

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Бранка Д. Башица

**ФИЛОГЕНЕТСКА АНАЛИЗА
ГЕНА, РАЗВОЈНА, ТКИВНА
И ПОЛНА ДИСТРИБУЦИЈА
ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗА
РИБЕ ЗЕБРИЦЕ – ФУНКЦИОНАЛНА
КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ОДАБРАНИХ
РЕКОМБИНАНТНИХ ПРОТЕИНА**

докторска дисертација

Београд, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Branka D. Bašica

**PHYLOGENETIC GENE ANALYSIS,
DEVELOPMENT-, TISSUE- AND GENDER-
DEPENDENT DISTRIBUTION OF ZEBRAFISH
GLUTATHIONE-S-TRANSFERASES –
FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF
SELECTED RECOMBINANT PROTEINS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

МЕНТОРИ:

др Радмила Ковачевић, професор емеритус
Универзитет у Новом Саду Природно-математички факултет

др Гордана Матић, редовни професор у пензији
Универзитет у Београду Биолошки факултет

КОМИСИЈА:

др Душанка Савић-Павићевић, редовни професор
Универзитет у Београду Биолошки факултет

др Светлана Фа, научни сарадник
Универзитет у Новом Саду Природно-математички факултет

др Небојша Андрић, доцент
Универзитет у Новом Саду Природно-математички факултет

Датум одбране: године

**СПИСАК РАДОВА У КОЈИМА ЈЕ ПРИКАЗАН ДЕО РЕЗУЛТАТА ДОКТОРСКЕ
ДИСЕРТАЦИЈЕ**

1. Glisic, B., Mihaljevic, I., Popovic, M., Zaja, R., Loncar, J., Fent, K., Kovacevic, R., Smital, T., 2015. Characterization of glutathione-S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 158, 50–62. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.10.013>
2. Glisic, B., Hrubik, J., Fa, S., Dopudj, N., Kovacevic, R., Andric, N., 2016. Transcriptional profiles of glutathione-S-Transferase isoforms, Cyp, and AOE genes in atrazine-exposed zebrafish embryos. *Environ. Toxicol.* 31, 233–244. <https://doi.org/10.1002/tox.22038>
3. Bašica, B., Mihaljević, I., Maraković, N., Kovačević, R., Smital, T., 2019. Molecular characterization of zebrafish Gstr1, the only member of teleost-specific glutathione S-transferase class. *Aquat. Toxicol.* 208, 196–207. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.01.005>

Значајан део резултата дисертације плод је уске сарадње са Лабораторијом за молекуларну екотоксикологију Института Руђер Бошковић из Загреба којом руководи др Твртко Смитал. Велику захвалност на дивној сарадњи и стеченом знању дугујем др Смиталу, др Марти Поповић, др Року Жаји, др Јовици Лончару, као и др Николи Маракковићу, а посебно свом драгом пријатељу др Ивану Михаљевићу.

Неизмерну захвалност дугујем свом ментору проф. др Радмили Ковачевић за све, а највише за истрајну и непоколебљиву веру у мене.

Хвала Јелени, драгој пријатељици, која је умела да поправи непоправљиво током свих ових година. Пуно хвала Јовани на пруженој помоћи и подрици на свим нивоима.

Посебну захвалност дугујем др Небојши Андрићу на сугестијама, разумевању и подрици током израде дисертације. Хвала проф. др Едварду Петрију на значајним саветима и сугестијама.

Велико хвала проф. др Гордани Матић, на разумевању и пруженој помоћи током свих деоница овог пута.

Хвала члановима комисије проф. др Душанки Савић-Павићевић и др Светлани Фа на сугестијама и саветима при изради дисертације.

Велику захвалност дугујем мојим пријатељима, бившим и садашњим члановима Катедре за физиологију животиња, на сјајној подрици и потпори. Посебну захвалност дугујем Шандору на помоћи у функционисању гајилишта за зебрице. Хвала колегама са Департмана за хемију, биохемију и заштиту животне средине и Департмана за биологију и екологију, посебно колегама са Катедре за микробиологију за сву помоћ пружену током израде ове докторске дисертације.

Највећу захвалност дугујем породици и пријатељима који су својом љубављу, разумевањем и вером у мене успели да осветле мрачне делове овог дугог пута.

Хвала Емилији.

Дисертацију посвећујем својој породици.

Бранка

ФИЛОГЕНЕТСКА АНАЛИЗА ГЕНА, РАЗВОЈНА, ТКИВНА И ПОЛНА ДИСТРИБУЦИЈА ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗА РИБЕ ЗЕБРИЦЕ – ФУНКЦИОНАЛНА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ОДАБРАНИХ РЕКОМБИНАНТНИХ ПРОТЕИНА

САЖЕТАК

Глутатион-S-трансферазе (GST) припадају вишефункционалној суперпородици ензима и имају разноврсне каталитичке улоге у организму, са основном функцијом конјугације редукованог глутатиона са разноврсним ксенобиотицима у циљу смањења њихове токсичности. Улога Gst у процесу детоксификације код риба је препозната током 1970-их година, али према доступној литератури, само је неколико рибљих ензима Gst функционално окарактерисано. У овој дисертацији урађена је свеобухватна карактеризација ензимске суперпородице Gst зебрица (лат. *Danio rerio*), важном кичмењачком модел организму, са циљем бољег разумевања диверзификације и еволуције, физиолошког значаја и улоге ензима Gst као биомаркера изложености одређеним хемикалијама. Комбинацијом биоинформатичких метода, анализом експримирања гена, експримирањем и пречишћавањем рекомбинантних протеина и применом ензимских тестова и тестирањем инхибиторног потенцијала различитих супстанци урађена је филогенетска анализа, развојна, ткивна и полна дистрибуција иРНК гена *gst* зебрице и функционална карактеризација одабраних рекомбинантних протеина (Gstr1, Gstr2 и Gstr3). Филогенетска анализа је открила 27 чланова суперпородице *gst* у геному зебрице, подељених у 9 класа. Развојна, ткивна и полна дистрибуција иРНК, као и функционална сличност са хуманим ортолозима, указује да су представници класа *Pi*, *Theta*, *Zeta* и *Rho* значајни у процесима биотрансформације ксенобиотика, и да потенцијално могу имати кључну улогу у одређеним физиолошким процесима. Резултати указују на могућу улогу Gstr1 у стероидогенези, метаболизму и/или физиолошкој активности андрогена код риба, на супрот изостанку овакве функције према естрогенима, као и заштити риба од штетних загађивача из спољашње средине, као што су органофосфорни инсектициди и лекови.

Кључне речи: Gst, дистрибуција иРНК, ензимска активност, рекомбинантни протеин, риба зебрица, филогенија, функционална карактеризација

Научна област: Биологија

Ужа научна област: Молекуларна биологија, Физиологија

**PHYLOGENETIC GENE ANALYSIS, DEVELOPMENT-,
TISSUE- AND GENDER-DEPENDENT DISTRIBUTION OF ZEBRAFISH
GLUTATHIONE-S-TRANSFERASES – FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF
SELECTED RECOMBINANT PROTEINS**

ABSTRACT

Glutathione-S-transferases (GSTs) are a superfamily of multifunctional proteins which have diverse roles. Their primary function is a conjugation of reduced glutathione to a variety of xenobiotics in order to alleviate their toxicity. The role of Gsts in the detoxification process in fish was recognized since the 1970s. According to literature, only a few fish Gst enzymes have been functionally characterized. Here, a comprehensive characterization of GSTs in zebrafish (*Danio rerio*), an important model organism, was made in order to better understand the diversification and evolution, the physiological significance, as well as the role of the Gsts as a biomarker of xenobiotic exposure. A combination of bioinformatic methods, gene expression analysis, purification of recombinant proteins, enzymatic tests and analysis of the inhibitory potential of various compounds was conducted to reveal phylogeny, developmental-, tissue- and sex-dependent distribution of the zebrafish *gst* mRNA and functional characterization of selected recombinant proteins (Gstr1, Gstt2, Gstm3). A detailed phylogenetic analysis revealed 27 *gst* genes, divided into 9 classes. The developmental-, tissue- and sex-dependent distribution of mRNA and functional similarity with human orthologs, indicated that representatives of the classes *Pi*, *Theta*, *Zeta*, and *Rho* are important in the biotransformation of xenobiotics. Gsts potentially key role in certain physiological processes was revealed. The results indicated a possible role of Gstr1 in the steroidogenesis, metabolism and/or physiological activity of androgens in fish, as opposed to the absence of such function for estrogen, as well as its role in the protection of fish from harmful environmental pollutants, like organophosphorus insecticides and drugs.

Key words: enzymatic activity, functional characterization, Gst, mRNA distribution, phylogeny, recombinant protein, zebrafish

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Molecular biology, Physiology

САДРЖАЈ

1.	УВОД	1
2.	ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	3
2.1.	Глутатион-S-трансферазе	4
2.1.1.	Опште карактеристике.....	4
2.1.2.	Класификација суперпородице GST.....	5
2.1.3.	Структура ензима GST.....	6
2.1.4.	Филогенија ензимске суперпородице GST	7
2.1.5.	Механизам ензимске реакције конјугације.....	10
2.1.6.	Физиолошке улоге ензима GST	11
2.1.7.	Ензими Gst код рибљих организама.....	13
2.1.8.	Ензими GST као биомаркери изложености ксенобиотицима	14
2.2.	Супстрати и инхибитори унутарћелијских ензима GST	14
2.2.1.	Преглед познатих супстрата ензима GST	14
2.2.2.	Преглед познатих инхибитора ензима GST.....	15
2.2.3.	Преглед емергентних супстанци присутних у воденим екосистемима	17
2.3.	Биотрансформација ксенобиотика	18
2.3.1.	Биотрансформација ксенобиотика код риба.....	19
2.4.	Риба зебрица као модел организам	20
2.4.1.	Предност у односу на друге модел организме.....	20
2.4.2.	Развојни стадијуми ембриона рибе зебрице	20
3.	ЦИЉЕВИ	22
4.	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	24
4.1.	Хемикалије	25
4.2.	Експерименталне животиње — рибе зебрице	26
4.2.1.	Адултне јединке	26
4.2.2.	Ембриони	26
4.3.	Бактеријски сојеви и плазмиди	27
4.3.1.	Бактеријски сојеви.....	27
4.3.2.	Плазмиди.....	28
4.4.	Филогенетска анализа	31
4.4.1.	Идентификација гена <i>gst</i>	31
4.4.2.	Конструисање филогенетског стабла	31
4.4.3.	Ортолошка предвиђања – анализа очуване синтеније.....	31
4.5.	Анализа експримирања гена	32
4.5.1.	Изолација укупне РНК и реверзна транскрипција	32
4.5.2.	Прајмери за PCR.....	32
4.5.3.	Провера специфичности дизајнираних прајмера	33
4.5.4.	Одређивање ефикасности дизајнираних прајмера за гене <i>gst</i>	34
4.5.5.	Релативна квантификација експримирања гена	35
4.6.	Рекомбинантно експримирање протеина	36

4.6.1.	Молекуларно клонирање гена <i>gst</i> рибе зебрице	36
4.6.2.	Припрема компетентних бактерија BL21	38
4.6.3.	Трансформација бактерија BL21	38
4.6.4.	Индукција експримирања рекомбинантних протеина Gst	38
4.7.	Пречишћавање рекомбинантних протеина	39
4.7.1.	Лизирање, сонификација и грубо раздвајање	39
4.7.2.	Афинитетна хроматографија са имобилизованим металом	39
4.7.3.	Дијализа.....	40
4.8.	Анализа рекомбинантних протеина	40
4.8.1.	Полиакриламид електрофореза са натријум додецилсулфатом (SDS-PAGE).....	40
4.8.2.	Дензитометријска анализа	40
4.8.3.	Одређивање количине пречишћених протеина	41
4.8.4.	Имуноблот анализа	41
4.9.	Функционална карактеризација рекомбинантних протеина.....	41
4.9.1.	Ензимски тестови	41
4.9.2.	Спектрофотометријска метода.....	42
4.9.3.	Спектрофлуориметријска метода	42
4.9.4.	Одређивање кинетичких параметара ензимски катализоване реакције.....	43
4.9.5.	Тестирање инхибиторног потенцијала супстанци	43
4.9.6.	Одређивање константе инхибиције (K_i) и типа инхибиције.....	44
4.10.	Обрада података.....	45
5.	РЕЗУЛТАТИ	46
5.1.	Идентификација гена <i>gst</i> рибе зебрице, конструкција филогенетског стабла ензимске суперпородице Gst.....	47
5.2.	Анализа развојне дистрибуције иРНК идентификованих гена <i>gst</i> код ембриона и ларви зебрица.....	58
5.3.	Анализа ткивне и полне дистрибуције иРНК идентификованих гена <i>gst</i> код адултних организама зебрице.....	62
5.4.	Функционална карактеризација ензима Gst рибе зебрице.....	67
5.4.1.	Трансформација гена за протеине Gstr1, Gstt2 и Gstm3 зебрице у хетерологни експресиони систем.....	67
5.4.2.	Одређивање кинетичких параметара ензимске реакције одабраних рекомбинантних протеина Gst.....	70
5.5.	Инхибиторни потенцијал одабраних ендогених једињења и ксенобиотика.....	75
5.5.1.	Инхибиција рекомбинантног протеина Gstr1 ендогеним једињењима.....	75
5.5.2.	Инхибиција активности рекомбинантног протеина Gstr1 ксенобиотичима.....	78
5.5.3.	Утицај ксенобиотика и ендогених једињења на активност рекомбинантног протеина Gstt282	
5.6.	Инхибиторни потенцијал узорка отпадне воде на активност рекомбинантних протеина Gstr1, Gstt2 и Gstm3	84
6.	ДИСКУСИЈА	87
6.1.	Идентификација гена <i>gst</i> зебрице, конструкција филогенетског стабла ензимске суперпородице Gst.....	88

6.2.	Анализа развојне дистрибуције иРНК идентификованих гена код ембриона и ларви зебрица.....	90
6.3.	Анализа ткивне и полне дистрибуције иРНК идентификованих гена <i>gst</i> код адултних организама зебрице.....	91
6.4.	Функционална карактеризација одабраних рекомбинантних протеина <i>Gst</i> зебрице.....	94
6.5.	Инхибиторни потенцијал одабраних ендогених једињења и ксенобиотика.....	96
6.6.	Инхибиторни потенцијал узорка отпадних вода	99
7.	ЗАКЉУЧЦИ.....	101
8.	ЛИТЕРАТУРА	103
9.	ПРИЛОЗИ.....	116
	ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА	136
	БИОГРАФИЈА.....	139
	Изјава о ауторству.....	140
	Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада.....	141
	Изјава о коришћењу	142

1. УВОД

Да би се разумели путеви биотранформације ксенобиотика, али и ендогених једињења, важно је идентификовати и окарактерисати интегралне елементе који обезбеђују њихову апсорпцију, дистрибуцију, метаболизам и ослобађање из ћелије/организма. Унос ксенобиотика и ендогених једињења у ћелију, у великој мери је посредован бројним мембранским транспортерима што чини нулту (0) фазу биотранформације. Унета једињења се даље трансформишу оксидо-редукционим реакцијама прве (I) фазе биотранформације, а потом и реакцијама друге (II) фазе, које су посредоване разним ензимима. За елиминисање метаболита из ћелија одговорни су ефлуksни транспортни протеини, чиниоци (III) фазе биотранформације. Промене у експримирању чланова овог система могу драматично да утичу на осетљивост организма на токсичност ксенобиотика или дистрибуцију ендогених једињења. Оне могу настати као резултат генетике, исхране, стадијума развоја, ткива, пола и утицаја околине или других ксенобиотика, што је од посебног значаја за процену ризика коју носе смеше из спољашње средине. Испитивање наведених етапа биотранформације и токсичности хемикалија користи се у добро познатом концепту ADME-Tox (енгл. *Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion-Toxicity*) изучавања утицаја хемикалија на здравље људи и животиња (Tsaoun и сар., 2016; Stegeman и сар., 2010).

Приступ који обухвата фенотипске студије функционалности експримираних ензима у хетерологним системима може помоћи у бољем разумевању путева биотранформације код риблих организама (Schlenk и сар., 2008). Један од значајних елемената биотранформације ксенобиотика су глутатион-S-трансферазе (енгл. *Glutathione-S-Transferase(s)*, GST), вишефункционални ензими II фазе биотранформације, са примарном функцијом конјугације глутатиона са разноврсним ксенобиотцима и ендогеним једињењима. Ова дисертација пружа свеобухватну анализу гена *gst* у риби зебрици (енгл. *zebrafish*, лат. *Danio rerio*), важном модел организму, са циљем бољег разумевања њихове диверзификације и еволуције, физиолошког значаја ензима Gst и улоге као биомаркера изложености одређеним хемикалијама присутним у спољашњој средини.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Глутатион-S-трансферазе

2.1.1. Опште карактеристике

Откриће каталитичке активности која посредује додавање (конјугацију) глутатиона (енгл. *γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine*, GSH) на молекул 1-хлоро-2,4-динитро бензен (енгл. *1-chloro-2,4-dinitro benzene*, CDNB) из 1961. године (Booth и сар., 1961) иницирало је вишедеценијски научни интерес за генетику и ензимологију катализатора ове реакције, означених као глутатион-S-трансферазе (Armstrong, 1997). Ови ензими први пут су идентификовани 1970. године у кукурузу (Frear и Swanson, 1970), а данас знамо да су присутна у већини живих организама, од бактерија до човека (Hayes и Pulford, 1995; Hayes и сар., 2005; Sheehan и сар., 2001; Allocati и сар., 2009; Allocati и сар., 2018).

Међународна унија за биохемију и молекуларну биологију (енгл. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, IUBMB) класификује GST ензиме са бројем EC 2.5.1.18 (енгл. *Enzyme Commission*, EC). Ова номенклатура указује да су то трансферазе (класа 2), које трансферују алкил- или арил-групу другачију од метил-група (поткласа 5) (интернет страница: „*IUBMB Enzyme Nomenclature EC 2.5.1.18*”).

Глутатион-S-трансферазе припадају вишефункционалној суперпородици ензима и имају веома разноврсне каталитичке улоге у организму. Основна улога ензима GST је у II фази детоксификације, односно биотрансформацији електрофилних једињења (Jakoby, 1978; Mannervik и Danielson, 1988; Hayes и Pulford, 1995; Hayes и сар., 2005; Oakley, 2011). Познато је да GST посредују детоксификацију разноврсних екзогенних једињења (ксенобиотика) путем конјугације са другим молекулима или вршећи улогу везујућих молекула, односно носача (Jowsey и Hayes, 2007). Кључна улога у II фази детоксификације, доприноси ублажавању токсичности различитих ксенобиотика и ендогених једињења. Ова улога се остварује катализом нуклеофилног напада сумпорног атома редукованог трипептида глутатиона (GSH) на електрофилну групу супстрата који је родитељско једињење или продукт I фазе метаболизма (Mannervik и сар., 1985; Hayes и Pulford, 1995). На овај начин долази до смањења реактивности једињења и повећања њихове растворљивости у води, што је главни предуслов за накнадну елиминацију кроз мембранске транспортере (Sau и сар., 2010). Тако се умањује токсичност различитих унутарћелијских метаболита и разноврсних ксенобиотика (Hayes и сар., 2005; Sau и сар., 2010).

Разноврсност ензима GST огледа се у постојању лепезе ових протеина карактеристичне за одређено ткиво, док додатно сваки ензим има сопствену супстратну специфичност. На овај начин се омогућава правовремена каталитичка обрада широког спектра потенцијалних супстрата. Треба истаћи да су унутарћелијски ензими GST квантитативно веома заступљени у ћелијама сисара најчешће 2–4% (Schlenk и сар., 2008), али могу да досегну и до 10% од укупних протеина у ћелијама неких органа (Boyer, 1989). Забележено је да су ензими GST у хепатоцитима пацова присутни у концентрацији од 0,2 mM (Ketterer и сар., 1983).

Изучавање ензима GST помаже бољем разумевању механизма одбране организма од ксенобиотика. Посебно је значајно разумети на који начин активност ових ензима утиче на осетљивост организма према ксенобиотцима, а у зависности од врсте и стадијума развоја јединке, као и осетљивости органа који се испитује.

2.1.2. Класификација суперпородице GST

Ензими суперпородице GST код еукариота се на основу своје ћелијске локализације класификују у три ензимске породице: унутарћелијска, митохондријска и породица мембрански асоцираних протеина (Sheehan и сар., 2001; Hayes и сар., 2005; Oakley, 2011). На основу комбинације хемијских, физичких и структурних карактеристика, сисарски унутарћелијски ензими GST се класификују у седам класа: *Alpha*, *Mu*, *Pi*, *Omega*, *Theta*, *Sigma* и *Zeta* (Mannervik и сар., 1992; Sheehan и сар., 2001). Постоји неколико додатних класа унутарћелијских ензима GST који се не срећу код сисара. Пример томе је класа *Rho* која је идентификована код појединих риба и бескичмењака (Konishi и сар., 2005). Такође, неколико класа идентификованих код несисарских врста накнадно је идентификовано код сисара, понекад обављајући функције које претходно нису биле повезане са ензимима GST (Sheehan и сар., 2001). Једна класа, означена као *Kappa*, припада митохондријској породици и садржи ензиме који имају структурну сличност са унутарћелијским ензимима GST (Morel и Aninat, 2011). Породици мембрански асоцираних протеина, односно микрозомалним ензимима GST (енгл. *Microsomal Glutathione-S-Transferase*, Mgst) припада класа GST означена као мембрански протеини повезани са метаболизмом еикозаноида и глутатиона (енгл. *Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism*, MAPEG) (Mannervik и сар., 1992). Овде спадају интегрални мембрански протеини који нису еволутивно блиско повезани са другим класама ензима Gst, попут леукотриен C4 синтазе (енгл. *Leukotriene C4 Synthase*, Ltc4s), активирајући протеин 5-липоксигеназе (енгл. *5-Lipoxygenase Activating Protein*, Flap); простагландин E синтазе (енгл. *Prostaglandin E Synthase*, Ptges) (видети поглавље 2.1.4) (Morgenstern и сар., 2011).

Припадници унутарћелијске ензимске породице GST су класификовани у различите класе на основу сличности у примарним структурама, специфичности за супстрат/инхибитор и имунолошким карактеристикама. Многе класе садрже више чланова који међусобно деле 40% идентичности аминокиселинске секвенце, док је овај проценат код чланова који припадају различитим класама до 25% (Oakley, 2011). Унутарћелијски протеини GST су обично хомодимери укључени у метаболизам ксенобиотика и детоксификацију потенцијално штетних ендогених једињења (Hayes и Pulford, 1995; Sheehan и сар., 2001). Диверзификација ових протеина у више класа омогућава супстратну специфичност. Такође, чланови унутарћелијске породице показују изомеразну активност, способност везивања лиганата и модулацију ћелијских путева сигналне трансдукције (Jowsey и Hayes, 2007). Пероскидазну активност показују чланови унутарћелијске и митохондријске ензимске суперпородице GST. Протеини MAPEG су хомотримери повезани са мембраном, који претежно учествују у биосинтези леукотриена и простагноида, док неки чланови поседују високу глутатион-пероксидазну активност која штити мембране од деловања липидних хидропероксида (Jakobsson и сар., 1999).

2.1.3. Структура ензима GST

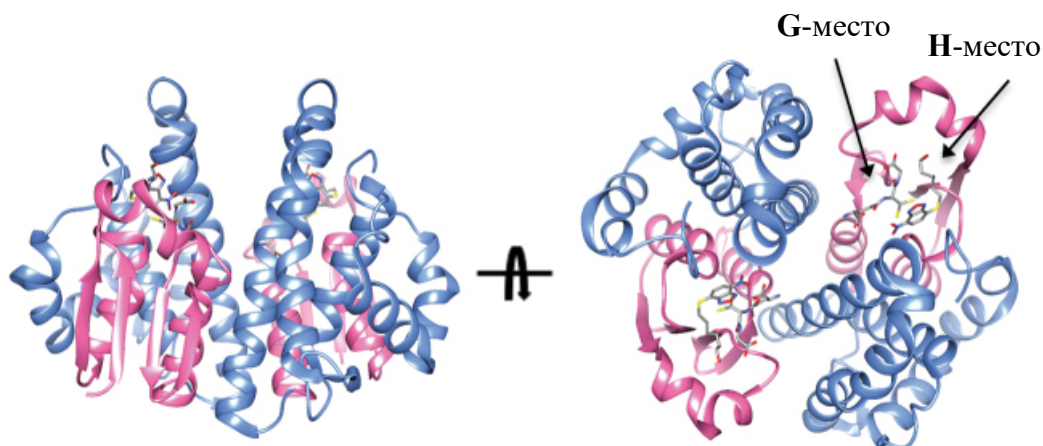
Прва кристалографска структура GST ензима одређена је 1991. године за ензим GSTP1-1 свиње (*Reinemer* и сар., 1991). Од тада се бележи експанзија научних података о структурним карактеристикама представника све три породице ензима GST (*Oakley*, 2011).

Чланови суперпородице GST деле изразиту сличност у низовима аминокиселина због чега имају и сличну секундарну и терцијарну структуру. Унутарћелијски ензими GST имају молекулску масу око 25 kDa и активни су као мономери и димери. Најчешће се срећу хомодимери, мада постоје и активне форме хетеродимера (*Schlenk* и сар., 2008). Димери увек припадају истој класи GST. Мономери GST се састоје од два различита домена, аминокрај сличан тиоредоксину ($\beta\alpha\beta\beta\alpha$) и карбоксилни-крај богат α -хеликсима. Репрезентативна структура хуманог унутарћелијског протеина GST дата је на Слика 2.1 (*Allocati* и сар., 2018).

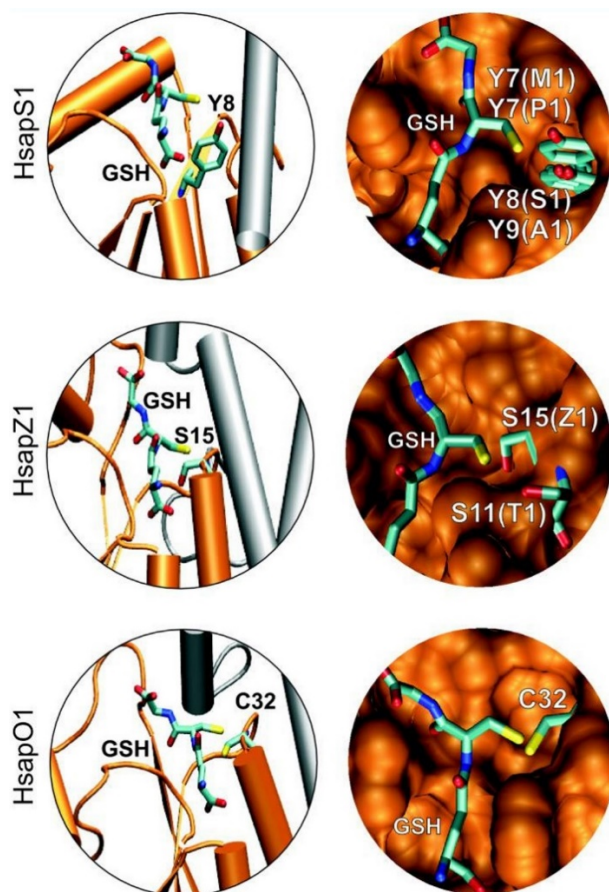
У оквиру аминокраја налази се специфично место за везивање ко-супстрата GSH, које се означава са **G**-место. Везивање се врши водоничним везама између остатка специфичне аминокиселине у оквиру **G**-места и цистеинског остатка на молекулу GSH. Код хуманих изоензима *Alpha*, *Mu*, *Pi* и *Sigma* ова аминокиселина је тирозин (**Y**), док је то серин (**S**) код *Theta* и *Zeta*, односно цистеин (**C**) код изоензима *Omega* (Слика 2.2). Код митохондријске класе протеина, *Kappa*, одговорна аминокиселина је серин, слично изоформама *Theta* (*Oakley*, 2011).

Амино- и карбоксилни-крај протеина GST заједно учествују у формирању везног места за супстрат. Ово место се означава као **H**-место (енгл. *hydrophobic*, **H**) услед хидрофобних супстрата које може да веже. Разноврстност структуре и хемијских карактеристика **H**-места је разлог многобројних специфичних интеракција ензима GST са супстратима (*da Fonseca* и сар., 2010; *Oakley*, 2011). Такође, може се уочити очување карбоксилног-краја код еволутивно млађих и сродних класа GST (*Alpha*, *Mu*, *Pi* и *Sigma*) (видети поглавље 2.1.4), што је у сагласности са преклапајућим супстратним специфичностима ових изоформи (*da Fonseca* и сар., 2010).

Структура митохондријских изоформи *Kappa* се разликује у начину савијања због постојања инсертованог домена на нивоу аминокраја. Овај домен је сличан бактеријским протеинима повезаним дисулфидним мостовима (енгл. *bacterial disulphide bonded proteins*, DsbA) (*Oakley*, 2011). Микрозомални ензими GST су интегрални мембрански протеини организовани као тримери са субјединицама око 15 kDa молекулске масе (*Schlenk* и сар., 2008).



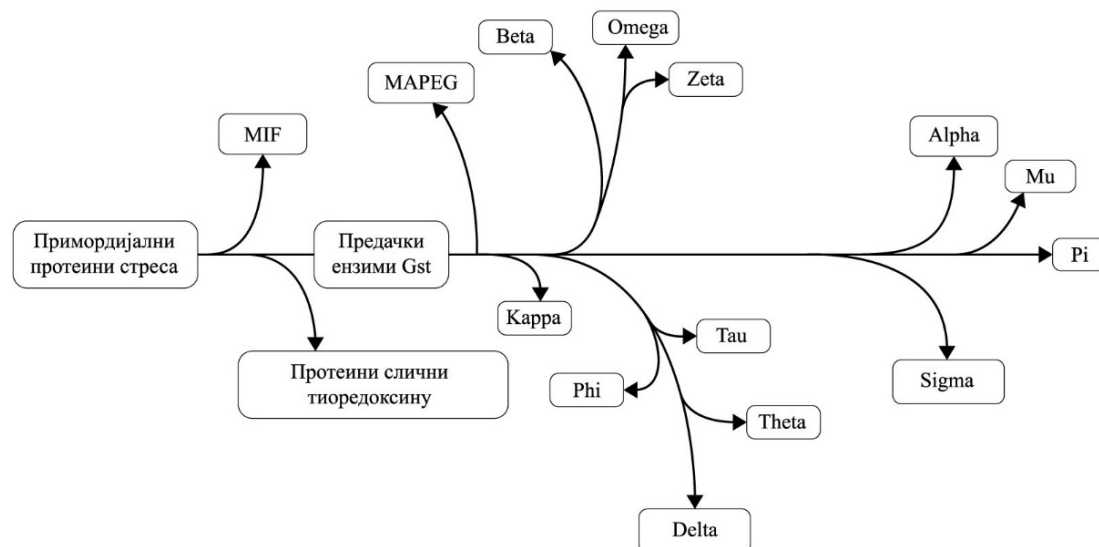
Слика 2.1. Структура унутарћелијског протеина GST. Приказан је хумани протеин GSTP1-1 у комплексу са ко-супстратом GSH (окупира **G**-месту) и NBDHEX инхибитором (окупира **H**-место) (модификовано према: *Allocati* и сар., 2018), доступно путем лиценце: [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). Оригинална структура 3GUR потхрањена је у протеинској бази (енгл. *Protein Data Bank*, PDB) од стране аутора *Federici* и сар., 2009. Роза боја означава тиоредоксину сличан аминокрај, плава боја означава карбоксилни-крај богат α -хеликсима.



Слика 2.2. Активно место (G-место) различитих класа хуманих протеина GST са приказом аминокиселина одговорних за активирање GSH молекула (модификовано према: *da Fonseca* и сар., 2010), доступно путем лиценце: [CC BY 2.0](https://creativecommons.org/licenses/by/2.0/).

2.1.4. Филогенија ензимске суперпородице GST

Као што је већ наведено, ксенобиотици и/или ендогено продукована једињења могу да представљају претњу нормалном функционисању организма. Способност организма да се одупре тој претњи представља његову биолошку адаптацију у циљу преживљавања (*Hayes* и *McLellan*, 1999). Показано је да ензими који врше детоксификацију разних једињења постоје код прокариота и еукариота више од 2,5 милијарде година (*Nebert* и *Dieter*, 2000). Као што је напред наведено, управо суперпородица ензима GST, која се састоји од вишефункционалних протеина, присутна је у већини живих организма, од бактерија до човека (*Hayes* и *Pulford*, 1995; *Hayes* и сар., 2005; *Sheehan* и сар., 2001; *Allocati* и сар., 2009; *Allocati* и сар., 2018). *Sheehan* и сарадници (2001) су предложили еволутивни модел развоја GST суперпородице од примордијалних протеина стреса, који дивергирају у неколико засебних класа.

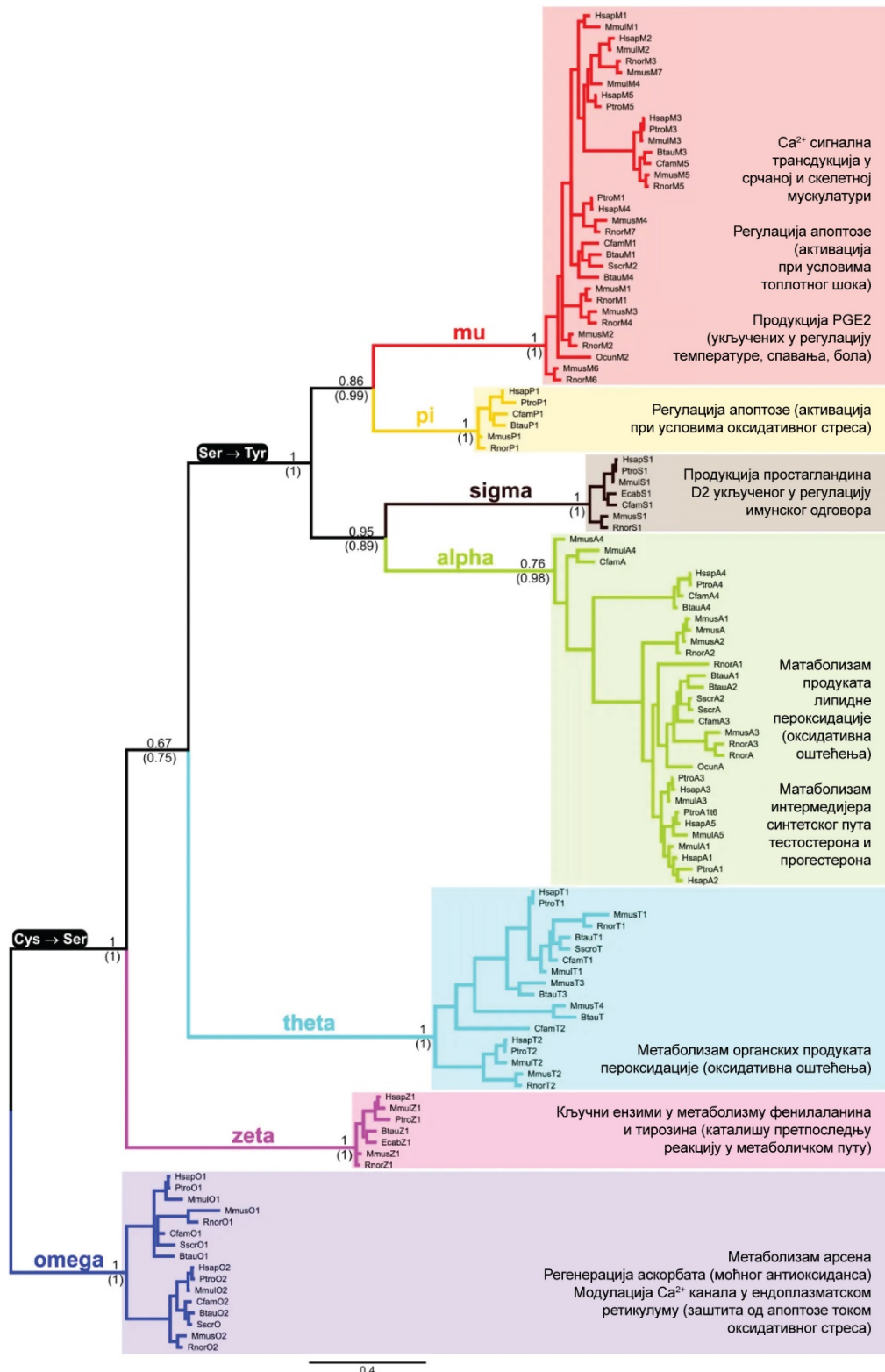


Слика 2.3. Дивергенције унутар суперпородице GST (модификовано према: Sheehan и сар., 2001; MIF – енгл. *Migration Inhibitory Factor*), доступно путем лиценце: CC BY 4.0.

Ензими GST представљају веома стару суперпородицу за коју се сматра да се развила од протеина сличних тиоредоксину као одговор на оксидативни стрес (Koonin и сар., 1994). Показано је да ензими GST многобројних врста деле сличне секвенце и структурне карактеристике са неколико протеина стреса (Rossjohn и сар., 1996). Појава различитих класа ензима GST се објашњава процесима генске амплификације која је праћена дивергенцијом, највероватније уз постојање механизма сличног рекомбиновању хомологних гена у *in vitro* условима (енгл. *DNA shuffling*) (Frova, 2006). Резултат оваквих дешавања је настанак нових каталитичких активности протеина GST (Armstrong, 1998; Hansson и сар., 1999). Из тог разлога ензими GST представљају одличан пример како вишеструке генске дупликације даље воде ка субфункционалности, односно неофункционалности и стварању ензимских група које имају многоструке функције (da Fonseca и сар., 2010). Неофункционалност ензима се често повезује са оптимизацијом секундарне функције коју је одређени протеин имао (O'Brien и Herschlag, 1999). Постојање хомо- и хетеродимера даље повећава диверзификацију каталитичке активности ензима GST уз јединствену употребу молекула GSH као ко-супстрата (da Fonseca и сар., 2010).

Филогенетско стабло сисарских унутарћелијских протеина GST уз опис ензимске активности чланова појединачних класа приказано је на Слика 2.4. Класе *Theta*, *Zeta* и *Omega* се сматрају еволутивно најстаријим у унутарћелијској Gst породици и присутни су у геномима различитих организама. У прилог овоме иде чињеница да класа *Theta* има улогу у метаболизму органских продуката пероксидације, односно заштити од оксидативног оштећења, што је чини еволутивно значајном. Такође, протеини који припадају *Omega* класи за активирање GSH ко-супстрата користе остатак цистеина слично глутаредоксинима, тј. протеинима од којих аминокрај унутарћелијских ензима GST води порекло. Тачније, филогенетско стабло унутарћелијских протеина GST је у складу са уоченим фундаменталним променама у њиховој структури (видети поглавље 2.1.3). То се односи на аминокиселину одговорну за стварање водоничне везе са GSH, која током еволуције прелази из цистеина у серин, а потом из серина у тирозин (Слика 2.2). За чланове који припадају класама *Alpha* и *Mu* теже је одредити еволутивне односе, попут ортологије и паралогије. Разлог томе је постојање интензивних генских дупликација у оквиру њих, где постоји и до седам изоформи. У оквиру ових класа GST проналазе се опсежни докази позитивне селекције. Такође, постојање дупликата код класа *Alpha*, *Mu*, као и *Theta* се повезује са улогом коју ови протеини имају у ћелијском одговору на стрес. На овај начин се долази до ефикасније елиминације ширег спектра штетних једињења, нарочито променом активног места који везује супстрат. Са друге стране, постојање ензимских дупликата који су укључени у строго контролисане метаболичке путеве потенцијално је штетно (da Fonseca и сар., 2010).

Sheehan и сарадници (2001) сугеришу могућност постојања других неоткривених класа GST, које могу да обављају различите функције, не нужно повезане са процесом детоксификације. Томе у прилог иде и чињеница да се све више гена *GST* детектује у ново секвенцираним геномима.

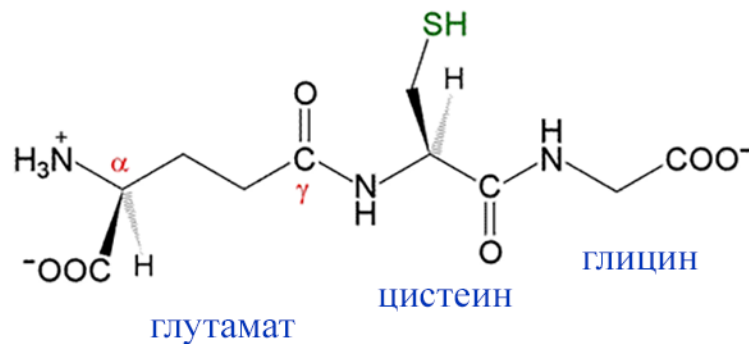


Слика 2.4. Филогенетско стабло сисарских унутарћелијских протеина GST. Дат је приказ промена у кључним каталитичким аминокиселинама (црни боксеви лево) и опис ензимске активности чланова појединачних класа (шарени боксеви десно) (модификовано према: *da Fonseca* и сар., 2010), доступно путем лиценце: [CC BY 2.0](https://creativecommons.org/licenses/by/2.0/).

2.1.5. Механизам ензимске реакције конјугације

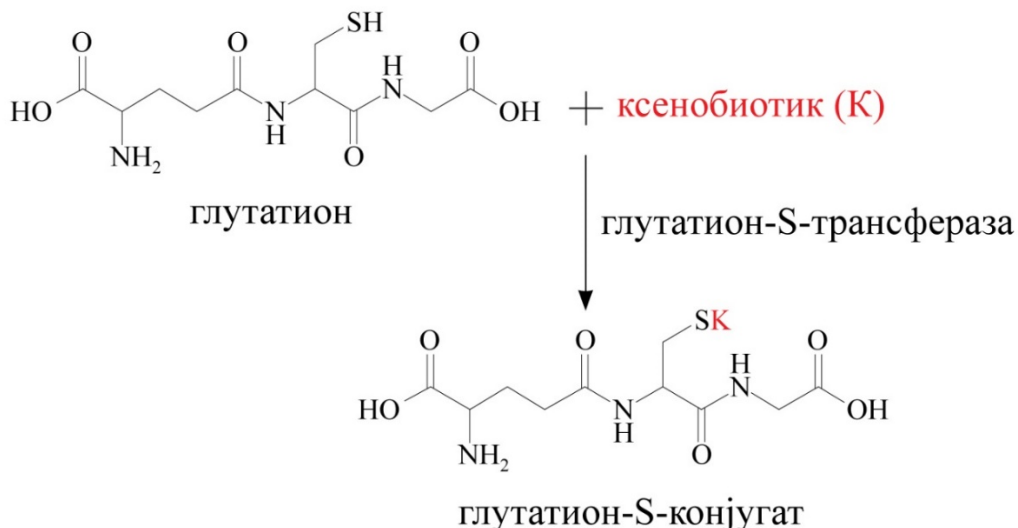
Најзаступљенија ензимска реакције II фазе биотрансформације је конјугација редукованог глутатиона на различите супstrate (*Blanchette* и сар., 2007; *Hodgson*, 2010). GSH је најзаступљенији тиол мале молекулске масе у ћелији (Слика 2.5). Присутан је у готово свим еукариотским, као и у неколико прокариотских организама и синтетише се *de novo* (*Beutler*, 1989; *Fahey*, 2001; *Dickinson* и *Forman*, 2002). Нарушавање метаболизма GSH има веома значајан утицај на ћелијску детоксификацију и нормалне физиолошке процесе (*Singhal* и сар., 2015).

Каталитичка активност ензима GST зависи од два процеса: везивања и активирања GSH кроз сачувано **G**-место и везивања електрофилног супстрата путем високо променљивог **H**-места (*Zimniak*, 2007). Управо се ензимска активност протеина GST првенствено огледа у њиховој способности да доведе супстрат у непосредну близину молекула GSH.



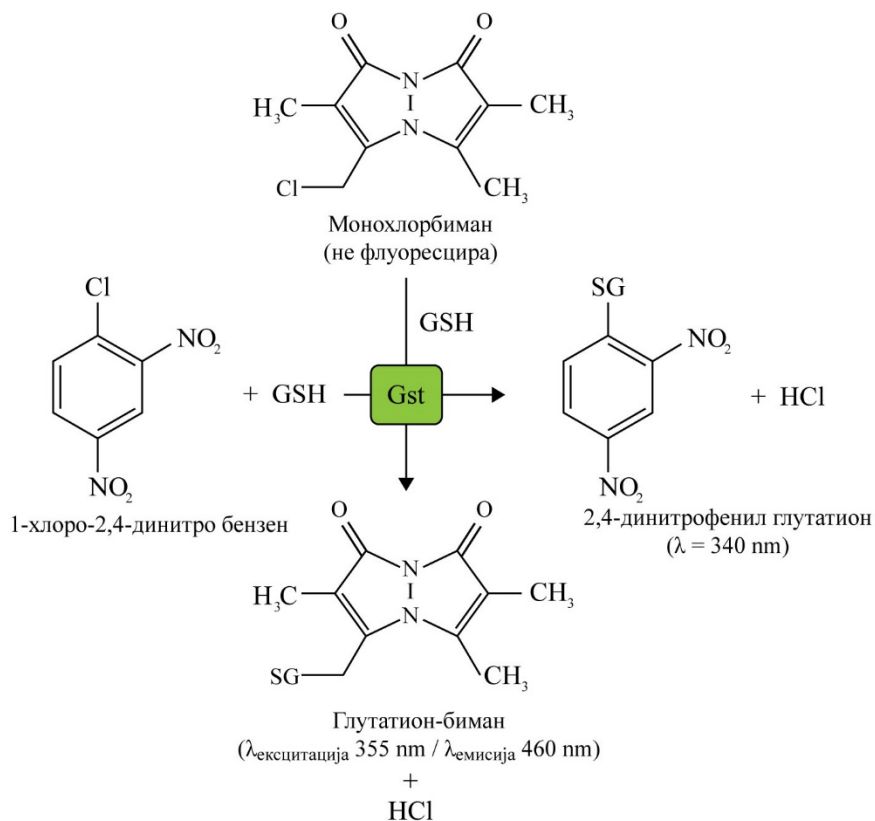
Слика 2.5. Структура редукованог трипептида глутатиона (модификовано према: *Ziglar* и *Allameh*, 2013), доступно путем лиценце: [CC BY 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

Супстрати припадају структурно различитим једињењима која садрже електрофилне атоме угљеника, азота или сумпора. Други део ензимске активности огледа се у активирању тоилне (сулфхидрилне, енгл. *sulfhydryl group*, -SH) групе молекула GSH, дозвољавајући да се одигра нуклеофилни напад на електрофилни супстрат (Слика 2.6). Супстрати након тога постају мање реактивни, али више растворљиви у води (*Harper*, 2004).



Слика 2.6. Реакција конјугације глутатиона са ксенобиотикум посредована ензимом глутатион-S-трансферазом (модификовано према: *Khalil* и сар., 2017), доступно путем лиценце: [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Опште прихваћени биолошки тест за мерење каталитичке активности ензима GST заснован је на хлоросупституцији, која укључује конјугацију GSH на 1-хлоро-2,4-динитро бензен (CDNB). Добијени производ ензимске реакције се лако идентификује спектрофотометријским мерењима на таласној дужини од 340 nm (*Habig* и сар., 1974; *Blanchette* и сар., 2007) (Слика 2.7). Такође, конјугација GSH на халогени биман, монохлорбиман (енгл. *monochlorobiman*, MCB), је посредована већином унутарћелијских ензима GST. Молекул MCB не флуоресцира, док добијени продукт ензимске реакције конјугације (глутатион-биман) ствара видљиву флуоресценцију ($\lambda_{\text{ексцитација}}$ 355 nm / $\lambda_{\text{емисија}}$ 460 nm) (Слика 2.7). Једноставност и осетљивост есеја заснованог на конјугацији MCB молекула, као и чињеница да је MCB моделни супстрат за многе ензиме GST, указују на значајност овог методолошког приступа у циљу мерења каталитичке активности ензима Gst (*Eklund* и сар., 2002).



Слика 2.7. Конјугација GSH на 1-хлоро-2,4-динитро бензен (CDNB) и монохлорбиман (MCB) посредована ензимима Gst (модификовано према: *Tambata* и сар., 2014; доступно путем лиценце: [CC BY 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/)).

2.1.6. Физиолошке улоге ензима GST

Данас постоји велики број кристалних структура ензима GST код несисарских врста. Ова сазнања су допринела упознавању са новим функцијама које носе протеини GST, а које претходно нису биле асоциране са њима. Поред најпрепознатљивије функције смањења токсичности различитих једињења, ензими GST имају и многобројне биолошке, односно физиолошке улоге. То се првенствено односи на улогу у заштити ћелија од оксидативног стреса кроз уклањање слободних радикала и регенерацију S-тиолованих протеина, као и улогу у биосинтези или метаболизму физиолошки значајних биомолекула попут леукотриена, простагландина, појединих стероида и тирозина (*Sheehan* и сар., 2001; *Hayes* и сар., 2005). Такође, ензими GST у ћелијама имају неколико различитих каталитичких активности попут изомеризације (*Chen* и *Juchau*, 1998; *Johansson* и *Mannervik*, 2001), отварања епоксидног

прстена, нуклеофилних ароматских супституција, реверзибилних Михаелових адиција на α,β -незасићене алдехиде и кетоне и пероксидазну активно ст (*Hurst* и сар., 1998; *Eaton* и *Vammler*, 1999). Ензими GST учествују и у некаталитичком везивању за друге протеине, што их чини интегралним деловима ћелијских сигналиних путева (*Hayes* и *Pulford*, 1995; *Sheehan* и сар., 2001; *Sau* и сар., 2010).

Некаталитичка улога

Некаталитичка функција ензима GST везана је за модификацију ћелијске сигналне трансдукције којом се контролишу процеси преживљавања, односно апоптозе (*Allocati* и сар., 2018). Ово се постиже контролисањем активности чланова митогенима активираних протеинских киназа (енгл. *Mitogen-Activated Protein Kinases*, MAPKs) путем протеин-протеин интеракција (*Laborde*, 2010). Пример овакве контроле је заштита туморске ћелије од апоптотских сигнала, где некаталитичким деловањем ензима GSTP1-1 долази до инхибиције активности киназе JNK (енгл. *c-Jun-N-terminal Kinase*, JNK). Показано је да се мономер хуманог протеина GSTP1-1 везује за протеине c-Jun и JNK, формирајући хетеротримерни комплекс којим се спречава фосфорилација протеина c-Jun од стране киназе JNK (*Adler* и сар., 1999). Фосфорилисан c-Jun је неопходан за формирање транскрипционог фактора активатор протеин-1 (енгл. *Activator Protein-1*, AP-1), који има улогу у индукцији експримирања гена чији су продукти укључени у процесе пролиферације ћелија, ДНК репарацију и ћелијску смрт (*Karin* и *Gallagher*, 2005). Такође, показана је протеин-протеин интеракција ензима GST са другим факторима у сигналним путевима MAPKs у циљу инхибирања њиховог деловања (нпр. са енгл. *Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 2*, TRAF2), што се доводи у везу са контролом ћелијског циклуса (*Wu* и сар., 2006; *Allocati* и сар., 2018).

Улога у развоју

Описана функција у биотрансформацији/метаболизму ендогених једињења, као и ћелијској сигнализацији указује на потенцијалну улогу чланова суперпородице GST током ембриогенезе и раних фаза развоја (*Tierbach* и сар., 2018). Како ови ензими имају широк спектар супстрата које прихватају (*Mannervik* и *Danielson*, 1988), веома је релевантно да поседују значајну улогу у заштити ембриона риба са спољашњим оплођењем од природних токсина и ксенобиотика присутних у воденим екосистемима (*Tierbach* и сар., 2018).

Улога у резистенцији на лекове

На основу своје каталитичке улоге ензими GST штите здраву ћелију од потенцијалних канцерогених једињења, док у туморским ћелијама, често долази до повећања њиховог експримирања. Показано је да повећање експримирања ензима GST и ефлуксних транспортних протеина у туморима редукује активност различитих антиканцерогених лекова (*Landi*, 2000; *Lo* и *Ali-Osman*, 2007; *Sau* и сар., 2010). Као што је претходно наведено, ензими GST учествују у контроли апоптозе инхибишући сигнални пут киназе JNK (*Adler* и сар., 1999; *McIlwain* и сар., 2006). На основу ових резултата ензимска суперпородица GST је последњих година предмет интензивних фармацеутских истраживања како би се произвели што ефикаснији хемотерапеутици (*Allocati* и сар., 2018; *Sau* и сар., 2010).

2.1.7. Ензими Gst код рибљих организама

Ензими глутатион-S-трансферазе су детаљно проучавани код сисарских врста. Њихова улога у процесу детоксификације код риба је препозната током 1970-их година. Ипак, према доступној литератури, само је неколико рибљих ензима Gst функционално окарактерисано, док је улога индивидуалних изоформи Gst у одређеним ткивима и даље остала непозната. Студије експримирања појединих изоформи Gst мерењем нивоа њихових иРНК изведена су код неколико врста кошљориба, попут речне фугу рибе (мефугу) (енгл. *river pufferfish*, лат. *Takifugu obscurus*), Јапанског пагра (енгл. *red sea bream*, лат. *Pargus major*), мрамора ривулуса (енгл. *mangrove killifish*, лат. *Rivulus marmoratus*), тостолобика сивог (енгл. *bighead carp*, лат. *Aristichthys nobilis*), иверка (енгл. *plaice*, лат. *Pleuronectes platessa*) и током ембрионалног развоја зебрице (Kim и сар., 2010; Konishi и сар. 2005; Lee и сар., 2006; Li и сар., 2010; Martinez-Lara и сар., 2002; Timme-Laragy и сар., 2013). Такође, Espinoza и сарадници (2012) су анализирали ткивну дистрибуцију иРНК гена *gst* сребрног лососа (енгл. *coho salmon*, лат. *Oncorhynchus kisutch*), као и промене њеног нивоа настале услед деловања кадмијума.

Испитивања активности протеина Gst риба претежно су се односила на мерење њиховог укупног каталитичког потенцијала, користећи моделне супstrate попут CDNB. Иако је овај приступ важан за одређивање сваобухватне активности Gst у *in vivo* условима, он не пружа увид у функцију појединачних изоформи Gst. Генерално, истраживања гена суперпородице Gst и њихових продуката код кошљориба су веома оскудна.

Класа Mu

Класа ензима Gst означена као *Mu* идентификована је у рибљим врстама попут јувенилног сребрног лососа, мефугу и тостолобика сивог (Espinoza и сар., 2012; Kim и сар., 2010; Li и сар., 2010). Такође, идентификација ових ензима као једних од најзаступљених изоформи Gst показана је код јувенилне беле јесетре (енгл. *white sturgeon*, лат. *Acipenser transmontanus*) и јувенилног краљевског лососа (енгл. *Chinook salmon*, лат. *Oncorhynchus tshawytscha*) (Donham и сар., 2005a; Donham и сар., 2005b).

Класа Theta

Поред тога што се сматра једном од еволутивно најстаријих у оквиру унутарћелијске породице ензима Gst (видети поглавље 2.1.4), класа *Theta* је специфична и по томе што исказује минималну или готово непостојећу активност према моделном сустрату CDNB (Board и сар., 1995). Код кошљориба представници унутарћелијске класе *Theta* су идентификовани и окарактерисани само код неких врста попут мрамора ривулуса (Lee и сар., 2006).

Класа Rho

Ензиму који је 2005. године идентификован код Јапанског пагра одређена је припадност новој класи ензима Gst, означеној као класа *Rho* (Konishi и сар., 2005). Ова класа ензима је даље изучавана код различитих рибљих врста попут: сребрног лососа, црне рибе (енгл. *black rockfish*, лат. *Sebastes schlegelii*), тостолобика сивог и Нилске тилапије (енгл. *Nile tilapia*, лат. *Oreochromis niloticus*) (Espinoza и сар., 2013; Jayasinghe и сар., 2016; Li и сар., 2010; Yu и сар., 2014). Такође, класа *Rho* проучавана је и код амфиоксуса (лат. *Branchiostoma belcheri*) (Fan и сар., 2007).

2.1.8. Ензими GST као биомаркери изложености ксенобиотицима

Биолошка контрола ензима GST је комплексна и зависна од многобројних фактора, попут пола, старости, ткива, врсте и трансформације тумора. За велики број хемикалија показано је да имају способност индукције ових ензима. Ова једињења су најчешће њихови директни супстрати или су првобитно модификовани од стране ензима I фазе метаболизма ксенобиотика (*Hayes* и *Pulford*, 1995). Зато су GST, као значајна карика у процесу детоксификације, препознати као потенцијални биомаркери изложености ксенобиотицима. Када је реч о воденим организмима, истраживања су се углавном односила на детекцију промене каталитичке активности ензима Gst под упливом одређених хемикалија (*Schlenk* и сар., 2008). Ипак, након излагања ксенобиотицима добијени резултати ензимских есеја су често варирали, од повећања активности (*Dong* и сар., 2013) до њеног смањења (*Toni* и сар., 2010). Каталитичка активност према било ком супстрату је резултат како преклапања супстратних специфичности различитих изоформи, тако и њихове различите ткивне заступљености (*Henson* и сар., 2001; *Schlenk* и сар., 2008). Због тога се праћење промене експримирања специфичних изоформи насталих након излагања ксенобиотику уводи као алтернатива ензимском есеју. Из тог разлога идентификација специфичних изоформи код појединих водених организама омогућава праћење промена експримирања и дефинише улогу ензима Gst као биомаркера изложености ксенобиотицима (*Blanchette* и сар., 2007).

2.2. Супстрати и инхибитори унутарћелијских ензима GST

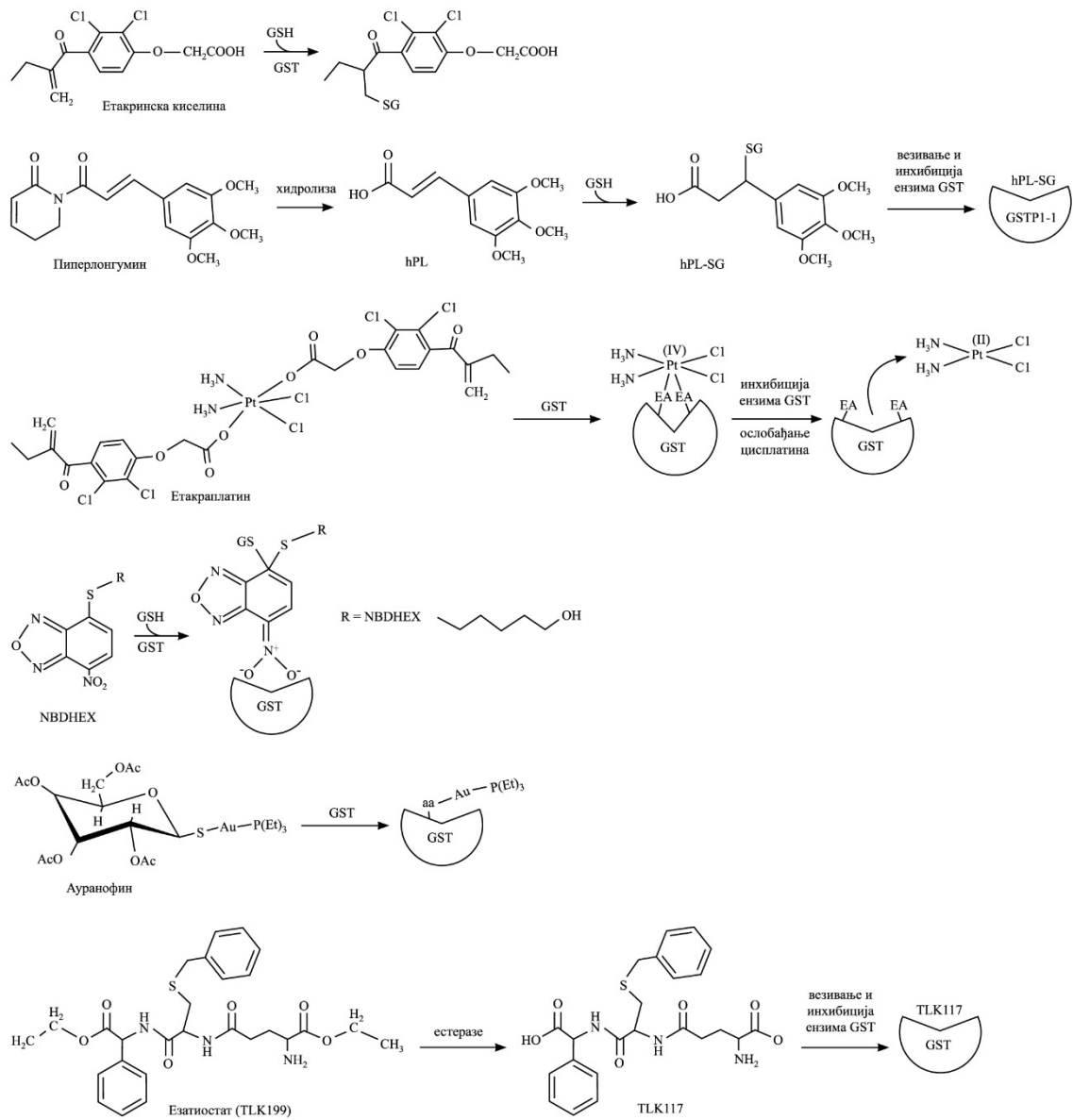
2.2.1. Преглед познатих супстрата ензима GST

Путем претходно описаног механизма, ензими GST катализују конјугацију GSH са широким спектром хидрофобних и електрофилних молекула, попут разноврсних продуката оксидативног метаболизма. Конјугована једињења тада постају мање токсична и предиспонирана за избацивање из ћелија (*Allocati* и сар., 2018). Поред улоге у реакцијама конјугације, поједини ензими GST испољавају и глутатион пероксидазну активност и катализују редукцију органских хидропероксида до одговарајућих алкохола (*Hayes* и сар., 2005). Наиме, сва ендогена једињења која имају α,β -незасићене угљенике су потенцијални супстрати за ензиме GST (*Hayes* и сар., 2005; *Ketterer* и сар., 1983). Примери таквих једињења су 4-хидроксиноненал (енгл. *4-hydroxynonenal*, 4-HNE), алдехидни производи липидне пероксидације који могу да оштећују ДНК и протеине и притом индукује апоптозу (*Raza* и *John*, 2006). Треба нагласити да кошљорибе садрже велике залихе полинезасићених масних киселина, чак и у виду капљица унутар хепатоцита, а које се лако оксидују нападом слободних радикала. Овим се може објаснити високи конститутивни нивои изоформи GST које детоксикују производе липидне пероксидације (*Schlenk* и сар., 2008). У ендогене супстрате GST убраја се и акролеин (2-пропенал), који настаје у процесима деградације треонина који су посредовани мијелопероксидазом и деградације спермина и спермидина који су посредовани аминоксидазама. Настанак већих количина акролеина је у корелацији са оксидативним стресом и инфламацијом (*Stevens* и *Maier*, 2008). Супстрати за ензиме GST су и веома токсични производи ДНК деградације (*Berhane* и сар., 1994; *Jowsey* и *Hayes*, 2007; *Singhal* и сар., 2015). Као што је раније наведено, поједини ензими GST су укључени у биосинтезу леукотриена и простагландина, појединих стероида попут тестостерона и прогестерона, али и деградацију тирозина (*Hayes* и сар., 2005). Тачније, ензими GST учествују у деградацији тиола и реакцијама изомеризације андростен-5-ене-3,17-дионе до андрост-4-ене-3,17-дионе (*Gu* и сар., 2004), 4-малеилацетоацетата (енгл. *maleylacetoacetate*, МАА) до 4-фумарилацетоацетата (енгл. *fumarylacetoacetate*, FAA) у оквиру катаболичког пута фенилаланина (*Polekhina* и сар., 2001). Такође, показано је да ензими GST сисара учествују у унутарћелијском транспорту различитих ендогених метаболита, лекова и хормона тако што се са одређеним афинитетом везују за ова једињења (*Listowsky* и сар., 1988).

Поред ендогених супстрата, GST катализују конјугацију ширег спектра електрофилних ксенобиотица: лекова (нпр. хемотерапеутици), тешких метала, пестицида, хербицида, органотина, перзистентних органских полутаната (енгл. *persistent organic pollutants*, POPs) и полицикличних ароматичних угљоводоника (енгл. *polyaromatic hydrocarbons*, PAHs) (Fedulova, 2011; George и Buchanan, 1990; Higgins и Hayes, 2011; Wu и сар., 2007). Показано је да су бензо[а]пирен и транс-изомер стилбен-оксида супстрати за ензиме GST (Seidegård и сар., 1989; Hu и сар., 1997). GST су укључени и у процесе детоксификације бројних епоксидних канцерогена, попут афлатоксина Б1 (енгл. *aflatoxin B1*, AFB1), који је токсични метаболит неких врста *Aspergillus* присутних у житарицама. Ово једињење је веома токсично за јетру и доводи се у корелацију са настанком хепатоцелуларног канцера. AFB1 се у организму детоксикује конјугацијом од стране ензима GST и потом елиминише из организма фецесом или урином (Dohnal и сар., 2014).

2.2.2. Преглед познатих инхибитора ензима GST

Како је раније наведено, ензими GST могу да инактивирају одређене лекове путем конјугације са GSH. На овај начин они учествују у стварању отпорности на дејство лекова, посебно хемотерапеутика. Из тог разлога фармацеутска индустрија развија велики број GST инхибитора (за референце видети Allocati, 2018). Поред тога, идентификовани су инхибитори ензима GST који су присутни у природи, најчешће у биљкама (Harshbarger и сар., 2017). Природни супстрат/инхибитор је етакринска киселина (енгл. *ethacrynic acid*, ЕТА). ЕТА представља α,β -незасићени кетон и потентни диуретик (Sau и сар., 2010), који се као конјугат GSH-ЕТА ковалентно везује за ензим GSTP1-1 (Gaté и Tew, 2001). У природне инхибиторе сврставају се и деривати ЕТА, као и пиперлонгумин. Етакраплатин (енгл. *ethacraplatin*) је инхибитор GST развијен у циљу превазилажења отпорности коју поседују ћелије тумора на деловање хемотерапеутика цисплатина. Овај инхибитор је конјугат цисплатина и два молекула ЕТА (Слика 2.8) (Johansson и сар., 2011). Недавно је развијен препарат који садржи инкапсулирани етакраплатин у мицелама нано димензија (Li и сар., 2017). Често коришћени инхибитори GST су и 6-(7-*nitro*-2,1,3-*benzoxadiazol*-4-*ylthio*)*hexanol* (NBDHEX), потентни инхибитор GSTP1-1 и ауанофин, фосфин злата који се користи као антиартритик (Tentori и сар., 2011; De Luca и сар., 2013). Показана је да 8-метоксипсорален (енгл. *8-methoxypsoralen*, 8-MOP) компетитивно инхибише ензиме GST (de Oliveira и сар., 2014). Инхибицију врше и разноврсни аналози молекула GSH, попут добро окарактерисане телинтре (езатиостат хидрохлорида, TER199, TLK199) и њених деривата (Lucente и сар., 1998; Mahadevan и Sutton, 2015).



Слика 2.8. Инхибитори ензима GST (модификовано према: *Allocati* и сар., 2018), доступно путем лиценце: [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

2.2.3. Преглед емергентних супстанци присутних у воденим екосистемима

Три велике групе емергентних супстанци које су присутне у воденим екосистемима јесу индустријске хемикалије, пестициди и лекови и средства за личну и кућну хигијену (енгл. *pharmaceuticals and personal care products*, PPCPs) (Murray и сар., 2010). У индустријске хемикалије се убрајају антиоксиданси као што су бутилирани хидроксианизол (енгл. *butylated hydroxyanisole*, ВНА); перфлуорисана једињења као што су перфлуорооктаноинска киселина (енгл. *perfluorooctanoic acid*, PFOA) и перфлуорооктансулфонска киселина (енгл. *perfluorooctanesulfonic acid*, PFOS); феноли као што су бисфенол А, нонифенол, терцијарни-бутил-хидрокинон (енгл. *tertiary-butylhydroquinone*, tBHQ); фталати као што су ди(2-етил)фталат (енгл. *diethyl phthalate*, DEP) ди(2-етилхексил)фталат (енгл. *diethylhexyl phthalate*, DEHP); полибромовани бифенили. Најчешће присутни пестициди су диазинон, метоксихлор, диелдрин, хлорпирифос, триазини (атразин). У PPCPs спадају различити аналгетици, антиепилептици, антимикуробни лекови, нестероидни антиинфламаторни лекови, синтетски хормони и други PPCPs (Murray и сар., 2010). Такође у емергентне супстанце улазе и адитиви у производњи нафте и нафтиних деривата, биолошки метаболити и токсини, ксеноестрогени, наночестице, и друга једињења (Vojinović Miloradov и сар., 2014). Нека од ових једињења путем отпадних вода доспевају у водене екосистеме, па су тако комуналне отпадне воде важан извор органских загађивача у воденој средини (Smital и сар., 2011). Ово је нарочито изражено уколико се комуналне отпадне воде претходно не подвргну специфичним процесима пречишћавања (Lishman и сар., 2006).

Најзначајније класе загађивача који се налазе у комуналним отпадним водама Западног Балкана су оне које потичу од ароматичних сурфактанта. А као најзаступљенији загађивачи отпадних вода овог подручја наводе се поједине класе лекова и производа за личну негу (Terzić и сар., 2008). У Новом Саду, комуналне отпадне воде се директно, без претходног пречишћавања, испуштају у Дунав (Слика 2.9) (Hrubik и сар., 2016b); Hashmi и сар., 2018). У тако нетретираним отпадним водама органско оптерећење је веома високо и карактерише га сложен хемијски састав (Terzić и сар., 2008). Показано је да су фталати, ПАХс, гликоли и њихови деривати, кофеин, бисфенол А, терпени и масне киселине једињења која се најчешће јављају у отпадним и површинском водама Дунава у близини Новог Сада (Milic и сар., 2014). Хемијска анализа поларне фракције отпадне воде града Новог Сада показала је присуство фенола, супституисаних бензена и деривата бензена, као и органских киселина (Hrubik и сар., 2016b). Друга студија је показала присуство кетона, супституисаних бензена и бензенских деривата, алкохола, естара органских киселина, еукалиптол, бензалдехид, ацетофенон, анизол (Samardzija Nenadov и сар., 2018). Такође је показано да појединачна једињења често доводе до другачијих биолошких одговора у поређењу са одговорима који настају након излагања њиховој смеси. Разлог томе су могуће интеракције између хемикалија у смеси (Haluzová и сар., 2011; Samardzija Nenadov и сар., 2018).

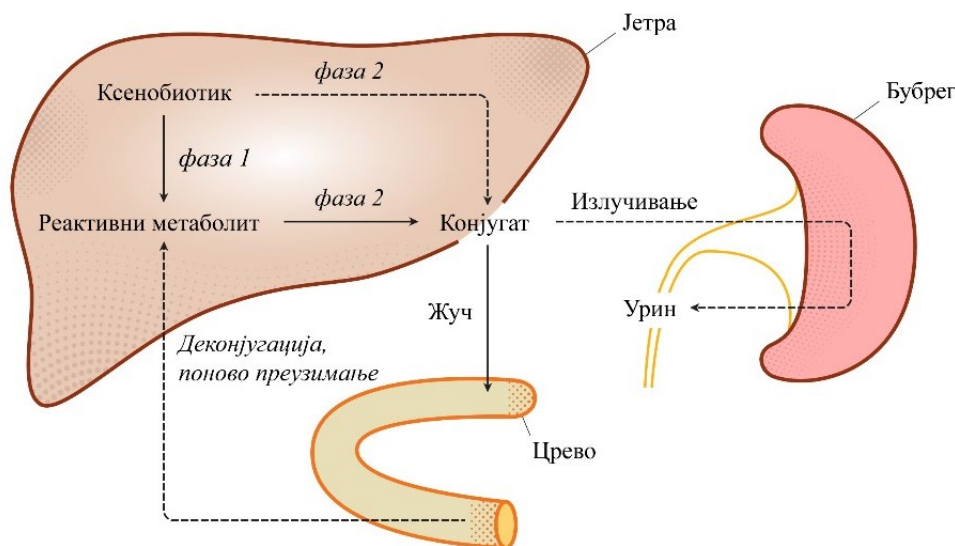


Слика 2.9. Део мапе Новог Сада са означеним местом испуста комуналних отпадних вода директно у Дунав.

2.3. Биотрансформација ксенобиотика

Појам биотрансформације одговара процесу који се одвија првенствено кроз ензимске реакције, а којима се често радикално мења хемијска природа неполарних липофилних једињења у поларне у води растворљиве метаболите, претежно доводећи до детоксификације и елиминације родитељских једињења. Нажалост, хемијска промена која је неопходна за повећање поларности једињења може да створи реактивне интермедијарне метаболите путем процеса биоактивације, а који могу бити биолошки много опаснији од сопствених родитељских једињења (*Diekmann и Hill, 2013; Schlenk и сар., 2008*). Метаболизам лекова или токсина у телу је пример биотрансформације.

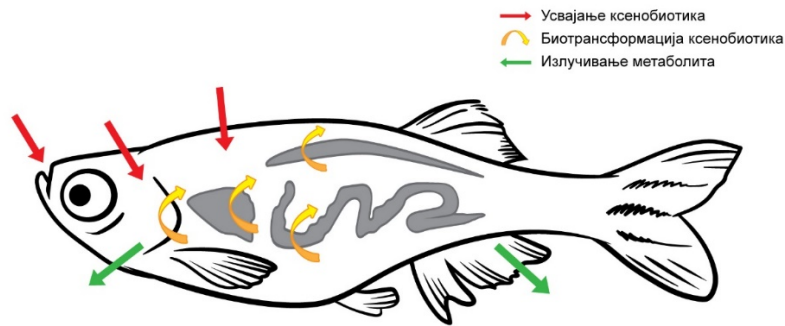
Кључни органи у којима се одиграва биотрансформација ксенобиотика су јетра, црево и бубрези. Ензими који учествују у биотрансформацији ксенобиотика високо су експримирани у овим органима, нарочито у цревима и јетри. Хемијске реакције које се одигравају подељене су по фазама које су временски и просторно одвојене. Нулта фаза (0) обухвата унос (усвајање) ксенобиотика од стране мембранских транспортних протеина (енгл. *uptake transporters*). Фаза I означава ензимску биоактивацију родитељских једињења путем оксидо-редукционих и хидролитичких реакција, а све у циљу увођења поларне групе у молекуле (*Hodgson, 2010*). Ензими ове фазе се означавају као ензими за функционализацију јер уводе функционалну групу у родитељски молекул (*Gräns, 2015*). Фаза II се односи на реакције конјугације метаболита насталих у реакцијама фазе II или директно родитељских молекула са једним од неколико ендогених молекула (глутатион, сулфат, глицин или глукуронска киселина), са циљем повећања њихове растворљивости у води што олакшава излучивање из организма. Коначно, фазу III обухватају процеси избацивања (енгл. *efflux*) родитељских једињења или метаболита од стране ефлуксних транспортера (*Hodgson, 2010*). Избацивање може да води ка бубрезима у циљу излучивања путем урина или ка цреву преко жучи. У цревима може да дође до деконјугације метаболита, чиме се он реактивира (Слика 2.10).



Слика 2.10. Биотрансформација и биоактивација ксенобиотика (модификовано према интернет страници: („*Metabolism of drugs and xenobiotics*”), доступно путем лиценце: [Creative Commons 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/)).

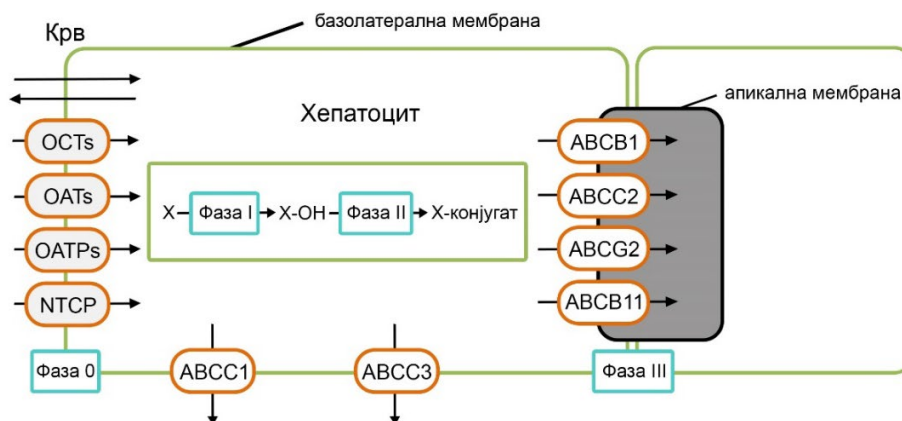
2.3.1. Биотрансформација ксенобиотика код риба

Од функционисања система апсорпције, дистрибуције, метаболизма и излучивања зависи ниво биоаккумуляције и токсичности коју изазива унети ксенобиотик (Nichols и сар., 2009). Усвајање ксенобиотика код риба се врши путем шкрга и коже из околне воде или кроз гастроинтестинални тракт путем исхране. Основни орган у коме се врши биотрансформација штетних једињења је јетра. Поред јетре, велику улогу у овом процесу имају црева, шкрге и бубрези (Слика 2.11). Хидрофилни метаболити се даље излучују из организма путем шкрга, фецеса или урина (Gräns, 2015).



Слика 2.11. Пuteви уноса, места биотрансформације и путевы излучивања ксенобиотика код рибе зебрице.

Биотрансформација ксенобиотика код риба се одиграва кроз претходно описане фазе (0, I, II и III) (Слика 2.12) у циљу елиминисања и спречавања биоаккумуляције липофилних једињења (Schlenk и сар., 2008). Процес биотрансформације катализује низ ензима који делују међусобно усклађено (Gräns, 2015). У фазу I код риба су укључени следећи ензими: монооксигеназе, флавопротеин монооксигеназа, моноамин оксидазе, епоксид хидролазе и редуктазе. Фази II припадају тзв. ензими конјугације: Gst, глукуронилтрансферазе (енгл. *Uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase*, *UDP-glucuronosyltransferase*, Ugt) или сулфонилтрансферазе (Livingstone, 1998; Schlenk и сар., 2008). Већину реакција фазе II биотрансформације ксенобиотика катализују ензими GST/Gst како код сисара, тако и код риба.



Слика 2.12. Фазе биотрансформације ксенобиотика. OCTs–енгл. *Organic Cation Transporters*; OATs–енгл. *Organic Anion Transporters*; OATPs–енгл. *Organic Anion Transporting Polypeptides*; NTCP–енгл. *Sodium-Taurocholate Cotransporting Polypeptide*; ABCC1–ABCC2–енгл. *ATP-Binding Cassette superfamily of transporters* (модификовано према интернет страници: “*Ecotoxicology, Dr. Shannon Bard*”).

2.4. Риба зебрица као модел организам

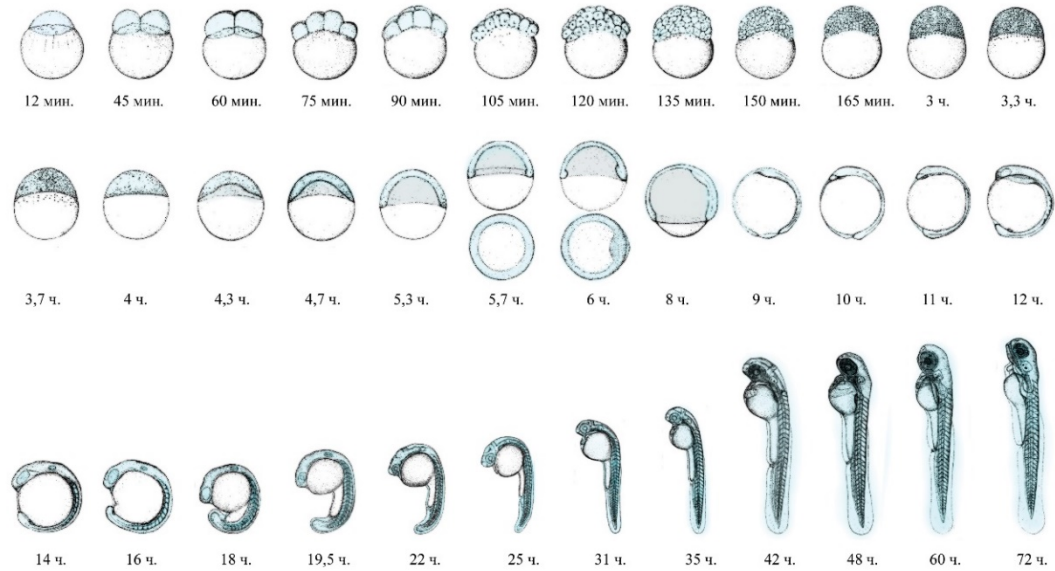
Риба зебрица (енгл. *zebrafish*, лат. *Danio rerio*) је мала слатководна тропска рибица која припада породици шаранских риба (лат. *Cyprinidae*). Она је значајан модел организам за проучавање биологије кичмењака. Показано је да радови у којима се као модел организам користе зебрице имају највећу стопу публикавања последњих година у односу на друге модел организме (*Garcia* и сар., 2016). Као истакнути модел организам у генетици, зебрица је препозната још 1981. године (*Streisinger* и сар., 1981) и успешно је коришћена у дефинисању мутација које утичу на развој органа код кичмењака (*de Souza Anselmo* и сар., 2018) *Kamel* и *Ninov*, 2017). Зебрица је сада популарни модел организам у различитим гранама биолошких истраживања изван генетике, укључујући развојну биологију, токсикологију, откривање нових лекова, модел за различите болести, неуробиологију и др. (за референце видети *de Souza Anselmo* и сар., 2018). Треба нагласити да је зебрица једини доступан модел организам кичмењака за претрагу високог капацитета (енгл. *High-Throughput Screening*, HTS) и изузетно је погодан за истраживања *in vivo*. Секвенцирањем и аотирањем генома зебрице откривен је висок степен еволутивне очуваности (70% хуманих генома има ортологе у геному зебрице), као и анатомских и физиолошких карактеристика хомологних са хуманим, што оправдава употребу овог модел организма у истраживањима везаним за здравље људи (*Garcia* и сар., 2016; *Howe* и сар., 2013).

2.4.1. Предност у односу на друге модел организме

Јединствене карактеристике које пружају предност зебрици у односу на друге класичне модел организме сисара су већ поменута слична анатомија и физиологија, као и развој са вишим кичмењацима (*Otte* и сар., 2017). Зебрице се лакше и јефтиније одржавају у лабораторијским условима у поређењу са модел организмима који припадају реду глодара. Предности зебрице се огледају и у олакшаном генетском праћењу, инјектирању модификованих гена, апсорпцији хемијских мутагена путем воде, транспарентности ембриона, као и веома брзом спољном развоју чиме је омогућена употреба неинвазивних техника сликања, али и манипулације (*de Souza Anselmo* и сар., 2018). Такође, велика предност која издваја овај модел организам је висока способност репродукције, где један пар зебрица може да продукује на стотине ембриона, који се веома брзо развијају у ларве са функционалним органима (*Kamel* и *Ninov*, 2017).

2.4.2. Развојни стадијуми ембриона рибе зебрице

Ембриони рибе зебрице представљају сложен, вишећелијски систем који интегрише интеракције различитих ткива, као и процесе диференцијације (*Scholz* и сар., 2008). Њихов развој је сличан развоју сисарских ембриона (*Kimmel* и сар., 1995; *Selderslaghs* и сар., 2012). Током ембрионалног развоја зебрице пролазе кроз више стадијума (Слика 2.13) који се означавају са: зигот (0–45 мин.), браздање (45–135 мин.), бластула (2,25–5,25 ч.), гастрџула (5,25–10 ч.), сегментација (10–24 ч.), фарингула (24–48 ч.) и период излегања (48–72 ч.) (*Kimmel* и сар., 1995).



Слика 2.13. Развојни стадијуми ембриона зебрице (модификовано према: *Kimmel* и сар., 1995), доступно путем дозволе број: 4774930942369.

Ембриони зебрица су веома значајни као модел користан за ефикасно и брзо испитивање утицаја хемикалија на различите биолошке системе. Подаци показују да је индустријска употреба зебрица највише заступљена у токсикологији, односно фармацеутској индустрији (*MacRae* и *Peterson*, 2015). Заправо, ембриони зебрица су прихваћени као алтернативни модел за предикцију акутне токсичности код риба, OECD TG236 (OECD, 2013) (*Nagel*, 2002; *Knöbel* и сар., 2012). Тенденција чешће употребе ембриона уместо одраслих јединки у истраживањима се додатно оправдава тиме што се у Европи ембриони зебрица не смастрају лабораторијским животињама све до фазе развоја када могу самостално да се хране (ЕЕС, 2010).

3. ЦИЉЕВИ

Циљеви докторске дисертације под називом: „Филогенетска анализа гена, развојна, ткивна и полна дистрибуција глутатион-S-трансфераза рибе зебрице – функционална карактеризација одабраних рекомбинантних протеина” су усмерени на свеобухватну карактеризацију ензимске суперпородице Gst рибе зебрице (лат. *Danio rerio*), важном модел организму кичмењака, и дефинисани су као:

- Идентификовање гена *gst* рибе зебрице и потпуна филогенетска анализа ензимске суперпородице Gst на основу чега би се одредио број гена у оквиру сваке филогенетске групе, гени *gst* зебрице позиционирали у односу на ко-ортологе других кичмењачких врста и доделила имена (анотирање) неименованим представницима суперпородице Gst код рибе зебрице;
- Анализирање очуване синтеније у циљу утврђивања хромозомске локализације гена *gst* рибе зебрице, одређивање нивоа очуваности гена *gst* код рибе зебрице и човека;
- Анализирање развојне, ткивне и полне дистрибуције иРНК идентификованих гена, и идентификација доминантно експримираних гена у ткивима кључним за процесе биотрансформације ксенобиотица (јетра, бубрези, црева и шкрге);
- Функционална карактеризација одабраних рекомбинантних протеина Gst рибе зебрице уз одређивање параметара ензимски катализоване реакције;
- Одређивање инхибиторног потенцијала одабраних емергентних супстанци присутних у воденим екосистемима одређивањем константе инхибиције и типа интеракције коју оставарују са рекомбинантним протеинима Gst рибе зебрице;

Добијени резултати треба да допринесу бољем разумевању диверзификације и еволуције ензима Gst зебрица, њиховог физиолошког значаја и улоге као биомаркера изложености одређеним једињењима.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Експериментална истраживања спроведена су у Лабораторији за молекуларну екотоксикологију, Завода за истраживање мора и околиша Института Руђер Бошковић, Загреб, Република Хрватска, којом руководи др Твртко Смитал и Департману за биологију и екологију Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду. Рад је подржан средствима пројекта Министарства просвете, науке и технолошког напретка Републике Србије (број пројекта: ОИ173037) и SCOPES пројекта Швајцарске националне фондације за науку (број пројекта: SCOPES IZ73Z0_128025).

4.1. Хемикалије

Ензими коришћени у раду набављени су од следећих произвођача: ензим *DNase I* од *Applied Biosystems* (Фостер Сити, Калифорнија, САД), Т4 DNA лигаза од *Life Technologies* (Карлсбад, Калифорнија, САД), док су ензими *Taq* и *Phusion* ДНК полимеразе, рестрикциони ензими *FastDigest* и алкална фосфатаза набављени од *Thermo Scientific* (Волтам, Масачусетс, САД). Лизозим је набављен од *Sigma-Aldrich* (Тауфкирхен, Немачка), а *RNase-free DNase Set* од *Qiagen* (Хилден, Немачка).

У раду су коришћени комерцијални комплети набављени од различитих произвођача: *RNeasy Mini* и *MiniElute Gel Extraction* од *Qiagen* (Хилден, Немачка); *High Capacity cDNA Reverse Transcription* са *RNase* инхибитором од *Applied Biosystems* (Фостер Сити, Калифорнија, САД). *pGEM-T Vector System I* од *Promega* (Медисон, Висконсин, САД); *DNA-Spin* од *iNtRON Biotechnology* (Кионги провинција, Република Кореја).

Етидијум бромид и *Commassie Brilliant Blue G (CBB-G250)* боје су поручене од *Sigma-Aldrich* (Тауфкирхен, Немачка), а *DNK dye (Loading dye 6x)* и *Power SYBR Green* боја од *Life Technologies* (Карлсбад, Калифорнија, САД).

Разноврсни маркери попут *GeneRuler DNA Ladder Mix*, *PageRuler Prestained Protein Ladder* су набављени од *Fermentas*, *Thermo Fisher Scientific* (Волтам, Масачусетс, САД), док је протеински маркер *Kaleidoscope* набављен од *Bio-Rad* (Херкјулиз, Калифорнија, САД).

Хистидин афинитетне колонице – *HisTrap HP* су набављене од *GE Healthcare Life Sciences* (Чикаго, Илиноис, САД), *Ni-NTA* агарозне куглице од *Qiagen* (Хилден, Немачка), дијализне кесице од *Bio-Rad* (Херкјулиз, Калифорнија, САД) и поливинилиден дифлуорид мембрана од *Milipore* (Билерика, Масачусетс, САД).

Коришћена антитела: мишје *anti-His*, каталoшки број: 37-2900 набављено је од *Invitrogen*, *Thermo Fisher Scientific* (Волтам, Масачусетс, САД), а козје анти-мишје IgG антитело конјуговано са пероксидазом рена од *Bio-Rad* (Херкјулиз, Калифорнија, САД).

Хемикалије набављене од *Life Technologies* (Карлсбад, Калифорнија, САД) су *TRIzol* и вода ослобођене од нуклеаза третирањем са диетилпирокарбонатом (енгл. *diethyl pyrocarbonate*, DEPC). Хемилуминисцентни супстрат, *Supersignal West Femto*, је набављен од *Thermo Scientific* (Рокфорд, Илиноис, САД), док је *RNA later* набављен од *Qiagen* (Хилден, Немачка), а *Ultrapure Dnase/Rnase free* дестилована вода од *Molecular Bioproducts* (Сан Дијего, Калифорнија, САД). Инхибитори протеаза (*cOmplete*, *EDTA-free protease inhibitor cocktail*) су набављени од *Roche*.

Од произвођача *Sigma Aldrich* (Тауфкирхен, Немачка) набављене су разне хемикалије попут: изопропил β-D-1-тиогалактопиранозид (енгл. *Isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside*, IPTG), имидазола, агароза, β-меркаптоетанола, ампицилина, хлорамфеникола, албумина телећег серума (енгл. *Bovine Serum Albumin*, BSA), *X-gal* и др. Све употребљене хемикалије биле су аналитичке чистоће.

Укупан екстракт узорка отпадне воде, као и фракције које садрже смеше неполарних, средње-поларних и поларних једињења обезбеђени су кроз реализацију пројекта SCOPES (број пројекта: IZ73Z0_128025) на Департману за хемију, биохемију и заштиту животне средине

Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду. Узорци су припремљени коришћењем екстракције чрсте фазе са хидрофилно-липофилним *Oasis HLB* сорбентом, што је праћено фракционисањем на силика гелу у неполарну, средње-поларну и поларну фракцију. Детаљан протокол фракционисања узорка отпадне воде дат је у раду *Hrubik* и сарадници (2016b).

4.2. Експерименталне животиње — рибе зебрице

4.2.1. Адултне јединке

Адултне јединке зебрица оба пола, набављене од локалних добављача у Загребу, Република Хрватска, коришћене су за изолацију укупне РНК из различитих органа. Рибице су по доношењу у лабораторију жртвоване и изоловани су следећи органи: мозак, шкрге, јетра, црево и гонаде. По четири органа од јединки истог пола су спојени (енгл. *pooled*) у јединствен узорак са циљем добијања довољно материјала за изоловање РНК. Услед мале величине бубрега зебрица, 14 органа појединачних јединки истог пола је изоловано и спојено у јединствен узорак. На описан начин сакупљено је 3–5 јединствених узорака сваког органа/ткива, како би се даље урадила анализа ткивне и полне дистрибуције иРНК гена *gst* зебрице. Након изолације ткива су чувана у *RNA later* на температури од -20°C до поступка изолације РНК.

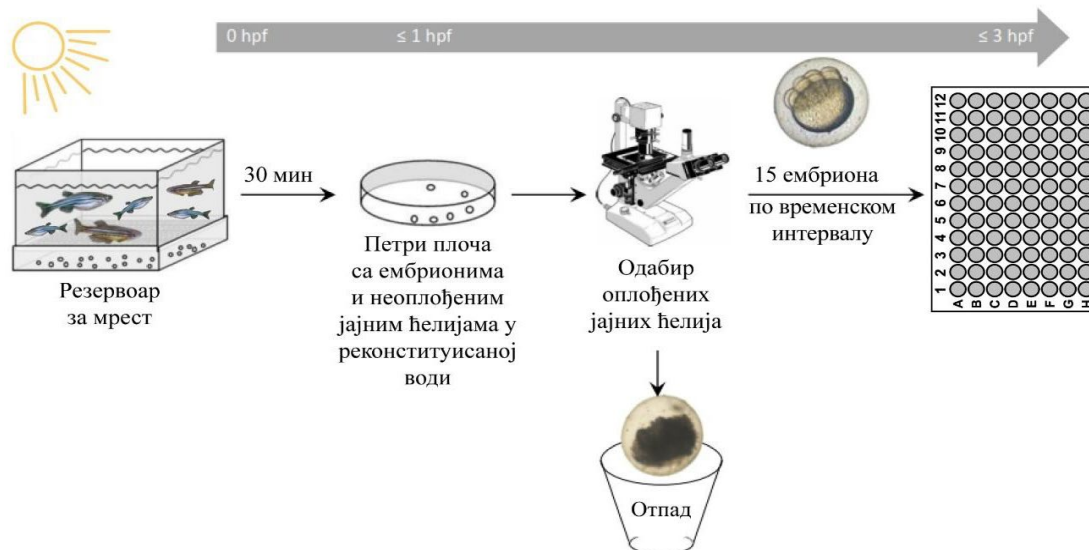
Експерименти су спроведени у складу са упутствима датим у Водичу Европске Уније за негу и употребу лабораторијских животиња, Директиви Савета (86/609/ЕЕЦ) и Закону Републике Хрватске о заштити животиња (*NN 135/2006*). Протокол експеримената са одраслим јединкама је одобрен од стране Одбора за биоетику Института Руђер Бошковић, Загреб, Република Хрватска (број дозволе: *BP-1504/2-2011*).

4.2.2. Ембриони

Одрасле јединке дивљег типа зебрица (*AB* сој) и рибе купљене од локалног добављача су коришћене за продукцију ембриона. Зебрице *AB* соја биле су поклон од др Жолта Ченкија (*Zsolt Csenki*), „Сент Иштван” Универзитет, Геделе, Мађарска. Рибе су гајене у гајилишту Департмана за биологију и екологију Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду. Услови гајења су били: температура $26,5^{\circ}\text{C}$ и осветљењем 12–12 сати, циклус светлост-мрак. Акваријуми су били напуњени водом из славине претретираном комерцијално доступним адитивом, *Easy-Life Filtermedium* (Дуивен, Холандија). Концентрација кисеоника је била око 80% засићености, док се рН одржавала на 8,4. Рибе су гајене у 1 L запремине воде по риби, храњене два пута дневно, 6 дана у недељи. Исхрана адултних риба укључивала је живе рачиће *Artemia nauplii* набављене од *Sanders* (Саут Огден, Јута, САД) и комерцијално доступну суву храну, *Tropical D-vital plus* (Хожов, Пољска).

За добијање ембриона, адултне рибе су према полу раздвајане у два засебна акваријума седам дана пре парења. Ембриони зебрица су добијени након парења у групама од десет мужјака и пет женки које су током ноћи чувани у прилагођеним резервоарима који садрже мрежицу на дну у циљу спречавања канибализма ембриона. Парење је стимулирано у јутарњим часовима укључивањем светла. Ембриони зебрица су сакупљени у реконституисаној води (ултрачиста вода која садржи: 2 mM CaCl_2 , 0,5 mM MgSO_4 , 0,75 mM NaHCO_3 и 0,075 mM KCl) према *OECD* (2013) протоколу у року од 30 мин. након парења. Одређивање стадијума развоја ембриона извршено је на основу претходно описане класификације (*Kimmel* и сар., 1995). Идентификовани и уклоњени су угинули ембриони (Слика 4.1). Нормално развијени ембриони су дистрибуирани у плоче са 96 бунарчића у запремини од 100 μL реконституисане воде. При сваком временском интервалу: 0, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 и 120 *hours post fertilisation* (hpf), сакупљени су ембриони, потом микроскопски испитани у циљу потврде нормалног развоја. Сакупљени ембриони/ларве су хомогенизовани у тубицама ослобођеним од нуклеаза (400 μL

TRIZol реагенса на 15 ембриона/ларви) помоћу штапића и сачувани на -80°C до поступка изолације укупне РНК.



Слика 4.1. Шематски приказ продукција, сакупљања, одабира и дистрибуирања ембриона зебрица у плоче са 96 бунарчића (модификовано према: OECD, 2013).

Према Закону о добробити животиња Републике Србије (Службени гласник Републике Србије бр. 41/09, 2009), односно Правилнику о условима за упис у Регистар за огледе на животињама и садржини и начину вођења тог регистра, програму обуке о добробити огледних животиња, начину неге, поступања и лишавања живота огледних животиња, обрасцу захтева за одобрење спровођења огледа на животињама, начину неге, поступања и лишавања живота огледних животиња, као и о садржини и начину вођења евиденције о држању, репродукцији, промету, односно спровођењу огледа на животињама (Службени гласник Републике Србије бр. 39/10, 2010), за огледе на јајима, ембрионима, ларвама риба не подносе се захтеви за издавање решења о одобрењу спровођења огледа. Наиме, јаја, ембриони и ларве риба нису обухваћени важећом Директивом Европске Уније о заштити животиња које се користе у научноистраживачке сврхе (*DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL*) и до 120 сати након фертилизације третирају се као *in vitro* модел, с обзиром да до тада немају спољашњу исхрану (ЕЕС, 1986; ЕЕС, 2010).

4.3. Бактеријски сојеви и плазмиди

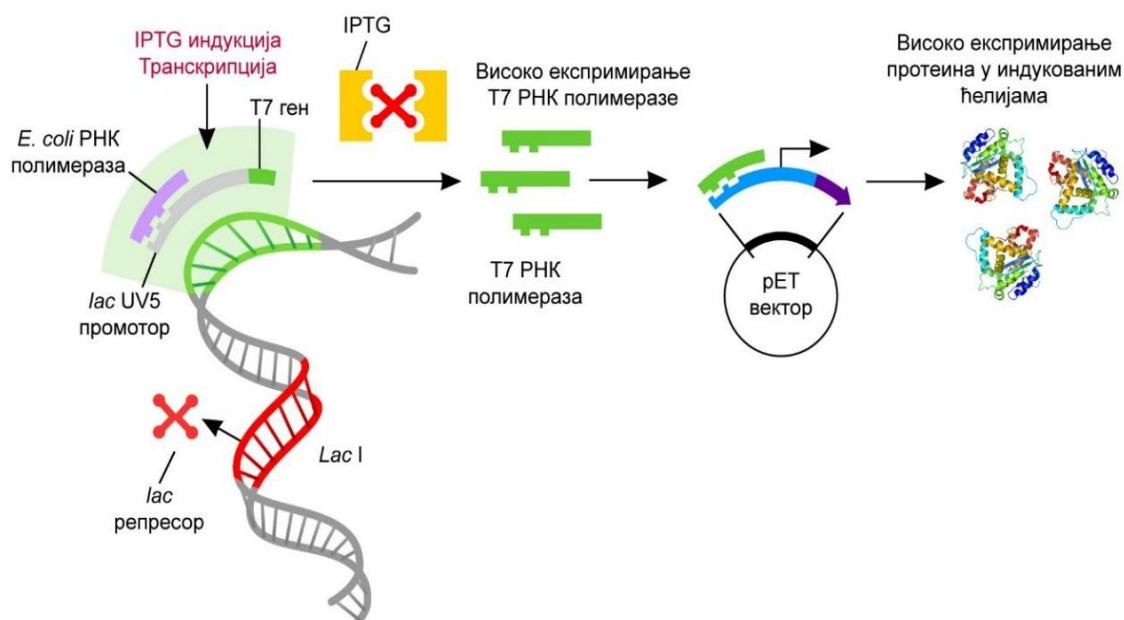
4.3.1. Бактеријски сојеви

У оквиру ове дисертације коришћени су прокариотски системи за молекуларно клонирање, као и експримирање гена, односно добијање жељених протеина. Коришћени прокариотски системи су два различита соја *Escherichia coli* (*E. coli*) бактерија, DH5-alpha (DH5 α) и BL21-CodonPlus (DE3).

За умножавање генских секвенци користио се сој компетентних бактерија *E. coli* **DH5 α** (*Invitrogen*, Карлсбад, Калифорнија, САД). Ове ћелије су узгајане на плочама са агарозном подлогом (*Sigma-Aldrich*, Тауфкирхен, Немачка) или у течном медијуму *Laurie Broth* (LB) (*Becton, Dickinson and Company*, Спаркс, Невада, САД). DH5 α је најчешће коришћен бактеријски сој за рутинско молекуларно клонирање, којим се максимизира ефикасност трансформације. Ове бактерије су дефинисане са три мутације: *recA1* и *endA1* које потпомажу

инсерцију плаزمида и *LacZ*M15 којом се омогућава плаво-бела селекција колонија (интернет страница: „Strain - DH5 α ”).

За експримирање рекомбинантних протеина користиле су се специфично оптимизоване бактерије *E. coli*, **BL21-CodonPlus (DE3)-RIL** (у даљем тексту: BL21) (*Stratagene*, Ла Џола, Калифорнија, САД). Специфичност ових бактерија огледа се у постојању додатних копија *argU*, *ileY*, и *leuW* тРНК гена у оквиру плазмидне ДНК (*ColE1*-компатибилан, *pACYC*-базиран плазмид). Ове тРНК препознају аргининске кодоне AGA и AGG, изолеуцински кодон AUA и леуцински кодон CUA, чиме се омогућава продукција хетерологних протеина. Овај додатни плазмид носи и секвенцу за отпорност на хлорамфеникол. Експримирање хетерологног протеина се индукује са IPTG због Т7 РНК полимеразе под контролом *lacUV5* промотора у рЕТa(+) вектору (Слика 4.2).

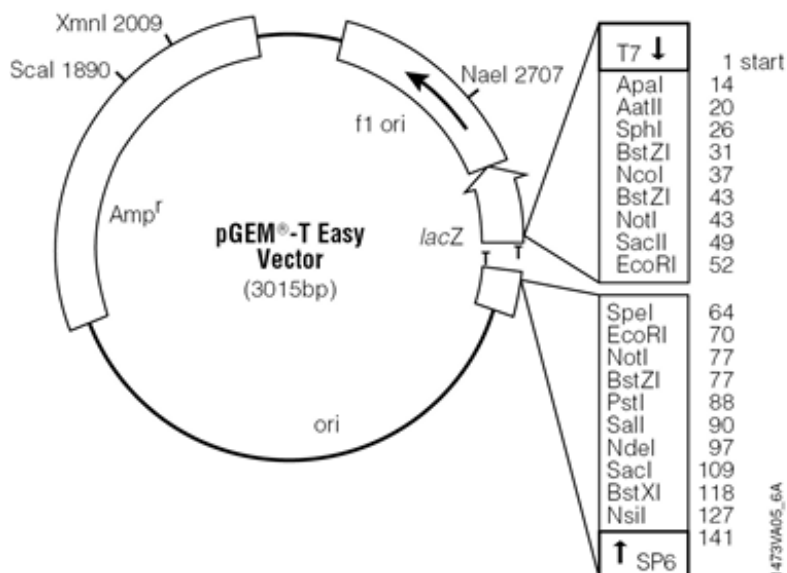


Слика 4.2. Молекуларна основа експримирања рекомбинантних протеина у бактеријским ћелијама BL21(DE3) након индуције са IPTG уз коришћење система рЕТ (модификовано према интернет страници: „TaKaRa Bio”).

4.3.2. Плазмиди

Коришћени вектори су плазмиди: рGEM-T и рЕТ-21a(+), који имају отпорност на различите антибиотике.

рGEM-T Easy вектор набављен од *Promega* (Медисон, Висконсин, САД) је линеаризовани вектор са тиминским (Т) наставком за олакшане инсерције секвенце (инсрта) који се клонира, а који је претходно умножен ланчаном реакцијом полимеразе (енгл. *polymerase chain reaction*, PCR) користећи *Taq* полимеразу, која приоритетно додаје аденин (А) на 3' крај продукта. Стога се молекуларно клонирање означава као ТА клонирање. рGEM-T вектор припада групи плазмида који се у бактеријама *E. coli* умножавају у великом броју копија (енгл. *high copy number*) и садржи део генске секвенце *LacZ* која има вишеструко место за инсерцију генетичког материјала. Овим се омогућава плаво-бела селекција колонија са жељеним инсертом коришћењем *X-gal* (5-бромо-4-хлоро-3-индолил- β -D-галактопиранозид) супстрата и индуктора IPTG. Маркер за одабир представља ген чији продукт омогућава отпорност на ампицилин (Слика 4.3).



Слика 4.3. Пример плазида pGEM-T са основним елементима за експресију: T – терминални 3' тимидински наставци, *ampR* – ген за отпорност на ампицилин, SP6 и T7 – промотори полимеразе, *lacZ* – ген за бета-галактозидазу, F1 origine – зачетак репликације F1. (Promega Corporation, 2018).

Вектор **pET-21a(+)** је набављен од *Novagen, Merck Group* (Дармштад, Немачка). Он је, у комбинацији са специфичним системом за експримирање (BL21) *E. coli*, веома погодан за функционалну анализу рекомбинантних протеина. Овај плазмид садржи *T7 tag* – секвенцу за експримирање T7 епитопног обележивача на аминокрају рекомбинантног протеина и *6× His tag* – секвенцу за експримирање 6× хистидинског обележивача на карбоксилном крају рекомбинантног протеина (Слика 4.4). Овако фузионисани рекомбинантни протеини су потпуно функционални без потребе за одстрањивањем обележивача. Обележивачи представљају антигене за дизајнирање специфичних антитела који тиме препознају протеин од интереса.

4.4. Филогенетска анализа

4.4.1. Идентификација гена *gst*

Секвенце гена и протеина *GST/gst* добијене су из база података: *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) (интернет страница: „*National Center for Biotechnology Information*”) *Ensembl* (интернет страница: „*Ensembl genome browser 95*”) и *DOE Joint Genome Institute* (интернет страница: „*JGI Genome Portal*”). Претходно познате хумане секвенце *GST* су именоване у односу на постојећу номенклатуру, док су се за секвенце осталих врста употребом алгоритма *blastx*, са праговном вредношћу $e = 10^{-3}$, вршиле претраге гена *gst* поређењем хуманих секвенци и генома: птица (кокошка, лат. *Gallus gallus*); гмизаваца (зелена анола, лат. *Anolis carolinensis*), водоземаца (тропска канџаста жаба, лат. *Xenopus tropicalis*), риба (зебрица, лат. *Danio rerio*; трободља, лат. *Gasterosteus aculeatus*; зелена тачкаста фугу риба, лат. *Tetraodon nigroviridis*; јапанска фугу риба, лат. *Takifugu rubripes*; медака, лат. *Oryzias latipes*), копљаша (амфиоксус, лат. *Branchiostoma floridae*) и плашташа (асцидија, лат. *Ciona intestinalis*). Претрага NCBI базе у циљу проналаска генских секвенци *gstp* вршена је за геноме риба: штука (енгл. *northern pike*, лат. *Esox lucius*), атлантски лосос (енгл. *Atlantic salmo*, лат. *Salmo salar*) и шаран (енгл. *common carp*, лат. *Cyprinus carpio*). Лажно позитивни резултати су изузети на основу филогенетске анализе. Вишеструка поравнања секвенци су изведена помоћу *Muscle* алгоритма (Edgar, 2004).

4.4.2. Конструисање филогенетског стабла

Филогенетска стабла су конструисана у програмском пакету *PhyML 3.0.1* (енгл. *PHYlogenetic inferences using Maximum Likelihood*) употребом *maximum likelihood* методе (Guindon и Gascuel, 2003) уз коришћење суперпородице глукуронилтрансфераза као *outgroup*, односно таксона ван монофилетичке групе који се користи за поређење приликом филогенетске анализе. За процену поверења чворова филогенетских стабала користио се *Approximate likelihood ratio* тест (aLRT) (Anisimova и Gascuel, 2006). Све претходно неанотиране секвенце *GST* су аниране према филогенетској анализи. Привремена имена гена дата су у складу са новом номенклатуром коју је усвојио *HUGO* Одбор за номенклатуру гена (енгл. *HUGO Gene Nomenclature Committee*, HGNC) (интернет страница: „*HUGO Gene Nomenclature Committee*”). За обраду, приказ и поравнања секвенци користио се програмски пакет *BioEdit* верзије 7.0 (Hall, 1999), док се идентитет секвенци израчунавао помоћу програмског пакета *DNASTAR*, верзије 7.0.0 (*DNASTAR, In.*, Медисон, Висконсин, САД).

4.4.3. Ортолошка предвиђања – анализа очуване синтеније

Појам синтенија, односи се на постојање парова гена који се јављају по истом редоследу. Ортолошка предвиђања, заснована на синтенијским односима између зебричних и хуманих гена од интереса, су дефинисана помоћу платформе *Genomicus* (интернет страница: „*Genomicus, genomes in evolution*”), која је претраживач очуване синтеније синхронизован са геномима из *Ensembl* базе података (Louis и сар., 2013).

4.5. Анализа експримирања гена

4.5.1. Изолација укупне РНК и реверзна транскрипција

Извор РНК за анализу експримирања, односно дистрибуције иРНК, су били нормално развијени ембриони/ларве сакупљени у временским интервалима: 0, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 и 120 hpf и органи: јетра, бубрег, шкрге, црево, мозак и гонаде изоловани из одраслих јединки оба пола. Укупна РНК из ембриона/ларви изолована је стандардном методом употребом *TRIzol* реагенса, док је РНК пореклом из ткива/органа адултних зебрица изолована употребом комерцијалног комплета који садржи све неопходне компоненте и реагенсе (*RNeasy Mini* комплет) према упутству произвођача.

TRIzol реагенс одржава интегритет РНК током хомогенизације ембриона/ларви (400 μ L *TRIzol* реагенса на 15 ембриона/ларви), док истовремено деградира ћелије и њене компоненте. Додавањем хлороформа (1/2 запремине), након центрифугирања, раздваја се раствор на водену и органску фазу. РНК остаје у воденој фази, а потом се преципитира изопропанолом и раствара у DEPC води. Изолација укупне РНК је праћена третманом *DNase I* у циљу деградације заосталих ДНК молекула. Важно је напоменути да се на овај начин у оквиру једног експеримента добијају резултати експримирања из јединственог узорка (енгл. *pool*) ембриона/ларви и према томе не могу да дају информацију о биолошкој варијабилности дистрибуције иРНК која постоји између ембриона/ларви.

Изолована ткива/органи одраслих јединки су хомогенизована помоћу *rotor-stator* хомогенизера при брзини од 10.000 ротација по минути (енгл. *rotation per minute*, rpm) током 20 секунди. Изолација укупне РНК сваког узорка вршена је помоћу *RNeasy Mini* комплета према упутству произвођача. Дигестија геномске ДНК је изведена употребом *RNase-free DNase Set* према упутству произвођача. Квалитет и квантитет изоловане укупне РНК је анализиран на спектрофотометру *Bio-Spec Nano* (*Schimidzu Corporation*, Кјото, Јапан). Концентрација је добијена као $\text{ng}/\mu\text{L} = A_{260} \text{ nm} \times 40$, а чистоћа је праћена кроз односе: апсорбанца на 260 nm (A_{260})/апсорбанца на 280 nm (A_{280}) који указује на контаминацију протеинима и однос A_{260}/A_{230} који указује на контаминацију органским једињењима. Чистоћа РНК се на основу оба параметра кретала у оптималном опсегу (1,7–2,1). Интегритет РНК молекула утврђен агарозном гел-електрофорезом. Реверзном транскрипцијом, изолована укупна РНК (2 μ g из ембриона, 1 μ g из ткива адултних јединки зебрица) је преведена у комплементарну ДНК (кДНК) користећи комплет *High Capacity cDNA Reverse Transcription* са *RNase* инхибитором према упутству произвођача.

4.5.2. Прајмери за PCR

Прајмери за PCR којом је извршена иницијална детекција гена *gst* зебрице и касније анализа експримирања у квантитативној ланчаној реакцији полимеразе у реалном времену (енгл. *quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*, qRT-PCR), ручно су дизајнирани на основу специфичних регија унутар сваког гена *gst* суперпородице (Табела 4.1). Ниво експримирања индивидуалних гена класа *Alpha*, *Mu* и *Pi* GST се не може уочити qRT-PCR методом услед високе идентичности њихових секвенци унутар кластера (ПРИЛОГ 1).

Табела 4.1. Секвенце прајмера коришћене за релативну квантификацију зебричних иРНК *gst* помоћу qRT-PCR анализе, дужине ампликона (енгл. *base pair*, bp), проценат ефикасности и параметри добијених стандардних кривих.

Име гена	Секвенце прајмера	<i>a</i>	<i>b</i>	Ефикасност (%)	Дужина ампл. (bp)
<i>gsta1-3</i>	F: 5'-GAGGGTCTGATAGATCTGATG-3' R: 5'-AACACTGGAAGGAAGCGCAC-3'	-3,22	30,53	104,60	119
<i>gstm1-3</i>	F: 5'-AATCAGGCGATGGACTTCC-3' R: 5'-AGTCAGAGAAGCTGCTTTAGAG-3'	-3,19	40,71	105,76	115
<i>gstp1-2</i>	F: 5'-CTACAACCTGTTTCGATCTCCT-3' R: 5'-GGGCAGAGATCTTGTCCAC-3'	-3,30	32,04	100,93	101
<i>gstt1a</i>	F: 5'-ATCTCATGGCTCAAAGGTCT-3' R: 5'-AAGACATGTTGAGATCCTCCA-3'	-3,40	24,81	97,00	110
<i>gstt1b</i>	F: 5'-CTACAAGAAGATTTCTCTGTTT-3' R: 5'-CAGCTAAGCAAAAAGTCTCCA-3'	-3,18	36,49	106,32	110
<i>gstt2</i>	F: 5'-GTGGAACAAATTGCGATAAGA-3' R: 5'-AAGCCATTGTCCTCCAGCAC-3'	-3,29	32,13	101,29	98
<i>gstol</i>	F: 5'-CAATGAGATCCTCCTCAAGA-3' R: 5'-CAGATTCATCGTCTCCAGC-3'	-3,22	31,78	104,60	109
<i>gstol2</i>	F: 5'-AAACGAGGCTTTGGCAAACA-3' R: 5'-CACTCCCATCATCTCTGCC-3'	-3,32	30,12	100,10	109
<i>gstz1</i>	F: 5'-GCCTCTGGGATCCAGCCT-3' R: 5'-AATCCTCGGTTGATGAAATGTT-3'	-3,37	33,08	98,10	95
<i>gstr1</i>	F: 5'-TAAAGAGAGATGTCCAGACT-3' R: 5'-ACCGGCTTCTCCAGCCACT-3'	-3,54	35,52	91,49	99
<i>mgst1a</i>	F: 5'-CGTAGAGCGTGTCCGAAGG-3' R: 5'-GATCTGGACCGGTCAGTGC-3'	-3,22	31,92	104,54	95
<i>mgst1b</i>	F: 5'-GCGATTGACAAAACAGGTCT-3' R: 5'-CATCGTCGCACTCTTTCCA-3'	-3,15	33,20	107,61	111
<i>mgst2</i>	F: 5'-CGTGGTGCTATTGTGGATAT-3' R: 5'-GATTCAGTATGTAGCCGGT-3'	-3,33	31,61	99,67	114
<i>mgst3a</i>	F: 5'-GATATGTGGCGCTAACCGGA-3' R: 5'-ACTGTACATTGTTGGATACGG-3'	-3,63	25,41	88,42	110
<i>mgst3b</i>	F: 5'-CGGGATGAAAGTTGGTGCT-3' R: 5'-TTGCGGATACACCTCCAG-3'	-3,42	25,80	96,10	127
<i>ef1a</i>	F: 5'-CCTGGGAGTGAAACAGCTGATC-3' R: 5'-GCTGACTTCCTTGGTGATTCC-3'	-3,43	42,49	95,50	100

a – нагиб; *b* – одсечак; F – узводни прајмер (енгл. *forward*); R – низводни прајмер (енгл. *reverse*).

4.5.3. Провера специфичности дизајнираних прајмера

Дизајнирани прајмери су коришћени за умножавање жељених секвенци, након чега су тако добијени ампликони подвргнути клонирању и секвенцирању ради потврде да прајмери амплификују жељену секвенцу.

Припрема ампликона за клонирање - ланчана реакција полимеразе

У ланчаној реакцији полимеризе као матрице користили су се одређени узорци кДНК, према литературним подацима за ткивно зависно експримирање (ко)ортолога. Прајмери (Табела 4.1) су у концентрацији од 400 nM употребљени у PCR реакцији са *Taq* ДНК полимеразом у условима: 94°C/2 мин., 39 циклуса: 94°C/30 секунди, 58°C/30 секунди, 72°C/1 мин. и потом 72°C/10 мин. (*Thermal Cycler, Biometra*, Гетинген, Немачка). *Taq* полимеразе приоритетно додаје аденин (А) на 3' крај продукта, па се овако амплификовани PCR продукти даље могу ТА клонирати.

Добијени PCR продукти су раздвојени хоризонталном електрофорезом на агарозном гелу (1%) са етидијум-бромидом за визуелизацију уз 1 × ТАЕ (енгл. *Tris-Acetate-EDTA*) пуфер, боју за наливање узорака *DNA dye* и маркер *GeneRuler DNA Ladder*, при напону од 70 mV и трајању

од 30 мин. Визуализација продуката је вршена помоћу UV транслуминатора (*Bachofer Laboratoriumsgeräte*, Ројтлинген, Немачка). Елуирање жељених ампликона из агарозног гела је вршено комерцијалним комплетом *MEGAquick-spin PCR ^ Agarose Gel Extraction System* или *MiniElute Gel Extraction* према упутствима произвођача.

Молекуларно ТА клонирање и трансформација DH5а компетентних бактерија

Трансформација DH5а компетентних бактерије је вршена методом топлотног шока, а пречишћени ампликони су молекуларно ТА клонирани помоћу *pGEM-T Vector System I* комплета, уз употребу T4 DNA лигазе према упутствима произвођача. На компетентне бактерије додат је конструкт *pGEM/gst* уз инкубацију на леду у трајању од 30 мин. Потом је извршен топлотни шок (42°C/20 секунди) и поновно инкубирање на леду у трајању од 2 мин. Опоравак бактерија у циљу постизања максималне ефикасности трансформације омогућен је додавањем 475 µL SOC медијума (SOB (енгл. *super optimal broth*) медијум обогаћен глукозом) и инкубирањем на 37°C у трајању од 1 ч. Бактерије су потом засејане (200 µL/плочи) на агарозној подлози која садржи *X-gal* (40 µg/mL), IPTG (0,1 mM) и ампицилин (100 µg/mL). Након тога плоче су инкубиране на температури од 37°C током наредних 14–16 ч.

Узгој течне културе трансформисаних DH5а бактеријских колонија

Након плаво-беле селекције додатно се проверила успешност трансформације бактеријских колонија PCR методом и агарозном електрофорезом у циљу потврде присуства фрагмента жељене дужине (беле колоније). За сваки ген је одабрана колонија у којој је инсерт најзаступљенији (има траку најјачег интензитета на агарозном гелу) и умножена као течна култура: запремина од 5 mL LB медијума са 100 µg/mL ампицилина, у инкубатору (37°C) са тресилицом (број обртаја: 250 rpm) и трајању 16–18 ч.

Изоловање ДНК плаزمида и одређивање примарне структуре

Изолација *pGEM-T* плаزمида са инсертом, из умножених бактеријских колонија у течной култури, је вршена стандардном минипреп техником употребом комерцијалног комплета (*DNA-Spin*,) према упутствима произвођача. Минипреп техника се заснива на алкалној хидролизи бактерија (*Birnboim*, 1983) и пречишћавању плазмида на комерцијалној колони која специфично везује ДНК.

Потврда инсертованих секвенци је добијена секвенцирањем изоловане плазмидне ДНК у *DNA* сервису, Завода за молекуларну биологију Института Руђер Бошковић, у Загребу, Република Хрватска. Припрема смеше за секвенцирање је било према упутству *DNA* сервиса. Секвенцирање је вршено методом по Сангеру (*Sanger* и сар., 1977) и било је базирано на *BigDye Terminator* комерцијалном комплету за секвенцирање (*Applied Biosystems*, Фостер Сити, Калифорнија, САД).

4.5.4. Одређивање ефикасности дизајнираних прајмера за гене *gst*

Теоријски ефикасност PCR реакције би требала да буде 100%, што значи да се жељени фрагмент удвостручује након сваког термалног циклуса током експоненцијалне фазе амплификације. Ефикасност представља значајан параметар квалитета PCR реакције, која се сматра добром уколико је ефикасност у опсегу 90–110%, односно одсечак стандардне криве у опсегу од –3,58 до –3,10 (*Real-time PCR handbook*, 2014). Ефикасност прајмера за сваки ген је потврђена апсолутном qRT-PCR методом коришћењем серије разблажења (10^1 – 10^8 броја копија) рекомбинантног плазмида као матрице, дизајнираних прајмера у концентрацији од 300 nM и *Power SYBR Green* боје. Добијени резултати ефикасности прајмера изражени у процентима уз параметре добијених кривих апсолутне квантификације дати су у Табела 4.1.

Након описаних поступака молекуларног клонирања омогућено је праћење експримирања гена *gst* у различитим ткивима/стадијумима развоја зебрице помоћу qRT-PCR методе употребом прајмера проверених специфичности и одређене ефикасности (Табела 4.1).

4.5.5. Релативна квантификација експримирања гена

Релативна квантификација експримирања гена у адултним ткивима и ембрионима зебрица урађена је qRT-PCR методом. Као што је напред речено, у случају класа *Alpha*, *Mu* и *Pi* GST није било могуће дизајнирати специфичне прајмере сваког представника за qRT-PCR анализу, услед веома високог степена идентичности нуклеотидног низа ових гена (ПРИЛОГ 1), које би задовољиле критеријум за дужину ампликона који се могу ефикасно умножавати (50–150 bp) (*Real-time PCR handbook*, 2014). Сходно томе, квантификација означена са *gst1-3*, *gstm1-3* и *gstp1-2* представља суму експримирања свих гена у оквиру појединачне класе.

За одабир ендogene контроле, тестирани су обрасци експримирања неколико гена, *gapdh* (глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа), *s18* (тип унутарћелијске рибозомалне рРНК молекуле), *b-actin* (актински протеин немишићних ћелија) и *ef1a* (елонгациони фактор 1 α) како би се пронашао ген са најстабилнијим експримирањем међу свим испитиваним узорцима ткива. Образац експримирања *ef1a* је био веома стабилан у свим узорцима ткива/стадијумима развоја зебрице (Слика 5.6 и Слика 5.10), што је у сагласности са претходно објављеним подацима (*McCurley* и *Callard*, 2008). Према томе, *ef1a* је даље коришћена као референтна (ендогена) контрола.

Комплементарна ДНК добијена након реверзне транскрипције РНК изоловане из ембриона/ларви је употребљена као матрица за qRT-PCR. За детекцију ампликона коришћена је *Power SYBR Green* боја и *ROX* као интернална референтна боја. Реакција је изведена у стандардним условима (95°C/10 мин., 40 циклуса: 95°C/15 секунди, 60°C/1 мин., анализа криве топљења) коришћењем апарата *ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Фостер Сити, Калифорнија, САД)* у присуству специфичних прајмера (Табела 4.1). Реакциона смеша у укупној запремини од 12,5 μ L садржала је компоненте у финалним концентрацијама: 1 \times *Power SYBR Green PCR Master Mix*, 300 nM узводног и низводног прајмера, 12,5 ng/бунарчићу кДНК продукта реакције реверзне транскрипције и DEPC воде. Сваки узорак анализиран је у дубликату.

qRT-PCR анализа дистрибуције иРНК гена *gst* у адултним ткивима оба пола зебрице је вршена коришћењем *ABI Prism 7300HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Фостер Сити, Калифорнија, САД)* и *Power SYBR Green* технологије. Реакциона смеша у укупној запремини од 10 μ L садржала је: 5 μ L 1 \times *Power SYBR Green PCR Master Mix*, по 0,5 μ L узводног и низводног прајмера (финалне концентрације 300 nM), 1,5 μ L кДНК (продукта реакције реверзне транскрипције) финалне концентрације 10 ng/бунарчићу и 2,5 μ L ултрачисте воде ослобођене од нуклеаза. Након почетне денатурације на 95°C током 10 мин. изведено је 40 циклуса умножавања (амплификације): 95°C/15 секунди, 60°C/1 мин., уз анализу криве топљења. Сваки јединствени узорак анализиран је у дубликату.

Кинетика експримирања гена *gst* је праћена употребом *ABI PRISM Sequence Detection Software 1.4 (Applied Biosystems, Фостер Сити, Калифорнија, САД)*. Анализа експримирања гена *gst* у сваком узорку ембриона и адултних зебрица извршена је qRT-PCR релативном методом квантификације, *Qgene* метода, односно нормализацијом добијених резултата на експримирање *ef1a* гена, као ендogene контроле. Ова метода је претходно описана у радовима *Muller* и сарадници (2002), *Simon* (2003) и *Lončar* и сарадници (2010). Релативни метод квантификације је описан са једначином (1):

$$(1) \text{MNE} = ((E_{\text{ref}})^{C_{\text{tref, mean}}}) / ((E_{\text{target}})^{C_{\text{target, mean}}})$$

где су: MNE – средња вредност нормализованог експримирања (енгл. *mean normalized expression*); E_{ref} – ефикасност ендogene контроле (*ef1a*); E_{target} – ефикасност таргетног гена; $C_{\text{tref, mean}}$ – средња C_t вредност добијена за ендogenous контролу (*ef1a*); $C_{\text{target, mean}}$ – средња C_t вредност добијена за таргетни ген.

Резултати експримирања гена *gst* представљају средњу вредност \pm стандардна грешка средње вредности релативног експримирања добијену из три независна експеримента са по 15 ембриона/ларви у сваком временском интервалу, односно 3–5 јединствених узорака за адултне јединке. Анализа добијених резултата је урађена помоћу *GraphPad Prism 5.00* програмског пакета (*GraphPad Software*, Ла Џола, Калифорнија, САД).

Ради бољег приказа резултата експримирања свих анализираних гена *gst* у ембрионима и ларвама зебрице, добијене вредности су помножене са фактором 10^3 ($\text{MNE} \cdot 10^3$), док су подаци добијени након qRT-PCR анализе гена *gst* код адултних ткива оба пола зебрице помножени са фактором 10^6 ($\text{MNE} \cdot 10^6$). На основу добијених вредности извршена је категоризација гена: **ниско експримирани** гени – за које је $\text{MNE} \cdot 10^6 < 1000$ (што одговара C_t вредности > 26), **умерено експримирани** гени – за које је $\text{MNE} \cdot 10^6$ у опсегу 1.000–10.000 ($C_t = 22$ –25), **високо експримирани** гени – за које је $\text{MNE} \cdot 10^6$ у опсегу 10.000–100.000 ($C_t = 19$ –21) и **веома високо експримирани** гени – за које је $\text{MNE} \cdot 10^6 > 100.000$ ($C_t < 18$).

4.6. Рекомбинантно експримирање протеина

Да би се омогућило експримирање рекомбинантних протеина Gst зебрице у потребним количинама, неходно је извршити молекуларно клонирање ових гена. То се постиже њиховим умножавањем PCR методом, потом ензимском обрадом добијених ампликона, лигацијом са вектором, трансформацијом у DH5 α бактерије, изолацијом умножених плаزمида и потврдом примарне структуре (секвенцирање) гена *gst*. Након клонирања умножене секвенце гена *gst* је потребно преклонирати у хетерологни систем за експримирање протеина, попут BL21 бактерија, а потом и индуковати експримирање рекомбинантних протеина Gst у оптималним условима (видети поглавље 4.3.1).

4.6.1. Молекуларно клонирање гена *gst* рибе зебрице

*Умножавање гена *gst* методом PCR*

Сваки ген *gst* је умножен PCR методом користећи кДНК зебрице као матрицу, а помоћу високо прецизне *Phusion* ДНК полимеразе и специфично дизајнираних прајмера за умножавање читавих гена *gstr1*, *gstt2* и *gstm3* (Табела 4.2) које имају уведено место за молекуларно клонирање употребом рестрикционих ензима *NheI*, *NotI* и *XhoI* (Табела 4.2). Ови прајмери су прилагођени специфичним рестрикционим местима на основу pET21a(+) мапе (Слика 4.4), а у циљу експримирања His обележивача на карбоксилном крају протеина Gst. *Phusion* ДНК полимеразе умножава ампликоне са равним крајевима (енгл. *blunt-end*). Гени *gst* су умножени у PCR реакцији (50 μL): 0,5 μL *Phusion* ДНК полимеразе, 1 μL 10 mM dNTP, 10 μL 5 \times HF пуфер, 50 ng одређене кДНК адултних зебрица као матрице (одабране на основу резултата ткивне дистрибуције иРНК гена који се клонирају), док су концентрације прајмера у реакцијама била 500 nM. Након почетне денатурације на 98°C током 2 мин. изведено је 34 циклуса умножавања (амплификације): 98°C/10 секунди денатурације, X°C/30 секунди хибридизације, 72°C/30 секунди елонгације, а потом је следила крајња елонгација: 72°C/10 мин. Температура хибридизације (енгл. *annealing*) (X) је била прилагођена свакој реакцији према упутствима произвођача полимеразе, а на основу тачке топљења (T_m) дизајнираних

прајмера (Табела 4.2). Оваква PCR реакција је омогућена употребом *Verity Thermal Cycler (Thermo Scientific, Волтам, Масачусетс, САД)* апарата са градијентним блоком за одржавање температуре.

Прајмери за умножавање гена *gst*

Прајмери које садрже места деловања рестрикционих ензима, а служе за умножавање читавих гена (*gstr1*, *gstt2*, *gstm3*) са циљем рекомбинантног експримирања протеина дате су у Табела 4.2. Сви прајмери су поручени од *Life Technologies* (Карлсбад, Калифорнија, САД).

Табела 4.2. Секвенце прајмера употребљених за умножавање гена *gst*, са инсертованим местима деловања рестрикционих ензима (црвена слова) и температуром топљења (T_m).

Име гена	Секвенца прајмера	Рестрикц. ензим	T_m (°C)
<i>gstr1</i>	F: 5'-TTGCTAGCATGGCGCAGAATATGTTGC-3'	<i>NheI</i>	64
	R: 5'-TTCTCGAGGGGAGGCTCTTGAGAATGTCTTCAC-3'	<i>XhoI</i>	64
<i>gstt2</i>	F: 5'-TTGCTAGCATGACCGGCAGACAGGC-3'	<i>NheI</i>	66
	R: 5'-TTCTCGAGGGCACTAAGTCAAGTGCAGAAACACCT-3'	<i>XhoI</i>	65
<i>gstm3</i>	F: 5'-TTGCTAGCATATGGCAATGAAGCTGGCA-3'	<i>NheI-NdeI</i>	66
	R: 5'-TTGCGGCCGCAACTCCTTCTTGTTCATTT-3'	<i>NotI</i>	62

F – узводни прајмер (енгл. *forward*); R – низводни прајмер (енгл. *reverse*).

Обрада ДНК ензимима

Добијени продукти PCR реакције су прво пречишћени агарозном гел-електрофорезом и елуирањем из гела помоћу *MiniElute Gel Extraction* комерцијалног комплета, а затим директно подвргнути дигестији 1 μ L рестрикционих ензима, *FastDigest*, уз одговарајући *FastDigest Green* обојени пуфер (Табела 4.2). Дигестија је вршена према упутству произвођача. рЕТ21а(+) плазмид је у циљу линеаризације такође подвргнут деловању истих рестрикционих ензима уз дефосфорилацију употребом алкалне фосфатазе осетљиве на температуру (1 U/ μ L) у циљу спречавања затварања плаزمид у коме није дошло до уметања инсерта. Након рестрикције поново је урађена агарозна гел електрофореза и изоловање жељених продуката помоћу истог комерцијалног комплета. Инсерти и вектор (у односу 3:1) су спојени помоћу 1 U T4 DNA лигазе.

Трансформација DH5 α бактерија, изолација плазмида и потврда примарне структуре гена *gst* (секвенцирање)

Трансформација DH5 α бактерија је вршена са 2,5 μ L лигацијске смеше (конструкт рЕТ21а(+)/*gst*) методом топлотног шока (42°C/20 секунди). Како рЕТ21а(+) плазмид носи ген за отпорност на ампицилин (Слика 4.4), селекција трансформисаних колонија је омогућена растом бактерија (37°C, 15 ч.) на подлози са ампицилином (100 μ g/mL). Израсле колоније су прво проверене путем PCR методе са *Taq* ДНК полимеразом и специфичним прајмерима (Табела 4.1), праћено агарозном гел (1,2%) електрофорезом. Да би се добила довољна количина рекомбинантног плазмида, потврђене трансформисане колоније су умножене као течна култура у инкубатору са тресилицом (LB медијум са 100 μ g/mL ампицилина, 37°C, 250 rpm), након чега је минипреп методом помоћу комерцијалног *DNA-Spin* комплета изолован рЕТ21а(+) плазмид са уклонираним жељеним геном *gst*. Минимум три позитивно уклонирани клона бактерија су се даље потврђивала одређивањем примарне структуре изолованих плазмида (*DNA* сервис, Завод за молекуларну биологију Института Руђер Бошковић, Загреб, Република Хрватска). Секвенцирани гени сваког клона су упоређивани са генским секвенцама из база података (NCBI и ENSEMBL). Уколико се секвенца једног клона разликује од секвенци друга два клона у једном или више базних парова, секвенце два идентична клона се сматрају валидним и један од ова два клона је изабран за даљи рад.

4.6.2. Припрема компетентних бактерија BL21

BL21 бактерије коришћене су за експримирање рекомбинантних протеина. Да би трансформација била успешна BL21 бактерије морају бити компетентне, тј. морају да поседују механизме који ће им омогућити усвајање ДНК фрагмента кроз ћелијски зид, као и његово уметање у хромозом или плазмид. Припрема компетентних бактерија BL21 је вршена додавањем 0,1 М CaCl₂ (Dagert и Ehrlich, 1979). Поступак је обухватао раст бактерија BL21 на агарозној подлози са хлорамфениколом (50 µg/mL), а потом и раст течне преконоћне бактеријске културе у инкубатору са тресилицом (LB медијум са 50 µg/mL хлорамфеникола, 37°C, 250 rpm). Култура бактерија гајена преко ноћи (16–18 ч.) је разблажена 50× са LB медијумом и уз праћење даљег раста културе, при истим условима, до достизања оптичке густине (енгл. *optical density*, OD) од 0,4. OD је праћена на спектрофотометру при таласној дужини од 600 nm (OD₆₀₀). Тада је прекинут раст бактеријске културе инкубирањем на леду 20 мин., након чега су бактеријске ћелије оборене (3.000×g, 10 мин., 4°C, 12 mL/туби). Исталожене бактеријске ћелије су лагано растворене са хладним 0,1 М CaCl₂ (250 µL/туби), инкубирани 30 мин. на леду и поново центрифугиране у истим условима. Исталожене бактеријске ћелије су благо растворене са 800 µL хладног 0,1 М CaCl₂ са 15% глицеролом и потом аликвотиране (100 µL/аликвоту) и чуване на –80°C. Провера компетентности је вршена трансформацијом бактерија са pUC18 контролним плазмидом који носи ген за резистентност на ампицилин и њиховим засејавањем на агарозне плоче са ампицилином.

4.6.3. Трансформација бактерија BL21

Сви изоловани pET21a(+) плазмиди са потврђеном уклонираном генском секвенцом *gst* зебрице (pET21a(+)/*gst* конструкти) су трансформисани у претходно припремљене компетентне BL21 бактерије. У циљу повећања ефикасности трансформације раније описани протокол је укључивао и додавање β-меркаптоетанола на бактеријске ћелије, непосредно пре додатка pET21a(+)/*gst* конструкта (максимално 50 ng). Селекција трансформисаних бактерија омогућена је растом на подлози која садржи ампицилин (100 µg/mL) и хлорамфеникол (50 µg/mL), а израслим колонијама је даље омогућен раст у течной култури уз додаток истих антибиотика. Аликвоти овако узгојених бактеријских клонова су чувани у 20% глицеролу на температури од –80°C до узгајања у циљу индукције експримирања рекомбинантних протеина *Gst*.

4.6.4. Индукција експримирања рекомбинантних протеина *Gst*

Течна култура трансформисаних BL21 бактерија која је расла преко ноћи (16–18 ч.) у инкубатору са тресилицом (37°C, 250 rpm) у LB медијуму који садржи ампицилин (50 µg/mL), разблажи се 40× са свежим LB медијумом који садржи ампицилин (50 µg/mL) тако да укупна запремина буде 100 mL. Раст бактеријске културе наставља се у истим условима (37°C, 250 rpm) до постизања OD₅₉₅ = 0,4–0,6. Након тога, индукција експримирања протеина *Gst* постиже се додавањем 1 mM IPTG (Pouliou и сар., 2015) при брзини мешања од 100 rpm. Температура на којој је омогућен раст бактеријске културе током индукције је 30°C (Sugantha priya и сар., 2010). Вршено је оптимизовање времена индукције рекомбинантног протеина *Gstm3* у трајању од 2 до 12 ч. Након истека времена индуковања експримирања хетерологног протеина, трансформисане BL21 бактерије су сакупљене центрифугирањем 3.000×g, 30 мин., на температури од 4°C. Талог бактеријских ћелија је замрзнут и чуван на температури од –80°C до поступка пречишћавања рекомбинантних протеина.

4.7. Пречишћавање рекомбинантних протеина

4.7.1. Лизирање, сонификација и грубо раздвајање

Талог индукованих бактеријских ћелија је ресуспендован у 9 mL пуфера за лизирање (20 mM Na-фосфатни пуфер, 500 mM NaCl, 40 μ L/mL инхибитора протеаза, pH 8,4), а потом је додат 1 mL свеже припремљеног лизозима (1 mg/mL) и све је инкубирано на леду 30 мин. Након деловања лизозима узет је узорак бактерија (означен као Ф1, запремине 30 μ L), а остатак лизата је даље подвргнут ултразвучној сонификацији ниске фреквенције: 6 \times 15–20 секунди, уз паузе на леду у трајању од 1 мин. Након ултразвучне сонификације одвојен је узорак Ф2 у запремини од 30 μ L, док је остатак потом центрифугиран (10.000 \times g, 45 мин., 4°C). У супернатанту се издвојила унутарћелијска фракција бактерија у којој се очекује доминантно присуство рекомбинантног протеина Gst. Узет је узорак супернатанта у запремини од 30 μ L и обележен је са Ф3. Талог је сачуван ради провере присутности рекомбинантног протеина уколико је нерастворљив, односно уколико је формирао агрегације и инклузиона тела.

4.7.2. Афинитетна хроматографија са имобилизованим металом

Метода афинитетне хроматографије са имобилизованим металом (енгл. *Immobilized-Metal Affinity Chromatography*, ИМАС) се заснива на постојању афинитета хистидинског обележивача рекомбинантног протеина према јонима никла и формирању координантне ковалентне везе. Везани протеини се елуирају помоћу компетитивног молекула, имидазола, који има јачи афинитет за никл.

HisTrap HP колона

Колона је коришћена према упутству произвођача. Еквилибрисање колоне (запремине 1 mL) са имобилизованим никлом (Ni), HisTrap, се вршило са 5 mL пуфера који потпомаже везивање рекомбинантног протеина (20 mM Na-фосфатни пуфер, 500 mM NaCl, pH 8,4). Претходно добијени супернатант (унутарћелијска фракција бактерија) је нанет на афинитетну колону, која се потом испира са 10–15 mL истог пуфера. Елуирање рекомбинантног протеина је вршено са 5 mL пуфера за елуирање (20 mM Na-фосфатни пуфер, 500 mM NaCl, 350 mM имидазола pH 8,4). Током поступка пречишћавања рекомбинантног протеина при сваком кораку је издвајан узорак у запремини од 30 μ L, где: Ф4 представља фракцију након протока супернатанта кроз хроматографску колоницу (енгл. *flow through fraction*); Ф5 представља фракцију након испирања хроматографске колонице (енгл. *wash fraction*); Е1–Е5 су фракције постепеног елуирања протеина са хроматографске колонице.

Ni-NTA агароза

Ni²⁺-*nitriлотriacetate acid* (Ni-NTA) смола која афинитетно везује His-обележене протеине еквилибрисана је два пута са по 1 mL пуфера за који потпомаже везивање протеина (25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl, 20 mM имидазол, 1 mM EDTA), уз лагано ресуспендовање и центрифугирање (800 \times g, 3 мин., 4°C). На тако добијен талог Ni-NTA смоле додаје се мања количина унутарћелијске фракције бактерија (супернатант након грубог раздвајања) како би се ресуспендовала и све пренело у остатак супернатанта. Потом је инкубација трајала 1 ч. на 4°C уз благо трескање. Према упутству произвођача додато је 500 μ L Ni-NTA смоле која има капацитет везивања до 5 mg протеина. Након инкубације, Ni-NTA смола је сакупљена центрифугирањем 800 \times g, 3 мин., затим у минималном делу супернатанта ресуспендована и пребачена на полипропиленску колону. Ni-NTA смола је потом два пута испрана са 5 mL пуфера за испирање који је садржавао 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl и 40 mM имидазол. Рекомбинантни протеини Gst су елуирани са 2 mL пуфера који је садржавао 25 mM

Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl и 500 mM имидазол. Елуирање се прво вршило са 1 mL пуфера за елуирање и тај корак се понављао пет пута са истим елуатом, тако је добијен елуат означен са ЕЛ1. Елуација се поновила са још 1 mL пуфера за елуирање и тај корак се понављао пет пута са истим елуатом, тако је добијен елуат означен са ЕЛ2. Елуати ЕЛ1 и ЕЛ2 су спојени, тако да је укупна запремина елуата била 2 mL. Слично као и приликом пречишћавања рекомбинантних протеина HisTrap HP колоном, при сваком кораку пречишћавања помоћу Ni-NTA агарозе одвојени су узорци за SDS-PAGE анализу.

4.7.3. Дијализа

Имидазол, као саставни део пуфера за елуацију, може да ремети ензимску активност пречишћених протеина, услед чега је неопходно ослободити добијене елуате од ове супстанце. У циљу отклањања имидазола из добијених елуата вршила се дијализа, употребом дијализних кесица и дијализног пуфера (20 mM Na-фосфатни пуфер, 50 mM NaCl, 1% глицерол, 0,5 mM дитиотреитол, pH 6,5), као хипотоничног раствора. Дијализна кесица дужине око 10 cm, претходно потопљена у ултрачисту воду у трајању од 2–3 мин., је напуњена спојеним елуатима и стављена у 1 L хладног дијализног пуфера. Уз константно мешање на магнетној мешалици (300 rpm), инкубирање је вршено током ноћи на температури од 4°C. Потом је дијализни пуфер замењен са 0,5 L свежег дијализног пуфера уз инкубирање при истим условима у трајању од 4–5 ч. По истеку инкубационог времена елуати, односно узорци који садрже пречишћене протеине Gst, из дијализне кесице су аликвотирани (50 µL/тубици), замрзнути на –80°C и тако чувани до поступка одређивање активности протеина, односно ензимских тестова. Једном одмрзнут аликвот није се више замрзавао.

4.8. Анализа рекомбинантних протеина

4.8.1. Полиакриламид електрофореза са натријум додецилсулфатом (SDS-PAGE)

Једнодимензиона SDS-PAGE анализа у континуираном пуферском систему је коришћена у циљу контроле присуства протеина од интереса и чистоће фракција у сваком кораку изолације, односно пречишћавања протеина. Узорци за анализу су даље припремљени тако што им је додато 2 µL β-меркаптоетанола и 8 µL пуфера за припрему узорка (1:5). Излагањем температури од 95°C у трајању од 5 мин. извршена је денатурација узорака, а потом су они центрифугирани (10.000×g, 3 мин.) и нанети на 3% полиакриламидни гел за концентровање узорака, уз електрофоретско кретање ка 12% гелу за раздвајање узорака. Користио се маркер *Kaleidoscope* и *Mini – PROTEAN 3 cell* апаратура (*Bio-Rad*, Херкјулиз, Калифорнија, САД), при напону од 200 V у трајању око 40 мин. По завршетку електрофорезе гел је испран са дестилованом водом и обојен са 15 mL раствора за бојење: 500 mL метанола, 400 mL дестиловане воде, 100 mL сирћетне киселине, 0,1 g СВВ-G250 боје у трајању од 1 ч. на собној температури уз благо мешање (50 rpm). Потом је вршено обезбојавање гела са раствором (100 mL метанола, 800 mL, дестиловане воде, 100 mL сирћетне киселине) преко ноћи, на собној температури уз мешање (80 rpm). Сликање гелова је вршено апаратом *myECL Imager* (*Thermo Fisher*, Хелсинки, Финска).

4.8.2. Дензитометријска анализа

Дензитометријском анализом испитан је удео жељеног протеина Gst у елуату. Испитан је елуат рекомбинантног протеина Gst2 добијен пречишћавањем HisTrap HP колоном. Елуат је разблажен 2×, 5×, 10×, 20×, и урађена је SDS-PAGE анализа заједно са познатим концентрацијама раствора BSA (25–1000 µg/mL), као стандардне криве. Вршено је поређење густине тачака траке која се налази у висини која одговара молекулској маси рекомбинантног

протеина и стандардне BSA криве. Поређење густине тачака је вршено *myImageAnalysis* програмским пакетом (*Thermo Fisher*, Хелсинки, Финска).

4.8.3. Одређивање количине пречишћених протеина

Количина протеина у елуатима након афинитетне хроматографије одређена је колориметријски, методом по Брадфорду (*Bradford*, 1976). Израчунавање концентрације протеина у узорку вршено је на основу стандардне криве распона 0,4–3 µg протеина коришћењем параметара линеарне регресије. Тачке криве формиране су употребом BSA концентрације 0,2 mg/mL који се раствара у К-фосфатном пуферу (100 mM). Концентрација пречишћених протеина била се у распону 1,6–3,8 mg/mL.

4.8.4. Имуноблот анализа

С обзиром на недостатак одговарајућих примарних антитела за протеине Gst зебрице, употребом примарног специфичног антитела (*anti-His*) који препознаје 6× His обележивач омогућена је идентификација, односно визуелизација изоформи Gst зебрице. Протеини у количини 10 µg су електрофоретски раздвојени на претходно описан начин (видети поглавље 4.8.1). Користио се протеински маркер *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*. Трансфер протеина са гела на поливинилиден дифлуорид мембрану (*Milipore*, Билерика, Масачусетс, САД) је вршен при напону од 100 V у трајању од 2 ч. на температури од 4°C у *Mini – PROTEAN 3 cell* (мокри трансфер). Након трансфера протеина извршено је блокирање мембране у пуферу: 3% BSA растворен у TBS (енгл. *Tris Base Saline*) пуферу (10 mM *Tris base*, 100 mM NaCl, pH 7,4) који је садржао 0,1% Tween-20 на собној температури у трајању од 2 ч., уз мешање (50 rpm). Потом је мембрана инкубирана са *anti-His* (1:3.000) моноклоналним антителом, преко ноћи на температури од 4°C уз ротацију слабијег интензитета. Након чега је мембрана инкубирана са козјим анти-мишјим IgG антителом конјугованим са пероксидазом рена (1:2.000) (*Bio-Rad*, Херкјулиз, Калифорнија, САД) у трајању од 1 ч. на собној температури, уз ротацију. Развијање мембране је вршено са хемилуминисцентним супстратом *Supersignal West Femto*, помоћу *myECL Imager* апарата.

4.9. Функционална карактеризација рекомбинантних протеина

4.9.1. Ензимски тестови

За функционалну карактеризацију рекомбинантних протеина оптимизовани су ензимски тестови, односно есеји, код којих се активност пратила употребом оптичких метода: спектрофотометрије и флуориметрије. Ензимска активност праћена је у функцији времена (интервал од 30 секунди до 10 мин.). Да би се одредила оптимална концентрација рекомбинантних протеина Gst у реакционој смеси, тестиране су њихове различите концентрације: 0, 10, 20, 40, 60 и 100 µg/mL, уз константну концентрацију ко-супстрата редукованог глутатиона (GSH) од 1 mM. Мерење активности рекомбинантних протеина Gstm3 и Gstm2 вршено је помоћу модел супстрата CDNB крајње концентрације од 1 mM, док је за ензим Gstm1 оптимизација есеја вршена помоћу модел супстрата MCB, крајње концентрације 200 µM. Оба супстрата се додају непосредно пред почетак мерења апсорбанце/флуоресценције. На основу добијених резултата оптимизације (Слика 5.17) одабрана је концентрација од 30 µg/mL рекомбинантног протеина Gst рачунато на укупну запремину реакционе смеше (односно 7,5 µg по бунарчићу) и временски период од 10 мин. за мерење активности Gst.

4.9.2. Спектрофотометријска метода

У циљу функционалне карактеризације рекомбинантних протеина Gst мерена је активност према CDNB супстрату спектрофотометријском методом према протоколу раније описаном у раду *Habig* и сарадници (1974) уз додатне модификације. Ензимски катализована реакција, као *in vitro* приступ, одвијала се на 25°C у *UV-star* транспарентној плочи са 96 бунарчића (*Greiner Bio-One GmbH*, Фрикенхаузен, Немачка). Реакциона смеша (250 μL) се састојала од: рекомбинантног протеина Gst, GSH и CDNB одговарајућих концентрација исказаних на укупну запремину реакционе смеше. Све компоненте су припремане у 100 mM К-фосфатном пуферу (pH 6,5). Слепа проба је уместо рекомбинантног протеина Gst, садржала К-фосфатни пуфер. Апсорбанца измерена у овим бунарчићима указује на брзину спонтаног формирања CDNB-GSH конјугата. Мерења су вршена на фотометру *Multiskan FC Microplate Photometer* (*Thermo Scientific*, Волтам, Масачусетс, САД). У циљу одређивања кинетике ензимски катализоване реакције апсорбанца је мерена 10 мин. у интервалима од 30 секунди на таласној дужини од 340 nm. На основу нагиба растуће апсорбанце CDNB-GSH конјугата, израчунато је формирање супстрат-GSH конјугата на основу Ламбер-Беровог закона (2):

$$(2) \quad A = \varepsilon \times c \times l$$

Где су: A – апсорбанца, ε – моларни коефицијент екстинкције ($\varepsilon_{\text{CDNB}} = 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), c – концентрација насталог конјугата, l – дужина апсорпционог слоја ($l = 0,649 \text{ cm}$).

Односно (3):

$$(3) \quad \text{Ензимска активност} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times l}$$

Где је ΔA – пораст апсорбанце по минути. Добијена вредност се дели са концентрацијом протеина у реакцији и исказује као $\mu\text{mol}/\text{мин}/\text{mg}$ протеина.

4.9.3. Спектрофлуориметријска метода

У циљу функционалне карактеризације рекомбинантних протеина Gst мерена је активност према супстрату МСВ спектрофлуориметријском методом према протоколу раније описаном у раду *Kamencic* и сарадници (2000) уз додатне модификације. Ензимски катализоване реакција, као *in vitro* приступ, одвијала се на 25°C у црним плочама са 96 бунарчића са равним дном (*Sigma-Aldrich*, Тауфкирхен, Немачка). Реакциона смеша (250 μL) се састојала од: рекомбинантног протеина Gst, GSH и супстрата МСВ одговарајућих концентрација. Све компоненте су припремане у 100 mM К-фосфатном пуферу (pH 6,5). Слепа проба је уместо рекомбинантног протеина Gst садржала К-фосфатни пуфер. Флуоресценција измерена у овим бунарчићима указује на брзину спонтаног формирања МСВ-GSH конјугата. Мерења су вршена на *Fluoroskan Ascent FL Microplate Reader* (*Thermo Fisher*, Хелсинки, Финкса). У циљу одређивања кинетике ензимски катализоване реакције флуоресценција је мерена 10 мин. у интервалима од 30 секунди на таласним дужинама екситације 355 nm и емисије 460 nm. На основу нагиба растуће флуоресценције МСВ-GSH конјугата, израчунато је формирање супстрат-GSH конјугата. Активност је представљена као флуоресцентна јединица (енгл. *Fluorescent Unit*, FU) по минути и mg протеина (FU/мин/mg протеина).

4.9.4. Одређивање кинетичких параметара ензимски катализоване реакције

У циљу одређивања параметара ензимски катализоване реакције, K_m и V_{max} за оба супстрата активност Gst мерена је у истим, претходно описаним, условима уз шири опсег концентрација супстрата: CDNB (0,1–15 mM) и MCB (1–1000 μ M), док је крајња концентрација ко-супстрата GSH износила 1 mM, а рекомбинантног протеина 30 μ g/mL. За сваку концентрацију супстрата, рађена је слепа проба, односно уместо рекомбинантног протеина Gst реакциона смеша је садржала К-фосфатни пуфер. Кинетика везивања рекомбинантног протеина Gst са ко-супстратом GSH мерена је у присуству супстрата CDNB (1 mM), уз шири опсег концентрација GSH (0,25–10 mM) и 30 μ g/mL рекомбинантног протеина. Слепа проба је уместо рекомбинантног протеина Gst садржала К-фосфатни пуфер. При израчунавању брзине ензимски катализоване реакције подаци о измереној апсорбаци, односно флуоресценцији у бунарчићима где није био присутан ензим (слепа проба) одузимани су од података измерених у бунарчићима где је ензим био присутан. Резултати кинетике ензимски катализоване реакције анализирани су помоћу *GraphPad Prism 5.00* програмског пакета, где су параметри K_m и V_{max} одређивани помоћу нелинеарне регресије користећи Михаелис-Ментен кинетику (4):

$$(4) \quad V = \frac{V_{max} \times [S]}{[S] + K_m}$$

Где су: V – брзина (за CDNB супстрат – μ mol/мин/mg протеина, за MCB супстрат – FU/мин/mg протеина), V_{max} – максимална брзина реакције, $[S]$ – концентрација супстрата и K_m – Михаелис-Ментен константа.

4.9.5. Тестирање инхибиторног потенцијала супстанци

Тест инхибиције је заснован на претходно описаном спектрофлуориметријском есеју за активност GST према MCB супстрату. Испитивање је изведено на 25°C у црним плочама са 96 бунарчића са равним дном са запремином реакционе смеше од 250 μ L. Реакциона смеша се састојала од: 100 mM К-фосфатног пуфера (pH 6,5), рекомбинантних протеина Gst (7,5 или 1,5 μ g по бунарчићу)¹, ко-супстрата GSH у коначној концентрацији 1 mM и флуоресцентног супстрата MCB у коначној концентрацији 100 μ M. За слепу пробу реакциона смеша је садржала К-фосфатни пуфер уместо рекомбинантног протеина Gst. Тестиране супстанце су примењене у коначној концентрацији од 100 μ M, изузев карбарила и пробенецида који су тестирани у концентрацији од 50 μ M због ниске растворљивости. Супстанце су претходно растворене у одговарајућем растварачу (етил-алкохол, метил-алкохол, или DMSO), а радни раствори супстанци припремани су у К-фосфатном пуферу тако да је концентрација растварача у реакционој смеси била 1%. Утврђено је да у тим концентрацијама растварачи не утичу на вредности флуоресценције како у слепој проби, тако ни у позитивној контроли. Реакциона смеша без тестираног једињења, уместо кога је додат К-фосфатни пуфер, је коришћена као позитивна контрола. Претходно је испитана активност тестираних једињења² у погледу њиховог утицаја на флуоресценцију MCB-GSH конјугата, односно припремана је одговарајућа слепа проба која је садржавала тестирано једињење (100 μ M) и К-фосфатни пуфер уместо рекомбинантног протеина Gst. Показано је да рифампицин и естрадиол у

¹ Есеји су рађени са рекомбинантним протеином Gstr1 који је пречишћен или помоћу HisTrap HP колоне или Ni-NTA агарозе (видети потпоглавље 4.7.2). Пречишћавањем рекомбинантних протеина другом методом добијен је бољи принос и стога је коришћена мања количина протеина у реакционој смеси. Кинетички параметри рекомбинантних протеина пречишћених једном или другом методом били су у потпуности упоредиви.

² Испитан је утицај на флуоресценцију MCB-GSH конјугата следећих једињења: тестостерон, 17 α -естрадиол, 17 β -естрадиол, бензо[а]пирен, 3,4-дихлоранилин, 3,4-дихлорфенол, бисфенол А, ди(2-етилхексил)фталат, терцијарни-бутил-хидрокинон, трибутилтин хлорид, атразин, карбамазепин, клофибрат, диклофенак, ибупрофен и рифампицин, као и поларна фракција узорка отпадне воде.

примењеној концентрацији смањују у одређеној мери вредност флуоресценције слепе пробе, док остале супстанце не утичу на ту вредност. Разлике у израчунатим вредностима ензимске активности када је од укупне вредности флуоресценције одузимана слепа проба са или без тестиране супстанце биле су мање од 10%. С обзиром да је интересејска варијација за наведене супстанце била у опсегу 5–23% (изузев за терцијарни-бутил-хидрокинон – 5%), за остале испитиване супстанце, слепа проба је садржавала К-фосфатни пуфер уместо рекомбинантног протеина Gst и тестираног једињења. Флуоресценција је мерена помоћу апарата (*Infinite M200*, Tecan, Салцбург, Аустрија или *Fluoroskan Ascent FL*, Thermo Fisher, Хелсинки, Финска) на таласним дужинама 355 nm за ексцитацију и 460 nm за емисије у трајању од 10 мин. уз мерење у интервалима од 15 или 30 секунди. Резултати су исказани као проценат (%) активности рекомбинантног протеина Gst у односу на позитивну контролу.

4.9.6. Одређивање константе инхибиције (K_i) и типа инхибиције

За једињења која при тестираној концентрацији (100 μM) инхибирају ензимску активност GST за више од 50% у поређењу са контролом одређивала се K_i вредност и тип реверзибилне интеракције. Тест инхибиције за одређивање K_i вредности испитиваних једињења је заснован на Михаелис-Ментен кинетици. У присуству различитих концентрација МСВ супстрата (5–600 μM), активност рекомбинантног протеина Gst испитана је у одсуству (позитивна контрола) и присуству константне концентрације потенцијалног инхибитора. Истовремено су тестиране 2–3 концентрације инхибитора одабране на основу степена (%) инхибиције која је уочена током иницијалног тестирања инхибиторног потенцијала. Реакциона смеша се састојала од: 100 mM К-фосфатног пуфера (pH 6,5), рекомбинантних протеина Gst у количини од 7,5 или 1,5 μg по бунарчићу, ко-супстрата GSH у коначној концентрацији 1 mM, флуоресцентног супстрата МСВ (5–600 μM) и тестиране супстанце у одговарајућој концентрацији. Реакциона смеша без тестираног једињења, уместо кога је додат К-фосфатни пуфер је коришћена као позитивна контрола. За сваку концентрацију супстрата рађена је слепа проба која је садржала К-фосфатни пуфер уместо рекомбинантног протеина Gst и тестираног једињења.

Средња вредност, стандардна грешка средње вредности (енгл. *standard error of mean*, SEM) и интервал поверења (95%) су израчунати на основу 4–6 поновака из три независна експеримента. За одређивање K_i вредности, очитани резултати су анализирани нелинеарном регресијом, употребом модела мешовите инхибиције. Добијене криве су фитоване у *GraphPad Prism 6.00* програмском пакету. Анализа резултата на овај начин омогућава добијање α вредности која даље служи за одређивање типа интеракције тестираних једињења са рекомбинантним протеинима Gst. Ова вредност одређује степен промене афинитета ензима за дати супстрат у присуству инхибитора. У случају када је вредност α једнака један ($\alpha = 1$), инхибитор испољава подједнак афинитет за везивање за слободан ензим и ензим у комплексу, и не утиче на афинитет ензима за дати супстрат, што резултује класичном некомпетитивном инхибицијом. Када је α број далеко већи од један ($\alpha \gg 1$) везивање инхибитора блокира везивање супстрата, што представља компетитивну инхибицију. У том случају инхибиторна супстанца може да буде супстрат за дати ензим, односно да он катализује њену трансформацију. У случају када је α веће од један ($\alpha > 1$), инхибитор се лакше везује за слободан ензим него за ензим у комплексу са супстратом, односно када је α мање од један ($\alpha < 1$), инхибитор се лакше везује за ензим у комплексу са супстратом у односу на слободан ензим. У та два случаја ради се о мешовитом типу инхибиције (Segel, 1976), или о некомпетитивном типу инхибиције у ширем смислу (Copeland, 2005). За графичку илустрацију типа инхибиције коришћен је *Lineweaver-Burk* дијаграм (двоструко реципрочни дијаграм) који представља графички приказ *Lineweaver-Burk* једначине за ензимску кинетику. На x-осу се уносе подаци за реципрочну вредност концентрације супстрата, а на y-осу за реципрочну вредност иницијалне брзине реакције што резултира линеаризацијом Михаелис-Ментен једначине. Одсечак на y-оси је једнак је реципрочној вредности V_{max} ; док се одсечак на x-оси изједначава са $-1/K_m$. У

присуству конкуритивног инхибитора, добија се серија правих које се секу на у-оси, односно на реципрочној вредности V_{\max} . У случају некокуритивне инхибиције ($\alpha = 1$) серија правих конургира ка негативном делу х-осе (на вредност $-1/K_m$). Када је у питању некокуритивна инхибиција где је $\alpha > 1$, серија правих се сече у горњем левом квадранту координатног система. У односу на израчунате K_i вредности извршена је категоризација инхибитора: **веома јаки инхибитори** – за које је $K_i < 1 \mu\text{M}$, **јаки инхибитори** – за које је $K_i = 1\text{--}20 \mu\text{M}$, **умерени инхибитори** – за које је $K_i = 20\text{--}40 \mu\text{M}$ и **слаби инхибитори** – за које је $K_i > 40 \mu\text{M}$.

4.10. Обрада података

Графички приказ у виду тзв. топлотне мапе (енгл. *heatmap*), који омогућава уочавање међусобне повезаности образаца експримирања гена *gst* током ембрионалног и ларвеног стадијума развоја, добијен је методом хијерархијског кластеровања (енгл. *Hierarchical Clustering*, HLC), применом Еуклидове дистанце као матрице помоћу програмског пакета означеног као енгл. *Multi experiment Viewer*, MeV (доступно на интернет страници: „MeV”) према упутствима произвођача.

Статистичка анализа разлика у експримирању иРНК гена *gst* у различитим ткивима (ПРИЛОГ 6) рађена је методом анализе варијансе (*ANOVA*) једног фактора варијабилитета и употребом Такијевог (енгл. *Tukey's*) *post hoc* теста. Вредности $p < 0,05$ сматране су статистички значајним. Статистичка поређења везана за полно зависну дистрибуцију иРНК нису извршена због малог броја узорака потребних за непараметријску статистичку анализу.

Предикција тродимензионалне структуре ових протеина урађена је методом хомологног моделовања помоћу *ROBETA* сервера (доступног на интернет страници „*Robetta: full-chain protein structure prediction server*”), док је визуелизација модела омогућена употребом *PyMOL* програмског пакета (*DeLano*, 2002).

Статистичка анализа каталитичке ефикасности којом рекомбинантни протеини *Gst* трансформишу одговарајуће супстрате/ко-супстрате добијена је *ANOVA* методом и употребом Такијевог *post hoc* теста (Табела 5.8), док је инхибиторни потенцијал фракција узорка отпадне воде анализиран *t*-тестом ($p < 0,05$) (Слика 5.31).

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Идентификација гена *gst* рибе зебрице, конструкција филогенетског стабла ензимске суперпородице *Gst*

У оквиру генома зебрице идентификовано је 27 различитих чланова ензимске суперпородице глутатион-S-трансфераза, који су дистрибуирани у 9 засебних класа. Седам класа припада унутарћелијској (цитосолној) породици ензима *Gst*: *Alpha*, *Mu*, *Pi*, *Omega*, *Theta*, *Zeta* и *Rho*; једна класа, *Kappa*, припада митохондријској породици, док микрозомалној породици припада МАРЕГ класа ензима *Gst*. У циљу филогенетске анализе употребом доступних база података (NCBI, Ensembl и DOE *Joint Genome Institute*) преузете су секвенце свих гена *GST/gst* за представнике појединих класа у оквиру типа хордата: сисари (човек, лат. *Homo sapiens*); птице (кокошка, лат. *Gallus gallus*); гмизавци (зелена анола, лат. *Anolis carolinensis*), водоземци (тропска канџаста жаба, лат. *Xenopus tropicalis*), рибе (зебрица, лат. *Danio rerio*; трободља, лат. *Gasterosteus aculeatus*; зелена тачкаста фугу риба, лат. *Tetraodon nigroviridis*; јапанска фугу риба, лат. *Takifugu rubripes*; медака, лат. *Oryzias latipes*); подтип копљаши (амфиоксус, лат. *Branchiostoma floridae*); подтип плашташи (асцидија, лат. *Ciona intestinalis*) (ПРИЛОГ 2). Вишеструко поравнање изведених низова аминокиселина хуманих и зебричних протеина *GST/Gst*, приказано у ПРИЛОГ 5, омогућава идентификацију мотива и аминокиселина који су специфични унутар одређене класе ензима. Очуваност одређених мотива и/или аминокиселина омогућава боље разумевање функције протеина *Gst* зебрица на основу до сада показане улоге ових структура у хуманим ортологним протеинима.

Добијени резултати показују да је ензимска класа *Alpha* еволутивно очувана од подтипа плашташа (лат. *tunicata*) до класе сисара (лат. *mammalia*) (Слика 5.1А) уз варијабилан број гена у таксономским групама (Табела 5.1). Класа *Alpha* зебрице садржи три члана: *gst1*, *gst2* и *gst3*, локализованих на 13. хромозому (Табела 5.2). Очувана синтенија гена *Alpha gst/GST* зебрице и човека показана је постојећом синтенијом између кластера на хромозому 13 у геному зебрице и кластера на хуманом хромозому 6 (Слика 5.5А). Пошто су гени у оквиру оба кластера повезани, није могуће на основу генског окружења закључити који ген *gst* зебрице је директан ортолог специфичног гена *GSTA* у хуманом геному. Протеински производи гена *gst* класе *Alpha* зебрице међусобно су веома слични са 91–93% идентичности аминокиселинске секвенце (ПРИЛОГ 4).

Табела 5.1. Број ортолога *GST/gst* анализираних врста у оквиру типа хордата: сисари (човек, *H. sapiens*); птице (кокошка, *G. gallus*); гмизавци (зелена анола, *A. carolinensis*), водоземци (тропска канџаста жаба, *X. tropicalis*), рибе (зебрица, *D. rerio*; трободља, *G. aculeatus*; зелена тачкаста фугу риба, *T. nigroviridis*; јапанска фугу риба, *T. rubripes*; медака, *O. latipes*); копљаши (амфиоксус, *B. floridae*); плашташи (асцидија, *C. intestinalis*).

Суперпородица <i>GST/gst</i>												
Породица		Унутарћелијска (цитосолна)							Митохондријална		Микрозомална	Укупан број
Врста	Класа	<i>Alpha</i>	<i>Mu</i>	<i>Pi</i>	<i>Omega</i>	<i>Theta</i>	<i>Zeta</i>	<i>Rho</i>	<i>Kappa</i>	МАРЕГ*		
<i>H. sapiens</i>		5	5	1	2	2	1	-	1	6	23	
<i>G. gallus</i>		4	1	-	1	2	1	-	1	6	16	
<i>A. carolinensis</i>		2	1	2	1	2	1	-	1	5	15	
<i>X. tropicalis</i>		3	1	3	2	2	1	-	2	6	20	
<i>D. rerio</i>		3	3	2	2	3	1	1	4	8	27	
<i>G. aculeatus</i>		1	1	-	1	1	1	5	1	5	16	
<i>T. nigroviridis</i>		1	1	-	1	2	1	3	1	5	15	
<i>T. rubripes</i>		1	2	-	1	2	1	3	1	5	16	
<i>O. latipes</i>		1	2	-	2	3	1	5	1	6	21	
<i>B. floridae</i>		2	2	-	4	1	1	3	1	2	16	
<i>C. intestinalis</i>		3	3	-	4	1	-	-	1	1	13	

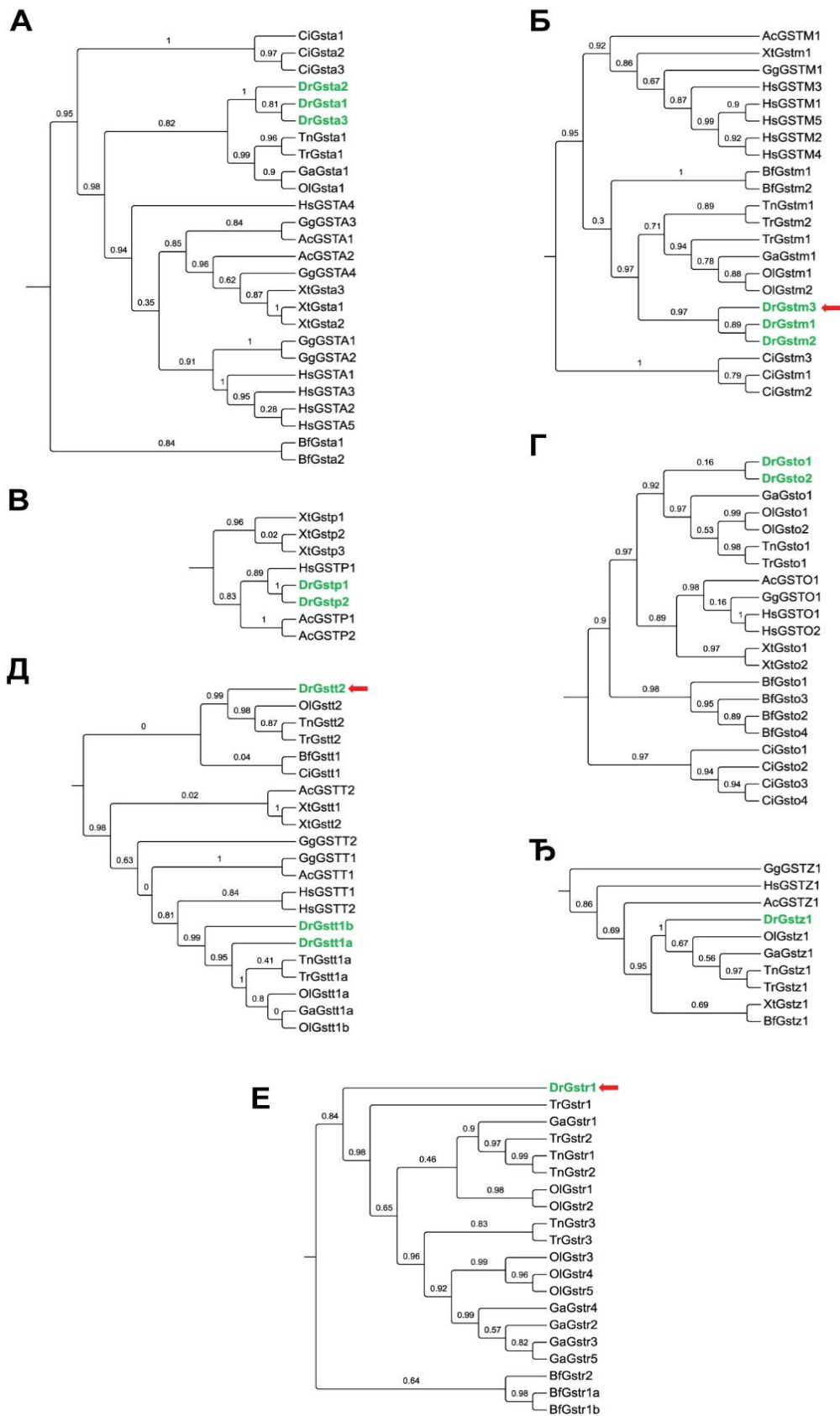
* У оквиру МАРЕГ класе убројани су представници који немају трансферазну активност (*ltc4s, flap, ptges*).

Ензимска класа *Mu* код зебрице садржи три гена: *gstm1*, *gstm2* и *gstm3*, уз присутне ортологе у свим анализираним геномима (Табела 5.1, Слика 5.1Б, ПРИЛОГ 3). Информације о приступном коду, дужини протеинских продуката и локализацији ових гена у геному дате су у Табела 5.2. *GSTM* (*GSTM1-5*) гени у хуманом геному су локализовани у оквиру кластера на хромозому 1 који је у синтенији са кластером на хромозому 8 у геному зебрице (Слика 5.5Б). Слично као код класе *Alpha*, анализа генског окружења не може да детерминише који ген *gstm* зебрице је директан ортолог специфичног гена *GSTM* код човека. Анализа аминокиселинских секвенци показује да је идентичност протеина *Gstm1*, *Gstm2* и *Gstm3* 83–94%, као што је приказано у ПРИЛОГ 4.

Табела 5.2. Чланови суперпородице *gst/GST* код зебрице и човека. Представљени су приступни кодови иРНК у NCBI бази података. Локализација гена је приказана према бази података секвенцираног генома зебрице (назив базе: GRCz10).

Ген	Приступни код у NCBI бази података	Дужина протеина (аминокиселина)		Локализација (Хромозом: почетак–крај: оријентација)
		Зебрица	Човек	
<i>gsta1</i>	NM_001109731	223	222	13: 707035–712809:1
<i>gsta2</i>	NM_213394	223	222	13: 699322–722215:1
<i>gsta3</i>	NM_001102648	223	222	13: 701322–704057:1
<i>GSTA4</i>	-	-	222	-
<i>GSTA5</i>	-	-	222	-
<i>gstm1</i>	NM_212676	219	218	8: 25276095–25278789:1
<i>gstm2</i>	NM_001110116	219	218	8: 25279670–25282667:1
<i>gstm3</i>	NM_001162851	219	225	8: 25283033–25287870:1
<i>GSTM4</i>	-	-	218	
<i>GSTM5</i>	-	-	218	
<i>gstp1</i>	NM_131734	208	210	14*: 3399999–3406739:1
<i>gstp2</i>	NM_001020513	208	-	14*: 3388236–3396243:1
<i>gsto1</i>	NM_001002621	240	241	13: 25250055–25258601:1
<i>gsto2</i>	NM_001007372	240	243	13: 25266502–25272311:1
<i>gstt1a</i>	NM_001327762.1	242	240	8: 30778381–30782029:–1
<i>gstt1b</i>	NM_200584	242	-	21: 15617204–15624557:1
<i>gstt2</i>	NM_200521	242	244	5: 9542060–9551696:1
<i>gstz1</i>	NM_001030271	216	216	17: 44992616–45000041:1
<i>gstr1</i>	NM_001045060	226	-	19: 770575–775730:1
<i>gstk1</i>	NM_001002560	229	226	16: 32055175–32059912:–1
<i>gstk2</i>	XM_001922164	222	-	16: 30998330–31015575:1
<i>gstk3</i>	XM_003200212	219	-	16: 32027182–32041357:–1
<i>gstk4</i>	NM_001040300	216	-	16: 32043201–32054789:–1
<i>mgst1a</i>	NM_001002215	152	155	4: 12720116–12726664:–1
<i>mgst1b</i>	NM_001005957	154	-	4: 12716741–12719503:–1
<i>mgst2</i>	NM_001045302	136	147	14: 47229513–47232788:1
<i>mgst3a</i>	NM_213427	150	-	20: 48757462–48773474:–1
<i>mgst3b</i>	NM_001080034	140	152	13: 45339357–45345099:1
<i>lta4s</i>	XM_003199867	153	150	14: 16066035–16074192:–1
<i>flap</i>	NM_200061	156	218	10: 36514818–36519948:1
<i>ptges</i>	NM_001014828	146	152	5: 32739609–32747840:1

* У верзији доступне базе података секвенцираног генома зебрице (назив базе: Zv9) ген је локализован на хромозому 4.



Слика 5.1. Филогенетско стабло унутарћелијске породице **GST/Gst**: (А) *Alpha*, (Б) *Mu*, (В) *Pi*, (Г) *Omega*, (Д) *Theta*, (Ђ) *Zeta* и (Е) класа *Rho* (Hs, *H. sapiens*; Gg, *G. gallus*; Ac, *A. carolinensis*; Xt, *X. tropicalis*; Dr, *D. rerio*; Ga, *G. aculeatus*; Tn, *T. nigroviridis*; Tr, *T. rubripes*; Ol, *O. latipes*; Bf, *B. floridae*; Ci, *C. intestinalis*). Стабло је конструисано у оквиру PhyML програма. Бројеви на гранама представљају процену нивоа поузданости клада унутар филогенетског стабла (енгл. *bootstrap values*).

Класа *Pi* обухвата два представника у геному зебрице: *gstp1* и *gstp2*. Анализирањем осталих генома нису уочени представници ове класе код представника птица (лат. *Gallus gallus*), риба попут трободље (лат. *Gasterosteus aculeatus*), медаке (лат. *Oryzias latipes*) или фугу риба (лат. *Tetraodon nigroviridis*, *Takifugu rubripes*), као ни код осталих подтипова хордата (плашташа и копљаша) (Табела 5.1, Слика 5.1В, ПРИЛОГ 2). Додатна претрага база података генома других риба показала је постојање два ко-ортолога код штуке (лат. *Esox lucius*), атланског лососа (лат. *Salmo salar*) и једног код шарана (лат. *Cyprinus carpio*) (Табела 5.3). Кодови, дужине аминокиселинских ланаца продуката и локализација гена *Pi* код зебрица приказани су у Табела 5.2. Оба гена *gstp* зебрице чине кластер који је у синтенији са геном *GSTP1* у хуманом геному локализованом на хромозому 11 (Слика 5.5В). Ова анализа потврђује да је *GSTP1* директни ортолог два гена унутар класе *Pi* зебрице. Протеински производи гена *gstp1* и *gstp2* имају висок ниво идентичности аминокиселинског ланца (87%), као што је показано у ПРИЛОГ 4.

Табела 5.3. Идентификовани представници класе *Pi* у геномима других риба.

Организам	Приступни код у NCBI бази података	Дужина протенна (аминокиселина)
Штука (<i>Esox lucius</i>)	ACO14256	208
	ACO14315	208
Атлантски лосос (<i>Salmo salar</i>)	ACI70112	208
	ACI68380	207
Шаран (<i>Cyprinus carpio</i>)	ABF57552	208

Класа *Omega* је еволутивно очувана од подтипа плашташа до класе сисара са различитим бројем гена присутним у анализираним геномима (Табела 5.1, Слика 5.1Г, ПРИЛОГ 2). У геному зебрице постоје два гена у оквиру ове класе, *gstol1* и *gstol2*, лоцирани на хромозому 13 (Табела 5.2). Анализом генског окружења са хуманим геномом потврђено је да су *GSTO1* и *GSTO2* човека, локализовани на 10. хромозому, директни ортолози *gstol1* и *gstol2* зебрице (Слика 5.5А). Међусобна идентичност *Gstol1* и *Gstol2* протеина зебрице износи 74% (ПРИЛОГ 4).

У оквиру унутарћелијске породице *Gst* зебрица, налази се и класа *Theta* са три представника (Табела 5.1), односно гена аотираних као: *gstt1a*, *gstt1b* и *gstt2* (Табела 5.2). Исти број гена присутан је једино код медаке, док је код осталих анализираних врста пронађено 1–2 гена (Табела 5.1, Слика 5.1Д, ПРИЛОГ 2). Гени у оквиру класе *Theta* не формирају јединствен кластер, већ су дифузно локализовани у геному зебрице, и то: на хромозому 8 (*gstt1a*), на 21. хромозому (*gstt1b*), односно на хромозому 5 (*gstt2*) (Табела 5.2). Ипак, показани су синтенијски односи ових гена са хуманим ко-ортолозима, *GSTT1* и *GSTT2*, локализованим на 22. хромозому (Слика 5.5Б). Идентичност протеина унутар класе *Theta* зебрице је нижа него идентичност унутар осталих класа и износи 43–61% аминокиселинског ланца (ПРИЛОГ 4).

Представник класе *Zeta* идентификован је код свих анализираних генома, осим код асцидије, као што је приказано у Табела 5.1. Оно што је карактеристично за ову класу је присуство само једног члана код свих кичмењачких врста и амфиоксуса (Табела 5.1, Слика 5.1Ђ, ПРИЛОГ 2). Анализа синтеније је показала да је хумани *GSTZ1*, који је локализован на 14. хромозому, у синтенији са геном *gstz1* на 17. хромозому у геному зебрице (Табела 5.2, Слика 5.5Г). Протеин зебрице, *Gstz1*, према анализи аминокиселинског ланца дели 66% идентичности са хуманим *GSTZ1* протеином (ПРИЛОГ 4).

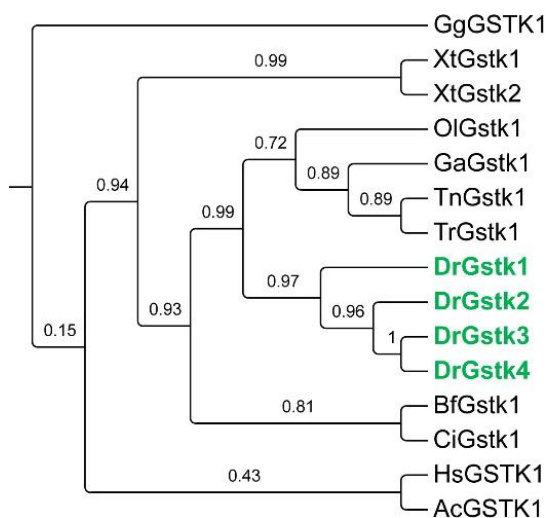
У оквиру анализираних генома риба и амфиоксуса постоји специфична унутарћелијска класа означена као класа *Rho*. Претрага база података показала је постојање веома варијабилног броја гена ове класе, 3–5 код осталих кошљориба, док је код зебрице присутан

само један представник, *gstr1* (Табела 5.1, Слика 5.1Е, ПРИЛОГ 2). Ген *gstr1* је локализован на 19. хромозому у геному зебрице, а дужина протеина износи 226 аминокиселина (Табела 5.2). Анализа идентичности аминокиселинског ланца овог протеина и постојећих ортолога код других протеина *Rho* кошљориба утврдила је постојање идентичности у опсегу 54–64%, односно 49–54% са протеинима *Rho* амфиоксуса. Резултати су приказани у Табела 5.4.

Табела 5.4. Идентичност аминокиселинског ланца протеина који припадају класи *Rho* идентификованој у испитиваним геномима (*Dr, D. rerio*; *Ga, G. aculeatus*; *Tn, T. nigroviridis*; *Tr, T. rubripes*; *Ol, O. latipes*; *Vf, V. floridae*); Бројеви представљају проценте.

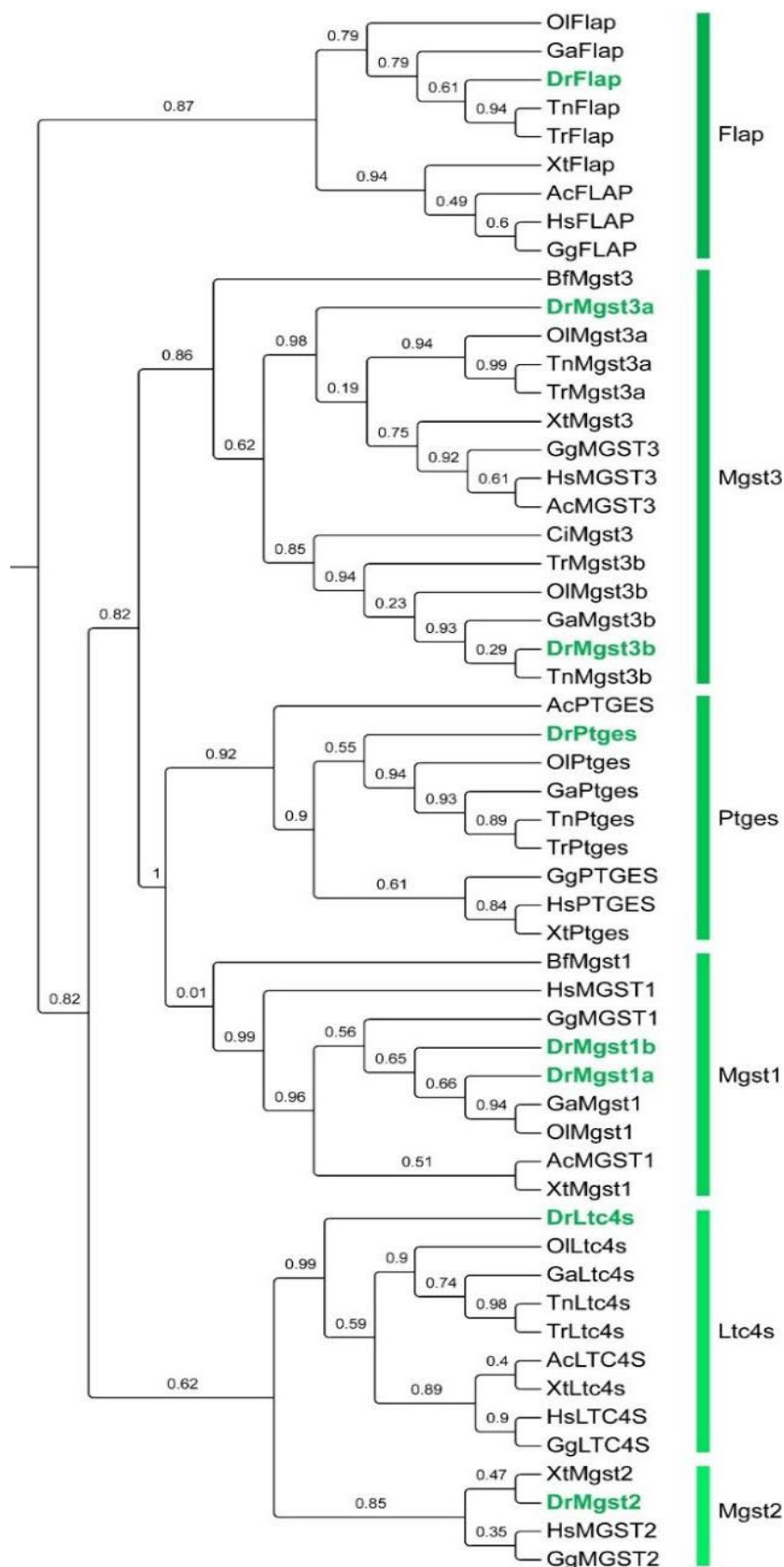
DrGstr1	TnGstr1	TnGstr2	TnGstr3	TrGstr1	TrGstr2	TrGstr3	GaGstr1	GaGstr2	GaGstr3	GaGstr4	GaGstr5	OIGstr1	OIGstr2	OIGstr3	OIGstr4	OIGstr5	BIGstr1a	BIGstr1b	BIGstr2
60.0	61.5	61.5	60.9	64.4	62.8	60.4	59.4	59.6	58.7	56.9	58.0	60.0	64.2	64.3	54.0	59.9	54.2	53.8	48.9
	86.7	86.7	61.2	67.0	78.7	68.3	70.9	62.9	62.1	63.4	59.6	67.4	69.8	70.2	59.9	66.1	55.4	55.4	49.1
		TnGstr2		68.0	81.0	71.6	71.4	64.0	62.7	63.6	60.3	67.6	70.8	71.1	61.1	67.4	55.6	55.1	49.1
				67.0	65.8	76.3	64.1	69.8	68.0	67.6	66.5	62.1	64.4	70.4	59.1	63.4	48.7	48.7	48.9
				TrGstr1	74.2	68.3	70.9	67.4	65.2	63.8	62.8	71.4	72.0	67.8	59.9	66.1	54.0	54.0	46.0
					TrGstr2	81.3	78.1	66.2	64.4	65.3	61.6	74.2	77.4	68.4	62.1	67.4	55.6	57.8	48.2
						TrGstr3	71.9	67.9	66.5	66.5	63.2	67.9	70.7	69.7	62.9	68.4	50.4	51.3	48.4
							GaGstr1	66.4	65.9	65.5	63.1	74.0	75.0	71.7	70.0	70.0	54.7	56.1	48.4
								GaGstr2	93.3	88.4	89.3	64.7	68.4	73.0	67.2	72.1	50.4	48.7	46.4
									GaGstr3	86.2	91.6	64.7	67.6	71.1	68.0	48.2	46.4	46.4	45.1
										GaGstr4	87.1	68.9	69.7	64.1	69.8	49.1	47.3	45.5	45.5
											GaGstr5	62.3	64.7	62.4	66.7	45.7	44.4	44.4	44.4
												OIGstr1	OIGstr2	OIGstr3	OIGstr4	OIGstr5	OIGstr1	OIGstr2	OIGstr3
													81.4	67.8	77.6	82.9	52.6	50.0	48.7
														OIGstr3	OIGstr4	OIGstr5	52.7	52.7	46.4
																	56.0	56.0	48.0
																	50.0	50.0	48.0
																	47.7	47.7	42.9
																	51.7	51.7	45.9
																	BIGstr1a	BIGstr1b	BIGstr2
																	91.6	91.6	65.3
																	BIGstr1a	BIGstr1b	BIGstr2
																	65.3	65.3	48.0

Класа *Kappa* обухвата представнике који се унутар ћелије локализују у митохондријама. У оквиру генома зебрице установљено је присуство четири различита гена, означених са *gstk1–gstk4*. Присуство ове класе је еволутивно очувано, где је кроз анализирани геноме показано присуство једног представника, односно код тропске канцасте жабе два представника (Табела 5.1, Слика 5.2, ПРИЛОГ 2). Сви представници гена класе *Kappa* зебрице локализовани су на 16. хромозому у оквиру кластера који је у синтенији са јединим хуманим ортологом, *GSTK1* локализованим на хромозому 7 (Табела 5.2, Слика 5.5Д). Идентичност протеина унутар ове класе Gst ензима зебрице је у опсегу 61–89%, док је њихова сличност са хуманим GSTK1 протеином у опсегу 44–49% (ПРИЛОГ 4).



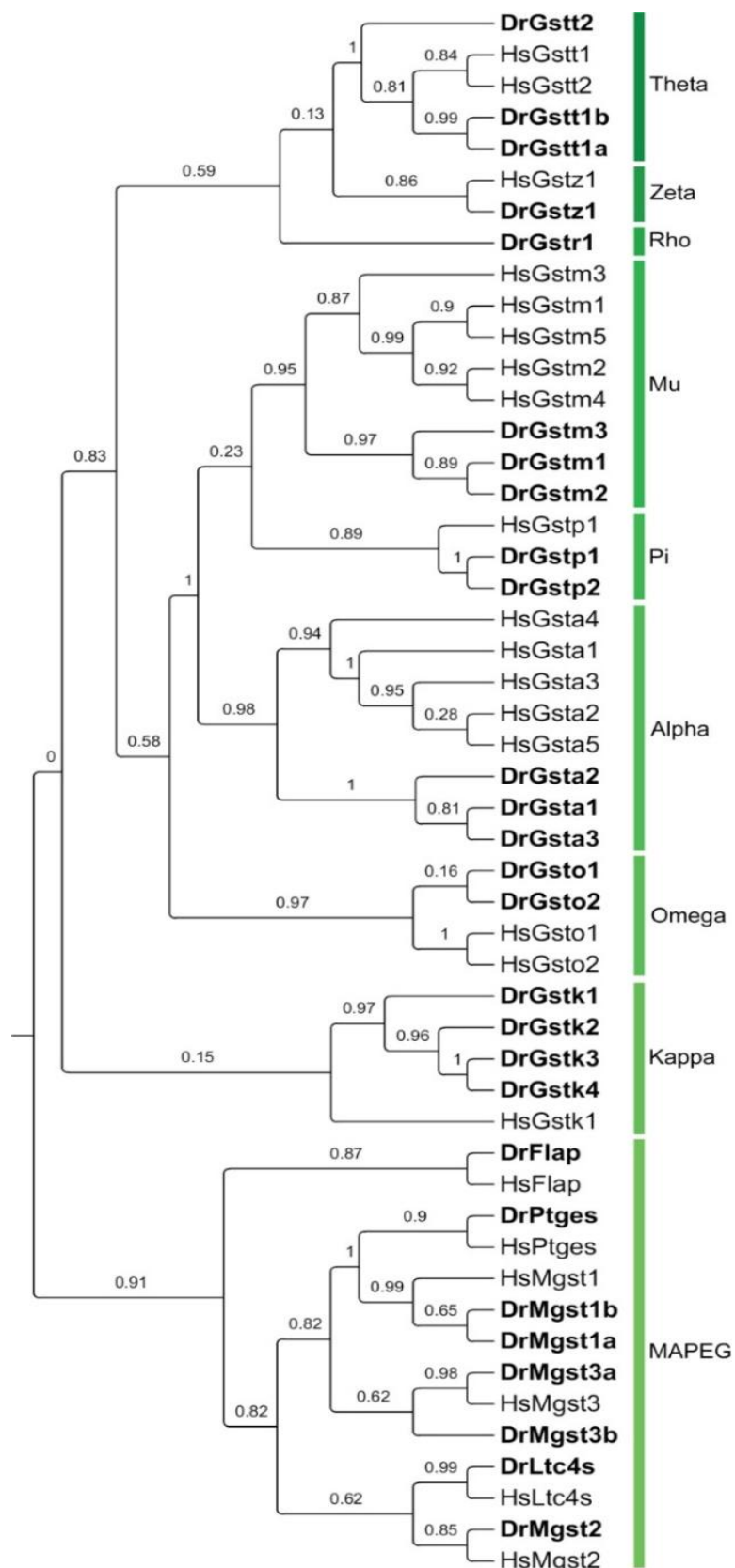
Слика 5.2. Филогенетско стабло митохондријске ензимске породице GST/Gst која обухвата класу *Kappa* (Hs, *H. sapiens*; Gg, *G. gallus*; Ac, *A. carolinensis*; Xt, *X. tropicalis*; Dr, *D. rerio*; Ga, *G. aculeatus*; Tn, *T. nigroviridis*; Tr, *T. rubripes*; Ol, *O. latipes*; Bf, *B. floridae*; Ci, *C. intestinalis*). Стабло је конструисано у оквиру PhyML програма. Бројеви на гранама представљају процену нивоа поузданости клада унутар филогенетског стабла.

Посебна породица мембрански везаних протеина Gst који учествују у метаболизму еикозаноида и глутатиона означена је као микрозомална, класа MAPEG и у оквиру протеома зебрице обухвата осам протеина. Протеини су подељени на следеће поткласе: *Mgst1* (*Mgst1a* и *Mgst1b*), *Mgst2* (*Mgst2*), *Mgst3* (*Mgst3a* и *Mgst3b*), *Ltc4s*, *Flap* и *Ptges* (Табела 5.1, Слика 5.3, ПРИЛОГ 2). Локализација гена ове породице у геному није организована у виду једног кластера. Анализа синтеније је показала да су гени са хромозома 4, *mgst1a* и *mgst1b*, ко-ортолози хуманог *MGST1* локализованог на хромозому 12 (Слика 5.5В), односно да је зебричин ген *mgst2* са 14. хромозома директан ортолог хуманог гена *MGST2* локализованог на хромозому 4 (Слика 5.5Ђ), док су *mgst3a* и *mgst3b* зебрице са хромозома 20 и 13 ко-ортолози хуманог гена *MGST3* са хромозома 1 у хуманом геному (Слика 5.5Б). Детаљни подаци о локализацију ових гена у оквиру генома зебрице приказани су у Табела 5.2. Протеини унутар поткласа *Mgst* микрозомалне породице Gst зебрице деле 15–70% идентичности аминокиселинског ланца (ПРИЛОГ 4).

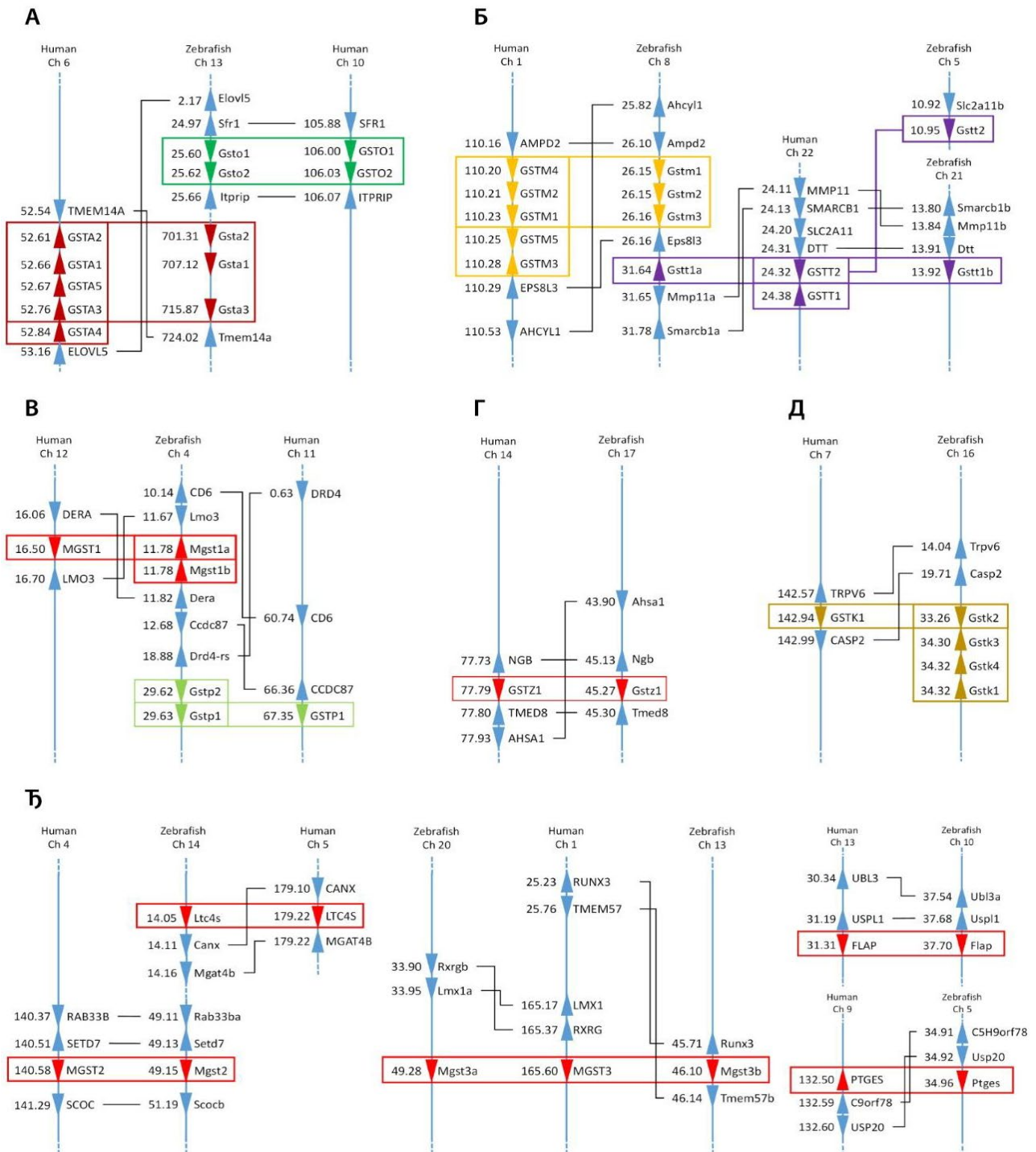


Слика 5.3. Филогенетско стабло микрозомалне ензимске породице GST/Gst која обухвата класу MAPEG, односно Mgst1, Mgst2, Mgst3, Flap, Ltc4s и Ptges подкласе (Hs, *H. sapiens*; Gg, *G. gallus*; Ac, *A. carolinensis*; Xt, *X. tropicalis*; Dr, *D. rerio*; Ga, *G. aculeatus*; Tn, *T. nigroviridis*; Tr, *T. rubripes*; Ol, *O. latipes*; Bf, *B. floridae*; Ci, *C. intestinalis*). Стабло је конструисано у оквиру PhyML програма. Бројеви на гранама представљају процену нивоа поузданости клада унутар филогенетског стабла.

Филогенетском анализом јасно се уочава раније еволутивно раздвајање класа MAPEG и *Kappa*. У оквиру унутарћелијске групе ензима Gst посебан кластер формирају класе *Theta*, *Zeta* и *Rho*, односно класе *Mu*, *Pi*, *Alpha* и *Omega* (Слика 5.4).



Слика 5.4. Филогенетско стабло суперпородице Gst/GST код зебрице и човека. Ознаке врста: Hs, *Homo sapiens*; Dr, *Danio rerio*. Стабло је конструисано у оквиру PhyML програма. Бројеви на гранама представљају процену нивоа поузданости клада унутар филогенетског стабла.



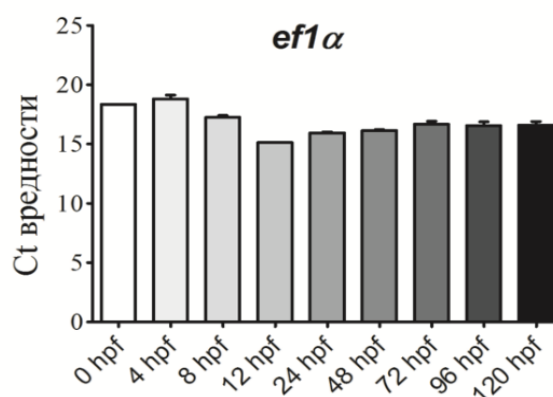
Слика 5.5. Синтенија гена *gst/GST* зебрице и човека: (А) *Alpha* и *Omega*, (Б) *Mu* и *Theta*, (В) *Pi* и *Mgst1*, (Г) *Zeta*, (Д) *Kappa*, (Ђ) MAPEG. Број наспрам имена гена представља број мегабаза (енгл. *Megabase pair*, Мбп) на којој је ген локализован у оквиру датог хромозома (енгл. *Chromosome*, Ch). Коришћени су подаци *Zv9* базе података секвенцираног генома зебрице. Анализу синтеније и припрему слике урадио је др Иван Михаљевић (Лабораторија за молекуларну екоотоксикологију, Завод за истраживање мора и околиша, Институт Руђер Бошковић, Загреб, Република Хрватска).

5.2. Анализа развојне дистрибуције иРНК идентификованих гена *gst* код ембриона и ларви зебрица

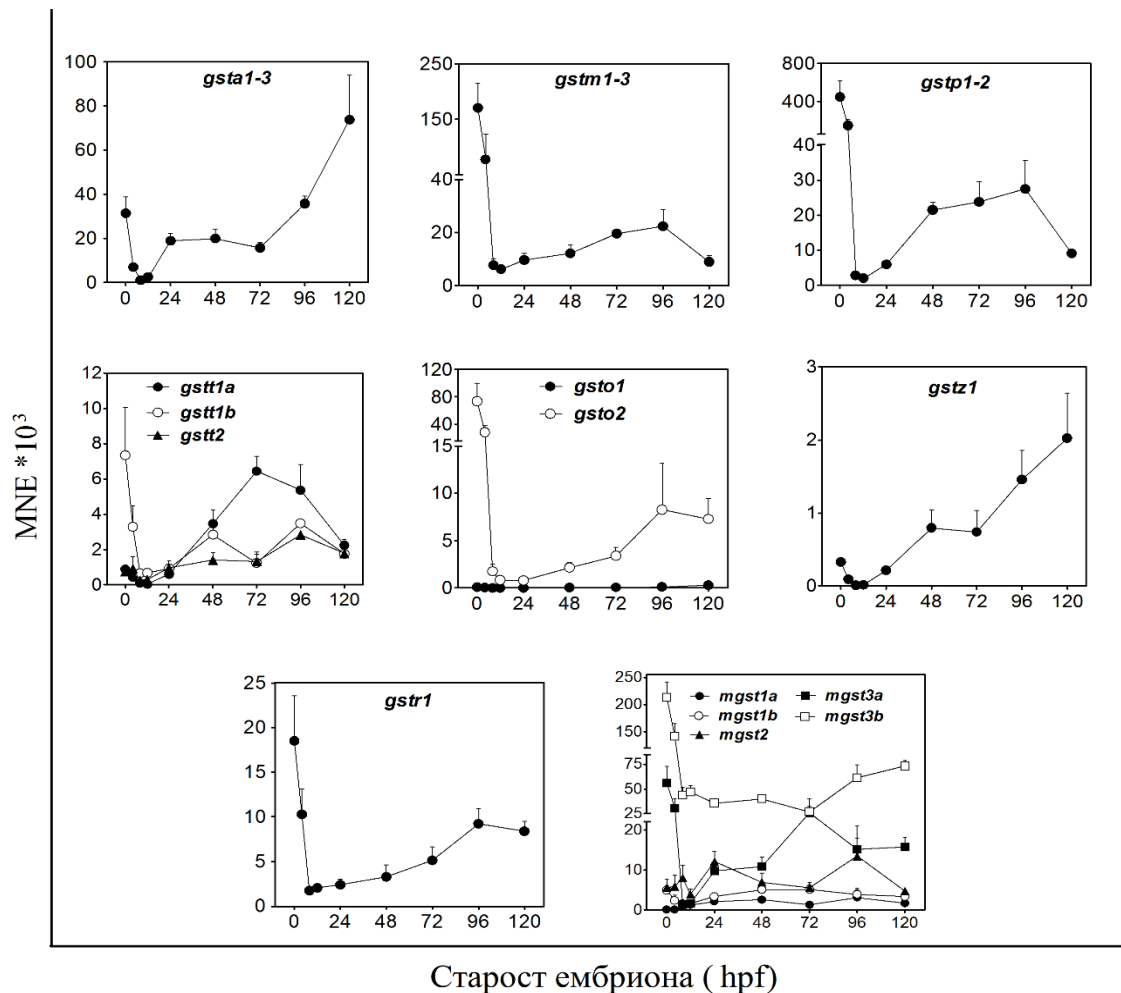
Коришћењем прајмера потврђене специфичности и одређене ефикасности, а који су ручно дизајнирани, омогућена је квантификација експримирања *gst* гена током раног развоја зебрица. Анализирано је експримирање двадесет различитих гена *gst*, припадника следећих класа/поткласа *Alpha* (*gst1-3*), *Mu* (*gstm1-3*), *Pi* (*gstp1-2*), *Theta* (*gstt1a*, *gstt1b*, *gstt2*), *Omega* (*gsto1*, *gsto2*), *Zeta* (*gstz1*), *Rho* (*gstr1*) и *Mgst* (*mgst1a*, *mgst1b*, *mgst2*, *mgst3a*, *mgst3b*). Експримирање представника класе *Kappa* митохондријске породице гена, као и чланова класе МАРЕГ који немају трансферазну активност (*lta4s*, *flap*, *ptges*) није квантификовано. У циљу проналажења адекватне ендogene контроле анализирано је експримирање неколико различитих гена: *gapdh*, *s18*, *b-actin* и *ef1a* током раног развоја зебрице: 0, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 и 120 сати након фертилизације (енгл. *hours post fertilization*, hpf). Резултати су показали да је експримирање *ef1a* најстабилније током анализираних стадијума развоја ембриона (Слика 5.6), што је у сагласности са претходно публикованим резултатима (McCurley и Callard, 2008). Из тог разлога експримирање гена *ef1a* је употребљена као ендогена контрола у свим даљим анализама.

На сликама 5.7 и 5.8 приказано је базално експримирање унутарћелијских и микрозомалних гена *gst* током развојних стадијума ембриона и ларви зебрице у виду обрасца експримирања при различитој старости ембриона (0, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120 hpf), док је на слици 5.9 дат графички приказ добијених резултата у виду топлотне мапе.

Обрасци експримирања изоформи *gst* током ембрионалног и ларвеног развоја зебрице су комплексни. Током раног стадијума развоја 0–4 hpf уочен је веома висок ниво иРНК следећих гена: *gstp1-2*, *gstm1-3*, *gsto2*, *mgst3a*, *mgst3b*. Повећан ниво иРНК у овом стадијуму показан је и за *gst1-3*, *gstr1*, *gstt1b*, *mgst2* (Слика 5.7 и Слика 5.8). Овакви резултати су највероватније последица присуства мајчинских иРНК у раном стадијуму развоја ембриона.



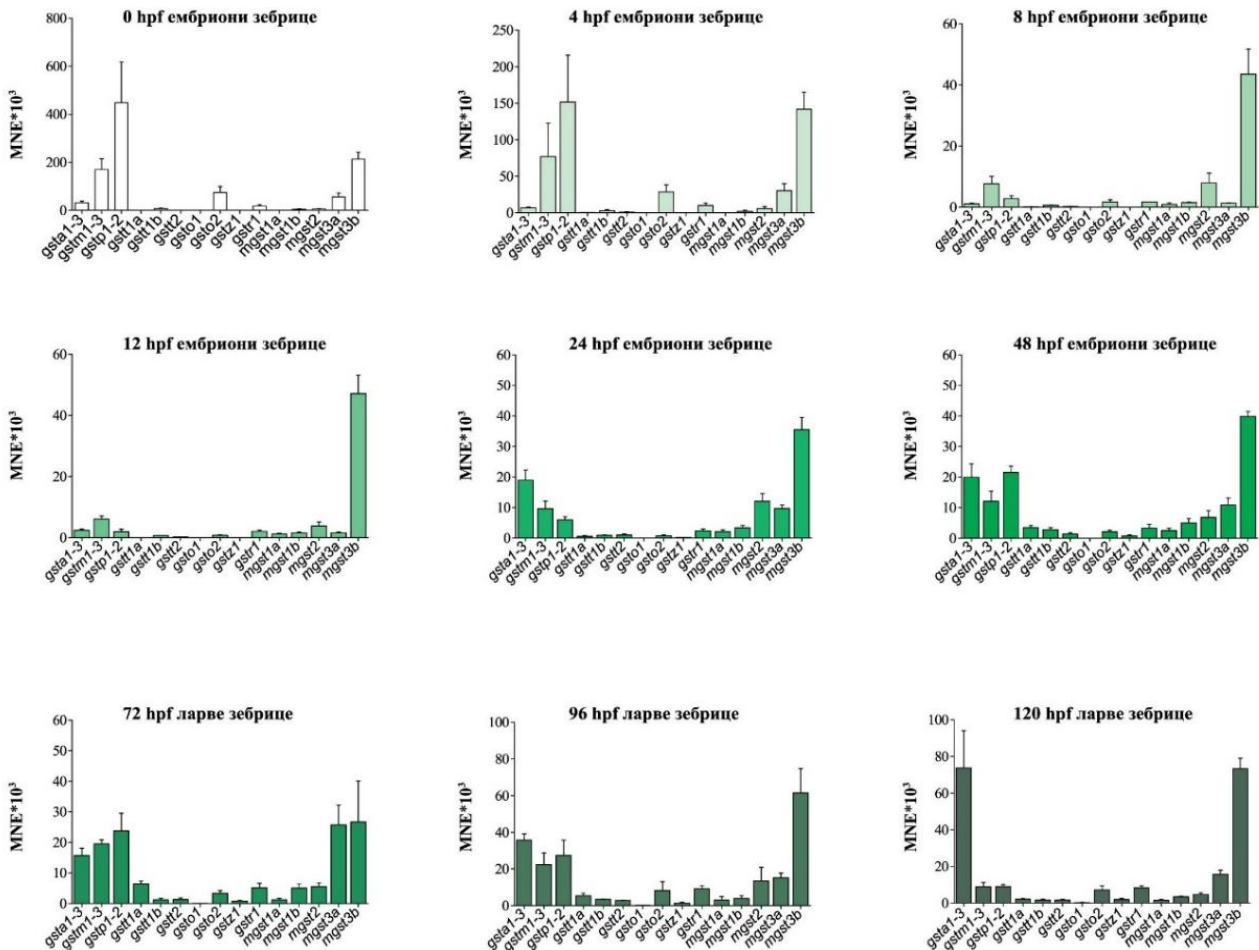
Слика 5.6. Експримирање гена *ef1a* током развојних стадијума ембриона и ларви зебрице (0, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 и 120 hpf). Резултати представљају средњу Ct вредност \pm SEM из три независна експеримента са 15 ембриона/ларви у сваком стадијуму развоја.



Старост ембриона (hpf)

Слика 5.7. Експримирање гена *gst* током развојних стадијума ембриона и ларви зебрица. Резултати представљају средњу вредност \pm SEM релативног експримирања добијених из три независна експеримента са 15 ембриона/ларви у сваком стадијуму развоја. Ради бољег приказа резултата, добијене вредности су помножене са фактором 10^3 . MNE означава средње нормализовано експримирање гена. Учити да су због различитих нивоа експримирања гена *gst*, скале на ординати различите.

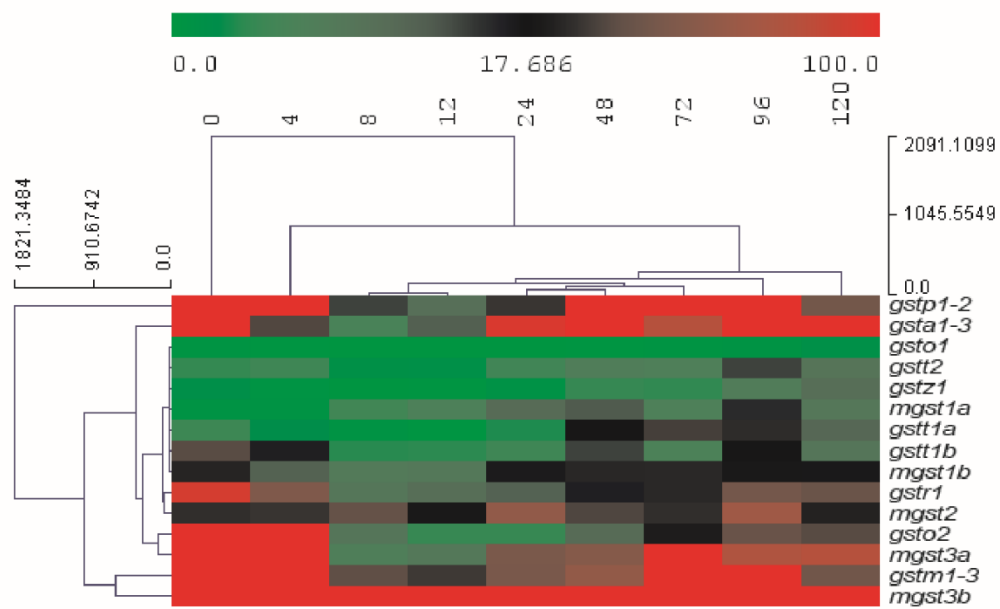
Насупрот томе, нивои иРНК *gstz1*, *gsto1*, *gstt1a*, *gstt2*, *mgst1a* и *mgst1b* гена су ниски током раног развоја ембриона, односно у фази зигота и бластуле. После 8 hpf запажају се ниски нивои иРНК свих анализираних GST изоформи током периода гаструлације и сегментације, односно од 12 до 24 hpf, изузев благог пораст нивоа иРНК *gsta1-3*, *gstm1-3*, и *gstp1-2* након 12 hpf. Изузетак је и експримирање *mgst3b* које је врло високо током свих периода развоја (Слике 5.7 и 5.8).



Слика 5.8. Експримирање гена *gst* током развојних стадијума ембриона и ларви зебрице. Резултати представљају средњу вредност \pm SEM добијени из три независна експеримента са 15 ембриона/ларви у сваком стадијуму развоја. Ради бољег приказа резултата, добијене вредности су помножене фактором 10^3 . MNE означава средње нормализовано експримирање гена. Уочити да су због различитих нивоа експримирања гена *gst* гена у појединим стадијумима развоја, скале на ординати различите.

Затим следи повећање транскрипције свих *gst* гена. Ниво транскрипата већине GST изоформи достиже максималну вредност у ларвеном периоду током 96 hpf, што је даље праћено смањењем транскрипције при 120 hpf. Ово је посебно уочљиво за: *gstml-3*, *gstpl-2*, *gsto2*, *gstr1*, *mgst2*, *gsttlb* и *gstt2* гене. Другачији образац експримирања гена испољавају *gstal-3*, *gstz1* и *mgst3b*, где се највиши ниво експримирања достиже при 120 hpf. Највиши ниво експримирања *gsttla* и *mgstla* гени постижу при 72 hpf, након чега се бележи пад њиховог експримирања (Слике 5.7 и 5.8).

Графички приказ дат на слици 5.9 у виду тзв. топлотне мапе (енгл. *heatmap*) омогућава уочавање међусобне повезаности образаца експримирања гена *gst* током ембрионалног и ларвеног стадијума развоја. Јасно се може запазити специфичан образац експримирања класе *Pi* током ембриогенезе зебрице у односу на остале гене. Насупрот томе, обрасци експримирања гена *gsto1*, *gstz1*, *gstt2* и *mgstla* су међусобно веома слични. Ако се посматрају сличности образаца експримирања свих гена на основу развојних стадијума, на топлотној мапи се може уочити различит образац експримирања током 0, 4 и 120 hpf у поређењу са свим осталим временским одредницама при којима је вршена анализа дистрибуције иРНК испитиваних гена. Јасно се може уочити да су обрасци експримирања гена при временским одредницама 8 и 12 hpf, односно 24 и 48 hpf међусобно веома слични (Слика 5.9).



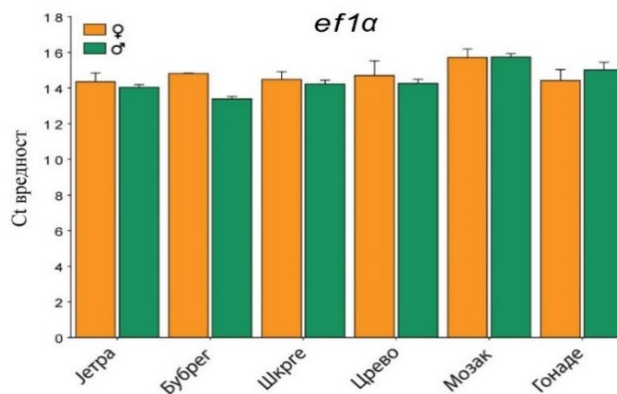
Слика 5.9. Топлотна мапа експримирања гена *gst* у различитим стадијумима развоја зебрице (0, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120 hpf) добијен НЛС методом, применом Еуклидове дистанце као матрице. Линије представљају добијене кластере обрасца експримирања гена (лево) и сатница (горе). Горња обојена трака представља процентуалне минималне и максималне границе експримирања (0–100%).

5.3. Анализа ткивне и полне дистрибуције иРНК идентификованих гена *gst* код адултних организама зебрице

Укупна РНК је изолована из шест ткива (јетра, бубрег, шкрге, црево, мозак, гонаде) и преведена у кДНК која се прво користила за тестирање специфичности и ефикасности дизајнираних прајмера, а потом за релативну квантификацију иРНК помоћу qRT-PCR методе. У циљу иницијалне детекције представника гена *gst* код зебрице, односно тестирање специфичности и ефикасности ручно дизајнираних прајмера реакцијом ланчане полимеразе изоловане кДНК умножени су фрагменти гена *gst*, који су потом клонирани и потврђени одређивањем примарне структуре (секвенцирањем).

Анализирана је ткивно и полно зависна дистрибуција иРНК двадесет различитих гена *gst*, разврстаних у 8 различитих класа: *Alpha*, *Mu*, *Pi*, *Theta*, *Omega*, *Zeta*, *Rho* и *Mgst*. Експримирање индивидуалних гена анализирано је за представнике *Theta*, *Omega*, *Zeta*, *Rho*, као и 5 чланова микрозомалне класе *Mgst* (*mgst1a*, *mgst1b*, *mgst2*, *mgst3a*, *mgst3b*). Резултати приказани за класе *Alpha*, *Mu* и *Pi* представљају збирно експримирање свих чланова унутар класе, с обзиром на то да се ниво експримирања индивидуалних гена не може уочити qRT-PCR методом услед високе идентичности њихових секвенци унутар кластера (погледати одељак 4.5).

У циљу проналажења адекватне ендogene контроле, слично као и код ембриона и ларви, анализирана су експримирања неколико различитих гена. Резултати су показали да је експримирање *ef1a* најстабилније у свим анализираним ткивима оба пола (Слика 5.10), као и током ембриогенезе. Из тог разлога ген *ef1a* је употребљен као ендогена контрола у свим даљим анализама.



Слика 5.10. Ткивна и полна дистрибуција иРНК елонгационог фактора 1а (*ef1a*) код адултних зебрица. Резултати су приказани као средња Ct вредност \pm SEM добијена из 3–5 јединствених узорака ткива од по 4–14 јединки.

У циљу олакшане интерпретације добијених qRT-PCR резултата извршена је категоризација гена у односу на степен експримирања при датим условима реакције (количина кДНК је износила 10 ng/реакцији): **ниско експримирани гени** – за које је $MNE \cdot 10^6$ (енгл. *Mean Normalized Expression*) < 1000 (што одговара Ct вредности > 26), **умерено експримирани гени** – за које је $MNE \cdot 10^6$ у опсегу 1.000–10.000 (Ct = 22–25), **високо експримирани гени** – за које је $MNE \cdot 10^6$ у опсегу 10.000–100.000 (Ct = 19–21) и **веома високо експримирани гени** – за које је $MNE \cdot 10^6 > 100.000$ (Ct < 18).

Гени класе *Alpha* показују високо експримирање у цревима женке и гонадама мужјака у поређењу са другим органима у којима је експримирање гена ове класе умерено (Слика 5.11А, ПРИЛОГ 6А).

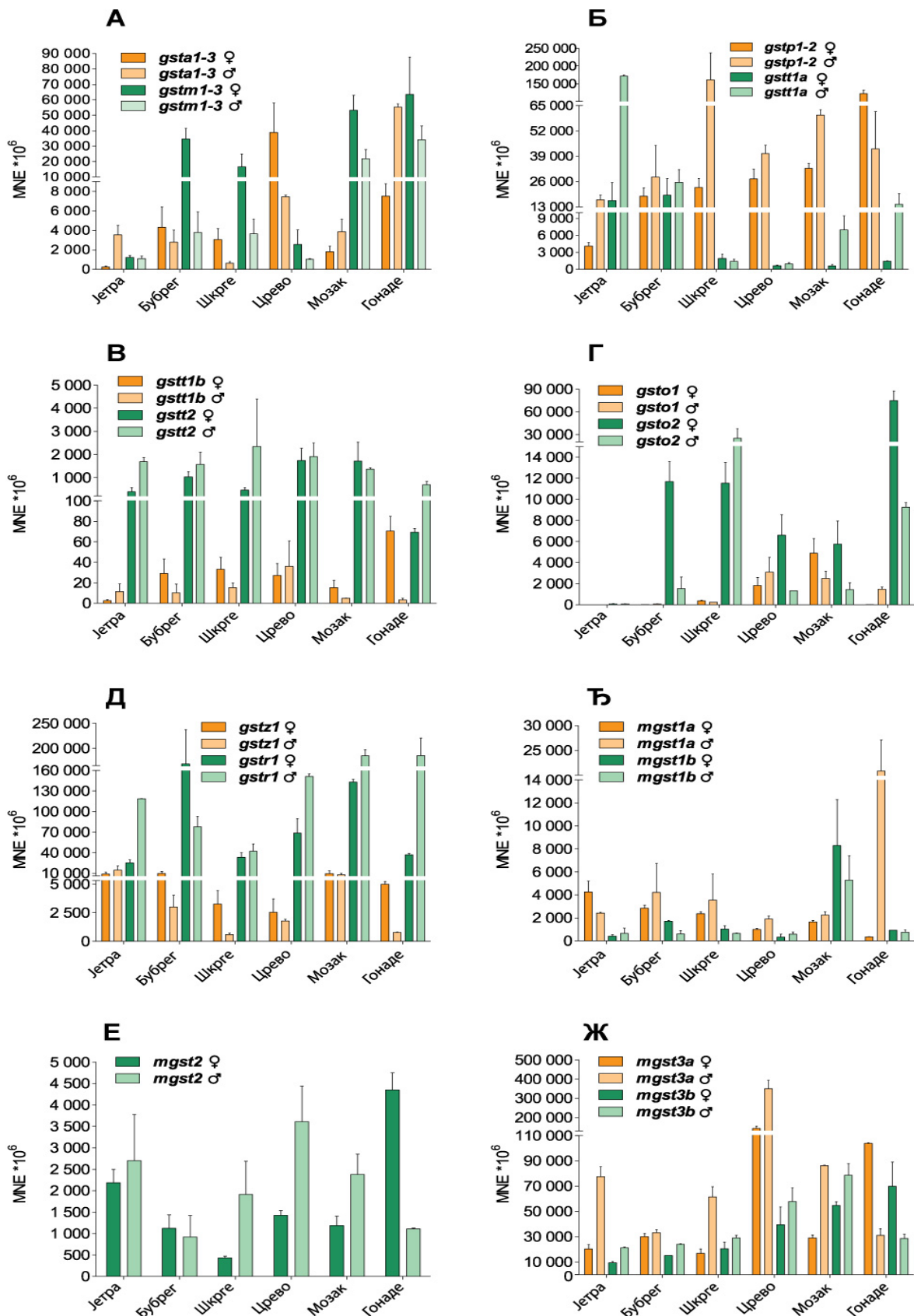
Класа *Mu* обухвата гене који су код адултних организама зебрице високо експримирани у гонадама и мозгу оба пола, а тај ниво експримирања задржан је и у бубрезима и шкргама женки. У осталим ткивима уочава се умерено експримирање гена класе *Mu*. Дистрибуција иРНК ових гена је, као што је приказано на слици 5.11А, полно зависна. Експримирање гена код женки у односу на мужјака је у бубрезима веће 9 пута, шкргама 5 пута и мозгу 2 пута.

Гени класе *Pi* су веома високо експримирани у шкргама мужјака и јајницима зебрица. У осталим ткивима: бубрези, црево и мозак код оба пола, шкрге женке, тестиси, и јетра мужјака, ови гени се високо експримирају, док је умерено експримирање забележено у јетри женке (Слика 5.11Б). Полно зависно експримирање је присутно у гонадама, где је ниво иРНК *Pi* гена у јајницима 4 пута већи у односу на тестисе. Супротан тренд је показан у јетри и шкргама (Слика 5.11Б). Статистичка анализа је показала веће експримирање *gstpl-2* у јајницима у односу на остала ткива (ПРИЛОГ 6Б).

Ткивна дистрибуција иРНК гена унутар класе *Theta* је веома разнолика. *Gstt1a* је веома високо експримиран у јетри мужјака, уз високо експримирање у јетри женке, бубрезима оба пола и тестисима, док је у осталим ткивима његово експримирање умереног типа (Слика 5.11Б, ПРИЛОГ 6Б). Насупрот томе, *gstt1b* је свеprisутно ниско експримиран. Трећи представник, *gstt2*, је умерено експримиран у свим испитиваним ткивима, изузев ниског експримирања у јајницима (Слика 5.11В, ПРИЛОГ 6В).

Класа *Omega*, слично као и *Theta*, показује веома разнолику дистрибуцију својих чланова у ткивима адултних организама оба пола зебрице. Наиме, ген *gstol* је много мање експримиран у ткивима зебрице у поређењу са својим ко-ортологом, *gstol2*. Умерено експримирање гена *gstol* је показано у мозгу и статистички је повећано у односу на остала ткива код женки зебрица (ПРИЛОГ 6Г). Умерено експримирање овог гена је забележено у цревима и тестисима, док је у осталим анализираним ткивима зебрице његово експримирање на ниском нивоу. Насупрот томе, експримирање гена *gstol2* је високо у јајницима, и то 8 пута у односу на тестисе, потом шкргама оба пола и у бубрезима женки. Овај ген је умерено експримиран у цреву и мозгу женки, као и у бубрезима, цреву и мозгу мужјака, док је његово ниско експримирање забележено у јетри код оба пола (Слика 5.11Г, ПРИЛОГ 6Г).

Класа *Zeta* има јединственог представника, *gstz1*, чије је експримирање у већини ткива ниже у поређењу са осталим испитиваним генима (Слика 5.12). Анализа ткивне и полне дистрибуције је показала високо експримирање овог гена у јетри и мозгу код оба пола и бубрезима женке, уз умерено експримирање у осталим ткивима. Полна зависност је присутна у гонадама, где је експримирање гена *gstz1* у јајницима 6 пута веће у односу на тестисе зебрица (Слика 5.11Д).

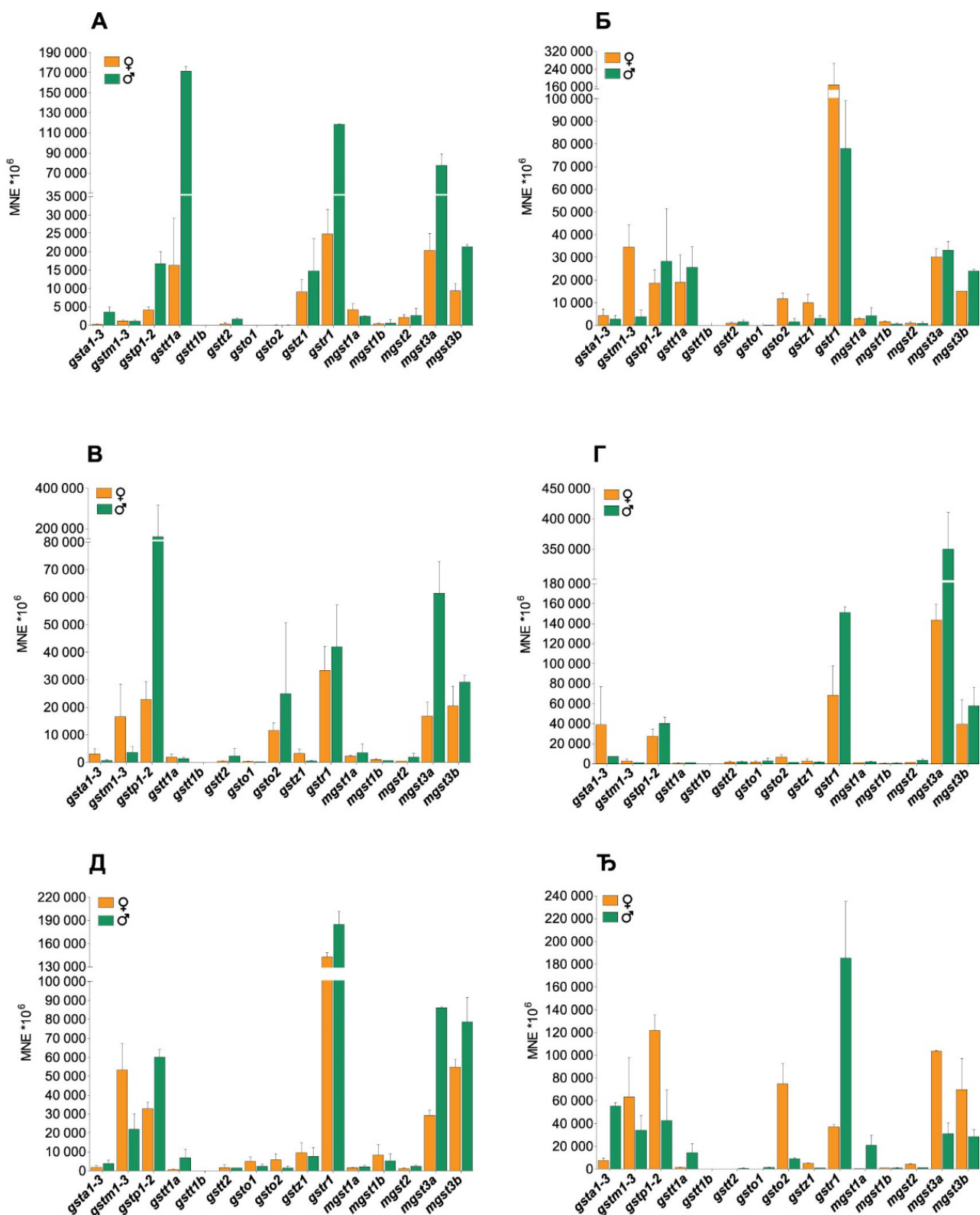


Слика 5.11. Ткивна и полна дистрибуција иРНК гена *gst* код адултних организама зебрице: (А) *gsta1-3* и *gstm1-3*, (Б) *gstp1-2* и *gstt1a*, (В) *gstt1b* и *gstt2*, (Г) *gsto1* и *gsto2*, (Д) *gstr1* и *gstz1*, (Ђ) *mgst1a* и *mgst1b*, (Е) *mgst2*, (Ж) *mgst3a* и *mgst3b*. Резултати су приказани као средња вредност \pm SEM добијена из 3–5 јединствених узорака ткива од по 4–14 јединки. Ради бољег приказа резултата, добијене вредности су помножене фактором 10^6 . MNE означава средње нормализовано експримирање гена. Уочити да су због различитих нивоа експримирања гена, скале на ординати различите.

Специфична класа која припада унутарћелијској породици је *Rho*, која код зебрице броји једног члана, *gstr1*. Експримирање овог гена је веома високо у јетри и цреву мужјака, бубрезима женки, тестисима и мозгу код оба пола. У осталим анализираним ткивима експримирање *gstr1* је високо (Слика 5.11Д, ПРИЛОГ 6Д). Полна зависност је присутна на ниову гонада, где је експримирање гена *gstr1* у тестису 5 пута веће у односу на јајнике зебрица (Слика 5.11Д).

Анализа ткивне и полне дистрибуције иРНК гена *mgst* који припадају микрозомалној класи је показала да представници *mgst1a*, *mgst1b* и *mgst2* имају ниже експримирање у поређењу са експримирањем осталих испитиваних гена зебрице. Ген *mgst1a* је умерено експримиран у ткивима оба пола, изузев високог експримирања у тестисима које показује статистички значајну разлику у односу на остала ткива (ПРИЛОГ 6Ђ). Ген *mgst1b* је углавном ниско експримиран у ткивима, изузев умереног експримирања у мозгу оба пола (Слика 5.11Ђ, ПРИЛОГ 6Ђ). Експримирање гена *mgst2* је умереног нивоа у јетри и јајницима, где је статистички значајно више експримиран у односу на остала анализирана ткива (ПРИЛОГ 6Е). Овај ген се такође умерено експримира и у шкргама, цреву и мозгу мужјака, док је његово експримирање у осталим анализираним ткивима ниско (Слика 5.11Е). Насупрот нижем експримирању ових гена, представници микрозомалне класе, *mgst3a* и *mgst3b* су много више експримирани у анализираним ткивима зебрице. Експримирање гена *mgst3a* је на веома високом ниову у цревима код оба пола, док је у осталим ткивима присутан висок ниво експримирања овог гена, слично као и ниво експримирања његовог ко-ортолог, гена *mgst3b*, који је високо експримиран у свим анализираним ткивима оба пола зебрице (Слика 5.11Ж, ПРИЛОГ 6Ж).

Посматрајући дистрибуцију свих иРНК гена *gst* у адултним организмима зебрице по појединачним ткивима може се закључити да су доминантно експримирани представници у јетри *gstt1a*, *gstr1*, *mgst3a* и *mgst3b*, док нешто мање експримирање имају гени класа *Pi* и *Zeta* (Слика 5.12А). Доминантно експримирање у бубрезима има ген *gstr1*, а потом гени: *gstp1-2*, *gstt1a*, *mgst3a* и *mgst3b* (Слика 5.12Б), док је у шкргама доминантно експримирање гена класе *Pi*, уз значајно експримирање гена *gsto2*, *gstr1*, *mgst3a* и *mgst3b* (Слика 5.12В). У цревима доминантно су експримирани гени *gstr1* и *mgst3a*, уз високо експримирање гена *gstp1-2* и *mgst3b* (Слика 5.12Г). Када се посматра експримирање GST у мозгу зебрица може се уочити преминација гена *gstr1*, уз високо експримирање *mgst3a* и *mgst3b*, као и представника класа *Mu* и *Pi* (Слика 5.12Д). У јајницима најзначајније експримирање испољавају представници класа *Mu* и *Pi* класе, као и гени *gsto2*, *mgst3a* и *mgst3b*, док је у тестисима такво експримирање уочено за представнике класа *Rho*, *Alpha*, *Mu* и *Pi*, као и за гене *mgst3a* и *mgst3b* (Слика 5.12Ђ).



Слика 5.12. Ткивна и полна дистрибуција иРНК гена *gst* код адултних организама зебрице: (А) јетра, (Б) бубрег, (В) шкрге (Г) црево, (Д) мозак, (Ђ) гонаде. Резултати су приказани као средња вредност \pm SEM добијена из 3–5 јединствених узорака ткива од по 4–14 јединки. Ради бољег приказа резултата, добијене вредности су помножене са фактором 10^6 . MNE означава средње нормализовано експримирање гена. Уочити да су због различитих нивоа експримирања гена, скале на ординати различите.

5.4. Функционална карактеризација ензима Gst рибе зебрице

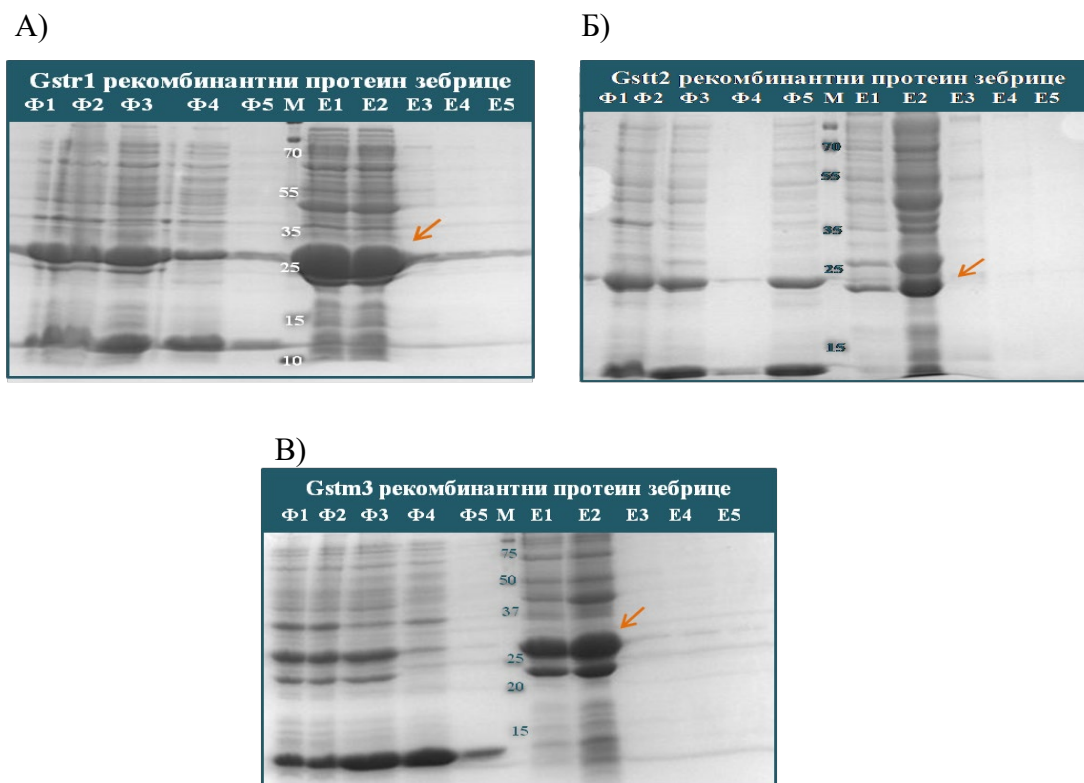
Функционална карактеризација девет различитих рекомбинантних протеина Gst зебрице: Gsta3, Gstm1, Gstm3, Gstp1, Gstp2, Gsto2, Gstt1a, Gstz1 и Gstr1 дефинисана је у оквиру рада (Glisic и сар., 2015). Функционална карактеризација³ се огледала у одређивању параметара ензимске активности: Михаелис-Ментен константе (K_m), максималне брзине (V_{max}) и броја измена (енгл. *turnover number*, k_{cat}) за неколико различитих супстрата.

У овој докторској дисертацији применом афинитетно-хроматографске HisTrap колонице извршено је пречишћавање три различита рекомбинантна протеина Gst: Gstr1, Gstt2 и Gstm3, у циљу њихове функционалне карактеризације, одређивање кинетичких параметара и испитивања инхибиторног потенцијала одабраних ендогених једињења и хемијски различитих ксенобиотика односно емергентних супстанци присутних у воденим екосистемима, као и узорка отпадних вода. Gstr1 је одабран као високо експримирани претставник класе *Rho* која је карактеристична за рибе и има само једног члана, а Gstt2 као најчешће умерено експримиран ген у свим испитиваним ткивима оба пола (слика 5.11B). Трећи рекомбинантни протеин, Gstm3 одабран је као представника класе *Mu* (Glisic и сар., 2015). Треба напоменути да је у делу ензимских есеја у којима је испитиван инхибиторни потенцијал појединих супстанци коришћен и рекомбинантни протеин Gstr1 пречишћен помоћу Ni-NTA агарозних куглица (видети поглавље 4.7.2).

5.4.1. Трансформација гена за протеине Gstr1, Gstt2 и Gstm3 зебрице у хетерологни експресиони систем

Експримирање рекомбинантних протеина је индуковано додатком IPTG у трајању од 6 ч. Продужена индукција у трајању од 12 ч није довела до повећаног експримирања испитиваних рекомбинантних протеина (резултати нису приказани). Након експримирања у хетероложном експресионом систему, вршено је пречишћавање рекомбинантних протеина афинитетном хроматографијом из унутарћелијске фракције бактерија. Током процеса пречишћавања рекомбинантних протеина са обе методе (видети поглавље 4.7.2) није било видљивих нерастворљивих формулација (нпр. инклузиона тела), што је потврђено SDS-PAGE анализом фракција добијених током процеса пречишћавања. Приказани су резултати SDS-PAGE анализе фракција добијених HisTrap HP колоном. Може се уочити да фракције E1 и E2 садрже највеће количине експримираних рекомбинантних протеина (~25–27 kDa), што се и очекује употребом колоница (Слика 5.13).

³ Функционалну карактеризацију рекомбинантних протеина у наведеном раду урадио је др Иван Михаљевић, Лабораторија за молекуларну екотоксикологију, Завод за истраживање мора и околиша, Институт Руђер Бошковић, Загреб, Република Хрватска.



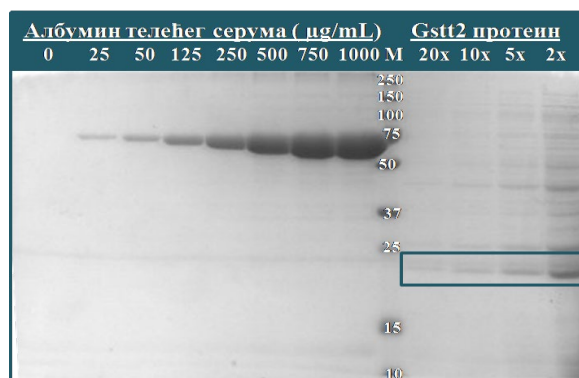
Слика 5.13. SDS-PAGE анализа фракција добијених приликом пречишћавања рекомбинантних протеина (А) Gstr1, (Б) Gstt2 и (В) Gstm3 употребом HisTrap HP колоница. Фракције су означене различитим ознакама где: Ф1 представља узорак бактерија након лизирања употребом лизозима; Ф2 представља узорак бактерија након ултразвучне сонификације; Ф3 представља бактеријску унутарћелијску фракцију; Ф4 представља фракцију након протока кроз хроматографску колоницу (енгл. *flow through fraction*); Ф5 представља фракцију након испирања хроматографске колонице (енгл. *wash fraction*); E1–E5 су фракције постепеног елуирања протеина са хроматографске колонице.

Даље је урађена имуноблот анализа. Ова анализа је заснована на експримирању специфичног обележивача (*tag*), 6× His, односно аминокиселинског низа од шест хистидина, који је након експримирања у хетероложном експресионом систему фузионисан на карбоксилном крају одређене изоформе Gst. С обзиром на недостатак одговарајућих примарних антитела за протеине Gst зебрице, употребом примарног специфичног антитела (*anti-His*) који препознаје 6× His обележивача омогућена је идентификација, односно визуелизација изоформи Gst зебрице. На основу резултата имуноблот анализе потврђено је успешно експримирање, као и пречишћавање протеина Gst (Слика 5.14).



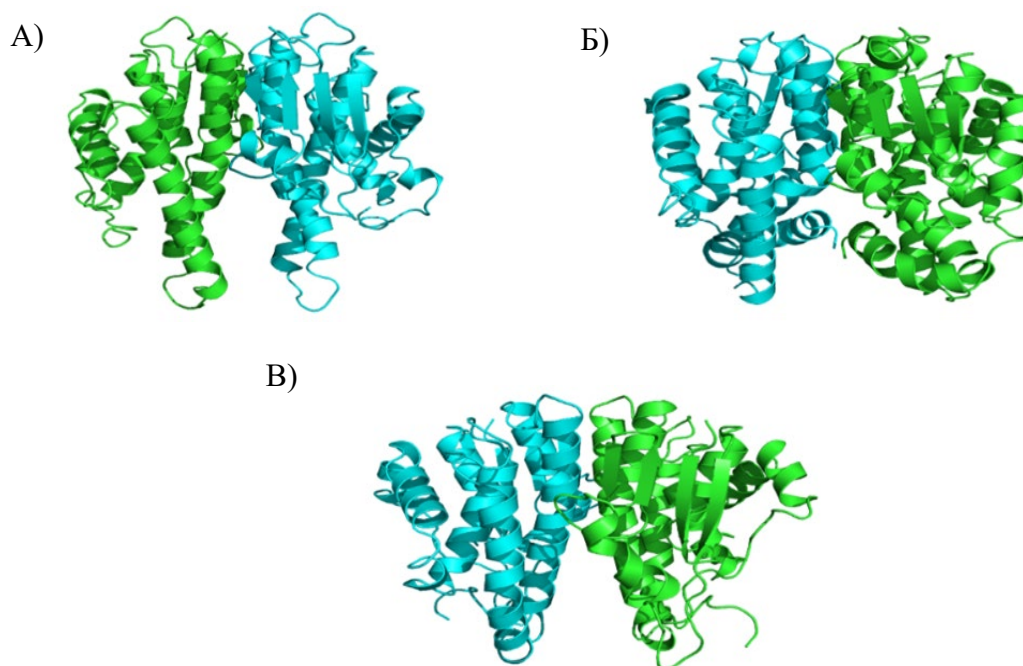
Слика 5.14. Имуноблот анализа као потврда рекомбинантних протеина Gst. Анализирани протеини представљају јединствен узорак спојених елуата (E1–E5) добијених пречишћавањем на HisTrap HP колоници и након дијализе.

Како би се утврдио удео жељеног протеина у елуату након пречишћавања, вршена је дензитометријска анализа. Овом анализом вршено је поређење густине тачака добијених трака након SDS-PAGE анализе различитих разблажења свих елуата рекомбинантног протеина *Gstt2* и познатих концентрација BSA, као стандардне криве. Резултати указују да добијена концентрација *Gstt2* (~ 1,5 mg/mL) одговара претходно одређеној концентрацији протеина (1,62 mg/mL), из спојених елуата E1–E5, помоћу Брадфордове методе, односно да је удео неспецифичних протеина у елуату незнатан (Слика 5.15).



Слика 5.15. SDS-PAGE анализа концентрације протеина *Gstm2*, након пречишћавања са HisTrap HP хроматографском колоницом, дензитометријском анализом добијених трака при различитим разблажењима *Gstm2* елуата (2x, 5x, 10x, 20x) и познатих концентрација албумина телећег серума.

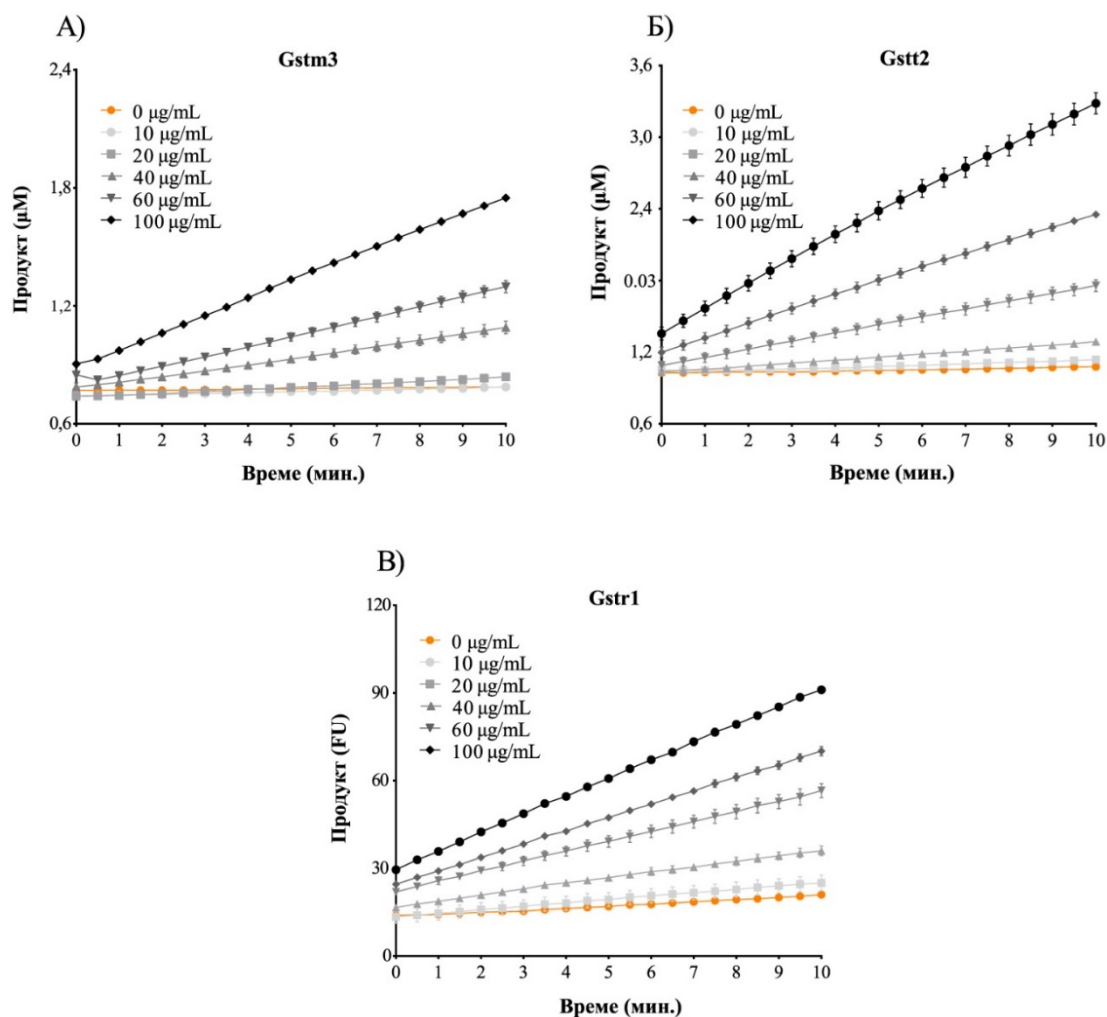
Изведени аминокиселински низови зебричних протеина *Gstm3* и *Gstm2*, приказани су у ПРИЛОГ 5Б, односно у ПРИЛОГ 5Г, док је изведени аминокиселински низ за зебричин протеин *Gstr1* приказан у ПРИЛОГ 7. Предикција тродимензионалне структуре ових протеина урађена је методом хомологног моделовања помоћу ROBBETA сервера (<http://robeta.bakerlab.org/>), док је визуелизација модела омогућена употребом PyMOL (<https://www.pymol.org/>) програма (Слика 5.16).



Слика 5.16. Предикција димерне структуре зебричних протеина *Gst*: А) *Gstr1*, Б) *Gstm2* и В) *Gstm3*. Анализа структуре протеина урађена помоћу ROBBETA сервера, док је визуелизација модела добијена помоћу PyMOL програма.

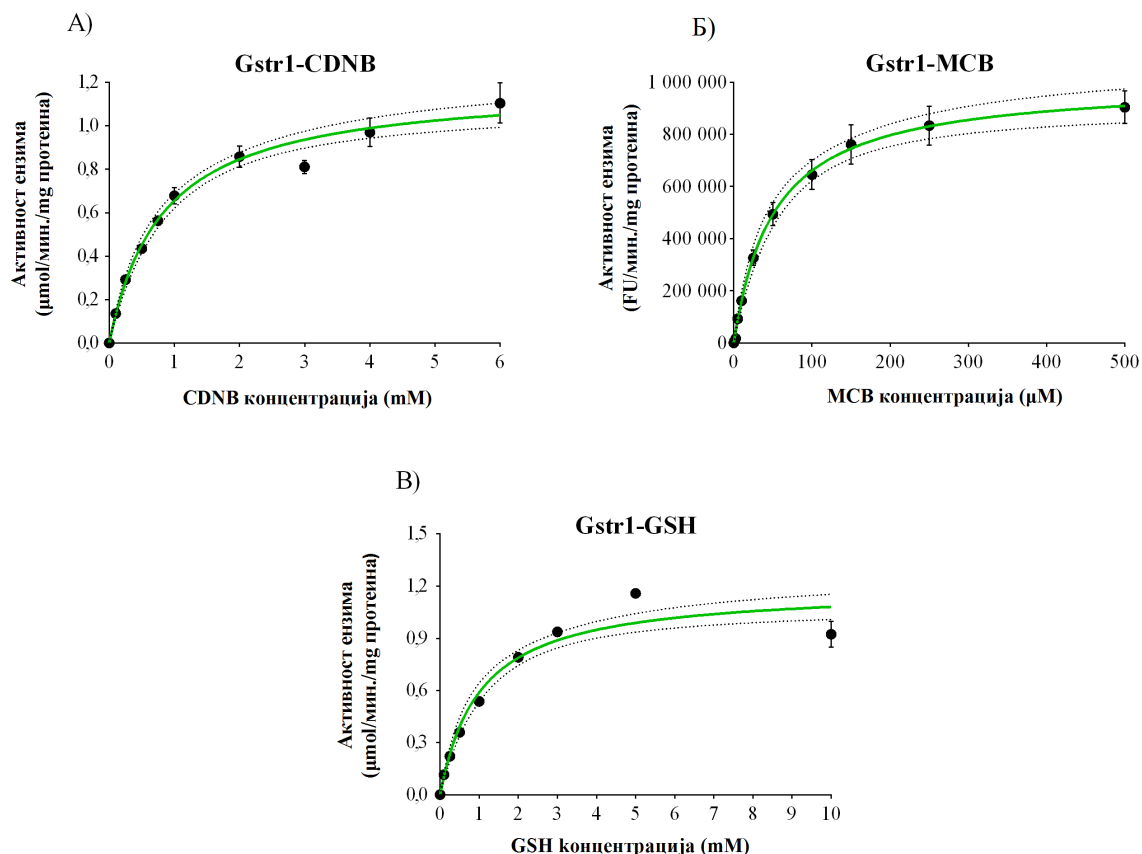
5.4.2. Одређивање кинетичких параметара ензимске реакције одабраних рекомбинантних протеина *Gst*

Функционална карактеризација појединих изоформи рекомбинантних протеина *Gst* зебрице након њиховог пречишћавања могућа је уколико се претходно оптимизују услови мерења ензимске реакције. Да би се дефинисали услови мерења иницијалне брзине ензимски катализоване реакције, неопходно је у функцији времена мерити количину насталог продукта при различитим концентрацијама ензима. На слици 5.17 приказано је настајање продукта у функцији времена у реакцијама катализованим рекомбинантним протеинима *Gstm3*, *Gstt2* и *Gstr1*. При мерењу ензимске активности тестиране су различите концентрације рекомбинантних протеина уз константну концентрацију ко-супстрата GSH (1 mM). При свим примењеним концентрацијама рекомбинантних протеина у опсегу мерења од 10 минута регистрован је линеаран пораст ензимске активности, што одговара условима мерења иницијалне брзине ензимски катализоване реакције. Док је при концентрацији од 20 $\mu\text{g/mL}$ то повећање било незнатно, при концентрацији од 40 $\mu\text{g/mL}$ пораст активности у функцији времена је био далеко већи. Имајући у виду потребу рационалног коришћења рекомбинантног протеина, у даљем раду је коришћена концентрација од 30 $\mu\text{g/mL}$ и временски период од 10 минута за мерење активности пречишћених рекомбинантних протеина *Gst*.



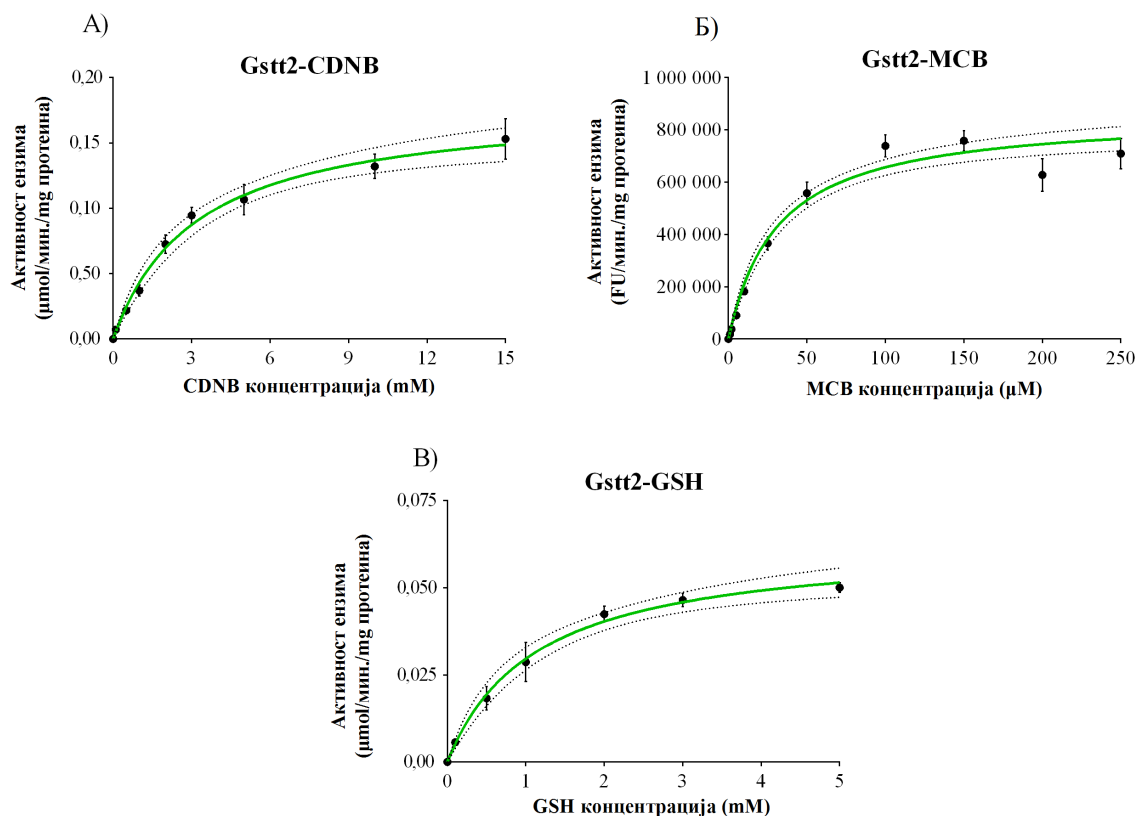
Слика 5.17. Активност рекомбинантних протеина *Gstm3*, *Gstt2* и *Gstr1*. Мерење активности (А) *Gstm3* и (Б) *Gstt2* вршено је помоћу супстрата CDNB, док је за (Б) *Gstr1* ензим мерење активности вршено помоћу супстрата МСВ. Мерења активности GST вршена су у присуству ко-супстрата GSH (1 mM) и различитих концентрација рекомбинантних протеина. Приказана је средња вредност \pm SEM добијена из 2–6 мерења у оквиру једног есеја.

Резултати показују да све три изоформе протеина Gst катализују конјугацију специфичних моделних супстрата, CDNB и MCB са ко-супстратом GSH, а ензимска активност одговара Михаелис-Ментен кинетици (Слике 5.18, 5.19, 5.20).



Слика 5.18. Михаелис-Ментен кинетика рекомбинантног протеина Gstr1: (А) кинетика трансформације CDNB у присуству GSH (1 mM), (Б) кинетика трансформације MCB у присуству GSH (1 mM) и (В) кинетика трансформације GSH у присуству CDNB (1 mM). Резултати су приказани као средња вредност \pm SEM од минимум шест поновака добијених из најмање три независна мерења, а за GSH од четири поновка из два независна експеримента. Криве представљају резултат нелинеарне регресије експерименталних података.

Рекомбинантни протеин Gstr1 показује највећи афинитет (мања K_m вредност) за оба супстрата у поређењу са другим изоформама Gst. Афинитет рекомбинантног протеина Gstr1 за супстрат CDNB је 4 пута већи од афинитета Gstt2, односно 16 пута већи од афинитета рекомбинантног протеина Gstm3 за исти супстрат. Такође, афинитет Gstr1 рекомбинантног протеина за MCB супстрат је 1,6 пута већи од афинитета Gstt2, односно 3 пута већи од афинитета рекомбинантног протеина Gstm3 за исти супстрат (Табела 5.5). Може се уочити да рекомбинантни протеин Gstm3 показује нижи афинитет и за везивање са ко-супстратом у поређењу са друге две изоформе ензима Gst (Табела 5.6). Резултати показују да је афинитет свих изоформи Gst за MCB многоструко већи (мања K_m) од афинитета за CDNB.

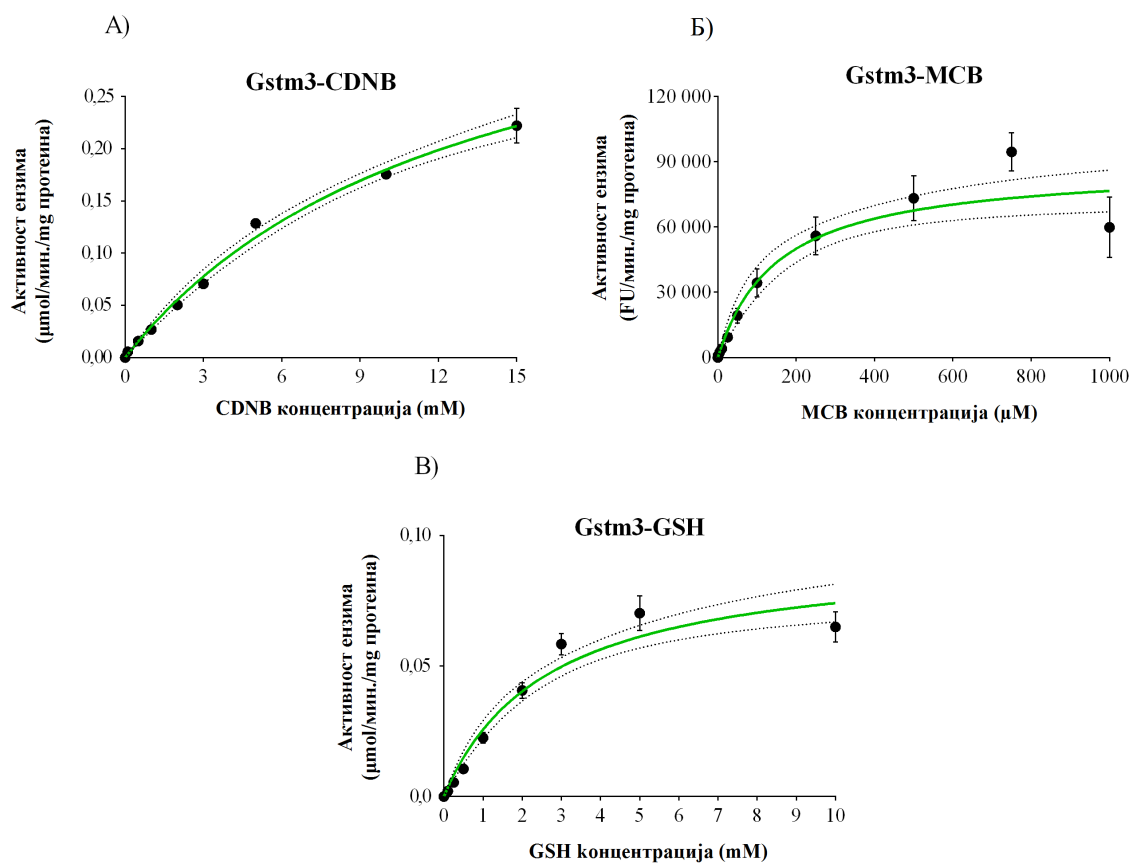


Слика 5.19. Михаелис-Ментен кинетика рекомбинантног протеина Gstt2: (А) кинетика трансформације CDNB у присуству GSH (1 mM), (Б) кинетика трансформације MCB у присуству GSH (1 mM) и (В) кинетика трансформације GSH у присуству CDNB (1 mM). Резултати су приказани као средња вредност \pm SEM од минимум шест поновака добијених из најмање три независна мерења, а за GSH од четири поновка из два независна експеримента. Криве представљају резултат нелинеарне регресије експерименталних података.

Табела 5.5. V_{\max} и K_m рекомбинантних протеина Gst у присуству супстрата CDNB и MCB.

Ензим	K_m	И.П. (95%)	V_{\max}	И.П. (95%)	R^2
CDNB					
Gtr1	$0,82 \pm 0,09$	0,64–1,00	$1,19 \pm 0,04$	1,10–1,28	0,94
Gstt2	$3,19 \pm 0,62$	1,95–4,44	$0,18 \pm 0,01$	0,15–0,21	0,85
Gstm3	$12,96 \pm 1,93$	8,87–17,05	$0,41 \pm 0,04$	0,34–0,49	0,99
MCB					
Gstr1	$0,05 \pm 0,01$	0,04–0,07	$1,00 \pm 0,05$	0,91–1,10	0,80
Gstt2	$0,03 \pm 0,004$	0,02–0,04	$0,86 \pm 0,04$	0,79–0,93	0,80
Gstm3	$0,15 \pm 0,04$	0,07–0,24	$0,09 \pm 0,01$	0,07–0,10	0,80

K_m је дата у mM, V_{\max} за CDNB у $\mu\text{mol}/\text{мин.}/\text{mg}$ прот., а за MCB у $(\text{FU}/\text{мин.}/\text{mg}$ протеина) $\cdot 10^{-6}$ због адекватнијег приказа. Резултати су приказани као средња вредност \pm SEM од 6 поновака у три независна експеримента. И.П. – интервал поверења; R^2 – коефицијент детерминације показује како се експериментално добијени подаци слажу са емпиријски добијеним кривама.



Слика 5.20. Михаелис-Ментен кинетика рекомбинантног протеина Gstm3:(А) кинетика трансформације CDNB у присуству GSH (1 mM), (Б) кинетика трансформације MCB у присуству GSH (1 mM) и (В) кинетика трансформације GSH у присуству CDNB (1 mM). Криве представљају резултат нелинеарне регресије експерименталних података. Резултати су приказани као средња вредност ± SEM од минимум шест поновка добијених из најмање три независна мерења, а за GSH од четири поновка из два независна експеримента.

Табела 5.6. K_m и V_{max} рекомбинантних протеина Gst за ко-супстрат GSH.

Ензим	K_m	И.П. (95%)	V_{max}	И.П. (95%)	R^2
Gstr1	1,02 ± 0,15	0,72–1,33	1,19 ± 0,05	1,09–1,30	0,94
Gstt2	1,13 ± 0,23	0,65–1,60	0,06 ± 0,00	0,05–0,07	0,93
Gstm3	2,66 ± 0,47	1,70–3,63	0,09 ± 0,01	0,08–0,11	0,95

Коришћен је 1 mM CDNB као супстрат; K_m је дата у mM, V_{max} у $\mu\text{mol}/\text{мин.}/\text{mg}$ прот; Резултати су приказани као средња вредност ± SEM од 4 поновка у два независна експеримента; И.П. – интервал поверења; R^2 – коефицијент детерминације показује како се експериментално добијени подаци слажу са емпиријски добијеним кривама.

Каталитичка ефикасност ензима исказује се количником k_{cat}/K_m где је k_{cat} обртни број, односно број молекула супстрата које ензим може трансформисати у продукт у јединици времена када је ензим потпуно засићен супстратом. Ова константа узима у обзир и брзину каталитичке реакције са одређеним супстратом (k_{cat}) и јачину интеракције ензима са датим супстратом K_m . Стога је много погоднија за поређење каталитичке активности различитих ензима. За одређивање каталитичке ефикасности ензима може да се користи и количник V_{max}/K_m , с обзиром да је V_{max} производ k_{cat} и концентрације ензима. Ефикасност којом рекомбинантни протеини Gst катализују конјугацију одговарајућих супстрата са GSH приказана је у оквиру табеле 5.7, а статистичка анализа ефикасности у табели 5.8.

Табела 5.7. Каталитичка ефикасност рекомбинантних протеина Gst.

Ензим	CDNB		MCB		GSH	
	$(V_{max}/K_m) \cdot 10^2$	И.П.	$(V_{max}/K_m) \cdot 10^{-5}$	И.П.	$(V_{max}/K_m) \cdot 10^2$	И.П.
Gstr1	154 ± 8	134–173	212 ± 20	169–255	117 ± 8	92–141
Gstt2	5 ± 1	4–7	283 ± 21	239–326	6 ± 1	2–11
Gstm3	3 ± 0	2–4	6 ± 1	3–8	4 ± 1	(–3)–11

Резултати су приказани као средња вредност ± SEM; Приказан је интервал поверења (И.П.) са нивоом од 95%.

Количник V_{max}/K_m указује да изоформа Gstr1 ефикасније трансформише супстрат CDNB (28 пута) и ко-супстрат GSH (19 пута) у поређењу са изоформом Gstt2, при чему су разлике високо значајне ($p < 0,0001$). Међутим, у присуству супстрата MCB нема статистички значајне разлике у активности Gstr1 и Gstt2 (Табела 5.8). Јасно се увиђа да је ефикасност рекомбинантног протеина Gstr1 у катализи трансформације супстрата CDNB, MCB, као и ко-супстрата GSH статистички значајно већа (51 пута, 35 пута, односно 29 пута) у односу на Gstm3. Не постоји статистички значајна разлика у ефикасности рекомбинантних протеина Gstt2 и Gstm3 у катализи конјугације супстрата CDNB са GSH, док је уочена статистички значајна већа ефикасност Gstt2 (47 пута) у односу на Gstm3 када је у питању супстрат MCB (Табела 5.7, Табела 5.8).

Табела 5.8. Статистичка анализа ефикасности којом рекомбинантни протеини Gst трансформишу одговарајуће супстрате/ко-супстрате (резултати су приказани у Табели 5.7).

Ензим	CDNB			MCB			GSH		
	Gstm3	Gstt2	Gstr1	Gstm3	Gstt2	Gstr1	Gstm3	Gstt2	Gstr1
Gstr1	***	***	-	***	нс3	-	**	***	-
Gstt2	нс3	-	***	***	-	нс3	нс3	-	***
Gstm3	-	нс3	***	-	***	***	-	нс3	**

Подаци су анализирани статистичком методом анализе варијансе употребом *post hoc Tukey* теста. *** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$; нс3 - нема статистичке значајности.

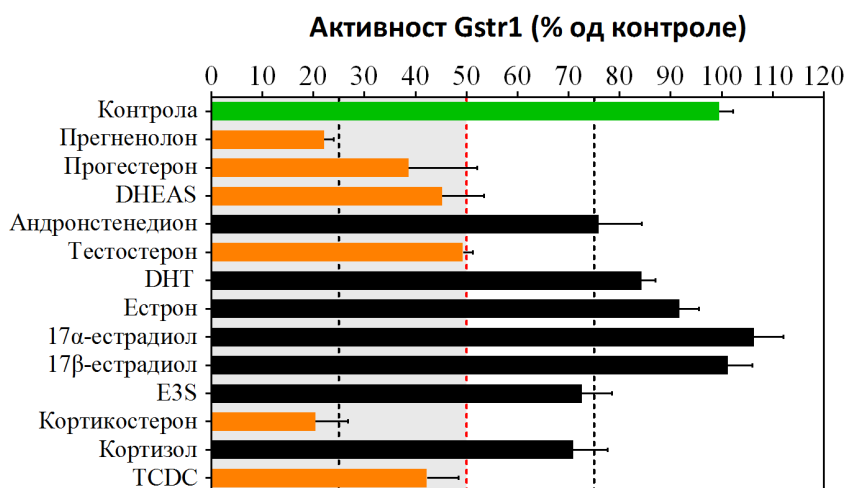
5.5. Инхибиторни потенцијал одабраних ендогених једињења и ксенобиотика

Претходно оптимизовани есеј за мерење активности Gst употребљен је за испитивање инхибиторног потенцијала одабраних ендогених једињења и ксенобиотика који припадају такозваним емергентним супстанцама присутним у отпадним водама (Murray и сар., 2010). За добијање прелиминарних резултата о инхибиторној активности тестираних једињења, активност два рекомбинантна протеина, Gstr1 и Gst2, испитана је у присуству и одсуству 100 μM одабраних једињења, а резултати су исказани као проценат (%) од активности коју рекомбинантни протеини имају у одсуству тестиране супстанце (100% активност). У другом кораку су анализирана сва једињења која при тестираној концентрацији инхибирају ензимску активност Gstr1 за више од 50% у поређењу са контролом. Дефинисан је тип инхибиције и одређене су константа инхибиције (K_i) и константа (α). Константа α описује утицај везивања инхибитора на афинитет датог рекомбинантног протеина за супстрат (Copeland, 2005).

Одређивање типа интеракције анализираних једињења (модулатора) са рекомбинантним протеинима Gstr1 и Gst2 вршено је упоређивањем кинетичких параметара (K_m и V_{max}) трансформације флуоресцентног моделног супстрата МСВ у одсуству и присуству тих једињења, а користећи нелинеарну регресију и мешовити тип (енгл. *mixed type*) инхибиције ензима. У циљу олакшане интерпретације добијених резултата извршена је категоризација инхибитора у односу на израчунате K_i вредности: **веома јаки инхибитори** – за које је $K_i < 1 \mu\text{M}$, **јаки инхибитори** – за које је $K_i = 1\text{--}20 \mu\text{M}$, **умерени инхибитори** – за које је $K_i = 20\text{--}40 \mu\text{M}$ и **слаби инхибитори** – за које је $K_i > 40 \mu\text{M}$.

5.5.1. Инхибиција рекомбинантног протеина Gstr1 ендогеним једињењима

Од ендогених супстанци испитана је активност 12 стероидних хормона и једног представника жучних киселина. Резултати су показали да четири полна хормона од десет тестираних, прегненолон, прогестерон, дехидроепиандростерон-сулфат (енгл. *dehydroepiandrosterone sulfate*, DHEAS) и тестостерон, интерагују са рекомбинантним протеином Gstr1 инхибишући његову ензимску активност за више од 50% у односу на контролу, при чему је инхибиција у присуству прегненолона била већа од 70%. Хормон коре надбубрега, кортикостерон је такође инхибисао активност Gstr1 за више од 70%, док кортизол није испољио инхибиторну активност. Ниједан од тестираних естрогенних хормона није показао инхибиторни потенцијал према рекомбинантном протеину Gstr1. Таурохенодеоксихолат (енгл. *taurochenodeoxycholate*, TCDC) је такође инхибисао ензимску активност за више од 50% (Слика 5.21).



Слика 5.21. Ефекат стероидних једињења на активност Gstr1. Резултати представљају проценат (%) активности Gstr1 да трансформише супстрат MCB (100 μM) у присуству тестираног једињења (100 μM) и GSH (1 mM) у односу на активност Gstr1 у одсуству тестираног једињења (контрола, 100%). Подаци представљају средње вредности \pm SEM трипликата из три независна експеримента. Скраћенице: DHEAS - дехидроепиандростерон-сулфат, DHT - дихидротестостерон (енгл. *dihydrotestosterone*), E3S - естрон-3-сулфат (енгл. *estrone-3-sulfate*), TCDC - таурохенодеоксихолат.

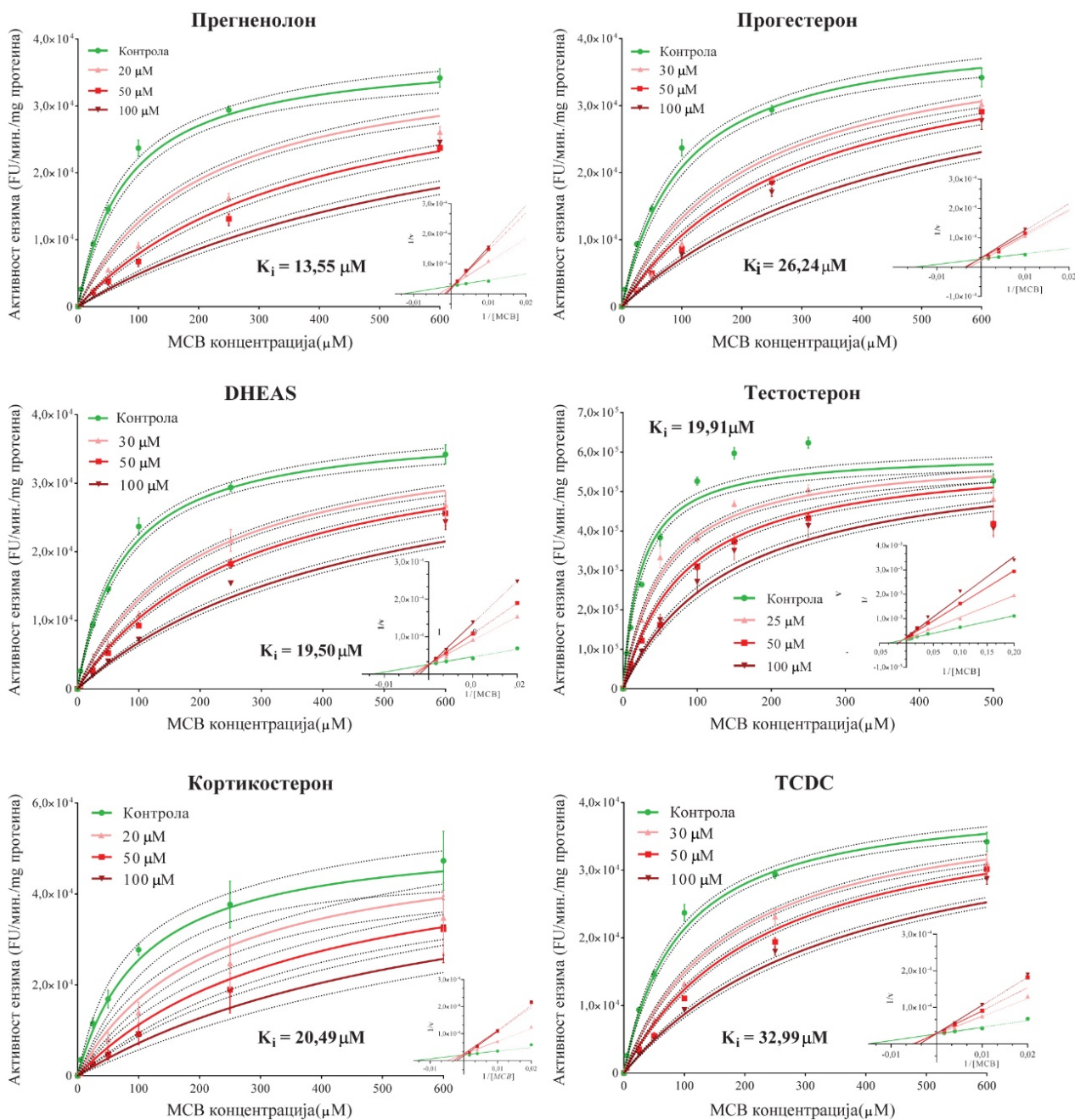
Резултати указују на могућу физиолошку интеракцију ензима Gstr1 са овим стероидима. Наиме, сви су показали компетитиван тип инхибиције активности Gstr1 (Табела 5.9, Слика 5.22). Израчунате K_i вредности су у микромоларном опсегу (14–26 μM), а прегненолон је показао највећу инхибицију ($K_i = 13,55 \pm 1,49 \mu\text{M}$) и класификован је као јак инхибитор.

Сва друга ендогена једињења која су показала интеракције са рекомбинантним протеином Gstr1 су класификована као умерени инхибитори. Тестостерон и DHEAS су показали сличан инхибиторни потенцијал са израчуномом K_i од приближно 20 μM . Кортикостерон је показао сличан инхибиторни потенцијал као андрогени са израчуномом $K_i = 20,49 \pm 4,89 \mu\text{M}$. TCDC је показао мањи инхибиторни потенцијал према Gstr1 са израчуномом $K_i = 33 \mu\text{M}$ (Табела 5.9, Слика 5.22).

Табела 5.9. Тип инхибиције рекомбинантног протеина Gstr1 стероидним хормонима и вредности константе инхибиције (K_i).

Једињење	Тип инхибиције	α	K_i (μM)	И.П. (95%)	R^2
Прегненолон	Компетитивна	$\alpha \gg 1$	$13,55 \pm 1,49$	10,60–16,50	0,98
Прогестерон	Компетитивна	$\alpha \gg 1$	$26,24 \pm 2,59$	21,10–31,39	0,98
DHEAS	Компетитивна	$\alpha \gg 1$	$19,50 \pm 1,61$	16,31–22,69	0,98
Тестостерон	Компетитивна	$\alpha \gg 1$	$19,91 \pm 2,23$	15,54–24,29	0,94
Кортикостерон	Компетитивна	$\alpha \gg 1$	$20,49 \pm 4,89$	10,79–30,19	0,89
TCDC	Компетитивна	$\alpha \gg 1$	$32,99 \pm 2,74$	27,55–38,44	0,98

Скраћенице: α (*alpha*) – константа која описује утицај везивања инхибитора на афинитет ензима за дати супстрат; И.П. – интервал поверења; R^2 – коефицијент детерминације; DHEAS - дехидроепиандростерон-сулфат; TCDC - таурохенодеоксихолат. Резултати су приказани као средња вредност \pm SEM из најмање три независна експеримента.



Слика 5.22. Тип инхибиције рекомбинантног протеина **Gstr1** стероидним хормонима и вредности константе инхибиције (K_i). Ензимска активност испитана је у присуству МСВ (5–600 μM) и GSH (1 mM) у одсуству (контрола) и присуству три концентрације тестираних једињења. Средња вредност ± SEM и интервал поверења (95%) су израчунати на основу 4–6 поновака из три независна експеримента. Инсерти представљају *Lineweaver-Burk* графике којима се илуструје тип инхибиције.

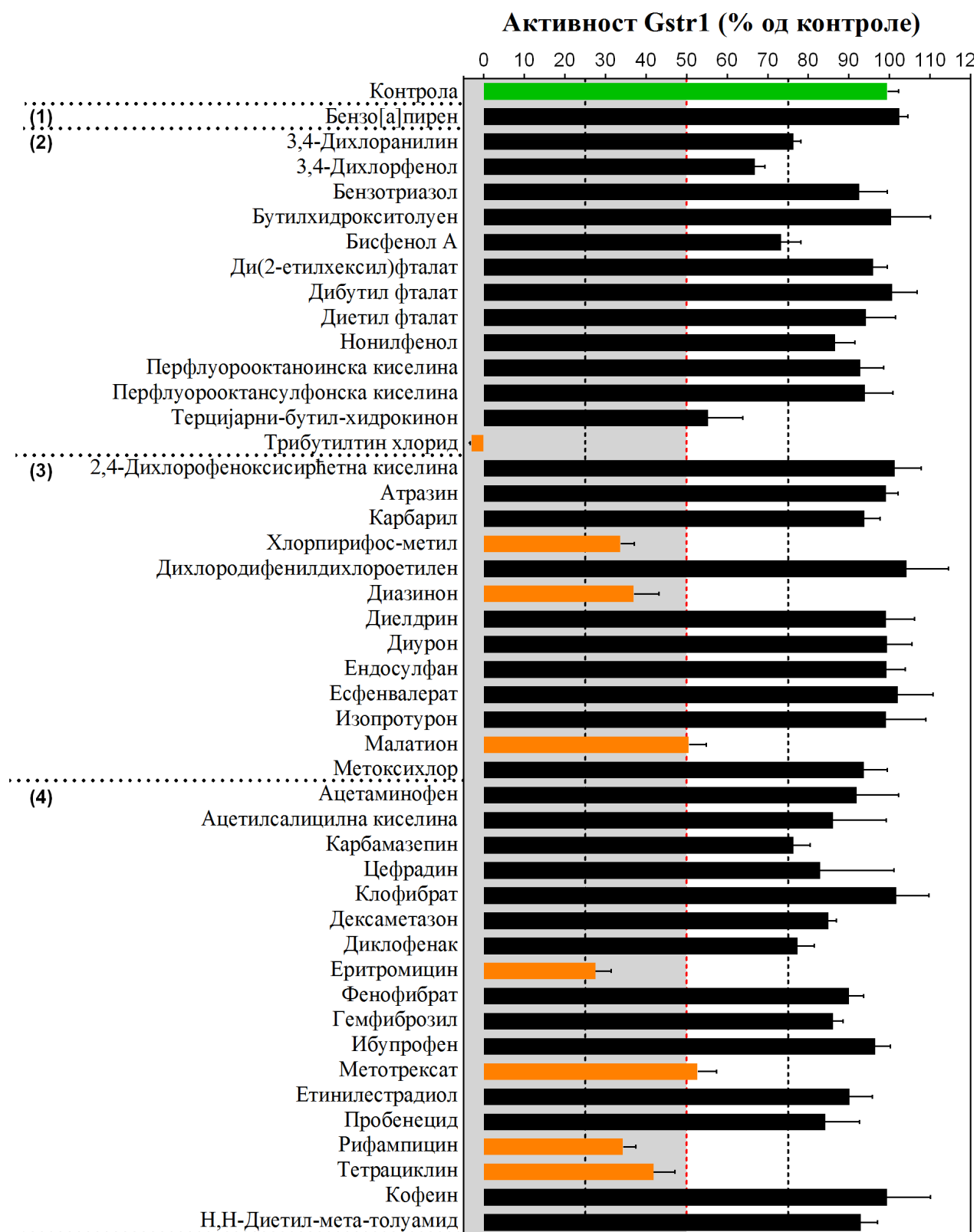
5.5.2. Инхибиција активности рекомбинатног протеина Gstr1 ксенобиотицима

Међу испитиваним индустријским хемикалијама, трибутилтин хлорид се испољио као јак инхибитор рекомбинатног протеина Gstr1, изазвао је потпуну блокаду ензимске активности када је примењен у концентрацији од 100 μ M (Слика 5.23).

Тестирани фталати, ДЕНР, дибутил фталат и ДЕР, као и перфлуорисана једињења, РФОА и РФОС, нису показала инхибиторни потенцијал према рекомбинатном протеину Gstr1. Друге испитиване индустријске хемикалије показале су ограничену интеракцију (инхибиција активности Gstr1 у опсегу 25–45% у односу на контролу) или потпуни изостанак интеракције са рекомбинатним протеином Gstr1 (Слика 5.23).

Органофосфорни пестициди, хлорпирифос-метил, диазинон и малатион су довели до инхибиције активности Gstr1 у опсегу 49–66%, док остали тестирани пестициди нису показали инхибиторну активност (Слика 5.23).

Међу лековима инхибицију у опсегу 47–72% у поређењу са контролом показали су еритромицин, метотрексат, рифампицин и тетрациклин. Остала тестирана једињења из групе РРСРс исказала су ограничену (инхибиција ензимске активности < 25%) или потпуни изостанак интеракције са рекомбинатним протеином Gstr1 (Слика 5.23).



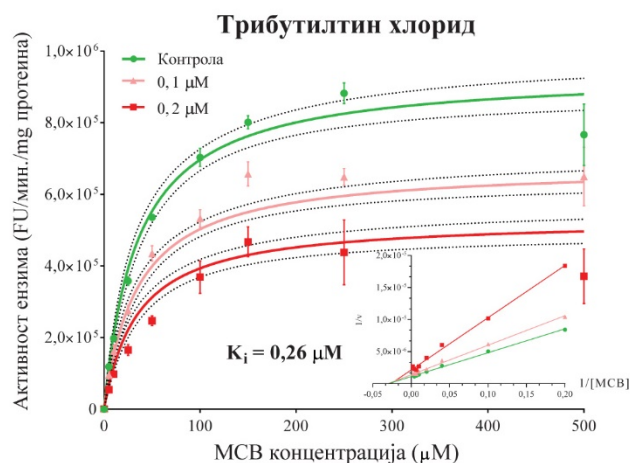
Слика 5.23. Ефекат ксенобиотика на активност Gstr1. Резултати представљају проценат (%) активности Gstr1 да трансформише супстрат МСВ (100 μM) у присуству тестираног једињења (100 μM) и ко-супстрата GSH (1 mM) у односу на активност Gstr1 у одсуству тестираног једињења (контрола, 100%). Једињења су подељена у четири групе: (1) полициклични ароматични угљоводоници, (2) индустријске хемикалије, (3) пестициди и (4) лекови и производи за личну негу. Подаци представљају средње вредности \pm SEM трипликаата из три независна експеримента.

Табела 5.10. Тип инхибиције рекомбинантног протеина Gstr1 тестираним једињењим: (1) индустријским хемикалијама, (2) пестицидима и (3) лековима и вредности константе инхибиције (K_i).

Једињење	Тип инхибиције	α	K_i (μM)	И.П. (95%)	R ²
(1) Трибутилтин хлорид	Некомпетитивна	$1,2 \pm 0,6$	$0,26 \pm 0,02$	0,21–0,31	0,93
(2) Диазинон	Компетитивна	$\alpha \gg 1$	$27,03 \pm 2,06$	22,93–31,12	0,98
Еритромицин	Компетитивна	$\alpha \gg 1$	$36,47 \pm 3,29$	29,94–43,00	0,97
Метотрексат	Компетитивна	$\alpha \gg 1$	$29,29 \pm 3,04$	23,25–35,33	0,98
(3) Рифампицин	Некомпетитивна	$1,8 \pm 0,4$	$64,83 \pm 2,48$	59,96–69,70	0,96
Тетрациклин	Компетитивна	$\alpha \gg 1$	$17,48 \pm 0,95$	15,59–19,37	0,98

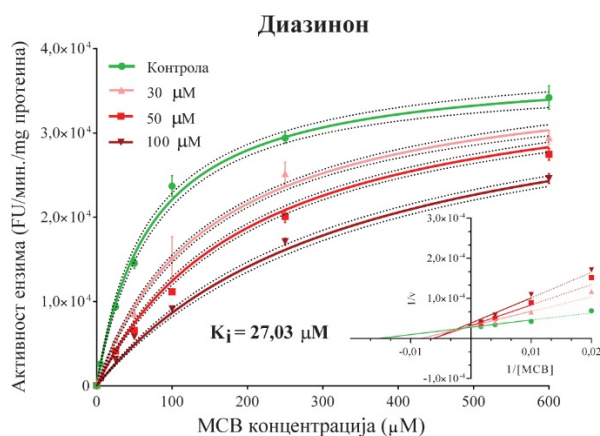
Скраћенице: α (*alpha*) – константа која описује утицај везивања инхибитора на афинитет ензима за дати супстрат; И.П. – интервал поверења; R² – коефицијент детерминације. Резултати су приказани као средња вредност \pm SEM из најмање три независна експеримента.

Трибутилтин хлорид се показао као веома јак некомпетитивни инхибитор ензимске активности рекомбинантног протеина Gstr1, са израчунавом K_i вредношћу од $0,26 \mu\text{M}$ (Табела 5.10, Слика 5.24).



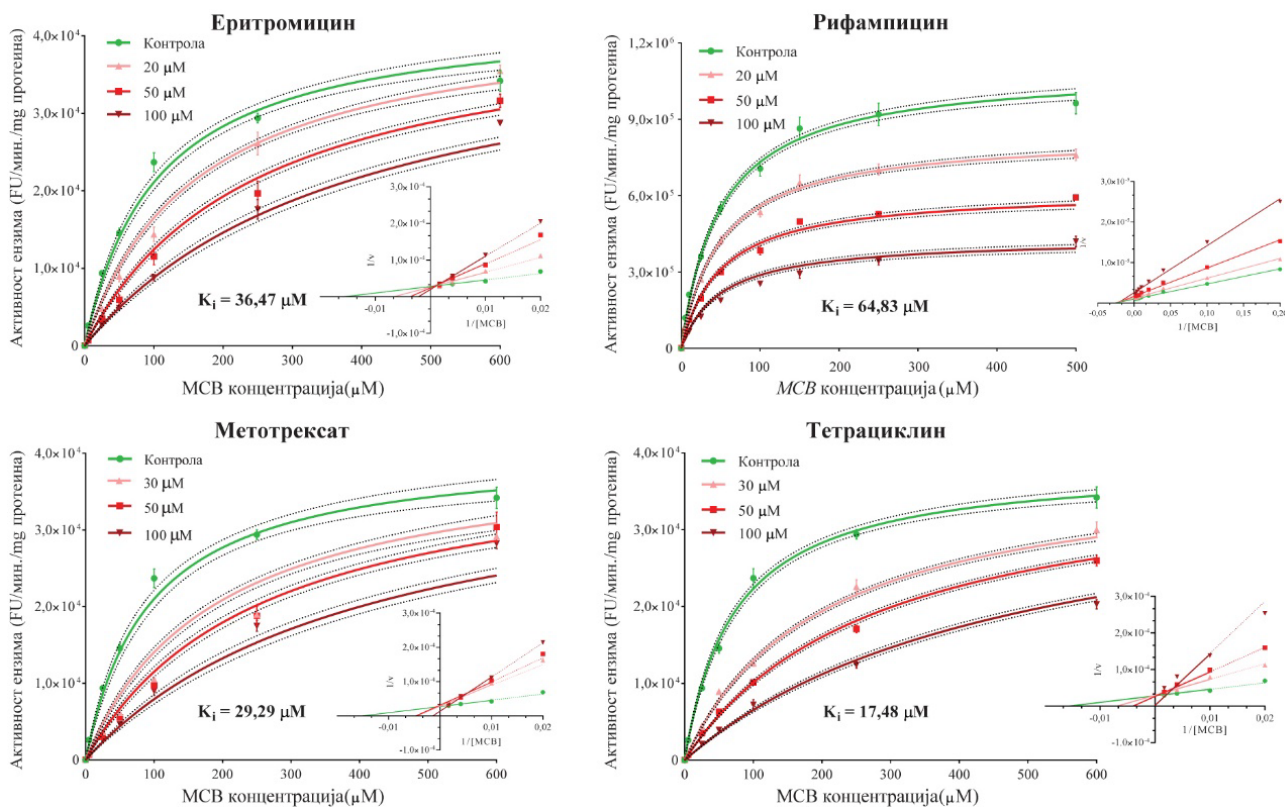
Слика 5.24. Некомпетитивна инхибиција рекомбинантног протеина Gstr1 трибутилтином и вредност константе инхибиције (K_i). Ензимска активност испитана је у присуству МСВ (5–600 μM) и GSH (1 mM) у одсуству (контрола) и присуству две концентрације трибутилтин хлорида. Средња вредност \pm SEM и интервал поверења (95%) су израчунати на основу 4–6 поновака из три независна експеримента. Инсerti представљају *Lineweaver-Burk* графике којима се илуструје тип инхибиције.

Од органофосфорних једињења која су изазвала инхибицију већу од 50%, приказани су резултати за диазинон који је исказао умерену компетитивну инхибицију активности Gstr1 са израчунавом K_i вредношћу од $27 \mu\text{M}$ (Табела 5.10, Слика 5.25). У случају друга два пестицида, хлорпирифос-метил и малатиона, при одређивању константе инхибиције добијени су резултати који су били у супротности са иницијално добијеним подацима о инхибиторној активности $100 \mu\text{M}$ ових једињења (Слика 5.23). Наиме, у присуству најниже концентрације оба пестицида ($30 \mu\text{M}$) активност рекомбинантног протеина Gstr1 је била повећана у поређењу са контролом, док је у присуству највише концентрације ($100 \mu\text{M}$) активност ензима била слична контролним вредностима (ПРИЛОГ 9).



Слика 5.25. Компетитивна инхибиција рекомбинантног протеина Gstr1 диазиномом и вредност константе инхибиције (K_i). Ензимска активност испитана је у присуству МСВ (5–600 μM) и GSH (1 mM) у одсуству (контрола) и присуству три концентрације диазинона. Средња вредност \pm SEM и интервал поверења (95%) су израчунати на основу 4–6 поновака из три независна експеримента. Инсерти представљају *Lineweaver-Burk* графике којима се илуструје тип инхибиције.

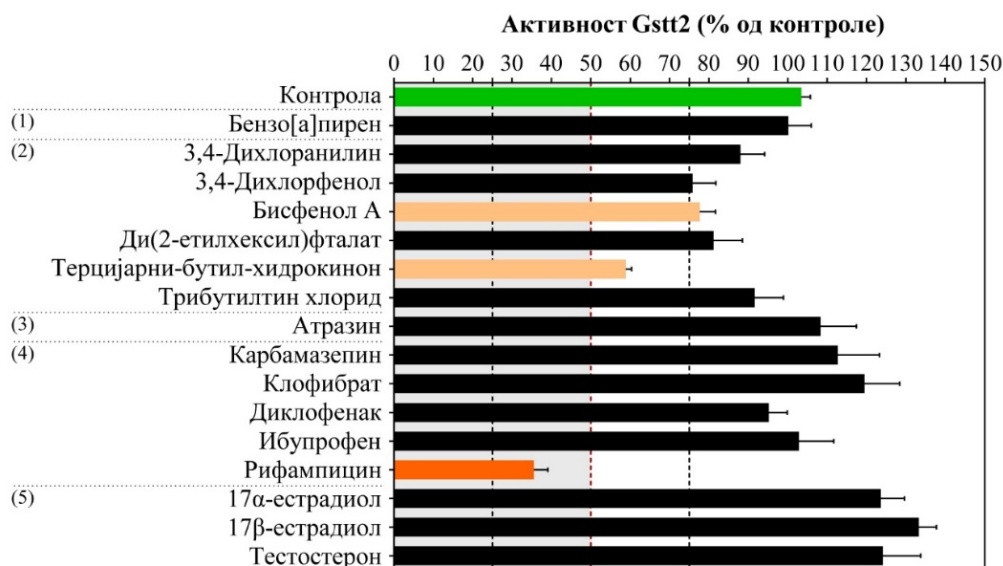
Тетрациклин је исказао јаку инхибицију компетитивног типа са израчунавом вредности K_i од 17,5 μM , док су еритромицин и метотрексат исказали умерену компетитивну инхибицију са вредности K_i од 36,5 μM , односно 29,3 μM (Табела 5.10, Слика 5.26). Насупрот томе, рифампицин је исказао слабу инхибицију активности Gstr1 некомпетитивног типа са израчунавом вредности K_i од 65 μM (Табела 5.10, Слика 5.26).



Слика 5.26. Тип инхибиције рекомбинантног протеина Gstr1 одабраним лековима и вредности константе инхибиције (K_i). Ензимска активност испитана је у присуству МСВ (5–600 μM) и GSH (1 mM) у одсуству (контрола) и присуству три концентрације тестираних једињења. Средња вредност \pm SEM и интервал поверења (95%) су израчунати на основу 4–6 поновака из три независна експеримента. Инсерти представљају *Lineweaver-Burk* графике којима се илуструје тип инхибиције.

5.5.3. Утицај ксенобиотика и ендогених једињења на активност рекомбинантног протеина Gstt2

За испитивање инхибиторног потенцијала одабраних једињења на активност рекомбинантног протеина Gstt2 примењен је исти приступ као и у случају Gstr1. Прво је испитан ефекат 100 μM датих једињења, а затим одређен тип инхибиције и константа инхибиције за она једињења која су показала инхибицију већу од 50% у односу на контролу. Од полицикличних ароматичних угљоводоника тестиран је бензо[а]пирен који није имао инхибиторну активност, као ни пестицид атразин. Од индустријских хемикалија, DCP, бисфенол А и ДЕНР изазвали су смањење активности у опсегу од 19–25%. Антиоксиданс, tBHQ, изазвао је инхибицију од 45%, док је од примењених лекова рифампицин изазвао инхибицију од 66%. С друге стране, хормони 17 α - и 17 β -естрадиол изазвали су значајно повећање активности Gstt2 рекомбинантног протеина (Слика 5.27).



Слика 5.27. Ефекат ксенобиотика и ендогених једињења на активност Gstt2. Резултати представљају проценат (%) Gstr1 активности да трансформише MCB (100 μM) у присуству сваког једињења (100 μM) и GSH (1 mM) у односу на активност Gstr1 ензима у одсуству тестираног једињења (контрола, 100%). Једињења су подељена у пет групе: (1) полициклични ароматични угљоводоници, (2) индустријске хемикалије, (3) пестициди, (4) лекови и (5) полни хормони. Подаци представљају средње вредности \pm SEM од најмање четири понављања из два независна експеримента.

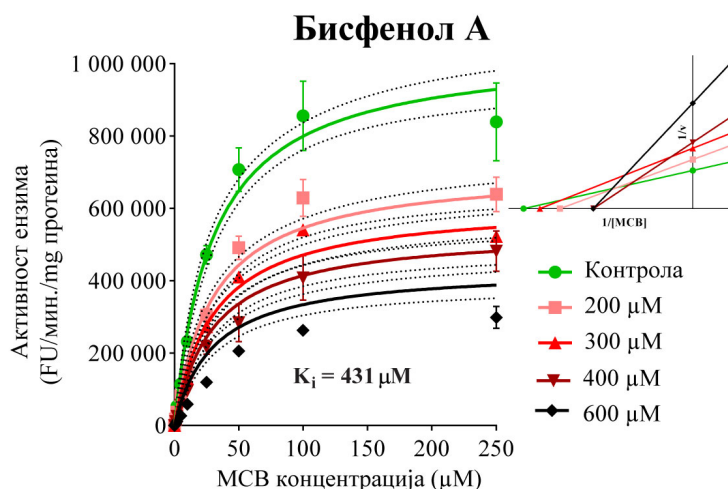
Тип инхибиције и константа инхибиције, одређени су за: рифампицин, tBHQ и бисфенол А (Табела 5.11)

Табела 5.11. Тип инхибиције рекомбинантног протеина Gstt2 одабраним једињењима и вредности константе инхибиције (K_i)

Једињење	Тип инхибиције	α	K_i (μM)	И.П. (95%)	R^2
Бисфенол А	Н (М)	$2 \pm 0,9$	$431,00 \pm 41,45$	349,80–512,20	0,84
tBHQ	Некомпетитивна	$1 \pm 0,6$	$81,46 \pm 8,17$	65,45–97,47	0,84
Рифампицин	Некомпетитивна	$1 \pm 0,3$	$55,06 \pm 2,34$	50,47–59,65	0,97

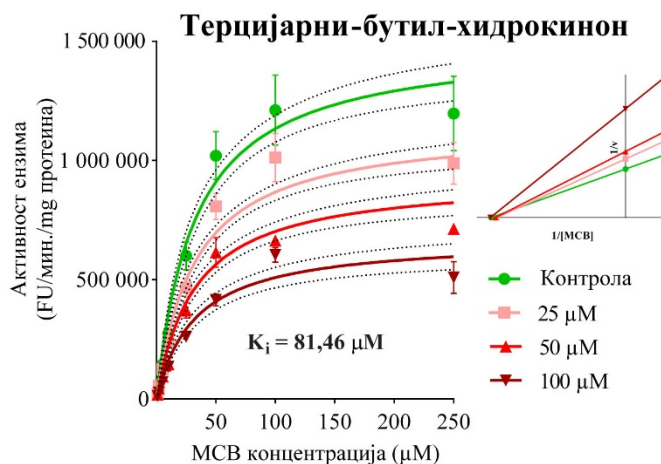
Скраћенице: tBHQ – Терцијарни-бутил-хидрокинон; α (*alpha*) – константа која описује утицај везивања инхибитора на афинитет ензима за дати супстрат; И.П. – интервал поверења; R^2 – коефицијент детерминације; Н (М) – некомпетитивни тип (мешовити тип) инхибиције. Резултати су приказани као средња вредност \pm SEM из најмање три независна експеримента, изузев у случају ВРА где је приказана средња вредност од 4 понављања из два независна експеримента.

Бисфенол А је испољио некопетитивни (мешовити) тип инхибиције ($\alpha = 2$) са врло великом вредности константе инхибиције (Табела 5.11, Слика 5.28).



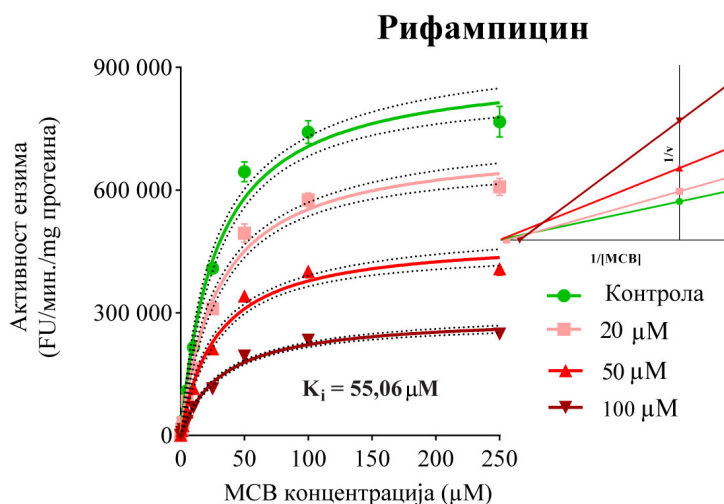
Слика 5.28. Некопетитивни (мешовит тип) инхибиције рекомбинантног протеина Gstr1 бисфенолом А и вредност константе инхибиције (K_i). Ензимска активност испитана је у присуству МСВ (5–250 μM) и GSH (1 mM) у одсуству (контрола) и присуству три концентрације ВРА. Средња вредност \pm SEM и интервал поверења (95%) су израчунати на основу 6 поновака из три независна експеримента. Инсerti представљају *Lineweaver-Burk* графике којима се илуструје тип инхибиције.

tBHQ је слаб некопетитивни инхибитор Gstr2 ($\alpha = 1$), а константа инхибиције износи $81 \pm 8 \mu\text{M}$ (Табела 5.11, Слика 5.29).



Слика 5.29. Некопетитивна инхибиција рекомбинантног протеина Gstr1 терцијарним-бутил-хидрокиноном и вредност константе инхибиције (K_i). Ензимска активност испитана је у присуству МСВ (5–250 μM) и GSH (1 mM) у одсуству (контрола) и присуству три концентрације tBHQ. Средња вредност \pm SEM и интервал поверења (95%) су израчунати на основу 6 поновака из три независна експеримента. Инсerti представљају *Lineweaver-Burk* графике којима се илуструје тип инхибиције.

Рифампицин је испољио некопетитивни тип инхибиције ($\alpha = 1$) са константом инхибиције, $K_i = 55 \pm 2 \mu\text{M}$ што га убраја у слабе инхибиторе (Табела 5.11, Слика 5.30).

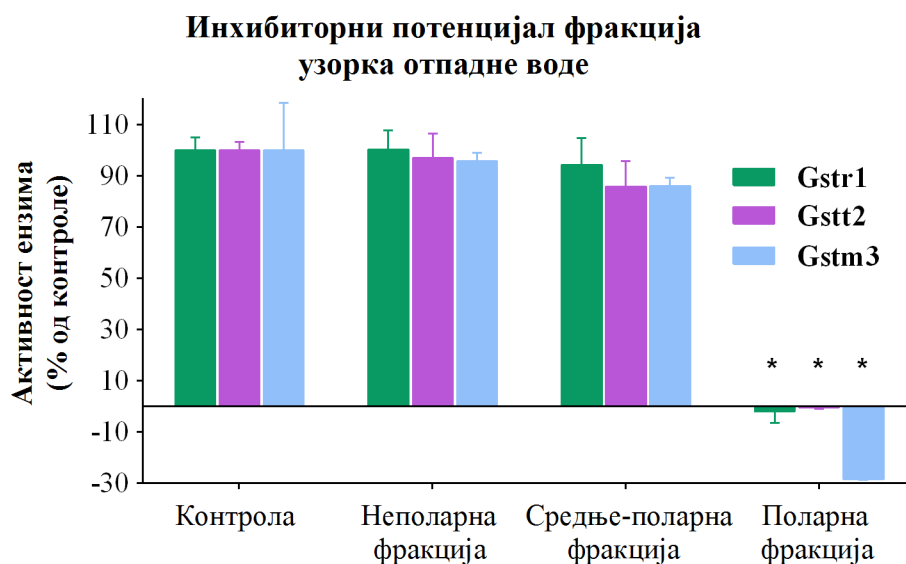


Слика 5.30. Некопетитивна инхибиција рекомбинантног протеина Gstr1 рифампицином и вредности константе инхибиције (K_i). Ензимска активност испитана је у присуству МСВ (5–250 μM) и GSH (1 mM) у одсуству (контрола) и присуству три концентрације рифампицина. Средња вредност \pm SEM и интервал поверења (95%) су израчунати на основу 6 поновака из три независна експеримента. Инсerti представљају *Lineweaver-Burk* графике којима се илуструје тип инхибиције.

5.6. Инхибиторни потенцијал узорка отпадне воде на активност рекомбинантних протеина Gstr1, Gstt2 и Gstm3

Поред испитивања инхибиторног потенцијала одабраних приоритетних супстанци, испитиван је и ефекат комплексне смеше једињања на активност рекомбинантних протеина Gst зебрице. Анализиран је инхибиторни потенцијал узорка отпадне воде који је добијен композитним прикупљањем воде током 24 часа. С обзиром да у таквом узорку могу да буду присутне различите приоритетне хемикалије, оправдано је употребљен као репрезентативни узорак из спољашње средине. Одговарајућим поступком изоловане су фракције које су садржале смеше неполарних, средње-поларних и поларних једињења. Ефекат узорка отпадне воде испитан је на активност три рекомбинантна протеина, Gstr1, Gstt2 и Gstm3.

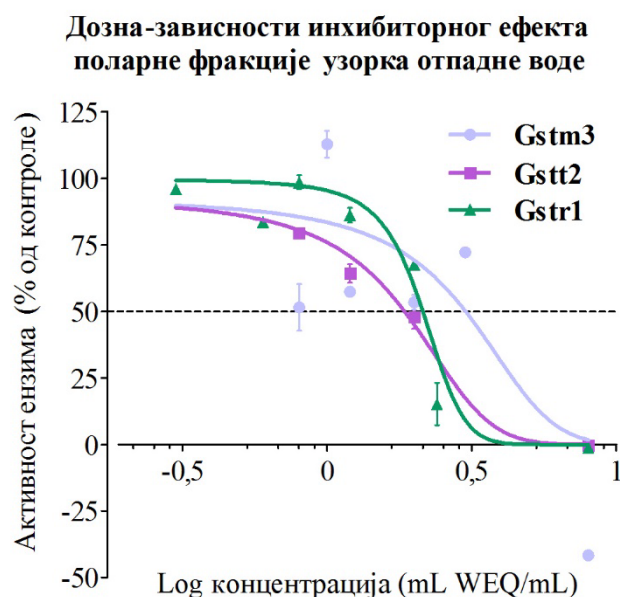
Праћена је промена активности у присуству фракција узорка при концентрацији од 8 mL WEQ/mL инкубационог медијума. Тестирана концентрација узорка исказана као mL WEQ (енгл. *Water Equivalent*)/mL инкубационог медијума представља екстрахована биолошки активна једињења садржана у 8 mL отпадне воде. Ова концентрација је одабрана у сагласности са претходним резултатима добијеним након испитивања утицаја узорка отпадне воде на ћелијску токсичност рибљих континуалних ћелијских линија (*Hrubik* и *cap*, 2016b). Као супстрат коришћен је МСВ, јер су сви рекомбинантни ензими осетљивији према њему у односу на супстрат CDNB. Резултати су показали да је поларна фракција једина испољила статистички значајну инхибицију активности сва три ензима (Слика 5.31). Из тог разлога даља испитивања инхибиције ензимске активности су била усмерена искључиво на поларну фракцију узорка отпадне воде.



Слика 5.31. Инхибиторни потенцијал узорка отпадне воде на активност Gstr1, Gstt2 и Gstm3. Ензимска активност испитана је у присуству MCB (100 μ M) и GSH (1 mM) у одсуству (контрола) и присуству 8 mL WEQ/mL узорка отпадне воде. Приказане су средње вредности \pm SEM од 3–6 понављања из три независна експеримента. Резултати су анализирани *t*-тестом ($p < 0,05$).

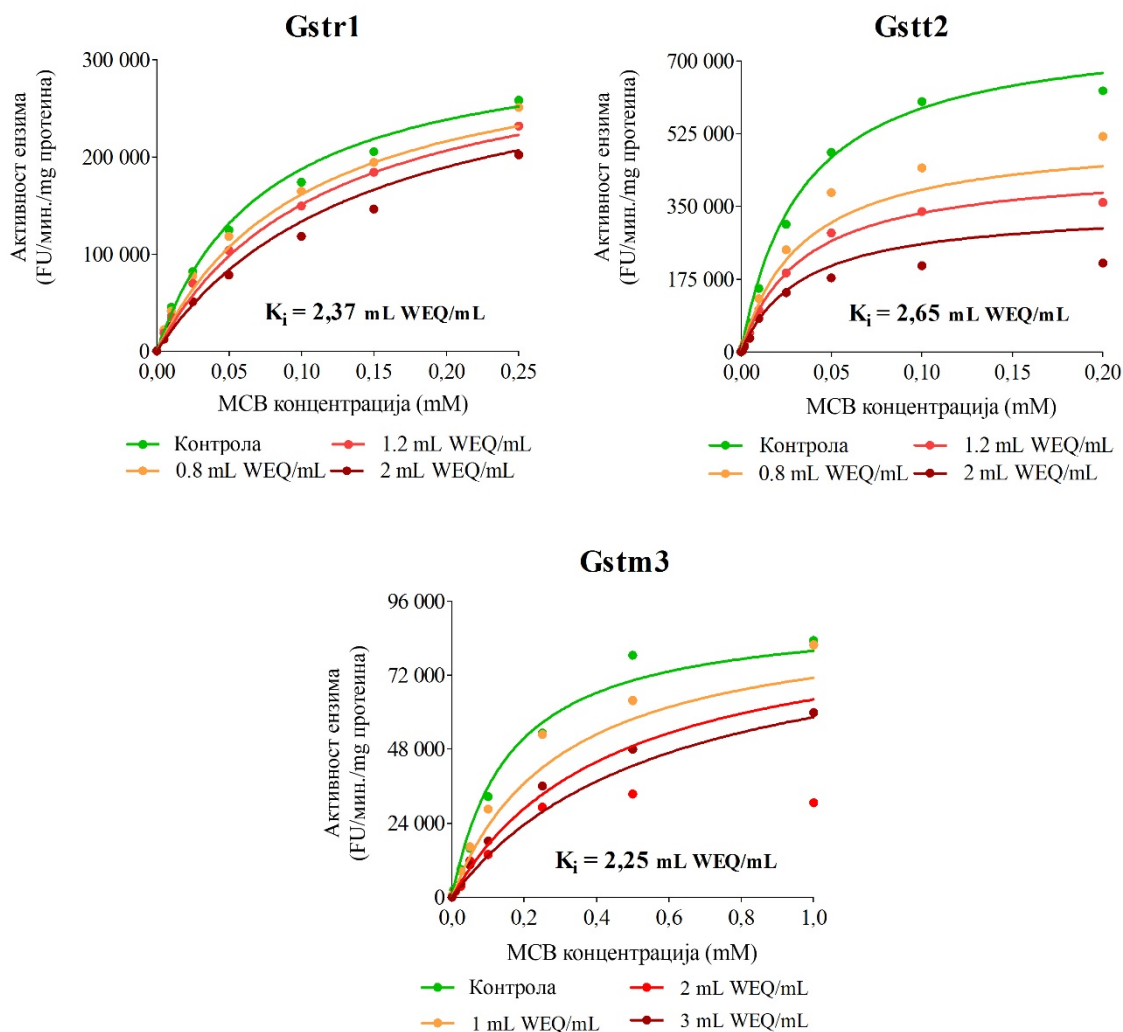
Прво је испитана активност ензима Gst у присуству различитих концентрација поларне фракције узорка отпадне воде и одређена концентрација која инхибише активност испитиваних рекомбинантних протеина Gst за 50%, (енгл. *Inhibitory Concentration*, IC₅₀) (слика 5.32).

Израчуната вредност за IC₅₀ за сва три рекомбинантна протеина је била слична: за Gstr1 2,11 mL WEQ/mL, за Gstt2 1,90 mL WEQ/mL, а за Gstm3 2,68 mL WEQ/mL.



Слика 5.32. Доза-зависност инхибиторног ефекта поларне фракције узорка отпадне воде на активност ензима Gstr1, Gstt2 и Gstm3 у присуству MCB (100 μ M) и GSH (1 mM). Приказане су средња вредност \pm SEM из минимум три независна експеримента.

Резултати показују да је поларна фракција узорка отпадне воде деловала је као конкуритивни инхибитор рекомбинантних протеина Gstr1 и Gstm3, док је неконкуритиван тип инхибиције испољила према рекомбинантном протеину Gstt2. Вредности K_i биле су слична за сва три рекомбинантна протеина, између 2–3 mL WEQ, и поклапале су се са вредностима за IC_{50} (Слика 5.33).



Слика 5.33. Конкуритивна инхибиција Gstr1 и Gstm3 и неконкуритивна инхибиција Gstt2 поларном фракцијом узорка отпадне воде. Ензимска активност испитана је у присуству MCB (0.05–1 mM) и GSH (1 mM) у одсуству (контрола) и присуству три концентрације поларне фракције узорка отпадне воде. Приказани су резултати репрезентативног мерења ензимске активности једног од три (за Gstt2 и Gstr1), односно два (Gstm3), независна експеримента чији су резултати коришћени за израчунавање K_i . Криве представљају резултат нелинеарне регресије.

6. ДИСКУСИЈА

Глутатион-S-трансферазе су битни чиниоци ћелијског детоксификацијског система, те се експримирање гена и/или активност њихових продуката често користи као биомаркер изложености ксенобиотицима. Већина студије о ензимима Gst фокусирана је искључиво на експримирање иРНК (*Timme-Laragy* и сар., 2013;) или мерење ензимске активности (*Best* и сар., 2002; *Otte* и сар., 2017; *Wiegand* и сар., 2000), док се само неколико студија бави мерењем кинетике специфичног пречишћеног рекомбинантног ензима Gst (*Doi* и сар., 2004; *Espinoza* и сар., 2013).

Имајући у виду претходно наведено, у оквиру ове докторске дисертације извршена је свеобухватна анализа гена *gst* у зебрици, важном кичмењачком модел организму. Користећи филогенетску анализу генома идентификовани су представници *GST/Gst* присутни у хордатима. Као резултат, у зебрицином геному аотирано је 27 гена *gst*, који су класификовани у 9 засебних класа (Табела 5.1). Потом је праћено експримирање двадесет гена свих породица осим митохондријске, класе *Kappa*, током ембрионалног развоја и у различитим ткивима адулта оба пола. Пречишћена су и функционално окарактерисана три рекомбинантна унутарћелијска ензима Gst, *Gstr1*, *Gstt2* и *Gstm3*. Испитан је инхибиторни потенцијал одабраних ендогених једињења, стероидних хормона, на активност *Gstr1*, ксенобиотика који припадају хемијски различитим групама емергентних супстанци присутних у воденим екосистемима на активност *Gstr1* и *Gstt2*, и композитног узорка отпадне воде као репрезентног узорка из животне средине на активност сва три рекомбинантна протеина.

6.1. Идентификација гена *gst* зебрице, конструкција филогенетског стабла ензимске суперпородице Gst

Резултати у оквиру ове дисертације који се односе на идентификацију гена и конструкцију филогенетског стабла представљају прву свеобухватну анализу ензимске суперпородице Gst зебрица. Ортолошки односи са хуманим генима *GST* додатно су испитани анализом очуване синтеније (Слика 5.5). Овакав приступ омогућава нови поглед на еволуцију ензима Gst код кошљориба и других хордата.

Идентификована су три различита гена класе *Alpha* присутне код зебрице, локализовани у оквиру кластера на хромозому 13. Слично као што је показано код сисара, а узимајући у обзир хромозомску локализацију и високу идентичност њихових аминокиселинских ланаца (ПРИЛОГ 4), чланови зебричине класе *Alpha* су највероватније резултат генске дупликације (*Fotouhi-Ardakani* и сар., 2000; *Suzuki* и сар., 1993). Резултати показују да су *Alpha* кластер зебрице и човека међусобно у синтенији (Слика 5.5А).

Кластер чланова класе *Mu* локализован је на 8. хромозому, што је показано и у оквиру истраживања *Timme-Laragy* и сарадници (2013). Gst чланови ове унутарћелијске класе испољавају високу (54–83%) идентичност аминокиселинских низова кроз рибе врсте (*Blanchette* и сар., 2007). Резултати показују да три гена *gstm* у геному зебрице кодирају структурно сличне ензиме (91–93% аминокиселинске идентичности) (ПРИЛОГ 4). Такође је показано да су *Mu* кластер зебрице и човека међусобно у синтенији (Слика 5.5Б).

Два гена класе *Pi* код зебрице, *gstp1* и *gstp2*, су тандемски организовани у геному зебрице и њихови протеински продукти имају висок ниво идентичности аминокиселинског ланца (87%). Слично је показано и у раду *Suzuki* и сарадници (2005). Ови гени су у синтенији са јединственим хуманим ортологом, *GSTP1* (Слика 5.5В). Уочена разлика у броју гена класе *Pi* у геному зебрице и човека може се објаснити постојањем еволутивно значајне дупликације читавог генома означеном као кошљорибама-специфичном генском дупликацијом (енгл. *teleost-specific genome duplication*, TSD). Поред овог еволутивног догађаја могућа је и независна дупликација гена, чиме би се могао објаснити већи број гена *Pi* класе у геному зебрице (*Meyer* и *Schartl*, 1999).

Гени класе *Theta* су присутни у организмима од бактерија до сисара. Због свог посебног места у еволуцији суперпородице GST, класа *Theta* се сматра генским претком свих осталих класа (*Pemble* и сар., 1994). Резултати показују да су представници класе *Theta*, *gstt1a* и *gstt1b*, у синтенији са хуманим представником *GSTT1*, док је јасна ортологија показана у односу зебричног *gstt2* и хуманог *GSTT2* (Слика 5.5Б). Њихова геномска дисперзија показана је и у истраживању *Timme-Laragy* и сарадници (2013).

Геном зебрице садржи два гена који припадају класи *Omega*, *gsto1* и *gsto2* (Табела 5.1), што је слично и броју гена у хуманом геному (*Timme-Laragy* и сар., 2013; *Whitbread* и сар., 2005). Анализом очуване синтеније показано је да су ови гени у блиској ортолошкој вези (Слика 5.5А). Класа *Omega* је високо очувана у оквиру подтипа кичмењака, али са различитим бројем гена (*Whitbread* и сар., 2005).

Класа *Zeta*, са јединственим представником *gstz1*, присутна је у геномима свих анализираних кичмењачких врста (Табела 5.1) са очуваном синтенијом у односу на хумани геном (Слика 5.5Г). Добијени резултати потврђују показану филогенетску дистрибуцију класе *Zeta* у многим организмима (*Board* и сар., 1997). Висока ортолошка очуваност (енгл. *one-to-one*) указује на значајну физиолошку улогу ове класе у организмима кичмењака.

Rho је још једна класа у зебричном геному која садржи јединственог представника, *gstr1*. Ипак, ово није у сагласности са резултатима идентификације гена ове класе код других кошљориба, где је уочена велика диверзификација (3–5 гена) (Табела 5.1). *Konishi* и сар. (2005) су указали да је *Rho* еволутивно издвојена класа, што је филогенетском анализом у овој дисертацији и показано (Слика 5.4, ПРИЛОГ 3). Такође, уочава се да класа *Rho* није присутна код других кичмењака, али је идентификована у геному амфиоксуса. Ови резултати иду у прилог претпоставци да се појава ове класе у еволуцији гена десила пре раздвајања копљаша и риба (*Fan* и сар., 2007). Карактеризација класе *Rho* у другим воденим организмима би детаљније могла да објасни своју јединствену присутност код риба.

Резултати показују да су чланови класе *Kappa*, *gstk1–gstk4*, локализовани у оквиру кластера на хромозому 16 (Слика 5.5Д), што је у сагласности са литературним подацима (*Timme-Laragy* и сар., 2013). Анализом очуване синтеније показано је да су ови гени у блиској ортолошкој вези са јединим хуманим ортологом (Табела 5.2, Слика 5.5Д), *GSTK1* локализованом на хромозому 7 (за референце погледати *Morel* и *Aninat*, 2011).

МАРЕГ су високо очувани ензими присутни у геномима од бактеријских до сисарских врста (*Lee* и *Dejong*, 1999), што је у сагласности са резултатима који су приказани у овој дисертацији (Табела 5.1, Слика 5.4, ПРИЛОГ 3).

Резултати филогенетске анализе су показали одсуство класе *Sigma* у геномима кошљориба. Гени класе *Sigma* су присутни у врстама од инсеката до сисара, са доминантним присуством код бескичмењака (*Ji* и сар., 1995). Код сисара најчешће имају важну улогу као простагландин *D2* синтаза (*Flanagan* и *Smythe*, 2011). Међутим, одсуство у кошљорибама се може објаснити функционалном супституцијом са неком другом класом *Gst*.

Као што је већ наведено, кошљорибе су, у поређењу са другим кичмењачким врстама, прошле кроз дупликацију читавог генома (TSD), због чега често имају копије гена (паралоге) ортолога присутних код сисарских врста. Гени се такође могу тандемски дуплирати унутар малог региона чиме се повећава генска присутност, али и еволуција специфичности према супстратима. На овај начин може настати потпуно нова или уже специфична функција продукта дуплираног гена (*Postlethwait* и сар., 2004). У овој дисертацији је показано постојање паралога у оквиру различитих класа гена *gst*, што указује на њихову субфункционализацију, која може да се огледа у ткивно и/или временски зависном експримирању, као и самој функцији коју обављају. Детаљна функционална карактеризација тандемски дуплираних гена *gst* зебрице представља предмет будућих истраживања.

6.2. Анализа развојне дистрибуције иРНК идентификованих гена код ембриона и ларви зебрица

У оквиру ове дисертације вршено је испитивање дистрибуције иРНК идентификованих гена *gst* у развојним стадијумима ембриона и ларви зебрице у циљу добијања обрасца базалног експримирања чланова суперпородице *gst*, посебно оних за које се претпоставља да учествују у процесу биотранформације ксенобитика у ембрионима зебрица. Важно је напоменути да су резултати експримирања добијени из јединственог узорка више ембриона и према томе не могу да дају информацију о биолошкој варијабилности дистрибуције иРНК која постоји између ембриона.

Пре активације свог генома ембрион потпуно зависи од ускладиштених генских продуката мајке. Показано је да мајчинска иРНК покреће ћелијске процесе током 3 hpf (*Tadros и Lipshitz, 2009*). Резултати анализе развојне дистрибуције иРНК указују на присуство ускладиштених продуката мајке већине гена *gst* у првих 4 hpf развоја. Сличне резултате показали су *Timme-Laragy* и сарадници (2013), док су на протеинском нивоу потврду повећаног експримирања класа *Alpha, Mu, Pi* и *Rho* у првих 4 hpf дали *Tierbach* и сарадници (2018). Осим тога, показана је и јасна ензимска активност *Gst* у првих 4 hpf зебрица (*Otte и сар., 2017; Wiegand и сар., 2000*). То значи да су поред ученог присуства ензими *Gst* и функционално активни већ у првим часовима ембриогенезе катализујући конјугацију GSH са ксенобиотцима и/или вршећи одређену физиолошку улогу.

Добијени резултати показују да ембриони зебрица експримирају све гене *gst* чије је експримирање присутно у адултима. Такође, учено је повећано експримирање чланова класа *Alpha, Mu, Pi, Rho* и неколико чланова микрозомалне (*Mgst*) породице у ембрионима/ларви зебрица. Већина иРНК гена *gst* је присутна 72 hpf што је најчешће праћено континуираним повећањем експримирања након тога. Слични резултати су показани у истраживањима *Timme-Laragy* и сарадници (2013), где је методом ДНК чипа идентификован пун сет гена *gst* експримираних у ембрионима зебрица. На протеинском нивоу потврду овим налазима дали су *Tierbach* и сарадници (2018) методом праћења вишеструких реакција (енгл. *multiple reaction monitoring*). Такође, детектовано је и повећање ензимске активности унутарћелијских ензима *Gst* након 72 hpf (*Otte и сар., 2017; Wiegand и сар., 2000*). Током ране хумане ембриогенезе на протеинском нивоу детектовани су представници класа *Alpha, Mu* и *Pi* (*Raijmakers и сар., 2001*), што је у сагласности са добијеним резултатима ове дисертације. За разлику од хуманих, ембриони зебрица експримирају ген *gstr1*, за који је у оквиру ове дисертације показано да нема хуманог ортолога.

Експримирање токсиколошки значајне класе *Pi* (*gstp1-2*) је највеће и изузетно динамично током убрзаног ембрионалног и ларвеног развоја (Слика 5.7). Мајчинска иРНК *gstp1-2* се детектује на почетку ембриогенезе, након чега ембрионално експримирање ових гена остаје ниско до стадијума фарингуле (24 hpf), са минимумом експримирања на 12 hpf, као што је показано и у радовима *Timme-Laragy* и сарадници (2013) и *Abunnaja* и сарадници (2017). После 24 hpf почиње раст експримирања до максимума у ларвеном стадијуму (96 hpf), када наступа њен пад. На приказу топлотне мапе јасно се може запазити специфичан образац експримирања класе *Pi* током ембриогенезе зебрице у односу на остале гене (Слика 5.9). Описане флукуације су кључне за правилан развој организма. У радовима је представљен потенцијални механизам који контролише флукуације у експримирању класе *Pi* током почетних стадијума ембриогенезе. Наиме, показано је да *Erk* киназе супримирају експримирање чланова класе *Pi* у почетним стадијумима ембриогенезе, од половине стадијума бластуле до соматогенезе (3–24 hpf), јер је спољашња средина ембриона у том периоду претежно оксидована са ниским садржајем молекула GSH (*Timme-Laragy и сар., 2013*). Како развој напредује регулација експримирања гена *gstp1-2* постаје независна од *Erk* сигнализације, а *Nrf2* (енгл. *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*) преузима доминантну улогу, што је у сагласности са редукованим условима у којима се ембрион тада развија (*Hrubik и сар., 2016a*). *Tierbach* и

сарадници (2018) су показали да је *Gstp1* доминантан представник класе *Pi* у ембрионима зебрица. Као што је већ споменуто, присуство ове класе забележено је код сисара током ембрионалног и раног феталног развоја органа попут јетре, танког црева и бубрега (*Raijmakers* и сар., 2001). Због тога може се закључити да је токсиколошка и/или физиолошка улога чланова ензимске класе *Pi* очувана током развоја различитих кичмењачких врста укључујући зебрицу и човека.

Интеракција експримирања гена *gst* са променама редокс статуса упућује на битну заштиту организма од повећања аеробног метаболизма након што ембрион уђе у фазу динамичког раста карактерисану повећањем пролиферације ћелија (*Tierbach* и сар., 2018). Дефинисање улоге ензима *Gst* у различитим физиолошким процесима током развоја предмет је истраживања, па тако постоје литературни подаци везани за експримирање *Mgst1*, члана класе MAREG која је претежно локализована у регијама и ћелијама укљученим у процес хематопоезе (*Bräutigam* и сар., 2018).

У резултатима се може уочити образац експримирања специфичан за одређени паралог, као што се запажа у резултатима развојне дистрибуције иРНК *gstt1a/gstt1b* и *mgst3a/mgst3b* (Слике 5.7 и 5.9). Слична запажања наведена су у раду *Timme-Laragy* и сарадници (2013). Временски зависна дистрибуција дуплицираних гена током развоја (Слика 5.7) представља облик субфункционализације, што је претходно коришћено у сврху дефинисања улоге сисарских хомолога (*Chiang* и сар., 2001; *Postlethwait* и сар., 2004). Такође, детаљна поређења образаца дистрибуције *gst* током развоја могу да пруже увид у функције протеинских продуката хомологних гена код других кичмењака, укључујући људе.

На основу добијених резултата може се закључити да код ембриона зебрица активирање транскрипције изоформи *gst* током развоја обезбеђује одбрамбене механизме у циљу смањења токсичности ксенобиотика. Такође, уочене сличности у експримирању гена *gst/GST* током ембриогенезе зебрице и човека оправдавају употребу зебрица као модела у истраживањима биотрансформације ксенобиотика. Њиховом употребом у истраживањима избегава се дуготрајно и ткивно зависно испитивање транскрипционих одговора адултних риба на исте хемикалије.

6.3. Анализа ткивне и полне дистрибуције иРНК идентификованих гена *gst* код адултних организама зебрице

Дефинисање ткивне дистрибуције иРНК гена *gst* је од велике важности из више разлога. Првенствено уочавање недостатка појединачних представника *gst* у одређеном ткиву/органу говори о подложности тог органа оштећењу од стране електрофилних једињења. Такође, присуство појединих представника *gst* у ткивима/органима који представљају биолошке баријере (нпр. шкрге, црево) и/или учествују у процесима биотрансформације (нпр. јетра), указује на улогу ових ензима у механизмима одбране од ксенобиотика.

У оквиру ове докторске дисертације урађена је анализа ткивне и полне дистрибуције иРНК 20 гена *gst* присутних у геному адултних зебрица. Анализа није урађена за митохондријске гене (класа *Kappa*) и чланове класе MAREG који немају глутатион трансферазну активност (*ltc4s*, *flap* и *ptges*). Резултати указују на постојање ткивне и полне дистрибуције иРНК идентификованих гена *gst* у адултима зебрица. Већина гена *gst* је експримирана у свим испитиваним органима (јетра, бубрег, шкрге, црево, мозак, гонаде) оба пола зебрице, указујући на постојање механизма одбране од ксенобиотика у њима, као и могућу физиолошку улогу протеина *Gst* у појединим ткивима.

Највећа разлика у експримирању хуманих и зебричних чланова класе *Alpha* присутна је на нивоу јетре. Резултати показују ниско експримирање ових гена у јетри зебрица (Слике 5.11А и 5.12А), што је у супротности са високим експримирањем хуманих ортолога, *GSTA1* и *GSTA2*, у истом ткиву (*Suzuki* и сар., 1993). Разлика у резултатима ове дисертације и студије коју су спровели *Tierbach* и сарадници (2018) огледа се у присуству ензима класе *Alpha* у јетри зебрица, детектованих на протеинском нивоу. Постоје и истраживања која показују

највише експримирање гена класе *Alpha* у јетри других риба, попут мефугу (лат. *Takifugu obscurus*) (Kim и сар., 2010), рибе мрамор ривулус (*Lee* и сар., 2006) и шарана (лат. *Cyprinus carpio*) (*Fu* и *Xie*, 2006), док је ниско експримирање забележено у јетри тостолобика сивог (лат. *Aristichthys nobilis*) (*Li* и сар., 2010). Иако је у споменутих истраживањима показано високо експримирање, ипак се чланови класе *Alpha* не дефинишу као доминантни представници на нивоу јетре риба. Будућа истраживања би могла да буду усмерена на тачно дефинисање улоге изоформи класе *Alpha* у јетри зебрице. Доминантно експримирање у овом ткиву имају представници других класа, првенствено *Theta*, *Pi* и *MAPEG* (Kim и сар., 2010; Li и сар., 2010; Espinoza и сар., 2012). Ови подаци указују на разлике у функцијама сисарских и рибљих ензима GST/Gst у јетри. Резултати у оквиру ове дисертације показују да су гени класе *Alpha* високо експримирани у цревима, док су умерено експримирани у бубрезима и мозгу зебрице. Сличан образац експримирања је показан и у другим рибљим организмима као што су: тостолобик сиви (Li и сар., 2010), мефугу (Kim и сар., 2010) и мрамор ривулус (Lee и сар., 2006).

Представници класе *Mu* су високо експримирани у мозгу и гонадама зебрица (Слике 5.11А), што је у сагласности са експримирањем хуманих гена *GSTM1-3* и *GSTM5* (Eaton и Bammler, 1999). Такође, сличне резултати добијени су и праћењем експримирања класе *Mu* у ткивима других риба, тостолобик сиви и мефугу (Kim и сар., 2010; Li и сар., 2010). Показано је да хумани *GSTM2* и *GSTM3* у мозгу имају улогу у изомеризацији простагландина *H2* (енгл. *Prostaglandine H2*, PGH2) као простагландин *E2* синтазе (енгл. *Prostaglandine E2*, PGE2) (Beuckmann и сар., 2000). Док је експримирање хуманих представника класе *Mu* у тестисима, у зависности од специфичности супстрата (Comstock и сар., 1994), повезано са заштитом од штетних једињења. Хумани *GSTM1* је веома високо експримиран у јетри (Takahashi и сар., 1993), а слични резултати су добијени и за гене класе *Mu* у риби мефугу (Kim и сар., 2010). Ипак, као што је показано експримирање ових гена у јетри зебрица је ниско, што је у сагласности са претходним истраживањима вршеним на рибљим врстама, тостолобику сивом и сребрном лососу (Li и сар., 2010; Espinoza и сар., 2012). Резултати указују на неравномерну ткивно и полно зависну заступљеност представника класе *Mu* у зебрици.

Класа *Pi* је свеprisутно високо експримирана у организму зебрице (Слике 5.11Б и 5.12), што је у сагласности са експресионим обрасцем уоченим код других шаранских врста, тостолобика сивог (Li и сар., 2010), али и хуманог ортолога *GSTP1* (Eaton и Bammler, 1999). Резултати Glisic и сарадници (2015) указују да је експримирање гена *gstp1* доминантно у односу на *gstp2* у свим анализираним ткивима оба пола зебрице, док резултати Hrubik и сарадници (2016а) то потврђују на нивоу ембриона зебрице. Разлике у експримирању ова два гена пресликавају се и на нивоу протеина, *Gstp1* је доминантан код зебрица у односу на *Gstp2*, што је показано у раду Tierbach и сарадника (2018). Високо експримирање овог гена у јетри, бубрезима, шкргама и цревима указује на кључну улогу његовог протеинског продукта у метаболизму ксенобиотика. Поред тога, високо експримирање гена *gstp1-2* у ткивима која не учествују у биотрансформацији, гонаде и мозак (Слике 5.11Б и 5.12), указује на њихову потенцијалну улогу у физиолошким процесима путем некаталитичке активности. Оваква активност је раније уочена за ко-ортологе класе *Pi* у сисарским организмима (Castro-Caldas и сар., 2009; 2012; Keating и сар., 2010; Bhattacharya и Keating, 2012).

Представник класе *Theta*, *gstt1a*, је свеprisутно високо експримиран у организму зебрице, са веома високим експримирањем у јетри, бубрезима и тестисима и умереним експримирањем у мозгу, цревима, шкргама и јајницима (Слика 5.11Б). Овакав образац експримирања уочен је и за хуманог ортолога, *GSTT1* (Eaton и Bammler, 1999). Високо експримирање представника класе *Theta* забележено је и у јетри сребрног лосога (Espinoza и сар., 2012) и тостолобика сивог (Li и сар., 2010). Резултати указују на занемарљиво експримирање гена *gstt1b* у свим анализираним ткивима оба пола, док је свеprisутно експримирање умереног нивоа забележено за представника *gstt2* (Слика 5.11В). Сличан образац експримирања *Gstt2* уочен је у мишјем организму (Knight и сар., 2007), док је хумани ортолог *GSTT2* примарно експримиран у јетри (Sherratt и Hayes, 2002).

Високо експримирање *gsto2* је показано у јајницима и шкргама, потом бубрезима, цреву и мозгу женки, док је умерено експримирање забележено у бубрезима, цреву и мозгу мужјака (Слика 5.11Г). Сличан образац ткивне дистрибуције припадника класе *Omega* забележен је на протеинском нивоу у зебрици (*Tierbach* и сар., 2018). Треба напоменути да се образац ткивно зависне дистрибуције иРНК које припадају класи *Omega* код зебрица значајно разликује од хуманог. Наиме, литературни подаци говоре да је експримирање хуманог *GSTO1* високо у јетри, срцу, бубрезима и скелетним мишићима, док је хумани ген *GSTO2* преобладајуће експримиран у тестисима, а умерено у срцу и јетри (*Whitbread* и сар., 2005). Другачији образац експримирања зебричних и хуманих гена класе *Omega* указује на потенцијалну функционалну различитост њихових протеинских продуката.

Класа *Zeta*, са јединственим представником *gstz1*, присутна је у геномима свих анализираних кичмењачких врста са очуваном синтенијом у односу на хумани геном. Оваква филогенетска очуваност указује на значајну функцију коју ова класа има у физиологији кичмењака. Високо експримирање зебричног *gstz1* у јетри је слично експримирању његових ортолога у јетри мефугу (*Kim* и сар., 2010) и јувенилног сребрног лососа (*Espinoza* и сар., 2012), док је умерено до високо експримирање у јетри и бубрезима слично сисарским ортолозима човека и глодара (*Board* и сар., 1997; *Knight* и сар., 2007). Узимајући у обзир да ензим GSTZ1 учествује у биотрансформацији дихлорсирћетне киселине (енгл. *dichloroacetic acid*, DCA) (*Tong* и сар., 1998), честог загађивача пијаћих вода, као и његово високо експримирање у јетри и бубрезима, могло би се претпоставити да и зебричин *Gstz1* учествује у одбрани организма од појединих загађивача из водене средине.

Ткивно зависна дистрибуција иРНК *gstz1* показала је високо експримирање овог гена у бубрезима, мозгу, јетри и цревима, што је у сагласности са обрасцем експримирања добијеним у другим рибљим врстама, првенствено код тостолобика сивог (*Li* и сар., 2010). Уочена разлика у експримирању овог гена у јетри и гонадама зебрице (Слика 5.11Д), где је експримирање 5 пута веће код мужјака, указује на могућу полно зависну разлику у капацитету на нивоу метаболичких и/или детоксификацијских процеса.

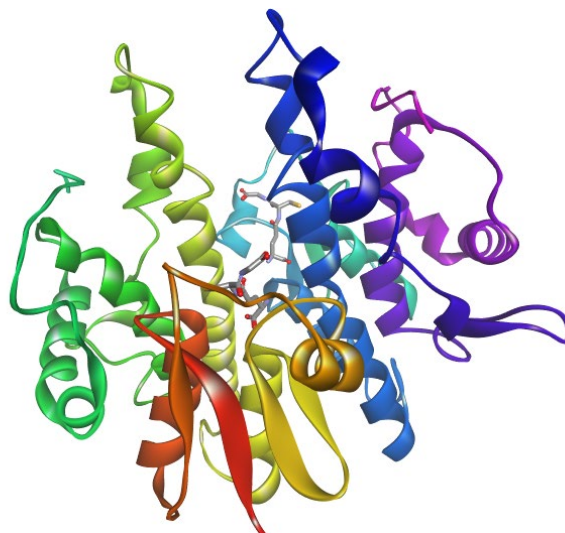
Резултати ткивно и полно зависне дистрибуције иРНК гена који припадају класи MAREG показују велике супротности. Зебричини гени *mgst1a*, *mgst1b* и *mgst2* су ниско експримирани (Слика 5.11Ђ и Е), док су *mgst3a* и *mgst3b* свеprisутно високо експримирани (Слика 5.11Ж). Слично томе, у литератури постоје подаци који говоре да је експримирање *Mgst3* код миша високо у цревима (*Knight* и сар., 2007), док је доминантно експримирање *mgst3* у јетри уочено код мефугу (*Kim* и сар., 2009). Због високог експримирања оба гена *mgst3* у јетри зебрице, слично као код сисарских ко-ортолога, може се претпоставити да ензими *Mgst3* имају битну улогу у биотрансформацији ксенобиотика.

Образац ткивне и полне дистрибуције иРНК гена *gst* зебрица даје нови увид у њихову значајност, која се огледа у различитим функцијама индивидуалних ензима *Gst* адултних зебрица. Уопштено посматрајући ткивно зависну дистрибуцију иРНК гена *gst* у адултним организмима зебрице може се закључити да су у јетри, као главном органу задуженом за процесе биотрансформације, доминантно експримирани *gstt1a*, *gstz1*, *mgst3a* и *mgst3b*, док нешто мање експримирање имају гени класе *Pi* и *Zeta*. У шкргама, органу који је директно изложен ксенобиотицима из водене средине, доминантно експримирање имају представници класе *Pi*, уз значајно експримирање гена *gsto2*, *gstz1*, *mgst3a* и *mgst3b*. У преосталим баријерним ткивима уочава се да доминантно експримирање у бубрезима има *gstz1*, а потом гени: *gstz1-2*, *gstt1a*, *mgst3a* и *mgst3b*, док су у цревима доминантно експримирани гени *gstz1* и *mgst3a*, уз високо експримирање гена *gstz1-2* и *mgst3b*. Дакле, анализа ткивно зависног експримирања гена *gst* у адултима зебрице је показала да су представници класа *Pi*, *Theta*, *Zeta*, *Rho* и *Mgst* значајни у процесима биотрансформације ксенобиотика, што се темељи на њиховом високом експримирању у баријерним ткивима/органима.

6.4. Функционална карактеризација одабраних рекомбинантних протеина Gst зебрице

Да би се тачније дефинисале улоге коју ензими Gst имају у биотрансформацији ксенобиотика и/или физиолошким процесима потребно је поред формулисања образаца дистрибуције њихових иРНК према ткивима, полу, и развојним стадијумима, извршити и функционалну карактеризацију, првенствено одређивањем параметара каталитичке реакције коју врше и испитивањем интеракције са потенцијалним ксенобиотцима и одређеним једињењима присутним у организму. У оквиру ове докторске дисертације пречишћена су и функционално окарактерисана три рекомбинантна унутарћелијска ензима Gst зебрице, Gstr1, Gstt2 и Gstm3. Тако је Gstr1 одабран као високо експримирана изоформа класе *Rho* која је, као што је показано, карактеристична за рибе (кошљорибе), *gstt2* као најчешће умерено експримиран ген у свим испитиваним ткивима, док је *gstm3* одабран као представник класе *Mu*. Односно, одабрани су на основу њихове потенцијалне физиолошке и/или екотоксиколошке значајности. Показано је да сва три анализирана унутарћелијска рекомбинантна протеина зебрице катализују конјугацију GSH трипептида са моделним супстратима: CDNB и MCB, али са различитом каталитичком ефикасношћу (Табела 5.7).

Функционално Gstr1 је показао високе афинитете (ниске K_m) за моделне супstrate CDNB и MCB, и ко-супстрат GSH (Табела 5.5, Табела 5.6). Афинитет и специфична ензимска активност ензима Gstr1 зебрице према CDNB (Табела 5.5) су веома слични са кинетиком CDNB ортолога класе *Rho* код других организама: греча ($K_m = 0,59$ mM; $V_{max} = 7,9$ μ M/мин/mg протеина) (Konishi и сар., 2005) и амфиоксуса ($V_{max} = 3,4$ μ M/мин./mg протеина) (Fan и сар., 2007), док је представник класе *Rho* код сребрног лососа исказао далеко већу ензимску активност ($V_{max} = 30$ μ M/мин./mg протеина) (Espinoza и сар., 2013) у односу на приказане резултате код зебрице. У раду Ваџица и сарадници (2019) приказан је модел ензима Gstr1 зебрице са молекуларним усидравањем (енгл. *molecular docking*) (Слика 6.1) да би се добио увид у структурне карактеристике овог ензима и објаснио механизам интеракције са GSH, као и различитим супстратима и/или инхибиторима. С обзиром да су аминокиселински остаци који чине везно место глутатиона (**G** место) и везно место хидрофобног супстрата (**H** место) у великој мери очувани код ензима Gst/GST, поређењем различитих секвенци они су идентификовани. За **G место** то су: Y8, W9, S13, P15, K40, E42, H43, E47, K49, Q56, L57, E69 и S70; док су за **H место** то: T11, P14, C16, E107, Q111, K112, Y114, E115, V116, F118, P124, G219 и E220 (ПРИЛОГ 7). *In silico* анализом сруктуре Gstr1 и места везивања утврђено је да је GSH у непосредној близини аминокиселина: **S13, P15, H43, Q56, L57, E69** и **S70** (Ваџица и сар., 2019).



Слика 6.1. Финална 3D структура ензима Gstr1 зебрице са усидреним GSH у месту G сваког мономера (Ваšica и сар., 2019).

На основу високих афинитета за моделне супstrate (Табела 5.5) уз свеprisутно високо експримирање у ткивима зебрице (Слика 5.11Д) може се претпоставити да ензим Gstr1 учествује у трансформацији одређених ксенобиотика и да има одређену улогу у метаболизму ендогених супстрата (видети касније).

Резултати функционалне карактеризације рекомбинантног протеина Gstt2 су показали да он конјугује оба моделна супстрата, CDNB и MCB, са ко-супстратом GSH. Ипак, добијена вредност K_m за CDNB је 3,2 mM, док је за MCB 100 пута нижа и износи 30 μ M. Ови резултати упућују на далеко нижи афинитет рекомбинантног протеина Gstt2 према супстрату CDNB. Интересантно је да се афинитет за CDNB значајно разликује између риблих (зебричних) представника класе *Theta*, Gstt2 (Табела 5.5) и Gstt1a (Glisic и сар., 2015), и сисарских ко-ортолога, јер *Theta* ензими код човека, миша и пацова не прихватају CDNB као супстрат (Sheehan и сар., 2001). Могуће објашњење лежи у великој варијабилности наставка на карбоксилном крају сисарских претставника класе *Theta*, а који је значајан за интеракцију са супстратима (Rossjohn и сар., 1998). Показано је да ензими класе *Theta* рибе мрамор ривулус имају већи афинитет за CDNB ($K_m = 0,71$ mM) (Lee и сар., 2006). Такође, већи афинитет према CDNB имају ензими класе *Theta* црне рибе ($K_m = 1,40$ mM) (Jayasinghe и сар., 2016). Уочени многоструко већи афинитет према MCB, односно вредност за K_m у микроларном опсегу у сагласности је са резултатима за Gstt1a ($K_m = 4$ μ M) (Glisic и сар., 2015). Поравнањем аминокиселинских секвенци хуманих ензима GSTT1 и GSTT2 и зебричних предстаника класе *Theta* (ПРИЛОГ 5Г), уочене су сличности у аминокиселинским остацима које су путем молекуларног усидравања претходно показане као кључне за детоксификациону (дехалогенизациону) активност (R107 и W115) (Flanagan и сар., 1998). Уочена је и разлика у аминокиселинском остатку H176 (GSTT1), који је код зебричних представника класе *Theta*, али и хуманог GSTT2 супституисан са Q176. Може се уочити и очуваност места G (GSH везујућег) (посебно је значајан очуван аминокиселински остатак S11) (ПРИЛОГ 5Г) (Tan и сар., 1996). С обзиром на свеprisутно експримирање гена *gstt2* зебрице (Слика 5.11В), изузетно велик афинитет и каталитичку ефикасност према MCB (Табела 5.5, Табела 5.7) и поседовање аминокиселинских остатака кључних за одређену активност, могло би се претпоставити да Gstt2 учествује у метаболизму ксенобиотика, као и заштити од продуката липидне пероксидације, слично хуманом ко-ортологу GSTT2 (Tan и Board, 1996).

Према добијеним резултатима, вредност за K_m зебричног ензима Gstm3 према супстрату CDNB износи 12,96 mM (Табела 5.5), што је 4,6 пута више од оне коју има хумани GSTM3, 20 пута више од K_m вредности коју има хумани GSTM1a и 12 пута више од ензима Gstm5

глодара према истом супстрату (Rowe и сар., 1998). Већа вредност K_m указује на нижи афинитет зебричног Gstm3 у поређењу са својим ко-ортолозима код човека и глодара. У односу на афинитет према CDNB, односно ко-супстрату GSH, зебричин ензим Gstm3 је сличнији свом хуманом ко-ортологу GSTM3 него GSTM1. У поређењу са структуром хуманог протеина GSTM1, представници класе *Mu* поседују препознатљиву „*Mu* петљу” ($^{35}\text{GEAPNYDKSC}^{44}$) (ПРИЛОГ 5Б), што резултира дубљим и затворенијим активним местом, док недостатак H108 аминокиселинског остатка указује на смањени афинитет према супстрату CDNB (Wu и Dong, 2012). Зебричини ензими класе *Mu* су сличнији хуманом GSTM2, односно GSTM3 зато што поседују аминокиселински остатак **R108**. Ове структурне карактеристике могу да објасне нижи афинитет (виша K_m) и мању каталитичку ефикасност рекомбинантног протеина Gstm3 зебрице према супстратима, у поређењу са афинитетима и каталитичком ефикасношћу рекомбинантних протеина Gstt2 и Gstr1 зебрице (Табела 5.5, Табела 5.7), али и хуманим GSTM1 и GSTM2, као најефикаснијим катализаторима супстрата CDNB (Comstock и сар., 1994).

Иницијална функционална карактеризација три унутарћелијска ензима, припадника засебних класа Gst, открила је њихове специфичне интеракције са моделним супстратима и ко-супстратом уз омогућавање поређења кинетичких особина са (ко)-ортолозима.

6.5. Инхибиторни потенцијал одабраних ендогених једињења и ксенобиотица

Ензими Gst представљају важан део ADME-Tox концепта, док се њихово експримирање и/или активност код акватичних организама често користи у екотоксиколошким истраживањима као биомаркер загађења животне средине. На основу добијених резултата и развијених методолошких приступа у оквиру ове дисертацији могуће је одредити специфичну физиолошку улогу индивидуалних ензима Gst, као и њихове потенцијалне интеракције са специфичним загађивачима из спољашње средине. У оквиру ове докторске дисертације испитан је инхибиторни потенцијал одабраних ендогених једињења и ксенобиотица на активност рекомбинантних протеина Gstr1 и Gstt2. Урађена је детаљна функционална карактеризација представника рибама (кошљорибама) специфичне класе *Rho*, Gstr1, као ензима који је високо експримиран у токсиколошки релевантним ткивима и који поседује највећи афинитет ка моделном супстрату МСВ. Добијени резултати указују да је инхибиторни потенцијал тестираних супстанци различит у погледу типа и јачине инхибиције коју испољавају према рекомбинантним протеинима Gstr1 и Gstt2 (Табела 5.9, Табела 5.10, Табела 5.11).

Имајући у виду да су ендокрини процеси, укључујући физиолошку улогу стероидних хормона, еволутивно веома очувани између зебрица и копнених кичмењака (Tokarz и сар., 2013), било је од значаја да се испита инхибиторни потенцијал стероидних хормона на активност ензима Gst. Испитана је активност рекомбинантног протеина Gstr1 у присуству 12 стероидних хормона. Добијени резултати су показали да четири хормона: прогестерон, прегненолон, дехидроепиандростерон-сулфат (DHEAS) и тестостерон компетитивно инхибирају активност рекомбинантног протеина Gstr1 са израчунатим вредностима K_i у опсегу 14–26 μM (Табела 5.9, Слика 5.21). Приступ *in silico* који обухвата дизајнирање модела протеина и лиганата путем истраживања тродимензионалне структуре и молекуларног усидравања, потврдио је осетљивост тестостерона на нуклеофилни напад GSH од стране протеина Gstr1 (Bašica и сар., 2019). Према томе, може се закључити да су стероидни хормони потенцијални физиолошки супстрати за зебричин ензим Gstr1.

Познато је да сисарски ензими GST имају способност везивања хормона, а нарочито полних, и да утичу на њихов транспорт, метаболизам и физиолошко дејство (Listowsky и сар., 1988). Претходно је показан и високи капацитет везивања стероида за поједине изоензиме GST (Eliasson и сар., 1999; Homma и сар., 1986). Тачније, тестостерон и прогестерон имају способност да се вежу за сисарске GST и то са умереним ($10^{-6} \text{ M} < K_d < 10^{-4} \text{ M}$), односно

високим ($K_d < 10^{-6}$ M) афинитетом (*Listowsky* и сар., 1988). Ови подаци су у складу са добијеним резултатима у оквиру ове дисертације. Студија *Remoué* и сарадника (2002) показала је специфично везивање тестостерона и ензима GST паразита *Schistosoma haematobium*, са вишим афинитетом везивања ($K_d = 5,7 \times 10^{-7}$ M). Такође, постоје подаци да унутарћелијска класа *Alpha* има улогу у GSH зависној изомеризацији двоструке везе делта (5)-андростене-3,17-диона и делта (5)-прегнен-3,20-диона, прекурсора тестостерона и прогестерона (*Johansson* и *Mannervik*, 2001; *Tars* и сар., 2010). Доказане интеракције четири стероидна хормона и рекомбинантног протеина Gstr1 зебрица указују на могуће учешће Gstr1 у стероидогенези, метаболизму и/или физиолошком деловању ових андрогена. Насупрот томе, ниједан од тестираних естрогених хормона није показао активност према оба рекомбинантна протеина, Gstr1 и Gstt2 (Слика 5.21 и 5.27), а активност Gstt2 није била инхибирана ни у присуству тестостерона (Слика 5.27). Као што је ткивно зависна анализа дистрибуције иРНК показала, експримирање гена *gstr1* у јајнику је 5 пута, а *gstt2* гена 10 пута мања него у тестисима (Слика 5.11Д и Слика 5.11В), што би се могло објаснити одсуством интеракција између ових ензима и естрогених хормона.

Познато је да ензими GST имају способност везивања глукокортикоидних хормона чиме могу да утичу на њихов транспорт, метаболизам и системско деловање (*Homma* и *Listowsky*, 1985). Добијени резултати показују да кортикостерон компетитивно инхибира активност зебричног протеина Gstr1 са израчунавом вредности K_i од 20,5 μ M (Табела 5.9, Слика 5.22). Резултат молекуларног усидравања кортикостерона, као идентификованог супстрата за Gstr1, потврђује његову осетљивост према нуклеофилном нападу ко-супстрата GSH од стране протеина Gstr1 (Вашица и сар., 2019). У тој анализи је показано да кортикостерон формира хидрофобну интеракцију алкилног типа са Val116, аминокиселином која учествује у формирању места Н, али из мономера В. Тиме се наглашава важност коришћења димерних структурних модела протеина Gst у студијама везивања. Иако је показано да кортикостерон није присутан код кошљориба (*Balm* и сар., 1989), његова структура је веома слична кортизолу, уз недостатак 17 α -хидроксилне групе. Такође је познато да кортикостерон може да се веже и активира глукокортикоидни рецептор кошљориба (*Mommsen* и сар., 1999). Као што се наводи у резултатима анализе ткивне и полне дистрибуције иРНК, Gstr1 је веома високо експримиран у мозгу оба пола зебрица (Слика 5.11Д, Слика 5.12Д). Занимљив је податак да је у мозгу пацова забележен пад активности GST изазван кортикостероном који може снажно да промовише неуродегенерацију (*Zafir* и *Banu*, 2009). Насупрот показаној инхибицији кортикостероном, кортизол који је главни хормон стреса у зебрицама, и делује као глукокортикоид, али и као минералокортикоид (*Tokarz* и сар., 2013), не доводи до инхибиције ензимске активности Gstr1 (Слика 5.21).

Једна од две основне жучне соли у многим врстама зракоперки (енгл. *ray-finned fish*, лат. *Actinopterygii*) је таурохенодеоксихолна киселина, док су зебрице једини представници кошљориба који првенствено синтетишу 5 α (*trans* А/В прстен) жучне киселине (*Hagey* и сар., 2010). Добијени резултати показују да је TCDC компетитивни инхибитор, односно вероватни физиолошки супстрат зебричног ензима Gstr1 (Табела 5.9, Слика 5.22) са израчунавом вредности K_i од 33 μ M. Према овим резултатима, могло би се претпоставити да Gstr1 утиче на физиолошку улогу TCDC у зебрицама.

Међу тестираним индустријским хемикалијама (Слика 5.23) само је трибутилтин хлорид, органометал које се користио као антикорозивно средство, исказао веома јаку некомпетитивну инхибицију активности Gstr1 са израчунавом вредности K_i од 0,26 μ M (Табела 5.10, Слика 5.24). Резултати молекуларног усидравања потврђују да трибутилтин хлорид има карактер реверзибилног инхибитора Gstr1 зебрице (Вашица и сар., 2019). Такође, у раду *Mihaljević* и сарадници (2020) је показано да и друга органотинска једињења испољавају снажну инхибицију рекомбинантног протеина Gstr1, некомпетитивног или компетитивног карактера, са вредности K_i у наномоларним границама (*Mihaljević* и сар. 2020). Добијени резултати су у сагласности са резултатима претходних истраживања инхибиторног ефекта трибутилтина на

активност Gst у рибама. *George* и *Buchanan* (1990) су показали веома висок потенцијал органотинских једињења (трибутилтин, трифенилтин) да *in vitro* инхибирају активност унутарћелијских ензима Gst рибе иверак. Такође, забележено је да органотини, укључујући и сам трибутилтин, инхибирају активност ензима Gst у рибама (*Al-Ghais* и *Ali*, 1999; *Padrós* и сар., 2003; *Wu* и сар., 2007) и претпоставља се да се органотин-GSH комплекси вежу за прво и друго каталитичко место димерних ензима GST. Насупрот томе, показало се да је дуготрајна изложеност сублеталним концентрацијама трибутилтина, израчунатих вредности K_i у сличном опсегу са онима добијеним у резултатима дисертације, узроковала стрес и појаву слободних радикала у јетри шарана уз значајно индуковање активности ензима Gst (*Li* и сар., 2015). Такође, *Wang* и сарадници (2006) су показали да је активност ензима Gst у јетри морске рибе *Sebastes marmoratus* (енгл. *Sea ruffe*) повећана после изложености ниским дозама трибутилтина, док је супротан ефекат забележен након излагања високим дозама. Истраживања на пацовима су потврдила да трибутилтин индукује оксидативни стрес инхибирајући активност GST, која води ка апоптози (*Ishihara* и сар., 2012; *Mitra* и сар., 2013). Инхибиција активности GST води ка повећању липидне пероксидације јер су његови супстрати унутар ћелија хидроперокси и 4-хидроксиалкени. Уопштено, инхибиција активности GST трибутилтином редукује капацитет ћелија да детоксикује друга једињења, чиме се повећава њихова осетљивост на оксидативни стрес. Супротан резултат је забележен при испитивању инхибиторног потенцијала трибутилтин хлорида према рекомбинантном протеину Gstt2 (Слика 5.27). Изостанак инхибиције је потенцијално могућ услед другачије примарне структуре овог протеина у односу на ензим Gstr1 зебрице (ПРИЛОГ 8), што би се могло тачније утврдити будућом анализом молекуларног усидравања трибутилтин хлорида и представника класе *Theta* зебрице. Такође је показано да су само два органотинска једињења од 10 тестираних испољили инхибиторно дејство на рекомбинантни протеин зебрице Gstt1 (*Mihaljević* и сар. 2020). Како су све тестиране индустријске хемикалије исказале недовољно инхибиторно дејство на активност рекомбинантног протеина Gstt2 (Слика 5.27), урађена је анализа инхибиције коју показују ВРА и tBHQ (Табела 5.11, Слика 5.28 и Слика 5.29). Једињење tBHQ се као оксиданс додаје храни, а ВРА је састојак поликарбонатне пластике. Према добијеним резултатима tBHQ некомпетитивно слабо инхибира активност Gstt2 рекомбинантног протеина са израчунатом K_i вредности од 81,5 μM . Док је ВРА исказао слабу некомпетитивану (мешовиту) инхибицију ($\alpha = 2$), са израчунатом K_i вредности од 431 μM . Претходна истраживања су показала да tBHQ индукује транскрипцију различитих гена *gst*, укључујући представника класе *Theta* код рибе Нилска тилапија (*He* и сар., 2013).

У оквиру дисертације испитан је инхибиторни потенцијал групе пестицида и само су органофосфорни инсектициди (хлорпирифос-метил, диазинон и малатион) инхибисали активност Gstr1 у опсегу 49–66% у односу на контролу (Слика 5.23). Одсуство интеракција ензима Gstr1 са другим тестираним пестицидима је у складу са до сада објављеним подацима. Заправо, *Trute* и сарадници (2007) су показали да најзаступљеније изоформе Gst јетре сребрног лосоца, које припадају класама *Pi* и *Rho*, немају интеракције са пестицидима, укључујући атразин. Међутим, *Booth* и *O'Halloran* (2001) су открили да ензими Gst могу да катализују конјугацију глутатиона са ксенобиотицима, укључујући органофосфорне пестициде. Добијени резултати дисертације су показали да диазинон компетитивно инхибира активност рекомбинантног протеина Gstr1 са израчунатом вредности K_i од 27 μM (Табела 5.10, Слика 5.25). На основу резултата може се претпоставити да је диазинон могући супстрат Gstr1, односно да је ензим Gstr1 укључен у биотрансформацију диазинона. Диазинон-метаболишући ензим(и) Gst откривен је код свилене бубе (*Yamamoto* и *Yamada*, 2016), што додатно говори о укључивању ензима Gst у процес детоксификације диазинона. Друга студија је показала да изложеност диазинону индукује активност ензима Gst у јетри шарана, што представља резултат одбране ћелије/органа од токсичности диазинона (*Oruc*, 2011). Промене активности рекомбинантног протеина Gstr1 изазване различитим концентрацијама хлорпирифос-метила и малатиона нису откриле јасан и конзистентан тип инхибиције, односно није било могуће

израчунати њихове вредности K_i (ПРИЛОГ 9). Због тога природа интеракција ових пестицида са ензимом Gstr1 остаје нејасна. Претходне студије о ефекту хлорпирифоса на активност ензима Gst показале су статистички значајно смањење те активности у ларвама зебрица, шарана и код пацова (*Jin* и сар., 2015; *Xing* и сар., 2012; *Mansour* и *Mossa*, 2009). Занимљиво је да је код рибљих врста роху, (енгл. *Rohu*, лат. *Labeo rohita*) и бабушка (енгл. *Prussian carp*, лат. *Carassius auratus gibelio*), малатион изазвао временски и ткивно зависну промену активности Gst (*Thenmozhi* и сар., 2011; *Huculeci* и сар., 2008). Такође, повећање и смањење активности GST у различитим органима уочено је након излагања неонаталних пацова малатиону (*Timur* и сар., 2003). Уопштено, према добијеним резултатима и раније објављеним подацима може се закључити да Gstr1 потенцијално припада групи ензима способних да биотрансформишу органофосфорне инсектициде, штитећи на тај начин рибље организме од штетних загађивача животне средине.

Одређивањем ензимске активности у присуству лекова и производа за личну и кућну негу уочено је да једино лекови: еритромицин, метотрексат, рифампицин и тетрациклин различито интерагују са рекомбинантним протеином Gstr1 (Слика 5.23). Добијени резултати показују да је макроциклични антибиотик, рифампицин, слаб некомпетитивни реверзибилни инхибитор Gstr1 са израчунатом вредности K_i од 65 μM (Табела 5.10, Слика 5.26). Молекуларно усидравање потврдило је да је рифампицин реверзибилни некомпетитивни инхибитор зебричног ензима Gstr1 уз описивање начина везивања који доводи до инхибиције. Студије везивања указују да рифампицин заузима G-место ензима Gstr1, блокирајући тако приступ молекуле GSH (Ваџица и сар., 2019). Од тестираних лекова једино је рифампицин интераговао са рекомбинантним протеином Gstt2 (Слика 5.27). Он је такође исказао некомпетитивну инхибицију према рекомбинантном протеину Gstt2, где је израчуната вредност K_i била сличног опсега и износила је 55 μM (Табела 5.11, Слика 5.30). Будуће студије везивања рифампицина и зебричног ензима Gstt2 би детаљно објасниле начин инхибирања његове активности. Иако је неколико претходних студија показало да рифампицин индукује експримирање транскрипата *gst/GST* рибљих и хуманих хепатоцита (*Corcoran* и сар., 2012; *Rae* и сар., 2001), као и индукцију активности Gst пацова (*Adachi* и сар., 1985), нема других података о промени активности Gst код риба изазване овим леком. Насупрот томе, лекови: еритромицин, метотрексат и тетрациклин компетитивно инхибирају активност рекомбинантног протеина Gstr1 са израчунатим вредностима K_i у опсегу 17,5–36,5 μM (Табела 5.10, Слика 5.26). Компетитивни тип инхибиције сврстава ове лекове у потенцијалне супстрате, односно указује да Gstr1 зебрице учествује у процесу њихове биотрансформације. Постоје докази да еритромицин, макролидни антибиотик, инхибира активност Gst у јетри златног караша (енгл. *goldfish*, лат. *Carassius auratus*) и стопа те инхибиције се смањује у зависности од времена излагања и концентрације (*Liu* и сар., 2017). Од свих тестираних лекова, тетрациклин је исказао најснажнију компетитивну ($K_i = 17,5 \mu\text{M}$) инхибицију активности Gstr1 (Табела 5.10, Слика 5.26). Литературни подаци говоре да овај поликетидни антибиотик инхибира хумане рекомбинантне ензиме GSTP1-1 and GSTM3-3 са IC_{50} вредностима од 13 μM , односно 47 μM (*Mukanganyama* и сар., 2002).

6.6. Инхибиторни потенцијал узорка отпадних вода

Отпадне воде се у Новом Саду директно, без процеса претходног пречишћавања, ослобађају у Дунав. Према томе оне постају директни извор полутаната (*Hrubik* и сар., 2016b). У оквиру дисертације испитан је инхибиторни потенцијал једног узорка отпадне воде који је добијен композитним прикупљањем воде током 24 часа. С обзиром да у таквом узорку могу да буду присутне различите емергентне хемикалије, оправдано је употребљен као репрезентативни узорак из спољашње средине. Претходно су одговарајућим поступком изоловане фракције које су садржале смеше неполарних, средње-поларних и поларних једињења. Поларна фракција је једина испољила статистички значајну инхибицију активности

сва три ензима (Слика 5.31). Ови резултати су у сагласности са подацима *Hrubik* и сарадници (2016b) где је једино поларна фракција узорка нетретиране отпадне воде, који су прикупљени са истог места и у приближно истом временском периоду, исказала разне штетне ефекте. Ови ефекти су укључивали ембриотоксичност зебрица, ћелијску токсичност и промене активности Cyp1a1/CYP1A1 ензима рибљих и хуманих ћелијских линија. Уочена ембриотоксичност се односила на повећање морталитета и развојне абнормалности ембриона зебрица при концентрацији узорка од 8 mL WEQ/mL, док су остали ефекти изазвани већ при нижим концентрацијама од 4–6 mL WEQ/mL (*Hrubik* и сар., 2016b). Иако није у питању исти узорак отпадне воде, с обзиром на временску блискост узорковања, могло би се претпоставити да узорак који је испитан у оквиру ове дисертације има сличан хемијски садржај поларне фракције као узорак који су анализирали *Hrubik* и сарадници (2016b). Такође, резултати *Smital* и сарадници (2011) указују да је поларна фракција нетретираног узорка отпадне воде града Загребa имала највећу 7-етоксирезорифин-О-деетилазну (енгл. *EthoxyResoufin-O-Deethylase*, EROD) активност. Добијени резултати ове дисертације указују да тестирана поларна фракција узорка отпадне воде делује као компетитивни инхибитор активности рекомбинантних протеина Gstr1 и Gstm3, а као некомпетитивни инхибитор активности протеина Gstt2. Вредност K_i била је слична за сва три рекомбинантна протеина у опсегу 2–3 mL WEQ (Слика 5.33), иако се афинитет за моделне супstrate и каталитичка ефикасност ова три протеина значајно разликују. Одређена вредност K_i је мања од концентрације која изазива промене детектоване у есејима у раду *Hrubik* и сарадници (2016b). Компетитивни тип инхибиције указује да биолошки активна једињења, доминантно присутна у поларној фракцији узорка отпадне воде, имају карактер супстрата, односно да ензими Gstr1 и Gstm3 потенцијално учествују у њиховој биотрансформацији, при чему је улога Gstr1 значајнија имајући у виду његову високу експримираност у свим екотоксиколошки релеватним ткивима. Насупрот томе, показана некомпетитивна инхибиција рекомбинантног протеина Gstt2 од стране једињења присутних у поларној фракцији указује да немају карактер могућих супстрата за овај ензим. Због природе подручја узорковања (Слика 2.9), које представља урбани испуст, сасвим је могуће да тестирана поларна фракција узорка отпадне воде садржи значајну количину лекова и/или производа за личну негу који могу да изазову инхибицију активности ензима Gst. Ова једињења су управо чести загађивачи отпадних вода (*Li*, 2014; *Smital* и сар., 2011). Треба нагласити да је одређена вредност K_i за сва три рекомбинантна протеина била мања од концентрације отпадне воде у поларној фракцији узорка која изазива промене детектоване у есејима у раду *Hrubik* и сарадници (2016b), што указује на већу осетљивост есеја Gst.

7. ЗАКЉУЧЦИ

На основу добијених резултата истраживања и дискусије у светлу доступне литературе могу се извести следећи закључци:

- ✓ Филогенетска анализа је открила велику разноврсност гена *gst* код риба, са укупно 27 чланова у геному рибе зебрице, подељених у 9 засебних класа: *Alpha* (*gsta1*, *gsta2*, *gsta3*), *Mu* (*gstm1*, *gstm2*, *gstm3*), *Pi* (*gstp1*, *gstp2*), *Omega* (*gstol1*, *gstol2*), *Theta* (*gstt1a*, *gstt1b*, *gstt2*), *Zeta* (*gstz1*), *Rho* (*gstr1*), *Kappa* (*gstk1*, *gstk2*, *gstk3*, *gstk4*), MAPEG (*mgst1a*, *mgst1b*, *mgst2*, *mgst3a*, *mgst3b*, *lrc4s*, *flap*, *ptges*).
- ✓ Анализа очуване синтеније решила је ортолошки однос идентификованих гена са хуманим генима, што је дало нови поглед на еволуцију ових гена код кошљориба и других хордата.
- ✓ Образац развојне, ткивне и полне дистрибуције иРНК идентификованих гена *gst* рибе зебрице пружио је увид у специфичности изоформи *Gst*, што даље имплицира њихове различите улоге у организму зебрице.
- ✓ Високо експримирање представника класа *Pi*, *Theta* (*Gstt1a*), *Zeta* (*Gstz1*) и *Rho* (*Gstr1*) у екотоксиколошки важним ткивима зебрица и њихова функционална сличност са хуманим ортолозима, указује на значај ових ензима у процесима биотрансформације ксенобиотика. Такође, резултати указују да чланови класа *Alpha*, *Pi*, *Theta*, *Zeta* и *Rho* потенцијално могу имати кључну улогу у одређеним физиолошким процесима.
- ✓ Иницијална функционална карактеризација три унутарћелијска ензима *Gst* зебрице, *Gstr1*, *Gstt2* и *Gstm3*, открила је њихове специфичне интеракције са моделним супстратима и омогућила поређење кинетичких својстава ензимске реакције са хуманим и/или рибљим ортолозима.
- ✓ Функционална карактеризација ензима *Gstr1*, јединог представника класе *Rho* у риби зебрици, је показала да су прегненолон, прогестерон, DHEAS и тестостерон физиолошки супстрати овог ензима, односно да би *Gstr1* могао да има одређену улогу у стероидогенези, метаболизму и/или физиолошкој активности андрогена код риба, на супрот изостанку овакве функције према естрогенима.
- ✓ Трибутилтин хлорид се показао као најпотентнији инхибитор активности *Gstr1* са константом инхибиције у наномоларном опсегу.
- ✓ Компетитивна инхибиција *Gstr1* од стране диазинона, еритромицина, метотрексата и тетрациклина указује да овај ензим има значајну улогу у биотрансформацији ксенобиотика и заштити риба од штетних загађивача из спољашње средине, као што су одређени органофосфорни инсектициди и лекови.
- ✓ Једињења присутна у поларној фракцији узорка отпадне воде инхибирају активност *Gstr1*, *Gstt2* и *Gstm3* ензима рибе зебрице са сличном K_i вредношћу, при чему је тип реверзибилне инхибиције различит за *Gstt2* у односу на остала два рекомбинантна протеина.
- ✓ Инхибиторни потенцијал испитиваних емергентних супстанци и узорка отпадне воде према рекомбинантним протеинима *Gst*, указује да би оптимизовани есеј са мерење активности *Gst* могао да буде осетљив тест за процену токсичности отпадних вода.

8. *ЛИТЕРАТУРА*

- Abunnaja, M.S., Kurogi, K., Mohammed, Y.I., Sakakibara, Y., Suiko, M., Hassoun, E.A., Liu, M.C., 2017. Identification and characterization of the zebrafish glutathione S-transferase Pi-1. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 31. <https://doi.org/10.1002/jbt.21948>
- Adachi, Y., Nanno, T., Yamashita, M., Ueshima, S., Yamamoto, T., 1985. Induction of rat liver bilirubin-conjugating enzymes and glutathione s-transferase by rifampicin. *Gastroenterol. Jpn.* 20, 104–110.
- Adler, V., Yin, Z., Fuchs, S.Y., Benezra, M., Rosario, L., Pincus, M.J., Sardana, M., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Davis, R.J., Ronai, Z., 1999. Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J.* 18, 1321–1334. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.5.1321>
- Al-Ghais, S.M., Ali, B., 1999. Inhibition of glutathione S-transferase catalyzed xenobiotic detoxication by organotin compounds in tropical marine fish tissues. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 207–213. <https://doi.org/10.1007/s001289900861>
- Allocati, N., Federici, L., Masulli, M., Di Ilio, C., 2009. Glutathione transferases in bacteria. *FEBS J.* 276, 58–75. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06743.x>
- Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., Federici, L., 2018. Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis.* <https://doi.org/10.1038/s41389-017-0025-3>
- Anisimova, M., Gascuel, O., 2006. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst. Biol.* 55, 539–52. <https://doi.org/10.1080/10635150600755453>
- Armstrong, R.N., 1998. Mechanistic imperatives for the evolution of glutathione transferases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 618–623. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(98\)80093-8](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(98)80093-8)
- Armstrong, R.N., 1997. Structure, Catalytic Mechanism, and Evolution of the Glutathione Transferases. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 2–18.
- Balm, P.H.M., Lambert, J.D.G., Wendelaar Bonga, S.E., 1989. Corticosteroid biosynthesis in the interrenal cells of the teleost fish, *Oreochromis mossambicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 76, 53–62. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(89\)90032-4](https://doi.org/10.1016/0016-6480(89)90032-4)
- Bard, D.S., n.d. Ecotoxicology [WWW Document]. *Environ. Toxicol. Res. Interes. Exp.* URL <http://www.ecotoxicology.ca/Projects/projects.html>
- Bašica, B., Mihaljević, I., Maraković, N., Kovačević, R., Smital, T., 2019. Molecular characterization of zebrafish Gstr1, the only member of teleost-specific glutathione S-transferase class. *Aquat. Toxicol.* 208, 196–207. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.01.005>
- Berhane, K., Widersten, M., Engström, A., Kozarich, J.W., Mannervik, B., 1994. Detoxication of base propenals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 1480–4. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.91.4.1480>
- Best, J.H., Pflugmacher, S., Wiegand, C., Eddy, F.B., Metcalf, J.S., Codd, G.A., 2002. Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and of microcystin-LR, on glutathione S-transferase activities in zebra fish (*Danio rerio*) 4 5 X (0 2) 0 0 0 1 0-3, *Aquatic Toxicology.*
- Beuckmann, C.T., Fujimori, K., Urade, Y., Hayaishi, O., 2000. Identification of mu-class glutathione transferases M2-2 and M3-3 as cytosolic prostaglandin E synthases in the human brain. *Neurochem. Res.* 25, 733–738. <https://doi.org/10.1023/A:1007579507804>
- Beutler, E., 1989. NUTRITIONAL AND METABOLIC ASPECTS OF GLUTATHIONE. *Annu. Rev. Nutr.* 9, 287–302. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1955.tb32092.x>
- Bhattacharya, P., Keating, A.F., 2012. Protective role for ovarian Glutathione S-transferase isoform pi during 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced ovotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 260, 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.02.014>
- Birnboim, H.C., 1983. A Rapid Alkaline Extraction Method for the Isolation of Plasmid DNA, *Methods in Enzymology.* Academic Press, Inc. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(83\)00059-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(83)00059-2)
- Blanchette, B., Feng, X., Singh, B.R., 2007. Marine glutathione S-transferases. *Mar. Biotechnol. (NY).* 9, 513–42. <https://doi.org/10.1007/s10126-007-9034-0>
- Board, P.G., Baker, R.T., Chelvanayagam, G., Jermin, 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., Coggan, M., Wilce, M.C.J., Parker, M.W., 1995. Evidence for an essential serine residue in the active site of the Theta class glutathione transferases. *Biochem. J.* 311, 247–250. <https://doi.org/10.1042/bj3110247>
- Booth, J., Boyland, E., Sims, P., 1961. An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. *Biochem. J.* 79, 516–524. <https://doi.org/10.1042/bj0790516>
- Booth, L.H., O'Halloran, K., 2001. A comparison of biomarker responses in the earthworm *Aporrectodea*

- caliginosa* to the organophosphorus insecticides diazinon and chlorpyrifos. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2494–2502. <https://doi.org/10.1002/etc.5620201115>
- Boyer, T.D., 1989. Special article the glutathione S-transferases: An update. *Hepatology* 9, 486–496. <https://doi.org/10.1002/hep.1840090324>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bräutigam, L., Zhang, J., Dreij, K., Spahiu, L., Holmgren, A., Abe, H., Tew, K.D., Townsend, D.M., Kelner, M.J., Morgenstern, R., Johansson, K., 2018. MGST1, a GSH transferase/peroxidase essential for development and hematopoietic stem cell differentiation. *Redox Biol.* 17, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.04.013>
- Castro-Caldas, M., Carvalho, A., Rodrigues, E., Henderson, C., Wolf, C., Gama, M., 2012. Glutathione S-Transferase pi Mediates MPTP-Induced c-Jun N-Terminal Kinase Activation in the Nigrostriatal Pathway. *Mol Neurobiol.* 45, 466–477. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8266-9>
- Castro-Caldas, M., Milagre, I., Rodrigues, E., Gama, M.J., 2009. Glutathione S-transferase pi regulates UV-induced JNK signaling in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurosci. Lett.* 451, 241–245. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.01.017>
- Chen, H., Juchau, M.R., 1998. Recombinant human glutathione S-transferases catalyze enzymic isomerization of 13-cis-retinoic acid to all-trans-retinoic acid in vitro. *Biochem. J.* 336, 223–226. <https://doi.org/10.1042/bj3360223>
- Chiang, E.F.L., Pai, C.I., Wyatt, M., Yan, Y.L., Postlethwait, J., Chung, B. chu, 2001. Two sox9 genes on duplicated zebrafish chromosomes: Expression of similar transcription activators in distinct sites. *Dev. Biol.* 231, 149–163. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.0129>
- Comstock, K.E., Widersten, M., Hao, X.Y., Henner, W.D., Mannervik, B., 1994. A Comparison of the Enzymatic and Physicochemical Properties of Human Glutathione Transferase M4-4 and Three Other Human Mu Class Enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 311, 487–495. <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1266>
- Copeland, R.A., 2005. Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery, *Journal of Chemical Information and Modeling*. A John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Corcoran, J., Lange, A., Winter, M.J., Tyler, C.R., 2012. Effects of Pharmaceuticals on the Expression of Genes Involved in Detoxification in a Carp Primary Hepatocyte Model. *Environ. Sci. Technol.* 46, 6306–6314.
- da Fonseca, R.R., Johnson, W.E., O'Brien, S.J., Vasconcelos, V., Antunes, A., 2010. Molecular evolution and the role of oxidative stress in the expansion and functional diversification of cytosolic glutathione transferases. *BMC Evol. Biol.* 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-281>
- Dagert, M., Ehrlich, S.D., 1979. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 6, 23–28. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(79\)90082-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(79)90082-9)
- De Luca, A. De, Hartinger, C.G., Dyson, P.J., Lo, M., Casini, A., 2013. A new target for gold (I) compounds: Glutathione-S-transferase inhibition by aurano fi n. *J. Inorg. Biochem.* 119, 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.08.006>
- de Oliveira, D.M., de Farias, M.T., Teles, A.L.B., Dos Santos Junior, M.C., de Cerqueira, M.D., Lima, R.M.F., El-Bachá, R.S., 2014. 8-Methoxypsoralen is a competitive inhibitor of glutathione S-transferase P1-1. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 308. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00308>
- de Souza Anselmo, C., Sardela, V.F., de Sousa, V.P., Pereira, H.M.G., 2018. Zebrafish (*Danio rerio*): A valuable tool for predicting the metabolism of xenobiotics in humans? *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 212, 34–46. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.06.005>
- DeLano, W.L., 2002. Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsl. Protein Crystallogr.* 40, 82–92. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03842-2>
- Dickinson, D.A., Forman, H.J., 2002. Glutathione in defense and signaling: Lessons from a small thiol, in: *Annals of the New York Academy of Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), pp. 488–504. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04690.x>
- Diekmann, H., Hill, A., 2013. ADMETox in zebrafish. *Drug Discov. Today Dis. Model.* 10, e31–e35. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2012.02.005>
- Dohnal, V., Wu, Q., Kuča, K., 2014. Metabolism of aflatoxins: Key enzymes and interindividual as well as interspecies differences. *Arch. Toxicol.* 88, 1635–1644. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1312-9>
- Doi, A.M., Pham, R.T., Hughes, E.M., Barber, D.S., Gallagher, E.P., 2004. Molecular cloning and

- characterization of a glutathione S-transferase from largemouth bass (*Micropterus salmoides*) liver that is involved in the detoxification of 4-hydroxynonenal. *Biochem. Pharmacol.* 67, 2129–2139. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.01.024>
- Dong, M., Zhu, L., Shao, B., Zhu, S., Wang, Jun, Xie, H., Wang, Jinhua, Wang, F., 2013. The effects of endosulfan on cytochrome P450 enzymes and glutathione S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*) livers. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 92, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.10.019>
- Donham, Rachel T, Morin, D., Jewell, W.T., Burns, S. a, Mitchell, A.E., Lamé, M.W., Segall, H.J., Tjeerdema, R.S., 2005a. Characterization of glutathione S-transferases in juvenile white sturgeon. *Aquat. Toxicol.* 71, 203–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.11.026>
- Donham, Rachel T., Morin, D., Jewell, W.T., Lamé, M.W., Segall, H.J., Tjeerdema, R.S., 2005b. Characterization of cytosolic glutathione S-transferases in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquat. Toxicol.* 73, 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.03.012>
- Eaton, D.L., Bammler, T.K., 1999. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol. Sci.* 49, 156–64. <https://doi.org/10.1093/toxsci/49.2.156>
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5, 113. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>
- EEC, 2010. DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. 33–79.
- EEC, 1986. Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.
- Eklund, B.I., Edalat, M., Stenberg, G., Mannervik, B., 2002. Screening for recombinant glutathione transferases active with monochlorobimane. *Anal. Biochem.* 309, 102–8.
- Eliasson, M., Stark, T., Depierre, J.W., 1999. Expression of glutathione transferase isoenzymes in the porcine ovary in relationship to follicular maturation and luteinization 117, 35–48.
- Ensembl genome browser 95 [WWW Document], n.d. URL www.ensembl.org/index.html
- Espinoza, H.M., Shireman, L.M., McClain, V., Atkins, W., Gallagher, E.P., 2013. Cloning, expression and analysis of the olfactory glutathione S-transferases in coho salmon. *Biochem. Pharmacol.* 85, 839–48. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.11.018>
- Espinoza, H.M., Williams, C.R., Gallagher, E.P., 2012. Effect of cadmium on glutathione S-transferase and metallothionein gene expression in coho salmon liver, gill and olfactory tissues. *Aquat. Toxicol.* 110–111, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.12.012>
- Fahey, R.C., 2001. Novel Thiols Of Prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001. 55, 333–356.
- Fan, C., Zhang, S., Liu, Z., Li, L., Luan, J., Saren, G., 2007. Identification and expression of a novel class of glutathione-S-transferase from amphioxus *Branchiostoma belcheri* with implications to the origin of vertebrate liver. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 450–61. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.09.013>
- Federici, L., Lo Sterzo, C., Pezzola, S., Di Matteo, A., Scaloni, F., Federici, G., Caccuri, A.M., 2009. Structural basis for the binding of the anticancer compound 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol to human glutathione S-transferases. *Cancer Res.* 69, 8025–8034. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1314>
- Fedulova, N., 2011. Alpha-class Glutathione Transferases from Pig: A Comparative Study. Uppsala University.
- Flanagan, J.U., Rossjohn, J., Parker, M.W., Board, P.G., Chelvanayagam, G., 1998. A homology model for the human theta-class glutathione transferase T1-1. *PROTEINS Struct. Funct. Genet.* 33, 444–454. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(19981115\)33:33.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(19981115)33:33.0.CO;2-8)
- Flanagan, J.U., Smythe, M.L., 2011. Sigma-class glutathione transferases. *Drug Metab. Rev.* 43, 194–214. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.560157>
- Fotouhi-Ardakani, N., Schecter, R., Batist, G., 2000. Evidence for Genomic Duplication of the Glutathione Transferase A3 Gene in Genus *Rattus*. *Mol. Biol. Evol.* 3, 331–335.
- Frear, D.S., Swanson, H.R., 1970. Biosynthesis of S-(4-ethylamino-6-isopropylamino- 2-s-triazino) glutathione: Partial purification and properties of a glutathione S-transferase from corn. *Phytochemistry* 9, 2123–2132. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85377-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85377-7)
- Frova, C., 2006. Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. *Biomol. Eng.* 23, 149–169. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2006.05.020>
- Fu, J., Xie, P., 2006. The acute effects of microcystin LR on the transcription of nine glutathione S-transferase genes in common carp *Cyprinus carpio* L. *Aquat. Toxicol.* 80, 261–266. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.09.003>

- Garcia, G.R., Noyes, P.D., Tanguay, R.L., 2016. Advancements in zebrafish applications for 21st century toxicology. *Pharmacol Ther* 161, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Gaté, L., Tew, K.D., 2001. Glutathione S-transferases as emerging therapeutic targets. *Expert Opin. Ther. Targets* 5, 477–489. <https://doi.org/10.1517/14728222.5.4.477>
- Genomicus, genomes in evolution [WWW Document], n.d. URL <http://www.genomicus.biologie.ens.fr/genomicus-95.01/cgi-bin/search.pl>
- George, S.G., Buchanan, G., 1990. Isolation, properties and induction of plaice liver cytosolic glutathione-S-transferases. *Fish Physiol. Biochem.* 8, 437–449. <https://doi.org/10.1007/BF00003400>
- Glisic, B., Mihaljevic, I., Popovic, M., Zaja, R., Loncar, J., Fent, K., Kovacevic, R., Smital, T., 2015. Characterization of glutathione-S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 158, 50–62. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.10.013>
- Gräns, J., 2015. Chemical mixtures and interactions with detoxification mechanisms and biomarker responses in fish.
- Gu, Y., Guo, J., Pal, A., Pan, S.S., Zimniak, P., Singh, S. V., Ji, X., 2004. Crystal structure of human glutathione S-transferase A3-3 and mechanistic implications for its high steroid isomerase activity. *Biochemistry* 43, 15673–15679. <https://doi.org/10.1021/bi048757g>
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696–704. <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Hagey, L.R., Møller, P.R., Hofmann, A.F., Krasowski, M.D., 2010. Diversity of Bile Salts in Fish and Amphibians: Evolution of a Complex Biochemical Pathway. *Physiol. Biochem. Zool.* 83, 308–321. <https://doi.org/10.1086/649966>
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp.* 41, 95–98.
- Haluzová, I., Modrá, H., Blahová, J., Havelková, M., Šíroková, Z., Svobodová, Z., 2011. Biochemical markers of contamination in fish toxicity tests. *Interdiscip. Toxicol.* 4, 85–89. <https://doi.org/10.2478/v10102-011-0015-9>
- Hansson, L.O., Bolton-Grob, R., Massoud, T., Mannervik, B., 1999. Evolution of differential substrate specificities in Mu class glutathione transferases probed by DNA shuffling. *J. Mol. Biol.* 287, 265–276. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2607>
- Harper, C.M., 2004. Structure, Catalytic Mechanism, and Evolution of the Glutathione Transferases Richard. *Muscle Nerve* 10, 339–351. <https://doi.org/10.1002/mus.10181>
- Harshbarger, W., Gondi, S., Ficarro, S.B., Hunter, J., Udayakumar, D., Gurbani, D., Singer, W.D., Liu, Y., Li, L., Marto, J.A., Westover, K.D., 2017. Structural and Biochemical Analyses Reveal the Mechanism of Glutathione S -Transferase Pi 1 Inhibition by the Anti-cancer Compound Piperlongumine * Edited by Norma Allewell 292, 112–120. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.750299>
- Hashmi, M.A.K., Escher, B.I., Krauss, M., Teodorovic, I., Brack, W., 2018. Effect-directed analysis (EDA) of Danube River water sample receiving untreated municipal wastewater from Novi Sad, Serbia. *Sci. Total Environ.* 624, 1072–1081. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.187>
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>
- Hayes, J.D., McLellan, L.I., 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res.* 31, 273–300. <https://doi.org/10.1080/10715769900300851>
- Hayes, J D, Pulford, D.J., 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 445–600. <https://doi.org/10.3109/10409239509083491>
- He, S., Liang, X.-F., Sun, J., Shen, D., 2013. Induction of liver GST transcriptions by tert-butylhydroquinone reduced microcystin-LR accumulation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.12.021>
- Henson, K.L., Stauffer, G., Gallagher, E.P., 2001. Induction of glutathione S-transferase activity and protein expression in brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*) liver by ethoxyquin. *Toxicol. Sci.* 62, 54–60. <https://doi.org/10.1093/toxsci/62.1.54>
- Higgins, L.G., Hayes, J.D., 2011. Mechanisms of induction of cytosolic and microsomal glutathione transferase (GST) genes by xenobiotics and pro-inflammatory agents. *Drug Metab. Rev.* 43, 92–137. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.567391>

- Hodgson, E., 2010. Introduction to Biotransformation (Metabolism), in: Krieger, R. (Ed.), Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology. Elsevier Inc., pp. 865–875. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00036-7>
- Homma, H., Listowsky, I., 1985. Identification of Yb-glutathione-S-transferase as a major rat liver protein labeled with dexamethasone 21-methanesulfonate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 7165–9. <https://doi.org/10.1073/PNAS.82.21.7165>
- Homma, H., Maruyama, H., Niitsu, Y., Listowsky, I., 1986. A subclass of glutathione S-transferases as intracellular high-capacity and high-affinity steroid-binding proteins 235, 763–768.
- Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J.C., Koch, R., Rauch, G.J., White, S., Chow, W., Kilian, B., Quintais, L.T., Guerra-Assunção, J.A., Zhou, Y., Gu, Y., Yen, J., Vogel, J.H., Eyre, T., Redmond, S., Banerjee, R., Chi, J., Fu, B., Langley, E., Maguire, S.F., Laird, G.K., Lloyd, D., Kenyon, E., Donaldson, S., Sehra, H., Almeida-King, J., Loveland, J., Trevanion, S., Jones, M., Quail, M., Willey, D., Hunt, A., Burton, J., Sims, S., McLay, K., Plumb, B., Davis, J., Clee, C., Oliver, K., Clark, R., Riddle, C., Elliott, D., Threadgold, G., Harden, G., Ware, D., Mortimer, B., Kerry, G., Heath, P., Phillimore, B., Tracey, A., Corby, N., Dunn, M., Johnson, C., Wood, J., Clark, S., Pelan, S., Griffiths, G., Smith, M., Glithero, R., Howden, P., Barker, N., Stevens, C., Harley, J., Holt, K., Panagiotidis, G., Lovell, J., Beasley, H., Henderson, C., Gordon, D., Auger, K., Wright, D., Collins, J., Raisen, C., Dyer, L., Leung, K., Robertson, L., Ambridge, K., Leongamornlert, D., McGuire, S., Gilderthorp, R., Griffiths, C., Manthavadi, D., Nichol, S., Barker, G., Whitehead, S., Kay, M., Brown, J., Murnane, C., Gray, E., Humphries, M., Sycamore, N., Barker, D., Saunders, D., Wallis, J., Babbage, A., Hammond, S., Mashreghi-Mohammadi, M., Barr, L., Martin, S., Wray, P., Ellington, A., Matthews, N., Ellwood, M., Woodmansey, R., Clark, G., Cooper, J., Tromans, A., Grafham, D., Skuce, C., Pandian, R., Andrews, R., Harrison, E., Kimberley, A., Garnett, J., Fosker, N., Hall, R., Garner, P., Kelly, D., Bird, C., Palmer, S., Gehring, I., Berger, A., Dooley, C.M., Ersan-Ürün, Z., Eser, C., Geiger, H., Geisler, M., Karotki, L., Kirn, A., Konantz, J., Konantz, M., Oberländer, M., Rudolph-Geiger, S., Teucke, M., Osoegawa, K., Zhu, B., Rapp, A., Widaa, S., Langford, C., Yang, F., Carter, N.P., Harrow, J., Ning, Z., Herrero, J., Searle, S.M.J., Enright, A., Geisler, R., Plasterk, R.H.A., Lee, C., Westerfield, M., De Jong, P.J., Zon, L.I., Postlethwait, J.H., Nüsslein-Volhard, C., Hubbard, T.J.P., Crollius, H.R., Rogers, J., Stemple, D.L., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Hrubik, J., Glisic, B., Fa, S., Pogrmic-Majkic, K., Andric, N., 2016a. Erk-Creb pathway suppresses glutathione-S-transferase pi expression under basal and oxidative stress conditions in zebrafish embryos. *Toxicol. Lett.* 240, 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.10.013>
- Hrubik, J., Glisic, B., Tubic, A., Ivancev-Tumbas, I., Kovacevic, R., Samardzija, D., Andric, N., Kaisarevic, S., 2016b. Toxicological and chemical investigation of untreated municipal wastewater: Fraction- and species-specific toxicity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 127, 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.01.018>
- Hu, X., O'Donnell, R., Srivastava, S.K., Xia, H., Zimniak, P., Nanduri, B., Bleicher, R.J., Awasthi, S., Awasthi, Y.C., Ji, X., Singh, S. V., 1997. Active site architecture of polymorphic forms of human glutathione S-transferase P1-1 accounts for their enantioselectivity and disparate activity in the glutathione conjugation of 7 β ,8 α -dihydroxy-9 α ,10 α -oxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 424–428. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6777>
- Huculeci, R., Dinu, D., Staicu, C., Munteanu, M.C., Costache, M., Dinischiotu, A., 2008. Malathion-Induced Alteration of the Antioxidant Defence System in Kidney, Gill, and Intestine of *Carassius auratus gibelio*. *Environ. Toxicol.* 523–530. <https://doi.org/10.1002/tox.20454>
- HUGO Gene Nomenclature Committee [WWW Document], n.d. URL www.genenames.org/
- Hurst, R., Bao, Y., Mannervik, B., Williamson, G., 1998. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferases, *Biochem. J.*
- Ishihara, Y., Kawami, T., Ishida, A., Yamazaki, T., 2012. Tributyltin induces oxidative stress and neuronal injury by inhibiting glutathione S-transferase in rat organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochem. Int.* 60, 782–790. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.03.004>
- IUBMB Enzyme Nomenclature EC 2.5.1.18 [WWW Document], n.d. URL <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/EC2/5/1/18.html> (accessed 9.5.19).
- Jakobsson, P.-J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., Persson, B., 1999. Common structural features of MAPEG— A widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci.* 8, 689–692.

<https://doi.org/10.1110/ps.8.3.689>

- Jakoby, W.B., 1978. The glutathione S-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 46, 383–414.
- Jayasinghe, J.D.H.E., Bathige, S.D.N.K., Nam, B.H., Noh, J.K., Lee, J., 2016. Comprehensive characterization of three glutathione S-transferase family proteins from black rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 189, 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.07.003>
- JGI Genome Portal [WWW Document], n.d. URL genome.jgi.doe.gov/portal/
- Ji, X., von Rosenvinge, E., Johnson, W., Tomarev, S., Piatigorsky, J., Armstrong, R., Gilliland, G., 1995. Three-Dimensional Structure, Catalytic Properties, and Evolution of a Sigma Class Glutathione Transferase from Squid, a Progenitor of the Lens S-crystallins of Cephalopods. *Biochemistry* 34, 5317–5328. <https://doi.org/10.1021/bi00016a003>
- Jin, Y., Liu, Z., Peng, T., Fu, Z., 2015. The toxicity of chlorpyrifos on the early life stage of zebrafish: A survey on the endpoints at development, locomotor behavior, oxidative stress and immunotoxicity. *Fish Shellfish Immunol.* 43, 405–414. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.010>
- Johansson, Ann Sofie, Mannervik, B., 2001. Human Glutathione Transferase A3-3, a Highly Efficient Catalyst of Double-bond Isomerization in the Biosynthetic Pathway of Steroid Hormones. *J. Biol. Chem.* 276, 33061–33065. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104539200>
- Johansson, K., Ito, M., Schophuizen, C.M.S., Mathew Thengumtharayil, S., Heuser, V.D., Zhang, J., Shimoji, M., Vahter, M., Ang, W.H., Dyson, P.J., Shibata, A., Shuto, S., Ito, Y., Abe, H., Morgenstern, R., 2011. Characterization of new potential anticancer drugs designed to overcome glutathione transferase mediated resistance. *Mol. Pharm.* 8, 1698–1708. <https://doi.org/10.1021/mp2000692>
- Jowsey, I.R., Hayes, J.D., 2007. Mammalian Glutathione S-Transferase Genes: Structure and Regulation, in: Awasthi, Y.C. (Ed.), *Toxicology of Glutathione Transferases*. New York, pp. 27–46.
- Kamel, M., Ninov, N., 2017. Catching new targets in metabolic disease with a zebrafish. *Curr. Opin. Pharmacol.* 37, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2017.08.007>
- Kamencic, H., Lyon, a, Paterson, P.G., Juurlink, B.H., 2000. Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione. *Anal. Biochem.* 286, 35–7. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4765>
- Karin, M., Gallagher, E., 2005. From JNK to pay dirt: Jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. *IUBMB Life* 57, 283–295. <https://doi.org/10.1080/15216540500097111>
- Keating, A.F., Sen, N., Sipes, I.G., Hoyer, P.B., 2010. Dual protective role for glutathione S-transferase class pi against VCD-induced ovotoxicity in the rat ovary. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 247, 71–5. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.06.002>
- Ketterer, B., Coles, B., Meyer, D.J., 1983. The role of glutathione in detoxication. *Environ. Health Perspect.* Vol. 49, 59–69.
- Khalil, S., Abbas, O., Kibbi, A.G., Kurban, M., 2017. Scabies in the age of increasing drug resistance. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005920>
- Kim, J.-H., Dahms, H.-U., Rhee, J.-S., Lee, Y.-M., Lee, J., Han, K.-N., Lee, J.-S., 2010. Expression profiles of seven glutathione S-transferase (GST) genes in cadmium-exposed river pufferfish (*Takifugu obscurus*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 151, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.09.001>
- Kim, J.-H., Raisuddin, S., Rhee, J.-S., Lee, Y., Han, K., Lee, J., 2009. Molecular cloning, phylogenetic analysis and expression of a MAPEG superfamily gene from the pufferfish *Takifugu obscurus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 149, 358–362. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.09.003>
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Dev. Dyn.* 10, 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Knight, T.R., Choudhuri, S., Klaassen, C.D., 2007. Constitutive mRNA expression of various glutathione S-transferase isoforms in different tissues of mice. *Toxicol. Sci.* 100, 513–24. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm233>
- Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, Á., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S., 2012. Predicting Adult Fish Acute Lethality with the Zebrafish Embryo: Relevance of Test Duration, Endpoints, Compound Properties, and Exposure Concentration Analysis. *Environ. Sci. Technol.* 46, 9690–9700. <https://doi.org/10.1021/es301729q>
- Konishi, T., Kato, K., Araki, T., Shiraki, K., Takagi, M., Tamaru, Y., 2005. A new class of glutathione S-transferase from the hepatopancreas of the red sea bream *Pagrus major*. *Biochem. J.* 388, 299–307. <https://doi.org/10.1042/BJ20041578>
- Koonin, E. V., Tatusov, R.L., Altschul, S.F., 1994. Eukaryotic translation elongation factor. *Protein Sci.* 3, 2045–2054.

- Laborde, E., 2010. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death Differ.* 17, 1373–80. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.80>
- Landi, S., 2000. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: A review. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(00\)00050-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(00)00050-8)
- Lee, Dejong, 1999. Microsomal GST-I: Genomic organization, expression, and alternative splicing of the human gene. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1446, 389–396. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(99\)00112-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(99)00112-8)
- Lee, Y.M., Seo, J.S., Jung, S.O., Kim, I.C., Lee, J.S., 2006. Molecular cloning and characterization of θ -class glutathione S-transferase (GST-T) from the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus* and biochemical comparisons with α -class glutathione S-transferase (GST-A). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346, 1053–1061. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.06.014>
- Li, G., Xie, P., Li, H., Chen, J., Hao, L., Xiong, Q., 2010. Quantitative profiling of mRNA expression of glutathione S-transferase superfamily genes in various tissues of bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 24, 250–259. <https://doi.org/10.1002/jbt.20333>
- Li, S., Li, C., Jin, S., Liu, J., Xue, X., Eltahan, A.S., Sun, J., Tan, J., Dong, J., Liang, X.J., 2017. Overcoming resistance to cisplatin by inhibition of glutathione S-transferases (GSTs) with ethacraplatin micelles in vitro and in vivo. *Biomaterials* 144, 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.08.021>
- Li, W.C., 2014. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environ. Pollut.* 187, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.01.015>
- Li, Z.H., Li, P., Shi, Z.C., 2015. Responses of the hepatic glutathione antioxidant defense system and related gene expression in juvenile common carp after chronic treatment with tributyltin. *Ecotoxicology* 24, 700–705. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1416-2>
- Lishman, L., Smyth, S.A., Sarafin, K., Kleywegt, S., Toito, J., Peart, T., Lee, B., Servos, M., Beland, M., Seto, P., 2006. Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada. *Sci. Total Environ.* 367, 544–558. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.03.021>
- Listowsky, I., Abramovitz, M., Homma, H., Niitsu, Y., 1988. Intracellular Binding and Transport of Hormones and Xenobiotics by Glutathione-Transferases. *Drug Metab. Rev.* 19, 305–318. <https://doi.org/10.3109/03602538808994138>
- Liu, J., Lu, G., Cai, Y., Wu, D., Yan, Z., Wang, Y., 2017. Modulation of erythromycin-induced biochemical responses in crucian carp by ketoconazole. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 5285–5292. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8268-7>
- Livingstone, D.R., 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: Quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 120, 43–49. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)10008-9](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10008-9)
- Lo, H.-W., Ali-Osman, F., 2007. Genetic polymorphism and function of glutathione S-transferases in tumor drug resistance. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7, 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2007.06.009>
- Lončar, J., Popović, M., Zaja, R., Smital, T., 2010. Gene expression analysis of the ABC efflux transporters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 151, 209–15. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.10.009>
- Louis, A., Muffato, M., Roest Crollius, H., 2013. Genomicus: five genome browsers for comparative genomics in eukaryota. *Nucleic Acids Res.* 41, D700–D705. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1156>
- Lucente, G., Luisi, G., Pinnen, F., 1998. Design and synthesis of glutathione analogues. *Farmaco* 53, 721–735. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(98\)00098-6](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(98)00098-6)
- MacRae, C.A., Peterson, R.T., 2015. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* <https://doi.org/10.1038/nrd4627>
- Mahadevan, D., Sutton, G.R., 2015. Ezatiostat hydrochloride for the treatment of myelodysplastic syndromes. *Expert Opin. Investig. Drugs* 24, 725–733. <https://doi.org/10.1517/13543784.2015.1021003>
- Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jansson, H., Tahir, M.K., Warholm, M., Jornvall, H., 1985. Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase structural data and enzymatic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 7202–7206.
- Mannervik, B., Awasthi, Y.C., Board, P.G., Hayes, J.D., Di Ilio, C., Ketterer, B., Listowsky, I., Morgenstern, R., Muramatsu, M., Pearson, W.R., Pickett, C.B., Sato, K., Widersten, M., Wolf, C.R., 1992. Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem. J.* 282, 305–308.
- Mannervik, B., Danielson, U.H., 1988. Glutathione transferases--structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 23, 283–337.
- Mansour, S.A., Mossa, A.-T.H., 2009. Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by

- chlorpyrifos and the protective effect of zinc. *Pestic. Biochem. Physiol.* 93, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2008.09.004>
- Martinez-Lara, E., Leaver, M., George, S., 2002. Evidence from heterologous expression of glutathione S-transferases A and A1 of the plaice (*Pleuronectes platessa*) that their endogenous role is in detoxification of lipid peroxidation products, in: *Marine Environmental Research*. pp. 263–266. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(02\)00188-5](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(02)00188-5)
- McCurley, A.T., Callard, G. V., 2008. Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. *BMC Mol Biol* 9, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-102>
- McIlwain, C.C., Townsend, D.M., Tew, K.D., 2006. Glutathione S-transferase polymorphisms: Cancer incidence and therapy. *Oncogene* 25, 1639–1648. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209373>
- Metabolism of drugs and xenobiotics [WWW Document], n.d. URL watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Metabolism/DrugMetabolism.html
- MeV [WWW Document], n.d. URL mev.tm4.org/#/welcome
- Meyer, A., Schartl, M., 1999. Gene and genome duplications in vertebrates: The one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 699–704. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(99\)00039-3](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(99)00039-3)
- Mihaljević, I., Bašica, B., Maraković, N., Kovačević, R., Smital, T., 2020. Interaction of organotin compounds with three major glutathione S-transferases in zebrafish. *Toxicol. Vitr.* <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104713>
- Milic, N., Spanik, I., Radonic, J., Sekulic, M.T., Grujic, N., Vyviurska, O., Milanovic, M., Sremacki, M., Miloradov, M.V., 2014. Screening analyses of wastewater and danube surface water in Novi Sad Locality, Serbia. *Fresenius Environ. Bull.* 23, 372–377.
- Mitra, S., Srivastava, A., Khandelwal, S., 2013. Tributyltin chloride induced testicular toxicity by JNK and p38 activation, redox imbalance and cell death in sertoli-germ cell co-culture. *Toxicology* 314, 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.09.003>
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish.* 9, 211–268. <https://doi.org/10.1023/A:1008924418720>
- Morel, F., Aninat, C., 2011. The glutathione transferase kappa family. *Drug Metab. Rev.* 43, 281–91. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.556122>
- Morgenstern, R., Zhang, J., Johansson, K., 2011. Microsomal glutathione transferase 1: mechanism and functional roles. *Drug Metab. Rev.* 43, 300–6. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.558511>
- Mukanganyama, S., Widersten, M., Naik, Y., Mannervik, B., Hasler, J., 2002. INHIBITION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASES BY ANTIMALARIAL DRUGS POSSIBLE IMPLICATIONS FOR CIRCUMLVENTING ANTICANCER DRUG RESISTANCE. *Int. J. Cancer* 97, 700–705.
- Muller, P.Y., Janovjak, H., Miserez, A.R., Dobbie, Z., 2002. Processing of Gene Expression Data Generated by Quantitative Real-Time RT-PCR. *Biotechniques* 32, 1372–4, 1376, 1378–9.
- Murray, K.E., Thomas, S.M., Bodour, A.A., 2010. Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. *Environ. Pollut.* 158, 3462–3471. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.08.009>
- Nagel, R., 2002. DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*--a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX* 19, 1:38–48. <https://doi.org/10.1007/s13311-013-0218-1>
- National Center for Biotechnology Information [WWW Document], n.d. URL www.ncbi.nlm.nih.gov/
- Nebert, D.W., Dieter, M.Z., 2000. The evolution of drug metabolism. *Pharmacology* 61, 124–135. <https://doi.org/10.1159/000028393>
- Nichols, J.W., Bonnell, M., Dimitrov, S.D., Escher, B.I., Han, X., Kramer, N.I., 2009. Bioaccumulation Assessment Using Predictive Approaches. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 5, 557–597. https://doi.org/10.1897/ieam_2008-088.1
- O'Brien, P.J., Herschlag, D., 1999. Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities. *Chem. Biol.* [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(99\)80033-7](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(99)80033-7)
- Oakley, A., 2011. Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metab. Rev.* 43, 138–51. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.558093>
- OECD, 2013. Guidelines for the testing chemicals, Section 2: Effects on biotic systems, Test No. 210: Fish, early-life stage toxicity test. *OECD Guidel. Test. Chem. Sect. 2*, OECD Publ. Paris, 1–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>
- Oruc, E., 2011. Effects of diazinon on antioxidant defense system and lipid peroxidation in the liver of

- Cyprinus carpio (L.). *Environ. Toxicol.* 26, 571–578. <https://doi.org/10.1002/tox.20573>
- Otte, J.C., Schultz, B., Fruth, D., Fabian, E., van Ravenzwaay, B., Hidding, B., Salinas, E.R., 2017. Intrinsic Xenobiotic Metabolizing Enzyme Activities in Early Life Stages of Zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. Sci.* 159, 86–93. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx116>
- Padrós, J., Pelletier, É., Ribeiro, C.O., 2003. Metabolic interactions between low doses of benzo[a]pyrene and tributyltin in arctic charr (*Salvelinus alpinus*): A long-term in vivo study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 192, 45–55. [https://doi.org/10.1016/S0041-008X\(02\)00042-X](https://doi.org/10.1016/S0041-008X(02)00042-X)
- Pemble, S., Schroeder, K.R., Spencer, S.R., Meyer, D.J., Hallier, E., Bolt, H.M., Ketterer, B., Taylor, J.B., 1994. Human glutathione S-transferase Theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem. J.* 300, 271–6. <https://doi.org/10.1042/bj3000271>
- pET-21a(+) Sequence and Map [WWW Document], n.d. URL [www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pET_and_duet_vectors_\(novagen\)&plasmid=pET-21a\(+\)&format=png](http://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pET_and_duet_vectors_(novagen)&plasmid=pET-21a(+)&format=png)
- Polekhina, G., Board, P., Blackburn, A., Parker, M., 2001. Crystal Structure of Maleylacetoacetate Isomerase/Glutathione Transferase Zeta Reveals the Molecular Basis for Its Remarkable Catalytic Promiscuity. *Biochemistry* 40, 1567–1576. <https://doi.org/10.1021/bi002249z>
- Postlethwait, J., Amores, A., Cresko, W., Singer, A., Yan, Y.-L., 2004. Subfunction partitioning, the teleost radiation and the annotation of the human genome. *TRENDS Genet.* 20. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.08.001>
- Pouliou, F.M., Thireou, T.N., Eliopoulos, E.E., Tsoungas, P.G., Labrou, N.E., Clonis, Y.D., 2015. Isoenzyme- and Allozyme-Specific Inhibitors: 2,2'-Dihydroxybenzophenones and Their Carbonyl N-Analogues that Discriminate between Human Glutathione Transferase A1-1 and P1-1 Allozymes. *Chem. Biol. Drug Des.* 86, 1055–1063. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12574>
- Promega Corporation, 2018. pGEM(R)-T and pGEM(R)-T Easy Vector Systems Technical Manual. Instr. Use Prod. 1–29.
- Rae, J.M., Johnson, M.D., Lippman, M.E., Flockhart, D.A., 2001. Rifampin is a selective, pleiotropic inducer of drug metabolism genes in human hepatocytes: studies with cDNA and oligonucleotide expression arrays. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299, 849–857.
- Raijmakers, M.T.M., Steegers, E.A.P., Peters, W.H.M., 2001. Glutathione S-transferases and thiol concentrations in embryonic and early fetal tissues, *Human Reproduction*.
- Raza, H., John, A., 2006. 4-Hydroxynonenol induces mitochondrial oxidative stress, apoptosis and expression of glutathione S-transferase A4-4 and cytochrome P450 2E1 in PC12 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.06.001>
- Real-time PCR handbook, 2014. , Applied Biosystems. <https://doi.org/CO320850812>
- Reinemer, P., Dirr, H.W., Ladenstein, R., Schaffer, J., Gallay, O., Huber, R., 1991. The three-dimensional structure of class wr glutathione S-transferase in complex with glutathione sulfonate at 2.3 Å resolution 10, 1997–2005.
- Remoué, F., Mani, J., Pugnière, M., Schacht, A., Capron, A., Riveau, G., Remoué, F., 2002. Functional Specific Binding of Testosterone to *Schistosoma haematobium* Functional Specific Binding of Testosterone to *Schistosoma haematobium* 28-Kilodalton Glutathione S -Transferase †. *Infect. Immun.* 70, 601–605. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.2.601>
- Robetta: full-chain protein structure prediction server [WWW Document], n.d. URL robetta.bakerlab.org/
- Rossjohn, J., Board, P.G., Parker, M.W., Wilce, M.C.J., 1996. A structurally derived consensus pattern for theta class glutathione transferases. *Protein Eng.* 9, 327–332.
- Rossjohn, J., McKinstry, W., Oakley, A.J., Verger, D., Flanagan, J., Chelvanayagam, G., Tan, K., Board, P., Parker, M., 1998. Human theta class glutathione transferase: the crystal structure reveals a sulfate-binding pocket within a buried active site. *Structure* 6, 309–322. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(98\)00034-3](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(98)00034-3)
- Rowe, J.D., Patskovsky, Y. V, Patskovska, L.N., Novikova, E., Listowsky, I., 1998. Rationale for reclassification of a distinctive subdivision of mammalian class Mu glutathione S-transferases that are primarily expressed in testis. *J. Biol. Chem.* 273, 9593–9601. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.16.9593>
- Samardzija Nenadov, D., Pogrmic-Majkic, K., Fa, S., Stanic, B., Tubic, A., Andric, N., 2018. Environmental mixture with estrogenic activity increases Hsd3b1 expression through estrogen receptors in immature rat granulosa cells. *J. Appl. Toxicol.* 38, 879–887. <https://doi.org/10.1002/jat.3596>
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463–5467.
- Sau, A., Pellizzari Tregno, F., Valentino, F., Federici, G., Caccuri, A.M., 2010. Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. *Arch. Biochem. Biophys.* 500, 116–22.

- <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.05.012>
- Schlenk, D., Celander, M., Gallagher, E.P., George, S., James, M., Kullman, S.W., Van den Hurk, P., Willett, K., 2008. Biotransformation in Fishes, in: Di Giulio, R.T., Hinton, D.E.. (Eds.), *The Toxicology of Fishes*. CRC Press, Taylor & Francis, New York, pp. 153–234.
- Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., Küster, E., Luckenbach, T., Voelker, D., 2008. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 15, 394–404. <https://doi.org/10.1007/s11356-008-0018-z>
- Segel, I.H., 1976. *Biochemical calculations: How to Solve Mathematical Problems in General Biochemistry.*, Second. ed. John Wiley & Sons, Ltd, Canada.
- Seidegård, J., Pero, R.W., Stille, B., 1989. Identification of the trans-stilbene oxide-active glutathione transferase in human mononuclear leukocytes and in liver as GST1. *Biochem. Genet.* 27, 253–261. <https://doi.org/10.1007/BF02401805>
- Selderslaghs, I.W.T., Blust, R., Witters, H.E., 2012. Feasibility study of the zebrafish assay as an alternative method to screen for developmental toxicity and embryotoxicity using a training set of 27 compounds. *Reprod. Toxicol.* 33, 142–154. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.08.003>
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360, 1–16. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3600001>
- Sherratt, P. J. and Hayes, J.D., 2002. Glutathione S-transferases, in: Ioannides, C. (Ed.), *Enzyme Systems That Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 319–352. <https://doi.org/10.1002/0470846305>
- Simon, P., 2003. Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics* 19, 1439–1440. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg157>
- Singhal, S.S., Singh, S.P., Singhal, P., Horne, D., Singhal, J., Awasthi, S., 2015. Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 289, 361–370. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.10.006>
- Smital, T., Terzic, S., Zaja, R., Senta, I., Pivcevic, B., Popovic, M., Mikac, I., Erik, K., Thomas, K. V, Ahel, M., 2011. Assessment of toxicological profiles of the municipal wastewater effluents using chemical analyses and bioassays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 844–851. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.11.010>
- Stegeman, J.J., Goldstone, J. V., Hahn, M.E., 2010. Perspectives on zebrafish as a model in environmental toxicology. *Fish Physiol.* 29, 367–439. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(10\)02910-9](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(10)02910-9)
- Stevens, J.F., Maier, C.S., 2008. Acrolein: Sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Mol Nutr Food Res* 52, 7–25. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.182>.doi
- Strain - DH5 α [WWW Document], n.d. URL cgsc2.biology.yale.edu/Strain.php?ID=150015
- Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D., Singer, F., 1981. Production of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 291, 293–296. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90155-R](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90155-R)
- Sugantha priya, S., Gowri Shankar, J., Thirumalaisamy, R., Kavitha, P., Prakash, B., Arunachalam, G., Selvamuthukumar, S., 2010. Over Expression of IPTG inducible GST protein in *E. coli* BL21. *J. Biomed. Sci. Res.* 2, 54–59.
- Suzuki, T., Johnston, P.N., Board, P.G., 1993. Structure and organization of the human alpha class glutathione S-transferase genes and related pseudogenes. *Genomics* 18, 680–686. [https://doi.org/10.1016/S0888-7543\(05\)80373-8](https://doi.org/10.1016/S0888-7543(05)80373-8)
- Suzuki, T., Takagi, Y., Osanai, H., Li, L., Takeuchi, M., Katoh, Y., Kobayashi, M., 2005. Pi class glutathione S-transferase genes are regulated by Nrf2 through an evolutionarily conserved regulatory element in zebrafish. *Biochem. J.* 388, 65–73. <https://doi.org/10.1042/BJ20041860>
- Tadros, W., Lipshitz, H.D., 2009. The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development* 136, 3033–3042. <https://doi.org/10.1242/dev.033183>
- Takahashi, Y., Campbell, E.A., Hirata, Y., Takayama, T., Listowsky, I., 1993. A basis for differentiating among the multiple human Mu-glutathione S-transferases and molecular cloning of brain GSTM5. *J. Biol. Chem.* 268, 8893–8898. <https://doi.org/10.1007/s00442-012-2273-4>
- TaKaRa Bio [WWW Document], n.d. URL <https://www.takarabio.com/products/protein-research/expression-vectors-and-systems/e-coli-expression-systems/pet-expression-system>
- Tambama, P., Abegaz, B., Mukanganyama, S., 2014. Antiproliferative activity of the isofuranonaphthoquinone isolated from *bulbine frutescens* against Jurkat T cells. *Biomed Res. Int.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/752941>
- Tan, K.-L., Board, P.G., 1996. Purification and characterization of a recombinant human Theta-class

- glutathione transferase (GSTT2-2). *Biochem. J.* 315, 727–732. <https://doi.org/10.1042/bj3150727>
- Tan, K., Chelvanayagam, G., Parker, M.W., Board, P.G., 1996. Mutagenesis of the active site of the human Theta-class glutathione transferase GSTT2-2: catalysis with different substrates involves different residues. *Biochem. J.* 319, 315–321.
- Tars, K., Olin, B., Mannervik, B., 2010. Structural Basis for Featuring of Steroid Isomerase Activity in Alpha Class Glutathione Transferases. *J. Mol. Biol.* 397, 332–340. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.01.023>
- Tentori, L., Susanna, A., Mazzon, E., Muzi, A., Sau, A., Cuzzocrea, S., Vernole, P., Federici, G., Maria, A., Graziani, G., 2011. benzoxadiazol-4-ylthio hexanol (NBDHEX) increases temozolomide efficacy against malignant melanoma. *Eur. J. Cancer* 47, 1219–1230. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.12.008>
- Terzić, S., Senta, I., Ahel, M., Gros, M., Petrović, M., Barcelo, D., Müller, J., Knepper, T., Martí, I., Ventura, F., Jovančić, P., Jabučar, D., 2008. Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region. *Sci. Total Environ.* 399, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.03.003>
- Thenmozhi, C., Vignesh, V., Thirumurugan, R., Arun, S., 2011. Impacts of Malathion on mortality and biochemical changes of freshwater fish *Labeo rohita*. *Iran J. Environ. Heal. Sci. Eng.* 8, 387–394.
- Tierbach, A., Groh, K.J., Schönenberger, R., Schirmer, K., Suter, M.J.F., 2018. Glutathione S-Transferase protein expression in different life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. Sci.* 162, 702–712. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx293>
- Timme-Laragy, A.R., Goldstone, J. V., Imhoff, B.R., Stegeman, J.J., Hahn, M.E., Hansen, J.M., 2013. Glutathione redox dynamics and expression of glutathione-related genes in the developing embryo. *Free Radic. Biol. Med.* 65, 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.011>
- Timur, S., Önal, S., Karabay, N.Ü., Sayim, F., Zihnioglu, F., 2003. In vivo effects of Malathion on Glutathione-S-transferase and acetylcholinesterase activities in various tissues of neonatal rats. *Turkish J. Zool.* 27, 247–252.
- Tokarz, J., Möller, G., Hrab̃, M., 2013. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology Zebrafish and steroids: What do we know and what do we need to know? □ 137, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.01.003>
- Tong, Z., Board, P.G., Anders, M.W., 1998. Glutathione transferase Zeta catalyses the oxygenation of the carcinogen dichloroacetic acid to glyoxylic acid. *Biochem. J.* 331, 371–374.
- Toni, C., de Menezes, C.C., Loro, V.L., Clasen, B.E., Cattaneo, R., Santi, A., Pretto, A., Zanella, R., Leitemperger, J., 2010. Oxidative stress biomarkers in *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide bispyribac-sodium. *J. Appl. Toxicol.* 30, 590–595. <https://doi.org/10.1002/jat.1530>
- Trute, M., Gallis, B., Doneanu, C., Shaffer, S., Goodlett, D., Gallagher, E., 2007. Characterization of hepatic glutathione S-transferases in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquat. Toxicol.* 81, 126–36. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.11.009>
- Tsaioun, K., Blaauboer, B.J., Hartung, T., 2016. Evidence-based absorption, distribution, metabolism, excretion (ADME) and its interplay with alternative toxicity methods. *ALTEX* 33, 343–358. <https://doi.org/10.14573/altex.1610101>
- Vojinović Miloradov, M.B., Turk Sekulić, M.M., Radonić, J.R., Milić, N.B., Grujić Letić, N.N., Mihajlović, I.J., Milanović, M.L., 2014. Industrijske emergentne hemikalije u životnom okruženju. *Hem. Ind.* 68, 51–62. <https://doi.org/10.2298/HEMIND121110028V>
- Wang, C., Zhao, Y., Zheng, R., Ding, X., Wei, W., Zuo, Z., Chen, Y., 2006. Effects of tributyltin, benzo[a]pyrene, and their mixture on antioxidant defense systems in *Sebastiscus marmoratus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.08.003>
- Whitbread, A.K., Masoumi, A., Tetlow, N., Schmuck, E., Coggan, M., Board, P.G., 2005. Characterization of the omega class of glutathione transferases. *Methods Enzymol.* 401, 78–99. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)01005-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)01005-0)
- Wiegand, C., Pflugmacher, S., Oberemm, A., Steinberg, C., 2000. Activity development of selected detoxication enzymes during the ontogenesis of the zebrafish (*Danio rerio*). *Int. Rev. Hydrobiol.* 85, 413–422. [https://doi.org/10.1002/1522-2632\(200008\)85:4<413::AID-IROH413>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1522-2632(200008)85:4<413::AID-IROH413>3.0.CO;2-3)
- Wu, B., Dong, D., 2012. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* 33, 656–668. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.09.007>
- Wu, Y., Fan, Y., Xue, B., Luo, L., Shen, J., Zhang, S., Jiang, Y., Yin, Z., 2006. Human glutathione S-transferase P1-1 interacts with TRAF2 and regulates TRAF2-ASK1 signals. *Oncogene* 25, 5787–5800. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209576>
- Wu, Y. qiong, Wang, C. gang, Wang, Y., Zhao, Y., Chen, Y. xin, Zuo, Z. hong, 2007. Antioxidant responses to benzo[a]pyrene, tributyltin and their mixture in the spleen of *Sebastiscus marmoratus*. *J. Environ. Sci.* 19, 1129–1135. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60184-3](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60184-3)

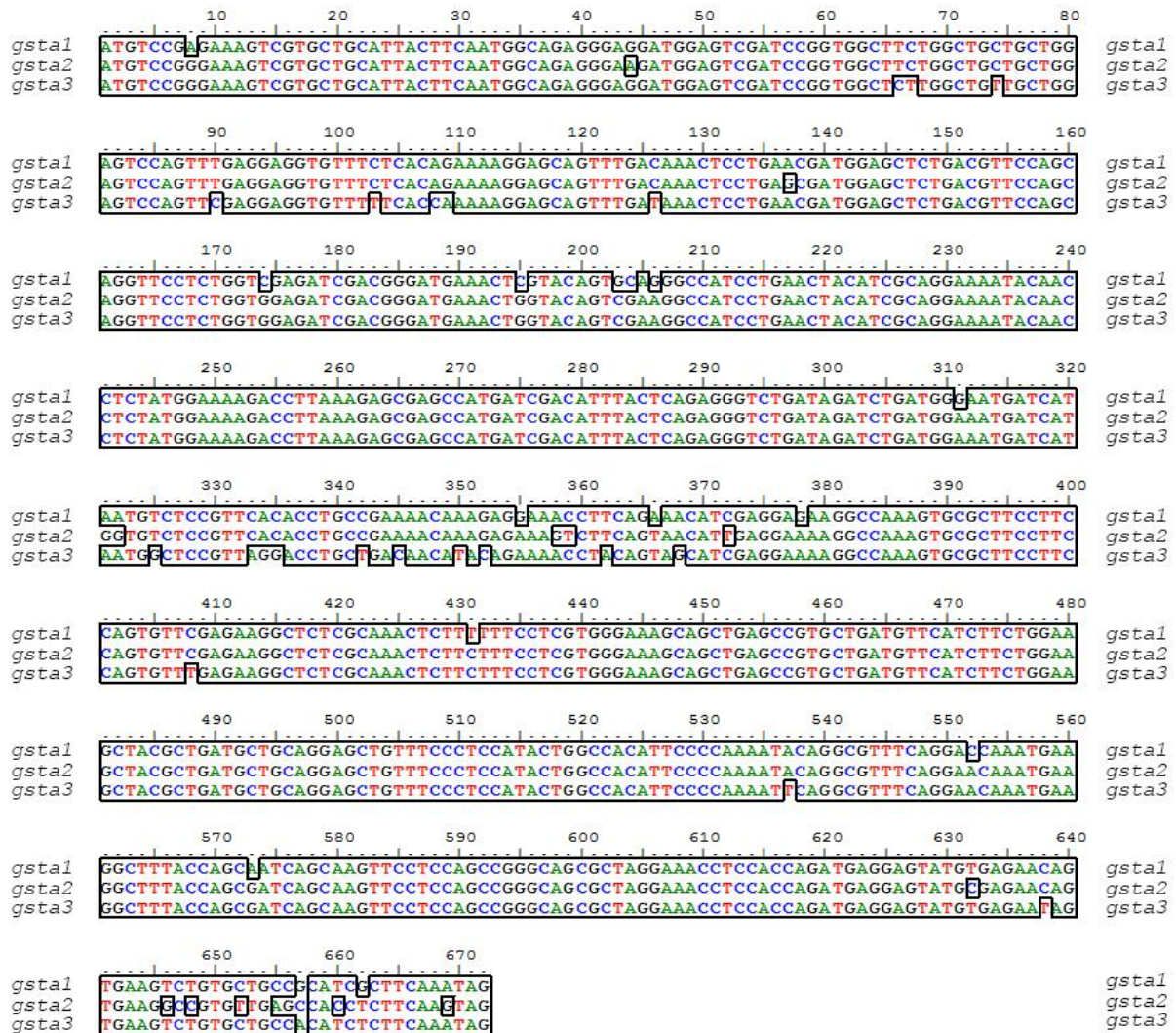
- Xing, H., Wang, Xu, Sun, G., Gao, X., Xu, S., Wang, Xiaolong, 2012. Effects of atrazine and chlorpyrifos on activity and transcription of glutathione S-transferase in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 33, 233–244. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.12.014>
- Yamamoto, K., Yamada, N., 2016. Identification of a diazinon- metabolizing glutathione S - transferase in the silkworm , *Bombyx mori*. *Nat. Publ. Gr.* 6, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep30073>
- Yu, Y., Liang, X.F., Li, L., He, S., Wen, Z.Y., Shen, D., 2014. Two homologs of rho-class and polymorphism in alpha-class glutathione S-transferase genes in the liver of three tilapias. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 101, 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.12.031>
- Zafir, A., Banu, N., 2009. Modulation of in vivo oxidative status by exogenous corticosterone and restraint stress in rats. *Stress* 12, 167–177. <https://doi.org/10.1080/10253890802234168>
- Ziglari, T., Allameh, A., 2013. The Significance of Glutathione Conjugation in Aflatoxin Metabolism, in: *Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects*. InTech. <https://doi.org/10.5772/52096>
- Zimniak, P., 2007. Substrates and Reaction Mechanisms of Glutathione Transferases, in: Awasthi, Y.C. (Ed.), *Toxicology of Glutathione Transferases*. CRC Press, New York, pp. 24–46.
- Службени гласник Републике Србије бр. 39/10, 2010. Правилнику о условима за упис у Регистар за огледе на животињама и садржини и начину вођења тог регистра, програму обуке о добробити огледних животиња, начину неге, поступања и лишавања живот огледних животиња, обрасцу захтева за одобрење спровођења оглед, Службени гласник Републике Србије.
- Службени гласник Републике Србије бр. 41/09, 2009. Закон о добробити животиња Републике Србије.

Слике из поглавља 2. Преглед литературе су преузете са интернет страница из научних радова са отвореним приступом (*Open access*) уз напомену одговарајуће лиценце која допушта дељење, модификовање и умножавање слика или је добијена дозвола за коришћење у докторској дисертацији путем *Copyright Clearance Center's RightsLink* (Слика 2.13).

9. ПРИЛОЗИ

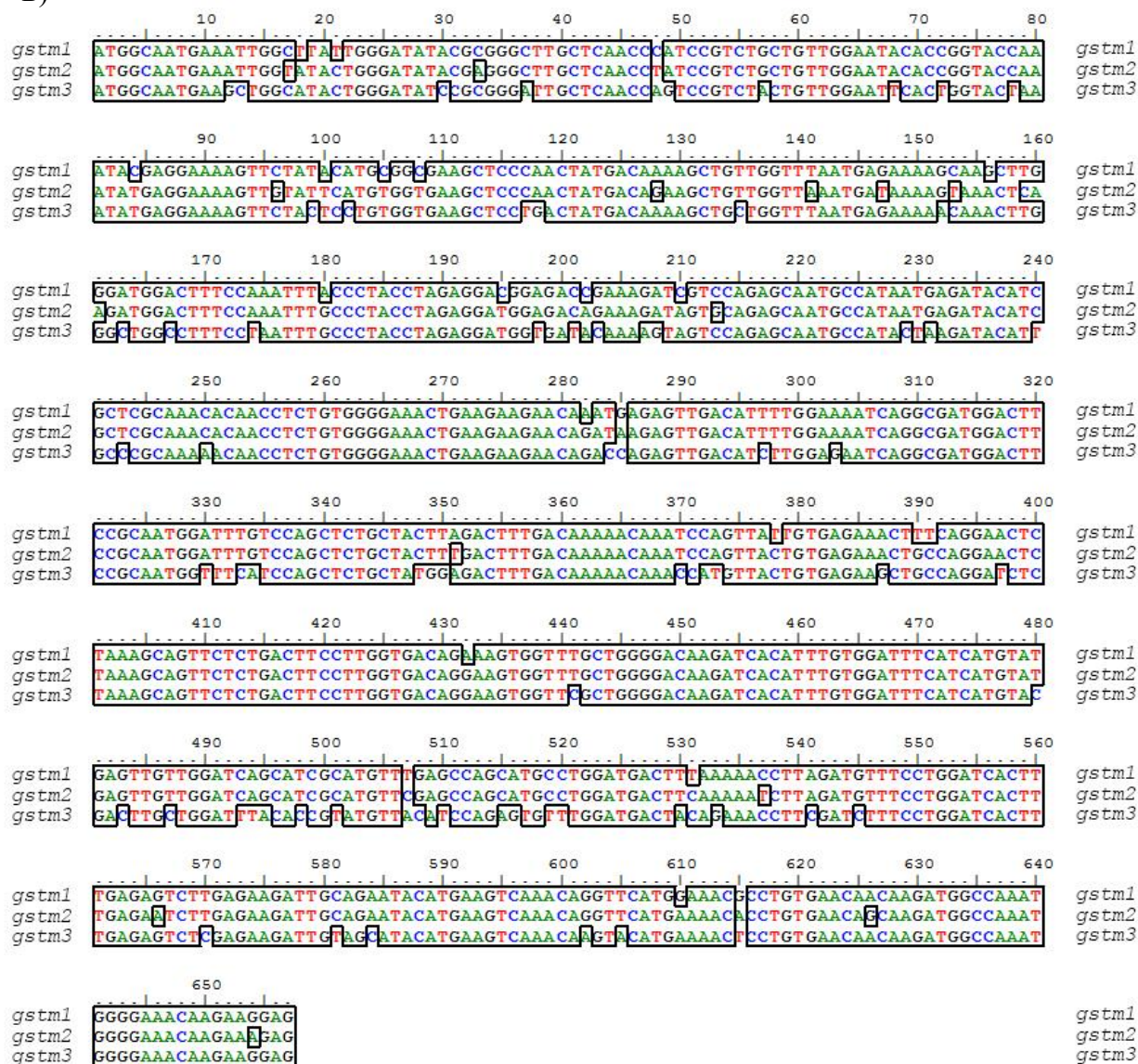
ПРИЛОГ 1. Поређење нуклеотидних низова зебричних gena *gst* који припадају: (A) *Alpha*, (B) *Mu* и (B) *Pi* класама. Вишеструко поравнање направљено је *ClustalW* методом у *BioEdit* програмском пакету.

A)



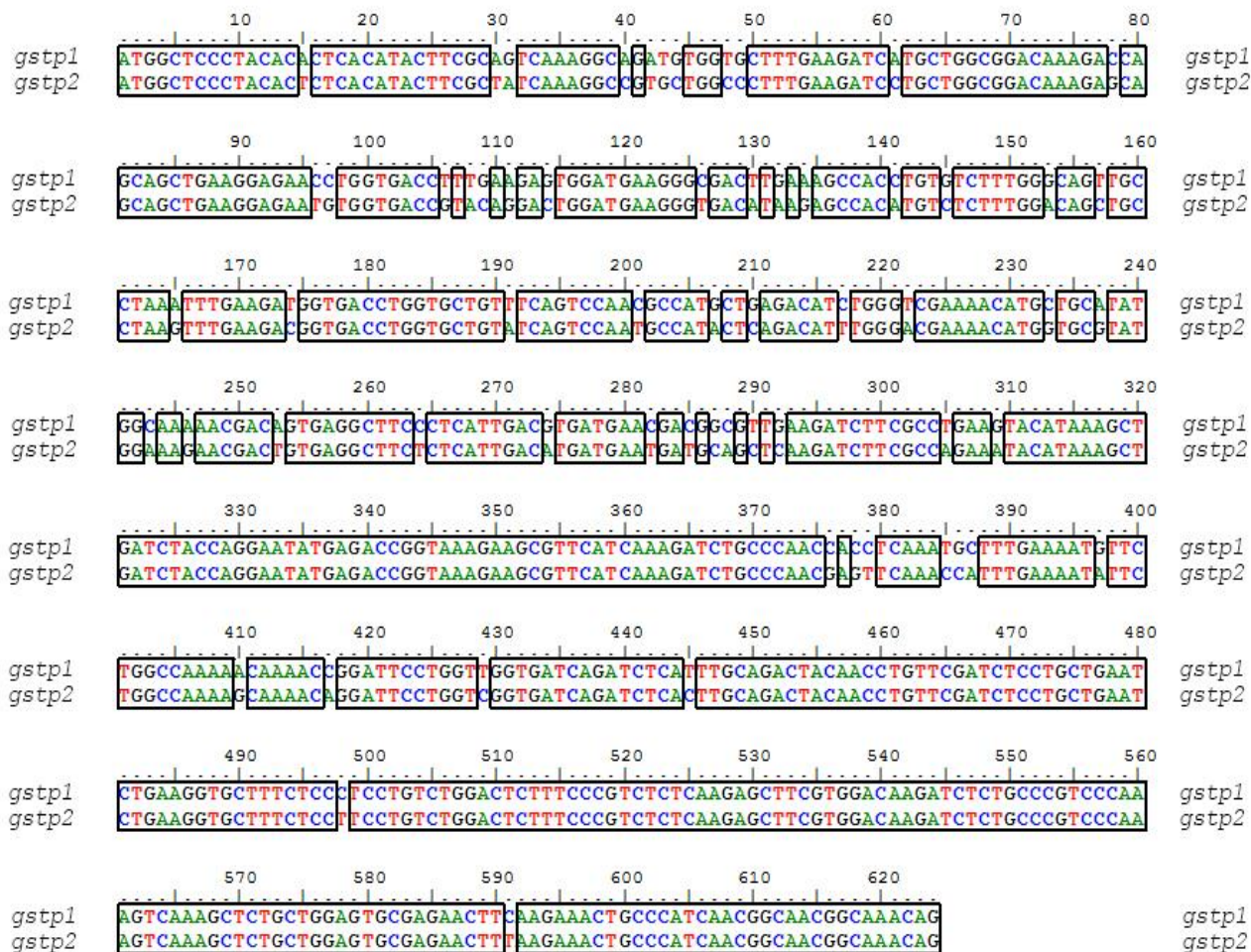
(наставка) ПРИЛОГ 1. Поређење нуклеотидних низова зебричних гена *gst* који припадају (Б) *Mu* класи. Вишеструко поравнање направљено је *ClustalW* методом у *BioEdit* програмском пакету.

Б)



(наставак) ПРИЛОГ 1. Поређење нуклеотидних низова зебричних GST гена који припадају (B) *Pi* класи. Вишеструко поравнање направљено је *ClustalW* методом у *BioEdit* програмском пакету.

B)



ПРИЛОГ 2. Анотације и приступни бројеви секвенци у базама података употребљених у филогенетској анализи суперпородице GST/Gst код хордата. Скраћенице за биолошке врсте: Hs, *Homo sapiens*; Gg, *Gallus gallus*; Ac, *Anolis carolinensis*; Xt, *Xenopus tropicalis*; Dr, *Danio rerio*; Tn, *Tetraodon nigroviridis*; Tr, *Takifugu rubripes*; Ga, *Gasterosteus aculeatus*; Ol, *Oryzias latipes*; Bf, *Brachyostoma floridae*; Ci, *Ciona intestinalis*.

Редни број	Анотација протеина	Приступни број у нуклеотидној бази података	Приступни број у протеинској бази података
1	HsGSTA1	NM_145740.3	NP_665683.1
2	HsGSTA2	NM_000846.4	NP_000837.3
3	HsGSTA3	NM_000847.4	NP_000838.3
4	HsGSTA4	NM_001512.3	NP_001503.1
5	HsGSTA5	NM_153699.1	NP_714543.1
6	HsGSTM1	NM_000561.3	NP_000552.2
7	HsGSTM2	NM_000848.3	NP_000839.1
8	HsGSTM3	NM_000849.4	NP_000840.2
9	HsGSTM4	NM_000850.4	NP_000841.1
10	HsGSTM5	NM_000851.3	NP_000842.2
11	HsGSTP1	NM_000852.3	NP_000843.1
12	HsGSTO1	NM_004832.2	NP_004823.1
13	HsGSTO2	NM_183239.1	NP_899062.1
14	HsGSTT1	NM_000853.2	NP_000844.2
15	HsGSTT2	NM_000854.3	NP_000845.1
16	HsGSTZ1	NM_145870.2	NP_665877.1
17	HsGSTK1	NM_015917.2	NP_057001.1
18	HsMGST1	NM_145791.2	NP_665734.1
19	HsMGST2	NM_002413.4	NP_002404.1
20	HsMGST3	NM_004528.3	NP_004519.1
21	HsLTC4S	NM_145867.1	NP_665874.1
22	HsFLAP	NM_001204406.1	NP_001191335.1
23	HsPTGES	NM_004878.4	NP_004869.1
24	GgGSTA1	NM_001001777.1	NP_001001777.1
25	GgGSTA2	BX930886.2	XP_003641074.1
26	GgGSTA3	NM_204818.2	NP_990149.1
27	GgGSTA4	NM_205412.1	NP_990743.1
28	GgGSTM1	NM_205090.1	NP_990421.1
29	GgGSTO1	NM_001277375.1	NP_001264304.1
30	GgGSTT1	NM_205365.1	NP_990696.1
31	GgGSTT2	ENSGALG00000005204	ENSGALP00000008341
32	GgGSTZ1	NM_001277462.1	NP_001264391.1
33	GgGSTK1	NM_001198649.1	NP_001185578.1
34	GgMGST1	NM_001135550.1	NP_001129022.1
35	GgMGST2	XM_001234229.3	XP_001234230.1
36	GgMGST3	NM_001277537.1	NP_001264466.1
37	GgLTC4S	XM_001233957.3	XP_001233958.3
38	GgFLAP	NM_001278144.1	NP_001265073.1
39	GgPTGES	NM_001194983.1	NP_001181912.1

(наставак) ПРИЛОГ 2. Анотације и приступни бројеви секвенци у базама података протеина употребљених у филогенетској анализи суперпородице <i>Gst</i> код хордата.			
40	AcGSTA1	XM_003215434.1	XP_003215482.1
41	AcGSTA2	XM_003215432.1	XP_003215480.1
42	AcGSTM1	XM_003220188.1	XP_003220236.1
43	AcGSTP1	XM_003214994.1	XP_003215042.1
44	AcGSTP2	XM_003215081.1	XP_003215129.1
45	AcGSTO1	XM_003218515.1	XP_003218563.1
46	AcGSTT1	XM_003230159.1	XP_003230207.1
47	AcGSTT2	XM_003230161.1	XP_003230209.1
48	AcGSTZ1	XM_003214371.1	XP_003214419.1
49	AcGSTK1	XM_003226455.1	XP_003226503.1
50	AcMGST1	XM_003225957.1	XP_003226005.1
51	AcMGST3	XM_003226718.1	XP_003226766.1
52	AcLTC4S	ENSACAG00000029619	ENSACAP00000022630
53	AcFLAP	XM_003219166.1	XP_003219214.1
54	AcPTGES	XM_003230516.1	XP_003230564.1
55	XtGsta1	NM_001016676.2	NP_001016676.1
56	XtGsta2	BC167922.1	AAI67922.1
57	XtGsta3	XM_004914490.1	XP_004914547.1
58	XtGstm1	NM_001004964.1	NP_001004964.1
59	XtGstp1	BC135948.1	AAI35949.1
60	XtGstp2	XM_002941946.2	XP_002941992.2
61	XtGstp3	XM_004917570.1	XP_004917627.1
62	XtGsto1	NM_001005086.2	NP_001005086.1
63	XtGsto2	NM_001011256.1	NP_001011256.1
64	XtGstt1	NM_001006810.1	NP_001006811.1
65	XtGstt2	XM_002931911.2	XP_002931957.2
66	XtGstz1	XM_002938867.2	XP_002938913.1
67	XtGstk1	NM_001011244.1	NP_001011244.1
68	XtGstk2	XM_004915803.1	XP_004915860.1
69	XtMgst1	NM_001011245.1	NP_001011245.1
70	XtMgst2	NM_001113155.1	NP_001106626.1
71	XtMgst3	NM_001006889.2	NP_001006890.1
72	XtLtc4s	NM_001113094.1	NP_001106565.1
73	XtFlap	NM_001032320.1	NP_001027491.1
74	XtPtges	NM_001113664.1	NP_001107136.1
75	DrGsta1	NM_001109731.1	NP_001103201.1
76	DrGsta2	NM_213394.1	NP_998559.1
77	DrGsta3	NM_001102648.1	NP_001096118.1
78	DrGstm1	NM_212676.1	NP_997841.1
79	DrGstm2	NM_001110116.1	NP_001103586.1
80	DrGstm3	NM_001162851.1	NP_001156323.1
81	DrGstp1	NM_131734.3	NP_571809.1
82	DrGstp2	NM_001020513.1	NP_001018349.1
83	DrGsto1	NM_001002621.1	NP_001002621.1
84	DrGsto2	NM_001007372.1	NP_001007373.1

(наставка) ПРИЛОГ 2. Анотације и приступни бројеви секвенци у базама података протеина употребљених у филогенетској анализи суперпородице *Gst* код хордата.

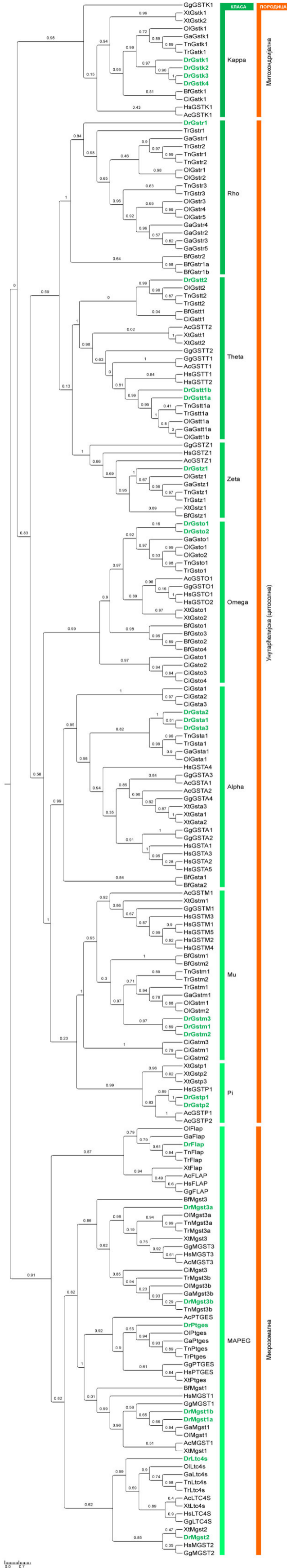
85	DrGstt1a	BC058294.1/XM_687335	XP_692427.1
86	DrGstt1b	NM_200584.1	NP_956878.1
87	DrGstt2	NM_200521.1	NP_956815.1
88	DrGstz1	NM_001030271.1	NP_001025442.1
89	DrGstr1	NM_001045060.2	NP_001038525.1
90	DrGstk1	NM_001002560.1	NP_001002560.1
91	DrGstk2	XM_001922164.3	XP_001922199.1
92	DrGstk3	XM_003200212.2	XP_003200260.2
93	DrGstk4	NM_001040300.1	NP_001035390.1
94	DrMgst1a	NM_001002215.1	NP_001002215.1
95	DrMgst1b	NM_001005957.1	NP_001005957.1
96	DrMgst2	NM_001045302.2	NP_001038767.1
97	DrMgst3a	NM_213427.1	NP_998592.1
98	DrMgst3b	NM_001080034.2	NP_001073503.1
99	DrLtc4s	XM_003199867.2	XP_003199915.1
100	DrFlap	NM_200061.1	NP_956355.1
101	DrPtges	NM_001014828.2	NP_001014828.1
102	GaGsta1	ENSGACG00000006489	ENSGACP00000008615
103	GaGstm1	ENSGACG00000007655	ENSGACP00000010161
104	GaGsto1	ENSGACG00000009287	ENSGACP00000012264
105	GaGstt1a	ENSGACG00000014744	ENSGACP00000019485
106	GaGstz1	ENSGACG00000007752	ENSGACP00000010286
107	GaGstr1	ENSGACG00000007537	ENSGACP00000010000
108	GaGstr2	ENSGACG00000007518	ENSGACP00000009987
109	GaGstr3	GENSCAN00000020241	GENSCAN00000020241*
110	GaGstr4	GENSCAN00000020247	GENSCAN00000020247*
111	GaGstr5	GENSCAN00000020249	GENSCAN00000020249*
112	GaGstk1	ENSGACG00000010408	ENSGACP00000013781
113	GaMgst1	ENSGACG00000019267	ENSGACP00000025469
114	GaMgst3b	ENSGACG00000007329	ENSGACP00000009736
115	GaLtc4s	ENSGACG00000016900	ENSGACP00000022321
115	GaFlap	ENSGACG00000020547	ENSGACP00000027165
117	GaPtges	ENSGACG00000015945	ENSGACP00000021045
118	TnGsta1	ENSTNIG00000016557	ENSTNIP00000019657
119	TnGstm1	ENSTNIG00000015146	ENSTNIP00000018200
120	TnGsto1	ENSTNIG00000013320	ENSTNIP00000001174
121	TnGstt1a	ENSTNIG00000002460	ENSTNIP00000005001
122	TnGstt2	ENSTNIG00000004422	ENSTNIP00000007059
123	TnGstz1	ENSTNIG00000017392	ENSTNIP00000020531
124	TnGstr1	GENSCAN00000042414	CAF99459.1
125	TnGstr2	ENSTNIG00000009231	ENSTNIP00000012096
126	TnGstr3	ENSTNIG00000009230	ENSTNIP00000012095
127	TnGstk1	ENSTNIG00000001719	ENSTNIP00000002129
128	TnMgst3a	ENSTNIG00000007858	ENSTNIP00000010678
129	TnMgst3b	ENSTNIG00000016913	ENSTNIP00000020032

(наставак) ПРИЛОГ 2. Анотације и приступни бројеви секвенци у базама података протеина употребљених у филогенетској анализи суперпородице <i>Gst</i> код хордата.			
130	TnLtc4s	ENSTNIG00000012964	ENSTNIP00000015943
131	TnFlap	ENSTNIG00000009910	ENSTNIP00000012802
132	TnPtges	ENSTNIG00000007499	ENSTNIP00000010308
133	TrGsta1	ENSTRUG00000014918	ENSTRUP00000038132
134	TrGstm1	ENSTRUG00000001751	ENSTRUP00000004010
135	TrGstm2	ENSTRUG00000006620	ENSTRUP00000016278
136	TrGsto1	ENSTRUG00000009691	ENSTRUP00000024351
137	TrGstt1a	ENSTRUG00000009188	ENSTRUP00000023119
138	TrGstt2	ENSTRUG00000013937	ENSTRUP00000035644
139	TrGstz1	ENSTRUG00000018231	ENSTRUP00000046665
140	TrGstr1	ENSTRUG00000014824	ENSTRUP00000037866
141	TrGstr2	ENSTRUG00000014824	ENSTRUP00000037869
142	TrGstr3	ENSTRUG00000014824	ENSTRUP00000037868
143	TrGstk1	ENSTRUG00000014778	ENSTRUP00000037765
144	TrMgst3a	ENSTRUG00000000749	ENSTRUP00000001801
145	TrMgst3b	ENSTRUG00000001586	ENSTRUP00000003649
146	TrLtc4s	ENSTRUG00000006092	ENSTRUP00000014804
147	TrFlap	ENSTRUG00000017324	ENSTRUP00000044382
148	TrPtges	ENSTRUG00000018415	ENSTRUP00000047141
149	OIGsta1	ENSORLG00000009674	ENSORLP00000012132
150	OIGstm1	ENSORLG00000005927	ENSORLP00000007456
151	OIGstm2	ENSORLG00000005961	ENSORLP00000007503
152	OIGsto1	ENSORLG00000006192	ENSORLP00000007787
153	OIGsto2	ENSORLG00000006201	ENSORLP00000007797
154	OIGstt1a	XM_004085912.1	XP_004085960.1
155	OIGstt1b	XM_004086462.1	XP_004086510.1
156	OIGstt2	ENSORLG00000020134	ENSORLP00000024982
157	OIGstz1	ENSORLG00000016318	ENSORLP00000020426
158	OIGstr1	XM_004074399.1	XP_004074447.1
159	OIGstr2	ENSORLG00000013712	ENSORLP00000017200
160	OIGstr3	XM_004074396.1	XP_004074444.1
161	OIGstr4	XM_004074397.1	XP_004074445.1
162	OIGstr5	ENSORLG00000019461	ENSORLP00000024221
163	OIGstk1	XM_004077966.1	XP_004078014.1
164	OIMgst1	ENSORLG00000010999	ENSORLP00000013794
165	OIMgst3a	ENSORLG00000010182	ENSORLP00000012767
166	OIMgst3b	ENSORLG00000017532	ENSORLP00000021934
167	OILtc4s	XM_004084926.1	XP_004084974.1
168	OIFlap	ENSORLG00000003412	ENSORLP00000004240
169	OIPtges	ENSORLG00000003915	ENSORLP00000004887
170	BfGsta1	XM_002590247.1	216204
171	BfGsta2	XM_002604101.1	208101
172	BfGstm1	XM_002593127.1	124836
173	BfGstm2	XM_002593127.1	72748
174	BfGsto1	XM_002588688.1	284880

(наставак) ПРИЛОГ 2. Анотације и приступни бројеви секвенци у базама података протеина употребљених у филогенетској анализи суперпородице Gst код хордата.			
175	BfGsto2	XM_002588684.1	100190
176	BfGsto3	XM_002588684.1	100214
177	BfGsto4	XM_002588684.1	101492
178	BfGstt1	XM_002605799.1	126041
179	BfGstz1	XM_002589184.1	120766
180	BfGstr1a	XM_002612461.1	218966
181	BfGstr1b	XM_002612462.1	214367
182	BfGstr2	XM_002612461.2	93284
183	BfGstk1	XM_002591555.1	281070
184	BfMgst1	XM_002595608.1	260006
185	BfMgst3	XM_002612186.1	269443
186	CiGsta1	XM_002120490.1	XP_002120526.1
187	CiGsta2	XM_002120365.2	XP_002120401.2
188	CiGsta3	XM_002119748.2	XP_002119784.1
189	CiGstm1	XM_002129080.1	XP_002129116.1
190	CiGstm2	XM_002129159.2	XP_002129195.1
191	CiGstm3	XM_002129097.1	XP_002129133.1
192	CiGsto1	XM_002122889.2	XP_002122925.1
193	CiGsto2	XM_002122657.2	XP_002122693.1
194	CiGsto3	XM_002126602.2	XP_002126638.2
195	CiGsto4	XM_002123868.1	XP_002123904.1
196	CiGstt1	XM_002119758.1	XP_002119794.1
197	CiGstk1	XM_002126488.2	XP_002126524.1
198	CiMgst3	ENSCING00000001082	ENSCINP00000002062

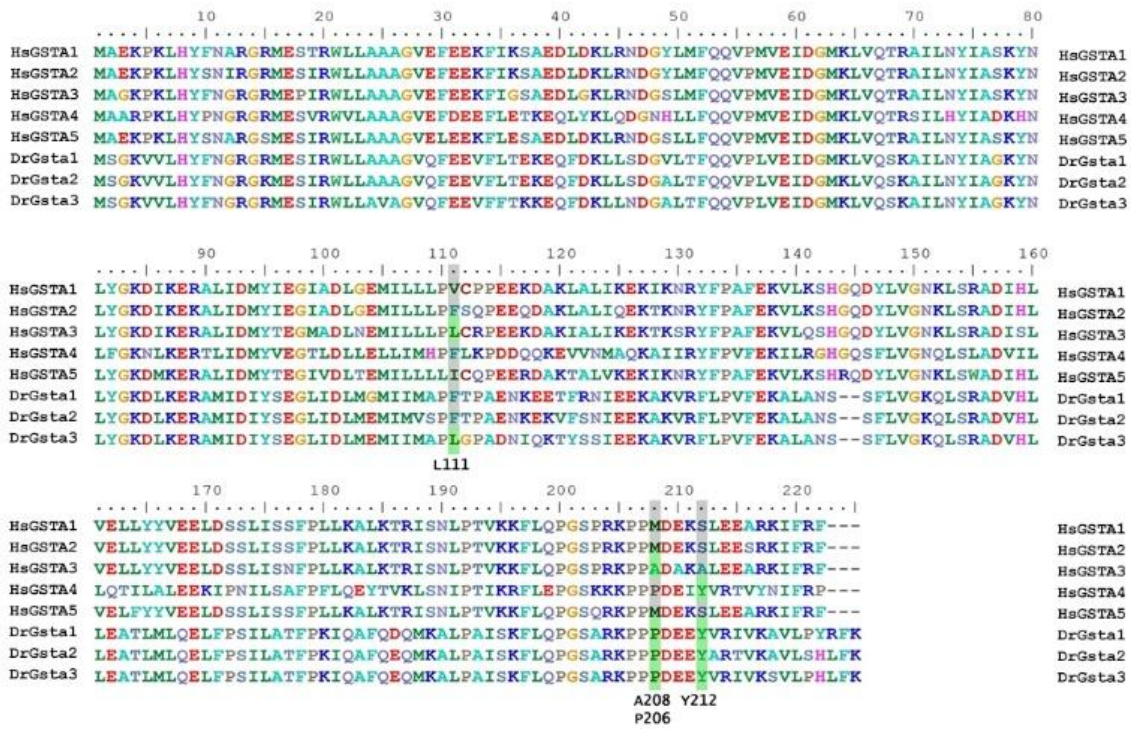
* Предвиђена секвенца транскрипта.

ПРИЛОГ 3. Филогенетско стабло ензимске суперпородице GST (Hs, *H. sapiens*; Gg, *G. gallus*; Ac, *A. carolinensis*; Xt, *X. tropicalis*; Dr, *D. rerio*; Ga, *G. aculeatus*; Tn, *T. nigroviridis*; Tr, *T. rubripes*; Ol, *O. latipes*; Bf, *B. floridae*; Ci, *C. intestinalis*). Стабло је конструисано у оквиру *PhyML* програма (енгл. *maximum likelihood method*). Бројеви на гранама представљају процену нивоа поузданости клада унутар филогенетског стабла (енгл. *bootstrap values*).

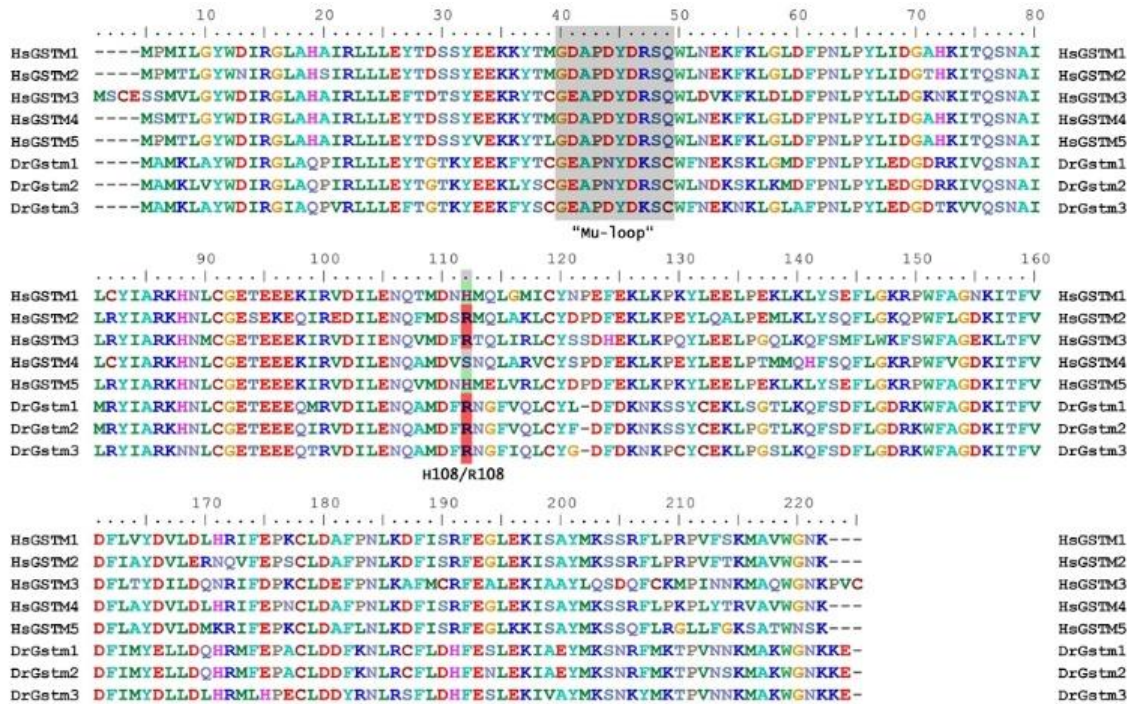


ПРИЛОГ 5. Вишеструко поравнање изведених низова аминокиселина GST/Gst протеина човека (Hs, *Homo sapiens*) и зебрице (Dr, *Danio rerio*): (A) Alpha, (B) Mu, (B) Pi, (Г) Theta, (Д) Zeta, (Ђ) Omega, (E) MAPEG (Mgst) класа. Вишеструко поравнање направљено је ClustalW методом у BioEdit програмском пакету.

A)

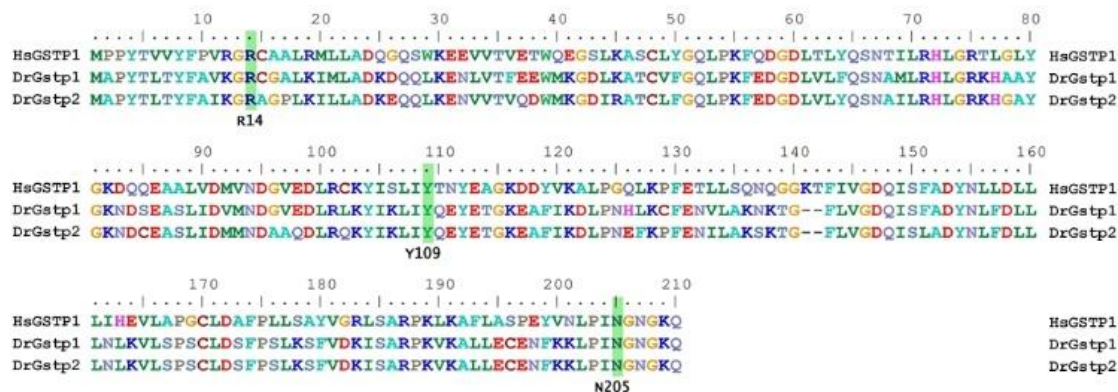


B)

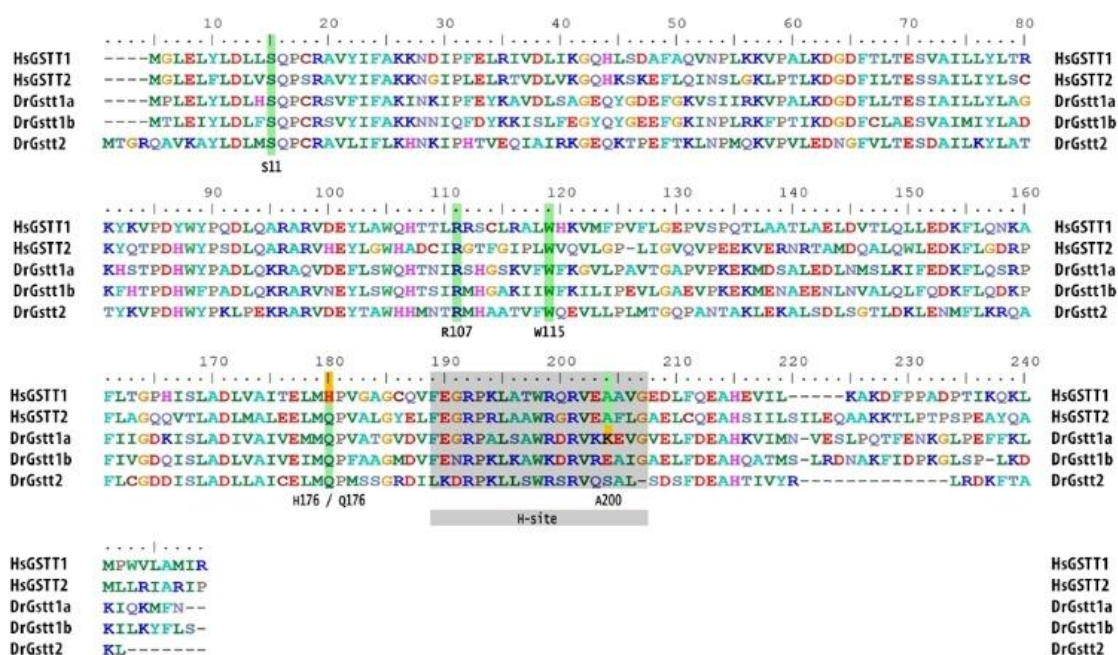


(наставак) ПРИЛОГ 5. Вишеструко поравнање изведених низова аминокиселина GST/Gst протеина човека (Hs, *Homo sapiens*) и зебрице (Dr, *Danio rerio*).

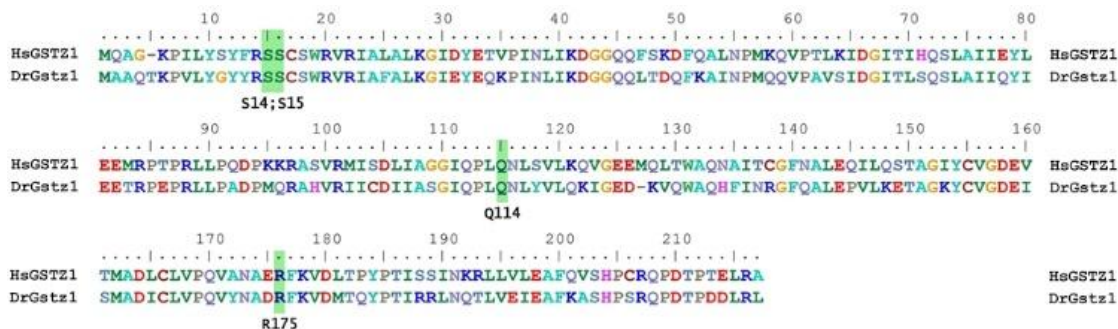
B)



Г)

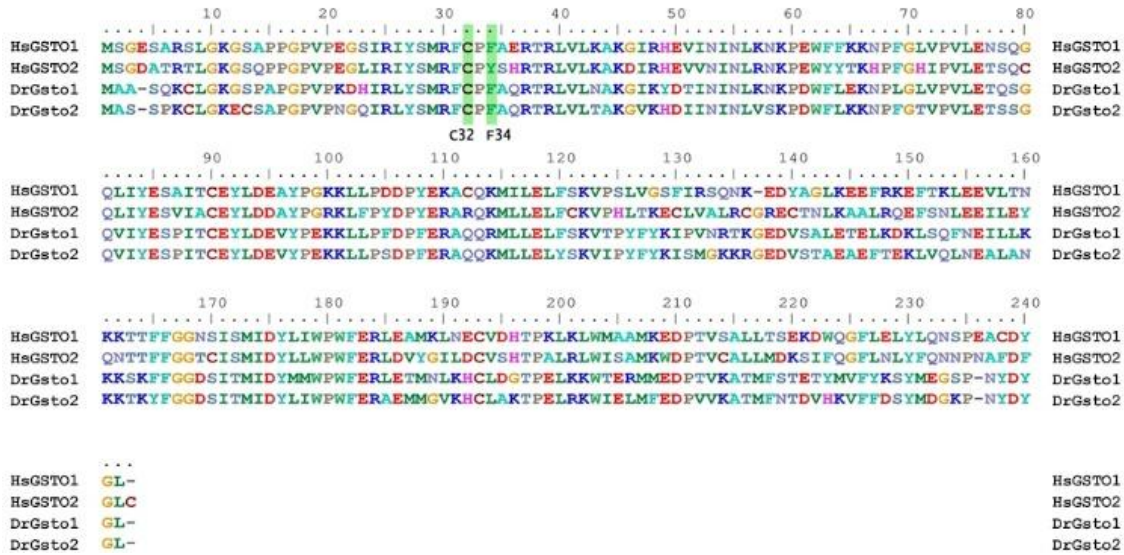


Д)

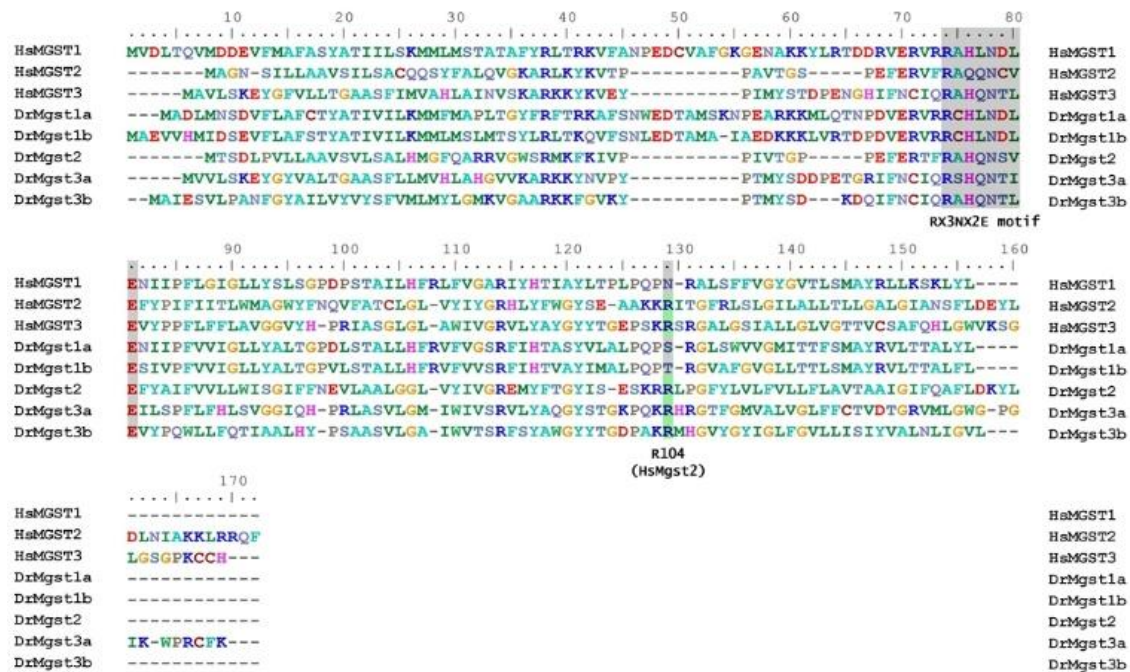


(наставак) ПРИЛОГ 5. Вишеструко поравнање изведених низова аминокиселина GST/Gst протеина човека (Hs, *Homo sapiens*) и зебрице (Dr, *Danio rerio*).

Ђ)



Е)



ПРИЛОГ 6. Статистичка анализа повећања нивоа иРНК *gst* gena зebreце поређењем различитих ткива (резултати су приказани на сликама 5.11 и 5.12): (А) *gst1-3* и *gstm1-3*, (Б) *gstp1-2* и *gstt1a*, (В) *gstt1b* и *gstt2*, (Г) *gstol1* и *gstol2*, (Д) *gstz1* и *gstz1*, (Ђ) *mgst1a* и *mgst1b*, (Е) *mgst2*, (Ж) *mgst3a* и *mgst3b*. Подаци су анализирани методом једносмерне анализе варијансе (*ANOVA*), употребом *post hoc Tukey* теста. *** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; нсз - нема статистичке значајности; Ј – јетра, Б – бубрег, Ш – шкрге, Ц – црево, М – мозак, Јај – јајници, Т – тестис. Зелена боја означава повећан ниво транскрипата у ткиву наведеном у датом реду у поређењу са оним у датој колони.

А)

	Женке						Мужјаци						
	<i>gst1-3</i>						<i>gst1-3</i>						
	Ј	Б	Ш	Ц	М	Јај	Ј	Б	Ш	Ц	М	Т	
Јетра	-	нсз	нсз	нсз	нсз	нсз	Јетра	-	нсз	нсз	*	нсз	***
Бубрег	нсз	-	нсз	нсз	нсз	нсз	Бубрег	нсз	-	нсз	**	нсз	***
Шкрге	нсз	нсз	-	нсз	нсз	нсз	Шкрге	нсз	нсз	-	***	*	***
Црево	нсз	нсз	нсз	-	нсз	нсз	Црево	*	**	***	-	*	***
Мозак	нсз	нсз	нсз	нсз	-	нсз	Мозак	нсз	нсз	*	*	-	***
Јајници	нсз	нсз	нсз	нсз	нсз	-	Тестис	***	***	***	***	***	-
	<i>gstm1-3</i>						<i>gstm1-3</i>						
	Ј	Б	Ш	Ц	М	Јај	Ј	Б	Ш	Ц	М	Т	
Јетра	-	*	нсз	нсз	**	***	Јетра	-	нсз	нсз	нсз	**	***
Бубрег	*	-	нсз	*	нсз	нсз	Бубрег	нсз	-	нсз	нсз	**	***
Шкрге	нсз	нсз	-	нсз	*	**	Шкрге	нсз	нсз	-	нсз	**	***
Црево	нсз	*	нсз	-	**	***	Црево	нсз	нсз	нсз	-	**	***
Мозак	**	нсз	*	**	-	нсз	Мозак	**	**	**	**	-	нсз
Јајници	***	нсз	**	***	нсз	-	Тестис	***	***	***	***	нсз	-

Б)

	Женке						Мужјаци						
	<i>gstp1-2</i>						<i>gstp1-2</i>						
	Ј	Б	Ш	Ц	М	Јај	Ј	Б	Ш	Ц	М	Т	
Јетра	-	*	**	**	***	***	Јетра	-	нсз	нсз	нсз	нсз	нсз
Бубрег	*	-	нсз	нсз	нсз	***	Бубрег	нсз	-	нсз	нсз	нсз	нсз
Шкрге	**	нсз	-	нсз	нсз	***	Шкрге	нсз	нсз	-	нсз	нсз	нсз
Црево	**	нсз	нсз	-	нсз	***	Црево	нсз	нсз	нсз	-	нсз	нсз
Мозак	***	нсз	нсз	нсз	-	***	Мозак	нсз	нсз	нсз	нсз	-	нсз
Јајници	***	***	***	***	***	-	Тестис	нсз	нсз	нсз	нсз	нсз	-
	<i>gstt1a</i>						<i>gstt1a</i>						
	Ј	Б	Ш	Ц	М	Јај	Ј	Б	Ш	Ц	М	Т	
Јетра	-	нсз	*	*	*	*	Јетра	-	***	***	***	***	***
Бубрег	нсз	-	*	**	**	*	Бубрег	***	-	***	***	**	нсз
Шкрге	*	*	-	нсз	нсз	нсз	Шкрге	***	***	-	нсз	нсз	*
Црево	*	**	нсз	-	нсз	нсз	Црево	***	***	нсз	-	нсз	*
Мозак	*	**	нсз	нсз	-	нсз	Мозак	***	**	нсз	нсз	-	нсз
Јајници	*	*	нсз	нсз	нсз	-	Тестис	***	нсз	*	*	нсз	-

(наставка) ПРИЛОГ 6. Статистичка анализа повећања нивоа иРНК *gst* гена зебрице поређењем различитих ткива.

В)

	Женке						Мужјаци						
	<i>gst1b</i>						<i>gst1b</i>						
	J	Б	Ш	Ц	М	Јај	J	Б	Ш	Ц	М	Т	
Јетра	-	нсз	нсз	нсз	нсз	***	Јетра	-	нсз	нсз	нсз	нсз	нсз
Бубрег	нсз	-	нсз	нсз	нсз	*	Бубрег	нсз	-	нсз	нсз	нсз	нсз
Шкрге	нсз	нсз	-	нсз	нсз	*	Шкрге	нсз	нсз	-	нсз	нсз	нсз
Црево	нсз	нсз	нсз	-	нсз	**	Црево	нсз	нсз	нсз	-	нсз	нсз
Мозак	нсз	нсз	нсз	нсз	-	***	Мозак	нсз	нсз	нсз	нсз	-	нсз
Јајници	***	*	*	**	***	-	Тестис	нсз	нсз	нсз	нсз	нсз	-
	<i>gst2</i>						<i>gst2</i>						
	J	Б	Ш	Ц	М	Јај	J	Б	Ш	Ц	М	Т	
	Јетра	-	нсз	нсз	нсз	нсз	нсз	Јетра	-	нсз	нсз	нсз	нсз
Бубрег	нсз	-	нсз	нсз	нсз	нсз	Бубрег	нсз	-	нсз	нсз	нсз	нсз
Шкрге	нсз	нсз	-	нсз	нсз	нсз	Шкрге	нсз	нсз	-	нсз	нсз	нсз
Црево	нсз	нсз	нсз	-	нсз	нсз	Црево	нсз	нсз	нсз	-	нсз	нсз
Мозак	нсз	нсз	нсз	нсз	-	нсз	Мозак	нсз	нсз	нсз	нсз	-	нсз
Јајници	нсз	нсз	нсз	нсз	нсз	-	Тестис	нсз	нсз	нсз	нсз	нсз	-

Г)

	Женке						Мужјаци						
	<i>gst1</i>						<i>gst1</i>						
	J	Б	Ш	Ц	М	Јај	J	Б	Ш	Ц	М	Т	
Јетра	-	нсз	нсз	нсз	***	нсз	Јетра	-	нсз	нсз	*	нсз	нсз
Бубрег	нсз	-	нсз	нсз	***	нсз	Бубрег	нсз	-	нсз	*	нсз	нсз
Шкрге	нсз	нсз	-	нсз	**	нсз	Шкрге	нсз	нсз	-	*	нсз	нсз
Црево	нсз	нсз	нсз	-	*	нсз	Црево	*	*	*	-	нсз	нсз
Мозак	***	***	**	*	-	***	Мозак	нсз	нсз	нсз	нсз	-	нсз
Јајници	нсз	нсз	нсз	нсз	***	-	Тестис	нсз	нсз	нсз	нсз	нсз	-
	<i>gst2</i>						<i>gst2</i>						
	J	Б	Ш	Ц	М	Јај	J	Б	Ш	Ц	М	Т	
	Јетра	-	нсз	нсз	нсз	нсз	***	Јетра	-	нсз	нсз	нсз	нсз
Бубрег	нсз	-	нсз	нсз	нсз	***	Бубрег	нсз	-	нсз	нсз	нсз	нсз
Шкрге	нсз	нсз	-	нсз	нсз	***	Шкрге	нсз	нсз	-	нсз	нсз	нсз
Црево	нсз	нсз	нсз	-	нсз	***	Црево	нсз	нсз	нсз	-	нсз	нсз
Мозак	нсз	нсз	нсз	нсз	-	***	Мозак	нсз	нсз	нсз	нсз	-	нсз
Јајници	***	***	***	***	***	-	Тестис	нсз	нсз	нсз	нсз	нсз	-

(наставка) ПРИЛОГ 6. Статистичка анализа повећања нивоа иРНК *gst* гена зебрице поређењем различитих ткива.

Д)

	Женке						Мужјаци						
	<i>gstl</i>						<i>gstl</i>						
	Ј	Б	Ш	Ц	М	Јај	Ј	Б	Ш	Ц	М	Т	
Јетра	-	нсз	нсз	*	нсз	нсз	Јетра	-	**	**	**	нсз	**
Бубрег	нсз	-	*	*	нсз	нсз	Бубрег	**	-	нсз	нсз	нсз	нсз
Шкрге	нсз	*	-	нсз	нсз	нсз	Шкрге	**	нсз	-	нсз	нсз	нсз
Црево	*	*	нсз	-	*	нсз	Црево	**	нсз	нсз	-	нсз	нсз
Мозак	нсз	нсз	нсз	*	-	нсз	Мозак	нсз	нсз	нсз	нсз	-	нсз
Јајници	нсз	нсз	нсз	нсз	нсз	-	Тестис	**	нсз	нсз	нсз	нсз	-
	<i>gstr1</i>						<i>gstr1</i>						
	Ј	Б	Ш	Ц	М	Јај	Ј	Б	Ш	Ц	М	Т	
	Јетра	-	***	нсз	нсз	**	нсз	Јетра	-	нсз	**	нсз	**
Бубрег	***	-	**	*	нсз	**	Бубрег	нсз	-	нсз	**	***	***
Шкрге	нсз	**	-	нсз	**	нсз	Шкрге	**	нсз	-	***	***	***
Црево	нсз	*	нсз	-	нсз	нсз	Црево	нсз	**	***	-	нсз	нсз
Мозак	**	нсз	**	нсз	-	**	Мозак	**	***	***	нсз	-	нсз
Јајници	нсз	**	нсз	нсз	**	-	Тестис	**	***	***	нсз	нсз	-

Ђ)

	Женке						Мужјаци						
	<i>mgst1a</i>						<i>mgst1a</i>						
	Ј	Б	Ш	Ц	М	Јај	Ј	Б	Ш	Ц	М	Т	
Јетра	-	нсз	*	***	**	***	Јетра	-	нсз	нсз	нсз	нсз	***
Бубрег	нсз	-	нсз	*	нсз	**	Бубрег	нсз	-	нсз	нсз	нсз	***
Шкрге	*	нсз	-	нсз	нсз	*	Шкрге	нсз	нсз	-	нсз	нсз	***
Црево	***	*	нсз	-	нсз	нсз	Црево	нсз	нсз	нсз	-	нсз	***
Мозак	**	нсз	нсз	нсз	-	нсз	Мозак	нсз	нсз	нсз	нсз	-	***
Јајници	***	**	*	нсз	нсз	-	Тестис	***	***	***	***	***	-
	<i>mgst1b</i>						<i>mgst1b</i>						
	Ј	Б	Ш	Ц	М	Јај	Ј	Б	Ш	Ц	М	Т	
	Јетра	-	нсз	нсз	нсз	***	нсз	Јетра	-	нсз	нсз	нсз	*
Бубрег	нсз	-	нсз	нсз	**	нсз	Бубрег	нсз	-	нсз	нсз	*	нсз
Шкрге	нсз	нсз	-	нсз	**	нсз	Шкрге	нсз	нсз	-	нсз	*	нсз
Црево	нсз	нсз	нсз	-	***	нсз	Црево	нсз	нсз	нсз	-	*	нсз
Мозак	***	**	**	***	-	**	Мозак	*	*	*	*	-	*
Јајници	нсз	нсз	нсз	нсз	**	-	Тестис	нсз	нсз	нсз	нсз	*	-

(наставкак) ПРИЛОГ 6. Статистичка анализа повећања нивоа иРНК *gst* гена зебрице поређењем различитих ткива.

Е)

	Женке						Мужјаци						
	<i>mgst2</i>						<i>mgst2</i>						
	Ј	Б	Ш	Ц	М	Јај	Ј	Б	Ш	Ц	М	Т	
Јетра	-	*	***	НСЗ	НСЗ	***	Јетра	-	НСЗ	НСЗ	НСЗ	НСЗ	НСЗ
Бубрег	*	-	НСЗ	НСЗ	НСЗ	***	Бубрег	НСЗ	-	НСЗ	НСЗ	НСЗ	НСЗ
Шкрге	***	НСЗ	-	НСЗ	НСЗ	***	Шкрге	НСЗ	НСЗ	-	НСЗ	НСЗ	НСЗ
Црево	НСЗ	НСЗ	НСЗ	-	НСЗ	***	Црево	НСЗ	НСЗ	НСЗ	-	НСЗ	НСЗ
Мозак	НСЗ	НСЗ	НСЗ	НСЗ	-	***	Мозак	НСЗ	НСЗ	НСЗ	НСЗ	-	НСЗ
Јајници	***	***	***	***	***	-	Тестис	НСЗ	НСЗ	НСЗ	НСЗ	НСЗ	-

Ж)

	Женке						Мужјаци						
	<i>mgst3a</i>						<i>mgst3a</i>						
	Ј	Б	Ш	Ц	М	Јај	Ј	Б	Ш	Ц	М	Т	
Јетра	-	НСЗ	НСЗ	***	НСЗ	***	Јетра	-	НСЗ	НСЗ	***	НСЗ	НСЗ
Бубрег	НСЗ	-	НСЗ	***	НСЗ	***	Бубрег	НСЗ	-	НСЗ	***	*	НСЗ
Шкрге	НСЗ	НСЗ	-	***	НСЗ	***	Шкрге	НСЗ	НСЗ	-	***	НСЗ	НСЗ
Црево	***	***	***	-	***	***	Црево	***	***	***	-	***	***
Мозак	НСЗ	НСЗ	НСЗ	***	-	***	Мозак	НСЗ	*	НСЗ	***	-	*
Јајници	***	***	***	***	***	-	Тестис	НСЗ	НСЗ	НСЗ	***	*	-
	<i>mgst3b</i>						<i>mgst3b</i>						
	Ј	Б	Ш	Ц	М	Јај	Ј	Б	Ш	Ц	М	Т	
	Ј	Б	Ш	Ц	М	Јај	Ј	Б	Ш	Ц	М	Т	
Јетра	-	НСЗ	НСЗ	НСЗ	*	**	Јетра	-	НСЗ	НСЗ	**	***	НСЗ
Бубрег	НСЗ	-	НСЗ	НСЗ	*	**	Бубрег	НСЗ	-	НСЗ	**	***	НСЗ
Шкрге	НСЗ	НСЗ	-	НСЗ	НСЗ	**	Шкрге	НСЗ	НСЗ	-	*	***	НСЗ
Црево	НСЗ	НСЗ	НСЗ	-	НСЗ	НСЗ	Црево	**	**	*	-	НСЗ	*
Мозак	*	*	НСЗ	НСЗ	-	НСЗ	Мозак	***	***	***	НСЗ	-	***
Јајници	**	**	**	НСЗ	НСЗ	-	Тестис	НСЗ	НСЗ	НСЗ	*	***	-

ПРИЛОГ 7. Изведени низ аминокиселина протеина Gstr1 зебрице. Црвена слова представљају аминокиселине чији остаци чине везно место глутатиона (**G место**), зелена боја представља аминокиселине чији остаци чине везно место хидрофобног супстрата (**H место**).

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      10          20          30          40          50
MAQNMLLYWG TGSPPCWRLM IALEEKQLQG YKHKLLSFDK KEHQSP EVKA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      60          70          80          90          100
LNPRALPTF KHGEIVVNES FAACLYLESV FKSQGTRLIP DNPAEMALVY

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     110          120          130          140          150
QRMFETENLQ QKMYEVAFYD WLVP EGERLE SALKRNKEKL IEELKLWEGY

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     160          170          180          190          200
LEKMGKGSYL AGKNFSMADV VCFPVIAYFP RLQCPKERCP RLMEYYEMVK

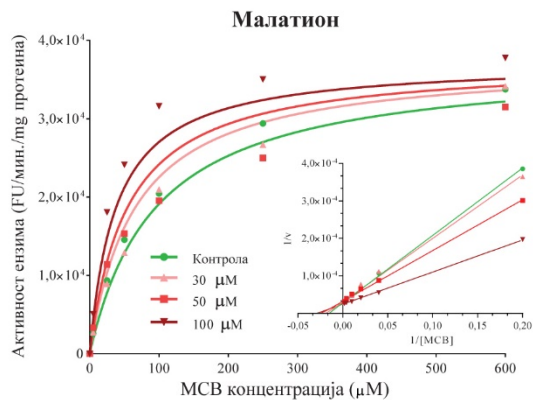
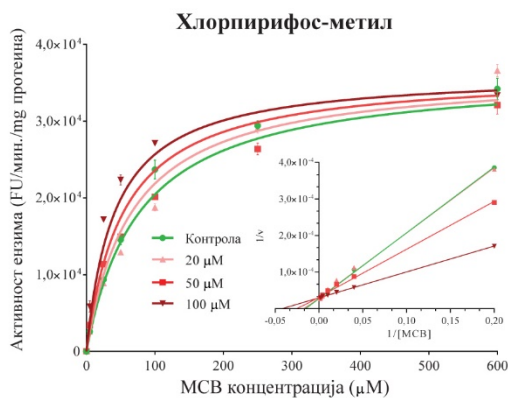
.....|.....| .....|.....| .....|
     210          220
DRPSIKASWP PEWLEKPVGE DILKSL
    
```

ПРИЛОГ 8. Вишеструко поравнање изведених низова аминокиселина протеина Gstt2 и Gstr1 зебрице. Бојом су обележене сличне и идентичне аминокиселине, док су само идентичне аминокиселине уоквирене. Вишеструко поравнање направљено је *ClustalW* методом у *BioEdit* програмском пакету.

```

      10          20          30          40          50
Gstt2  MTGRQAVKAYLDLMSQPCRAVLIIFLKHNKIP -HTVEQIAIRKGEQKTPEF
Gstr1  --MAQNMLLYWGTGSPPCWRLMIALEEKQLQGYKHKLLSFDKKEHQSP EV
      60          70          80          90          100
Gstt2  TKLNPQKVPVLEDNQFVLTESDAILKYLATTYKVP -DHWYPKLPEKRAR
Gstr1  KALNPRALPTFKHGEIVVNESFAACLYLESVFKSQGTRLIPDNPAEMAL
     110          120          130          140          150
Gstt2  VDEYTAWHHMNTRMHAATVFWQEVLLP ---LMTGQPANTAKLEKALS DL
Gstr1  VYQR -MFETENLQKQKMYEVAFYDVLVPEGERLESALKRNKEKLEELKLW
     160          170          180          190          200
Gstt2  SGTLDKLENMFLKRAFLCGDDSLADLLAICELMQP MSSGRDILKDRPK
Gstr1  EGYLEKMG ---KGSYLAGKNFSMADVVCFPVIAY -FRLQCPKERCP
     210          220          230          240
Gstt2  LMSWRSRVQSALS DSFDEAHTIVYRLRDKFTA LRLKITGGVSA LLDLV
Gstr1  LMEYYEMVKDRPS ---IKASWPP EWLEKPVGE DILKSL
    
```


ПРИЛОГ 9. Ефекат хлорпирифос-метила и малатиона на активност Gstr1. Ензимска активност испитана је у присуству МСВ (5–600 μM) и GSH (1 mM). Средња вредност \pm SEM и интервал поверења (95%) су израчунати на основу 4–6 поновака из три независна експеримента. Инсерти представљају *Lineweaver-Burk* графике којима се илуструје тип инхибиције.



ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА

4-HNE	4-хидроксиноненал (енгл. <i>4-hydroxynonenal</i>)
8-MOP	8-метоксипсорален (енгл. <i>8-methoxypsoraln</i>)
ABCC1– ABCCG2	(енгл. <i>ATP-binding cassette superfamily of transporters</i>)
ADME-Tox	(енгл. <i>absorption, distribution, metabolism, and excretion-toxicity</i>)
AFB1	афлатоксина Б1 (енгл. <i>aflatoxin B1</i>)
aLRT	(енгл. <i>approximate likelihood ratio test</i>)
AP-1	активатор протеин-1 (енгл. <i>activator protein-1</i>)
β-actin	актински протеин немишићних ћелија
ВНА	бутилирани хидроксианизол (енгл. <i>butylated hydroxyanisole</i>)
BL21	компетентне бактерије BL21 (енгл. <i>BL21-CodonPlus(DE3)-RIL competent bacteria</i>)
bp	базни парови (енгл. <i>base pair</i>)
BSA	албумин телећег серума (енгл. <i>bovine serum albumin</i>)
СВВ-G250	(енгл. <i>commassie brilliant blue G</i>)
CDNB	1-хлоро-2,4-динитро бензен (енгл. <i>1-chloro-2,4-dinitro benzene</i>)
Ch	хромозом (енгл. <i>chromosome</i>)
DCA	дихлорсирћетна киселина (енгл. <i>dichloroacetic acid</i>)
DEHP	ди(2-етилхексил)фталат (енгл. <i>diethylhexyl phthalate</i>)
DEP	ди(2-етил)фталат (енгл. <i>diethyl phthalate</i>)
DEPC	диетилпирокарбонат (енгл. <i>diethyl pyrocarbonate</i>)
DHEAS	дехидроепиандростерон-сулфат (енгл. <i>dehydroepiandrosterone sulfate</i>)
DHT	дихидротестостерон (енгл. <i>dihydrotestosterone</i>)
DMSO	диметил сулфоксид (енгл. <i>dimethyl sulfoxide</i>)
DsbA	бактеријски протеини повезани дисулфидним мостовима (енгл. <i>bacterial disulphide bonded proteins</i>)
E3S	естрон-3-сулфат (енгл. <i>estrone-3-sulfate</i>)
EC	Комисија за ензиме (енгл. <i>enzyme commission</i>)
ef1a	елонгациони фактор 1α (енгл. <i>elongation factor 1α</i>)
EROD	7-етоксирезорифин-О-деетилазна активност (енгл. <i>ethoxyresoufin-O-deethylase</i>)
ETA	етакринска киселина (енгл. <i>ethacrynic acid</i>)
FAA	4-фумарилацетоацетат (енгл. <i>fumarylacetoacetate</i>)
Flap	активирајући протеин 5-липоксигеназа (енгл. <i>5-lipoxygenase activating protein</i>)
FU	флуоресцентна јединица (енгл. <i>fluorescent unit</i>)
gapdh	глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа
GSH	глутатион (енгл. <i>glutathione, γ-L-glutamyl-L-cysteinyl-glycin</i>)
GST	глутатион-S-трансферазе (енгл. <i>glutathione-S-transferases</i>)
G-место	место за везивање глутатиона (енгл. <i>G-site, GSH-binding region</i>)
HGNC	(енгл. <i>HUGO Gene Nomenclature Committee</i>)
HLC	хијерархијско кластеровање (енгл. <i>hierarchical clustering</i>)
hpf	сати након фертилизације (енгл. <i>hours post fertilisation</i>)
HTS	претрага високог капацитета (енгл. <i>high-throughput screening</i>)
H-место	место за везивање хидрофобног супстрата (енгл. <i>hydrophobic H-site, substrate-binding site</i>)
IMAC	афинитетна хроматографија са имобилизованим металом

	(енгл. <i>immobilized-metal affinity chromatography</i>)
IPTG	изопропил β-D-1-тиогалактопиранозид (енгл. <i>isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>)
IUBMB	Међународна унија за биохемију и молекуларну биологију (енгл. <i>international union of biochemistry and molecular biology</i>)
JGI	(енгл. <i>Joint Genome Institute</i>)
JNK	(енгл. <i>c-Jun-N-terminal Kinase</i>)
lacZ	ген за бета-галактозидазу
LB	(енгл. <i>Laurie Broth</i>)
Ltc4s	леукотриен C4 синтаза (енгл. <i>leukotriene C4 synthase</i>)
MAA	4-малеилацетоацетат (енгл. <i>maleylacetoacetate</i>)
MAPEG	мембрански протеини повезани са метаболизмом еикозаноида и глутатиона (енгл. <i>membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism</i>)
MAPKs	митогенима активирани протеинске киназе (енгл. <i>mitogen-activated protein kinases</i>)
Mbp	мегабазни парови (енгл. <i>megabase pair</i>)
MCB	моноклорбиман (енгл. <i>monochlorobimane</i>)
MCS	секвенца за вишеструко клонирање
MeV	(енгл. <i>multi experiment viewer</i>)
Mgst	микрозомални ензими GST (енгл. <i>microsomal glutathione-S-transferase</i>)
MIF	(енгл. <i>migration inhibitory factor</i>)
MNE	средња вредност нормализованог експримирања (енгл. <i>mean normalized expression</i>)
NBDHEX	(енгл. <i>6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol</i>)
NCBI	(енгл. <i>National Center of Biotechnology Information</i>)
Ni-NTA	(енгл. <i>Ni²⁺-nitrilotriacetic acid</i>)
Nrf2	(енгл. <i>nuclear factor (erythroid-derived 2)-like</i>)
NTCP	(енгл. <i>sodium-taurocholate cotransporting polypeptide</i>)
OATPs	(енгл. <i>organic anion transporting polypeptides</i>)
OATs	(енгл. <i>organic anion transporters</i>)
OCTs	(енгл. <i>organic cation transporters</i>)
OD	оптичка густина (енгл. <i>optical density</i>)
PAHs	полициклични ароматични угљоводоници (енгл. <i>polyaromatic hydrocarbons</i>)
PCR	ланчана реакција полимеразе (енгл. <i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	база протеинских структура (енгл. <i>protein data bank</i>)
PFOA	перфлуорооктаноинска киселина (енгл. <i>perfluorooctanoic acid</i>)
PFOS	перфлуорооктансулфонска киселина (енгл. <i>perfluorooctanesulfonic acid</i>)
PGD2	простагландин D2 (енгл. <i>prostaglandin D2</i>)
PGE2	простагландин E2 (енгл. <i>prostaglandin E2</i>)
PGH2	простагландин H2 (енгл. <i>prostaglandin H2</i>)
PhyML	(енгл. <i>phylogenetic inferences using maximum likelihood</i>)
POPs	перзистентни органски полутанти (енгл. <i>persistent organic pollutants</i>)
PPCPs	лекови и средства за личну и кућну хигијену (енгл. <i>pharmaceuticals and personal care products</i>)
Ptges	простагландин E синтазе (енгл. <i>prostaglandin E synthase</i>)
qRT-PCR	(енгл. <i>quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>)
rpm	ротација по минути (енгл. <i>rotation per minute</i>)

s18	тип унутарћелијске рибозомалне рРНК молекуле
SDS-PAGE	Полиакриламид електрофореза са натријум додецилсулфатом (енгл. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SEM	стандардна грешка средње вредности (енгл. <i>standard error of mean</i>)
-SH	сулфхидрилна група (енгл. <i>sulfhydryl group</i>)
SOB	(енгл. <i>super optimal broth</i>)
SOC	SOB медијум обогаћен глукозом
TAE	(енгл. <i>tris-acetate-EDTA</i>)
tBHQ	терцијарни-бутил-хидрокинон (енгл. <i>tertiary-butylhydroquinone</i>)
TBS	(енгл. <i>tris base saline</i>)
TCDC	таурохенодеоксихолат (енгл. <i>taurochenodeoxycholate</i>)
TRAF2	(енгл. <i>tumor necrosis factor receptor-associated factor 2</i>)
TSD	кошљоробама-специфична генска дупликација (енгл. <i>teleost-specific genome duplication</i>)
Ugt	глукуронилтрансферазе (енгл. <i>UDP-glucuronosyltransferase</i>)
WEQ	(енгл. <i>Water Equivalent</i>)
X-gal	5-бромо-4-хлоро-3-индолил- β -D-галактопиранозид
кДНК	комплементарна ДНК

БИОГРАФИЈА

Бранка Башица (девојачко Глишић) рођена је у Новом Саду 1985. године. Као носилац Вукове дипломе завршила је гимназију у Новом Саду. Основне академске студије Молекуларне биологије уписала је 2004. године на Природно-математичком факултету Универзитета у Новом Саду, које је завршила 2008. године са просечном оценом 9,76. Звање Дипломирани биолог-мастер, молекуларни биолог стекла је 2009. године на истом факултету са постигнутом просечном оценом током студија 9,83.

Докторске академске студије Биологије, модул Молекуларна биологија еукариота, уписала је 2009. године, а реуписала 2017. године на Биолошком факултету Универзитета у Београду. На Природно-математичком факултету Универзитета у Новом Саду на пројекту Министарства науке и заштите животне средине Републике Србије као истраживач-приправник за ужу научну област Физиологија животиња изабрана је 2009. године. На пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије 2011. године изабрана је у звање истраживач-сарадник. Била је запослена у компанијама *BiologicsHub* и *Hybrid Power System*. Тренутно је запослена као помоћник уредника у издавачкој кући *MDPI*.

Током истраживачког рада била је укључена у реализацију два пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије и два SCOPES пројекта Швајцарске националне фондације за науку. Као први аутор објавила је два рада у међународним часописима изузетних вредности (M21a), један рад у врхунском међународном часопису (M21), седам конгресних саопштења на скуповима међународног значаја (M34) и четири конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја (M64). У коауторству је објавила један рад категорије M21a, шест радова категорије M21, три рада категорије M22, по један рад из категорија M23 и M51, као и многобројна конгресна саопштења.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Бранка Башица

Број индекса: M3009/2017

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Филогенетска анализа гена, развојна, ткивна и полна дистрибуција глутатион-S-трансфераза рибе зебрице – функционална карактеризација одабраних рекомбинантних протеина”

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Бранка Башица

Број индекса M3009/2017

Студијски програм Молекуларна биологија еукариота

Наслов рада „Филогенетска анализа гена, развојна, ткивна и полна дистрибуција глутатион-S-трансфераза рибе зебрице – функционална карактеризација одабраних рекомбинантних протеина”

Ментор др Радмила Ковачевић, професор емеритус и др Гордана Матић, редовни професор у пензији

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Филогенетска анализа гена, развојна, ткивна и полна дистрибуција глутатион-S-трансфераза рибе зебрице – функционална карактеризација одабраних рекомбинантних протеина”

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.