 farklı aktivite bandı belirlenmiştir. Ayrıca maksimum DNaz aktivitesi pH 5.0 civarında görülmüş olup Mg^{+2} iyonunun pH 7.5'te gözlenen aktivite bantlarını önemli derecede inhibe ettiği bulunmuştur. DNA ile muamele edilmiş aç *Tetrahymena* hücrelerinde ise zimogram deneyleri, hücre dışına salgılanan 32 kDa'luk bir DNaz aktivite bandında kısmi bir artış meydana geldiğini göstermiştir. Sonuç olarak; gelecekte *Tetrahymena*'nın ökaryotik rekombinant protein üretim konakçısı olarak yaygın kullanımı, bu çalışma bulguları ile daha kolaylaşmış olacaktır.

Anahtar kelimeler: *Tetrahymena*, DNaz aktivitesi, DNaz II, DNA ile muamele.

ABSTRACT

Master of Science Thesis

CHARACTERIZATION OF DEOXYRIBONUCLEASE (DNase) ACTIVITY IN DNA-FED STARVED *Tetrahymena thermophila* CELLS BASED ON GENE EXPRESSION

Erhan ASLAN

Anadolu University
Graduate School of Sciences
Department of Advanced Technologies

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Muhittin ARSLANYOLU
2013, 45 pages

Deoxyribonucleases (DNases) are a group of enzyme that breaks down the single or double stranded DNA molecules in a non-specific sequence manner. These enzymes have myriad biological functions *in vivo* for instance DNA fragmentation in apoptosis and being defense barrier for the exogenous DNA uptake. *In vitro*, during routine laboratory works, it is necessary to use a DNase to prevent DNA contamination in protein and RNA isolations. *Tetrahymena thermophila*, a unicellular eukaryotic ciliate, is a well-known model organism which is widely used for regulatory, system and molecular biology studies; however, there is no extensive DNase study in this organism. Its life cycle consists of three stages namely, vegetative, starvation and conjugation. Due to the increasing potential of being a eukaryotic protein expression host in recent years, it is found that characterization of DNase activity in *Tetrahymena* is crucial. So far as, DNase activity is a parameter that makes the transformation of an organism more difficult. In this study, bioinformatics analyses showed that *Tetrahymena* genome encodes five DNase II genes. All of these proteins possess catalytic TxDHSKW motif, which is specific for DNase II proteins. Phylogenetic analyses also showed that *Tetrahymena* DNase II proteins have ancestral characteristics comparing to higher eukaryotic DNases. Experimentally, characterization of DNase activity of vegetative and starved cells was performed with agarose and zymogram assays by using whole cell extracts. As a result of zymography, a total of five DNase activity bands, ranging between 28-69 kDa, were identified. Highest DNase activity was obtained at acidic pH (pH 5) and Mg²⁺ ions inhibit neutral DNase activities significantly. DNA treatment of starved cells partially increased extracellular DNase activity of a 32 kDa protein. As a result, the findings of this study will help to simplify the usage of *Tetrahymena* as a eukaryotic recombinant protein expression host.

Key words: *Tetrahymena*, DNase activity, DNase II, DNA-treatment.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim süresince bana sağladığı olanaklar ve düşünsel katkıları için danışman hocam Yard. Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU'na;

Sahip olduğu biyolojisi ile bilimsel düşünce yetimi şekillendirmede büyük katkısı olduğunu düşündüğüm *Tetrahymena thermophila*'ya emek veren tüm bilim insanlarına;

Yardımlarının büyüklüğüne bakılmaksızın bu tez çalışmasında bir şekilde katkısı bulunan tüm laboratuvar arkadaşlarıma;

Aileme;

Samimi teşekkürlerimi sunarım.

Erhan ASLAN

Temmuz, 2013

Nurçin'e

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGE DİZİNİ	viii

1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç	4

2. MATERYAL VE YÖNTEM	5
------------------------------------	----------

2.1. Deneysel Yöntemler	5
2.1.1. <i>Tetrahymena thermophila</i> kültürünün geliştirilmesi, toplam protein izolasyonu ve protein miktar tayini	5
2.1.2. Toplam proteinden DNaz aktivitesinin agaroz jel ile analizi	6
2.1.3. Toplam proteinden DNaz aktivitesinin zimogram DNaz aktivite jeli ile analizi	7
2.1.4. <i>Tetrahymena</i> hücrelerinin DNA ile muamele edilmesi	7
2.1.5. DNA ile muamele edilmiş <i>Tetrahymena</i> hücrelerinde DNaz II genlerinin mRNA değişiminin analizi	8
2.1.6. Zimogram analizi ile belirlenen aktivite bantlarından sorumlu proteinlerin MALDI/TOF-MS ile tanımlanması	8
2.2. Biyoinformatiksel Analizler	9
2.2.1. <i>Tetrahymena thermophila</i> genomunda olası DNaz genlerinin taranması	9
2.2.2. Aday genlerin protein motif analizi ve benzerlik/aynılık matrislerinin oluşturulması	9
2.2.3. Aday genlerin protein dizileri ile filogenetik ağaç yapılandırması	9

3. BULGULAR	10
--------------------------	-----------

3.1. Deneysel Bulgular	10
------------------------------	----

3.1.1. <i>Tetrahymena</i> toplam proteininden DNaz aktivitesinin agaroz jel ile genel biyokimyasal karakterizasyonu.....	10
3.1.2. <i>Tetrahymena</i> toplam proteininden DNaz aktivitesinin zimogram DNaz aktivite jeli ile genel biyokimyasal karakterizasyonu ..	15
3.1.3. Agaroz ve zimogram aktivite jel analizlerinin karşılaştırmalı bulgu tanımı	18
3.1.4. DNA ile muamele edilen aç <i>Tetrahymena</i> hücrelerinin DNaz aktivite karakterizasyonu	19
3.1.5. DNA ile muamele edilen vejetatif <i>Tetrahymena</i> hücrelerinin DNaz aktivite karakterizasyonu	24
3.1.6. Geri-transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GT-PRZ) ile <i>Tetrahymena</i> DNaz II genlerinin mRNA ifade analizi	27
3.2. Biyoinformatiksel Analizler.....	28
3.2.1. <i>Tetrahymena</i> genomunda DNaz II genlerinin taranması	28
3.2.2. DNaz II genlerinin genel filogenetik analizi	31
4.TARTIŞMA	34
5.SONUÇ	37
KAYNAKLAR	38
EK- 1: Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler	41
EK- 2: Çalışmada Kullanılan Cihazlar, Kitler ve Enzim Setleri	43
EK-3: <i>Tetrahymena</i> DNaz II Protein Dizileri.....	44
EK-4: Çalışmada kullanılan Geri-transkripsiyon PZR primer Dizileri	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. DNaz etki mekanizması şematik gösterimi	3
3.1. pH'ya bağlı DNaz aktivite optimizasyonu	11
3.2. Divalent katyonların vejetatif ve aç <i>Tetrahymena</i> DNaz aktivitesi üzerine etkisi.....	12
3.3. EDTA, çinko ve ATA'nın vejetatif ve aç <i>Tetrahymena</i> DNaz aktivitesi üzerindeki etkisi.....	14
3.4. Vejetatif ve aç <i>Tetrahymena</i> hücrelerinin zimogram DNaz aktivite jeli ile kofaktör analizi	16
3.5. Vejetatif ve aç <i>Tetrahymena</i> hücrelerinin zimogram DNaz aktivite jeli ile inhibitör analizi	18
3.6. DNA ile muamele edilmiş aç <i>Tetrahymena</i> 'nın hücreiçi DNaz aktivitesinin analizi	21
3.7. DNA ile muamele edilmiş aç <i>Tetrahymena</i> 'nın dış ortama salgıladığı DNaz aktivitesinin analizi	23
3.8. DNA ile muamele edilmiş vejetatif <i>Tetrahymena</i> hücrelerin hücreiçi DNaz aktivitesinin zimogram analizi.....	24
3.9. DNA ile muamele edilmemiş (A) ve edilmiş (B) hücrelerin Hoechst boyaması sonrası mikroskopik analizi.....	25
3.10. DNA ile muamele edilmiş vejetatif <i>Tetrahymena</i> 'nın dış ortama salgıladığı DNaz aktivitesinin analizi	26
3.11. <i>Tetrahymena</i> DNaz II genlerinin mRNA ifade analizi	27
3.12. <i>Tetrahymena</i> DNaz II aday genlerinin Clustal W programı ile dikey hizalaması.....	29
3.13. DNaz II enzim ailesinin maksimum likelihood filogenetik analizi	32
4.1. <i>Tetrahymena</i> DNaz II genlerinin 15 saatlik açlık anındaki mRNA ifade seviyeleri	36

ÇİZELGE DİZİNİ

3.1. <i>Tetrahymena</i> aday DNaz II proteinlerinin kendileri ve NUC-1 ile olan benzerlik ve aynılık yüzdeleri.....	30
--	----

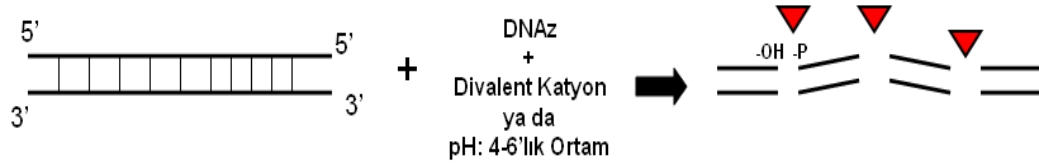
1. GİRİŞ

Tek hücreli ökaryot *Tetrahymena thermophila* (kısaca *Tetrahymena*), model organizma olarak sistem ve moleküler biyoloji çalışmaları için oldukça kullanışlı bir platform teşkil etmektedir. Telomer ve telomerazların fonksiyonu [1], ribozimlerin keşfi [2] gibi Nobel ödüllü buluşlar *Tetrahymena* biyolojisi ile aydınlatılmıştır. Sucul bir organizma olan *Tetrahymena*'nın yaşam döngüsü vejetatif, açlık ve konjugasyon olmak üzere üç ana evreden oluşur. Birbirinden farklı biyolojik olayların cereyan ettiği bu evrelerde farklı genlerin farklı seviyelerde ifade edildiği bildirilmiştir [3].

Tetrahymena'da yapısal ve fonksiyonel olarak birbirinden farklı iki çekirdek aynı sitoplazmada bulunur. Transkripsiyonel olarak sessiz olan ve nesiller arası genetik devamlılıktan sorumlu mikro çekirdek (MİK) 5 diploid kromozoma sahiptir. Hücredeki somatik olaylardan sorumlu olan, transkripsiyonel olarak aktif makro çekirdek (MAK) ise poliploid bir yapıya sahiptir ve hücrenin fenotipini belirler. Vejetatif evrede MİK mitoz ile bölünürken MAK amitotik bölünme geçirir. Mayoz ise sadece eşeysel üreme evresi olan konjugasyon evresinde gerçekleşir. Konjugasyon esnasında mayotik MİK'ten yeni MAK gelişirken, eski MAK gelişimsel olarak belirlenen Programlanmış Nükleer Ölüm (PNÖ) olarak bilinen mekanizma tarafından yok edilir. *Tetrahymena*'da konjugasyon esnasında görülen PNÖ'nün yüksek ökaryotlarda gözlemlenen apoptozisin ilkin versiyonu olduğu düşünülmektedir. Çünkü; kromatin yoğunlaşması, genomik DNA'nın yüksek moleküler büyüklükteki DNA parçalarına bölünmesi ve oligonüklezom büyüklüğünde parçalanma (~180 bç) gibi programlı hücre ölümüne has enzimatik aşamalar, PNÖ'de de gerçekleşmektedir. Örneğin; mitokondriyal bir deoksiribonükeaz'ın (DNaz) makronükleer parçalanmanın kromatin yoğunlaşması esnasında PNÖ'yü başlatıcı enzim olduğu bildirilmiştir [4]. *Tetrahymena*'da DNaz enzimlerinin varlığı, ilk olarak Brunks ve Navas'ın bu organizmaya DNA aktarımı için geliştirdikleri elektroporasyon çalışmasında görülmüştür. Brunks ve Navas, hücrelerin dış ortama DNaz salgıladığını ve bu DNaz aktivitesinin de plazmitleri parçalayarak transformasyon verimliliğini önemli ölçüde düşürdüğünü bildirilmişlerdir [5]. *Tetrahymena* DNaz'larının genel olarak tanımlanması ve

karakterizasyonu üzerine bu iki çalışma dışında kapsamlı bir araştırmaya ise rastlanmamıştır.

DNaz'lar DNA molekülünü özgün olmayan bölgelerden rastgele parçalayan proteinlerden oluşan enzim ailesine verilen genel bir isimdir. pH ve kofaktör gereksinimi gibi biyokimyasal parametrelere göre sınıflandırılırlar [6]. Fonksiyon gösterdikleri optimum pH açısından genel olarak nötral ve asidik DNaz'lar olarak iki ana gruba ayırmak mümkündür. **Nötral DNaz'lar** pH 7-8 civarı aktivite gösteren ve genellikle kofaktör ihtiyacı duyan DNaz'lardır. Bu gurubu temsil eden ve biyolojik-biyoteknolojik özellikleri en iyi bilinen enzim DNaz I enzimidir (EC 3.1.21.1). Yüksek ökaryotlarda ve özellikle de omurgalı hayvanların sindirim sistemini oluşturan doku ve organlarda bulunan bu enzim, aktivite göstermek için Mg^{+2} ve Ca^{+2} iyonlarına ihtiyaç duyar [7]. DNA parçalanması sonrası 3'OH ile sonlanan ürünler oluşur. Apoptotik DNA parçalanmasının yanı sıra [8], rekombinant DNaz I'in sistik fibrozis hastalığının tedavisinde kullanıldığı da bilinmektedir [9]. Öte yandan protein/RNA izolasyonu gibi rutin laboratuvar çalışmalarında, DNA kontaminasyonunu en aza indirmek için kullanılan DNaz da sığır pankreasından elde edilen DNaz I'dir. Asidik pH değerlerinde aktivite gösteren DNaz'lar ise **Asidik DNaz'lar** olarak bilinir. Optimum aktiviteyi pH 4-5 civarı gösteren bu enzimler genellikle kofaktör ihtiyacı duymazlar. Aksine, yapılan deneysel çalışmalar çinko, bakır gibi katyonların DNaz II aktivitesini inhibe ettiğini göstermiştir (Şekil 1.1) [10]. DNaz II (EC 3.1.22.1), asidik DNaz'lar arasında en iyi bilinen örnektir. DNaz I'lerden farklı olarak DNA parçalanması sonrasında 3'P'lı ürünler oluşur. Bitkilerde ve mayalarda bulunmayan DNaz II grubu enzimler, tek hücrelilerden yüksek ökaryotlara kadar geniş bir yayılım gösterirler. Tek hücreli *Tetrahymena thermophila* organizmasının DNaz enzim ailesi üyelerinin ne gibi enzim özelliklerine sahip olduğu, henüz araştırılmadığından biyolojik ve biyoteknolojik tanımına ihtiyaç bulunmaktadır.



Şekil 1.1. DNaz etki mekanizması şematik gösterimi. DNaz kesim bölgeleri üçgen ile gösterilmiştir.

Tetrahymena DNaz'larının aktivite tabanlı tanımlanması, DNaz'ların PNÖ'deki görevlerine ek olarak biyoteknolojik açıdan da önem arz etmektedir. Çünkü yakın tarihte yapılan çalışmalar *Tetrahymena*'nın biyoteknolojik potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Örneğin, fonksiyonel insan DNaz I [11] ve alkalın fosfataz proteinlerinin *Tetrahymena*'da rekombinant protein olarak üretilmesi, translasyon sonrası gerçekleşen çeşitli modifikasyonları bu organizmanın yapabildiğini göstermiştir [12]. Öte yandan, laboratuvar ortamında kolaylıkla kültüre edilebiliyor olması ve fermantasyon sistemlerine olan uyumluluğu *Tetrahymena*'yı ökaryotik protein üretim konakçısı olarak güçlü bir aday haline getirmiş, *Tetrahymena* tabanlı rekombinant terapötik protein ve aşı üretimi yapan biyoteknoloji şirketlerinin kurulmasına vesile olmuştur. Ancak *Tetrahymena*'nın laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan bir konakçı haline gelebilmesi için DNA aktarımına uygun ırkların ve çeşitli vektör sistemlerinin geliştirilmesi, daha da önemlisi biyolojik kapasitesinin daha iyi anlaşılması gerekmektedir. Biyoteknolojik açıdan bakıldığı zaman, uygun bir konakçı hücre ırkının geliştirilmesi için, o konakçının sahip olduğu DNaz'larının iyi bilinmesi gerekmektedir. Zira DNA'yı parçalama aktivitesine sahip olan DNaz'ların konakçı hücreye, transfeksiyon ile plazmit DNA aktarımı durumunda dış ortamda ve iç ortamda lizozomlarda bir bariyer teşkil ettiği bilinmektedir [13]. Bu tez çalışması ile *Tetrahymena* DNaz'larının genel karakterizasyonunun yapılarak literatürdeki eksikliğin giderilmesi amaçlanmıştır.

1.1. Amaç

Bu tez çalışması kapsamında; vejetatif (tok) ve aç *Tetrahymena* hücreleri ile DNA'lı ortam muamelesine alınmış aç *Tetrahymena* hücrelerinin DNaz aktivitelerinin genel özelliklerinin karakterizasyonu amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez kapsamında analizler temelde deneysel ve biyoinformatiksel olmak üzere iki ana yaklaşımla gerçekleştirilmiştir. Deneysel analizler kapsamında öncelikle *Tetrahymena* toplam proteini kullanılarak aç ve tok hücrelerin genel DNaz aktivite karakterizasyonu yapılarak optimum pH, kofaktör ve inhibitör deneyleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen veriler ışığında DNA ile muamele edilen *Tetrahymena* hücrelerinin DNaz aktivite davranışı hem mRNA hem de protein seviyesinde belirlenmeye çalışılmıştır.

Biyoinformatiksel analizler kapsamında ise *Tetrahymena thermophila* genomunda çeşitli biyolojik olaylarda görev aldığı düşünülen DNaz genlerinin homologları aranmış ve benzerlik/aynılık oranları belirlenmiştir. Ayrıca DNaz II enzim ailesi için filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

2.1. Deneysel Yöntemler

2.1.1. *Tetrahymena thermophila* kültürünün geliştirilmesi, toplam protein izolasyonu ve protein miktar tayini

Bu tez çalışması kapsamında aksi belirtilmedikçe *T.thermophila* SB210 ırkı kullanılmıştır. Kültür, 50 mL PPY besiyerinde 30°C’de 120 rpm çalkalamalı etüvde, hücre sayısı orta logaritmik faza (5×10^5 hücre/mL) ulaşınca kadar geliştirilmiştir. Bakteriyel kontaminasyonu önlemek amacıyla kültüre 25 µg/mL oranında penisilin/streptomisin antibiyotik karışımı eklenmiştir. Hücreleri açığa almak için yukarıdaki gibi geliştirilen hücre kültürü santrifüjlenip peletlendikten sonra açlık tamponu (10 mM Tris-HCl, pH 7.5) ile bir kez yıkandıktan sonra tekrar aynı tampon içinde çözülmüş ve inkübasyona alınmıştır.

Hücreler santrifüjleme ile peletlendikten sonra sıvı kısım uzaklaştırılmış ve hücre peleti yaklaşık 3 mL T100B protein izolasyon tamponu (1% Triton-X 100, 150 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl, pH 7.5, 2 mM PMSF ve proteaz inhibitör kokteyli) ile çözülmüştür [14]. Karışım pipetleme ve vorteksleme ile tamamen homojen hale getirildikten sonra hücreler 10 dk buzda inkübe edilmiştir. Her 2 dakikada bir, örnekler kısa süreli vortekslenip tekrar buza gömülmüştür. Buzda

inkübasyon sonrası örnekler 4°C’de 14.000 g de 5 dk. süre ile santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası sıvı faz, hücre peletine dokunmadan alınmış ve yeni deney tüpüne aktarılmıştır. Protein izolasyon kalitesi SDS-PAGE ile analiz edilmiştir.

Elde edilen toplam protein örneğindeki protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. Protein standardı olarak BSA (Bovine Serum Albumin) kullanılmıştır.

2.1.2. Toplam proteinden DNaz aktivitesinin agaroz jel ile analizi

pH, kofaktör ve inhibitörlerin *Tetrahymena* DNaz aktivitesi üzerine olan etkilerini belirlemek için 20 µl hacminde standart DNaz reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, 200 ng toplam protein 500 ng salmon sperm DNA’sı ile değişik reaksiyon şartlarında 37°C’de 30 dk. süre ile inkübe edilmiş ve 70°C 20 dk inkübasyon ile DNaz reaksiyonları sonlandırılmıştır. Ardından 0,5 µg/mL oranında EtBr ile boyanmış %1’lik agaroz jel ile DNA parçalanma davranışı analiz edilmiştir. Reaksiyon tamponu olarak 40 mM konsantrasyonunda Tris ve sodyum asetat tamponları kullanılmış ve pH 4-10 arası test edilmiştir. *Tetrahymena* DNaz aktivitesinin kofaktör gereksinimlerini belirlemek amacıyla çeşitli divalent katyonlarla yukarıdaki gibi DNaz reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla pH 5 (40 mM NaAc) ve pH 7.5’te (40 mM Tris-HCl) 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂ ve 2 mM MgCl₂+2 mM CaCl₂ ile DNaz reaksiyonları gerçekleştirilmiş ve kofaktörlerin DNaz aktivitesi üzerine etkisi agaroz jel ile analiz edilmiştir. Benzer şekilde çeşitli inhibitörlerin (10 mM EDTA, 5 mM ZnCl₂, 100 µM ATA) DNaz aktivitesi üzerindeki inhibe edici etkileri pH 5 ve 7.5’te gerçekleştirilen DNaz reaksiyonları ile belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak ticari DNase I (1 ünite/µl, Promega) ve DNase II (1,4 ünite/µl, Sigma) enzimleri sırasıyla 0,0012 ve 0,03 ünite konsantrasyonunda kullanılmıştır.

2.1.3. Toplam proteinden DNaz aktivitesinin zimogram DNaz aktivite jeli ile analizi

Tetrahymena'nın çalışılan deneysel şartlar altında kaç tane DNaz aktivitesine sahip proteine sahip olduğunu belirlemek için zimogram DNaz aktivite deneyi yapılmıştır. Bu yöntemin standart SDS-PAGE yönteminden farkı ayırma jelinde 200 µg/mL oranında substrat olarak salmon sperm DNA'sı içermesidir. Toplam protein örnekleri %12'lik zimogram jeli ile 50V'ta yaklaşık 3 saat koşturularak protein bantlarının moleküler büyüklüğüne göre ayrılması sağlanmıştır. Elektroforez sonrası aktivite jelinden SDS'i uzaklaştırmak ve DNaz aktivitesine olanak vermek için jel 100 mL renatürasyon tamponu (% 2,5'luk Triton-X 100) ile 25 dk. boyunca 3 kez yıkanmıştır. Ardından jelden fazla Triton'u uzaklaştırmak için jel 100 mL distile su ile 25 dk. boyunca yıkanmıştır. Asidik DNaz aktivesi (pH 5) için jeller 200 mL 50 mM NaAc tamponunda, nötral DNaz aktivitesi (pH 7.5) için ise 200 mL 50 mM Tris-HCl tamponunda 37°C'de hafif çalkalamalı etüvde yaklaşık 14 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası jeller 1 µg/mL'lik EtBr çözeltisinde 30 dk boyunca boyanmış ve boyama sonrası jeller UV görüntüleme cihazında görüntülenmiştir. DNaz aktivitesinden dolayı aktivitenin gerçekleştiği bölgeler UV altında siyah bant şeklinde görülmüştür.

Zimogram deneyinde elde edilen her bir aktivite bandının çeşitli kofaktörlere ve inhibitörlere verdiği tepkiyi belirlemek amacıyla 2.1.2'de belirtilen kofaktör ve inhibisyon deneyleri zimogram analizi ile de gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda yukarıda bahsedilen konsantrasyondaki reaktifler reaksiyon tamponuna eklenerek deneyler gerçekleştirilmiştir.

2.1.4. *Tetrahymena* hücrelerinin DNA ile muamele edilmesi

DNA'ya karşı *Tetrahymena* hücrelerinin özgün bir DNaz enzimi ile cevap verip vermediğini, yani DNaz aktivitesinin DNA muamelesi ile tetiklenip tetiklemediğini test etmek amacıyla aç ve tok hücreler DNA ile muamele edilmiştir. Bu kapsamda 1×10^6 hücre 50 µg salmon sperm DNA'sı ile 0, 15, 30, 45, 60 ve 120 dk boyunca muamele edilmiş ve sonrasında hücreler RNA ve

protein izolasyonunda kullanılmak üzere peletlenerek -86°C’de saklanmıştır. Aynı şekilde dış ortam (açlık tamponu) da muhafaza edilmiş ve DNaz aktivite analizine alınmıştır.

2.1.5. DNA ile muamele edilmiş *Tetrahymena* hücrelerinde DNaz II genlerinin mRNA değişiminin analizi

DNA ile muamele edilmiş *Tetrahymena* hücrelerinde DNaz II genlerinin mRNA miktarındaki değişim geri transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (GT-PZR) yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu kapsamda DNA ile muamele edilmiş hücrelerden toplam RNA izolasyonu yapılmış ve toplam RNA’ya DNaz uygulaması yapılarak izolasyondan gelen genomik DNA uzaklaştırılmıştır. RNA miktar ve kalitesi spektrofotometrik ölçümler ile belirlenmiştir.

Elde edilen toplam RNA örneklerinden cDNA havuzu oluşturmak için ticari bir kit yardımı ile (Fermentas RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit) cDNA sentezlenmiştir.

Biyoinformatiksel olarak belirlenen 5 DNaz II aday genine özgü primerler tasarlanmış ve bu primerler kullanılarak GT-PZR gerçekleştirilmiştir. Yükleme kontrolü olarak mRNA ifade seviyesi sabit olan aktin genine özgü primer çifti kullanılmıştır. Reaksiyon sonrası ürünler %1’lik agaroz jeli yüklenerek koşturulmuş, elektroforez sonrası UV altında görüntülenmiştir.

2.1.6. Zimogram analizi ile belirlenen aktivite bantlarından sorumlu proteinlerin MALDI/TOF-MS ile tanımlanması

Zimogram analizinde elde edilen aktivite bantlarından sorumlu proteinlerin kesin tanısı için toplam protein örnekleri 2.1.3’te bahsedildiği şekilde SDS-PAGE ve Zimogram jeli elektroforez edilmiş, Commasie Brilliant Blue boyası ile boyanmış ve aday protein bantları steril bisturi ile kesilip temiz deney tüplerine aktarılmıştır. Oda sıcaklığında kurutulan örnekler MALDI/TOF-MS analizi için Proteomics International (Avustralya) firmasına gönderilmiştir.

2.2. Biyoinformatiksel Analizler

2.2.1. *Tetrahymena thermophila* genomunda olası DNaz genlerinin taranması

Tetrahymena thermophila genom veritabanı (TGD) (www.ciliate.org) ve National Center for Biotechnology Information (NCBI) veritabanı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) kullanılarak *Tetrahymena* genomunda bulunan olası DNaz genleri belirlenmeye çalışılmıştır. Bunun için deneysel olarak DNaz aktivitesine sahip olduğu ispatlanmış farklı organizmalardan gelen protein dizileri kullanılarak BLAST analizleri yapılmıştır.

2.2.2. Aday genlerin protein motif analizi ve benzerlik/aynılık matrislerinin oluşturulması

Aday genlerin protein dizileri ClustalW programı ile dikey olarak hizalanmış ve korunmuş bölgeler belirlenmiştir (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) Aday genlerin deneysel olarak DNaz olduğu gösterilmiş olan proteinlerle olan dizisel benzerlik ve aynılık yüzdeleri belirlemek için MatGat 2.02 programı kullanılmıştır [15].

2.2.3. Aday genlerin protein dizileri ile filogenetik ağaç yapılandırması

Aday genlerin protein dizileri kullanılarak filogenetik ağaçlar yapılandırılmıştır. Bunun için MEGA5 programı ve [16] internet tabanlı www.phylogeny.fr servisi kullanılmıştır [17].

3.BULGULAR

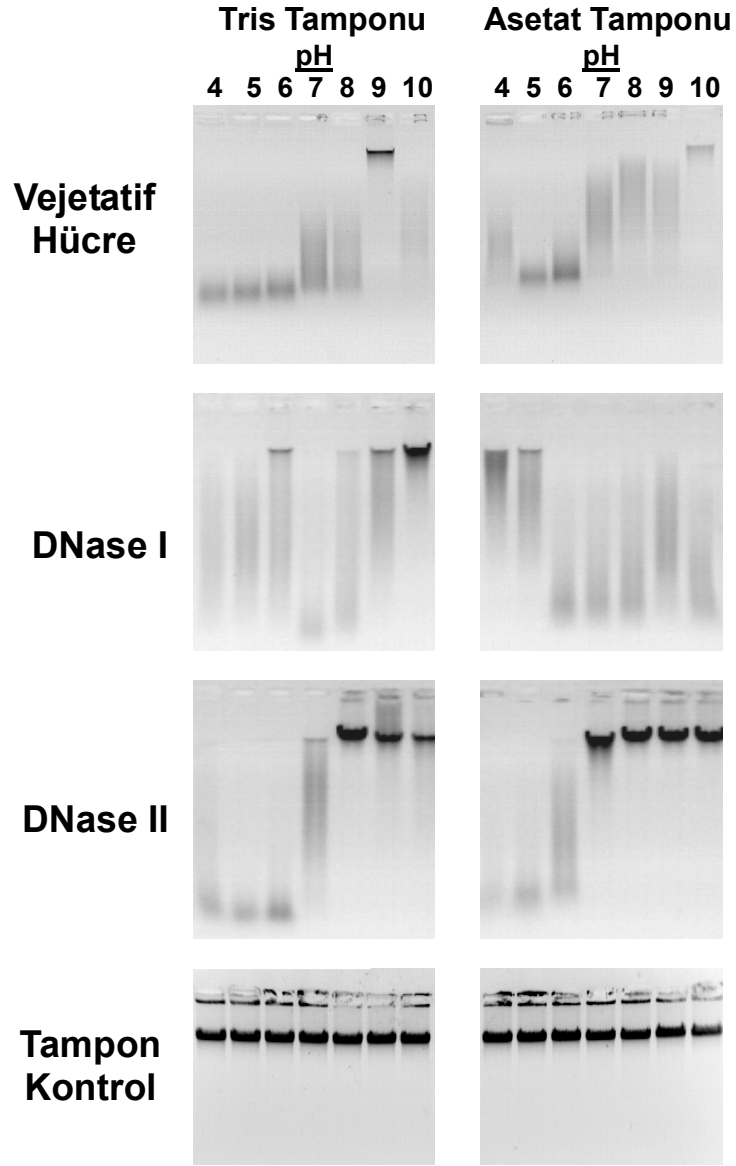
3.1. Deneysel Bulgular

3.1.1. *Tetrahymena* toplam proteininden DNaz aktivitesinin agaroz jel ile genel biyokimyasal karakterizasyonu

Bu tez çalışmasının ana amacını oluşturan DNA ile beslenmiş *Tetrahymena* hücrelerinin DNaz aktivite karakterizasyonu için öncelikle toplam proteinden kaynaklanan DNaz aktivitesinin genel biyokimyasal karakterizasyonu gerekli görülmüştür. Bu bağlamda 2.1’de belirtildiği şekilde standart DNaz reaksiyonları hazırlanarak optimum pH, kofaktör gereksinimi ve inhibitör deneyleri gerçekleştirilmiş, agaroz jel ve zimogram aktivite jeli ile analiz edilmiştir.

pH Optimizasyonu: Farklı pH’larda toplam protein kullanılarak standart DNaz reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda Tris ve asetat olmak üzere iki farklı reaksiyon tamponu kullanılarak pH 4-10 arası test edilmiş ve reaksiyon sonuçları agaroz jel analiz edilmiştir. Şekil 3.1’de görüldüğü üzere en yüksek DNaz aktivitesi pH 4-5’te gerçekleşmiştir. Ticari DNaz kontrolleri beklenildiği gibi sonuç vermiştir. Nötral bir DNaz olan DNase I optimum aktivitesini pH 7-8 civarında gösterirken, asidik bir DNaz olan DNase II ise pH 5’te maksimum DNaz aktivitesi göstermiştir. Reaksiyon tamponlarının DNaz aktivitesi üzerine olan etkisi incelendiğinde, ticari DNase I enzimi Tris tamponunda daha iyi sonuç verirken, DNase II enzimi ise asetat tamponunda daha tutarlı DNaz aktivite davranışı göstermiştir (Şekil 3.1).

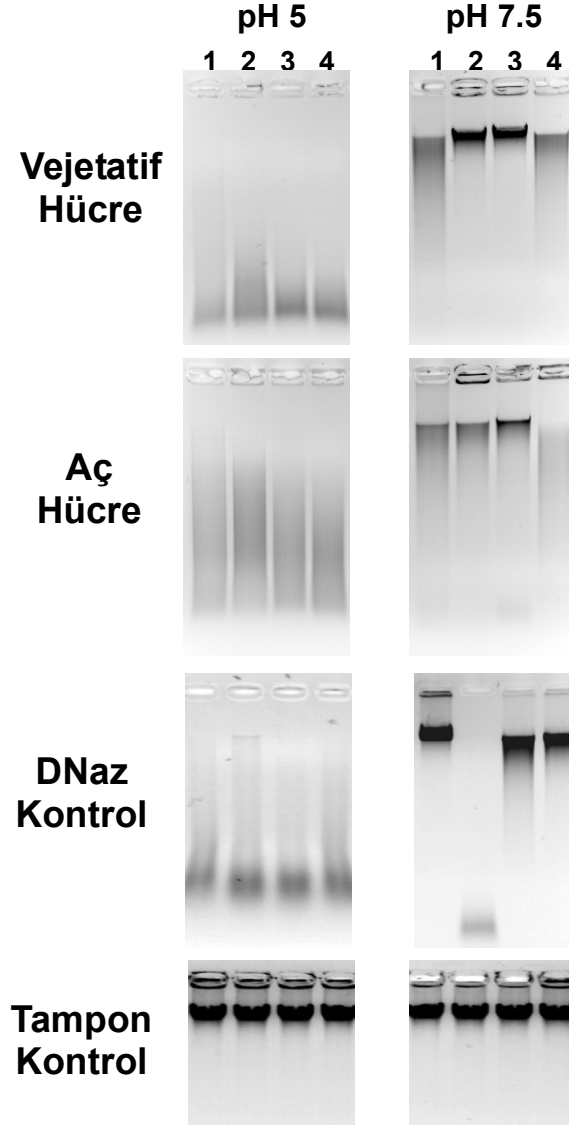
Elde edilen bu veriler ışığında asidik DNaz aktivitesini karakterize etmek için pH 5, nötral DNaz aktivitesini karakterize etmek içinse pH 7.5 değerlerinde karar kılınmış ve sonraki deneyler bu pH değerlerinde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. pH'ya bağlı DNaz aktivite optimizasyonu: Vejetatif hücreden izole toplam protein kullanılarak 2.1.2'de belirtildiği şekilde DNaz reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Ticari DNase I ve II enzimleri kontrol olarak kullanılmıştır. Tampon kontrolü olarak toplam protein örneği ya da ticari enzim içermeyen örnekler aynı deneysel şartlarla muamele edilmiştir.

Çeşitli kofaktörlerin *Tetrahymena* DNaz aktivitesi üzerindeki etkisi: +2 değerlikli çeşitli katyonların DNaz aktivitesi üzerine etkisi bilinmektedir. Özellikle nötral DNaz'lar optimum DNaz aktivitesi göstermek için en az bir divalent katyona ihtiyaç duyarlar. *Tetrahymena* DNaz'larının kofaktör gereksinimlerini toplam protein üzerinden belirlemek için, Mg^{+2} ve Ca^{+2} iyonları

ile DNaz reaksiyonları gerçekleştirilmiş ve agaroz jel ile analiz edilmiştir (Şekil 3.2).

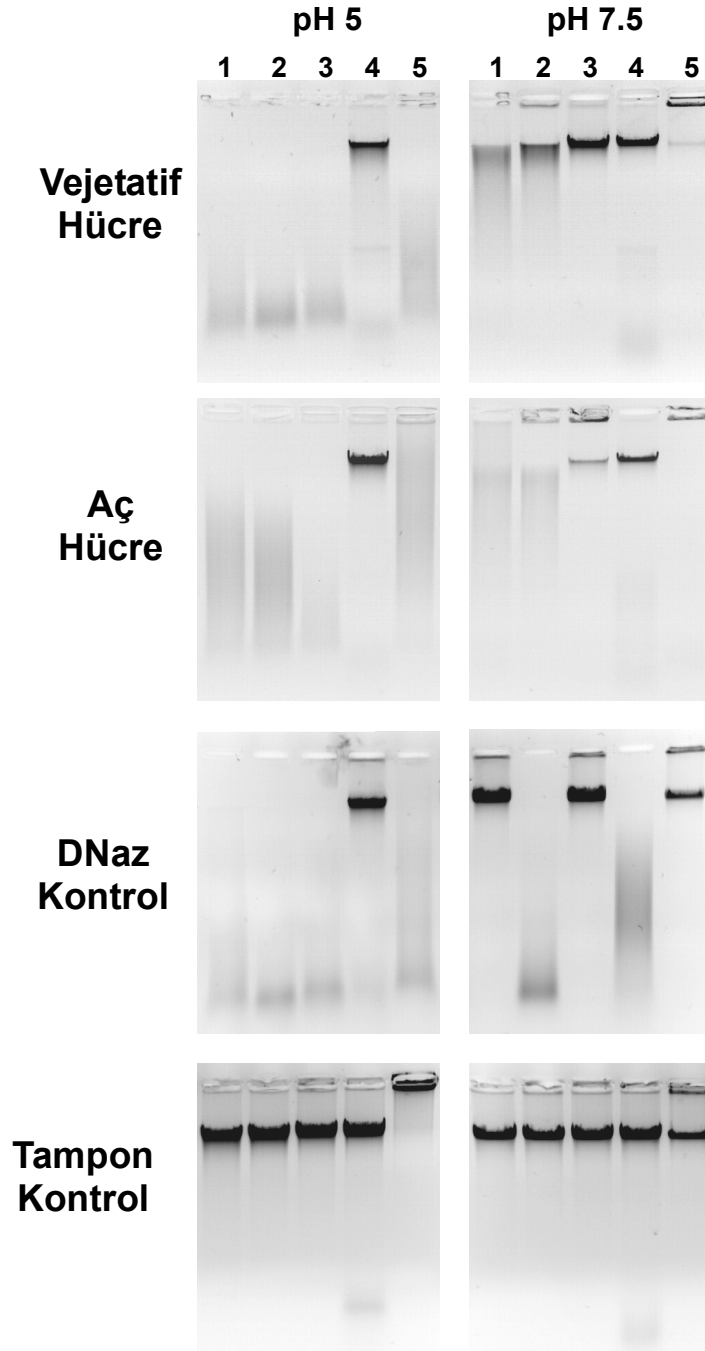


Şekil 3.2. Divalent katyonların vejetatif ve aç *Tetrahymena* DNaz aktivitesi üzerine etkisi: 1; Kofaktörsüz reaksiyon, 2; 2 mM $MgCl_2$ +2mM $CaCl_2$, 3: 2 mM $MgCl_2$, 4: 2 mM $CaCl_2$. Ticari DNase I ve DNase II enzimleri sırasıyla pH 7.5 ve pH 5'te DNaz kontrolü olarak kullanılmıştır. Aç *Tetrahymena* hücrelerinin düşük DNaz aktivitesinden dolayı aç hücre grubunda 0,2 μg toplam protein yerine 1 μg toplam protein kullanılmıştır.

Ticari DNaz kontrolleri beklenen sonuçları vermiştir. Divalent katyonların asidik DNaz aktivitesi üzerine belirgin bir etki göstermemiştir. Ancak DNase I sadece $MgCl_2 + CaCl_2$ varlığında DNaz aktivitesi göstermiş, diğer şartlarda ise DNA parçalaması oldukça kısıtlı miktarda gerçekleşmiştir.

Aç hücrelerin DNaz aktivitesinin tok hücrelerin DNaz aktivitesine göre daha düşük olduğu görülmüştür. Bu nedenle aç hücrelerin DNaz aktivite karakterizasyonunda daha fazla toplam protein kullanılması gerekmiştir (Bkz Şekil 3.2, Şekil altı yazısı). Ticari DNaz II aktivitesine benzer şekilde aç ve tok hücrelerin pH 5'deki DNaz aktivitesi divalent katyonların belirgin bir etkisi olmadığı görülmüştür. pH 7.5'te ise maksimum DNaz aktivitesi vejetatif hücrelerde kofaktörsüz reaksiyon şartlarında gerçekleşirken (Şekil 3.2, pH 7.5, 1.Kuyu) aç hücrelerde 2 mM $CaCl_2$ varlığında gerçekleşmiştir (Şekil 3.2, pH 7.5, 4.Kuyu). Hem aç hem de tok hücrelerin pH 7.5'te sahip olduğu nötral DNaz aktivitesi ise 2 mM $MgCl_2$ varlığında inhibe olmuştur (Şekil 3.2, pH 7.5, 2. ve 3.kuyu). Bu nedenle sonraki karakterizasyon deneylerinde nötral DNaz aktivitesi herhangi bir kofaktör kullanmaksızın gerçekleştirilmiştir.

Çeşitli inhibitörlerin *Tetrahymena* DNaz aktivitesi üzerine etkisi: DNaz aktivitesi üzerine çeşitli kimyasalların inhibe edici etkisi olduğu bilinmektedir. *Tetrahymena* nötral DNaz aktivitesinin katyon bağımlı olup olmadığını sınamak için Etilendiamin tetraasidik asit (EDTA) ile DNaz reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Öte yandan literatürde çinkonun özellikle DNaz II benzeri DNaz aktivitesi üzerinde inhibe edici bir etkisi olduğundan bahsedilmiştir [10]. Bu nedenle çinkonun *Tetrahymena* DNaz aktivitesi üzerindeki etkisi de çalışılmıştır. Son olarak genel bir DNaz inhibitörü olarak bilinen aurintrikarboksilik asit'in (ATA) inhibe edici etkisi belirlenmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. EDTA, çinko ve ATA'nın vejetatif ve aç *Tetrahymena* DNaz aktivitesi üzerindeki etkisi:

1: İnhibitörsüz, 2: 2 mM CaCl_2 , 3: 10 mM EDTA+2 mM CaCl_2 , 4: 100 μM ATA, 5: 5 mM ZnCl_2 . Ticari DNase I ve DNase II enzimleri sırasıyla pH 7.5 ve pH 5'te DNaz kontrolü olarak kullanılmıştır. DNase I reaksiyonlarında (1. kuyu hariç) aktivitenin gerçekleşebilmesi için ek olarak 2 mM MgCl_2 de kullanılmıştır. pH 5'te çinko (5.kuyu), DNA'nın agaroz jelde göç şeklini etkilemiştir.

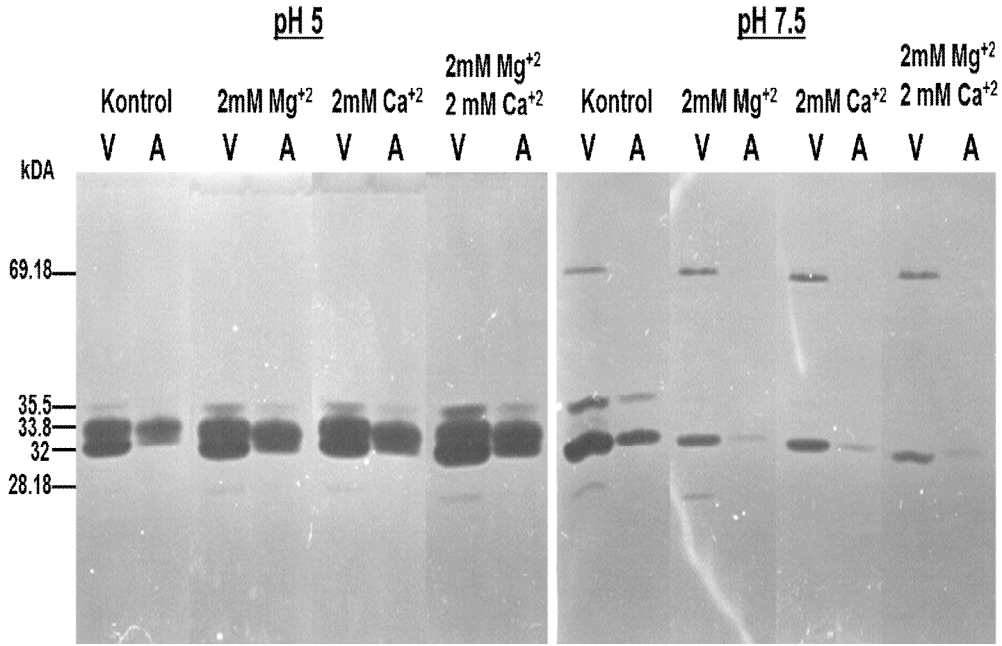
Şekil 3.3'te görüldüğü üzere tüm inhibitörler vejetatif ve aç *Tetrahymena* DNaz aktivitesine benzer şekilde etki etmiş, hücrelerin yaşam döngüsüne bağlı bir biyolojik cevap görülmemiştir. 10 mM EDTA, pH 5'te DNA parçalaması üzerinde bir inhibisyona neden olmazken pH 7.5'te belirgin miktarda inhibisyona neden olmuştur (Şekil 3.3, 2. ve 3. kuyular). Bu sonuç farklı pH'larda farklı DNaz'ların görev alabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca her ne kadar magnezyumun *Tetrahymena* nötral DNaz aktivitesi üzerinde inhibe edici etkisi olsa da pH 7.5'teki EDTA inhibisyonu *Tetrahymena* nötral DNaz'larının kofaktör(ler)e çok az konsantrasyonda dahi olsa ihtiyaç duyduğunu göstermektedir. Çünkü EDTA, şelat oluşturarak divalent katyonları bağlama özelliğine sahiptir.

100 µM ATA ticari DNase I reaksiyonunu kısmen, diğer tüm DNaz reaksiyonlarını ise tamamen inhibe etmiştir.

Çinkonun özellikle DNaz II benzeri aktiviteler için kuvvetli inhibitör olduğu bildirilmiştir. Ancak Şekil 3.3'te görüldüğü gibi (5. kuyu) pH 7.5'te kısmi bir inhibisyon söz konusu iken, pH 5'te ticari DNase II de dahil olmak üzere etkin bir inhibisyon gerçekleşmemiştir.

3.1.2. *Tetrahymena* toplam proteininden DNaz aktivitesinin zimogram DNaz aktivite jeli ile genel biyokimyasal karakterizasyonu

Agaroz jel aktivite deneyi ile *Tetrahymena* DNaz aktivitesi hakkında genel bir karakterizasyon yapılmış ve aktivitenin sınırları ve biyokimyasal özellikleri temel düzeyde belirlenmiş olsa da, bu aktiviteden sorumlu olan proteinlerin daha detaylı karakterizasyonu için zimogram DNaz aktivite jel deneyi gerçekleştirilmiştir. SDS-PAGE yönteminin proteinleri büyüklüklerine göre ayırma gücüne sahip olması, toplam protein havuzu içinde bulunan *Tetrahymena* proteinlerinden hangisi ya da hangilerinin çalışılan deneysel şartlar altında DNaz aktivitesine sahip olduğunun ve bu proteinlerin hangi biyolojik durumlarda görev aldıklarının belirlenmesine olanak sağlamıştır. Agaroz jel analizine paralel olarak zimogram aktivite jeli ile asidik ve nötral şartları temsilen sırasıyla pH 5 ve pH 7.5'te olmak üzere kofaktör ve inhibitör deneyleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4. Vejetatif ve aç *Tetrahymena* hücrelerinin zimogram DNaz aktivite jeli ile kofaktör analizi: Vejetatif ve aç *Tetrahymena* hücrelerinden izole edilen toplam protein kullanılarak asidik (50 mM NaAc, pH 5) ve nötral (50 mM Tris-HCl, pH 7.5) şartlarda, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂ ve 2 mM MgCl₂+2 mM CaCl₂ varlığında aktivite analizi yapılmıştır. Kontrol: kofaktör içermeyen reaksiyon. V: vejetatif hücre, A: 18 saat açlık stresinde kalan hücre. Aktivite jeline yaklaşık 30 µg toplam protein yüklenmiştir. Aktivite 14 sat süresince 37 °C’de gerçekleşmiştir.

Zimogram deneyi sonucunda çalışılan şartlar altında vejetatif ve aç *Tetrahymena* hücrelerinden elde edilen toplam protein örneklerinde Rf değerleri yaklaşık olarak 69 ile 28 kDa arasında değişen beş temel DNaz aktivite bandı tespit edilmiştir. Bu aktivite bantların tamamı vejetatif hücrelerde gözlemlenirken, 28 kDa ve 69 kDa büyüklüğündeki iki aktivite bandı aç hücrelerde oluşmamıştır (Şekil 3.4). Yalnızca vejetatif hücrede aktivite gösteren 69 kDa’luk protein, söz konusu bu aktiviteyi sadece nötral şartta (pH 7.5) göstermiş, pH 5’te ise bu bant gözlemlenmemiştir. Öte yandan 33.8 kDa’luk aktivite ise sadece pH 5’te oluşmuştur.

Divalent katyonların *Tetrahymena* DNaz’ları üzerine olan etkisine bakıldığında ne magnezyum ne de kalsiyum iyonuna bağlı bir aktivite bandı oluşumu gözlenmemiştir. Ancak kofaktör içermeyen kontrol grubu ile diğer deney gruplarının aktivite bant yoğunlukları karşılaştırıldığında bir takım farklılıklar

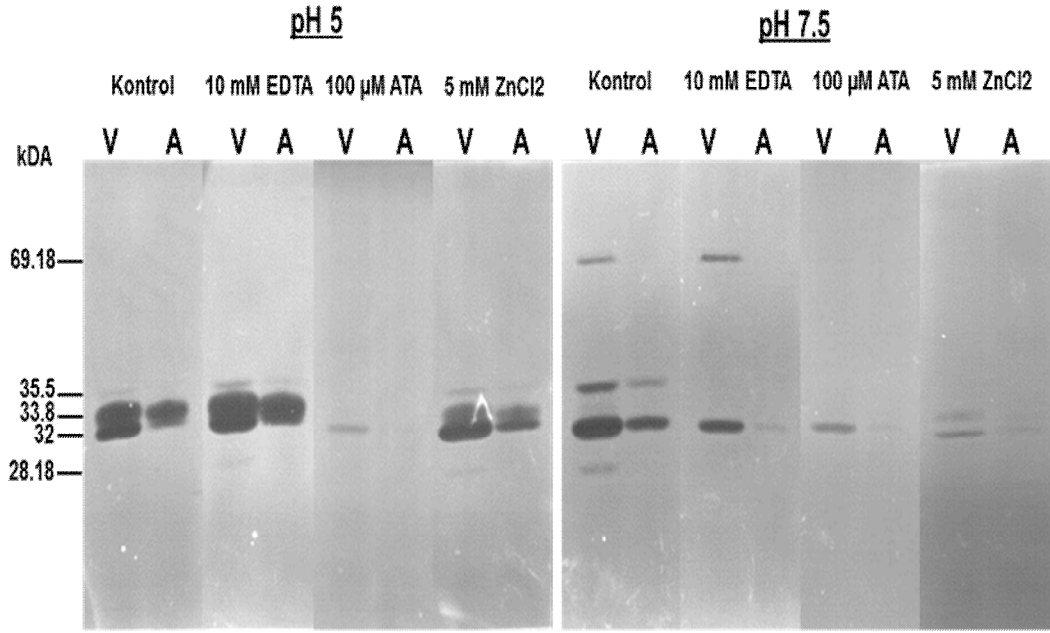
olduğu görülmüştür. Örneğin, pH 7.5'te kofaktör varlığında 35.5 kDa'luk aktivitenin yok olduğu, 32 kDa'luk aktivitenin ise hem vejetatif hem de aç hücre gruplarında önemli ölçüde azaldığı görülmektedir. pH 5'te ise divalent katyon varlığından kaynaklanan herhangi bir aktivite bant kaybı bulunmazken kofaktör varlığında (özellikle 2 mM MgCl₂+2 mM CaCl₂ varlığında) aktivite bantlarının kontrol grubuna göre bir miktar daha yoğunlaştığı görülmüştür.

Zimogram aktivite jeli ile belirlenen aktivite bantlarının asidik ve nötral şartlarda inhibitörlere verdiği cevapları belirlemek için EDTA, ATA ve çinko ile inhibisyon deneyleri yapılmıştır (Şekil 3.5).

pH 7.5'te 10 mM EDTA'nın 69 kDa'luk aktivite bandı (sadece vejetatif hücrelerde oluşan) üzerinde inhibe edici bir etkisi yokken 35.5 ve 28 kDa'luk aktiviteleri tamamen inhibe etmiştir. 32 kDa'luk aktivite üzerinde ise kısmi bir inhibisyon söz konusudur. Bu veriler ışığında, 10mM EDTA'nın inhibe ettiği aktivitelerden sorumlu proteinlerin (35.5, 32 ve 28 kDa) katyon bağımlı çalışan DNaz'lar olabileceği söylenebilir. Öte yandan 10 mM EDTA'dan etkilenmeyen 69 kDa'luk aktiviteden sorumlu proteinin nötral pH'da aktivite gösteren DNaz II benzeri bir protein olabilir. Çok yaygın olmamakla birlikte, bazı DNaz II benzeri proteinler, beklentiler dışında pH tercihi gösterebilmektedir. Örneğin, bir denizyıldızı olan *Acanthaster planci*'den izole edilen bir toksinin memeli DNaz II proteini ile yüksek homoloji göstermesine rağmen, optimum DNaz aktivitesi pH 7.2'de olmuştur [18]. pH 5'te ise 10 mM EDTA herhangi bir inhibisyona neden olmamakla birlikte, kısmi bir aktivite artışı gözlemlenmiştir.

5 mM ZnCl₂ pH 7.5'te önemli derecede inhibisyona neden olmuşken, pH'te ciddi bir inhibisyon gerçekleşmemiştir.

100 µM ATA her iki pH değerinde de kuvvetli inhibisyona neden olmuştur.



Şekil. 3.5. Vejetatif ve aç *Tetrahymena* hücrelerinin zimogram DNaz aktivite jeli ile inhibitör analizi: Vejetatif ve aç *Tetrahymena* hücrelerinden izole edilen toplam protein kullanılarak asidik (50 mM NaAc, pH 5) ve nötral (50 mM Tris-HCl, pH 7.5) şartlarda, 10 mM EDTA, 100 µM ATA ve 5 mM ZnCl₂ aktivite analizi yapılmıştır. Kontrol: kofaktör içermeyen reaksiyon. V: vejetatif hücre, A: 18 saat açlık stresinde kalan hücre. Aktivite jeline yaklaşık 30 µg toplam protein yüklenmiştir. Aktivite 14 sat süresince 37 °C’ de gerçekleşmiştir.

3.1.3. Agaroz ve zimogram aktivite jel analizlerinin karşılaştırmalı bulgu tanımı

Vejetatif ve aç *Tetrahymena* hücrelerinin sahip oldukları DNaz aktivitelerinin genel biyokimyasal karakterizasyonu iki yaklaşımla gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel analizi ile toplam protein kullanılarak standart DNaz reaksiyonları gerçekleştirilmiş ve DNA parçalama miktarı agaroz jel ile belirlenmiştir. Bu yöntem ile DNA parçalanması tespit edilse bile bu parçalanmadan sorumlu olan proteinlerin sayısı, moleküler büyüklüğü gibi önemli bulgulara ulaşmak için zimogram jel aktivite deneyi gerçekleştirilmiştir.

Agaroz jel analizinde en yüksek DNaz aktivitesi pH 5’te gerçekleşmiştir (Şekil 3.1, pH 5). Bu veri zimogram aktivite jeli ile teyit edilmiştir. Aktivite bantlarının yoğunlukları kıyaslandığında, pH 5’te elde edilen aktivite bantlarının

yoğunluğunun, pH 7.5'te elde edilen aktivite bantlarının yoğunluğundan daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 3.4 pH 5 ve 7.5 Kontrol grupları). Benzer şekilde Agaroz jel analizinde açlık stresindeki *Tetrahymena* hücrelerinin sahip olduğu DNaz aktivitesi vejetatif hücrelere nazaran daha düşük olduğu bulunmuş ve aç hücrelerin karakterizasyonu için daha fazla toplam protein kullanılması gerekmiştir. Zimogram aktivite jeli sonucunda hem pH 5'te hem de pH 7.5'te vejetatif hücrelerdeki aktivite bantlarının yoğunluğu aç hücre aktivite bantlarının yoğunluğundan daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca vejetatif gelişim gösteren *Tetrahymena*'da zimogram aktivite jeli sonucunda 4 DNaz aktivitesi bulunmuşken, aç hücrelerde tespit edilen aktivite bant sayısı 3'tür.

Agaroz jel analizi sonucunda Mg^{+2} ve Ca^{+2} varlığında nötral DNA aktivitesinde bir inhibisyon meydana geldiği tespit edilmiştir (Şekil 3.2). Zimogram jel analiz bulguları bu veriyi destekler niteliktedir. pH 7.5'te, Mg^{+2} ve Ca^{+2} varlığında 69 kDa'luk aktivite bandı dışındaki tüm aktivitelerde inhibisyon olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.4, pH 7.5). Ancak zimogram analizinde benzer inhibisyon sadece Mg^{+2} ve sadece Ca^{+2} varlığında gerçekleştirilen deneylerde de gözlemlenirken agaroz jel analizinde sadece Mg^{+2} 'un inhibisyona neden olduğu, Ca^{+2} varlığında ise DNaz aktivitesinin etkilenmediği görülmüştür (Şekil 3.2). Bu açıdan bakıldığında agaroz jel ile zimogram analizi arasında farklılık bulunmaktadır.

İnhibisyon deneyleri açısından bakıldığında; 10 mM EDTA, 100 μ M ATA ve 5 mM $ZnCl_2$ 'nin vejetatif ve aç *Tetrahymena* DNaz aktivitesi üzerindeki etkilerinin agaroz ve zimogram analizlerinde bir tutarlılık olduğu görülmektedir (Şekil 3.3 ve 3.5 karşılaştırması).

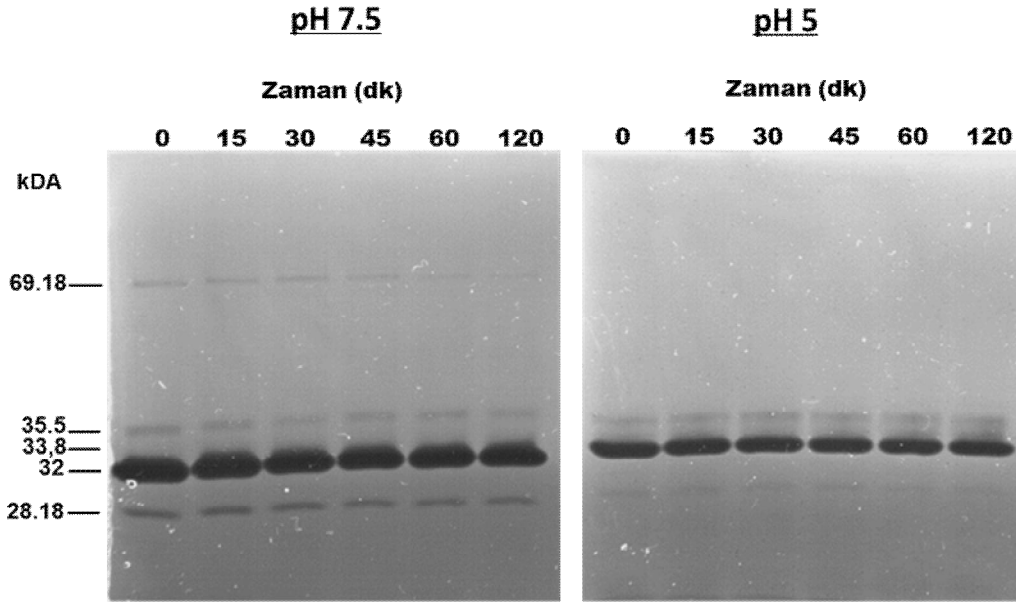
3.1.4. DNA ile muamele edilen aç *Tetrahymena* hücrelerinin DNaz aktivite karakterizasyonu

Açlık stersi altındaki bir hücrenin metabolik faaliyetlerini yerine getirerek hayatta kalabilmesi için besin bulması gerekir. Bu temel mantıktan yola çıkarak aç *Tetrahymena* hücreleri DNA ile muamele edilerek DNaz aktivitesinde bir tetiklenmemin olup olmadığının araştırılması, bu tez çalışmasının ana hipotezini

oluşturmaktadır. Zira DNA'nın yapısında bulunan şeker, fosfat gibi yapılar belirli enerji değerlerine sahiptir [19].

Bu kapsamda DNA ile muamele edilen aç *Tetrahymena* hücrelerinin hücre içi ve hücre dışı DNaz aktivite değişimi incelenmiştir. *Tetrahymena*'nın besiyeri ve açlık tamponuna lizozomal enzimlerini salgıladığı bilinmektedir [20]. DNaz II'ler lizozomal bir enzim olduğundan dış ortama salgılanan bu enzim(ler) arasında DNaz aktivitesinin olup olmadığı analiz edilmiştir. 2 saat süresince DNA ile muamele edilen hücrelerden ve kontrol grubu olarak DNA ile muamele edilmemiş hücrelerden belirli aralıklarla örnek alınmış, hücre peletlerinden RNA ve protein izolasyonu gerçekleştirilirken, dış ortam (açlık tamponu) doğrudan DNaz aktivite analizine alınmıştır.

DNA ile muamele sonrası hücre içi DNaz aktivitesi açısından bir farklılık olup olmadığını belirlemek için 35 µg toplam protein aktivite jelinde koşturulmuş, pH 7.5 ve pH 5'te aktivite deneyi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.6). Deney sonucunda DNA ile muamele edilmemiş hücre grubuna göre (0. zaman) deney grubunda asidik ve nötral DNaz aktivitesinde ciddi oranda bir değişim gözlenmemiştir. Bu veriden yola çıkarak, aç hücrelerin DNA ile muamelesi sonucu, hücre içi DNaz aktivitesinde bir tetiklenme olmadığı söylenebilir.



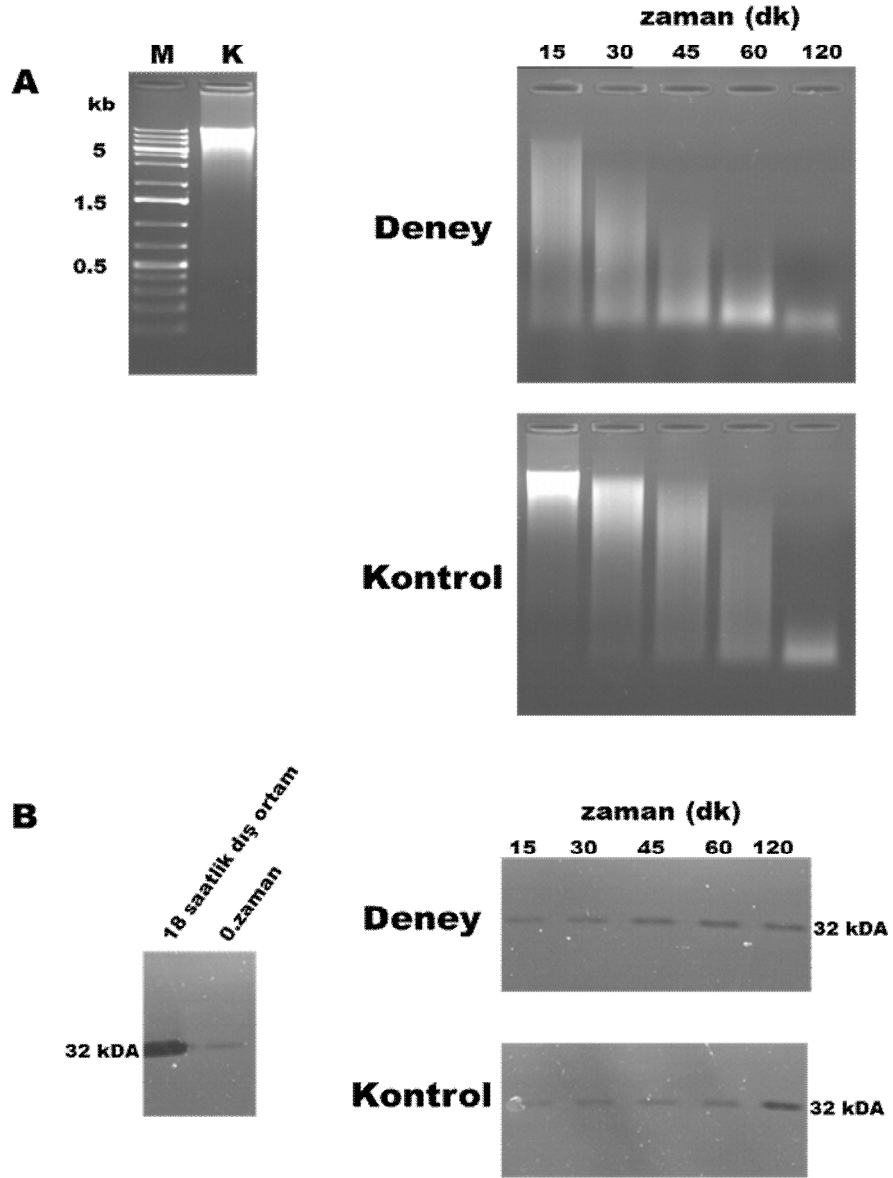
Şekil 3.6. DNA ile muamele edilmiş aç *Tetrahymena*'nın hücreiçi DNaz aktivitesinin analizi. 0. zaman DNA ile muamele edilmemiş hücre grubu

Hücreiçi DNaz aktivitesinde ciddi bir tetiklenmenin meydana gelmemiş olması, *Tetrahymena*'nın hücre dışına DNaz enzim(ler)ini salgılıyor olabileceğini düşündürmüştür. Bu nedenle dış ortamın sahip olduğu DNaz aktivitesini belirlemek ve DNA muamelesine karşı özgün bir aktivitenin oluşup oluşmadığını tespit etmek için, DNA ile muamele edilmiş hücrenin dış ortamı doğrudan agaroz jele yüklenerek DNA parçalanma miktarı belirlenmiştir. Kontrol olarak DNA ile muamele edilmemiş hücre grubunun dış ortamı da deney grubunda olduğu gibi alınmış, aynı zaman aralıklarında ve DNA konsantrasyonunda DNA ile inkübe edilerek reaksiyon gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.6).

DNA ile muamele edilen hücrelerdeki DNA parçalanması (deney) genel anlamda DNA ile muamele edilmeyen hücrelere (kontrol) göre, özellikle ilk 15 ve 30. dk'larda daha yüksek olduğu bulunmuştur (Şekil 3.7A). 120 dk sonunda ise hem deney hem de kontrol grubundaki parçalanma miktarlarının eşit olduğu görülmüştür. Bu veriden yola çıkarak, DNA ile muamele edilmiş aç *Tetrahymena* hücrelerinde dış ortam DNaz aktivitesinde bir tetiklenme olduğu söylenebilir. Ayrıca kontrol grubunda meydana gelen DNA parçalanmasına dayanarak aç *Tetrahymena* hücrelerinin açlık tamponuna, herhangi bir muamele olmaksızın da

DNaz enzimi salgıladığı belirlenmiştir. Ancak bu DNaz aktivitesi, DNA varlığında daha da hızlanmıştır.

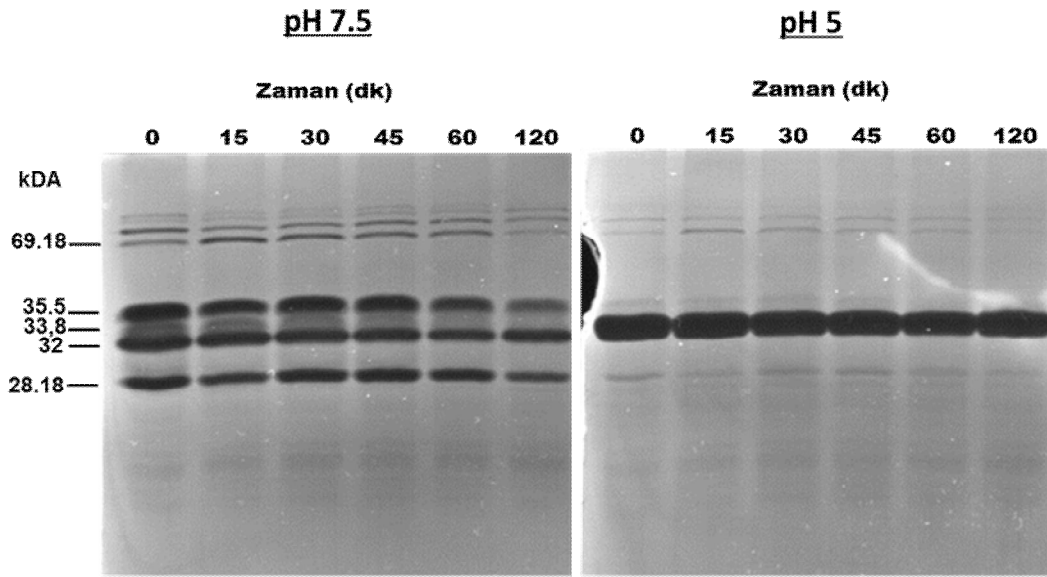
DNA muamelesi sonrası gerçekleşen söz konusu bu aktivite artışının, dış ortama hali hazırda salgılan DNaz proteinin translasyonel olarak düzenlenmesinden mi kaynaklandığı, yoksa daha önce hiç üretilmeyen ve açlık tamponuna salgılanmayan başka bir DNaz tarafından mı gerçekleştiğini belirlemek için zimogram aktivite analizi yapılmıştır (Şekil 3.7B). Zimogram analizi sonucunda hem DNA ile muamele edilmiş hücre grubunda hem de muamele edilmemiş kontrol grubunda 32 kDa büyüklüğünde bir aktivite tespit edilmiştir. Ancak aktivite bant yoğunlukları karşılaştırıldığında, çok büyük bir fark olmamakla birlikte deney grubundaki aktivite bantlarının (özellikle 45 ve 60. dk) kontrol grubuna oranla daha yoğun oldukları gözlemlenmiştir. 18 saatlik dış ortamda ise DNaz aktivitesinin maksimum olduğu, 0. zamanda da bir miktar aktivitenin var olduğu tespit edilmiştir. Öte yandan zimogram analizi sonucunda dış ortamda çalışılan deneysel şartlar altında 32 kDa büyüklüğünde bir aktivite tespit edildiğinden, agaroz jel analizinde gösterilen aktivite farklılığının bu proteinden kaynaklıyor olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 3.7. DNA ile muamele edilmiş aç *Tetrahymena*'nın dış ortama salgıladığı DNaz aktivitesinin analizi. **A)** Dış ortam DNaz aktivitesinin agaroz jel ile analizi. Deney grubu DNA ile muamele edilmiş, Kontrol grubu DNA ile muamele edilmemiş hücre grubu. M, DNA markerı. K, kontrol grubunda kullanılan substrat 500 ng salmon sperm DNA'sı. **B)** Dış ortam DNaz aktivitesinin zymogram aktivite jeli ile analizi.

3.1.5. DNA ile muamele edilen vejetatif *Tetrahymena* hücrelerinin DNaz aktivite karakterizasyonu

Aç hücrelerin DNA muamelesi sonrası hücre içi DNaz aktivitesinde herhangi bir değişimin olmaması, vejetatif hücrelerdeki durumun test edilmesi gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu nedenle benzer deneysel adımlar aç hücrede olduğu gibi tok, vejetatif *Tetrahymena* için de uygulanmıştır.

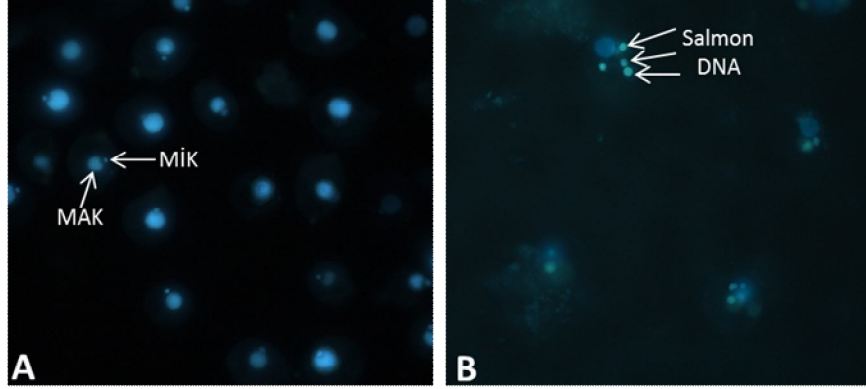


Şekil 3.8. DNA ile muamele edilmiş vejetatif *Tetrahymena* hücrelerin hücre içi DNaz aktivitesinin zimogram analizi

Aç hücrelerde olduğu gibi DNA ile muamele edilmiş vejetatif *Tetrahymena*'nın hücre içi DNaz aktivitesinde de önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. (Şekil 3.8). Bu nedenle aç hücrelerde olduğu gibi açlık stresinde olmayan ve zengin besiyerinde geliştirilen vejetatif hücrelerin de besiyeri ortamına DNaz(ları)nı salabileceği düşünülmüş ve besiyeri ortamının DNaz aktivitesi de analiz edilmiştir.

Aç ve vejetatif hücrelerin hücre içi DNaz aktiviterinde önemli derecede bir aktivite değişiminin meydana gelmemesi, substrat DNA'sının hücre içine girip girmediği sorusunu ortaya çıkarmıştır. Bu neden DNA ile muamele edilmiş

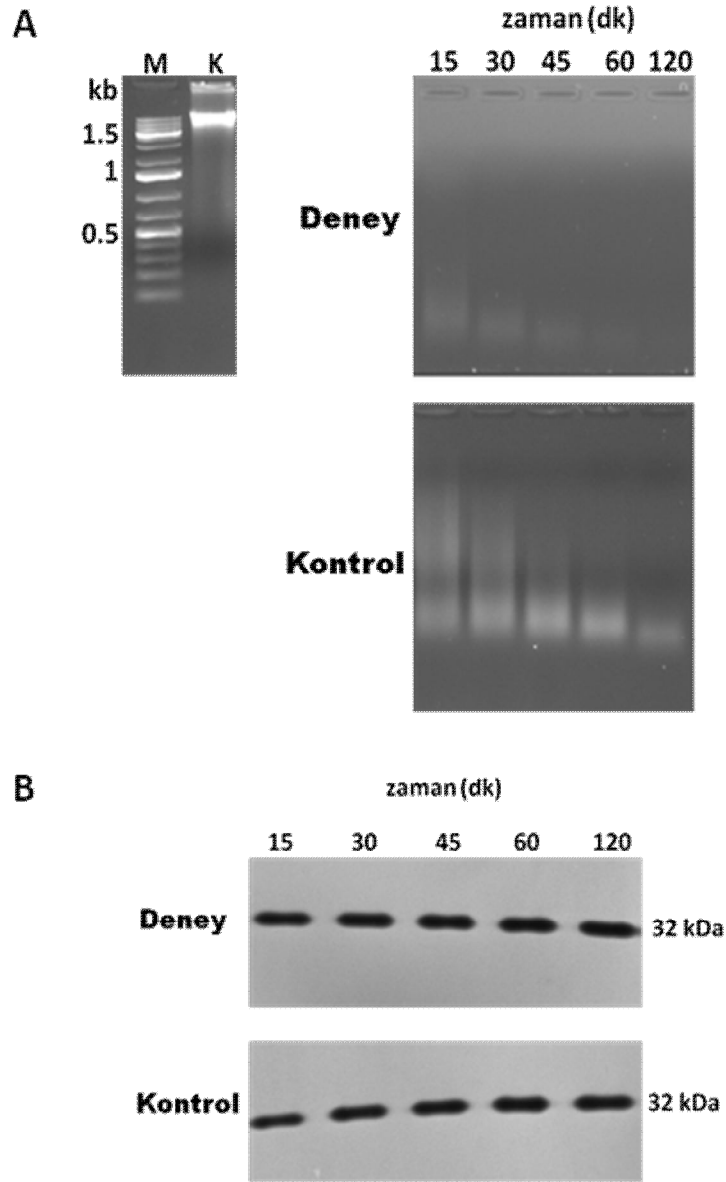
olan hücreler Hoechst floresan boyası ile boyanarak mikroskopik analiz yapılmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. DNA ile muamele edilmemiş (A) ve edilmiş (B) hücrelerin Hoechst boyaması sonrası mikroskopik analizi. MAK: Makro çekirdek, MİK: Mikro çekirdek. Görüntüleme aç hücrelerin DNA ile 2 saat muamale sonrası çekilmiştir.

DNA ile muamele edilmemiş hücrelerde sadece MİK ve MAK görülürken (Şekil 3.9A), DNA ile muamele edilmiş hücre grubunda (Şekil 3.9B) MİK ve MAK'a ek olarak hücre içinde bazı küçük yapılar görülmektedir. Bu veriden yola çıkarak substrat olarak kullanılan salmon sperm DNA'sının hücre içine *Tetrahymena* tarafından alındığı sonucuna ulaşılmıştır.

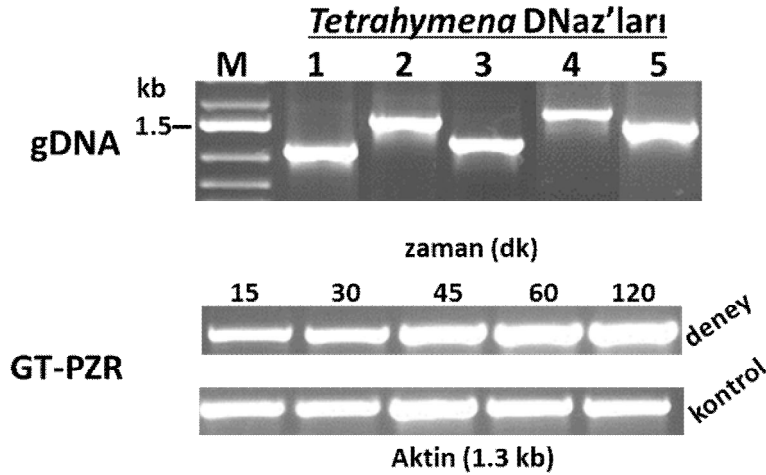
DNA ile muamele edilmiş vejetatif hücrelerin de hücre dışı DNaz aktivitesi araştırılmış ve aç hücrelerin salgıladığı aynı DNaz'ı tok hücrelerin de salgıladığı görülmüştür (Şekil 3.10). DNA muamlesine bağlı olarak zimogram sonucunda bir aktivite değişimi görülmezken agaroz jelde deney grubunda artış görülmüştür. Bu farklılık deneysel olarak tekrarın gerektiğini göstermektedir.



Şekil 3.10. DNA ile muamele edilmiş vejetatif *Tetrahymena*'nın dış ortama salgıladığı DNaz aktivitesinin analizi. **A)** Dış ortam DNaz aktivitesinin agaroz jel ile analizi. Deney grubu DNA ile muamele edilmiş, Kontrol grubu DNA ile muamele edilmemiş hücre grubu. M, DNA markerı. K, kontrol grubunda kullanılan substrat 500 ng salmon sperm DNA'sı. **B)** Dış ortam DNaz aktivitesinin zymogram aktivite jeli ile analizi.

3.1.6. Geri-transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GT-PRZ) ile *Tetrahymena* DNaz II genlerinin mRNA ifade analizi

Biyoinformatiksel olarak belirlenmiş *Tetrahymena* DNaz II genlerinin DNA muamelesine sonucunda mRNA seviyelerinde bir değişimin olup olmadığını belirlemek amacıyla GT-PRZ ile analizler yapılmıştır. Her bir DNaz II geni için özgün primerler tasarlanmış ve primerlerin T_m optimizasyonu genomik DNA (gDNA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ardından DNA ile muamele edilmiş hücrelerden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiş ve GT-PZR ile DNaz II genlerinin mRNA ifade değişimi belirlenmeye çalışılmıştır (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. *Tetrahymena* DNaz II genlerinin mRNA ifade analizi

Şekil 3.10’da görüldüğü üzere gDNA ile gerçekleştirilen PZR reaksiyonunda beklenen büyüklüklerde ürün oluşumu gözlenirken GT-PZR reaksiyonunda sadece kontrol geni aktinden ürün elde edilebilmiş, *Tetrahymena* DNaz genlerinde ise herhangi bir ürün oluşumu gözlenmemiştir. Yapılan değişik PZR optimizasyonları da beklenen sonucu vermemiştir. Beklenildiği üzere aktin geninin mRNA ifadesi deney ve kontrol grubunda benzer sonuçlar vermiştir.

3.2. Biyoinformatiksel Analizler

Bu tez çalışması kapsamında *Tetrahymena* genomu tarafından kodlanan olası DNaz genlerinin tanımlanması, birbirleri ve diğer DNaz'lar ile olan benzerlik matrislerinin ve filogenetik ağaçların yapılandırılması çalışmanın biyoinformatiksel analiz kısmını oluşturmaktadır.

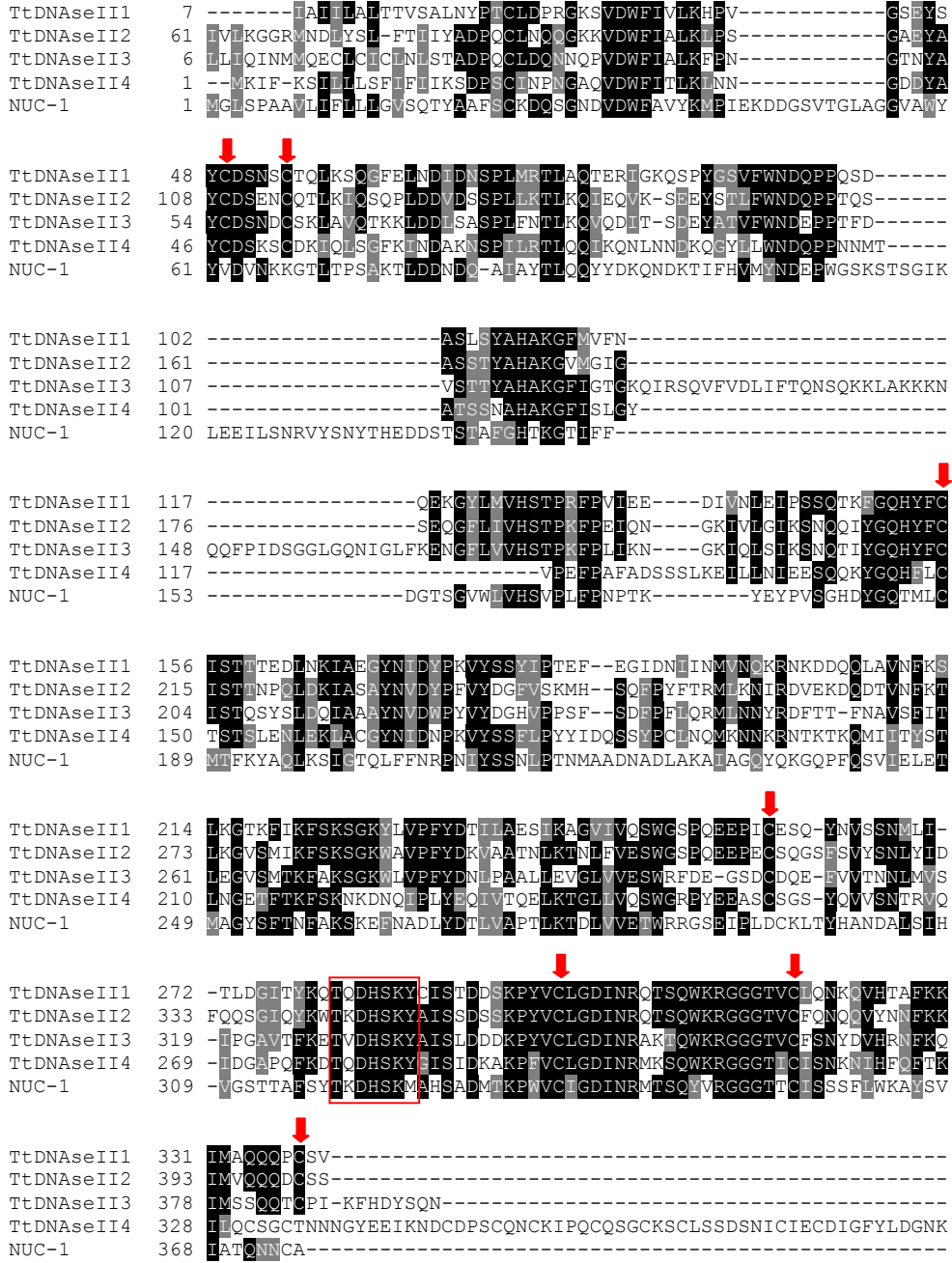
3.2.1. *Tetrahymena* genomunda DNaz II genlerinin taranması

Agaroz ve zimogram analizleri sonucunda *Tetrahymena* toplam proteinin asidik şartlarda en yüksek DNaz aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Bu nedenle *Tetrahymena* genomunda DNaz II benzeri proteinlerin bulunup bulunmadığının tespiti önemli görülmüştür.

Bu kapsamda deneysel olarak DNaz II olduğu bilinen genlerin protein dizileri kullanılarak *Tetrahymena thermophila* SB210 genomunda BLAST analizi yapılmıştır. BLAST analizi sonucunda 5 adet DNaz II benzeri gen bulunmuştur.

BLAST analizi için bulucu olarak *Caenorhabditis elegans* NUC-1 geninin protein dizisi kullanılmıştır. Apoptotik yolda görev alan bu genin hem dizisel hem de aktivite açısından memeli DNaz II homologu olduğu belirlenmiştir [21]. *Tetrahymena* aday DNaz II genleri ile NUC-1 geninin protein dizisi ClustalW programı ile dikey olarak hizalanmış ve motifsel analiz yapılmıştır (Şekil 3.12).

Analiz sonucu bulunan genlerin gen bankası erişim numaraları ve uygun görülen kısaltmaları şöyledir: TtDNazII-1 (TTHERM_00028710), TtDNazII-2 (TTHERM_00028680), TtDNazII-3 (TTHERM_00028670), TtDNazII-4 (TTHERM_00122420) ve TtDNazII-5 (TTHERM_00495970).



Şekil 3.12. *Tetrahymena* DNaz II aday genlerinin ClustalW programı ile dikey hizalaması. Siyah renkle gölgelendirilmiş amino asitler korunmuş bölgeleri göstermektedir. Kırmızı dikey oklar disülfid bağ oluşumunda sorumlu olduğu düşünülen sistein amino asit blokları. Kırmızı kutu içine alınmış bölge ise aktif katalitik merkezi göstermektedir.

DNaz II'lerin katalitik bölgesinde **TxDHSKW** motifi korunmuş olarak yer alır [8]. Şekil 3.6'da kırmızı kutu ile gösterildiği üzere *Tetrahymena* DNaz II'lerinde bu motif **TxDHSKY** şeklini almıştır, yani yüksek ökaryotlarda bu motif

apolar triptofan (W) amino asidi ile sonlanırken *Tetrahymena*'da polar trozin (Y) amino asidi bulunmaktadır. Şekil 3.12'de oldukça korunmuş birkaç motif daha göze çarpmakla birlikte bu bölgelerin biyolojik görevleri hakkında literatürde bir bilgi mevcut değildir.

DNaz II'lerin disülfid bağı içerdikleri bilinmektedir [22]. Disülfid bağı sistein (C) amino asitleri arasında kurulan kovalent bir bağdır. *Tetrahymena* DNaz II aday genlerinde 7 adet korunmuş sistein bloğu tespit edilmiştir (Şekil 3.12 kırmızı oklar). Ancak bu sistein amino asitlerinden hangilerinin disülfid köprülerinin oluşumuna katıldıklarının tespiti için deneysel çalışma gerekmektedir.

Çizelge 3.1. *Tetrahymena* aday DNaz II proteinlerinin kendileri ve NUC-1 ile olan benzerlik ve aynılık yüzdeleri. Açık gri bloklar benzerlik, koyu gri bloklar aynılık değerleridir.

	1	2	3	4	5	6
1. TtDNazII-1		46.4	41	20.2	19	28.5
2. TtDNazII-2	59.5		44.8	18.7	18.9	24.3
3. TtDNazII-3	58	62.9		18.3	18.5	26.6
4. TtDNazII-4	29	29.7	29		14.8	12.9
5. TtDNazII-5	42.1	44.8	40.8	27.2		18.5
6. NUC-1	45.3	44.8	46.1	22.1	40.6	

Genel olarak DNaz enzimlerinin aktif bölgesinde yer alan amino asitler korunmuş olarak bulunurken, aktif bölge dışında bulunan amino asitler türler arasında hatta aynı türde dahi büyük farklılık gösterebilmektedir. *Tetrahymena* aday DNaz II proteinlerindeki bu durumu belirlemek için aday genlerin amino asit dizileri kendi aralarında ve deneysel olarak DNaz II olduğu belirlenmiş NUC-1 ile benzerlik-aynılık analizine alınmıştır (Çizelge 3.1). Analiz sonucuna göre NUC-1 proteini ile en yüksek amino asit benzerliğine sahip *Tetrahymena* DNaz II'si TtDNaz II-3'tür. Bu proteinin NUC-1 ile olan aynılık yüzdesi ise 26.6'dır. Aynılık yüzdeleri 44.8 olan TtDNaz II-2 ile TtDNaz II-3'ün, amino asit benzerlikleri en yüksek olan iki aday protein oldukları belirlenmiştir.

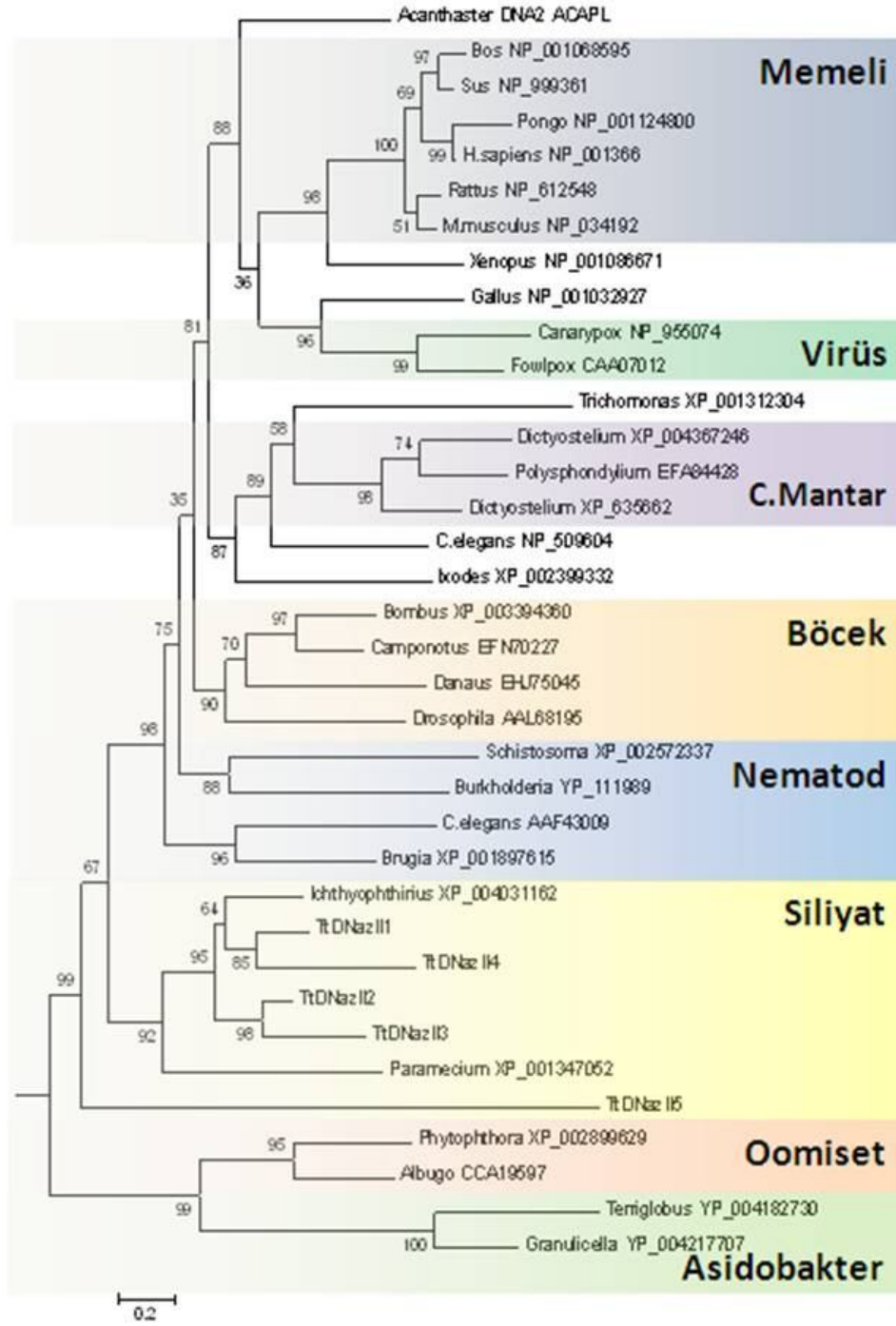
3.2.2. DNaz II genlerinin genel filogenetik analizi

DNaz II enzim ailesi üyelerinin tüm organizmal dünyayı temsil eden filogenetik analizi daha önce tanımlanmıştır [23]. Ancak gelişen DNA dizileme teknikleri sayesinde genom projesi ve anotasyonu tamamlanan organizmalara sürekli yeni katılımların olması DNaz II açısından güncel bir analizi gerekli kılmıştır.

DNaz II enzimlerinin mayalarda ve bitkilerde bulunmadığı, bunun dışında diğer canlı gruplarında yayılış gösterdiği bilinmektedir. Dahası 2000 yılına kadar bakterilerde de varlığı tespit edilememiş, sonrasında *Burkholderia* ile yapılan analizler sonucunda bu bakterinin DNaz II benzeri genlere sahip olduğu ortaya çıkmıştır [24].

Tetrahymena genomu tarafından kodlanan DNaz II benzeri genlerin evrimsel resimdeki yerlerini belirlemek ve diğer DNaz II'ler ile olan ilişkisini ortaya koymak amacıyla filogenetik analiz yapılmıştır. Bunun için NCBI ve SuperFamily 1.75 veri tabanları kullanılarak DNaz II protein popülasyonu oluşturulmuş ve internet tabanlı www.phylogeny.fr sitesinden ağaç yapılandırılması gerçekleştirilmiştir. Sitenin filogenetik analiz kısmından “**A la Carte**” modu kullanılmıştır. Bu yöntemle protein dizilerinin dikey hizalaması **MUSCLE** programı, filogenetik ağacın görüntülenmesi ise **TreeDyn** programı ile gerçekleştirilmiştir. Filogenetik ağaç yapılandırılmasında tercih edilen istatistiki yaklaşım ise **Maximum Likelihood (ML)** olarak belirlenmiştir. A la Carte modu ile tüm bu analizlerin tek seferde yapılması mümkündür.

ML ağacının genel topolojisi incelendiğinde organizmal gruplaşmanın olduğu görülmektedir (Şekil 3.13). Asidobakter ve oomiset üyelerinin oluşturduğu dörtlü klad (clade), filogenetik ağacın dış grubunu oluşturmuştur. Bu tez çalışmasının ana kapsamı dışında olmakla beraber, birer asidobakter olan *Granulicella* ve *Terriglobus* genomlarının DNaz II benzeri bir protein kodladığı ilk kez bu tez kapsamında bulunmuştur. Asidik şartlarda aktivite gösteren DNaz II enzimlerine asidik şartlarda yaşayan bakterilerde de rastlanması ilgi çekici görülmüştür.



Şekil 3.13. DNaz II enzim ailesinin maksimum likelihood filogenetik analizi. Her bir genin gen bankası erişim numarası cins isminden sonra gelmektedir.

Tetrahymena DNaz II üyeleri ise çok hücrelilerin oluşturduğu ana grubun dış grubu olarak filogenetik ağaçta yer almıştır. Bunlar arasında TtDNaz II-5'in diğer *Tetrahymena* DNaz II proteinlerine göre daha ilkin karaktere sahip olduğu görülmüştür. Düşük ökaryot olarak tanımlanan *Tetrahymena*'nın yüksek ökaryotlara dış grup olması evrimsel analiz açısından kabul edilebilir bir durumdur.

DNaz II enziminin bakteri dünyasında ilk tanımlandığı organizma olan *Burkholderia* ise *C.elegans* ve *Brugia* gibi nematodların oluşturduğu gruba yakın bir yerde pozisyonlanmıştır. Toprakta yayılış gösteren *C.elegans*'ın *Burkholderia* tarafından enfekte edildiği bilinmektedir [25]. Bu nedenle evrimsel olarak birbirine uzak bu iki tür arasında görülen bu yakınlık lateral gen transferi ile açıklanabilir. *Canarypox* ve *Fowlpox* virüsleri de çeşitli kümes hayvanlarını enfekte eden virüslerdir. *C.elegans-Burkholderia* örneğinde olduğu gibi bu virüsler de bir kuş olan *Gallus* ile yakın bir bölgede pozisyonlanmışlardır. Elde edilen bu veriler ışığında DNaz II enzimlerinin lateral gen transferi vasıtasıyla çeşitli taksonlar arası geçişe uygun bir enzim ailesi olduğu ileri sürülebilir.

Elde edilen filogenetik ağacın doğruluğunu sınamak adına **Neighbour joining (NJ)** algoritması ile de analiz yapılmış ve ML ağacında olduğu gibi nodları yüksek istatistiki değerlere sahip veriler elde edilmiştir.

Tetrahymena DNaz'larını kendi içinde değerlendirmek için sadece 5 *Tetrahymena* DNaz II aday geninin olduğu ML ağacı oluşturulmuştur. Oluşturulan yeni ağaçta da *Tetrahymena* DNaz'ları genel ağaçta aldıkları pozisyonlarla aynı topolojiyi vermişlerdir.

4.TARTIŞMA

DNA molekülünü parçalayan DNaz enzimlerinin çeşitli biyolojik ve biyoteknolojik öneme sahip oldukları bilinmektedir. Bu yüzden birçok farklı organizmanın DNaz enzimleri hem biyolojik hem de biyoteknolojik açıdan araştırılmaktadır. Gün geçtikçe biyoteknolojik potansiyeli daha da artan *Tetrahymena*’nın DNaz enzimleri ile ilgili “kapsamlı genel” bir karakterizasyon çalışması bulunmadığından, bu tez çalışması özgün bir nitelik taşımaktadır.

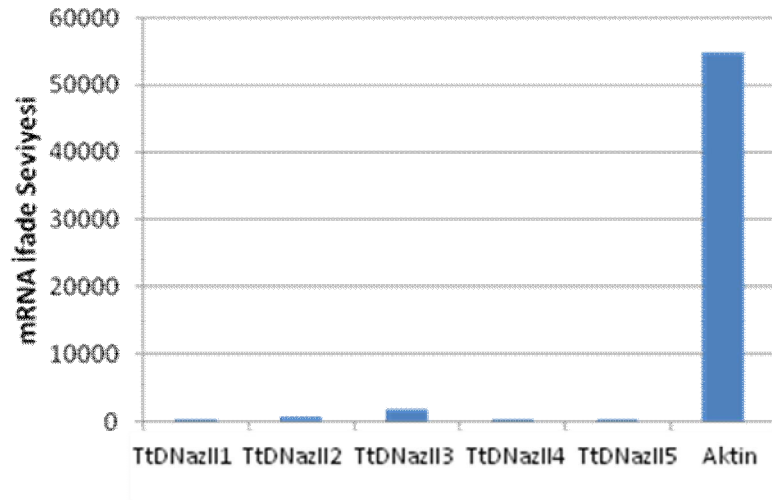
Bu çalışma ile *Tetrahymena* “**çözünür**” DNaz’larının genel karakterizasyonu yapılmış ve DNA ile muamele edilmiş hücrelerde DNaz aktivite potansiyeli kısmen de olsa belirlenmiştir. Bu çalışma bulguları, *Tetrahymena*’nın protein üretim konakçısı olma potansiyelinin artmasına ve DNaz aktivitesi azaltılmış ya da tamamen yok edilmiş rekombinant ırklar geliştirilmesi açısından, bu amaca uygun hedef genlerin belirlenmesine katkıda bulunmaktadır. Zira çeşitli insan enzimlerinin *Tetrahymena*’da fonksiyonel olarak üretildiği bilinmektedir. Gelecekte *Tetrahymena*’nın daha yaygın olarak ökaryotik protein üretiminde kullanılıyor olabilmesi için DNaz enzimlerini kodlayan genlerden bazılarının bertaraf edilerek yeni ırkların geliştirilmesi gerekecektir. Buna benzer yaklaşımlar literatürde de mevcuttur. Örneğin *Frankia* cinsine ait çeşitli türlerin *E.coli*’ye alternatif klonlama ve protein üretim konakçısı olabileceği düşünülmüş, ancak yapılan deneyler sonucu, bu organizmanın düşük transformasyon verimliliğine sahip olduğu görülmüştür. Bunun üzerine farklı *Frankia* türlerinin DNaz aktiviteleri incelenmiş ve oldukça kuvvetli hücre içi ve hücre dışı DNaz aktivitesine sahip oldukları belirlenmiştir [26]. Benzer çalışmalar ökaryotik sistemlerde de denenmiştir. Örneğin çıplak DNA’nın ve viral olmayan vektörlerin memeli hücrelerine başarılı bir şekilde aktarılmasında DNaz II enzimlerinin bir bariyer teşkil ettikleri rapor edilmiştir [13]. Bu raporda, transfeksiyon verimliliğinin en düşük olduğu hücrelerde DNaz II aktivitesinin en yüksek olduğu bulunmuş ve DNaz II genleri susturulmuş (knock-out edilmiş) hücrelerde ise transfeksiyon verimliliğinin normal hücrelere oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde *Tetrahymena* DNaz’larının bu çalışma ile aktivite davranışlarının belirlenmesi, olası yeni ırkların geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

Brunks ve Navas, *Tetrahymena*'ya DNA aktarımında kullanılmak üzere geliştirdikleri elektroporasyon yönteminde, hücrelerin açlık tamponuna DNaz II özelliklerine sahip bir DNaz salgıladığını ve bu DNaz aktivitesinin de transformasyon verimliliğini önemli ölçüde düşürdüğünü bildirmişlerdir [5]. Bu aktiviteyi bertaraf etmek için elektroporasyon öncesi hücreler nötral pH'da HEPES ile muamele edilerek ortam pH'sı nötr seviyeye getirilmeye çalışılmıştır. Ancak söz konusu çalışmada bu DNaz aktivitesinin karakterizasyonuna yer verilmemiştir. Bu tez çalışması ile belirlenen hücre dışına salgılanan ve nötral şartlarda aktiviteye sahip 32 kDa büyüklüğündeki proteinin elektroporasyon verimini düşüren DNaz'lardan biri olma ihtimali yüksektir. Bu nedenle yüksek transformasyon verimliliğine sahip ırkların geliştirilmesinde hedef gen olarak 32 kDa'luk proteini kodlayan gen, ilk hedef olarak ortaya çıkmıştır.

DNA ile muamele edilmiş hücrelerin hücre içi DNaz aktivitesinde ise önemli bir değişiklik olmamıştır. Bu durum hücre içinde hali hazırda var olan (housekeeping) DNaz aktivitesinin hücre içine giren yabancı DNA'yı parçalamak için yeterli olduğu fikrini düşündürmektedir. Bu noktada DNA'nın hücre içine girip girmediğinin sınanması gerekliliği ortaya çıkmış ve DNA ile muamele edilmiş aç hücreler Hoechst floresan boyası ile boyanıp mikroskopta incelenmiştir (Şekil 3.9). DNA ile muamele edilmemiş kontrol grubunda sadece MAK ve MİK boyanırken (Şekil 3.9A), DNA ile muamele edilmiş hücre grubunda hücre içinde MAK ve MİK'e ek olarak MİK boyutunda bazı yapılar görülmektedir (Şekil 3.9B). Bu yapılara kontrol grubunda rastlanılmamış olması bunların salmon sperm DNA'sı olma ihtimalini desteklemektedir. Literatürde ise çıplak DNA'nın *Tetrahymena* sitoplazmasına doğal yollardan giriş yaptığına dair bir veri bulunmamaktadır. Öte yandan *Tetrahymena* sitoplazmasına salmon sperm DNA'sının giriş yaptığı varsayılması durumunda DNA'nın sağlamlığı hakkında bir bulgu bulunmamaktadır. Zira transformasyon çalışmalarında genellikle halkasal rekombinant vektörler kullanılır ve bu vektörlerde meydana gelebilecek tek bir kırılma (çentik) bile transformasyonun başarısızlıkla sonuçlanmasına neden olabilir.

DNaz aktivite bantlarındaki proteinleri kodlayan gen dizilerinin MS/MS-MALDI/TOFF ile belirlenmesinden sonra bu genlere ait transkriptlerin aç

hücrelerin DNA muamelesine bağlı ifade değişimi, geri transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (GT-PZR) yöntemi ile analizi planlanmıştı. Fakat MALDI-TOF sonuçlarının negatif çıkması nedeniyle bu analiz, biyoinformatiksel olarak belirlenen beş adet *Tetrahymena* DNaz II genleri üzerinden gerçekleştirilmiştir. Ancak GT-PZR sonuçlarına göre bu genlerde mRNA ifadesi bu yöntemle 35 döngü ve Tekrar-PZR yapılmasına rağmen elde edilememiştir. Bu durum *Tetrahymena* DNaz II genlerinin düşük veya transkripsiz mRNA ifade profiline sahip olmalarıyla açıklanabilir. Miao ve arkadaşlarının (2009) mikroçip yöntemi ile oluşturdukları *Tetrahymena* transkriptomik veri tabanı değerleri kullanılarak, DNaz II genleri ile GT-PZR deneyinde kontrol olarak kullanılan aktin geninin mRNA ifade seviyeleri grafik olarak karşılaştırmalı çizilmiştir (Şekil 4.1) [3]. Bu grafiğe göre DNaz II genlerinin açlık evresindeki mRNA ifadelerinin aktin genine oranla oldukça düşük olması, yaptığımız GT-PZR deneyindeki bulguları destekler durumdadır.



Şekil 4.1. *Tetrahymena* DNaz II genlerinin 15 saatlik açlık anındaki mRNA ifade seviyeleri. Katalaz geninin erişim numarası TOTHERM_00190950. Bu şekil <http://tfgd.ihb.ac.cn/> sitesinden yararlanılarak oluşturulmuştur [3].

5.SONUÇ

Bu tez çalışması kapsamında aç ve vejetatif *Tetrahymena* hücrelerinin DNaz aktivite davranışları toplam protein üzerinden agaroz ve zimogram deneyleri ile belirlenmiş ve en yüksek DNaz aktivitesinin asidik şartlarda gerçekleştiği bulunmuştur. Zimogram deneyleri sonucunda toplamda moleküler büyüklükleri 28-69 kDa arasında değişen beş DNaz aktivite bandı belirlenmiştir. Divalent katyonlardan magnezyumun nötral DNaz aktivitesi üzerinde inhibe edici bir etkisi olduğu görülmüştür. Vejetatif hücreler, aç hücrelere göre daha fazla protein ve DNaz aktivitesine sahiptir. Hücre içi DNaz aktivitelerine ilaveten 32 kDa büyüklüğünde hücre dışı bir DNaz aktivitesi de tespit edilmiştir.

Aç *Tetrahymena* hücreleri DNA ile muamele edildiğinde DNaz aktivitelerinde bir tetiklenmenin olabileceği hipotezi kurulmuş, agaroz ve zimogram deneyleri ile DNA ile muamele edilmiş aç hücrelerin hücre dışı DNaz aktivitesinde kısmen de olsa bir artış olduğu gösterilmiştir. Özellikle hücre dışına salgılanan bu proteini kodlayan genin geri genetik yöntemi ile belirlenmesi, transformasyon açısından uygun “DNazı-susturulmuş (deficient)” *Tetrahymena* ırklarının geliştirilmesi açısından önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Blackburn, E. ve Gall, J.G., "A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*," *Journal of Molecular Biology.*, **33:53**, 1978.
- [2] Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, K., Sands, J., Gottschling, D.E. ve Cech, T.R., "Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*," *Cell.*, **31:1**, 147–57, 1982.
- [3] Miao, W., Xiong, J., Bowen, J., Wang, W., Liu, Y., Braguinets, O., Grigull, J., Pearlman, R.E., Orias, E. ve Gorovsky, M.A., "Microarray analyses of gene expression during the *Tetrahymena thermophila* life cycle," *PLoS One.*, 4:2, 4429, 2009.
- [4] Kobayashi, T. ve Endoh, H., "A possible role of mitochondria in the apoptotic-like programmed nuclear death of *Tetrahymena thermophila*," *The FEBS Journal.*, **272:20**, 5378–5387, 2005.
- [5] Brunk., C.F. ve Navas., P. "Transformation of *Tetrahymena thermophila* by electroporation and parameters effecting cell survival," *Exp Cell Res.*, **147:2**, 525-532, 1988.
- [6] Yang, W., "Nucleases: diversity of structure , function and mechanism," *Q Rev Biophys.*, **1**, 1–93., 2011.
- [7] Zannoni, A., Spinaci, M., Bernardini, C., Bacci, ML., Seren, E., Mattioli, M. ve Forni, M., "DNase I activity in pig MII oocytes: implications in transgenesis," *Reproduction.*, **131:3**, 461–468, 2006.
- [8] Shiokawa, D.ve Tanuma, S., "Characterization of human DNase I family endonucleases and activation of DNase gamma during apoptosis," *Biochemistry.*, **40:1**, 143–152, 2001.
- [9] Shak, S., Capon, D. J., Hellmiss, R., Marsters, S.A. ve Baker, C.L., "Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum," *PNAS.*, **87-23**, 9188–9192, 1990.
- [10] Evans, C.J. ve Aguilera, R.J., "DNase II: genes, enzymes and function," *Gene.*, **322**, 1–15, 2003.

- [11] Weide, T., Herrmann, L., Bockau, U., Niebur, N., Aldag, I., Laroy, W., Contreras, R., Tiedtke, A. ve Hartmann, W.W., “Secretion of functional human enzymes by *Tetrahymena thermophila*,” *BMC Biotechnology*, **6:19**, 2006.
- [12] Aldag, I., Bockau, U., Rossdorf, J., Laarmann, S., Raaben, W., Herrmann, L., Weide, T.ve Hartmann, W.W., “Expression, secretion and surface display of a human alkaline phosphatase by the ciliate *Tetrahymena thermophila*,” *BMC Biotechnology*, **11:11**, 2011.
- [13] Howell, DP., Krieser, RJ., Eastman, A. ve Barry, MA., “Deoxyribonuclease II is a lysosomal barrier to transfection,” *Molecular Therapy*, **8:6**, 957–963, 2003.
- [14] Zhang, X., ve Thompson, G.A. Jr., “An apparent association between glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and a sphingolipid in *Tetrahymena mimbres*,” *Biochemistry Journal*, **206**, 197–206, 1997.
- [15] Campanella, J.J., Bitincka, L., ve Smalley, J., “MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences,” *BMC Bioinformatics*, **4:29**, 2003.
- [16] Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. ve Kumar, S., “MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods,” *Molecular Biology and Evolution*, **28:10**, 2731–2739, 2011.
- [17] Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.M. ve Gascuel, O., “Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist,” *Nucleic Acids Research*, **36**, 465–469, 2008.
- [18] Shiomi, K., Midorikawa, S., ve Ishida, M., “Plancitoxins lethal factors from the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci* are deoxyribonucleases II,” *Toxicon*, **44**, 499–506, 2004.
- [19] Bueno, J., Torres, M., Almendros, A., Carmona, R., Nuñez, M.C., Rios, A., ve Gil, A., “Effect of dietary nucleotides on small intestinal repair after diarrhoea. Histological and ultrastructural changes,” *Gut*, **35:7**, 926–933, 1994.

- [20] Tiedtke, A. ve Rasmussen, L., "Release of lysosomal enzymes in *Tetrahymena*: a Ca²⁺ dependent secretory process," *Journal of Cell Science.*, **89**, 167–172, 1988.
- [21] Lyon, C.J., Evans, C.J., Bill, B.R., Otsuka, A.J. ve Aguilera, R.J., "The *C.elegans* apoptotic nuclease NUC-1 is related in sequence and activity to mammalian DNase II," *Gene.*, **252:1-2**, 147–154, 2000.
- [22] MacLea, K.S., Krieser, R.J. ve Eastman, A., "Structural requirements of human DNase II α for formation of the active enzyme: the role of the signal peptide, N-glycosylation, and disulphide bridging," *Biochemistry Journal.*, **371**, 867–876, 2003.
- [23] Shpak, M., Kugelman, J.R., Varela-Ramirez, A. ve Aguilera, R.J., "The phylogeny and evolution of deoxyribonuclease II: an enzyme essential for lysosomal DNA degradation," *Molecular Phylogenetics and Evolution.*, **47:2**, 841–854, 2008.
- [24] MacLea, K.S., Krieser, R.J. ve Eastman, A., "A family history of deoxyribonuclease II: surprises from *Trichinella spiralis* and *Burkholderia pseudomallei*," *Gene.*, **305:1**, 1–12, 2003.
- [25] O'Quinn, A.L., Wiegand, E.M., Jeddeloh, J.A., "*Burkholderia pseudomallei* kills the nematode *Caenorhabditis elegans* using an endotoxin-mediated paralysis," *Cellular Microbiology.*, **3:6**, 381–93, 2001.
- [26] Tavares, F. ve Sellstedt, A., "DNase activities of the extracellular, cell wall-associated, and cytoplasmic protein fractions of *Frankia* Strain R43," *Applied and Environmental Microbiology.*, **63:11**, 4597–4599, 1997.

EK- 1: Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

- Tris Base (Applichem A2264)
- Borik Asit (Bio Basic, BB0044)
- Sodyum Asetat (Sigma, S2889)
- Glisin (Bio Basic, DR0235)
- Gliserol (Sigma, G5516)
- SimplyBlue SafeStain (Invitrogen, LC6060)
- Magnezyum Klorür (Sigma, M8266)
- Kalsiyum Klorür (Sigma, C1016)
- Çinko Klorür (Sigma, 96468)
- Bovine Serum Albumin, BSA (Sigma, A2153)
- Bradford Solution (Bio Basic, CA-39)
- Salmon Sperm DNA'sı (Sigma, D1626)
- Lamda DNA (NEB, N3011S)
- Triton-X 100 (Sigma, T8787)
- Penisilin-Streptomisin Çözeltisi (Sigma, P4333)
- Aurintrikarboksilik Asit, ATA (Sigma, A0885)
- 100 mM son yoğunlukta olacak şekilde distile su ile çözülerek çözelti hazırlanır. Alüminyum folyoya sarılarak oda sıcaklığında saklanır.
- EcoRI-HindIII Lamda DNA Marker'ı (Thermo, SMO192)
- Protein Standart Marker (Biorad, 161-0017)
- EDTA (Fluka, 03620).

Genellikle 0.5M yoğunluğunda kullanılır. EDTA, pH ayarlaması yapılmadıkça suda çözünmediği için başlangıçta son hacmin yarısı kadar su ile çözülmesi ve yüksek yoğunlukta NaOH ile pH'sının 8.0'a getirilmesi gerekir.

- Etidyum bromür (EtBr), (Sigma, E8751)

Son yoğunluğu 10 mg/ml (0.01 gr/ml) olacak şekilde dH₂O'da çözülerek stok solüsyonu hazırlanır ve 4°C'de saklanır. Agaroz jel elektroforezi için son hacimde 0,5 µg/ml olacak şekilde (40 ml agaroz için 2 µl EtBr) kullanılır.

- 10X TBE Tamponu (Tris-Borik Asit-EDTA)

108 gr Tris base ve 55 gr borik asit 600 ml dH₂O da çözüldükten sonra 40 ml 0.5 M EDTA eklenir. Toplam hacim 1 litreye tamamlanır. Bu şekilde hazırlanan stok TBE'nin çökmemesi için 4°C'de saklanması ve deneylerde 1X (900 ml dH₂O + 100 ml 10X TBE) yoğunluğunda kullanılması gerekir.

- Açlık Tamponu (10 mM Tris-HCl, pH 7.5)

Final yoğunluğu 10 mM olacak şekilde Tris Base tartılır ve distile su ile çözülür. 6N HCl ile pH 7.5'e getirilir. Çözelti 121°C'de 15 dk otoklavlandıktan sonra oda sıcaklığında saklanır.

- SDS-PAGE Paketleme Jel Tamponu (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8)
- SDS-PAGE Ayırma Jel Tamponu (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)
- SDS-PAGE Elektroforez Tamponu

30.3 gr Tris base, 144 gr glisin, 10 gr SDS 1000 mL distile suda çözülür. 1/10 oranında seyreltme yapıldıktan sonra kullanılır.

- Zimogram Renatürasyon Tamponu (%2.5 Triton-X 100)

10 mL Triton-X 100 (Sigma, T8787) distile su ile 400 mL'ye tamamlanır ve manyetik karıştırıcıda tamponun tamamen homojen hale gelmesi sağlanır.

- Zimogram Örnek Yükleme Tamponu

2X olarak hazırlanır ve son yoğunluk 1X olacak şekilde kullanılır. (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, % 0.8 SDS, % 20 gliserol, 20µg/mL BSA ve % 0.02 bromphenol blue)

- Zimogram Aktivite tamponu

Nötral DNaz aktivitesi için 50 mM Tris-HCl, pH 7.5; asidik DNaz aktivitesi için 50 mM NaAc pH 5.0 çözeltileri hazırlanır.

EK- 2: Çalışmada Kullanılan Cihazlar, Kitler ve Enzim Setleri

- Etüv (Genhart, Thermo Shaker THO 220), Santrifüj (Thermo IEC Micromax, Beckman Coulter Microfuge 22R, ve Beckman Coulter Allegra 25R), Otoklav (Eastern Medical, Vertical Autoclave), PZR Cihazı (Biorad, iCycler thermal; Helena Thermal Cycler; Techne), Agaroz Jel Elektroforez Aparatı (Thermo EC Mini Cell EC320, Thermo EC Midi Cell Ec 330 ve BioRad Mini SubCell GT), SDS-PAGE elektroforez aparatı (BioRad Mini Protean Tetra Cell), Güç Kaynağı (Thermo Electrocorporation EC250-90), UV Jel Görüntüleme Kabini (Uvitec M02 4611), pH Metre (Crison), Vorteks (IKA MS2), Su banyosu (Memmert D-91126), Isı bloğu (Thermoblock Clifton B11), Hibridizasyon fırını (Biyometra OV3), Nanodrop (Metek ND-100), Spektrofotometre (UV- 2101 PC Shimadzu), Terazi (Ohaus pro AV812), Manyetik Karıştırıcı (Schott, SLK6).
- RevertAid first strand cDNA sentez kiti (Fermentas, K1622), Qiagene RNeasy Mini Kit (Qiagene, 74106).
- Taq DNA Polymerase, (Fermentas, EP0401), RQ1 RNase-Free DNase II (Promega, M610A), DNase II (Sigma, D5025).

EK-3: *Tetrahymena* DNaz II Protein Dizileri

>TtDNazII-1

MMYKTLIAIILALTTVSALNYPTCLDPRGKSVDWFIVLKHFPVGSEYSYCDNSNSCTQLKSQGFELNDIDNS
PLMRTLQAQTERIGKQSPYGSVFWNDQPPQSDASLSYAHAKGFMVFNQEKGYLMVHSTPRFPVIEEDIVNL
EIPSSQTKFGQHYFCISTTTEDLNKIAEGYNIDYPKVYSSYIPTFEFEGIDNIIINMVNQKRNKDDQQLAVN
FKSLKGTGFIKFSKSGKYLVPFYDTILAESIKAGVIVQSWGSPQEEPICESQYNVSSNMLITLDGITYKQ
TQDHSKYCISTDDSKPYVCLGDINRQTSQWKRGGGTVC LQNKQVHTAFKKIMAQQQPCSV

>TtDNazII-2

MAEIMYHSFIHI IKPKPRSPSISYQHKL LISVFFILINLIMVQEKVFGENSYENLFKKSEIVLKGGRMND
LYSLFTIIYADPQCLNQQGKKVDWFIALKLPSGAEYAYCDSENCQTLKIQSQPLDDVDSSPLLKTLKQIE
QVKSEEYSTLFWNDQPPQTSASSTYAHAKGVMGIGSEQGFLIVHSTPKFPEIQNGKIVLGIKSNQQIYGQ
HYFCISTTNPQLDKIASAYNVDPFYDGFVSKMHSQFPYFTRMLKNIRVEKDQDVTNFKTLKGVSMIK
FSKSGKWAVPFYDKVAATNLKTNLFVESWGWSPQEEPECSQGSFSVYSNLYIDFQQSGIQYKWKTDHISKYA
ISSDSSKPYVCLGDINRQTSQWKRGGGTVC FQNNQVYNNEFKKIMVQQQDCSS

>TtDNazII-3

MDLDYLLIQINMMQECLCICLNLSTADPQCLDQNNQPVDFIALKFPNGTNYAYCDSDNDCSKLAVQTKKL
DDL SASPLFNTLQVQDITSDEYATVFWNDEPPTFDVSTTYAHAKGFIGTGKQIRSQVFVDLIFTQNSQK
KLAKKKNQQFPIDSGGLQONIGLFKENGFLVVHSTPKFPLIKNGKIQLSIKSNQTIYQQHYFCISTQSYS
LDQIAAAYNVWDWPYVYDGHVPPSFDFPFLQRM LN NYRDTTFNAVSFTLEGVSMTKFAKSGKWLVPFY
DNLPAALLEVGLVVESWRFDEGSDCDQEFVVTNNLMVSI PGAVTFKETVDHISKY AISLDDDKPYVCLGDI
NRAKTQWKRGGGTVCFSNYDVHRNFKQIMSSQQT CPIKFHDYSQN

>TtDNazII-4

MKIFKSILLLSFIFIIKSDPSCINPNGAQVDWFITLKLNNGGDYAYCDSKSCDKIQLSGFKINDAKNSPI
LRTLQQIKQNLNNDKQGYLLWNDQPPNNMTATSSNAHAKGFISLGYVPEFPAPADSSSLKEILLNIEESQ
QKYGQHFLCTSTSLLENLEKLACGYNIDNPKVYSSFLPYIDQSSYPCLNQMKNNKRNTKTKQMIITYSTL
NGETFTKFSKNKDNQIPLYEQIVTQELKTG LLVQSWGRPYEEASC SGSYQVVSNTRVQIDGAPQFKDTQD
HSKYGISIDKAKPFVCLGDINRMKSQWKRGGGTICISNKNIHQFTKILQCSGCTNNNGYEEIKND CDPS
CQNC KIPQCQSGCKSCLSSDSNICIECDIGFYLDGNKCSRQCNCEICTQNGNICTQCIENFELDKN SQC
IPTCDQSCLTCSQPQDPDSCLSCKSGSYLTDDNNCKKCISPCTDCEKGDCTQCEQNYIILKNYECLPICD
KSCLTCSSPKNPQSCLTCEE GYYLNKITNECMICGVDC AQCLEADNCTTCKDGF SFNNKKCIKNEVSKT
KICHISCLTCTKSDPNACSSCPPNLFTNLNTCLPYQCDKSCCLTCSSPYNPQSCLTCKGGYYLNKITKQ
CMNCGIDCAQCIESADNCTACKDGYILKNQKCVKSEINKVKTCHNSCLTCTKSDPN SCLSCPPKFFLSN
LNTCLPCQQPCSECKESANTCTSCLENYFLEESKQPIKIEVTRFSYSVLFEPSLLLILYLIFTI

>TtDNazII-5

MTKEIRFLKLLIVIIISLSLTRGDLSCGKIYQQDVAFYVIQSMYPYDVQVKEQIYFGYTDDQNL RSTFNYS
PQNLLFNSSSPISLLISQINDDPSIKFIQWDNNQGKSSLSFSKGLVAIQEESEHGLFFGYSMNNFLKIN
KSKIEMNLNQQDMFGQQFFCISLDLENLEKLAENLLITKINVQFSNISSQLKFKNLSRLQNYLNIHYPL
DYKTVDLNLINSEVIVKMITQNYWIIYNTNISDFESLTIDDQISAILNCDILFKNSKPSVNQCQPHYTS
ETILTIQHKNYKLD SKQDKSKWILCKNNNQNTTFFICLSDL DNYTPRYFHGGNLF CFKSKQLHLQLYSNMI
SSINFCTLDDILHSKPRDNKFTELQENKEEKENPQNYQQDI

EK-4: Çalışmada kullanılan Geri-transkripsiyon PZR primer Dizileri

F-DNazII1XhoI 5' CTCGAGATGATGTATAAACTCTTATTGCC

R-DNazII1ApaI 5' GGGCCCTCAGACACTGCAAGGTTATTATTATG

F-DNazII2XhoI 5' CTCGAGATGGCTGAAATTATGTATCATTC

R-DNazII2ApaI 5' GGGCCCTCAGCTTGAACAGTCTTACTG

F-DNazII3XhoI 5' CTCGAGATGGATTTAGATTATTTACTTATTC

R-DNazII3ApaI 5' GGGCCCTCAATTTTATGAATAATCATGAAAC

F-DNazII4XhoI 5' CTCGAGATGAAAATATTTAAATCTATTTTGC

R-DNazII4 5' AGCAAGAAAGACAAGAATCTGGATC

F-DNazII5XhoI 5' CTCGAGATGACAAAAGAAATTAGATTTTAAAG

R-DNazII5ApaI 5' GGGCCCTCAGATATCTTAATAATAATTTAAAG

F-TtAktin 5' ATGGCTGAAAGTGAATCCCCCGC

R-TtAktin 5' CACTTTCTGTGGACGATGGAAGGACC