



**İNSAN PLASENTAL RİBONÜKLEAZ
İNHİBİTÖRÜNÜN HETEROLOG EKSPRESYONU
VE SAFLAŞTIRILMASI**

ÖZNUR CAN

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Dr. Öğr. Üyesi FATMA GEDİKLİ
Eylül – 2021
Her hakkı saklıdır**

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**İNSAN PLASENTAL RİBONÜKLEAZ İNHİBİTÖRÜNÜN
HETEROLOG EKSPRESYONU VE SAFLAŞTIRILMASI**

ÖZNUR CAN

TOKAT
2021

Her Hakkı Saklıdır

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

ÖZNUR CAN

13 Eylül 2021

ÖZET

DOKTORA TEZİ

İNSAN PLASENTAL RİBONÜKLEAZ İNHİBİTÖRÜNÜN HETEROLOG EKSPRESYONU VE SAFLAŞTIRILMASI

ÖZNUR CAN

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜYESİ FATMA GEDİKLİ)

İnsan plasental ribonükleaz inhibitörü (RI), in vivo olarak RNaz aktivitesini düzenleyen ve in vitro olarak RNaz kontaminasyonunun potansiyel bir problem olduğu çeşitli moleküler biyoloji uygulamalarında yaygın olarak kullanılan sitoplazmik bir proteindir. RI, hidrofobik lösin açısından zengin tekrar motiflerinden oluşması ve yüksek miktarda indirgenmiş sistein kalıntıları içermesi gibi benzersiz özellikleri ile ayırt edilmektedir. Rekombinant RI ekspresyonunun, *Escherichia coli* sitoplazmasında çözünür formda yüksek seviyelere ulaşması son derece zordur. Bu çalışmada RI' nın çözünür ifadesini geliştirmek için N-terminal füzyon ortağı, moleküler şaperonlar seti, indirgeyici ajanlar ve yeniden katlama prosedürleri kullanılmıştır. 6x-His etiketi, sfGFP füzyon etiketi ve TEV proteaz bölgesi içeren bir rekombinant ekspresyon vektörü oluşturularak, ekspresyon için konakçı organizma olarak *E. coli* BL21 (DE3) suşu tercih edilmiştir. Rekombinant plazmit, BL21 hücrelerine başarılı bir şekilde transforme edilmiştir. İnklüzyon cisimciklerinden geri kazanılan proteini saptamak için SDS-PAGE analizi gerçekleştirilmiştir. 78 kDa moleküler kütleye sahip tek bir bant gözlenmiştir. N terminal etiketi, doğal RI oluşturmak için üretilen TEV proteaz ile uzaklaştırılarak Ni-NTA agaroz ile protein saflaştırması yapılmıştır. RNA elektroforezi kullanılarak RI' nın aktif olduğu tespit edilmiştir.

2021, 106 Sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Ribonükleaz İnhibitörü, RNaz A, *E. coli*, rekombinant protein

ABSTRACT

DOCTORATE THESIS

HETEROLOGOUS EXPRESSION AND PURIFICATION OF HUMAN PLACENTAL RIBONUCLEASE INHIBITOR

ÖZNUR CAN

**TOKAT GAZİOSMANPAŞA UNIVERSITY
INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES**

DEPARTMENT OF BIOLOGY

(SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. FATMA GEDİKLİ)

Human placental ribonuclease inhibitor (RI) is a wide spread cytoplasmic protein regulating RNase activity in vivo and extensively used in a variety of molecular biology applications in vitro where RNase contamination is a potential problem. The RI is distinguished by its unique features, such as being hydrophobic leucine-rich repeat motifs and containing a high amount of reduced cysteine residues. The expression of recombinant RI is extremely difficult to reach high levels in soluble form in the cytoplasm of *Escherichia coli*. Here, we utilized N-terminal fusion partner, the set of molecular chaperones, reducing agents and refolding procedures to improve the soluble expression of RI. By constructing a recombinant expression vector containing 6x-His tag, *sfGFP* fusion tag and TEV protease cleavage site, *E. coli* BL21 (DE3) was preferred as a host strain for expression. The recombinant plasmid was efficiently transformed into competent BL21 host cells. The SDS-PAGE analysis was carried out to detect the expression of protein which recovered from the inclusion bodies. A single band with a molecular mass of 78 kDa was observed. N terminal tags were removed by TEV protease digestion to generate native RI and its purification was performed with Ni-NTA agarose. The activity of RI was determined by using RNA electrophoresis.

2021, 106 Pages

KEYWORDS: Ribonuclease Inhibitor, RNase A, *E. coli*, recombinant protein

ÖNSÖZ

Bu tezin tamamlanmasında yardımlarını esirgemeyen ve tecrübelerinden istifade ettiğim danışmanım Dr. Öğretim Üyesi Fatma GEDİKLİ'ye, Prof. Dr. İsa Gökçe ve ekibindeki hocalarıma, Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ'a, Arş. Gör. Çağlar BERKEL'e;

Her koşulda arkamda duran ve bana güç veren aileme;

Kendi ayakları üzerinde durabilen bir birey olmamı sağlayan, saye-i sakfında yetiştiğim biricik okulum, yuvam Dačka'ma;

Bir şekilde hayatıma dokunan ve bana emek veren herkese teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZNUR CAN

13 Eylül 2021

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISATLIMLAR	vi
ŞEKİL LİSTESİ	ix
ÇİZELGE LİSTESİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 RNA	9
2.2 Ribonükleazlar	13
2.3 RNaz A	23
2.4 Ribonükleaz İnhibitörleri (RI)	35
2.5 Rekombinant DNA Teknolojisi	51
3. MATERYAL VE YÖNTEM	61
3.1 Materyal	61
3.1.1 Laboratuvar ekipmanları	61
3.1.2 Kimyasallar	62
3.1.3 Suşlar ve vektörler	62
3.1.4 Antibiyotikler ve indükleyiciler	63
3.1.5 Besiyeri İçerikleri	63
3.1.6 Elektroforezde kullanılan reaktifler	63
3.1.7 Hücre parçalanması ve protein saflaştırmasında kullanılan reaktifler	65
3.1.8 Refolding işleminde kullanılan reaktifler	66
3.2 Yöntem	67
3.2.1 sfGFP-RI kimerik füzyon proteinini kodlayan gen bölgesini içeren ekspresyon vektörünün oluşturulması	67
3.2.2 Bakteriyel ekspresyon sisteminde sfGFP-RI üretimi	69
3.2.3 Şaperon sistemler ile koekspresyon	72
3.2.4 Yeniden katlama (Refolding)	73
3.2.5 TEV proteaz enziminin üretilmesi ve saflaştırılması	77
3.2.6 TEV proteaz kesimi	77

3.2.7 RI proteinin agaroz jel tabanlı aktivite tayini	78
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	81
4.1 <i>sf</i> GFP-RI Kimerik Füzyon Proteinini Kodlayan Geni İçeren Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması	81
4.2 Bakteriyel Ekspresyon Sisteminde <i>sf</i> GFP-RI Üretimi	81
4.2 Şaperon Sistemler ile Koekspresyon	82
4.3 Yeniden Katlama (Refolding)	85
4.4 TEV Proteaz Enziminin Üretilmesi ve Saflaştırılması.....	87
4.5 TEV Proteaz Kesimi	88
4.6 RI Proteinin Agaroz Jel Tabanlı Aktivite Tayini	89
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	92
6. KAYNAKÇA.....	96
ÖZGEÇMİŞ	106

SİMGELER VE KISALTMALAR

μL	Mikrolitre
6x-His	Hekza histidin
Å	Angstrom
ANG	Anjiyojenin
cDNA	Komplementer DNA
Cm	Kloramfenikol
Da	Dalton
DEPC	Dietil Pirokarbonat
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dsRNA	Çift İplikli RNA
DTT	Ditiyotreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
fM	Femtomolar
g	Gram
GST	Glutathione S-transferase
hRI	Human Placental Ribonuclease Inhibitor
IF2	Translation Initiation Factor 2 Domain I
IPTG	İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
K_i	İnhibisyon Sabiti
L	Litre
LRR	Leucine Rich Repeats
M	Molar
MBP	Maltose-binding Protein
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MsyB	<i>E.coli</i> Acidic Protein

Ni-NTA	Nikel-nitrilotriasetik Asit
nm	Nanometre
NusA	N-utilization Substance A
OD	Optik Dansite
pH	$-\log[H^+]$
pI	İzoelektrik Nokta
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RI	Ribonükleaz İnhibitörü
RNA	Ribonükleik Asit
RNaz	Ribonükleaz
RNaz A	Sığır Pankreatik Ribonükleaz A
rpm	Rotatory Per Minute (dakikadaki devir sayısı)
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforez
<i>sf</i> GFP	Superfolder Green Fluorescent Protein
ssRNA	Tek İplikli RNA
SUMO	Small Ubiquitin Modifying Protein
TAE	Tris Acetate EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TEV	Tobacco Etch Virus
Trx	Thioredoxin
UV	Ultraviolet
β -ME	β -Merkaptoetanol
μ M	Mikromolar

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2. 1. Crick' in santral dogma ile ilgili oluşturduğu kendi notlarına ait ilk taslak ...	3
Şekil 2. 2. Santral dogmada bilgi akışı	4
Şekil 2. 3. a. Koronavirüs (ssRNA) b. Rotavirüs (dsRNA)	5
Şekil 2. 4. Farklı virüs sınıflarının replikasyon ve transkripsiyon modlarının özeti	6
Şekil 2. 5. RNA replikasyonu ve reverse transkripsiyon	6
Şekil 2. 6. RNA ve DNA	8
Şekil 2. 7. Ribonükleotit yapısı.....	9
Şekil 2. 8. RNA ikincil yapısı	10
Şekil 2. 9. RNA' nın Yüksek Dereceli Katlanması	11
Şekil 2. 10. RNA çeşitleri	13
Şekil 2. 11. Ekzonükleaz ve endoribonükleazların kesim yerleri	15
Şekil 2. 12. Ekzoribonükleazlar ve endoribonükleazlar	16
Şekil 2. 13. Omurgalı RNaz süper ailesinin prototipi olan ribonükleaz A' nın üç boyutlu yapısının şerit diyagramı.....	24
Şekil 2. 14. RNA' nın degradasyonu	27
Şekil 2. 15. RNaz A substrat bağlama alt bölgeleri	29
Şekil 2. 16. RNaz A enzimin etki mekanizması	30
Şekil 2. 17. Kısalmış RNA formları	31
Şekil 2. 18. Ribonükleaz İnhibitörü	37
Şekil 2. 19. İnsan, domuz, fare ve sıçandan elde edilen RI amino asit dizilerinin hizalanması..	39
Şekil 2. 20. Sitotoksik RNazlar.....	41
Şekil 2. 21. RNaz A-RI kompleksinin yapısı.....	46
Şekil 2. 22. Rekombinant DNA teknolojisindeki genel işlemler.....	52
Şekil 2. 23. <i>E. coli</i> ' de rekombinant protein ekspresyonu için kullanılan bir plazmit vektörünün genel özellikleri	54
Şekil 2. 24. <i>E. coli</i> ' de gen ekspresyonu için en önemli üç bileşen	56
Şekil 2. 25. Yabancı genin ekspresyonu	57
Şekil 2. 26. <i>E. coli</i> sitozolünde şaperon aracılı protein katlanması	59
Şekil 2. 27. Bakteriyel inklüzyon cisimciklerinden biyoaktif protein izolasyonu	60
Şekil 3. 1. <i>sfGFP</i> -RI füzyon proteinini kodlayan geni içeren plazmit vektörün tasarlanması	67
Şekil 3. 2. <i>sfGFP</i> -RI' nın amino asit sekansı	68
Şekil 3. 3. pET30a(+) vektör haritası.....	69
Şekil 3. 4. Şaperon plazmitler	74
Şekil 3. 5. TEV proteaz ile kesim	78
Şekil 4. 1. <i>sfGFP</i> -RI' nın <i>E. coli</i> BL21 pLysE hücrelerinde üretimine ait SDS-PAGE görüntüsü	82
Şekil 4. 2. Protein agregasyonu	82

Şekil 4. 3. Şaperon sistemler ile koekspresyon	83
Şekil 4. 4. Şaperon proteinlerin üretimine ait SDS-PAGE görüntüsü	84
Şekil 4. 5. Sp1 ile büyük ölçekte üretim.	84
Şekil 4. 6. Poliakrilamid jelin UV’ deki görüntüsü	85
Şekil 4. 7. İnklüzyon cisimciklerinden <i>sf</i> GFP-RI proteinin yeniden kazanımı için kullanılan 1. prosedürün % 12’ lik SDS-PAGE’ de analizi.....	86
Şekil 4. 8. Poliakrilamid jelin UV’ deki görüntüsü	86
Şekil 4. 9. İnklüzyon cisimciklerinden <i>sf</i> GFP-RI proteinin yeniden kazanımı için kullanılan 2. prosedürün %12’ lik SDS-PAGE’ de analizi.....	87
Şekil 4. 10. TEV proteaz üretimine ait SDS-PAGE jel görüntüsü	88
Şekil 4. 11. <i>sf</i> GFP-RI proteininin TEV proteaz enzimi ile kesiminin % 12’ lik SDS- PAGE’ de analizi	90

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2. 1. Transfer dizisi	4
Çizelge 2. 2. RNazların ana işlevleri ve temsili örnekleri	15
Çizelge 2. 3. Omurgalılara özgü ribonükleaz ailesinin üyelerinin kaynağı ve işlevleri .	18
Çizelge 2. 4. RNaz A ile ilgili Nobel ödüllü çalışmalar	24
Çizelge 2. 5. <i>E. coli</i> ekspresyon sistemlerinin karakteristikleri.....	53
Çizelge 2. 6. Klonlamada kullanılan başlıca vektörler	54
Çizelge 2. 7. Vektör dizaynındaki değişkenler	55
Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılan ekipmanlar	61
Çizelge 3. 2. Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	62
Çizelge 3. 3. Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve indükleyiciler	63
Çizelge 3. 4. % 12' lik yürütme jeli tamponu ve % 4'lük yükleme jeli tamponunun içerikleri.....	64
Çizelge 3. 5. Kolondan saflaştırma işleminde kullanılan tamponlar	65
Çizelge 3. 6. Refolding işleminde kullanılan reaktifler (1)	66
Çizelge 3. 7. Refolding işleminde kullanılan reaktifler (2)	66
Çizelge 3. 8. Bu çalışmada kullanılan şaperon plazmitlerin listesi (Sp1-5)	73
Çizelge 3. 9. Kullanılan reaktiflerin hacimleri	80

1. GİRİŞ

Influenza, Zika, Ebola, Hepatit C, Kırım Kongo Kanamalı Ateşi, çocuk felci, kızamık ve son dönemde küresel olarak etkisini devam ettiren yeni tip korona (SARS-CoV-2) gibi virüsler insanlarda ciddi hastalıklara neden olan RNA virüsleridir (Bukasov ve ark., 2021). Viral enfeksiyonlarda hastalığın hızlı ve etkili bir şekilde tanısı hayati önem taşımaktadır. Öyle ki enfekte olanların bir bölümünde erken dönemde kişi hastalığın belirtilerini göstermemesine rağmen aktif olarak başkalarına virüs bulaştırabilmektedir (Barboza ve ark., 2020). COVID-19 pandemisiyle birlikte tanı teknolojilerinin önemi daha iyi anlaşılmıştır. RNA virüs enfeksiyonlarının erken evrede tanısı ve tedaviye verilen yanıtın takibinde Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyon (RT-PCR) yönteminin önemi tartışılmazdır (Kevadiya ve ark., 2021). Bu yöntemde hassas ve çabuk bozulabilir yapıda olan mRNA' nın stabilitesi için ortamdaki RNaz A' lardan arındırılması gerekmektedir. Oldukça aktif, dayanıklı ve her yerde bulunabilen RNaz A, ribonükleaz inhibitörlerinin (RI) yardımı ile uzaklaştırılabilmektedir.

RI, yaygın olarak RNA tabanlı tanı kitlerinde kullanılmaktadır (Qian ve ark., 2020). Ülkemizde kullanılan tıbbi tanı kitlerinin neredeyse tamamı yurt dışından ithal edildiğinden bu durum ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Ayrıca uluslararası giriş çıkışların yasaklandığı, çalışma kısıtlamalarının getirildiği pandemi sürecinde tedarik ile ilgili sıkıntılarda yaşanabilmektedir. Bu doğrultuda, tıbbi tanı kiti bileşenlerinden biri olması ve moleküler biyolojinin RNA temelli tüm çalışma alanlarında RNA bütünlüğünün korunması amaçlı ribonükleaz inhibitörü üretilmesi hedeflenmiştir.

RI-RNaz A etkileşimleri üzerine devam eden çalışmalar için büyük miktarda RI proteinine ihtiyaç duyulmaktadır. Maalesef RI' nın doğal kaynaklardan izolasyonu yoğun çaba gerektirmekte ve zaman almaktadır. RI' nın *Escherichia coli*' de rekombinant olarak üretilmesi bazı araştırmacılar tarafından çalışılmıştır. Fakat bu çalışmaların sonucuna göre *E. coli*' de üretilen RI' nın litre başına çözünür madde miktarı oldukça düşük olmuştur (Šiurkus ve Neubauer, 2011a).

E. coli' de rekombinant RI proteinlerinin ifadenme seviyelerini arttırmak amacıyla farklı yöntemler uygulanabilmektedir. Bunlar arasında RI' nın çözünürlüğünün geliştirilmesi için füzyon ekspresyonu en etkili olanıdır. MBP, GST, NusA, SUMO,

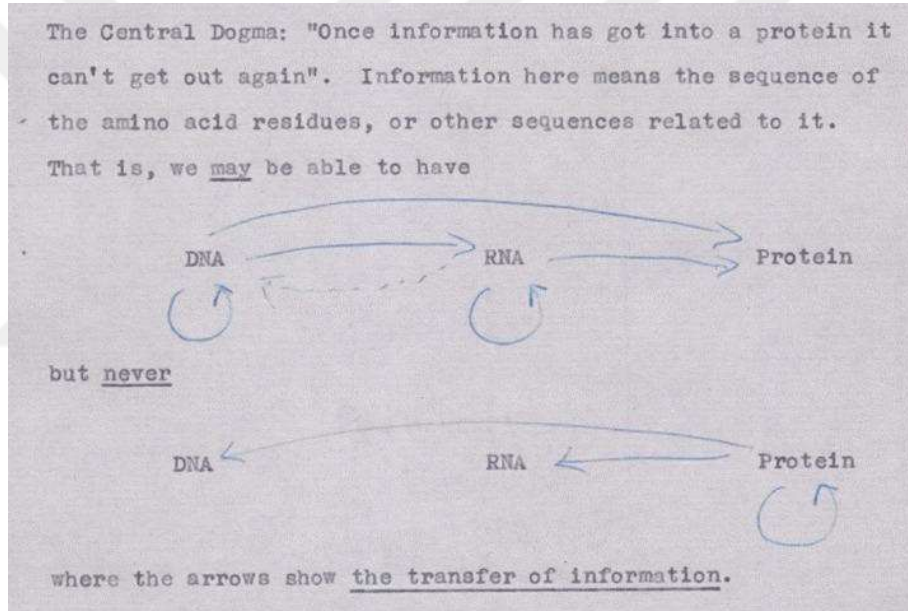
IF2, Trx ve MsyB olmak üzere füzyon motifleri olarak çeşitli yapılar kullanılmıştır (Dawei ve ark., 2019). RI-füzyon proteinlerinin oldukça aktif olduğu kanıtlanmıştır, bu da füzyon ortaklarının RI işlevine müdahale etmediğini göstermektedir (Guo ve ark., 2011).

Bu çalışmada da füzyon ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Daha önceki çalışmalardan farklı olarak RI, yeşil floresan proteini (GFP) analogu olan superfolder GFP “sfGFP” genine füzyon edilmiştir. sfGFP füzyonlarının, yüksek termodinamik stabilitesi, sağlam katlanma kinetiği ve çözünürlüğü söz konusudur (Solovyov ve ark., 2011). Bu özellikleri göz önünde bulundurarak, sfGFP-RI proteinin kodlayan geni içeren vektör, konak organizma *E. coli*’ye transforme edilmiştir. Ekspresyonu gerçekleştirilen füzyon protein, afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılmıştır. Füzyon olarak elde edilen protein aktivite gösteremediği için füzyon etiketini uzaklaştırmak adına TEV proteaz enzimi rekombinant olarak üretilip afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılmıştır. sfGFP-RI’ nın içerdiği TEV proteaz kesim bölgesi sayesinde kesim işlemi gerçekleştirilerek RI kolondan elüe edilmiştir. RI’ nın tek başına aktivite gösterebildiği, RNaz A’ yı inhibe edebildiği anlaşılmıştır.

Piyasada satılan yurt dışı menşei RI’ lar oldukça maliyetlidir. RI’ lara alternatif olarak kullanılan ve RNaz A’ yı etkin bir şekilde inaktive eden reaktifler tehlikeli kimyasallar içermektedir ve RNA’ nın yapısını bozabilmektedir. RI’ nın daha verimli ve aktif olarak üretilmesi için çeşitli iyileştirilmelere ihtiyaç duyulmaktadır. Gerekli optimizasyonlar sağlandığında RNaz A kontaminasyonunun potansiyel bir problem olduğu çeşitli moleküler biyoloji uygulamalarında kullanılması hedeflenmektedir.

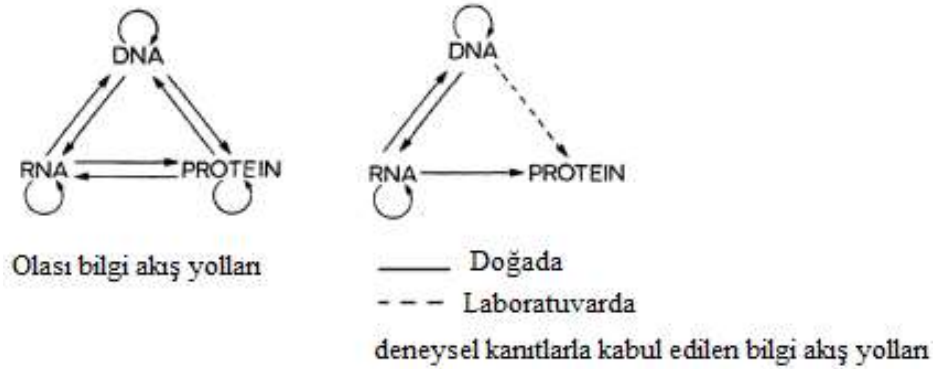
2. GENEL BİLGİLER

Moleküler biyolojinin bel kemiğini oluşturan “santral dogma”, DNA'dan RNA'ya ve proteinlere hücre içindeki genetik bilginin akışını tanımlamaktadır (Şekil 2.1). Canlılardaki genetik bilginin bu düzenli aktarımının milyonlarca yıldır değişmemesi, biyolojik geçerliliğinin ve evrimsel öneminin bir kanıtıdır. Bu, örneğin bir insan geninin (ökaryotik dünyadan) bir bakteriye (prokaryotik dünyadan) veya bir viral genin (hücresiz dünyadan) bir ökaryotik hücreye replikasyonunu, transkripsiyonunu veya translasyonunu mümkün kılmaktadır. Genom replikasyonu ve ekspresyonunda yer alan moleküler mekanizmalar evrenseldir (Gómez-Márquez, 2020).



Şekil 2. 1. Crick'in santral dogma ile ilgili oluşturduğu kendi notlarına ait ilk taslak (Cobb, 2017)

Dogmanın ana fikri, "bilginin" bir kez proteine geçtikten sonra tekrar dışarı çıkamayacağıdır. Yani; bilgi aktarımı yalnızca nükleik asitten nükleik asite veya nükleik asitten proteine mümkünken proteinden proteine veya proteinin nükleik aside aktarımı imkansızdır. Buradaki “bilgi” DNA ve RNA için nükleotit, proteinler için ise amino asit dizileridir. Bu akış yönü, son evrensel ortak atadan (LUCA- “Last Universal Common Ancestor”) beri tüm organizmalarda işlemiştir (Gillings ve Westoby, 2014).



Şekil 2. 2. Santral dogmada bilgi akışı (Graur, 2018)

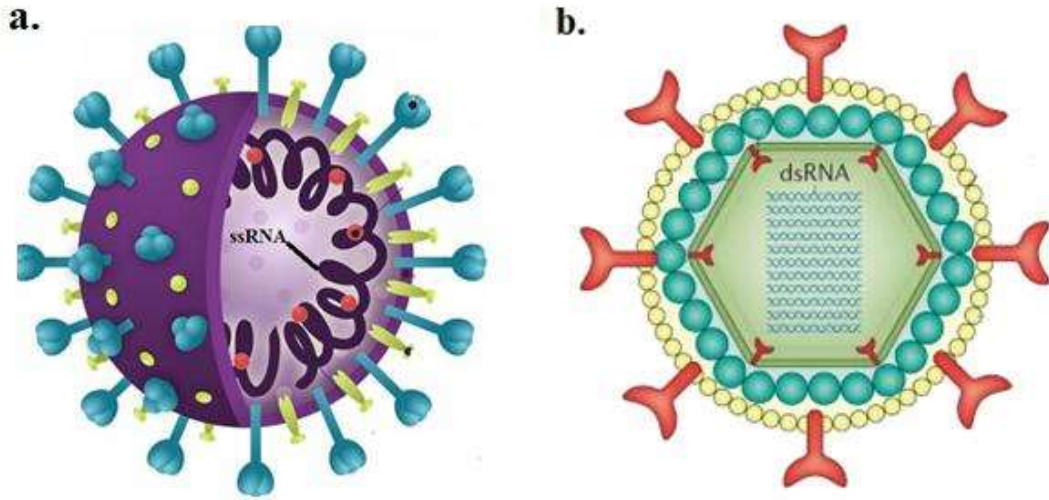
Bilgi, canlı organizmada en önemli biyopolimerler olan DNA, RNA ve proteinler arasında ardışık olarak transfer edilmektedir. Teorik olarak, dokuz olası aktarım vardır. Santral dogma, bunlardan yalnızca altısının kabul edilebilir olduğunu varsaymaktadır: DNA replikasyonu, RNA replikasyonu, transkripsiyon, Reverse (Ters) transkripsiyon, translasyon, DNA' dan proteine (Şekil 2.2). Bu dönüşümler genel aktarım, özel aktarım ve bilinmeyen aktarım olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır (Çizelge 2.1). Genel aktarım olağan biyolojik süreçlerde; özel aktarım yalnızca virüslerin dahil olduğu yerlerde veya laboratuvarıda gerçekleşmektedir; bilinmeyen transfer ise tespit edilmemiş teorik bir sınıftır ve bunun gerçekleşmediğine inanılıyor olsa da, prionlar istisna olarak kabul edilebilmektedir (Crick, 1970; Graur, 2018).

Çizelge 2. 1. Transfer dizisi (Gao ve ark., 2009)

Genel Transfer	Özel Transfer	Bilinmeyen Transfer
DNA → DNA	RNA → DNA	Protein → DNA
DNA → RNA	RNA → RNA	Protein → RNA
RNA → Protein	DNA → Protein	Protein → Protein

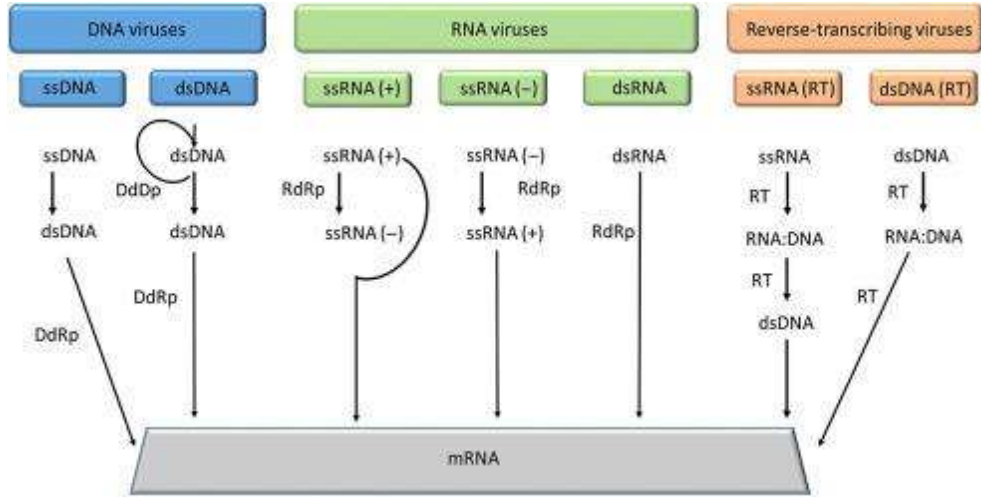
Bu sürecin ilk adımında DNA replikasyonu gerçekleşmektedir. DNA' nın kopyalandığı süreç olan replikasyon, ökaryotik hücre döngüsünde S fazı sırasında meydana gelmektedir. Daha sonra bir gendeki DNA dizisi, bilgilerini haberci RNA' ya (mRNA) kopyalamaktadır. Ardından genetik mesajları bir ribozoma aktararak ve bu bilgiyi "okuyarak" protein sentezi için kullanmaktadır. Tüm bu süreç genel aktarım olarak adlandırılmaktadır. 1958' de Francis Crick tarafından önerilen bu kimyasal reaksiyon ilk olarak milyarlarca yıl önce harekete geçmiştir. Birkaç önemli istisna dışında da, tüm biyolojik hücreler bu kurala uymaktadır (Gao ve ark., 2009).

Virüsler, otonom üreme ve metabolizma yeteneklerinden yoksundur. Genetik yapıları ne olursa olsun, viral genomlar, canlı konak hücreleri ile birlikte çoğaltılıp ifade edilmektedirler. RNA, çoğu hücrede kalıtsal bilgi olarak hizmet etmese de, DNA içermeyen birçok virüs için bu işlevi yerine getirebilmektedir. Örneğin RNA virüsleri, genetik materyal olarak RNA'ya sahiptir, bu tek sarmallı veya çift sarmallı olabilmektedir (Poltronieri ve ark., 2015). Virüsler, genomlarının replikasyonu için RNA'ya bağımlı RNA polimerazlardan yararlanmaktadır. Retrovirüsler, ise tek iplikli RNA genomlarının iki kopyası ile reverse transkriptaz, integras işlevi altında konakçı DNA'ya entegre edilebilen viral DNA üretebilmektedir. Çocuklarda ve bağışıklık sistemi baskılanmış diğer bireylerde şiddetli gastroenterite neden olan rotavirüsler, çift sarmallı RNA (dsRNA) virüslerinin örnekleridir. Soğuk algınlığına neden olan rinovirüsler, koronavirüs ve Ebola virüsü tek sarmallı RNA (ssRNA) bulundurmaktadır (Markiewicz ve ark., 2021) (Şekil 2.3).



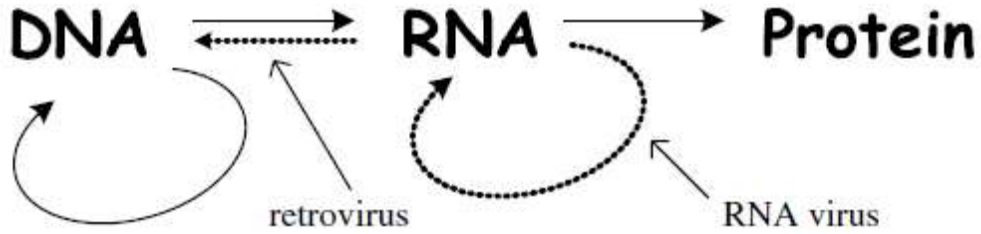
Şekil 2. 3. a. Koronavirüs (ssRNA) b. Rotavirüs (dsRNA) (Crawford ve ark., 2017; Santos ve ark., 2020)

RNA virüsleri, genetik materyal olarak RNA'yı kullandığı bilinen tek yaşam formudur. Bu virüsler genomlarının replikasyonunu iki yolla gerçekleştirebilmektedir. Her ikisi için de genellikle enfekte olmamış konakçı hücrelerde bulunmayan enzimatik aktiviteler gerektirmektedir. Birincisi RNA'ya bağımlı RNA polimerazlar ile RNA'ya bağlı RNA sentezi, ikincisi RNA'ya bağlı DNA sentezidir (Rampersad ve Tennant, 2018) (Şekil 2.4).



Şekil 2. 4. Farklı virüs sınıflarının replikasyon ve transkripsiyon modlarının özeti. DdRp, DNA'ya bağımlı DNA polimeraz; DdRp, DNA'ya bağımlı RNA polimeraz; RdRp, RNA'ya bağımlı RNA polimeraz; RT, ters transkriptaz (Rampersad ve Tennant, 2018)

1970 yılında RNA' dan DNA' ya, sonra DNA' dan RNA' ya ve proteinlere bilgi aktarımında reverse transkriptaz adı verilen bir enzim kullanarak RNA' dan DNA kopyası yapabilen virüsleri keşfedilmiştir (Coffin ve Fan, 2016) (Şekil 2.5). Influenza, HIV, Hepatit C ve SARS-CoV-2 retrovirüsleri bu kategoridedir.



Şekil 2. 5. RNA replikasyonu ve reverse transkripsiyon (Gao ve ark., 2009)

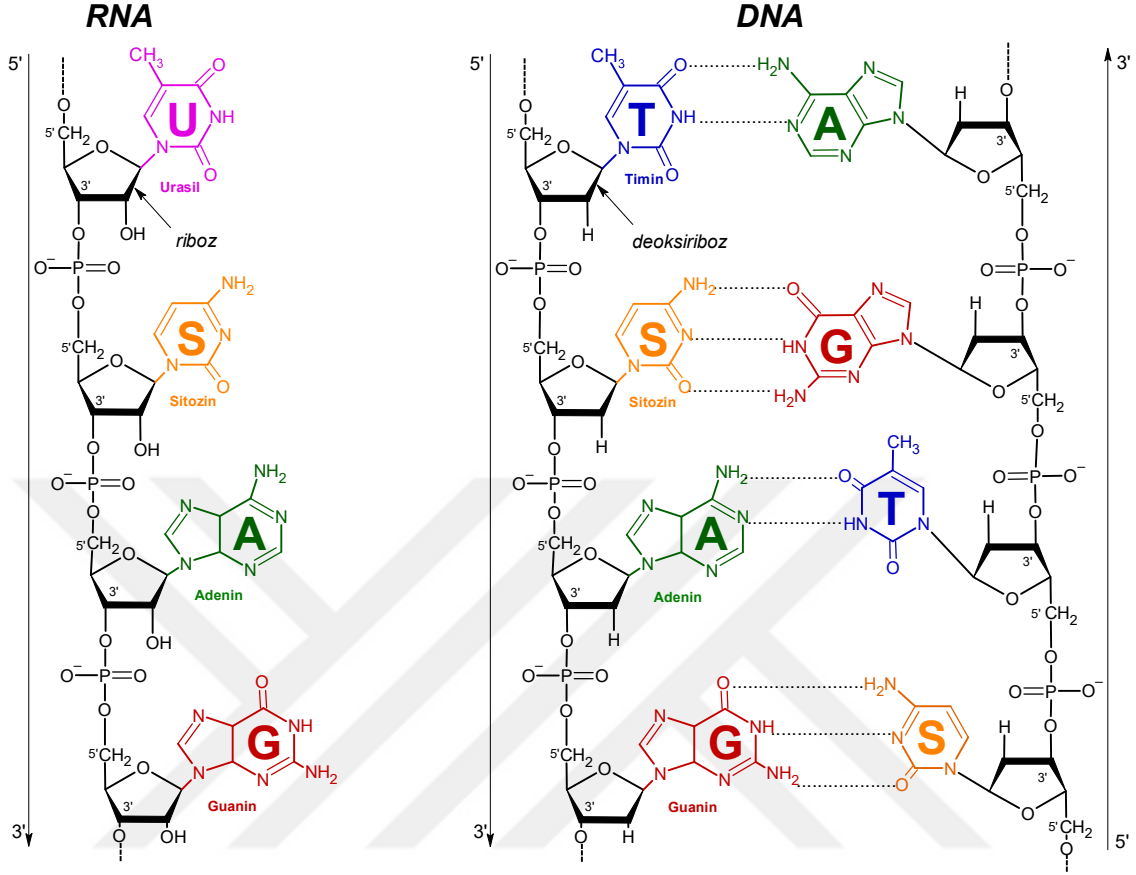
1970' lerin başında retroviral reverse transkriptazın keşfi, nihayetinde RT-PCR prosesinin uygulanmasını mümkün kılmıştır. Reverse transkriptaz, kalıp olarak RNA kullanarak DNA sentezini katalize eden RNA' ya bağımlı bir DNA polimerazdır. RT-PCR, in vitro nükleik asit amplifikasyonunda başlangıç materyali olarak RNA kullanılarak tamamlayıcı cDNA' ya (komplementer DNA) dönüştürülmektedir. cDNA, hücrede bulunmaz, ancak in vitro sentezlenir ve yaygın olarak transkripsiyonel aktiviteyi ölçmek veya bir RNA virüsünün varlığını test etmek için kullanılabilir. cDNA, PCR kullanılarak üstel amplifikasyon için bir kalıp görevi görmektedir. RT-PCR bir veya iki adımda gerçekleştirilebilmektedir. Tek adımlı RT-PCR, RT reaksiyonu ile PCR reaksiyonunu aynı tüpte birleştirir ve yalnızca diziye özgü primerler kullanılmaktadır. İki aşamalı RT-PCR sırasında, sentezlenen cDNA, PCR için ikinci bir

tüpe aktarılmaktadır. RT-PCR, RNA virüsü enfeksiyonlarının teşhisinde ve miktar tayininde yaygın olarak kullanılmaktadır (Farkas ve Holland, 2009; Jalali ve ark., 2017).

Yukarıda bahsedilen santral dogmadaki Reverse transkripsiyon ve RNA replikasyonu gibi özel transfer örneklerine ek olarak diğer bir özel transfer şekli ise DNA' dan proteinlere doğrudan translasyonudur (Şekil 2.5). Hücre kültüründe büyütülen memeli hücrelerinden elde edilen belirli DNA preparasyonlarının, bir *E. coli* hücresiz sistem tarafından (yani bir tüpte), aminoglikozit antibiyotiklerin, örneğin streptomisin ve neomisinin, mRNA yokluğunda protein sentezini belirgin şekilde uyarabildiği yapılan çalışmalarla ortaya çıkmıştır (McCarthy ve Holland, 1965).

Histon modifikasyonları, DNA metilasyonu veya genetik diziyi çevreleyen materyalin farklı modifikasyonları nedeniyle nesiller arası epigenetik kalıtım konusunda son zamanlardaki gelişmelere rağmen, herhangi bir organizmada, DNA dizisindeki bilginin proteindeki bilgiden yeniden yazılabileceğine dair hiçbir kanıt yoktur. Bu yüzden Crick' in öne sürdüğü, “protein sentezi nükleik asitlere dayanır ve genetik bilgi proteine girdikten sonra DNA dizisini değiştiremez” temel argümanı günümüzde hala geçerliliğini korumaktadır (Cobb, 2017).

Santral dogma tarafından açıklanan bilgi aktarımı, biyopolimer dizisinin bir sonraki adımdaki biyopolimer dizisinin kalıp olarak kullanıldığı güvenilir, deterministik aktarımdır. Bu diziler tamamen orijinal biyopolimere bağlıdır. DNA, RNA ve proteinler dahil olmak üzere biyopolimerler, monomer adı verilen tekrarlayan birimlerden oluşan moleküllerdir. Monomer zinciri, bilgiyi verimli bir şekilde kodlamaktadır (Lanier ve ark., 2017) (Şekil 2.6).

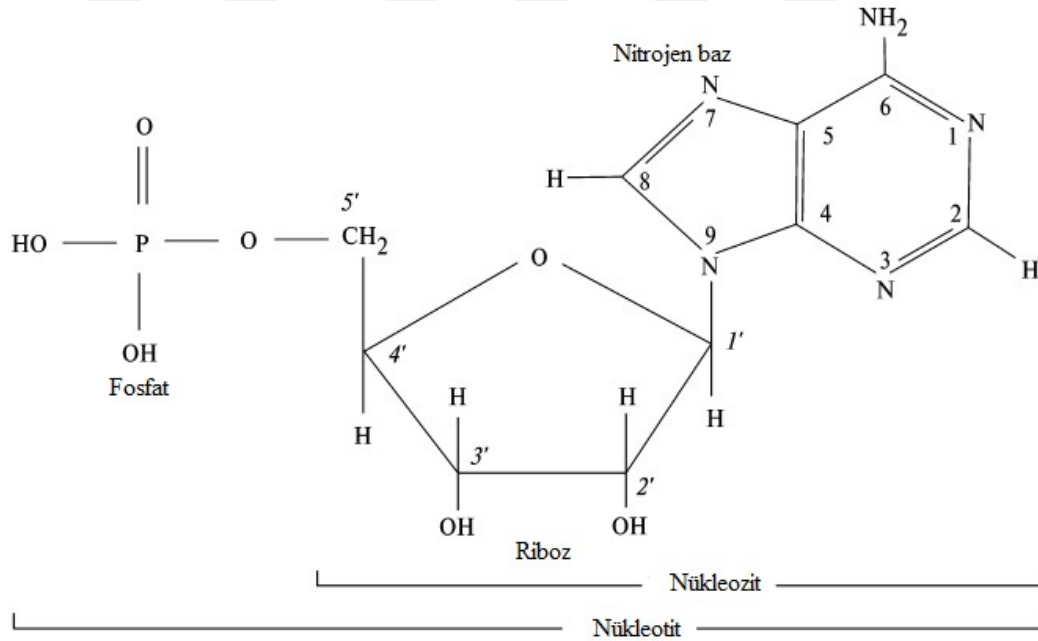


Şekil 2. 6. RNA ve DNA

Hem RNA hem de DNA' nın monomer yapı taşları, nükleotitler üç temel bileşenden oluşmaktadır: bir pentoz (beş karbonlu şeker), en az bir fosfat grubu (nükleotitler, üç fosfat grubu içerebilir) ve bir azotlu baz. DNA, dört farklı baza sahip nükleotitlerin bir biyopolimeridir: adenin (A), guanin (G), sitozin (C) ve timin (T). DNA dizilerinin genetik bilgi taşıdığı gerçeği, 1950' lerde açıkça gösterilmiştir. Daha sonra, Watson ve Crick, DNA' nın çift iplikli bir sarmal olarak var olduğunu ve bazların birbirini tamamlayıcı bir şekilde eşleştirildiği karşıt ipliklerdeki bazlar arasındaki hidrojen bağları tarafından stabilize edilmektedir. A ile T veya C ile G, Watson-Crick çiftleri olarak adlandırılmaktadır. Bir DNA dizisinin bir kısmı, transkripsiyon ve translasyon adı verilen süreçler yoluyla RNA' ların ve proteinlerin üretilmesinde rol oynamaktadır. Kopyalanabilen bir DNA dizisinin segmentlerine gen denilmektedir. Bir gendeki bilginin ifadenmesi normal olarak bir DNA kalıbından yazılan bir RNA molekülünün senteziyle gerçekleştirilmektedir. Genetik bilginin ifadesinde merkezi bir araçtır (Liu, 2006).

2.1 RNA

RNA; DNA ve proteinlerle birlikte yaşamın üç temel makromoleküllerinden birini oluşturmaktadır. Fosfodiester bağlarıyla birbirine bağlanan ribonükleotitlerden meydana gelen bir makromoleküldür. RNA zincirindeki bir ribonükleotit, riboz (pentoz şekeri), dört azotlu bazlardan birini (A, G, C ve U) ve bir fosfat grubu içermektedir (Şekil 2.7). DNA ve RNA zincirlerinin ilk bakışta oldukça benzer görülmelerine karşın; RNA timin yerine urasil ve pentoz şekerin 2'-OH içermesi nedeniyle farklılaşmaktadır. RNA'nın ihtiva ettiği 2'-OH, RNA'nın hem yapısında hem de işlevinde temel roller oynamaktadır. 2'-OH, RNA ile DNA arasındaki konformasyonel ve termodinamik farklılıkların ana belirleyicisidir.



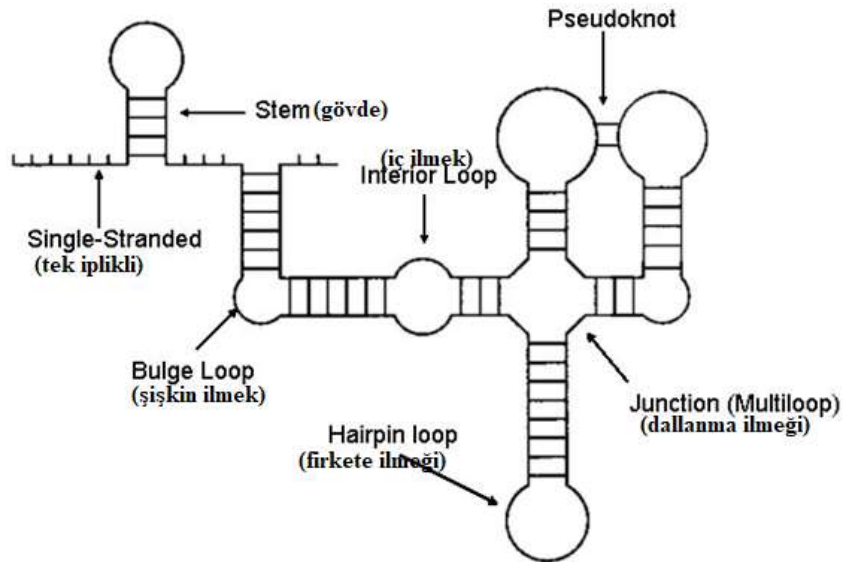
Şekil 2. 7. Ribonükleotit yapısı (Bregestovski, 2015)

RNA'nın fosfodiester bağları, her bir riboz şekerindeki 2'-OH grubunun bir sonucu olarak kararsızdır. Bazik koşullar altında hidroksil grubu protondan arındırılabilir. Dolayısıyla, bir nükleofil olarak hareket edebilir ve fosfat bağını hidrolize edebilmektedir. Bu yüzden RNA, uzun vadeli bilgi depolama için ideal bir makromolekül değildir. Bunun tersine, DNA bu 2'-OH grubundan yoksundur. Bu küçük fark, DNA'nın stabilitesini sağlayarak DNA'yı genetik bilgilerin saklanması için daha uygun hale getirmektedir (Velema and Kool, 2020).

DNA tipik olarak uzun ve çift sarmal iken, RNA çok daha kısa ve tek sarmalıdır. RNA molekülü, farklı uzunluklarda kanonik Watson-Crick baz çiftleri yanında geniş bir hidrojen-bağı ve π -istifleme etkileşimleri sayesinde çeşitli yapılar oluşturabilmektedir (Vranken ve Weiss, 2012). Birçok RNA molekülü, RNA sarmalı içindeki tamamlayıcı diziler arasında intramoleküler baz eşleşmeleri yaparak kendi üzerine katlandığı bölgeler içerebilmektedir (Gao ve ark., 2009).

Hidrojen bağları yoluyla baz eşleşmesi, RNA ikincil yapısının temelidir. Adenin ve urasil arasında iki hidrojen bağı oluşurken, sitozin ve guanin arasında üç bağı oluşur. Bir diğer baz eşleşmesi de guanin ve urasil arasındaki daha az stabil olan wobble baz eşleşmesidir (G-U). Bu, Watson-Crick baz çifti kurallarına uymayan RNA moleküllerindeki iki nükleotit arasındaki bir eşleşmedir (Varani ve McClain, 2000).

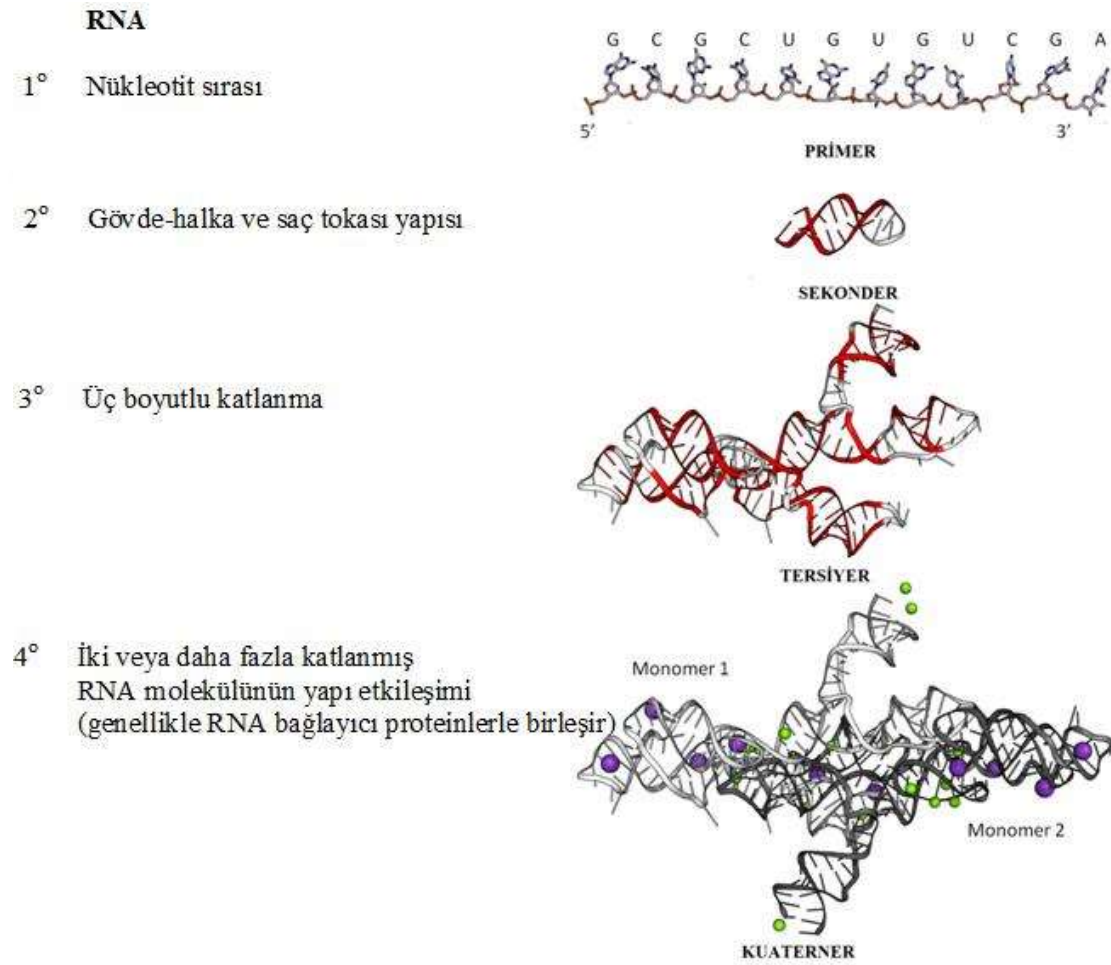
Genel olarak, kendi kendine hibridize olmuş RNA dizisi, sarkan iplikler, gövde bölgeleri ve ilmeklerden oluşmaktadır. Sarkan bir iplik, şeker-fosfat omurgasının 3' ya da 5' ucundaki ardışık eşleşmemiş bazların bir ipliğidir. Gövde bölgesi, tamamlayıcı bazlarla eşleşmiş kısımlardır. İlmekler genel olarak dört sınıfa ayrılabilir: firkete ilmekleri, iç ilmekler, dallanma ilmekleri ve şişkin ilmekler (Gao ve ark., 2009) (Şekil 2.8).



Şekil 2. 8. RNA ikincil yapısı (Wuchty ve ark., 1999)

RNA konformasyonundaki bu değişiklikler ikincil, üçüncül veya dördüncül yapısal seviyelerde meydana gelebilmektedir. Örneğin riboanahtarlar (riboswitch), ligand

bağlanması üzerine alternatif ikincil yapılara katlanarak gen ekspresyonunu kontrol edebilmektedir. Öte yandan, ribozimler, substrat bağlanmasını, katalizi ve ürün salınımını sağlamak için farklı üçüncül yapılar arasında geçiş yapabilmektedir. Proteinler ayrıca ribozomun ve splisozom (spliceosome) gibi diğer RNP (ribonükleoprotein) makinelerinin kuaterner montajı gibi çeşitli sonuçları tetikleyebilen RNA üçüncül yapısında değişikliklere neden olabilmektedir (Ganser ve ark., 2019).



Şekil 2. 9. RNA' nın Yüksek Dereceli Katlanması (Farrell, 2017; Anonim, 2021a)

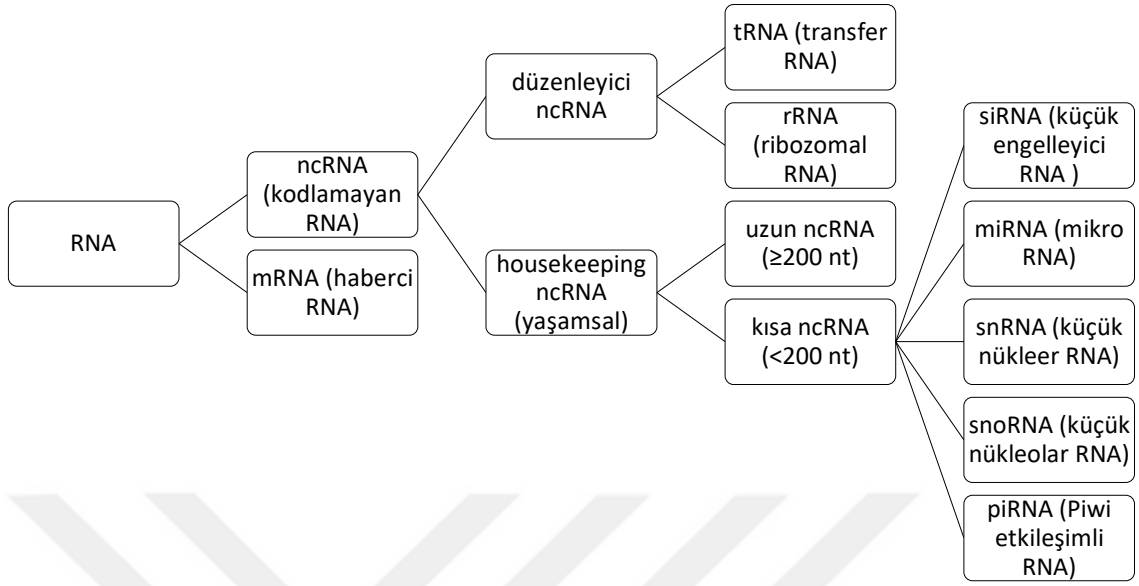
Nükleik asitlerin ve proteinlerin birincil yapısı monomerlerin sırasıdır. Bir molekülün ikincil yapısı, birincil yapısının bir sonucu olarak ortaya çıkan ilk katlanma seviyesidir. Üçüncül yapı, molekül içindeki atomların üç boyutlu düzenlenmesidir. Bir molekülün kuaterner yapısı oluştuğunda, molekülün bir veya daha fazla özdeş veya özdeş olmayan molekülle etkileşiminden kaynaklanan sonuçların daha yüksek dereceli katlanmasıdır (Farrell, 2017) (Şekil 2.9).

RNA' nın işlevleri, dizilimleri kadar konformasyonlarına da bağlıdır. Bu zincirlerin kendi üstlerinde katlanmaları moleküle, DNA' ya nazaran çok daha güçlü bir yapısal çeşitlilik kazandırmaktadır. Bu nedenle RNA çok çeşitli hücrel işlevlere uygun bir moleküldür (Fohrer ve ark., 2006). Şimdiye kadar, DNA ve çoğu protein, RNA' dan önemli ölçüde daha kararlı olduğu için daha çok saflaştırılmış ve araştırmalar için çokça tercih edilmiştir. Bu yüzden RNA biraz daha arka planda kalmıştır. Son zamanlarda, RNA' ların yapı ve fonksiyonlarının önemi yapılan çalışmalarla tedricen gün yüzüne çıkmaktadır.

RNA, DNA ve proteinlere özgü işlevleri yerine getirebilmektedir (Bregestovski, 2015).

1. Kodlama: Protein sentez programlarını içermektedir.
2. Replikatif: Nükleotit dizilerini kopyalayabilmektedir.
3. Yapısal: Tersiyer yapılar oluşturabilmektedir.
4. Tanıma: RNA, diğer makromolekülleri ve ligandları tanıyabilir ve bunlarla spesifik olarak etkileşime girebilmektedir.
5. Katalitik: RNA, kimyasal reaksiyonların (ribozimler) spesifik katalizini gerçekleştirebilmektedir.

Transkripsiyon ve tranlasyondan sorumlu mRNA, rRNA, tRNA' ların yanı sıra küçük nükleer RNA (snRNA) ve küçük nükleolar RNA (snoRNA) gibi kodlamayan RNA' ların (ncRNA) varlığı keşfedilmiştir. Daha yakın zamanlarda ncRNA araştırma alanı mikroRNA (miRNA), küçük engelleyici RNA (siRNA) ve uzun kodlamayan RNA (lncRNA) bulunmuştur. Şimdilerde ise ökaryotik transkriptomun % 97' lik kısmının protein kodlamayan RNA' lardan oluştuğu bilinmektedir. Bu yeni RNA' ların keşfi ile RNA' nın DNA ile protein arasında aracılık eden basit bir bilgi taşıyıcısı olmadığı anlaşılmıştır (Lomax, 2014) (Şekil 2.10).



Şekil 2. 10. RNA çeşitleri

Hücre içindeki farklı RNA türleri, hâlâ ortaya çıkmakta olup RNA' yı daha küçük parçalara bölen ribonükleazlar olarak bilinen proteinler tarafından düzenlenebilmekte ve manipüle edilebilmektedir Doğrudan RNA molekülleri üzerinde etkili olan enzimler, RNA helikazlar, poli (A) polimerazlar ve pirofosfohidrolazlar gibi diğer RNA ile ilişkili yardımcı enzimlerle uyum içinde hareket eden, fosfodiester bağlarının ekzo- veya endoribonükleolitik bölünmesini katalize eden ribonükleazlardır (Clouet-D'Orval ve ark., 2018). Ribonükleazlar, aynı zamanda RNA moleküllerinin olgunlaşmasında da önemli roller üstlenmektedir.

2.2 Ribonükleazlar

RNA aracılığıyla bilgi akışı, canlı yaşamı için esastır. RNA metabolizmasını düzenleyen çeşitli enzimler bu akışı kontrol etmektedir. Bakteria (Bacteria), Arkea (Archaea) ve Ökarya (Eukarya) olmak üzere üç domain altında sınıflandırılan tüm canlılar RNA polimerazlar aracılığıyla RNA sentezlemektedir. Sentezlenen RNA molekülleri, olgun ve fonksiyonel formlarına ulaşmak için spesifik bölünme reaksiyonlarına girmektedir. Bunlar arasında, birincil kopyaların uçlardan kısalması, intronların çıkarılması gibi nükleolitik reaksiyonlar vardır. İşlevsel transkriptlerin oluşmasına yol açan bu işlem, RNA'daki fosfodiester bağlarının hidrolizini kapsamaktadır. Ek olarak her RNA nihayetinde oligonükleotitlerine veya

mononükleotitlerine indirgenmektedir. Böylelikle gereksiz RNA' ların parçalanması gerçekleştirilmiş olmaktadır. Bunlar, hatalı ya da işlevlerini tamamlamış, artık hücre içinde ihtiyaç duyulmayan, birincil kopyaların işlenmesi sırasında atılan fazla RNA parçalarını kapsamaktadır. Bahsi geçen bu RNA olgunlaşma (işleme) ve RNA degradasyonu (bozunma) işlemleri, çeşitli yapı ve etki mekanizmalarına sahip hücrel "ribonükleazlar" olarak adlandırılan RNA depolimerazları tarafından katalizlenmektedir. RNA' nın daha küçük bileşenlere parçalanmasını katalizleyen ribonükleazlar (genellikle "RNaz" olarak kısaltılmaktadır), ilgili reaksiyonlarda tüm RNA türlerine müdahale edebilen nükleaz ailesine ait enzimlerdir. RNazlar; RNA olgunlaşması, RNA degradasyonu ve dönüşümü, RNA kalite kontrolü ve hatta gen regülasyonu dahil olmak üzere RNA metabolizmasının hemen hemen her alanında önemli bir yer tutmaktadır. Aynı zamanda RNazlar, çok çeşitli biyolojik görevleri yerine getirdikleri için, hücre tarafından en yaygın olarak salgılanan enzimler arasındadırlar (Eun, 1996; Nicholson, 1999; Houseley ve Tollervey, 2009; Taylor, 2014; Bonnin ve Boulloc, 2015; Deutscher, 2015).

RNazlar, hem yapı hem de işlev açısından çok heterojen bir enzim grubudur. Tümü fosfodiester bağlarının, endonükleolitik veya ekzonükleolitik olarak, az ya da çok özgüllikle bölünmesini katalize etmektedir. Hemen hemen her hücrel süreçte doğrudan veya dolaylı olarak yer almaktadırlar (Bechhofer ve Deutscher, 2019).

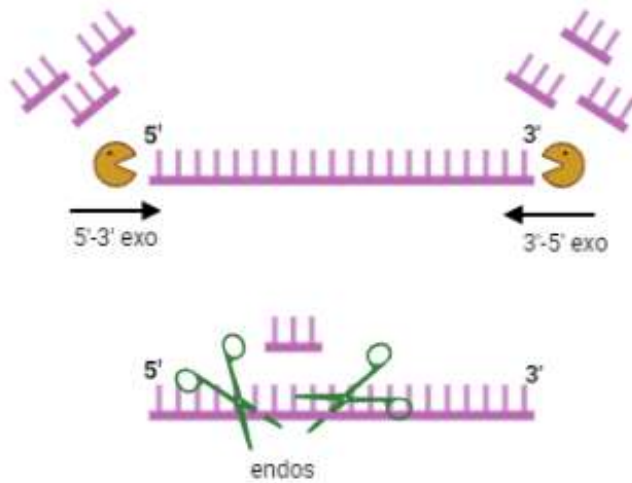
Tüm hücrel yaşam formlarında çeşitli RNaz türleri mevcuttur. Hatta tek bir hücre içinde, fonksiyonel olarak birbirinden farklı RNazlar bulunabilmektedir. Örneğin, *E. coli*' de 15-20 farklı RNaz tanımlanmıştır (Eun, 1996). Bilinen RNazların çoğu protein yapısındadır ancak iyi karakterize edilmiş birkaç RNaz' da katalitik kısım, bir RNA molekülüdür (Aravind ve Koonin, 2001).

Çizelge 2.2' de, RNazların ana işlevleri ve temsili örnekleri listelenmektedir. Bu işlevlerden bazıları, RNA olgunlaşması ve bozulması gibi tüm organizmalar için gereklidir, bazıları ise organizmaya bağlı değildir. Örneğin, tüm organizmalar çevrede RNA' nın sindirimi için RNazlara ihtiyaç duymamakta ve çok azı sitotoksik RNazlar üretmektedir (Pingoud ve Meiss, 2005).

Çizelge 2. 2. RNazların ana işlevleri ve temsili örnekleri (Pingoud ve Meiss, 2005)

İşlev	Enzim	Organizma
RNA sindirimi (ekstraselüler)	RNaz A	<i>Bos taurus</i>
	RNaz T ₁	<i>Aspergillus oryzae</i>
	<i>Serratia</i> nükleaz	<i>Serratia marcescens</i>
	Staphylococcal nükleaz	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Nükleaz P1	<i>Penicillium citrinum</i>
RNA olgunlaşması	RNaz III	<i>Escherichia coli</i>
	Ökaryotik pre-mRNA'ların 3'-uçlu işlenmesi için 'bölünme kompleksi'	<i>Bos taurus</i>
	Dicer	<i>Homo sapiens</i>
RNA degradasyonu (intraselüler)	RNaz E	<i>Escherichia coli</i>
	RNaz HI	<i>Escherichia coli</i>
	Poly(A)-spesifik ekzoribonükleaz	<i>Homo sapiens</i>
Apoptoz	Antikodon nükleaz	<i>Escherichia coli</i>
	2-5A-bağımlı RNaz L	<i>Homo sapiens</i>
Sitotoksiste	α -Sarcin	<i>Aspergillus giganteus</i>
	Onkonaz	<i>Rana pipiens</i>
Büyüme kontrolü	BS-RNaz	<i>Bos taurus</i>
	Anjiyojenin	<i>Homo sapiens</i>
	S-RNazları	<i>Nicotiana glauca</i>

RNazlar tek başlarına hareket edebildiği gibi RNA bozunma kompleksleriyle işbirliği yapabilmektedirler. RNA bozunması sırasında, sadece RNA türlerini ortadan kaldıran "moleküler katiller" değildirler. RNazlar, ribonükleotitlerin geri dönüşümüne katkıda bulunmada son derece önemli bir rol oynamaktadırlar. Ayrıca zararlı proteinler üretebilecek anormal RNA' ları da yok ederek koruma sağlamaktadır (Arraiano ve ark., 2010). Bütün organizmalarda, RNA bozunması yaygın bir aktivite olmasının yanında spesifik RNA bozunma yollarının karmaşıklığına rağmen aralarında önemli benzerlikler bulunmaktadır (Houseley ve Tollervey, 2009).



Şekil 2. 11. Ekzonükleaz ve endoribonükleazların kesim yerleri

Ribonükleazlar birkaç farklı şekilde sınıflandırılabilir. Etki mekanizmalarına göre endo ve ekzoribonükleaz olarak sınıflandırılan RNazlar, enzimatik aktivitesini RNA molekülündeki fosfodiester bağlarını yıkararak gerçekleştirmektedir (Canestrari ve Paroo, 2018). Endoribonükleazlar, bir RNA polinükleotit zincirindeki içte yer alan fosfodiester bağlarını hidroliz ederken, ekzoribonükleazlar ise zincirin uç kısımlarındaki (5' veya 3') nükleotitleri çıkarmaktadır (Nicholson, 1999; Arraiano ve ark., 2013) (Şekil 2.11). Bu enzimler substrat olarak farklı RNA türleri kullanabilmektedir. Bazıları belirli bir substrat tipi için spesifiklik gösterebilmektedir.

5' Ekzoribonükleazlar	Endoribonükleazlar	3' Ekzoribonükleazlar
Eksoribonükleaz I (Ökaryotlar)	RNaz A (Omurgalılar)	PNPaz (Hepsi)
Eksoribonükleaz II (Ökaryotlar)	RNaz H (Hepsi)	RNaz PH (Arkeler, bakteriler)
Rnaz J1/J2 (Bakteriler)	RNaz III (Bakteriler, ökaryotlar)	RNaz R (Bakteriler, ökaryotlar)
	RNaz L (Ökaryotlar)	RNaz D (Hepsi)
	RNaz P (Hepsi)	RNaz T (Bakteriler)
	RNaz T1 (Bakteriler, fungi)	Oligo-RNaz (Hepsi)
	RNaz T2 (Hepsi)	
	RNaz U2 (Fungi)	
	RNaz E (Hepsi)	
	RNaz G (Bakteriler)	

Şekil 2. 12. Ekzoribonükleazlar ve endoribonükleazlar (Lee ve ark., 2021)

Başlangıçta literatürdeki en iyi karakterize edilmiş memeli proteinlerinden biri olan RNaz A ile yapılan çalışmalara dayalı olarak, zamanla RNaz fonksiyonlarının kapsamını genişleten, memelilerde ve diğer omurgalılarda önemli dizi homolojisine sahip başka RNazlar da tanımlanmıştır. Böylece omurgalılara özgü RNaz A süper ailesinin (üst aile) birleşmesine olanak sağlamıştır. Bu üst ailenin üyeleri, farklı dağılım ve özellikler gösteren diğer endo- ve ekzoribonükleazlardan ayırt edilebilmektedir (Eun, 1996; Koczera ve ark., 2016) (Şekil 2.12).

RNaz A süper ailesi, "tüm omurgalı alt filumunda bulunan" çok sayıda protein içermektedir. Aslında omurgalılara özgü tek enzim ailesini oluşturmaktadırlar (Arnold, 2014; Lomax ve ark., 2017).

Evrimsel olarak, omurgalılara özgü ribonükleaz ailesi olarak da bilinen, RNaz A süper ailesi, adını kurucu üyesi olan sığır pankreası endoribonükleazından (RNaz A) almaktadır. Bu ailenin sekiz üyesi insan dokusundan izole edilmiş olup genetik

analizlere göre (insan genom projesi ile ulaşılan sekanslara göre) beş üyesinin daha bulunduğu tahmin edilmektedir (Çizelge 2.3) (Koczera ve ark., 2016). İnsan pankreatik ribonükleazları, RNaz A ile % 70 benzer temel yapısal ve katalitik kalıntılara sahiptirler. Hepsi, kromozomun (kromozom 14) uzun kolunda bulunan genler tarafından kodlanmaktadır (Probst ve ark., 2006).

RNaz 1-8, ribonükleaz aktivitesi için gerekli katalitik bölgeyi içeren kanonik RNaz A ailesinin tipik üyeleridir. Bu ailenin üyeleri, benzersiz üç boyutlu disülfid bağı yapıları ile karakterize edilir ve sığır pankreas RNaz A ile homologdur. RNaz 9-13, karakteristik disülfid bağı yapıya sahiptir, ancak ribonükleaz aktivitesi sergileme olasılığı düşüktür (Rademacher ve ark., 2016).

Çizelge 2. 3. Omurgalılara özgü ribonükleaz ailesinin üyelerinin kaynağı ve işlevleri (Uebersohn, 2013)

Ribonükleaz	Diğer adı	Bulunduğu yer	Önerilen İşlevleri
RNaz 1	İnsan Pankreatik RNaz	Pankreas, böbrek, mide, akciğer, karaciğer, dalak, endotel dokusu, idrar, kan serumu	Serum viskozitesini korumak, bağışıklık sisteminin aktivasyonu
RNaz 2	Eozinofil kaynaklı nörotoksin (EDN)	Eozinofil granülleri, dalak, karaciğer, böbrek, plasenta, idrar	Bağışıklık sisteminin aktivasyonu, Antiviral koruma
RNaz 3	Eozinofil katyonik protein (ECP)	Eozinofil granülleri	Enflamatuvar tepkilerin düzenlenmesi, antiviral / bakteriyel / helmint
RNaz 4		Pankreas, akciğer, iskelet kası, kalp, böbrek ve plasenta	Koruma, Apoptoz indüksiyonu Anjiyogenez, nöronal büyümenin uyarılması, nöroprotektif
RNaz 5	Angiogenin (ANG)	Karaciğer, endotel hücreleri, omurilik, kanser hücreleri	Damarlanma, rRNA üretimi, hücre proliferasyonu ve hayatta kalma; motor nöronların uzaması ve hayatta kalması, nöroprotektif, hücre stres tepkisi, kanser hücresi çoğalması, Cildi bakterilerden korur
RNaz 6	---	Akciğer, kalp, beyin, plasenta, karaciğer, iskelet kası, böbrek, pankreas	Bilinmiyor
RNaz 7	---	Keratinosit, karaciğer, böbrek, iskelet kası, kalp	Cildi bakterilerden korur
RNaz 8	---	Plasenta	Plasantanın antimikrobiyal koruması
RNaz 9-13	---	testisler; diğer yerler mümkün	Bilinmiyor, ribonükleolitik olmadığı düşünülüyor, erkek üremesinde rol oynayabilir
RNaz A	Sığır Pankreatik RNaz	Sığır pankreası (<i>Bos taurus</i>)	RNA'nın mide mikroorganizmalarından sindirimi
BS-RNaz	Sığır Seminal RNaz	Sığır semeni	İmmünsüpresyon
Onkonaz	ONC; Ranpirinase; P-30	Kuzey leopar kurbağası oositleri	İnsanlarda sitotoksik, tümör hücrelerini hedefler, kanser tedavisinde kullanılır

Bu ailenin üyeleri, benzer üç boyutlu yapıya sahip olmakla birlikte bir lizin ve iki histidin kalıntısından oluşan bir RNaz katalitik bölge bulundurmaktadır. Protein yapısı, dört disülfür köprüsü ile birbirine bağlanan sekiz sistein kalıntısı ile karakterize edilir ve bu üçüncül yapılarının önemli bir parçasıdır. Bu ailenin tüm proteinleri globüler olup 14-16 kDa boyutundadır. Hepsi olmasa da bazıları katalitik aktivite ile ilişkili bir motif (CKXXNTF) içermektedir (Gupta ve ark., 2013).

Farklı RNA substratları üzerinde çeşitli katalitik farklılıkları ile karakterize edilen yapısal olarak farklı bu RNaz üyeleri, omurgalılara özgü tek enzim ailesi gibi görünen bir gen ailesini oluşturmaktadır. Diyet RNA' sının sindirilmesinin yanı sıra, ailenin hemen hemen tüm üyeleri için nörotoksisite, anjiyojenez, apoptoz, antiviral, antitümör aktivite gibi çok çeşitli biyolojik işlemler bildirilmiştir. Son evrimsel çalışmalar, RNazların omurgalılarda konakçı savunması veya anjiyojenik protein olarak başladığını ileri sürmektedir (Sorrentino, 2010; Lu ve ark., 2018; Beeram, 2019; Castro ve ark., 2021) .

RNaz A süper ailesinin üyeleri, oldukça küçük kararlı salgı proteinleridir. Ayrıca, düşük konsantrasyonlarda sitotoksik aktivite sergileyen RNaz A homologlarının keşfi, bu enzim ailesine olan ilgiyi arttırmıştır. Sahip oldukları aktiviteleri, bu enzimlerin terapötik amaçlar için kullanılmalarına yönelik çalışmaları yoğunlaştırmıştır (Azghandi ve ark., 2020).

Son yıllarda RNaz ve RNA bağlanma alanları üzerine kurulu büyük, karmaşık sistemlerin karakterizasyonu, RNAi ve CRISPR-Cas9' un iç işleyişini ortaya çıkarmıştır. Yüksek, programlanabilir bölünme özgülüğü sağlamak için bir RNA dizisi kullanan bu sistemler, araştırma için halihazırda güçlü araçlardır ve farmasötiklerin geliştirilmesi için büyük bir potansiyele sahiptir (Velema and Kool, 2020).

Anahtar bir endonükleaz olan RNaz A' lar gen duplikasyonu, hücrel metabolizma ve kanser tedavisinde de rol oynamaktadır. RNaz A' ların aşırı ekspresyonu, birçok kanser türüyle yakından ilişkilidir. RNaz A' lar, habis tümör teşhisi için giderek yeni bir biyobelirteç olarak kabul edilmekte ve yeni ilaç keşfi için spesifik bir hedef olarak kullanılmaktadır (Ni ve ark., 2019).

İnsan RNaz A üst ailesinin birkaç üyesi de antimikrobiyal aktivitelerle karakterize edilir ve bunların doğuştan gelen bağışıklığa katıldıklarına dair kanıtlar vardır. Özellikle, RNaz 2 (aynı zamanda eozinofilden türetilmiş nörotoksin, EDN olarak da adlandırılır) ve RNaz 3 (aynı zamanda eozinofil katyonik protein, ECP olarak da adlandırılır), çeşitli antiviral ve antibakteriyel aktivitelerin yanı sıra, doğal konak savunmasında immünomodülatör aktiviteler sergilemektedir. Antimikrobiyal aktiviteler ayrıca RNaz 5 (anjiojenik potensinden dolayı anjiojenin olarak da adlandırılır), RNaz 6, RNaz 7 ve RNaz 8 için de bildirilmiştir. RNaz 5 ve RNaz 7, keratinositler tarafından eksprese edilir ve bu nedenle kütanöz doğuştan savunmaya katkıda bulunabilmektedir. RNaz 7' nin cildi enfeksiyonlardan korumada önemli rol oynadığına dair çalışmalar vardır (Dyer ve Rosenberg, 2006; Rademacher ve ark., 2019).

RNaz aracılığıyla aktif RNA bozunma sistemleri, RNA virüslerine karşı ilk savunmadır. RNA virüsleri arasında influenza virüsleri ve koronavirüsler gibi solunum yolu virüsleri oldukça bulaşıcıdır. İnsan derisi RNazları, bozulmamış bir koronavirüs içindeki RNA' lar üzerine doğrudan etki edemez çünkü RNA, zarf ve nükleokapsid proteinler tarafından korunmaktadır. Etanol ve izopropanol bu proteinleri denatüre edebildiğinden virüslerin RNA genomlarını açığa çıkarabilmektedir. Zarfların ve viral kapsidlerin bozulmasından sonra, koronavirüslerin büyük RNA genomları viryonlardan salınarak insan derisinin yüzeyine yapışabilmektedir. Bu RNA' lar alkol ile muameleden sonra bile bozulmadan kalabilmekte ve bir şekilde vücuda girmenin yolunu bulabilmektedir. İnsanların virüslere ve diğer mikroorganizmalara karşı doğuştan gelen bir kütanöz savunma sistemi vardır; cilt RNazları önemli engellerden biridir, çünkü ribonükleolitik aktiviteleri, RNA genomlarını küçük parçalara ayırarak onları devre dışı bırakan ekzojen RNA' ların girişini engellemektedir (Wang, 2020).

Yıllık salgınlardan kaynaklanan önemli ekonomik kayıplar, virüslerin yüksek değişkenliği nedeniyle zamanla işe yaramaz hale gelen yeni antiviral ajanların sürekli aranmasına neden olmaktadır. Antiviral RNazların etkisinin moleküler mekanizmasının incelenmesi ile organizmayı virüs genomundaki değişikliklerden bağımsız olarak koruyabilen yeni antiviral preparatların geliştirilmesi mümkündür (Ilinskaya ve Mahmud, 2014).

RNA molekülleri, gen ekspresyonu mekanizmasında ve dolayısıyla hücre farklılaşmasında çok özel bir role sahiptir. Tüm hücre ve doku fonksiyonları nihayetinde gen ekspresyonu tarafından yönetilmektedir. Gen ekspresyonu çalışmalarında RNA transkript düzeyleri önemli bir parametredir. RNaz A ailesi olarak bilinen çok geniş bir enzim yelpazesi, polimerik RNA'nın bozunmasını katalize eder ve hem hücre içi hem de hücre dışı düzeyde çok çeşitli biyolojik olaylara katılmaktadır (Economopoulou ve ark., 2007).

RNaz A' lar, anlaşıldığı üzere bir hücre içinde birçok temel işleve sahiptir. Aynı zamanda insan vücudu, bu enzimleri gözyaşı, tükürük, mukus ve ter gibi sıvılarda salgılayarak istilacı mikroorganizmalara karşı savunmak için hücre dışında da bu enzimleri kullanmaktadır ve hücre dışına en çok salgılanan enzimler arasındadırlar. Bu bolluk; RNA bütünlüğüne ve saflığına dayanan in vitro uygulamalardan; RNA saflaştırma, hücre dışı protein sentezi (Cell-Free Protein Synthesis-CFPS), revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), kantitatif RT-PCR (qRT-PCR), RNA-Seq, Northern Blot analizleri için büyük bir sorundur. Hücrelerden ve dokulardan gelen endojen RNazlara ek olarak, çoğu ortamdaki birincil RNaz kaynağı mikroorganizmalardır. Özellikle parmak yağı ve havadaki toz partiküllerinde bulunan bakteriler, mantarlar ve bunların sporlarıdır (Miyamoto ve ark., 2009; Earl ve ark., 2018).

RNA; protein translasyonu, gen regülasyonu ve gen ekspresyonu gibi doğal işlevlerinin ötesinde, tıbbi teşhis, terapötik geliştirme ve protein mühendisliğinin de içinde bulunduğu çeşitli uygulamalar için tasarlanmaktadır. Ancak RNA, bozulmaya DNA'dan çok daha duyarlıdır. RNA, yüksek pH, metal katyonlar, yüksek sıcaklıklar ve kontamine edici RNaz koşullarına maruz kaldığında kolaylıkla hidrolize olmaktadır. RNA degradasyonunun başlıca nedenlerinden biri RNaz kontaminasyonudur. RNA ile ilgili prosedürlerde, RNA moleküllerinin saklanması esnasında, RNaz kirleticilerine karşı oldukça tedbirli davranmak gerekmektedir (Aryani ve Denecke, 2015; Earl ve ark., 2018).

Ribonükleik asitlerin (RNA) her yerde bulunan ribonükleazlar tarafından hızlı bozunması, RNA moleküllerine dayalı yeni tedavilerin etkinliğini sınırlamaktadır (Probst ve ark., 2006).

RNA, ortamdaki RNazların her yerde bulunmasından dolayı bozunmaya son derece duyarlıdır. Bu nedenle, RNA ile çalışırken büyük özen gereklidir. RNA, kararsız bir moleküldür ve hücre veya dokulardan ekstrakte edildiğinde çok kısa bir yarı ömre sahiptir. Ribozomal RNA (rRNA) (% 80-90), haberci RNA (mRNA) (% 2.5-5) ve transfer RNA (tRNA) dahil olmak üzere birkaç doğal RNA türü vardır. Bozulmaya yatkın olduğundan RNA izolasyonu için özel dikkat ve önlemler gereklidir (Tan ve Yiap, 2009).

RNaz A ailesinin üyeleri, minimum kofaktör gereksinimlerine sahip olan ve geniş bir pH aralığında aktif olan küçük, dikkat çekici şekilde kararlı enzimlerdir ve bunların kontrolü çok önemlidir. Üçüncül konfigürasyonlarını, bu enzimlerin birçok denatürant ile muameleden sonra ve hatta kaynatıldıktan sonra yeniden oluşmasına izin veren dört disülfür köprüsü sayesinde korumaktadırlar. Özellikle dirençli olanlar, pankreas çeşidinin RNazlarıdır (RNaz A-benzeri enzimler); araştırmacının, taze dokuyu hızlı dondurarak, kaotropik lizis tamponunda homojenize ederek veya doku içindeki RNA'yı kimyasal olarak stabilize ederek bu enzimi engellemek için kelimenin tam anlamıyla saniyeleri vardır. Bu uyarı aynı şekilde diğer birçok doku için de geçerlidir. Açıkça, hem ekipmanın hem de reaktiflerin deneyin başlangıcından itibaren nükleazlardan arındırılmasını sağlamak araştırmacının görevidir. Çoğu moleküler biyolog için, kullanılan çözelti, malzeme ve aparatların steril olduğunu söylemek, genellikle RNaz steril, yani RNaz içermeyen bir ifadedir. Pazarlanan kimyasallar ve önceden hazırlanmış reaktifler ve solüsyonlar genellikle RNaz ve DNaz içermediği konusunda sertifikalandırılmıştır, ancak genellikle standart ürünlerden daha pahalıdır (Farrell, 2017).

Genellikle RNA odaklı laboratuvar çalışmalarında pankreatik RNaz A, B, C, bakteriyel RNaz I ve fungal RNaz T1 en sıkıntılı ekstraselüler enzimler olarak kabul edilmektedir. Bunlar arasında özellikle RNaz A ailesindeki enzimler son derece kararlıdır. Isınmaya karşı oldukça dirençlidirler ve hatta kaynatıldıktan sonra bile önemli ölçüde faaliyetlerini sürdürmektedirler. Ek olarak, geniş bir pH aralığı üzerinde aktiftirler ve hemen hemen hiç kofaktör gereksinimleri yoktur (Blumberg, 1987). Bununla birlikte RNA, belirli hücre tiplerinde çeşitli konsantrasyonlarda endojen olarak ve parmaklarda ekzojen olarak salgılanan RNazlar tarafından sindirilmeye karşı çok hassastır. İnsan

pankreatik ribonükleazlar doğası gereği salgı proteinleridir ve sığır pankreas RNaz A' nın bir karşılığı olarak kabul edilmiştir (Gaur ve ark., 2001).

2.3 RNaz A (3.1.27.5)

Tarihçesi

RNaz A ilk olarak 1920' de tanımlanmıştır (Arnold, 2014). 1940' ların sonlarında sığır pankreas dokusundan kilogram seviyelerinde saflaştırılarak enzimle ilgili çalışmalar devam etmiştir. Kaynak dokusunun bolluğunun ve olağanüstü konformasyonel stabilitesinin bir sonucu olarak 1950' ler ve 1960' larda protein yapısı ve fonksiyonel çalışmalar için favori bir konu olmuştur (Rosenberg, 2008). Sığır pankreas dokusundan izole edilen bir endoribonükleaz olan RNaz A, geniş getiren hayvanların bağırsaklarında mikroorganizmalar tarafından üretilen büyük miktarlarda RNA' nın sindiriminde işlev gördüğü düşünülmektedir. Bu yüzden geniş getirenlerin pankreasındaki miktarı özellikle yüksektir. Bu yüksek aktivite seviyesi, RNaz A' nın (EC 3.1.27.5) keşfedilmesine ve ayrıntılı karakterizasyonuna yol açmıştır. Pek çok farklı ribonükleaz formu vardır (ribonükleaz A, B, C, D, vb.). RNaz A, baskın modifiye edilmemiş formdur ve diğerleri glikozilasyon derecesine göre değişmektedir. Adındaki "A", substrat spesifikliğini değil, *Bos taurus*'un pankreasındaki enzimin baskın formunu ifade etmektedir (Azghandi ve ark., 2020; Raines, 1998).

RNaz A, büyük miktarda ve yüksek saflıkta bulunması nedeniyle, protein kimyası ve enzimolojisinde dönüm noktası niteliğindeki çalışmaların hedefi olmuştur. Protein dizisi ve yapı tayini için yöntemler geliştirmek ve protein katlanma probleminin doğasını ortaya çıkarmak için kullanılan RNaz A, biyokimya tarihindeki belki de en iyi karakterize edilmiş enzimdir (Kövéş ve ark., 2008). RNaz A, küçük, kararlı ve kolayca saflaştırıldığı için proteinlerle ilgili biyokimyasal araştırmalarda birçok ilkten sorumludur (Cuchillo ve ark., 2011). RNaz A' nın katalitik mekanizması, amino asitlerinin seviyesine kadar çözülen ilk enzimatik mekanizmadır. Ayrıca RNaz A, kristalin bir formda büyük miktarlarda elde edilebilen ilk enzimlerden biridir (Uebersohn, 2013).

RNaz A, proteinlerin katlanması, stabilitesi ve kimyası üzerinde dönüm noktası niteliğindeki birçok çalışmanın kaynağı olmuştur. Amino asit dizisinin katlanmış bir

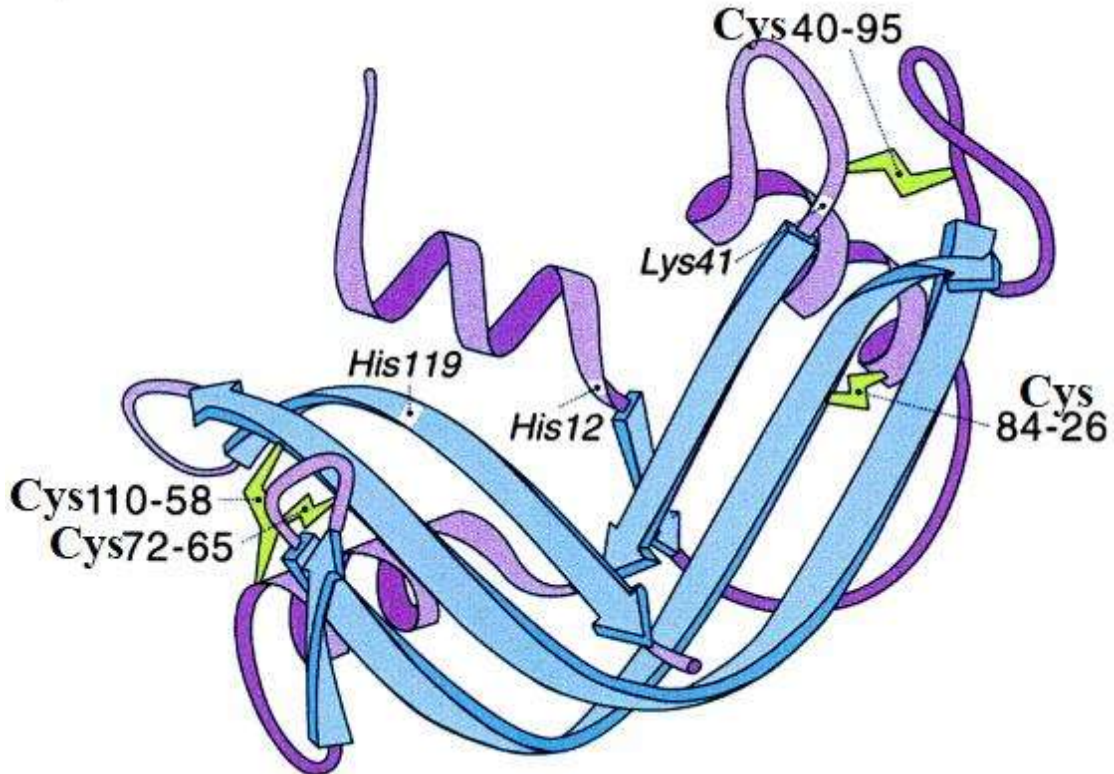
proteinin yapısını belirlediğini kanıtlamak ve enzimlerin katalitik merkezinde amino asitlerin belirli bir düzenlemesinin olduğunu göstermek için kullanılmıştır. RNaz A aynı zamanda sentetik olarak sentezlenen ilk enzimdir ve biyolojik moleküllerin yapay olarak inşa edilebilen basit kimyasal varlıklar olduğunu göstermektedir. RNaz A yardımıyla keşfedilen bu temel kavramların tümü Nobel Ödülü'ne layık görülmüştür (Çizelge 2.4) (Raines, 1998).

Çizelge 2. 4. RNaz A ile ilgili Nobel ödüllü çalışmalar (Raines, 1998).

Araştırmacılar	Yıl	Konu
Christian B. Anfinsen	1972	“Protein Zincirlerinin Katlanmasına Yönelik İlkeler Üzerine Çalışmalar”
Stanford Moore	1972	“Pankreatik Ribonükleaz Ve Deoksiribonükleazının Kimyasal Yapıları”
William H. Stein	1972	“Pankreatik Ribonükleaz Ve Deoksiribonükleazının Kimyasal Yapıları”
Robert Bruce Merrifield	1984	“Katı-Faz Sentezi”

Yapısı

Bu enzim, protein yapısı ve enzim fonksiyonları çalışmalarında ana model olarak hizmet vermektedir.



Şekil 2. 13. Omurgalı RNaz süper ailesinin prototipi olan ribonükleaz A'nın üç boyutlu yapısının şerit diyagramı (Klink ve ark., 2000)

Enzim kristal formda 1940 yılında elde edilmiştir. RNaz A, bir x-ışını kristal yapısının belirlendiği dördüncü proteindir. Şimdilerde RNaz A' nın tüm amino asit dizisi bilinmektedir. 124 amino aside ve 13.686 Da mol kütesine sahip, nispeten küçük, monomerik bir enzimdir.

Genel olarak, proteinin üç boyutlu yapısı, aktif bölgenin yerini gösteren bir yarıkla birlikte küresel bir böbrek şeklini almaktadır. 100' den fazla üç boyutlu RNaz A yapısı ve varyantları, protein veri bankasında (<http://www.rcsb.org>) mevcuttur (Smith, 2006). Uzun dört antiparalel β iplik ve üç kısa α sarmal içermektedir (Şekil 2.13).

Uygun pozisyonlarda 3 katalitik kalıntıya (1 lizin ve 2 histidin) ve üç ila dört disülfid bağı oluşturan 6 ila 8 sisteine sahiptirler. Bu korunmuş kalıntılar dışında, RNazlar oldukça farklıdır ve sekans kimlikleri % 20 ila yaklaşık % 100 arasında değişmektedir. RNaz A üst ailesinin üyeleri, farklı amino asit dizilerine ancak benzer üçüncül yapılara sahiptir (Leland ve ark., 1998).

His12 ve His119, aktif bölgenin parçasıdır ve RNA bölünmesine asit-baz katalizine katkıda bulunmaktadır. Proteinin bazlığına katkıda bulunan dokuz lizin ve dört arginin de ilgi çekicidir. Lys41, aktif bölgeye yakın olup kataliz için kritik olduğu bilinmektedir (Eun, 1996).

Birçok türden pankreas RNazları glikozile edilmektedir. Glikozidik yan zincirler için dört bağlanma yeri vardır ve tümü asparajin kalıntılarını içermektedir. Bu yan zincirlerin rolünün, RNaz A molekülünü bağırsakta emilmekten korumak olduğu ileri sürülmüştür. In vivo RNaz A proteini ilk olarak salgılama sırasında çıkarılan N-terminalinde 25 amino asit uzantısı içeren 16,100 Da büyüklüğünde bir protein olarak sentezlenmektedir. Önceden salgılanan formun da enzimatik olarak aktif olduğu görülmektedir (Burrell, 1993).

Diğer RNaz türleri, örneğin RNaz B, C ve D de pankreas salgılarından izole edilmiştir. Asn34'te farklı şeker bileşenleri ile glikozile edilmeleri haricinde, RNaz A ile aynı oldukları bilinmektedir (Eun, 1996).

Stabilitesi

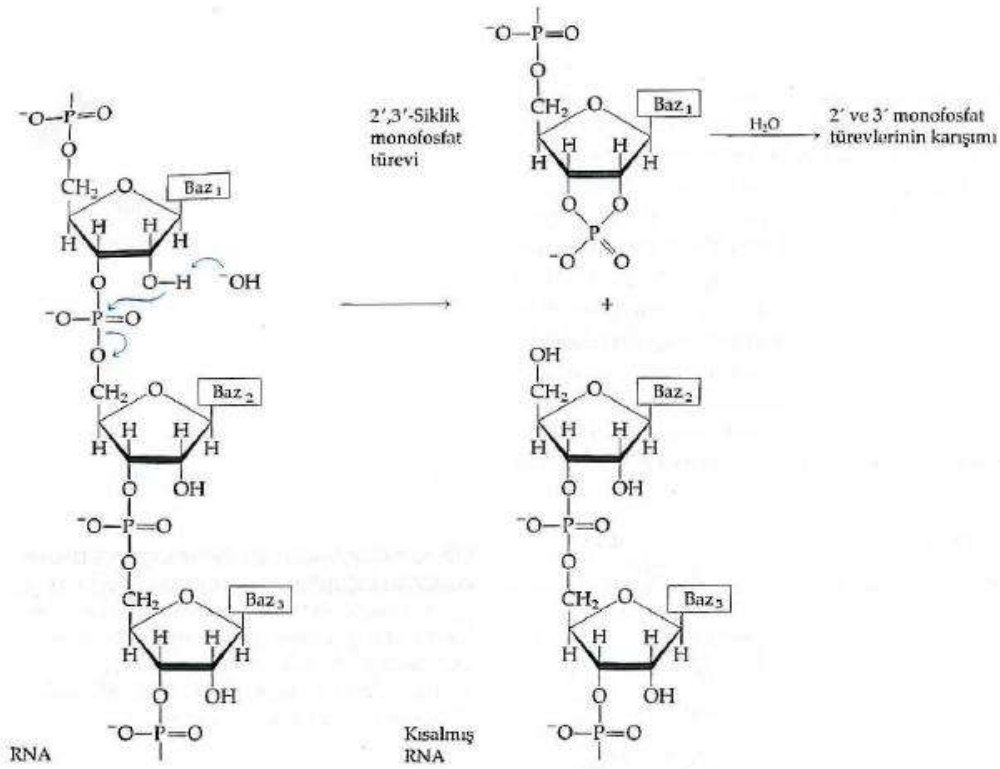
RNaz A, muhtemelen moleküler biyologların kullanacağı en kararlı enzimlerden biridir. 25 °C' nin altındaki geniş pH değerleri aralığında oldukça kararlıdır. 100 °C' de enzim en çok pH 2.0 ve pH 4.5 arasında stabildir. Örneğin 100 °C' de ve pH 3.5' te 30 dk ısıtma aktivitenin yalnızca % 21' ini yok ederken, pH 9.0' da 5 dk % 90' dan fazlasını yok etmektedir (Burrell, 1993).

RNaz A oldukça dayanıklıdır öyle ki sığır pankreasından RNaz A'nın saflaştırılması için kullanılan bir prosedürde, ekstraktlar sülfürik asit ile muamele edildikten sonra kaynayana kadar ısıtılmış ve bu işlemler enzimin aktivitesine etki etmemiştir. RNaz A' nın bu stabilitesi, büyük ölçüde zincirin farklı kısımlarını birbirine yapıştıran dört disülfid bağlantısından kaynaklanmaktadır. RNaz A, doğal halde Cys26-Cys84, Cys58-Cys110, Cys65-Cys72, Cys40-Cys95 olmak üzere dört disülfid bağına sahiptir; bu, kendi boyutundaki bir protein için alışılmadık derecede büyük bir sayıdır (Klink ve ark., 2000).

pH 5.0' da UV ışığı (254 nm), muhtemelen proteindeki disülfür köprülerinin tahrip olmasının bir sonucu olarak enzimi etkisiz hale getirebilmektedir. Bu disülfür köprülerinin kimyasal olarak yok edilmesi de aktiviteyi yok edebilmektedir. Disülfür köprüleri denatürasyon yöntemiyle bozulmadan bırakılırsa, protein oldukça hızlı bir şekilde yeniden katlanabilmektedir. Disülfür köprüleri yeniden oksitlenirse enzim aktif hale geri dönebilmektedir (Burrell, 1993).

Reaksiyon Mekanizması

Riboz, deoksiribozdan farklı olarak hem 2' hem de 3' pozisyonlarında hidroksil grupları taşıdığından, RNA kimyasal olarak DNA'dan çok daha reaktif olmakla birlikte fosfat ve riboz arasında bulunan fosfodiester bağlarını hidrolize eden çeşitli özgülükteki ribonükleazlar için parçalaması kolay bir avdır (Green ve Sambrook, 2019). Hücrel transkripsiyon ile üretilen RNA, ribonükleazların etkisiyle bozunmaktadır.



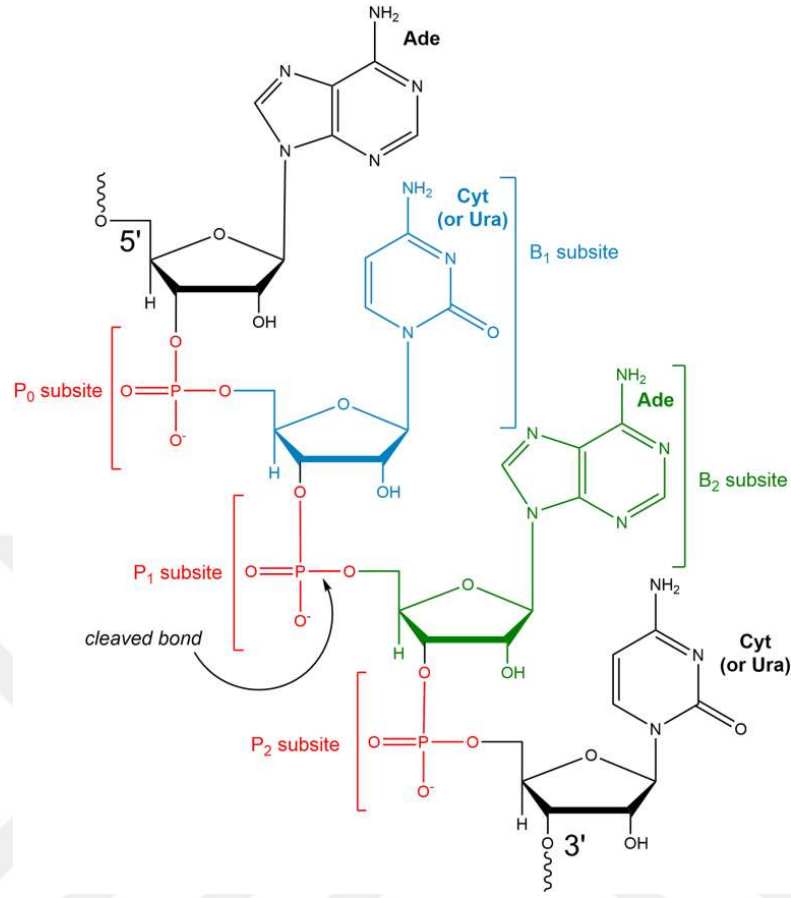
Şekil 2. 14. Şekil 2.14. RNA' nın degradasyonu (Lehninger ve ark., 2000)

RNA' nın omurgasını birbirine bağlayan fosfo-ester bağlarının hidrolizi yoluyla tek sarmallı RNA' yı kesmektedir (Şekil 2.14). Bu ailenin prototip bir üyesi olan RNaz A, bu reaksiyonu neredeyse difüzyon yoluyla RNA ile temas edebileceği kadar hızlı bir şekilde katalize etmektedir (Cho ve ark., 2005).

Büyük miktarlarda saf proteinin mevcudiyetinin yanı sıra yüksek stabilitesi ve küçük boyutu (sadece 124 aa) ile RNaz A, RNA' ya bağlanmasının ve bölünmesinin araştırıldığı ilk enzimatik reaksiyon mekanizması olmuştur. RNaz A, enzimlerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini ortaya çıkarmak için klasik bir modeldir. Bu modelde, RNaz A' dan His12 ve His119 kalıntıları, bir 2',3'-siklik fosfodiester ara ürünü aracılığıyla bir fosfodiester bağımlı hidrolize etmek için sırasıyla genel baz ve asit görevi görmektedir. 1966' da bu model, geçiş durumunda negatif yük oluşumunu stabilize etmeye yardımcı olan ek bir katalitik kalıntı olan Lys41' i içerecek şekilde revize edilmiştir. Neredeyse 30 yıl sonra, RNA bazlarına bağlanan ve proteinin bazlar arasında bölünme tercihini sağlayan çoklu ek alt bölgelerin rolü geliştirilmiştir. Ayrıca, RNaz A üzerindeki çok sayıda katyonik kalıntının önemi de keşfedilmiştir. RNaz A' nın, pozitif

yükleri, proteinin katyonik yüzeyinin etrafını saran uzun bir RNA zinciri ile geçici olarak ilişki kurmasını sağlamaktadır (Oroz ve Laurents, 2019).

RNaz A, katyonik bir yarıқта substrat olarak RNA' yı bağlamaktadır. Yerleşik terminolojiye göre aktif bölge, sırasıyla RNA bazları ve fosfat grupları ile etkileşime giren B ve P alt bölgelerine bölünmektedir. Yapısal çalışmalar, bu süper ailenin arketipik üyesi olan sığır RNaz A' nın aktif bölgesindeki fosfat grupları, pirimidin ve pürin nükleotit bazları için bağlanma bölgeleri hakkında ayrıntılı bilgi sağlamıştır (Bafna ve ark., 2019). Yarık, spesifik olarak bağlı bir substratın bazları etkileşime giren alt bölgeler (B1, B2 ve B3) ve fosforil gruplarıyla etkileşime giren alt bölgeler (P0, P1 ve P2) içermektedir. B1 alt bölgesi sadece pirimidin bazlarını bağlamaktadır. B2 ve B3 alt bölgeleri, pürin bazlarını bağlamayı tercih etmektedir. P1 alt bölgesindeki His12, His119 ve Lys41, enzimin katalitik işlevi için en merkezi kalıntılardır. RNaz homologları arasında kesinlikle korunur ve reaksiyonda kilit rol oynamaktadır. Diğer alt bölgeler homologlar arasında daha değişkenlik gösterebilmektedir. Enzim, aktif bölge olan P1 alt bölgesine bağlı bir fosforil grubunun P-O bağının bölünmesini katalize etmektedir. P0 (Lys66) ve P2 (Lys7 ve Arg10) alt bölgelerini oluşturan amino asit kalıntıları, substratın enzime bağlanma afinitesini arttırarak dolaylı olarak katalize katılmaktadır (Fisher ve ark., 1998; Polydoridis ve ark., 2007) (Şekil 2.15).



Şekil 2. 15. RNaz A substrat bağlama alt bölgeleri (Bafna ve ark., 2019)

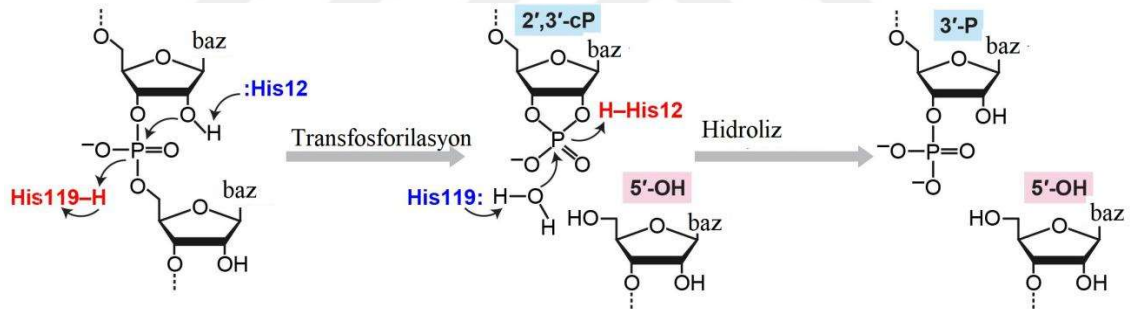
RNaz A gibi tüm RNaz homologları, aynı mekanizma ile RNA' nın bölünmesini katalize etmektedir. Katalitik bölgede iki histidin kalıntısı yer almaktadır. His12, ribozun hidroksil grubu üzerine etki etmektedir. His119 ise fosforil kısmına etkilidir. Böylece molekülün iki kısmından kırılma gerçekleşmektedir. Beş aminoasidin yer aldığı bazik bölge RNA' yı bağlamaktadır. Ancak ribonükleolitik aktiviteleri, aktif bölgelerinin yapılarındaki farklılıklar nedeniyle hem büyüklük hem de özgüllük açısından önemli ölçüde farklılık gösterebilmektedir. Bazıları spesifik RNA substratlarına karşı çeşitli katalitik aktivitelere sahiptirler (Leonidas ve ark., 1999).

RNaz A, pirimidin bazlarına özgü bir endoribonükleazdır. Bu nedenle P-O5' bağlarını keserek RNA' yı hem mononükleotitlere hem de oligonükleotitlere bölmektedir. RNA' nın sitozin veya urasil kalıntılarını spesifik olarak hidrolize etmektedir. Enzim, C ve U kalıntılarının 3' tarafında RNA' nın fosfodiester bağlarını keserek 3'-P ve 5'-OH uçlu mono- ve oligoribonükleotit ürünlerini çıkaran tepkimeyi katalizler. Reaksiyon, iki

histidin kalıntısının (His12 ve His119) katalitik olarak temel roller oynadığı iki aşamalı bir işlemdir (Shigematsu ve ark., 2018) (Şekil 2.16).

1. Transfosforilasyon: His12' nin yan zinciri, bir substrat molekülündeki 2'-OH' den bir protonu ayıran ve böylece daha pozitif yüklü fosfor (P) atomu üzerinde 2'-O tarafından bir nükleofilik saldırıyı kolaylaştıran genel baz görevi görmektedir. His119, bağın kesilmesini teşvik etmek için P-O-R' bağındaki oksijen atomuna proton veren genel bir asit görevi görmektedir. Bunun sonucu olarak 2', 3'-siklik ribonükleotit fosfat ara ürünü oluşmaktadır.

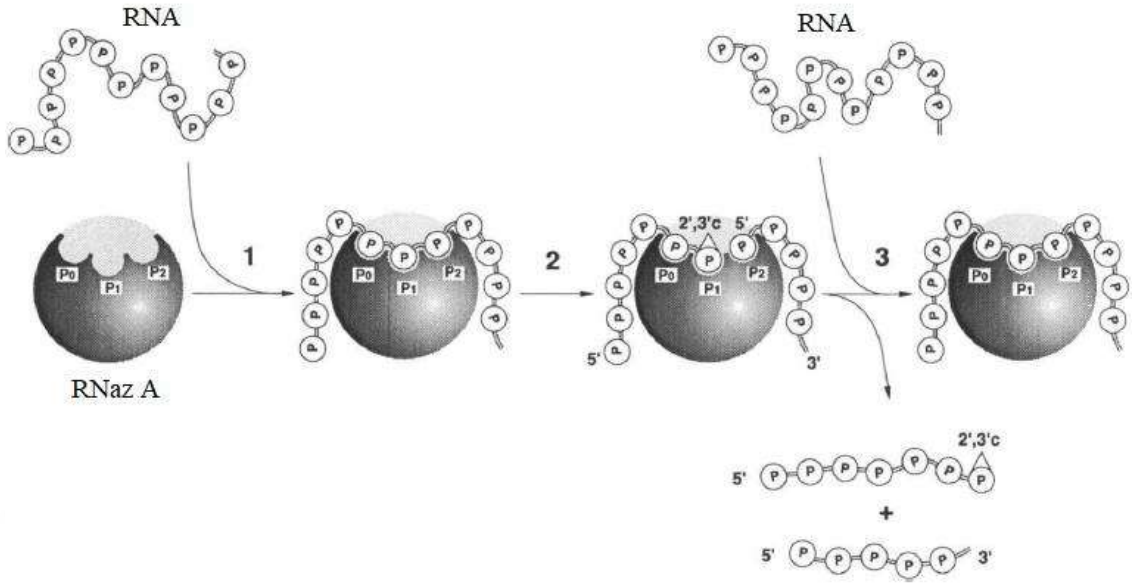
2. Hidroliz: Reaksiyonun ikinci aşaması için, bu iki His kalıntısının yan zincirlerinin genel asit ve baz aktiviteleri tersine çevrilmektedir. His12, yeni edindiği protonunu 2'-3'-siklik ribonükleotit fosfat ara ürününe bağışlayarak genel bir asit görevi görürken, genel bir baz olarak işlev gören His119, aynı ara ürün üzerinde hidroksil saldırısını desteklemek için su molekülünden bir proton kabul etmektedir.



Şekil 2. 16. RNaz A enzim etki mekanizması 1. Transfosforilasyon basamağı 2. Hidroliz basamağı (Shigematsu ve ark., 2018)

Histidin, yan zincir olarak imidazol halkasına sahiptir. Nötre yakın bir pK_a değerine ($pK_a=6$) sahip olduğundan, fizyolojik pH' da, hem proton alıcısı (akseptör) hem de vericisi (donör) olabilmektedir. Histidinlerin bu özellikleri sayesinde RNaz A genel asit baz katalizi ile substratlarını kimyasal olarak değiştirmektedir (Smith ve ark., 2008).

Hücrel RNA molekülleri fosfat veya hidroksil uçları içermektedir. 2',3'-siklik fosfat (cP), esas olarak ribonükleazlar tarafından RNA bölünmesinden üretilen 3'-terminal RNA formlarından biridir (Shigematsu ve ark., 2018) (Şekil 2.17).



Şekil 2. 17. Kısalmış RNA formları (Moussaoui ve ark., 1996)

Fonksiyonları

Sığır pankreatik ribonükleazı (RNaz A), RNA' nın bölünmesini katalize etmektedir. Varsayılan biyolojik işlevi, geniş getirenlerin bağırsaklarında biriken büyük miktarlardaki RNA' yı parçalamaktır. RNaz A üst ailesinin diğer üyeleri, çoğalma önleyici, sitotoksik, embriyotoksik, aspermatojenik ve antitümöral aktiviteler dahil olmak üzere çeşitli ilginç biyolojik özelliklere sahiptir (Rutkoski ve ark., 2005).

Ticari Kullanımı

Laboratuvar çalışmalarında özellikle organizmalardan saf DNA eldesi konusunda sıklıkla başvurulmaktadır. RNaz A, RNA' nın sitozini veya urasil kalıntılarını spesifik olarak hidrolize ederek DNA saflaştırmasında yaygın olarak tercih edilen bir endonükleazdır (Nichols ve Yue, 2008; Dang ve ark., 2020). DNA 2'-OH grubu içermediğinden dolayı ribonükleazlar DNA' nın bütünlüğüne zarar vermemektedir. RNA' yı uzaklaştırmak için kullanılan birçok farklı marka RNaz A bulunmaktadır.

Kaynakları

İnsan derisinin yüzeyinin güçlü RNaz aktivitesi içerdiği iyi bilinmektedir (Abtin ve ark., 2009; Wang, 2017). Tüplere, pipet uçlarına, tezgah üstlerine, vb. çıplak elle dokunulduğunda, bu kaynaktan RNaz kontaminasyonu elde etmek ve yaymak çok kolaydır.

Havadaki toz parçacıkları genellikle bakteri veya kf barındırabilmektedir. Bu mikroorganizmalardan gelen RNazlar, tozun oktğ her yerde birikir ve buna laboratuvar ekipmanı, açık ŐiŐeler vb. dahildir. RNA analizi için kullanılan reaktiflerin RNaz iermediğ onaylanmamıŐsa, kontaminasyonun bir kısmının bu kaynaktan gelme olasılığı yüksektir. Uygun bakım yapılmazsa, reaktifler laboratuvar da kontamine olabilmektedir. Dokular ve hücreler endojen RNazlar içerdiğinden RNaz kontaminasyonu örneklerin kendisinden de gelebilmektedir (Farrell, 2017).

İnhibitörleri

Hücre içi RNA' ların, 5' u kapama, 3' u poliadenilasyonu ve RNA protein kompleksi (ribonükleoprotein partikülü veya RNP) içerisinde katlanma gibi bir dizi strateji ile RNaz aktivitesinden korunduğ bilinmektedir (Bechhofer ve Deutscher, 2019). Bir başka koruma mekanizması, bazı hücre tiplerinde nispeten hücresel proteinlerin büyük çoğunluğunu oluşturan ve herhangi bir protein-protein etkileşiminin en yüksek afinitesi ile belirli RNazlara bağlanan ribonükleaz inhibitörüdür (RI). RI ile kompleks oluŐturduklarında, RNazlar RNA' ya bağlanamaz veya herhangi bir Şekilde yapısını bozamazlar.

RNaz aktivitesinin kontrolü için kullanılan bileşikler, spesifik ve spesifik olmayan RNaz inhibitörleri olmak üzere iki geniş kategoriye ayrılmaktadır. Spesifik inhibitörler, RNazların aktivitesine ket vururken, spesifik olmayan inhibitörler, DNaz, RNaz, proteaz ve benzeri dahil olmak üzere herhangi bir enzim aktivitesini ortadan kaldırmaktadır (Farrell, 2017).

Hücre dışında RNA bozunması, RNA bütünlüğüne ve saflığına dayanan in vitro uygulamalardan, hücre dışı protein sentezi (CFPS), revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), kantitatif RT-PCR (qRT-PCR), RNA-Seq ve Northern Blot analizleri için aynı zamanda RNA moleküllerinin saklanması esnasında RNazların tamamen uzaklaştırılması ya da inaktivasyonu, RNA örneğine zarar vermeden, denatüre etmeden, fenol ve kloroform gibi toksik kimyasallar kullanmadan zordur (Earl ve ark., 2018).

RNA' nın bozunması ile başa çıkabilmeye çalıŐan birtakım çözümler mevcuttur. Mesela örneklerin ve çözeltilerin dietilpirokarbonat (DEPC) ile ön işleme tabi tutmak,

ribonükleaz inhibisyonunda etkilidir. Ancak DEPC ve benzer kimyasallar karsinojenler olarak bilinmektedir. Dolayısıyla kullanımları için dikkat ve eğitim gerektirmektedir. Ayrıca bu kimyasallar amin, tiyol ve alkol grupları ile oldukça kolay reaksiyona girebilmektedirler ve bu yan grupları içeren biyolojik reaktiflerin kullanıldığı deneylerde tercih edilmemektedirler. Bazı tamponlarla (örneğin, Tris) uyumsuzdur. Tamponlarda ve cam eşyalarda RNazları inaktive etmek için kullanılan oldukça reaktif bir alkilleyici ajan olan DEPC, RNA'yı alkilleyebilmektedir. Bu bazı uygulamalar için RNA'yı kullanılamaz hale getirmektedir (Earl ve ark., 2018; Green ve Sambrook, 2019).

Vanadil ribonükleosit kompleksleri, birçok RNaz' ın aktif bölgelerine bağlanarak katalitik aktivitelerini neredeyse tamamen engellemektedir. Diğer biyolojik olmayan (non- biologic) bir çözüm, RNaz A inhibisyonu için bir araç olarak anyonik polimerler, örneğin polivinil sülfonik asidin (PVSA), güçlü bir RNaz A inhibitörüdür. Yinelene sülfat birimleri, RNA'nın omurgasını oluşturan tekrar eden fosfat birimlerine benzer ve RNaz A ile yarışmalı elektrostatik etkileşimler oluşturduğu düşünülür, böylece RNA bağlanma bölgelerini işgal ederek RNaz A'yı etkili bir şekilde inhibe etmektedir (Earl ve ark., 2018; Green ve Sambrook, 2019).

Biyolojik olarak üretilen protein yapısındaki RNaz inhibitörleri de vardır. Pek çok RNaz, hemen hemen tüm memeli dokularının sitoplazmasında bulunan bu proteinlere kovalent olmamakla birlikte çok sıkı bir şekilde bağlanır ve plasentadan bol miktarda izole edilebilmektedir. Bu protein inhibitörlerinin hedeflerine bağlanma afiniteleri oldukça yüksektir (1-70 fM) ve etkili bir şekilde inhibisyon sağlamaktadır. Doğal kaynaktan izolasyon ile veya rekombinant biyoteknolojisi kullanılarak laboratuvarlarda elde edilebilmektedir. RNA'nın izolasyonunun ve karakterizasyonunun tüm aşamalarında bütünlüğünü ciddi şekilde tehdit eden sağlam ve güçlü RNazların aktivitesini kontrol altında tutmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Green ve Sambrook, 2019).

RNaz A' nın ribonükleolitik aktivitesini kompetitif şekilde inhibe eden karbonhidrat bazlı hibrit moleküller dizayn edilebilmektedir (Tsirkone ve ark., 2009; Das ve ark., 2020).

RNA analizi ve miktar tayini en iyi sonucu elde etmek için tamamen sağlam, degrade olmamış RNA örnekleri gerektirmektedir. Fosfodiester bağlarının enzimatik olmayan hidrolizi, yüksek sıcaklık veya pH ve iki değerlikli katyonların (Mg^{2+} , Mn^{2+}) mevcudiyeti tarafından desteklense de, bir RNA numunesinin kirletici bir ribonükleaz (RNaz) tarafından hızla parçalanması muhtemeldir. RNA izolasyon prosedürleri sırasında RNazların tamamen çıkarılması veya etkisiz hale getirilmesi zordur ve bunlar, işleme sırasında numuneye yanlışlıkla dahil edilebilmektedir. Laboratuvarda RNazlar için birkaç olası kaynak vardır. RNazlar çevrede her yerde; polen, toz, deride bulunabilmektedir. Ribonükleaz koruma deneyleri veya plazmit preparasyonlarında RNA' yı parçalama gibi rutin laboratuvar prosedürleri, yüksek oranda saflaştırılmış, konsantre RNazlar tarafından sağlanmaktadır. RNaz, stok çözeltileri yapmak için kullanılan toz reaktiflerde veya RNA' yı işlemek için kullanılan pipet uçlarında ve tüplerde olabilmektedir. Birçok farklı kaynaktan RNazlar izole edilmiş ve karakterize edilmiştir. Sığır pankreasından izole edilen RNaz A, muhtemelen en iyi çalışılmış olanıdır ve yapı-fonksiyon çalışmaları için bir model sistem olarak kullanılmıştır. Diğer ticari olarak temin edilebilen RNazlar, *E. coli*' den RNaz 1 ve *Aspergillus oryzae*' den RNaz T1 de ısıya çok dayanıklıdır. Bu üç enzimin her biri farklı bir substrat spesifikliğine ve farklı bir amino asit dizisine sahiptir (Nichols ve Yue, 2008)

E. coli' de en az 20 farklı RNaz tanımlanmıştır. Bu verilere dayanarak, memeli hücreleri için sayıların çok daha büyük olduğunu tahmin etmek zor değildir. RNaz inhibitörleri, RNA izolasyonu ve RNA kullanımı sırasında RNA bozulmasını en aza indirmek veya hidroliz mekanizmalarını incelemek için geliştirilmiştir. Bazı inhibitörler çok çeşitli farklı RNazlar üzerinde aktifken, diğerleri çok spesifiktir. Bazı inhibitörler RNA izolasyonu için kullanılmaktadır ve diğerleri enzimatik reaksiyonlar sırasında profilaktik olarak en etkilidir. Kullanılacak RNaz inhibitörünün tipi uygulamaya bağlıdır (Pasloske, 2001).

2.4 Ribonükleaz İnhibitörü (RI)

Ribonükleazlar, tek sarmallı RNA' yı oldukça farklı şekillerde parçalamaktadır. Bu RNA düzenleyici proteinlerin de kendi düzenleyicileri vardır ve ribonükleaz inhibitörü olarak bilinmektedir. Ribonükleaz inhibitörü olmadan, omurgalılara özgü ribonükleazlar hücre ölümüne neden olabilmektedir (Lee ve ark., 2021).

RNA, biyolojide bilgi transferini etkileyen biyopolimerler arasında en az kararlı olanıdır. Yine de, RNA' nın in vivo ömrü, çoğunlukla enzimatik bozunma hızı ile belirlenmektedir. In vitro ribonükleaz inhibitörleri, RNaz A gibi salgılayıcı ribonükleazlarla tesadüfi kontaminasyonu sonucunda RNA' ya verilen hasarı azaltmak için sıklıkla kullanılmaktadır (Smith ve ark., 2003).

Ribonükleolitik aktivitenin kontrolü, RNA' nın moleküler biyolojik manipülasyonlarında önemlidir. Plasenta, RI' nın zengin bir kaynağıdır (Shapiro ve Vallee, 1991). Sitozolik RNaz inhibitörü, pankreatik RNaz A ailesinin son derece yüksek afiniteli monomerik RNazları ile bağlanan, böylece ribonükleolitik aktivitelerini tamamen inhibe eden Cys kalıntıları açısından oldukça zengin bir proteindir (Monti ve ark., 2007).

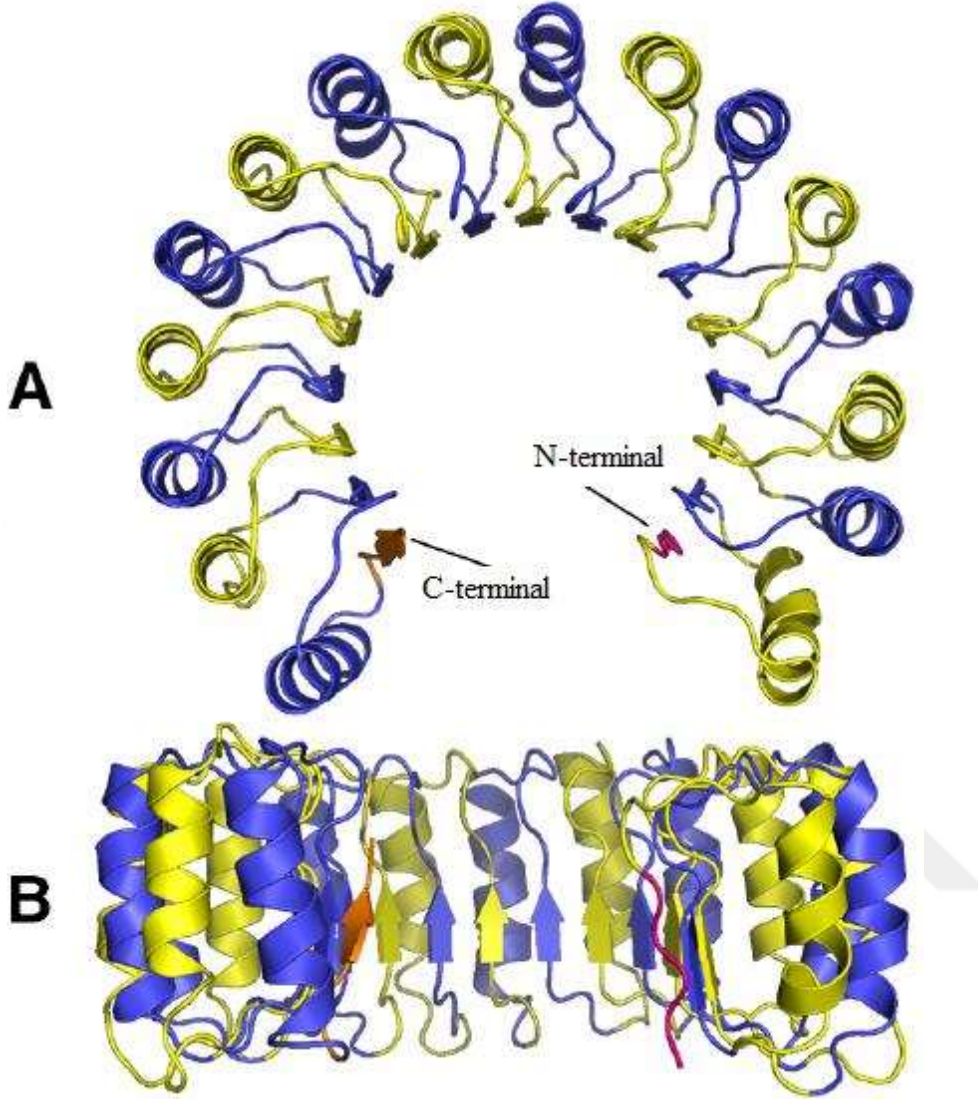
RI, tüm memeli hücrelerinin sitozolünde bulunan oldukça korunmuş, 460 aminoasitten oluşan 50 kDa boyutunda bir proteindir. RNazların ribonükleolitik aktivitesini engellemesi nedeniyle RI olarak adlandırılmıştır. RI, omurgalılara özgü RNaz A süper ailesinin çok sayıda üyesinin aktivitesini inhibe edebilmektedir. RI' nın üç boyutlu yapısı dikkat çekici olup belirgin bir at nalı şekli oluşturan α -sarmal ve β -iplikçik birimleri ile karakterize edilmektedir (Dickson ve ark., 2005).

RI, omurgalıya özgü ribonükleaz ailesinin veya RNaz A süper ailesinin çok sayıda üyesinin aktivitesini inhibe edebilmektedir. 1952' de “guinea pig” (kemirgen) karaciğeri ekstraktında RNazların aktivitesini engelleyen bir inhibitörün varlığı keşfedilmiştir. 1970' lerin sonlarında, bu aktivitenin 1:1 stokiometrik oranda ribonükleazlara bağlanan ve bunları inhibe eden ribonükleaz inhibitörünün etkisi olduğu bulunmuştur. Daha sonra RI' nın araştırılmasının en üst düzeye çıktığı dönem, fizikokimyasal ve fonksiyonel analiz için yeterli homojen protein miktarlarının eldesi için çeşitli yöntemlerin

geliştirilmesiyle başlamıştır. O zamandan beri, RI proteini; beyin, karaciğer, testis ve eritrositler dahil olmak üzere çok sayıda memeli kaynağından izole edilmiştir (Fominaya ve ark., 1988; Dickson ve ark., 2005). Sonraki on yıl, RI' nın çeşitli RNazlarla etkileşimleri üzerine ayrıntılı kinetik çalışmalar, sıkı bağlanmanın fiziksel temeli, RI' nın birincil yapısının belirlenmesi ve bu proteinin rekombinant üretimi için sistemlerin oluşturulması üzerine araştırmalar yapılmıştır. 1990' larda RI' nın üç boyutlu yapısı ve RI' nın çeşitli ligandlarını nasıl tanıdığına dair önemli bilgiler elde edilmiştir (Shapiro, 2001). RI, femtomolar afinite ile RNaz A' lara bağlanarak onları inaktif hale getirmektedir. RI ve onun hedef ribonükleazları tarafından oluşturulan kompleksler, bilinen en sıkı biyomoleküler etkileşimler arasındadır.

Yapısı

RI' nın üç boyutlu yapısı oldukça dikkat çekicidir. Birbirini takip eden α -sarmal / β -iplikli motiflerle, İspanya' daki Cordoba Camii/Katedrali' nin çifte kemerlerini anımsatan zarif bir yapı oluşturmaktadır. Ortaya çıkan yapı, yaklaşık 21 Å iç çapı ve yaklaşık 67 Å dış çapı olan bir at nalı benzeri küresel olmayan bir şekle sahiptir (Şekil 2.18). Bu yapının oluşturduğu geniş yüzey alanı, enzim-substrat kompleksinde önemli rol oynamaktadır (Oroz ve Laurents, 2019). İçbükey boşluğu sayesinde RI, RNaz A süper ailesinin birkaç üyesine 1:1 sitokiyometride bağlanmaktadır.



Şekil 2. 18. Ribonükleaz İnhibitörü. (A) yukarıdan aşağıya ve (B) ön görünümünden üç boyutlu şerit yapısı. C-terminali turuncu renkle, N-terminali pembe renkle gösterilmiştir. Mavi, A-tipi tekrarları, sarı B-tipi tekrarları temsil etmektedir. At nalı'nın dışında α -heliksler, iç kısımdaki oklar β iplikler (Uebersohn, 2013).

RI, alışılmadık derecede yüksek lösin ve sistein içeriği ile karakterize edilen bir amino asit bileşimine sahip asidik bir proteindir (pI ~4.7). RI' nın yapısı, tamamen protein-protein ve protein-ligand etkileşimleriyle spesifik olarak ilişkili hidrofobik bir alan olan lösin bakımından zengin tekrarlardan (15 -16 LRR motifinden) oluşmaktadır. Hem serbest hem de RNaz-bağlı RI' nın kristal yapıları, LRR kıvrımı ve bunun ligandlarla etkileşimi hakkında zengin bilgi vermektedir. RI neredeyse tamamen LRR' lerden yapılmıştır. Bu tür tekrarlar, hücre döngüsü regülasyonu, DNA onarımı, hücre dışı

matriks etkileşimleri ve enzim inhibisyonu dahil olmak üzere çok çeşitli işlevler sergileyen 100' den fazla proteinde tanımlanmıştır. LRR süper ailesinin en iyi karakterize edilmiş üyelerinden biri, pankreas süper ailesinden ribonükleazları (RNazlar) sıkıca bağlayan ve inhibe eden sitoplazmik bir protein olan ribonükleaz inhibitörüdür (RI). RI' da LRR motifi tipik olarak moleküler tanıma ve protein-protein bağlanma etkileşimlerine katkıda bulunmaktadır. RI proteinindeki LRR' ler 28 ila 29 kalıntı arasında değişmektedir. RI' deki 28 kalıntılı LRR' ler “A-tipi” tekrarlar 29 kalıntılı LRR' ler "B-tipi" tekrarlar olarak adlandırılmaktadır. Bu hidrofobik alan art arda birbirini izleyen A ve B tipini içeren 15 -16 LRR motifinden oluşmaktadır (Hofsteenge, 1994; Kobe ve Deisenhofer, 1996; Shapiro, 2001; Dickson ve ark., 2005; Uebersohn, 2013 ;Lomax ve ark., 2014) (Şekil 2.18).

10-17 pozisyonlarındaki A tipi CXLTXXXC sekansı, B tipi ise NXLGDXGa sekansı ile karakterize edilmektedir ("a" alifatik anlamına gelir). N ve C terminal tekrarları daha az homologdur (Hofsteenge, 1997).

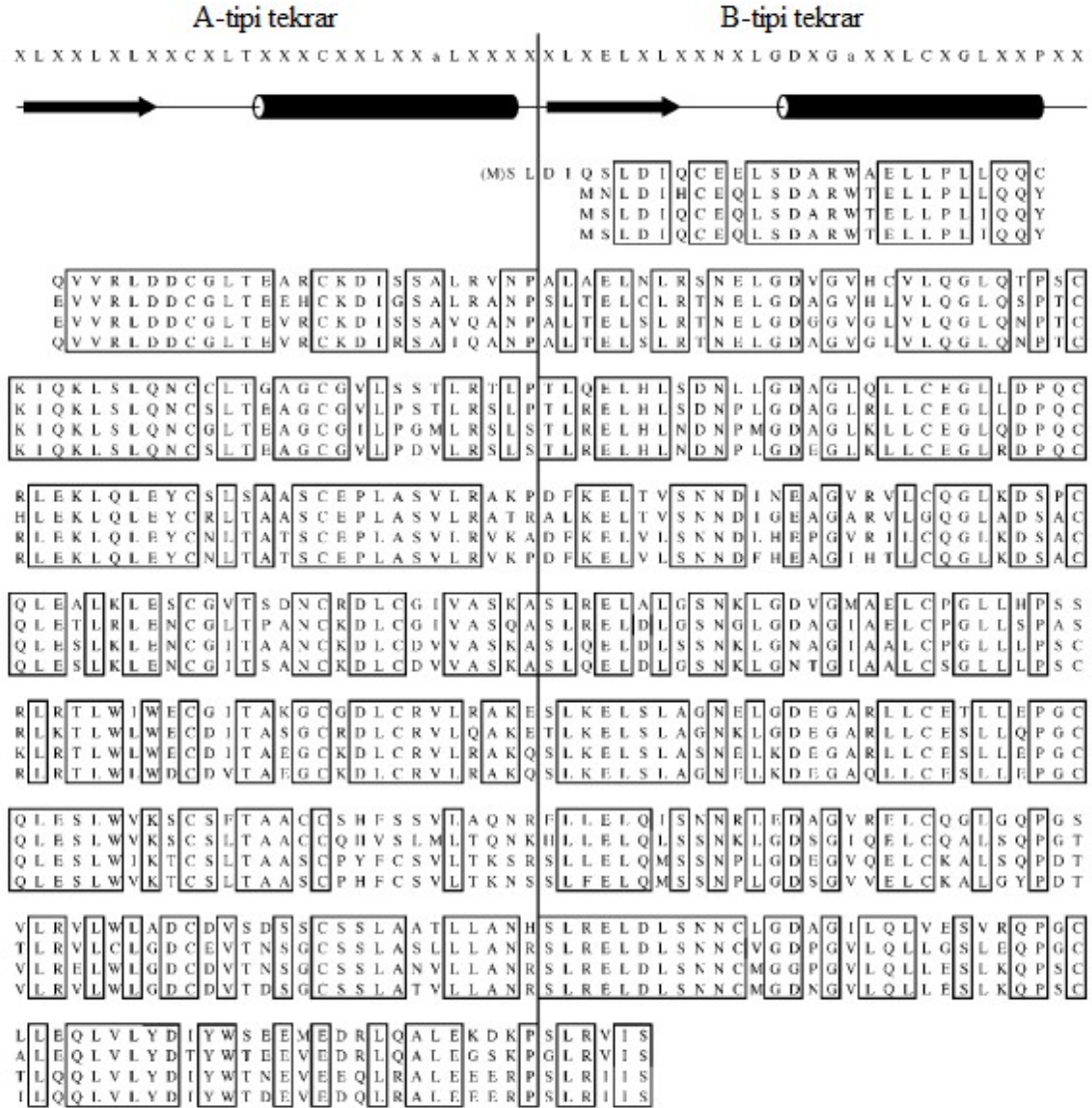
Lösine ek olarak protein, RI' nın ribonükleazları bağlaması için hepsinin indirgenmiş durumda olması gereken yüksek bir sistein kalıntısı içeriğine sahiptir (30-32 tane) (Oroz ve Laurents, 2019).

İlginç bir şekilde RI, RNaz A ailesinin ribonükleazlarıyla birlikte evrimleşmiş gibi görünmektedir. Bu birlikte evrim nedeniyle memeli RI, memeli RNaz A' ların hareketini tamamen bloke ederken kurbağaların RNazlarını engelleyememektedir (Oroz ve Laurents, 2019). Amfibi ve kuşlardan elde edilen RI' lar da, memeli pankreas tipi ribonükleazların etkisiz inhibitörleridir (Leland ve Raines, 2001).

İncelenen her memeli hücresi RI içermektedir. Bu oksidasyona duyarlı sitozolik protein, RNaz A' ya ve RNaz A süper ailesinin diğer üyelerine bağlanmaktadır (Haigis ve ark., 2003).

RI, önemli dizi ve yapı benzerliğini paylaşan homologlarla, memelilerde sıkı bir şekilde korunmaktadır. RI homologlarının birincil yapısı, proteinlere genel bir at nalı şekli veren LRR' lerden yapılmıştır. İnsan, domuz, fare ve sıçan RI amino asit dizileri % 66 özdeşliği paylaşmaktadır (Dickson, 2006) (Şekil 2.19). Yine başka bir çalışmada da domuz, keçi, koyun, fare, rat ve insan gibi memeli canlılardan tanımlanarak amino asit

dizileri çıkarılan RI' larda % 70' in üzerinde sekans benzerliği bulunduğu tespit edilmiştir (Guo ve ark., 2011).



Şekil 2. 19. İnsan, domuz, fare ve sıçandan elde edilen RI amino asit dizilerinin hizalanması. Kutu içine alınmış kısımlar korunmuş bölgelerdir. RI, 28 ve 29 amino asit uzunluğundaki birbirini izleyen iki homolog tekrardan oluşur.

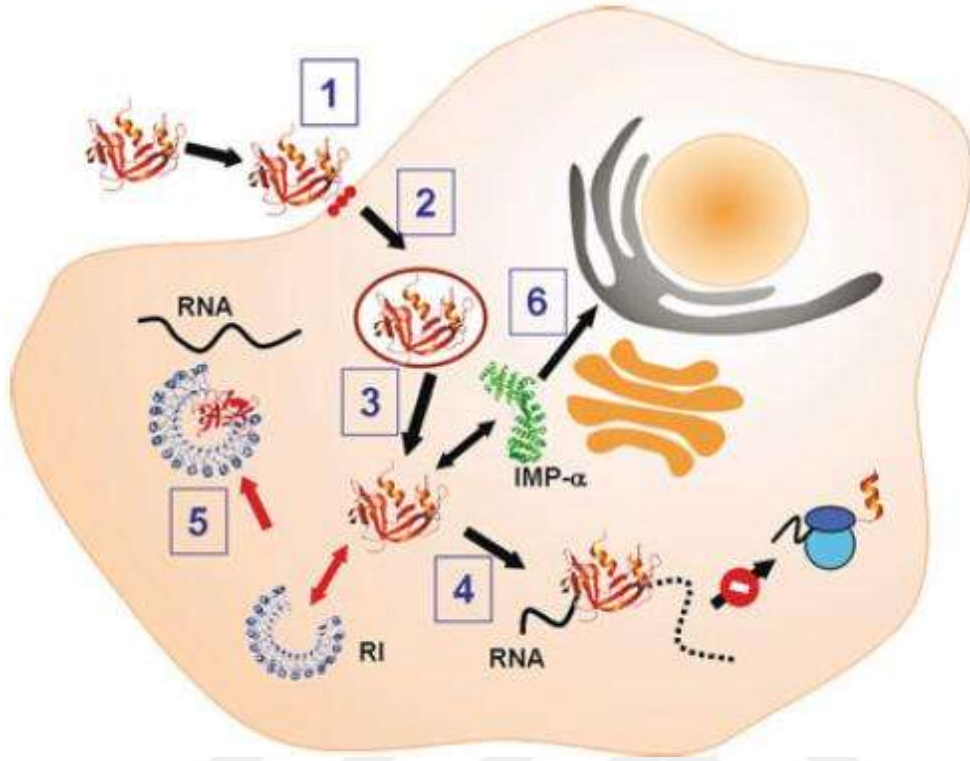
RI, çok sınırlı dizi benzerliklerini paylaşan pankreas süper ailesinden birkaç ribonükleaza yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Buna karşılık, RI dizileri yüksek oranda korunur; insan ve sıçan RI' ları, insan RI' sının N-terminalinde kısa bir ekleme dışında hiçbir ekleme veya silme olmaksızın domuz RI' sına çok benzerdir. Domuz ve sıçan 456 amino asit içerirken, hRI' nın dört artıklı N-terminal uzantısı nedeniyle 460 amino asit vardır. hRI' nın N terminalinin asetilasyonu dışında translasyon sonrası hiçbir değişiklik

içermediği gösterilmiştir. Tüm sisteinler indirgenmiş formda mevcuttur (Kobe ve Deisenhofer, 1996).

RI' nın tamamen etkisizleştirilmesine 15 disülfür köprüsünün oluşumu eşlik eder ve proteolize karşı duyarlılığını büyük ölçüde artırmaktadır. Süreç son derece işbirlikçidir, ya hep ya hiç şeklinde gerçekleşmektedir (Hofsteenge, 1997). RI' nın oksidasyona duyarlılığı, reaktif olarak kullanımını azaltmaktadır. Doğal proteinde bulunan sistein kalıntılarının hiçbirisi bir disülfid bağına katılmamaktadır (Kim ve ark., 1999).

Biyolojik rolü

RI' nın biyolojik rolü bütünüyle bilinmemektedir. Proteinin fizyolojik rolü henüz belirlenmemiş olsa da, son veriler proteinin in vivo rolünün kan damarı gelişiminin düzenlenmesi olabileceğini düşündürmüştür. RI' nın güçlü inhibitör aktivitesinin RNA işlemede, anjiyogenezde ve hücrenin toksik ribonükleazlardan korunmasında kullanıldığı düşünülmektedir. RI tarafından tanınan ribonükleazlar salgılanan proteinlerdir, oysa RI yalnızca sitozolde bulunmaktadır. Bununla birlikte, RI afinitesinin ribonükleaz sitotoksitesinin birincil belirleyicisi olduğu gösterilmiştir. Sadece RI' dan kaçan ribonükleazlar bir hücreyi öldürebilmektedir (Dickson ve ark., 2005) (Şekil 2.20).



Şekil 2. 20. Sitotoksik RNazlar (Ribó ve ark., 2011) 1. RNazlar, etkileşime girer 2. Endositoza uğrarlar 3. Endositik veziküllerin birinden RNaz, lizozomal degradasyondan kaçınarak sitozole geçer 4. RNaz sitozolde kararlılığını korursa sitotoksik aktivitesi hücrel RNA' yı bozar ve apoptozu uyarır 5. RI tarafından yakalanırsa, ribonükleolitik aktivitesini kaybeder ve RNA' yı hasarsız bırakır 6. RNazın RI ile etkileşimini engelleyen ve onu hücre çekirdeği gibi RI içermeyen RNA içeren bir organelle yönlendiren α -importin gibi moleküllerle hücre ölümü indüklenir

Sentetik veya doğal RNaz inhibitörleri, kanser tedavisinde terapötik ajan olarak çokça araştırılmıştır. Anjiyogenez sıklıkla bir pankreatik RNaz A homologu olan anjiyojenin (ANG) tarafından teşvik edilir ve anjiyojenin inhibisyonunun tümörlerin büyümesinin ve metastazının baskılanmasına neden olması beklenmektedir (Thomas ve ark., 2018).

RI bağlanmasından kaçınmak için tasarlanmış RNaz A varyantları, çeşitli insan tümör hatlarına karşı sitotoksitede belirgin bir artışa neden olmaktadır. Bu bulgular, RI' nın sitozolik lokalizasyonu ve yüksek afinite ile ptRNazları bağlama yeteneği ile birleştiğinde, hücreleri salgılanan RNazların ekzojen istilasından koruduğunu göstermektedir (Dickson ve Raines, 2009).

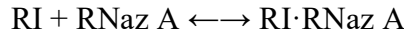
Memeli canlılarla yapılan çalışmalarda, böbrekler, timus, yemek borusu, testisler, plasenta, beyin, akciğer, dalak, kalp, yağ dokusu, cilt ve kırmızı kan hücreleri dahil olmak üzere birçok hücre tipinin sitozolünde RI bulunmuştur. Farklı dokulardan izole edilen bu RI' lar birbiri ile homologdur. Ayrıca, RI' nın, hücre dışı sıvılarda bol miktarda bulunan istilacı ribonükleazlara karşı memeli hücrelerini koruyan bir nöbetçi olduğu bilinmektedir. Ancak salgılayıcı ribonükleazları inhibe etmesine rağmen, RI' ya plazma, tükürük ve idrar gibi hücre dışı sıvılarda rastlanamamıştır (Dickson ve ark., 2005).

İnsan plasental RNaz inhibitörü, birçok memeli dokusunun sitoplazmik ekstraktlarında bulunan ve birbiriyle ilişkili RNaz inhibitörlerinden biridir. Bu RNaz inhibitörünün güçlü olması, RNA bütünlüğünün korunmasının gerekli olduğu in vitro transkripsiyon ve translasyon reaksiyonlarında yaygın olarak kullanılmasına yol açmıştır (Lee ve Vallee, 1989).

İnsan plasental ribonükleaz / anjiyojenin inhibitörü, birkaç memeli dokusunda oluşan bir sitoplazmik ribonükleaz inhibitörüdür. İnsan plasentasından saflaştırılan RI 'nın, sıgır pankreatik RNaz A' yı bağlayarak hücre içi RNazları kontrol ettiği ve non-kompetitif bir inhibitör olarak işlev gördüğü gösterilmiştir (Park ve ark., 2008).

RNaz inhibitörleri, RNA moleküllerini hazırlama sırasında RNazlar tarafından istenmeyen bozunmadan korumak için başka bir pratik kullanıma sahiptir. Bunun için ticari olarak rekombinant insan plasental RNaz inhibitörü temin edilebilmektedir (Kosuge ve ark., 2003).

RNaz A- RI kompleksi



RI-RNaz sistemi doğal protein mühendisliğinin dikkate değer örneklerinden birisidir. RI, ribonükleazları sıkı ve hızlı bir şekilde bağlamaktadır. Bu etkileyici derecede hızlı bağlanma kuvvetine, elektrostatik çekim veya pozitif - negatif yükler arasındaki çekim yardımcı olmaktadır. Biyolojik pH' ta ribonükleazlar katyonik proteinlerdir (pozitif yüklüdür) ve RI bir anyonik proteindir. Bu, RI ve hedef ribonükleazlarının tek başına difüzyondan daha hızlı bir araya getirilmesine yol açmaktadır. RI, büyük ve tekrarlayan

amino asit kalıntıları içeren bir protein olmasına rağmen, RI ve ribonükleazlar arasındaki bağlanma etkileşimlerinin çoğu, RI' nın C-terminal bölgesinde yoğunlaşmaktadır (Kobe ve Deisenhofer, 1996). RI, substratın aktif bölgeye erişimini bloke ederek RNaz A' yı inhibe etmektedir. Enzim, RI' nın C-terminal ucuyla kenetlenmektedir (Hofsteenge, 1997).

RI, substratların sterik engelleme yoluyla aktif bölgeye erişimini önleyerek RNaz' ı inhibe eder ve RNaz A-RNA etkileşimini büyük ölçüde taklit etmez. Protein-protein komplekslerinde normalden daha büyük erişilebilir bir yüzey alanı, RI ve RNaz A arasındaki arayüzde gömülüdür. İki protein arasında çok sayıda temas bölgesi vardır. Şekil tamamlayıcılık derecesi, protein-protein komplekslerinde gözlenenden genellikle biraz daha düşüktür. RNaz A-RI arayüzünde, daha az tamamlayıcılık, iki molekül arasında birçok etkileşim için bir fırsat sağlayan ve bu nedenle muhtemelen kompleksin gözlemlenen sıklığı için ana faktörlerden biri olan aşırı büyük arayüz tarafından görünüşte telafi edilmektedir (Kobe, 2001).

Katalitik kalıntılar Lys41 ve His119 dahil olmak üzere birkaç aktif bölge kalıntısı inhibitörle temas eder; His12, inhibitör ile etkileşime girmez. RNaz A' nın diğer RI ile temas eden RNA bağlayıcı kalıntıları arasında Lys7, Gln11, Arg39, Val43, Cys65, Lys66, Gln69, Asn71, Glu111 bulunur, ancak Cys40, Asn44, Thr45, Asp83, Phe120 ve Ser123 dahil değildir (Kobe ve Deisenhofer, 1996).

Ribonükleaz inhibitörü (RI), omurgalılara özgü ribonükleazları bağlayan hücre içi bir memeli proteinidir; bu etkileşim, şimdiye kadar keşfedilen en sıkı kovalent olmayan etkileşimlerden biridir. RI ve ribonükleazlar arasındaki kovalent olmayan bağlanma etkileşimi femtomolar afinite ile meydana gelen istisnai bir durumdur. Bir enzimin inhibitörü için afinitesi veya birbirlerine ne kadar sıkı bağlandıkları, inhibisyon sabiti veya K_i olarak bilinen bir değerle nicel olarak temsil edilebilmektedir. Bu değer molarite olarak ölçülmektedir. Hedefinin aktivitesini % 50 azaltmak için gereken inhibitör konsantrasyonunu temsil etmektedir. Daha düşük inhibisyon sabitleri, iki protein arasında daha yüksek bir afinite anlamına gelmektedir (Uebersohn, 2013).

Sığır pankreas ribonükleaz (RNaz A) süper ailesinin salgılanan üyeleri ile sitozolik ribonükleaz inhibitör proteini (RI) arasında oluşan kompleksin birleşme oranı yüksektir

(RNaz A ve insan RI için $K_a = \sim 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). İlgili ayrışma hızı düşüktür, femtomolar aralıkta bir denge ayrışma sabiti vermektedir (RI ve insan pankreas ribonükleazı (RNaz 1) arasındaki kompleks için $K_d = 0.29 \text{ fM}$). Bu yüksek stabilite, görünüşe göre hücreleri, ribonükleazların gelişigüzel istilasına karşı korumak için evrimleşmiştir. Aslında, RI' dan kaçan RNaz A ve RNaz 1 varyantları sitotoksiktir. RI ve ribonükleazlar arasındaki arayüz, protein-protein komplekslerinde tipik olarak mevcut olandan daha yüksek oranda yüklü kalıntı içerir, bu da kompleks stabilitede elektrostatiklerin bir rolü olduğunu düşündürmektedir. $pI = 4.7$ izoelektrik noktası olan anyonik ve pankreas tipi ribonükleazlar yüksek oranda katyoniktir (Turcotte ve Raines, 2009).

RI ve onun aynı kökenli ribonükleazları, bir protein-protein kompleksini karakterize etmek için benzersiz bir sistemi temsil etmektedir (Johnson ve ark., 2007). RI, RNaz A üst ailesinin memeli üyelerini, pikomolar aralığın içinde veya altındaki K_i değerleriyle olağanüstü sıkı bir şekilde bağlayan 50 kDa' lık bir proteindir (Arnold ve ark., 2011).

Ribonükleaz inhibitörü, tüm hücrel proteinlerin % 0.1' ini oluşturan sitozolde yerleşik bir proteindir. RI, saldırgan ribonükleazlar için bir nöbetçi görevi görür ve at nalı şeklindeki bağlanma yüzeyi aracılığıyla RNaz A süper ailesinin üyelerinin ribonükleolitik aktivitesini inhibe etmektedir. RI, hızla gelişen RNaz A ailesi üyeleri arasındaki düşük dizi benzerliğine rağmen bu kontrolü göstermektedir. (Johnson ve ark., 2007).

Proteinlerin diğer proteinler tarafından doğru ve yüksek düzeyde seçici olarak tanınması çoğu biyolojik süreci yönlendirmektedir. Bununla birlikte, tek bir proteinin, yapısal olarak ilişkili çok sayıda partneri tanıma yeteneğinde karışıklık sergilediği çok sayıda durum vardır. Plasental ribonükleaz inhibitörü (RI), bu tür rastgele bir proteinin dikkate değer bir örneğidir. Memeli pankreas RNaz süper ailesinin farklı üyelerinin tümünü yüksek afinite ile bağlamaktadır. RNaz A, anjiyojenin, RNaz 2 (eozinofil kaynaklı nörotoksin (EDN) ve RNaz 4 dahil çok sınırlı dizi benzerliklerine sahip (arasında sadece % 24 özdeşlik vardır) çeşitli RNazlar, 10^{-14} ve 10^{-16} M arasındaki K_i değerleriyle inhibe edilmektedir. Bu afiniteler, proteinlerin kovalent olmayan bağlanması için bildirilen en yüksek afiniteler arasındadır (Chen ve Shapiro, 1997).

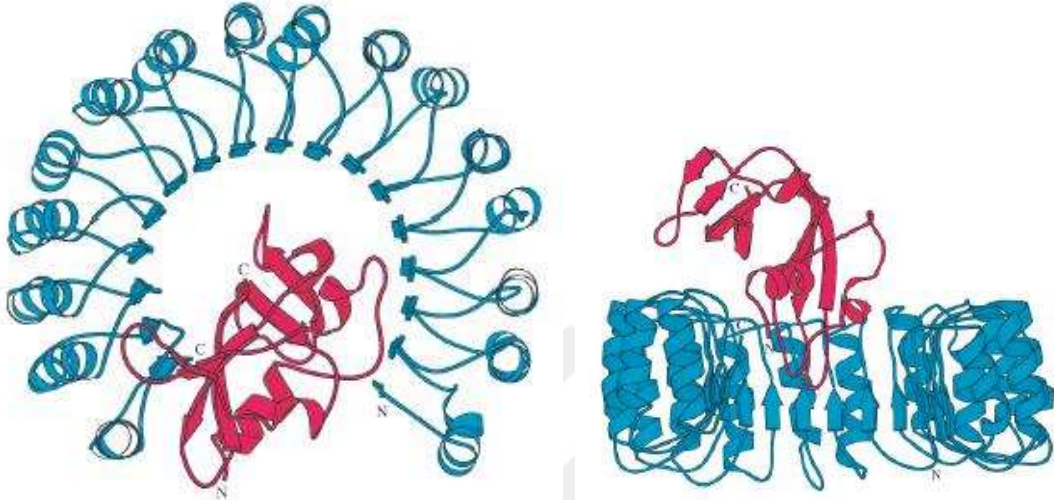
RI kalıntıları ile belirli bir ribonükleaz arasında yapılan spesifik temaslar çoğunlukla benzersizdir. RI' nın küresel olmayan at nalı şekli, kütlesi göz önüne alındığında, bu proteinin beklenenden % 10 daha fazla yüzey alanının maruz kalmasına izin vererek maksimum düzeyde bir bağlanma yüzeyi sağlamaktadır (Uebersohn, 2013). RI, RNaz A süper ailesine 1:1 oranında bağlanabilir ve 4×10^{-14} M' lık son derece düşük K_i değeri ile RNaz A aktivitesini inhibe edebilmektedir. RI' nın kan damarını indükleyen RNaz anjiyojenine (ANG) afinitesi daha da yüksektir ($K_i = 7 \times 10^{-16}$ M), ki bu, herhangi bir protein-protein etkileşimi için kayıtlarda en yüksek olanlardan biridir. (Guo ve ark., 2011). 0.7 fM ile afinitesi en sıkı olanlar arasındadır. Diğer ligandlar için K_i değerleri de femtomolar aralıkta yer almaktadır (Iyer ve ark., 2005). Oluşan komplekslerin ayrışma sabiti son derece düşüktür (Da-wei ve ark., 2019).

RI, aktif bölgeyi sterik olarak bloke ederek RNaz aktivitesini inhibe etmektedir Buna göre, RI birçok farklı RNazı engelleyebilmektedir. RI-RNaz A etkileşiminin iki özelliği, RI' nın birkaç farklı RNazı nasıl bağlayabileceğini açıklamaya yardımcı olmaktadır. İlk olarak, inhibitör, farklı ligandları barındırmak için küçük konformasyonel ayarlamalar yapabilmektedir. İkincisi, ara yüzeyde gömülü olan alışılmadık derecede geniş yüzey alanı, çok yüksek bir bağlanma afinitesi sağlamaktadır (Kobe ve Deisenhofer, 1996).

RI ile kompleks oluşturulduğunda, bu ribonükleazlar artık RNA' yı bağlayamamakta dolayısıyla parçalayamamaktadır. RI, RNaz A' nın bilinen memeli olmayan homologlarına karşı etkisizdir. Kurbağa karaciğeri ribonükleazı, sialik asit bağlayıcı lektin ve P-30 proteini gibi amfibi ribonükleazları da dahil olmak üzere pankreas ribonükleaz üst ailesinin bir alt kümesi, RI tarafından inhibe edilememektedir (Kobe ve Deisenhofer, 1996).

RI, iç çevresini kaplayan uzun paralel bir beta tabakası ve dış çevresini kaplayan alfa sarmalları olan at nalı şeklinde bir α/β proteinidir. RNaz A böbrek şeklindedir, ağırlıklı olarak antiparalel beta yapısından oluşur ve dört disülfür köprüsü ile stabilize edilir. RNaz aktif bölgesi, RNaz A' nın iki lobu arasındaki bir yarıktadır. Enzim, at nalının C-terminal köşesini kaplayan aktif bölge yarığı ile inhibitöre bağlanır; bir lob içbükey boşluğa girer ve diğer lob at nalı yüzünün üzerine yerleşmektedir (Kobe, 2001).

50 kDa ribonükleaz inhibitör proteini, RNaz A ($K_d \sim 10^{-14}$ M) ile tüm fosforil grubu bağlanma alt bölgelerini şelatlayan sıkı bir kompleks oluşturmaktadır (Smith ve ark., 2003) (Şekil 2.21).



Şekil 2. 21. RNaz A-RI kompleksinin yapısı (Kobe ve Deisenhofer, 1996)

İnhibitörün birincil hedefi muhtemelen enzimlerin fosfat bağlama bölgesidir. Diğer kısımlardaki veya enzimlerin aktif bölgesinin çevresindeki kalıntıları içeren ikincil temaslar, bağlanmanın sıklığı için daha az spesifik ve daha az önemlidir. Bu, esnek bağlanmaya izin verecek ve dolayısıyla RI'nın neden hem RNaz A hem de ANG için bu kadar iyi bir inhibitör olduğunu açıklamaktadır (Guillet ve ark., 1993).

RI, pankreas tipi RNazları ribonükleolitik aktivitelerini inhibe etmektedir. RI, memeli hücrelerinin sitozolünde bulunur ve pek çok türde farklı doku tiplerinden saflaştırılmıştır. Ribonükleolitik aktivitenin inhibisyonu ve sitozolik konumu, RI'nın pankreas tipi RNazları istila ederek hücrel RNA'yı bozulmadan koruduğu önerisine yol açmıştır. RNazlar, sitozole girerek ve hücrel RNA'yı parçalayarak sitotoksik olabilir. Ribonükleolitik aktivitesi, aşırı RI varlığı ile sınırlıdır. RI-RNaz A kompleksinin kovalent olmayan etkileşimleri son derece güçlüdür (Wang ve Li, 2006).

Stabilite

RI-RNaz etkileşimi tersine çevrilebilir olmasına rağmen, yarı ömür kompleksin ayrışması onlarca saat, hatta günlerle ölçülmektedir. Bununla birlikte, RI'nın inaktivasyonuna veya RI-RNaz kompleksinin ayrışmasına yol açan birtakım bileşikler bulunmuştur. Yapılan ilk çalışmalarda, asitlerin RI'yı kolayca etkisiz hale getirdiği

bilinmektedir. Ayrıca tiyol değiştirici reaktiflere karşı hassasiyet kapsamlı bir şekilde ortaya konmuştur. Oksitlenmiş glutatyon, muhtemelen karışık disülfidler oluşturarak RI' yı inaktive ederken, katepsinler RI' yı proteolitik olarak inaktive edebilmektedir (Hofsteenge, 1997).

Yukarıda da bahsedildiği gibi RI ve ligandları arasında oluşan kovalent olmayan kompleksler, biyolojide bilinen en sıkı komplekslerdir. RI' nın, omurgalıları özgü ribonükleaz ailesinin üyelerine bağlanma ve onların aktivitesini durdurmadaki etkinliği dikkat çekicidir, ancak RI' nın bir zayıflığı vardır: oksijen veya daha spesifik olarak, hidroksil radikalleri veya hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri (ROS). Bu zayıflık, yüksek sistein içeriğinden kaynaklanmaktadır. Bir oksidasyon reaksiyonu yoluyla, iki sisteinden gelen tiyol grupları, disülfür köprüsü olarak bilinen yeni bir kovalent baę oluşurmaktadır (Blázquez ve ark., 1996).

RI' nın tanımlayıcı özelliklerinden biri, alışılmadık derecede yüksek sistein içeriğinin bir sonucu olarak oksidasyon duyarlılığıdır. Bununla birlikte, RI' da, bu disülfid bağlarının oksidatif oluşumu, yapısal bir çöküşe ve engelleyici işlevin tamamen kaybolmasına yol açmaktadır. İnsan RI, tümü serbest ve doğal, aktif RI formunda indirgenmiş 32 serbest sistein içerir. Bir sitozolik protein için bu sistein sayısı alışılmadık derecede yüksektir. Ayrıca ilgi çekici olan, RI' nın 30-32 sistein kalıntısı olup, bunların hepsinin proteinin aktiviteyi koruması için indirgenmiş kalması gerekmektedir (Kim ve ark., 1999).

RNase A memeli dokularından yüksek ısı ve düşük pH koşullarında büyük miktarlarda saflaştırılabilir. Buna karşın RI dokularda hem daha az bulunur hem de daha kırılgandır. Ayrıca ısı, asit, proteazlar, pH değişiklikleri ve oksidasyon ile kolayca inaktive edilebilmektedir. Sülfhidril reaktifleri (örn, p-hidroksimerküribenzoat) ile işleme karşı oldukça hassastır, aktif RNazları RI ile sıkı komplekslerinden hızla serbest bırakabilmektedir (Blázquez ve ark., 1996).

Aslında, tek bir sisteinin bile oksidasyonu, işbirlikçi bir "ya hep ya hiç" dizisine yol açarak, RI' nın tamamen inaktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Açıkça, kültürlenmiş hücrelerin oksidanlarla işlenmesi, RI' nın hızla kaybolmasına neden olmak için yeterlidir (Lomax ve ark., 2014).

İnsan plasental RNaz inhibitörünün inhibisyon kapasitesi, pH 7 ile 8.37 arasında maksimumdur. Ayrıca, inhibitör 6.38' in altındaki bir pH' da RNaz bloke etme yeteneğini kaybetmeye başlamaktadır. Bu protein bazlı RNaz inhibitörünün pH'a bağlı etkinliği şaşırtıcı değildir çünkü elektrostatik etkileşimler RNaz inhibitörünün (fizyolojik pH' da negatif yüklü) RNazlar (fizyolojik pH' da pozitif yüklü) ile bağlanmasında rol oynamaktadır. pH 5' te RNaz inhibitörü neredeyse nötr olur ve dolayısıyla RNaz bağlama ve bloke etme kapasitelerini büyük ölçüde kaybetmektedir (Huysmans ve ark., 2019).

Moleküler Biyoloji' de RI

Nükleik asitlerin korunması, moleküler biyolojideki in vitro çalışmalarda merkezi bir öneme sahiptir. Ribonükleazlar, ortamda bol miktarda bulunmaları, olağanüstü konformasyonel stabiliteleri, proteolize dirençleri ve iki değerlikli katyonlar veya diğer kofaktörlere gereksinimleri olmaması nedeniyle genellikle en sorunlu nükleazlar olarak kabul edilmektedir. İnsan cildi, temas etmesi halinde yüzeylere ve solüsyonlara kolayca aktarılan çok sayıda nükleazın kaynağıdır. Ek olarak, RNA' nın degradasyonunu gerektiren birçok prosedürde ribonükleazlara gereksinim duyulur ancak ribonükleaz aktivitesi, aynı deneyin sonraki adımlarında sorun oluşturabilmektedir. Küçük moleküllü etkili ribonükleaz inhibitörleri, bu durumlarda önemli fayda sağlayabilmektedir (Smith, 2006).

RI, laboratuvar çalışmaları boyunca RNA' yı korumak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. RNA saflaştırma, cDNA sentezi, RT-PCR, RNA dizileme dahil olmak üzere çeşitli RNA' ya duyarlı uygulamalarda kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Bu tür çalışmalarda, küçük miktarlarda RNaz varlığı bile, RNA kalitesini ve deneysel sonucu oldukça etkilemektedir. RI için yeni bir uygulama alanı ise, SARS-CoV-2 varlığına yönelik tükürük bazlı testlerdedir. Bu, standart nazofaringeal sürüntü çubuğu ile örnek almaya kıyasla insanların basit bir şekilde kendi örneklerini almalarını sağlayacağından oldukça önemlidir. Numunenin elde edilmesi basit olsa da, tükürükte bulunan sindirim enzimleri RNA için tehdit oluşturmaktadır. Bir RNaz inhibitörünün kullanımı, RNA' nın korunması ve doğru test sonuçlarının elde edilmesi açısından elzemdir (Anonim, 2021b).

RI, laboratuvar deneyleri sırasında RNA' yı korumak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Kim ve ark., 1999).

RI' nın kaynağı

RI laboratuvar çalışmaları boyunca RNA' yı korumak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Geçmişte, RI homojenize plasentadan saflaştırılmıştır. Bu, insan RI varyantlarının tedarik edilmesi söz konusu olduğunda bir seçenek değildir. RI-RNaz A etkileşimleri üzerine devam eden çalışmalar için büyük miktarda RI proteinine ihtiyaç duyulmaktadır. Maalesef RI' nın doğal kaynaklardan izolasyonu yoğun çaba gerektirmekte ve zaman almaktadır. Bu yüzden RI' nın çeşitli ekspresyon sistemlerinde rekombinant olarak üretilmesi bazı araştırmacılar tarafından çalışılmıştır (Dickson ve ark., 2005).

Doğal kaynaklardan yeterli miktarda protein saflaştırmak nispeten pahalıdır. Bu nedenle, esasen safsızlıklardan arınmış, büyük, daha ucuz miktarlarda RI kaynağına ihtiyaç vardır. Bu safsızlıkların bazıları HIV ve hepatit virüsü gibi viral kaynaklardan olabilen memeli proteinleri, olası prionlar ve memeli DNA' sıdır. Rekombinant DNA teknolojisiyle, kirletici içermeyen insan RI' sının klonlanması ve aktif gen ürününün kullanılabilir miktarlarını elde etmek mümkündür (Lewis ve Shultz, 1998).

Şu anda, RI geninin yaygın bakteri ve maya türleri gibi kolayca büyütülen hücrelere dönüştürüldüğü bir rekombinant ekspresyon sistemi çok daha popüler bir seçimdir. RI için bazı ekspresyon protokolleri, bir miligram saflaştırılmış RI elde etmek için 4 litre rekombinant bakteri kültürü gerektirmektedir, Bu da bazı araştırmacıları ökaryotik böcek hücrelerinde RI ekspresyonunu denemeye yöneltmiştir (Guo ve ark., 2011).

RI üretimi için üçü *Escherichia coli'* den ve biri *Saccharomyces cerevisiae'* den olmak üzere birkaç rekombinant sistem rapor edilmiştir. Düşük verim ve çözünmezliğin rekombinant RI üretiminde tekrarlayan problemler olduğu kanıtlanmıştır. Yine de RI, bir prokaryotta doğrudan ekspresyon için ideal olan ve aktivitesi için translasyon sonrası modifikasyon gerektirmeyen bir sitoplazmik proteindir (Lee ve Vallee, 1989).

Bugüne kadar, RI' nın tüm ayrıntılı yapı-fonksiyon analizleri, *E. coli'* de heterolog ekspresyonla üretilen protein üzerinde gerçekleştirilmiştir (Hoang ve ark., 2018).

E. coli' de ifade edilen RI, genellikle zayıf bir çözünürlüğe sahiptir (litre kültür başına 0.5 mg' dan az). RI' nın inklüzyon cisimciklerinden denatürasyonu ve renatürasyonu, her litre kültürden sadece 0.25 mg aktif RI vermektedir. Domuz RI' sının, zayıf trp promotörü ve minimal ortam kullanılarak *E. coli*' de çözünür form olarak yüksek seviyede eksprese edildiği rapor edilmiştir. Maya ve böcek hücrelerinde RI üretimi gerçekleştirilebilmiştir, ancak düşük ekspresyon seviyesi ile sonuçlanmıştır (Guo ve ark., 2011).

RI' nın yüksek oksijene duyarlı yapısının kararsız doğası, saflaştırma sırasında her zaman indirgeme koşullarının ve düşük oksijen konsantrasyonlarının korunmasına özen gösterilmesi gerektiği anlamına gelmektedir (Uebersohn, 2013).

Rekombinant RI ekspresyonunun, *E. coli* sitoplazmasında çözünür formda yüksek seviyelere ulaşması son derece zordur. Guo ve ark. (2011), RI' nın çözünür ifadesini geliştirmek için beş N-terminal füzyon ortağı kullanmıştır. Bunlardan T7 promotörünün kontrolünde klonlanan maltoz bağlayıcı protein (MBP), N-kullanım maddesi A (NusA) ve translasyon başlatma faktörü 2 alan I (IF2), rekombinant murin RI' nın çözünür ekspresyon seviyesini büyük ölçüde geliştirmiştir. Glutasyon S-transferaz (GST) ve küçük ubikuitin değiştirici protein (SUMO) çok daha az verimli olmuştur. Tüm bu RI-füzyon proteinleri, RNaz A aktivitesini inhibe edebilmiştir.

Yine başka bir çalışmada füzyon proteini NusA-hRI çözünür ve aktif formda elde edilebilmiştir (Da-wei ve ark., 2019).

RI füzyon proteininin endojen RI' nın özelliklerini koruması, yani sitozolde yer alması ve RNaz A' nın ribonükleolitik aktivitesini bağlayabilmesi ve engelleyebilmesi gerekmektedir. Ayrıca, RI' nın overekspresyonunun saptanmasının kolay olmasına ihtiyaç vardır. Yapılan başka bir çalışmada ECFP-RI füzyon proteini bu gereksinimleri karşılayabilmiştir (Haigis ve ark., 2003).

Bilinen ribonükleazların çoğuna benzer şekilde, RNaz A, bir RNA substratı ile çoklu temaslar yapabilmektedir. Enzimatik aktif bölge ve bitişik alt bölgeler, elektrostatik etkileşimleri yoluyla RNA omurgasındaki sıralı fosforil gruplarını bağlamaktadır. En güçlü RNaz A inhibitörleri, bu genişletilmiş arayüzden yararlanmaktadır. Örneğin, üç

alt bölgeyi kaplayan pirofosfata bağlı bir oligonükleotit (pdUppA-3'-p), RNaz A' nın bilinen en sıkı küçük molekülü inhibitörüdür (Smith ve ark., 2003).

Bir dizi üretici bu alanı hedefleyen reaktifler sunmuştur ve her biri büyüyen bir pazar payı için rekabet etmektedir. RI' lar tükürük dahil olmak üzere birçok vücut sıvısında RNA' nın stabilizasyonuna geniş ölçüde uygulanabilir görünmektedir. Geçmişte plasentadan izole edilmiş, ancak şimdi rekombinant olarak ifade edilen RI, RNaz A, B ve C' yi spesifik olarak inhibe eden bir proteindir. Protein, $>10^{14}$ bir birleşme sabiti (K_a) ile RNazları inhibe edebilmektedir. RNaz I, RNaz T1, S1 nükleaz, RNaz H' ye karşı etkili değildir. RI, Taq DNA polimeraz, AMV veya M-MuLV ters transkriptazları veya faj RNA polimerazları ile birlikte kullanıldığında polimeraz aktivitesinin inhibisyonu gözlenmemektedir (Nichols ve Yue, 2008). Çeşitli RI rekombinant DNA teknolojilerinden faydalanılarak oluşturulabilmektedir.

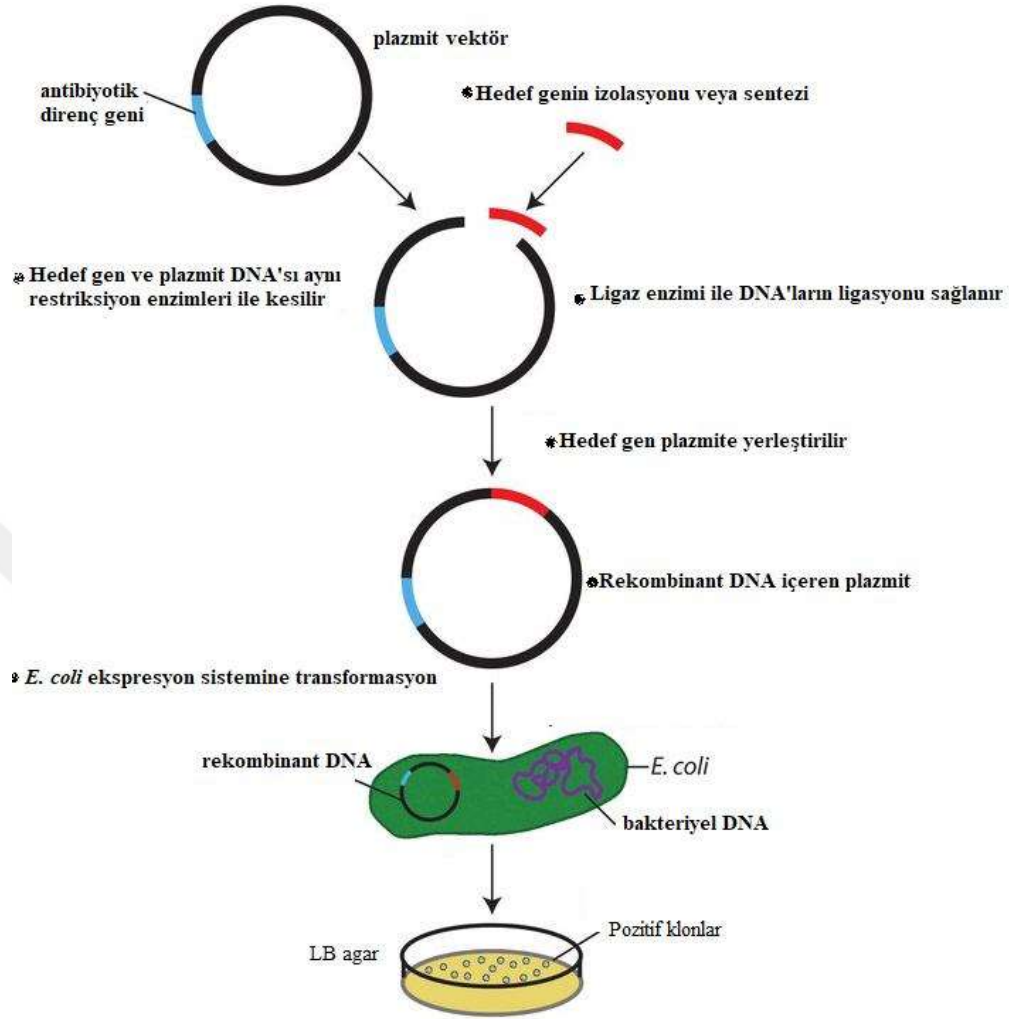
İnsan plasental RI' sını kodlayan doğal genin izole edilmesi ve protein üretimi için

- klonlanmış bir genin varlığı için bir DNA kütüphanesinin taranması,
- bir insan RI plazmit yapısının oluşturulması,
- plazmit yapısının bir konak hücreye sokulması,
- hücre lizisi ile RI proteininin izole edilmesi

gerekmektedir (Pasloske ve Wu, 2004).

2.5 Rekombinant DNA Teknolojisi

Genetik mühendisliği ve rekombinant nükleik asit (DNA veya RNA) teknolojilerinden, farklı organizmalardan yeni genetik materyal kombinasyonları elde etmek için yararlanılmaktadır. Hedef bir gen, konağından saflaştırılıp veya DNA dizisinin sentezi yoluyla alınıp bir klonlama vektörüne yerleştirilmektedir. Ardından bakteriye transfer edilmektedir. Gen, burada eksprese edilerek rekombinant proteinin üretimi sağlanmaktadır. Bu şekilde büyük miktarlarda protein elde etmek mümkün olabilmektedir (Brown, 2010) (Şekil 2. 22).



Şekil 2. 22. Rekombinant DNA teknolojisindeki genel işlemler (Deans, 2014)

Genetik mühendisliği ilk olarak 1973 yılında Herbert Boyer ve Stanley Cohen tarafından, farklı türlerden elde edilen genetik bilgiyi birleştiren ve onları kopyalayabilen fonksiyonel bir organizma oluşturmaya çalışılmasıyla başlamıştır. *Xenopus laevis* kurbağa türünün genlerini *E. coli* bakterisine aktararak bu genlerin nesilden nesile aktif olarak eksprese edildiğini göstermişlerdir. Genentech şirketi, 1978 yılında genetiği değiştirilmiş *E. coli* tarafından üretilen insan proteini somatostatini ve ardından insan insülinini ticari olarak üretmeyi başarmıştır. Protein veri bankasındaki (PDB) üç boyutlu proteinlerin çoğu da, *E. coli* ekspresyon sistemlerinde üretilmiştir (Kaur ve ark., 2018).

E.coli ekspresyon sistemlerinde rekombinant protein üretimi

Rekombinant protein üretimi için *E. coli* overekspresyon ve kolay saflaştırma avantajları sayesinde çokça tercih edilmektedir (Çizelge 2.5). Halihazırda, *E. coli*' de çok sayıda aşı, terapötik ilaç ve endüstriyel enzim üretilmektedir (Demain ve Vaishnav, 2009).

Çizelge 2. 5. *E. coli* ekspresyon sistemlerinin karakteristikleri (Demain ve Vaishnav, 2009)

Avantajları	Dezavantajları
Hızlı ekspresyon	Disülfid bağları içeren proteinlerin ekspresyon zorluğu
Yüksek verim	Proteinler endotoksinler ile birlikte üretilir
Kültüre etmenin ve genom modifikasyonlarının kolaylığı	İnklüzyon cisimcik olarak üretilen protein inaktiftir ve yeniden katlanma gerektirir
Ucuz	Glikozillenmemiş proteinler üretir

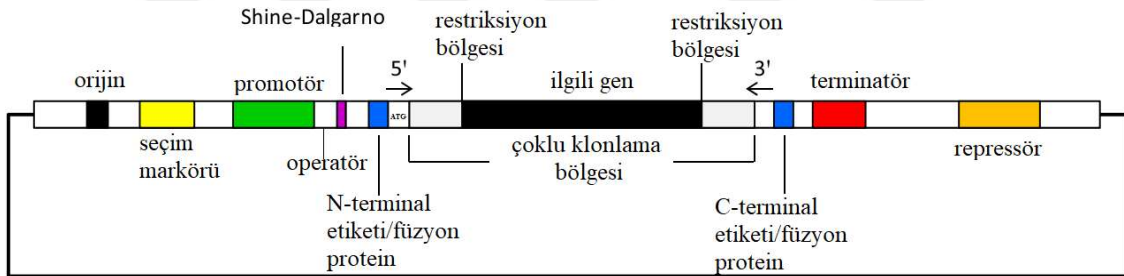
Öncelikle rekombinant protein üretiminde hedef proteini kodlayan gen gerekmektedir. Bu, direkt üretildiği organizmadan DNA izolasyonu veya cDNA eldesi ile olabileceği gibi, DNA sentezi kimyasal olarak oluşturulabilmektedir. Günümüzde en çok, bu kimyasal yöntem kullanılmaktadır. Mevcut yazılımlardan faydalanarak protein kodlayan gen dizisini çeşitli değişikliklerle tasarımı gerçekleştirilebilmektedir. Tasarladığımız ilgili geni doğrudan istediğimiz vektörün içine klonlanmış şekilde temin etmek mümkündür. Bunu yapan firmalar oldukça yaygındır. Önemli olan nokta, gen konstrüksiyonunu en az hata ile gerçekleştirmektir. Çalışılması hedeflenen proteinin bütün özelliklerinin çok iyi bilmesi gerekmektedir. Mesela proteinin, ökaryotik veya prokaryotik kökenli olup olmadığı önemlidir. Buna göre kullanılacak vektörün, konak hücre sistemi ile kodon uyumu olmalıdır. İlgili gen tasarlanırken bu hususa dikkat edilmelidir (Parret ve ark., 2016).

,

Çizelge 2. 6. Klonlamada kullanılan başlıca vektörler (Rapley, 2010)

Vektör	Konak	Vektör yapısı	Insert aralığı (kb)
M13	<i>E.coli</i>	Dairesel virüs	1-4
Plazmit	<i>E.coli</i>	Dairesel plazmit	1-5
Lambda faj	<i>E.coli</i>	Doğrusal virüs	2-25
Kozmid	<i>E.coli</i>	Dairesel plazmit	35-45
BAC (Bakteri yapay kromozomu)	<i>E.coli</i>	Dairesel plazmit	50-300
YAC (Maya yapay kromozomu)	<i>S. cerevisiae</i>	Doğrusal kromozom	100-2000

Yabancı DNA' yı başka bir hücreye sokmak için farklı vektörler kullanılabilir (Çizelge 2.6). En sık tercih edilen, laboratuvarlarda yapay olarak oluşturulan plazmitlerdir. Prokaryotik sistemde yabancı genin klonlanması ve ekspresyonu için sıklıkla tercih edilen plazmitlerin, kolayca modifiye edilmeleri ve bir hücre içinde kendi kendine çoğalabilme gibi yetenekleri vardır. Bir ekspresyon vektörü, klonlanan bir genin kopyalanacağı ve/veya transle edileceği şekilde tasarlanmaktadır. Bir replikasyon orijini, seçim markörü, klonlama alanı gibi çeşitli bileşenleri içermektedir (Nora ve ark., 2019). Şekil 2.23'de plazmitin temel bileşenleri şematize edilmiştir.



Şekil 2. 23. *E. coli*'de rekombinant protein ekspresyonu için kullanılan bir plazmit vektörünün genel özellikleri (Ahmad ve ark., 2018)

Kullanılacak plazmit vektörün öncelikle, konak hücre sistemi ile uyumlu olmalıdır. Ayrıca kullanılacak vektörün; güçlü promotorlar, ribozom bağlanma bölgesi, sonlanma sekansları, afinite etiketi, solubilizasyon sekansları ve çoklu klonlama bölgesi ile iyi bir kombinasyona ihtiyacı vardır. Bunlar plazmit vektöre göre değişiklik gösterebilmektedir (Singha ve ark., 2017) (Çizelge 2.7).

Çizelge 2. 7. Vektör dizaynındaki değişkenler (Singha ve ark., 2017)

Orijin	pMB1, pUC, ColE1, p15a, pBR322
Promotor	Lac, trp, tac, T7, araBAD
Seçim markörü	Ampisilin, Tetrasiklin, Kanamisin, Kloramfenikol
Afinite etiketi	Peptit etiketleri: poly-His-, poly-Arg-, FLAG-, S-) Füzyon partnerleri: MBP, SUMO, GST, NusA, GFP
Etiket ayırma bölgesi	Enterokinaz, trombin, TEV, Faktör Xa

pET' ler ekspresyon vektörü olarak sıkça kullanılmaktadır. pBR322' den replikasyon orjinini ve lac operon üzerinde rekombinant protein ekspresyonu için T7 faj RNA polimeraz promotorunun temelini kullanan tasarlanmış bir plazmittir. Vektör kolay indüklenebilir T7 promotor bölgesi içermektedir. İlgili gen bu promotör bölgesinin aşağı kısmına klonlanmaktadır. Vektör, protein ekspresyonunun indüklenebileceği konakçı organizmaya aktarılmaktadır. Lac operonu, laktoz analogu olana IPTG ile düzenlenerek T7 promotor kontrolünde ilgili dizinin transkripsiyonunu başlatmaktadır. Ortamda bulunan IPTG, T7 RNA polimerazın üretimini baskılayan lac repressörüne bağlanır ve lac operatöründen tetramerik repressörü çıkarmaktadır. Böylece miktarı artan T7 RNA polimeraz T7 promotoruna bağlanır ve heterolog olarak üretilecek proteinin gen dizisinin transkripsiyonunu sağlamaktadır. Normalde lacI geninin ürünü lac repressör molekülü T7 RNA polimeraz üretimini baskımlarken IPTG bu baskıyı ortadan kaldırarak hücrede T7 RNA polimeraz miktarını arttırmaktadır. T7 RNA polimeraz da ilgili proteinin üretimini başlatmak üzere kendi promotörüne bağlanmaktadır (Mierendorf ve ark., 1998).

Bakteriler ve Ökarya üyelerinde protein üretimi için çok sayıda vektör ve destekleyici sistem kombinasyonu kullanılarak çok çeşitli sistemler geliştirilmiştir. Bunun aksine, yaşamın üçüncü alanı olan Archaea üyeleri (arkeler) için sadece birkaç transformasyon sistemi geliştirilmiştir. Arkeler genetik manipülasyona çok daha az yatkındır. Rekombinant proteinlerin üretimi için dönüşüm araçları sadece birkaç tür için mevcuttur (Albers ve ark., 2006).

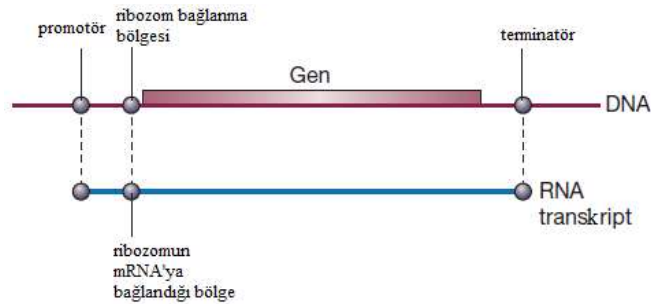
Bu ekspresyon sistemlerin seçimi hedef proteinin karakteri ve büyüklüğüne göre değişmektedir. Büyük proteinlerin (100 kDa' dan büyük) üretimi için daha çok ökaryotik sistemler, daha küçük proteinler için prokaryotik sistemler kullanılabilir. Post-tranlasyonel modifikasyonların gerekip gerekmediği,

maliyeti, verimliliği ekspresyon sistemi seçimi için göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Bakteri, maya, böcek, bitki ve hayvanlar gibi rekombinant protein üretimi için kullanılan birçok konak vardır. En çok bakteriyel sistemler kullanılmaktadır. *E. coli* iyi tanımlanmış, laboratuvar koşulları altında pahalı olmayan ortamlarda büyüebildiği ve 20 dakika gibi çok kısa sürede iki katına çıkabildiği için, yalnızca prokaryotik değil aynı zamanda ökaryotik kökenlerden yirmi yılı aşkın bir süredir rekombinant protein üretmenin en popüler yolu olmuştur. Hızlı büyümesi nedeniyle mutantların seçimi kolay ve rahattır. Ayrıca, *E. coli* hücreleri, yabancı DNA'yı almak (dahil etmek) ve rekombinant proteinleri çok yüksek oranda eksprese etmek için oldukça verimlidir (Ahmad ve ark., 2018; Rosano ve ark., 2019).

Vektörün, bakteriyel sisteme aktarılması hususunda ısı şoku, elektroporasyon, cam boncuk, PEG yöntemi, CaCl_2 ile muamele gibi hem fiziksel hem de kimyasal yöntemler kullanılabilmektedir. Bunlar arasında uygulanabilirliğinin basit ve maliyetsiz oluşu nedeniyle ısı şoku yöntemi ile transformasyon sıklıkla kullanılmaktadır (Ren ve ark., 2019).

Yabancı (Ekzojen) genlerin *E. coli*' de ekspresyonu

Yabancı genlerin *E. coli*' de başarılı bir şekilde eksprese edilebilmesi için ifade vektörünün uygun bölgesine yerleştirilmesi gerekmektedir (Şekil 2.24).

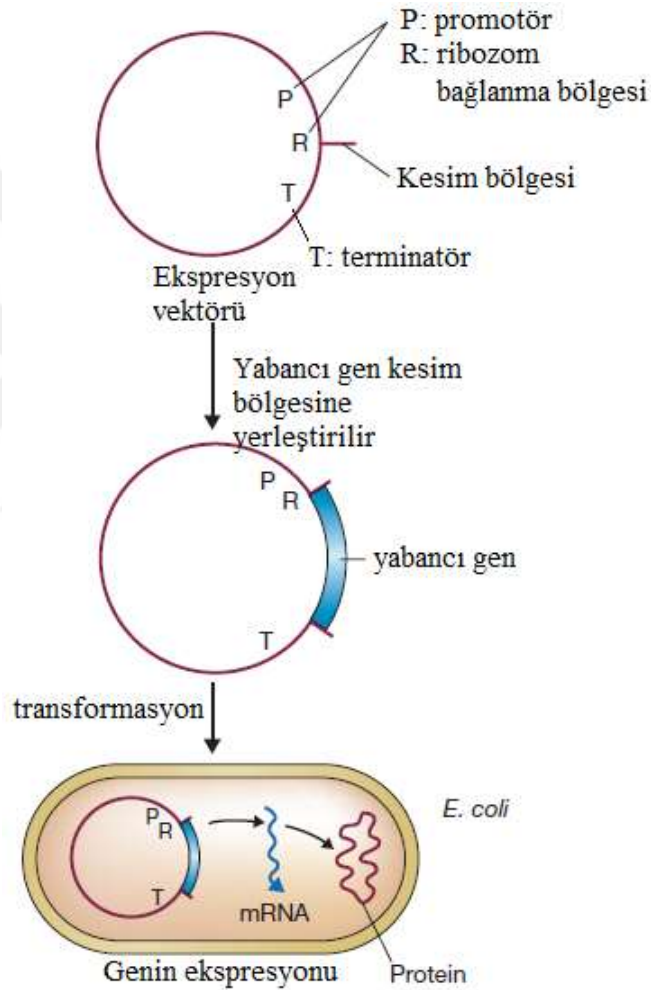


Şekil 2. 24. *E. coli*'de gen ekspresyonu için en önemli üç bileşen (Brown, 2010)

Vektörde promotör, terminatör ve ribozom bağlanma bölgesi bu yüzden önem arz etmektedir (Brown, 2010) (Şekil 2.25).

1. Promotör, genin transkripsiyonunun başlaması gereken noktayı göstermektedir. *E. coli*' de promotör, transkripsiyon enzimi RNA polimerazının σ alt birimi tarafından tanınmaktadır.

2. Ribozom bağlanma bölgesi, ribozom tarafından mRNA molekülüne bağlanması gereken nokta olarak tanınan kısa bir nükleotit dizisidir. Genin başlangıç kodonu, her zaman bu bölgenin aşağı akış yönünde birkaç nükleotittir.
3. Transkripsiyonun durması gereken genin sonunda noktayı işaretleyen terminatör (sonlandırıcı) bölge vardır. Terminatör, genellikle bir ilmek yapısı oluşturmak için kendisiyle baz çifti oluşturabilen bir nükleotit dizisidir.



Şekil 2. 25. Yabancı genin ekspresyonu (Brown, 2010)

Transforme edilen hücreler, antibiyotikli besiyeri içeren petrilere yayma ekim yapılmaktadır. Petrilere beliren pozitif kolonilerden tek düşen bir tanesi seçilip sıvı besiyerine inoküle edilmektedir. Başlangıçta küçük ölçekte optimum koşullarda uygun indükleyici ile kültüre edilerek ardından hedef proteinin üretilip üretilmediği belirlenmektedir. Eğer hedef protein SDS-PAGE ile analiz edilirse büyük ölçekte üretime aynı hücreler ile devam edilmektedir. Besiyeri, karbon kaynağı, sıcaklık,

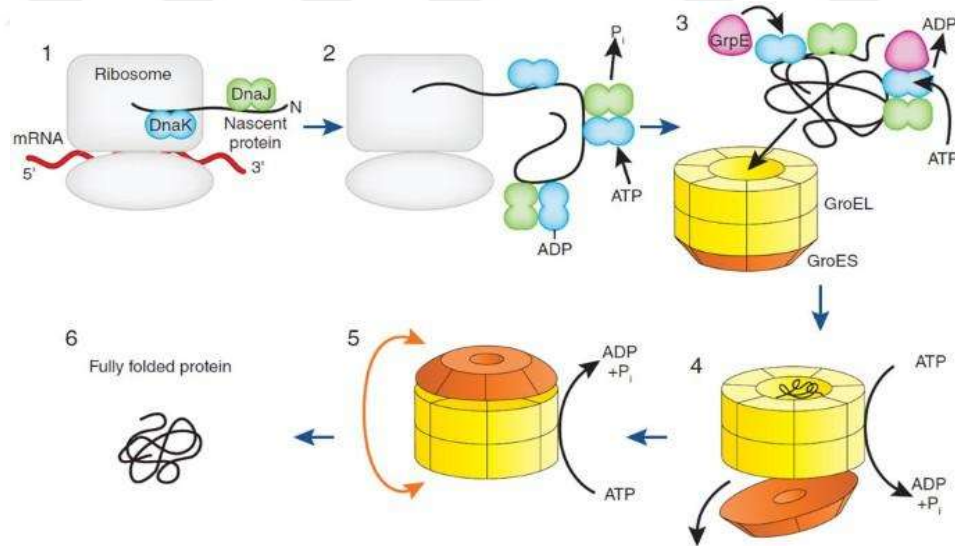
indükleyicinin konsantrasyonu, indükleme noktası ekspresyon seviyesini arttırmak için optimize edilebilmektedir. Ekspresyonu tamamlanan hücreler santrifüj ile toplanmaktadır. Hedef proteininin konakçı hücreden izolasyonu için ilk olarak uygun tampon ile hücre bütünlüğünün bozulması ve hücre içeriğinin açığa çıkarılması sağlanmaktadır. Proteaz inhibitörleri kullanılarak saflaştırılacak proteinlerin parçalanmasının önüne geçilebilmektedir. Lizozim ile enzimatik olarak veya sonikatör gibi donanımlarla mekanik olarak parçalama işlemi gerçekleştirilebilmektedir. Ardından çözünen ve çözünmeyen kısımları ayırmak için santrifüj yapmak gerekmektedir. Yüksek hızlı santrifüj ile de protein haricindeki hücre komponentlerinin uzaklaştırılması sağlanmaktadır. Elde edilen süpernatant, saflaştırma protokolü için başlangıç materyali (lizat) olmaktadır. Metal afinite kromatografisi, Ni-NTA rezin içeren kolonlar kullanılarak saflaştırma için sıklıkla tercih edilmektedir. Proteinin terminallerinden birine metal iyon rezinlerine afinitesi olan histidin kuyukları takılarak koenzim bağlı agaroz taneciklerine spesifik olarak bağlanması sağlanmaktadır. Lizatta bulunan diğer proteinler bu koenzime bağlanma özelliğine sahip olmadığı için yıkanıp kolondan uzaklaştırılmaktadır. Kolona bağlı proteinin kolondan ayrılması için histidin ile yarışacak yüksek konsantrasyonlarda imidazol kullanılmaktadır. Saflaştırılan kısımdan tuz, imidazol gibi maddelerin uzaklaştırılması için diyaliz yapılmaktadır (Bornhorst ve Falke, 2000; Structural Genomics Consortium, 2008) .

Füzyon etiketinin mevcudiyeti ilgili proteinin yapısını veya biyolojik fonksiyonunu etkilediğinde, taşıyıcı proteinlerin ve afinite etiketlerinin çıkarılması genellikle gereklidir. Bu genellikle, bölgeye özgü proteolizi kolaylaştıran füzyon ortağı ve hedef rekombinant protein arasına bölünme bölgelerinin sokulmasıyla elde edilmektedir. Yaygın proteazlar arasında enterokinaz, faktör Xa, TEV proteazı ve trombin bulunmaktadır (Waugh, 2011).

E. coli, ürettiği rekombinant proteindeki disülfid bağlarını sentezleyemez ve protein her zaman doğru olarak katlanamaz. Eğer protein tersiyer yapısını doğru olarak almazsa genellikle çözünmez ve bakteri içinde “inklüzyon cisimcikleri” oluşturmaktadır. Bu yüzden proteinin doğru katlanmasına yardımcı olan şaperonlar kullanılabilenkte veya inklüzyon cisimciklerinden geri kazanım yoluna gidilebilmektedir (Singhvi ve ark., 2020).

Rekombinant proteinlerin çözünürlüğünü artıran moleküler şaperonlar ile ko-ekspresyon

Çoğu protein sentezlenirken aktif şeklini oluşturmak için katlanmaktadır. Doğru katlanma ve büyük kompleksler oluşturma “moleküler şaperonlar” olarak adlandırılan proteinler sayesinde kolaylaşabilmektedir. Bununla birlikte proteinlerin uygun olmayan kümelenmelerinin engellemektedirler. Moleküler şaperonların çeşitli türleri mevcuttur ve dizileri yüksek derecede korunmuştur. Bir kısmı, özellikle protein kararlılığının risk altında olduğu örneğin yüksek sıcaklıklarda hücrede aşırı derecede bulunmaktadır. *E. coli*’de DnaK ve DnaJ, ATP bağımlı enzimler olup yeni oluşan polipeptitlere bağlanarak onları yanlış katlanmalarına yol açan hızlı katlanmalardan korumaktadırlar. Böylece yavaş katlanma doğru katlanma şansını artırmaktadır. Eğer DnaK-J kompleksi proteini uygun şekilde katlayamazsa kısmi katlanmış proteinleri, GroEL ve GroES diye adlandırılan proteinlere transfer etmektedirler. Yeni sentezlenen proteinlerin katlanmaları, bu çok üniteli şaperonlar aracılığı ile sağlanmış olmaktadır (Madigan ve Martinko, 2012) (Şekil 2.26).

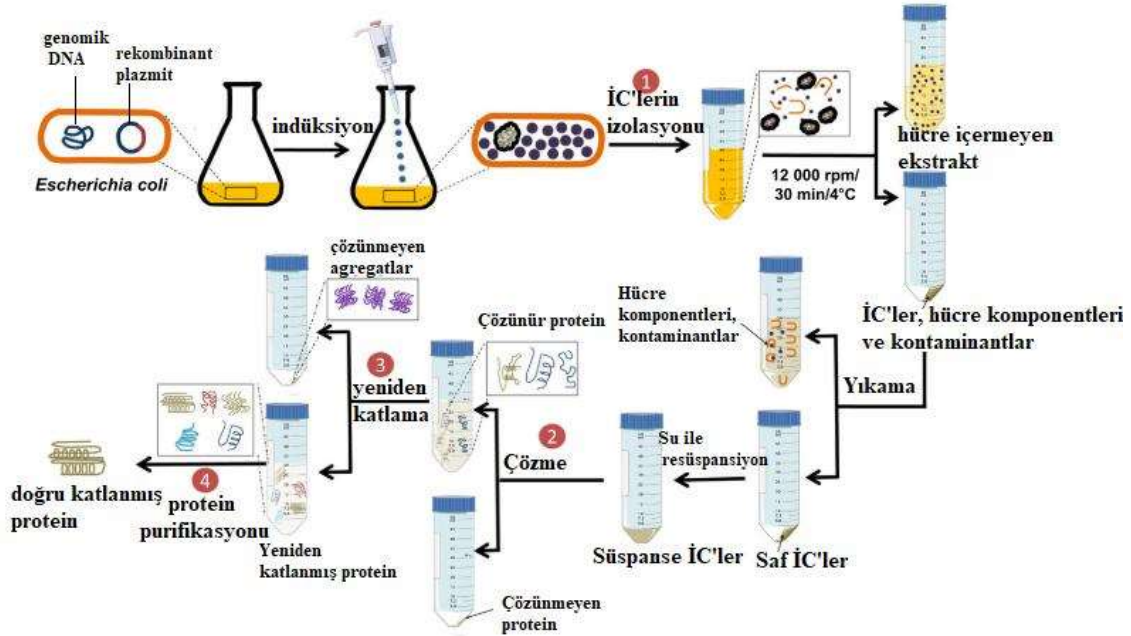


Şekil 2. 26. *E. coli* sitozolünde şaperon aracılı protein katlanması (Martin ve Hartl, 1993)

Biyoaktif proteinlerin inklüzyon cisimciklerinden geri kazanılması

Tipik olarak, inklüzyon cisimciği yoğun şekilde paketlenmiş, granüler bir protein kütesidir. Biyoaktif proteinin inklüzyon cisimciklerinden geri kazanılmasındaki en kritik iki adım, rekombinant protein agregatlarının çözünmesi ve biyoaktif bir forma yeniden katlanmasıdır. Biyoaktif rekombinant proteinin inklüzyon cisimciklerinden geri

kazanılması dört adımı içermektedir; i) inklüzyon cisimcikleri hücresel bileşenlerin çoğundan daha yoğun olduğundan yüksek hızlı santrifüj kullanılarak *E. coli* hücrelerinden izolasyonu, ii) yarı saf protein agregatlarının çözünmesi, iii) denatüre proteinin yeniden katlanması ve iv) biyoaktif proteinin saflaştırılması (Kaur ve ark., 2018) (Şekil 2.27).



Şekil 2. 27. Bakteriye inklüzyon cisimciklerinden (İC'ler) biyoaktif protein izolasyonu (Singhvi ve ark., 2020)

Bu amaçla laboratuvarlarda kullanılan metot geleneksel olarak dört ana adımı (izolasyon, çözme, yeniden katlama ve saflaştırma) içermektedir. Buna karşılık işlem basamaklarının sayısının azlığı, geri kazanımdan edilen proteinin yüksek verimliliği, zaman ve maliyet tasarrufu açısından kromatografi yöntemi daha caziptir. Kolona aktarılan inklüzyon cisimcikleri lizatından direkt olarak kolona gerekli çözeltiler eklenerek aktif protein elde edilebilmektedir. Hedef protein istenen saflıkta ve yeterli seviyede üretildikten sonra aktivite çalışmaları gelmektedir. Proteinin özelliklerine göre aktifliği test edilmektedir. Her protein farklıdır, bu nedenle bir protein ifadesi için optimize edilmiş koşullar asla diğer protein için benzer şekilde işlememektedir. Dolayısıyla çeşitli alanlara fayda sağlayan proteinlerin üretimi sağlansa da *E. coli*'de heterolog gen ekspresyonu görüldüğü kadar kolay bir iş değildir (Singhvi ve ark., 2020).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Laboratuvar ekipmanları

Bu çalışmada kullanılan laboratuvar ekipmanları Çizelge 3.1’ de listelenmiştir.

Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılan ekipmanlar

Ekipmanların listesi

Buz makinesi (Vision)

Buzdolabı (Vestel- GTP 455A)

Dikey Soğutucu (+4 °C) (Uğur)

Dondurucu (-80 °C) (Hettich)

Etüv (Memmert)

Güç kaynağı (elektroforez için) (Bio-Rad)

Hassas terazi (Kern)

Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı (Velp Scientifica)

İnkübatör (Biosan ES-20, Zhicheng- ZHWY/111C, Zhicheng- ZHWY/211C, Velp Scientifica)

Konsantrator (Milipore)

Jel görüntüleme cihazı (Bio- Rad)

Mikrodalga fırın (Arçelik-MD500)

Mini-santrifüj/vorteks (Biosan-Combi Spin)

Otoklav (HMC-Hirayama, Biobase)

PCR cihazı (Bio-Rad T100)

pH metre (WTW)

Peristaltik pompa (Longer Pump)

Santrifüj (Hitachi -Himac CT 15E, Hermle- Z 326K)

Sonikatör (Bandelin Sonopuls)

Termostatlı Blok Isıtıcı (Biosan-Bio TDB100, VWR)

UV transillüminatör (Syngene)

UV-Vis Spektrofotometre (DeNovix, Jenway)

Yüksek Hızlı Santrifüj (Vision-VS 30 000i)

3.1.2 Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar Çizelge 3.2’ de listelenmiştir.

Çizelge 3. 2. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Kimyasalların listesi	
Agaroz (Nyztech)	Lizozim (CDH)
Akrilamid (Merck)	Maya ekstraktı (Biolife)
Amonyum sülfat (Merck)	Metanol (Merck)
APS (Biorad)	NaCl (Tekkim)
Benzamidin (Merck)	Ni-NTA Rezin (Qiagen, Serva)
Coomassie Brilliant Blue (Amresco)	Orange G (Alfa Aesar)
Diyaliz Membranı (Spectro/Por)	Pepton (Merck)
DMSO (Merck)	PMSF (Serva)
DTT (Fluorochem)	Protein Marker (Bio Basic, Thermo)
EDTA (Amresco)	SDS (Serva)
Etanol (Merck)	Sukroz (Amresco)
Etidyum bromür (ICN)	TEMED (Biorad)
Glasiyel Asetik Asit (Merck)	Tripton (CDH)
Gliserol (VWR, Amresco)	Tris (Pancreac Applichem)
Glisin (Merck)	Tris/HCl (Bio Basic)
HCl (Merck)	Triton X-100 (Amresco)
Imidazol (Merck)	Üre (Bio Basic)
KOH (Sigma)	β -ME (Merck)
LB Agar (Lab M)	Ribonükleaz İnhibitörü (Thermo)
LB Broth Base (Neogen)	

3.1.3 Suşlar ve vektörler

Başlık 3.2.1’ deki tasarlanan dizinin yapay sentezi Biomatik firması tarafından gerçekleştirilmiştir. Dizi, *E. coli* pET30a(+) vektörüne klonlanmış halde temin edilmiştir. Vektör, daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere amplifikasyon amacıyla *E. coli* DH5 α konak hücrelerine transforme edilmiştir. Ekspresyon için *E. coli* BL21 (DE3) pLysE hücrelerine aktarılmıştır. İlgili proteinini daha çözünür elde etmek için

Takara firmasına ait Şaperon plazmitleri (1-5) ile ko-ekpresyon gerçekleştirilmiştir. *E. coli* BL21 (DE3) RIL hücrelerinden TEV proteazın üretimi sağlanmıştır.

3.1.4 Antibiyotikler ve indükleyiciler

Bu çalışmada kullanılan antibiyotikler ve indükleyiciler Çizelge 3.3' te listelenmiştir. İstenilen konsantrasyonlarda hazırlandıktan sonra 0,22 µm' lik enjektör filtresinden geçirilmiştir. Kloramfenikol alkolle, diğerleri su ile hazırlanmıştır.

Çizelge 3. 3. Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve indükleyiciler

Reaktifler	Stok Çözelti konsantrasyon	Temin edildiği firma
Ampisilin	100 mg/mL	Fisher
Kanamisin	50 mg/mL	Serva
L-Arabinoz	0.5 mg/mL	Goldbio
Kloramfenikol	34 mg/mL	Alfa Aesar
Tetrasiklin	5 ng/mL	Sigma
IPTG	1 M	Goldbio

3.1.5 Besiyeri İçerikleri

Luria bertani (LB) broth (1 L için)

Tripton veya pepton 10 g

Maya ekstraktı 5 g

Sodyum klorür 5 g

Luria bertani (LB) agar (1L için)

1 L'lik LB Broth çözeltisine 15 g agar eklenmiştir. Besiyerleri hazırlandıktan sonra otoklavlanmıştır.

3.1.6 Elektroforezde kullanılan reaktifler

Agaroz Jel Elektroforezi için;

Agaroz jeli: 1.2 g agaroz, 100 mL 1x TAE tamponu ile hazırlanan karışım mikrodalga fırında agaroz çözünene kadar kaynatılmıştır. Biraz soğuduktan sonra üzerine 3 µL EtBr (10 mg/mL) ilave edilmiştir. Ardından jel, elektroforez tankına dökülmüştür.

50x TAE: 2 M Tris-Acetate, 50 mM EDTA, 1M asetik asit saf suda çözölmüştür. pH:8 olacak şekilde son hacim saf su ile 1 L' ye tamamlanmıştır.

1x TAE: 20 mL 50x TAE stok çözeltisinden alınmıştır son hacim saf su ile 1 L' ye tamamlanmıştır. Jelde yürütme tamponu olarak kullanılmak üzere son konsantrasyonu 40 mM Tris, 20 mM asetik asit, 1 mM EDTA olmuştur.

Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroföze (SDS PAGE) için;

Ayırma jeli tamponu: 1.5 M Tris, % 0.4 SDS yaklaşık 90 mL saf suda çözölmüştür. pH' sı 8.8'e ayarlanarak son hacim saf su ile 100 mL' ye tamamlanmıştır.

Yükleme jeli tamponu: 0.5 M Tris, % 0.4 SDS yaklaşık 90 mL saf suda çözölmüştür. pH' sı 8.8'e ayarlanarak son hacim saf su ile 100 mL' ye tamamlanmıştır

% 10 Amonyum Persülfat (APS): 0.1 g APS 1 mL saf su içerisinde çözölmüştür. Kullanmadan hemen önce taze olarak hazırlanmıştır.

SDS-PAGE için % 12' lik yürütme jeli tamponu ve % 4' lük yükleme jeli tamponu içerikleri Çizelge 3.4' te listelenmiştir.

Çizelge 3. 4. % 12' lik yürütme jeli tamponu ve % 4' lük yükleme jeli tamponunun içerikleri

% 12' lik Yürütme Jeli	
Distile H ₂ O	4 mL
Ayırma jeli tamponu	2.25 mL
% 40 akrilamid	2.7 mL
% 10 APS	50 µL
TEMED	20 µL
% 4'lük Yüklem Jeli	
Distile H ₂ O	2.55 mL
Yüklem jeli tamponu	1 mL
% 40 akrilamid	0.35 mL
% 10 APS	50 µL
TEMED	10 µL

5x Tris-Glisin Tamponu: 15 g Tris, 72 g Glisin ve 5 g SDS yaklaşık 900 mL suda çözölmüştür. Son hacim saf suyla 1 L' ye tamamlanmıştır.

1x Tris-Glisin Tamponu: Elektroföze tankına, 5x stok çözeltisinden hazırlanan 1x tampon konulmuştur.

Örnek Yükleme tamponu (2x): % 2 SDS, % 10 Gliserol, % 5 β -ME, % 0.01 Bromfenol mavisi, 1.25 M Tris/HCl, pH 6.8 olarak hazırlanmıştır. Aynı tampon, içinde β -ME ve SDS eklenmeden de hazırlanmıştır.

Jel boyama (Staining) çözeltisi: 1 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 500 mL metanol içerisinde çözülüp filtre kâğıdından süzildükten sonra karışımın üzerine 100 mL glasiyel asetik asit eklenmiştir. Son hacim saf su ile 1 L' ye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Boya uzaklaştırma (destaining) çözeltisi: 500 mL metanol ve 100 mL glasiyel asetik asit karıştırılmıştır. Son hacim saf su ile 1 L' ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.1.7 Hücre parçalanması ve protein saflaştırmasında kullanılan reaktifler

Parçalama (Lizis) solusyonu: 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl olacak şekilde saf suda çözülerek hazırlanmıştır. pH: 8 olarak ayarlanmıştır

PMSF: Konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde hazırlanmıştır.

Benzamidine: Konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde hazırlanmıştır.

1x TEV proteaz tamponu: 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl ve 14 mM β -ME olacak şekilde kimyasallar tartılarak saf suda çözülmüştür ve pH:8 olarak ayarlanmıştır.

Bu çalışmada kolondan saflaştırma işleminde kullanılan tamponlar Çizelge 3.5' te listelenmiştir.

Çizelge 3. 5. Kolondan saflaştırma işleminde kullanılan tamponlar (pH:8)

Tamponlar	Bileşenleri
Yükleme (Loading)	20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl
Yıkama (Wash)	10 mM imidazol, 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl 20 mM imidazol, 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl 25 mM imidazol, 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl
Elüsyon	300 mM imidazol, 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl

3.1.8 Refolding işleminde kullanılan reaktifler

Melissis ve ark. (2010) tarafından önerilen prosedür için tamponlar pH: 8 olacak şekilde hazırlanmıştır (Çizelge 3.6).

Çizelge 3. 6. Refolding işleminde kullanılan reaktifler (1)

Tamponlar	Bileşenleri
Süspansiyon	50 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 2 mM PMSF
Resüspansiyon	50 mM Tris-HCl, % 2.5 triton X-100, % 20 sükröz
Çözme	50 mM Tris-HCl, 8 M Üre
Refolding	100 mM Tris-HCl, 10 mM DTT, % 20 gliserol
Diyaliz	20 mM Tris HCl, 100 mM NaCl

GE Healthcare (2007) tarafından önerilen prosedür için tamponlar pH: 8 olacak şekilde hazırlanmıştır (Çizelge 3.7).

Çizelge 3. 7. Refolding işleminde kullanılan reaktifler (2)

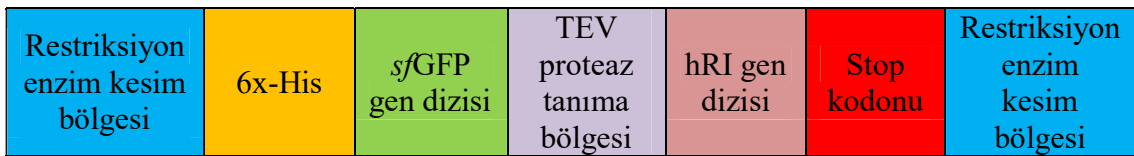
Tamponlar	Bileşenleri
Süspansiyon	2 M üre, 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, % 2 Triton X-100
Resüspansiyon	20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazol, 6 M guanidine-HCl, 1 mM β -ME
Bağlama	20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazol, 6 M guanidine-HCl, 1 mM β -ME
Refolding	20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazol, 0 M üre, 1 mM β -ME 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazol, 1 M üre, 1 mM β -ME 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazol, 2 M üre, 1 mM β -ME 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazol, 3 M üre, 1 mM β -ME 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazol, 4 M üre, 1 mM β -ME 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazol, 5 M üre, 1 mM β -ME 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazol, 6 M üre, 1 mM β -ME
Yıkama	20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazol, 1 mM β -ME 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 10 mM imidazol, 1 mM β -ME
Elüsyon	20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 500 mM imidazol, 1 mM β -ME

3.2 Yöntem

Sambrook ve Russell (2001) ve Ausubel ve ark. (2003)' e göre standart moleküler biyoloji yöntemleri kullanılmıştır. Aksi belirtilmediği sürece tüm santrifüjler 4 °C' de gerçekleştirilmiştir.

3.2.1 *sfGFP*-RI kimerik füzyon proteinini kodlayan geni içeren ekspresyon vektörünün oluşturulması

sfGFP ve insan plasental ribonükleaz inhibitor proteinine ait gen dizisi NCBI (The National Center for Biotechnology Information) gen bankasında taranmıştır. Bu DNA dizileri *E. coli* bakterisine transforme edilip üretileceğinden *E. coli* kodon profiline en uygun şekilde proteini sentezleyebilecek nitelikteki genin tasarlanmasına çalışılmıştır. Bu amaçla füzyon proteinini kodlayan bu genin kodon optimizasyonu çevrimiçi yazılım olan JCat (Java Codon Adaptation Tool) ile yapılmıştır (Grote ve ark., 2005). Böylelikle *E. coli*' de eksprese edilecek şekilde nadir kodonlarından arındırılmıştır. Kodon optimizasyonu yapılan genin gerektiğinde çeşitli ekspresyon vektörlerine klonlanabilmesi için ilgili restriksiyon enzimleri NEBCutter V2.0 (New England Biolabs Inc.) programı kullanılarak belirlenmiştir. N terminale, altı tane histidin kodlayan nükleotit eklenmiştir. *sfGFP* ve RI arasına TEV proteaz kesim bölgesi yerleştirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1. *sfGFP*-RI füzyon proteinini kodlayan geni içeren plazmit vektörün tasarlanması

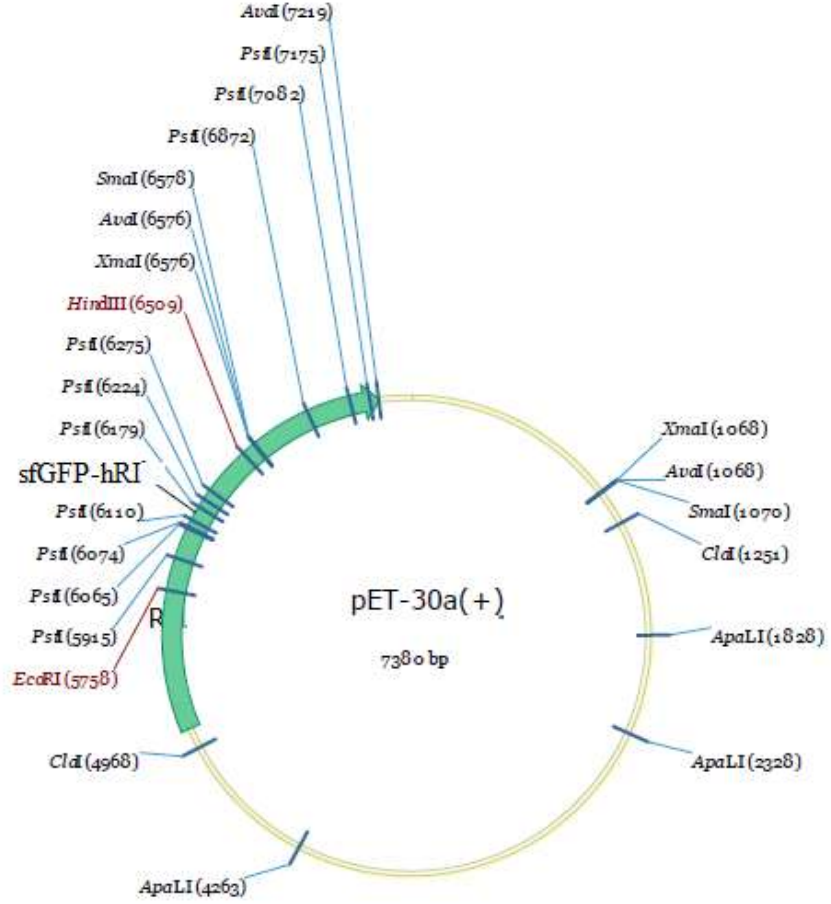
Gerekli düzenlemeler yapıldıktan sonra ORF'nin hatasız bir şekilde okunabildiğinin belirlenmesi için Expasy Translate Tool yazılımından faydalanılmıştır. Doğru bir şekilde transle edildiği anlaşılmıştır (Şekil 3.2).

HMHHHHHHSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLTCLKFICTTGKLPV
PWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGTYKTRAEVKFEGD
TLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNFSHNVIYITADKQKNGIKANFKIRHNVEDGQSVQLA
DHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSVLSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMDELYKGGG
ENLYFQSLDIQSLDIQCEELSDARWAEELLPLQCCQVRLDDCGLTEARCKDISSALRVNPA
LAELNLRNELGDVGVCVQLQGLQTPSCKIQKLSLQNCCLTGAGCGVLSSTLRTLPTLQELH
LSDNLLGDAGLQLLCEGLLDPPCRLEKLQLEYCSLSAASCEPLASVLRAPDFKELTVSNND
INEAGVRVLCQGLKDSPCQLEALKLESCGVTSDNCRDLGIVASKASLRELALGSNKLGDVG
MAELCPGLLHPSSRLRTLWIWECGITAKGCGDLCRVLRAKESLKELSLAGNELGDEGARLLC
ETLLEPGCQLESWLKSCSFTAACCSHFSSVLAQNRFLLELQISNNRLEDAGVRELCCQGLGQ
PGSVLRVWLADCDVSDSSCSLAATLLANHSLRELDLSNNCLGDAGILQLVESVRQPGCLL
EQLVLYDIYWSEEMEDRLQALEKDKPSLRVIS-LE

Şekil 3. 2. *s/GFP-RI'* nin amino asit sekansı

Daha sonra Blast P (Basic Local Alignment Search Tool) veri tabanında orjin dizinin ve tasarlanan dizinin translasyonları karşılaştırılmıştır. % 100 benzerlik elde edilmiştir. Tasarlanan dizinin yapay sentezi Biomatik firması tarafından gerçekleştirilmiştir. Dizi, *E. coli* pET30a(+) ekspresyon sistemine klonlanmış halde temin edilmiştir (Şekil 3.3).

E. coli hücrelerinde klonlama ve ekspresyon için oluşturulan pET30a(+) vektörü, kanamisine direnç sağlayan bir gene ve IPTG ile protein ekspresyonunu indüklemek için bir lac operonuna sahiptir.



Şekil 3. 3. pET30a(+) vektör haritası

Liyofilize halde gelen ilgili geni içeren vektör 40 µL nükleaz içermeyen su ile vortekslenerek iyice çözülmüştür. Vektör, daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere amplifikasyon amacıyla *E. coli* DH5α konak hücrelerine transforme edilmiştir.

3.2.2 Bakteriyel ekspresyon sisteminde sfGFP-RI üretimi

İlgili geni içeren pET30a(+) ile deneysel çalışmalara, rekombinant konstrüktün, ekspresyon hücrelerine transformasyonu ile başlanmıştır. Transformasyon için kompetent hücrelere ihtiyaç vardır. Kompetent hücrelerin ekzojen DNA alımına karşı hassasiyetlerinin fazla olduğu bilinmektedir. Kimyasal olarak kompetent hücreler, yüksek iki değerlikli katyon konsantrasyonu (genellikle kalsiyum klorür) ile işleme tabi tutulurak ardından ısı şokuna maruz bırakılmaktadır. Böylece hücrelerin, geçici olarak ekzojen DNA'ya geçirgen hale gelmeleri sağlanmaktadır. Kimyasal olarak kompetent hücreler Inoue ve ark. (1990)'a göre hazırlanmıştır.

Ekspresyon için, önceden kompetent hale getirilen *E. coli* BL21(DE3) pLysE hücreleri, konak organizma olarak kullanılmıştır. *sfGFP-RI* genini ifade etmek için Şekil 3.3' te diyagramı gösterilen sentetik yapıdaki plazmit T7 RNA polimeraz sentezleyen bu *E. coli* suşuna yerleştirilmiştir.

Rekombinant konstrüktün, kompetent hale getirilen *E. coli* BL21(DE3) pLysE hücrelerine ısı şoku ile transformasyonu

Isı şoku transformasyonu, ekzojen plazmit DNA' nın kompetent bakteri hücrelerine girişini arttırmak için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Transformasyon işleminin ardından, bakteri hücrelerinin optimal ortamda inkübe edilmesi gerekmektedir, çünkü transformasyon aşırı hücre stresine neden olmaktadır.

- Soğutulmuş steril ependorf tüpüne 200 µL bir önceki işlem basamağında hazırlanan kompetent hücre süspansiyonu konulmuştur.
- 200 µL kompetent hücre süspansiyonu üzerine 1 µL plazmit DNA (pET30a-sfGFP-RI) eklenerek 1 saat buzda bekletilmiştir.
- 1 saatin ardından 42 °C' lik su banyosunda ısı şokuna maruz bırakıldıktan sonra tekrar 5 dk buzda bekletilmiştir.
- Transformasyonu yapılan hücreler, LB agar seçici besiyeri içeren petrilere yayma ekim yapılarak 37 °C sıcaklıktaki etüvde 1 gece boyunca bekletilmiştir. (200 mL LB agara 200 µL 50 mg/mL' lik kanamisin ve 34 mg/mL' lik kloramfenikol çözeltisi ilave edilerek petri kaplarına dökülerek LB agarın katılaşması beklenmiştir)

pET30a-sfGFP-RI proteininin indüksiyonu

- pET30a-sfGFP-RI plazmit DNA' sı ile transforme olmuş ve koloni oluşumu gözlemlenen *E. coli* BL21(DE3) pLysE hücreleri içeren petrilerinden birer koloni alınarak; 4 µL 50 mg/mL kanamisin ve 4 µL 34 mg/mL kloramfenikol ihtiva eden 4 mL'lik steril LB Broth içeren tüplere inoküle edilmiştir. Ardından, hücrelerin çoğalması için 240 rpm' de 37 °C' lik çalkalamalı inkübatörde bir gece bırakılmıştır.
- Ertesi sabah kültürden ve % 70' lik gliserol çözeltisinden 1:1 eklenerek bir gliserol stoğu hazırlanarak - 80 °C' de saklanmıştır.

- Diğer yandan ilgili antibiyotikleri içeren steril 600 mL' lik erlenlerde üretime geçilmiştir. Bir gün önce ekilen ve büyüme görülen tüplerdeki hücre kültürlerinden 1' er mL 600 mL' lik LB besiyeri içeren 2 L' lik erlenlere inoküle edilmiştir. 240 rpm 37 °C' de inkübasyona bırakılmıştır.
- Her saat başı 600 nm' deki absorbanları okunarak yetiştirilmiştir. Erlenlerdeki kültürlerde optik dansite (OD) 0.5-0.7 arasında bir değere ulaşıldığında 1 M 600 µL IPTG ile indüklenmiştir.
- IPTG ile 4 saatlik inkübasyonun ardından erlenler alınarak; 250 mL' lik santrifüj tüplerinde, +4 °C' de 8 000 rpm'de 6 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısımları uzaklaştırılmıştır.
- Toplanan *E.coli* BL21 (DE3) pLysE hücreleri -20 °C' de muhafaza edilmiştir.

E. coli BL21 (DE3) pLysE hücrelerinin parçalanması

- -20 °C' de muhafaza edilen indüklenmiş haldeki hücreler buza gömülmüştür. Üzerine 20 mM Tris 100 mM NaCl içeren lizis tamponundan (pH: 7.5) 50 mL eklenerek süspanse hale getirilmiştir.
- Süspansiyona lizozim enzimi ve 100 mM benzamidinden 100 µL eklenerek vortekslenmiştir. Daha sonra üzerine aynı konsantrasyondaki PMSF'den 100 µL ilave edilmiştir.
- +4 °C' de 1 saat sonikatör yardımıyla parçalama işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Ardından 30 000 rpm' de ve +4 °C' de 1 saat santrifüjlenerek, karışımındaki hidrofobik proteinler ve diğer hidrofobik hücre bileşenleri çöktürülmüştür.

Afinite kromatografisi yöntemi ile *sGFP-RI* proteininin saflaştırılması

- Saflaştırma işlemi için polikarbonat kolon içerisine Ni-NTA agaroz rezinden 500 µL konulduktan sonra, kolon 50 mL kadar yükleme tamponuyla yıkanmıştır.
- Santrifüj sonrasında alınan protein karışımı kolona tatbik edilmiş ve kolondan gelen bütün fraksiyonlar toplanmıştır.
- Protein yüklenmiş kolon farklı konsantrasyonlarda imidazol içeren yıkama tamponları ile kolondaki rezine afinitesi olmayan diğer proteinlerin uzaklaştırılması sağlanmıştır.

- Elüsyon tamponu ile kolona tutunmuş olan ilgili protein 250 µL' lik fraksiyonlar halinde elüe edilmiştir.

SDS-PAGE ile *sf*GFP-RI proteininin analizi

- Toplanan her fraksiyondan alınan 100 µL' lik numuneler 100 µL örnek yükleme tamponuyla karıştırılıp, 100 °C' de 5 dk kaynatılmıştır.
- Rekombinant *sf*GFP-RI proteininin moleküler ağırlığı bakımından analiz edilmesi amacıyla SDS-PAGE işlemi Laemmli (1970)'e göre, % 12' lik ayırma jeli ve % 4' lük yükleme jeli kullanarak gerçekleştirilmiştir.
- Boya jelin dibine gelinceye kadar elektroforez işlemine devam edilmiştir.

Hedef füzyon proteinin aktif olabileceğine dair ipucu verecek *sf*GFP' nin ışımasını gözlemlemek için indirgeyici ajan içermeyen örnek yükleme tampon ile karıştırılan numuneler jel yürütme işi bittikten sonra Comassie ile boyanmadan önce UV altında incelenmiştir.

3.2.3 Şaperon sistemler ile koekspresyon

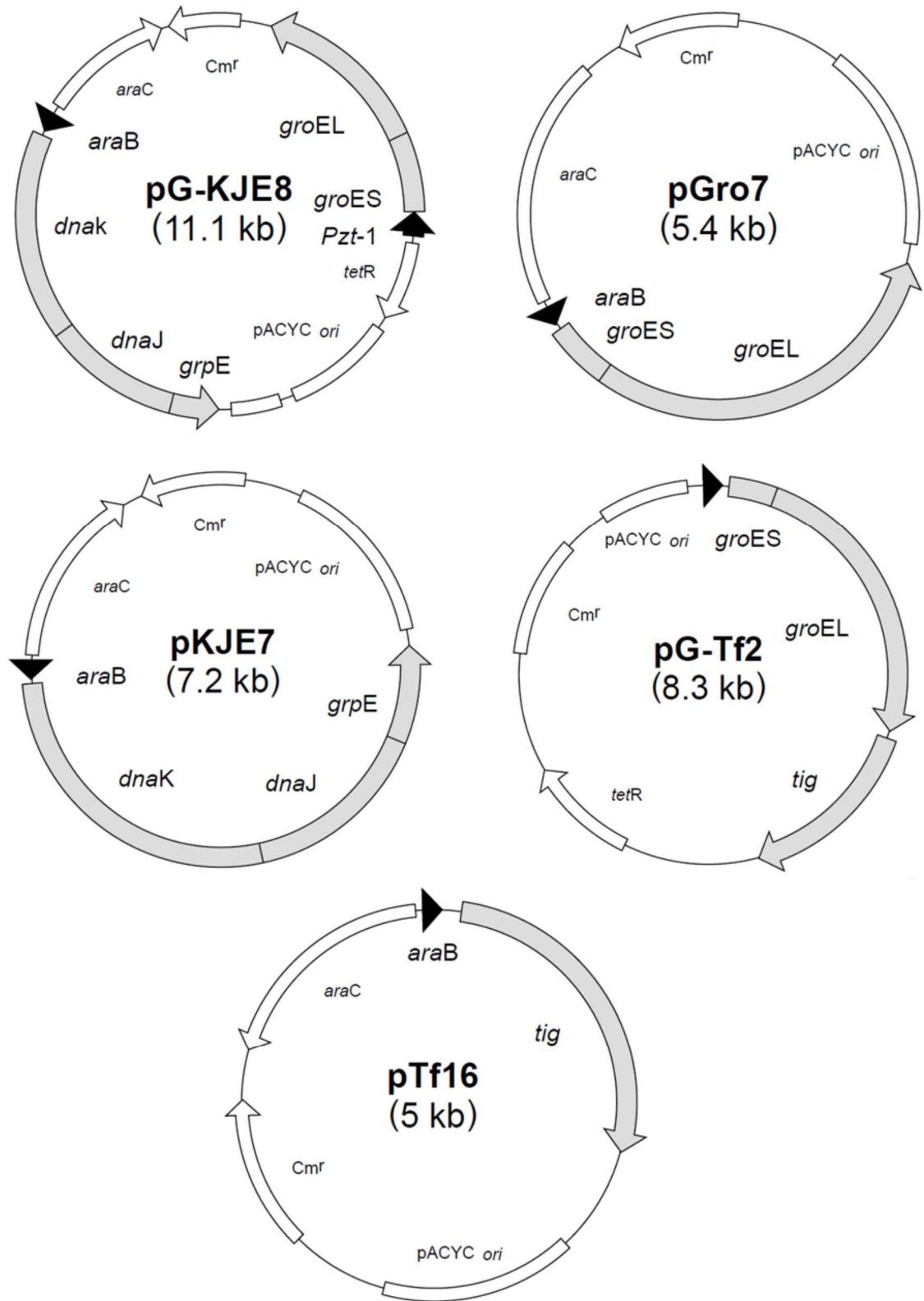
Bu aşamada *sf*GFP-RI proteinini eksprese etmeye programlanmış vektör ve Çizelge 3.8' deki şaperon sistemlerin kompetent *E. coli* BL21(DE3) pLysE hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan şaperon sistemler kısaca Sp1-5 olarak kodlanmıştır.

*sf*GFP-RI proteinine ait geni içeren pET30a-*sf*GFP-RI plazmiti, kompetent *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine Başlık 3'teki gibi ısı şoku ile transfer edilmiştir. Daha sonra gerekli antibiyotikli besiyeri içeren petrilere ekim yapılmıştır. Koloni oluşumu gözlemlenen BL21 pLysE petrilerinden birer koloni alınarak ilgili antibiyotikleri ihtiva eden 4 mL'lik steril LB tüplerine inoküle edilmiştir ve 240 rpm 37 °C' de bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi sabah hücreler 50 mL LB erlenlerine inoküle edilmiştir. Yaklaşık 1 saat sonra şaperon sistemlerinin kendi indükleyicileri eklenmiştir. OD: 0.5 olduğunda ise 1:1 oranında IPTG eklenmiştir ve 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 6 000 rpm 10 dk santrifüjden sonra pelet kısımları -20 °C' ye kaldırılmıştır. Bir sonraki gün peletler liziz tampon ile 10 µL proteaz inhibitörleri (PMSF ve Benzamidin) eklenerek çözündürülmüştür. Her biri 20 dk sonikatörde parçalanmıştır. Her birinden 200 µL

alınarak 12 000 rpm 15 dk santrifüj yapılmıştır. Süpernatant ve peletten örnek alınmıştır.

Çizelge 3. 8. Bu çalışmada kullanılan şaperon plazmitlerin listesi (Sp1-5)

No	Plazmit	Antibiyotik Dirençliliği	İndükleyici Ajan	Şaperonlar ve Moleküler Ağırlıkları (kDa)
Sp1	pG-KJE8	Cm (20 mg/mL)	L-arabinoz (0.5 mg/mL), tetrasiklin (5 ng/mL)	dnaK(70)-dnaJ(40)-grpE(22)/groES(10)-groEL(60)
Sp2	pGro7	Cm (20 mg/mL)	L-arabinoz (0.5 mg/mL)	groES(10)-groEL(60)
Sp3	pKJE7	Cm (20 mg/mL)	L-arabinoz (0.5 mg/mL)	dnaK(70)-dnaJ(40)-grpE(22)
Sp4	pG-Tf2	Cm (20 mg/mL)	tetrasiklin (5 ng/mL)	groES(10)-groEL(60)/tig(56)
Sp5	pTf16	Cm (20 mg/mL)	L-arabinoz (0.5 mg/mL)	tig(56)



Şekil 3. 4. Şaperon plazmitler (Takara Bio Inc.)

3.2.4 Yeniden katlama (Refolding)

Tipik olarak, yoğun bir şekilde paketlenmiş, granüler bir protein kütlesi olan aktif olmayan inklüzyon cisimciklerinin konak hücreden izole etmek için hücre zarının bozulması gerekmektedir. Daha sonra farklı yöntemler kullanılarak izole edilen inklüzyon cisimciklerinden protein aktif hale getirilebilmektedir.

Bu çalışmada inklüzyon cisimciklerinden proteinin yeniden kazanımı için iki farklı yöntem denenmiştir.

İlk yöntemde aşağıdaki işlemler gerçekleştirilmiştir (Melissis ve ark., 2010). Kullanılan tampon içerikleri Çizelge 3.6'da belirtilmiştir.

- *E. coli* BL21 pLysE hücreleri 37 °C' de kanamisin içeren LB ortamında bir gece boyunca büyütülmüştür (50 mL). Bu kültür, 3.6 L LB içeren erlenlere inokülasyon için kullanılmıştır (600 mL x 6). Hücreler 240 rpm' de 37 °C' lik inkübatörde OD 0.5-0.6 olduğunda 1 mM IPTG ile indüklenmiştir. 4 saatin sonunda hücreler toplanmıştır (8 000 rpm 6 dk). Akabinde süpernatant uzaklaştırılarak hücreler -20 °C' de muhafaza edilmiştir.
- -20 °C' den çıkarılan hücreler 50 mM Tris, 0.1 mM DTT, 2 mM PMSF içeren pH' sı 8.0 olan Tris-HCl tampon ile süspanse edilmiştir. Süspanse edilen hücrelere lizozim enzimi eklendikten sonra buz üzerinde 1 saat kadar sonikatörle parçalanarak santrifüjlenmiştir (12 000 rpm 15 dk). Süpernatant atılarak, inklüzyon cisimciklerinin bulunduğu pelet toplanmıştır. Ardından resüspansiyon tamponu 1 g pelet için 5 mL olacak şekilde ile yıkanp santrifüjlenmiştir (12 000 rpm de 15 dk). Bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır.
- Önceki basamakta yıkanma işlemi tamamlanan pelet çözme tamponu (5 mL/g pelet) eklenerek +4 °C' de çalkalamalı inkübatörde düşük devirde 5 saat boyunca çözölmüştür. Sonrasında çözünmeyen kısım santrifüjleme ile ayrılmıştır (12 000 rpm 15 dk). Süpernatant, nihai protein konsantrasyonu 0.2 mg/mL' den daha az oluncaya kadar soğuk refolding tamponuna damla damla ilave edilmiştir ve hafifçe karışması için inkübatöre konulmuştur (+4 °C 16 saat). Santrifüjleme ile agregatlar uzaklaştırılmıştır (12 000 rpm 15 dk). Süpernatant kısım membrana aktararak diyaliz için hazırlanan tampon içinde 1 gün bekletilmiştir (+4 °C).

- Diyalizin ardından yeniden katlanan protein Ni-NTA agaroz içeren kolondan saflaştırılmıştır. Kolondan gelen bütün fraksiyonlar toplanmıştır. Toplanan her fraksiyondan alınan numuneler örnek yükleme tamponuyla karıştırılıp, 100 °C' de 5 dk denatüre edilerek önceden hazırlanan SDS-PAGE jelinin kuyucuklarına yüklenmiştir.

Diğer yöntem ise GE Helthcare (2007) firmasına aittir. Kullanılan tampon içerikleri Çizelge 3.7'de belirtilmiştir.

- Bir g pelet başına 5 mL olacak şekilde pelet üzerine 20 mM Tris-HCl (pH: 8.0) tamponu eklenerek hücreler vortekslenmiştir. Üzerine proteaz inhibitörleri ve lizozim ilave edilmiştir. Buz üzerine alınan hücreler sonikatör ile parçalanmıştır (9 cycle, % 90 power 45 dk). Ardından santrifüjleme yapılmıştır (12 000 rpm 20 dk).
- İnküzyon cisimciklerini içeren pelet soğuk süspansiyon tamponu eklenerek buz üzerinde 4 cycle, % 62 power 5 dk sonikatörde parçalanarak süspanse edilmiştir. Süspanse hücreler santrifüjlenmiştir (12 000 rpm 20 dk). Daha sonra supernatant uzaklaştırılarak pelet ikinci bir üre yıkamasına tabi tutulmuştur.
- Pelet resüspansiyon tamponu ile yeniden süspanse edilmiştir. Oda sıcaklığında 30-60 dk karıştırmanın ardından santrifüjlenmiştir (12 000 rpm 20 dk).
- Süpernatant kısım alınarak 10 mL bağlanma tamponu ile dengelenmiş Ni-NTA agaroz içeren kolona yüklenmiştir. Akabinde kolon 10 mL 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazol, 6 M guanidin hidroklorür, 1 mM β -ME pH: 8.0 ve sonrasında 10 mL 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazol, 1 mM β -ME, 6 M üre pH:8.0 kolondan geçirilmiştir.
- Bağlı proteinin yeniden katlanması 6-0 M üre gradienti kullanılarak her bir refolding tampondan 5' er mL olacak şekilde 0.1-1.0 mL/dk hızla gerçekleştirilmiştir.
- Sırasıyla yıkama tamponları kolondan geçirilmiştir.
- Son olarak elüsyon tamponu ile yeniden katlanan protein elüe edilmiştir. Toplanan her fraksiyondan alınan numuneler örnek yükleme tamponuyla karıştırılıp, 100 °C' de 5 dk denatüre edilerek önceden hazırlanan SDS-PAGE jelinin kuyucuklarına yüklenmiştir.

3.2.5 TEV proteaz enziminin üretilmesi ve saflaştırılması

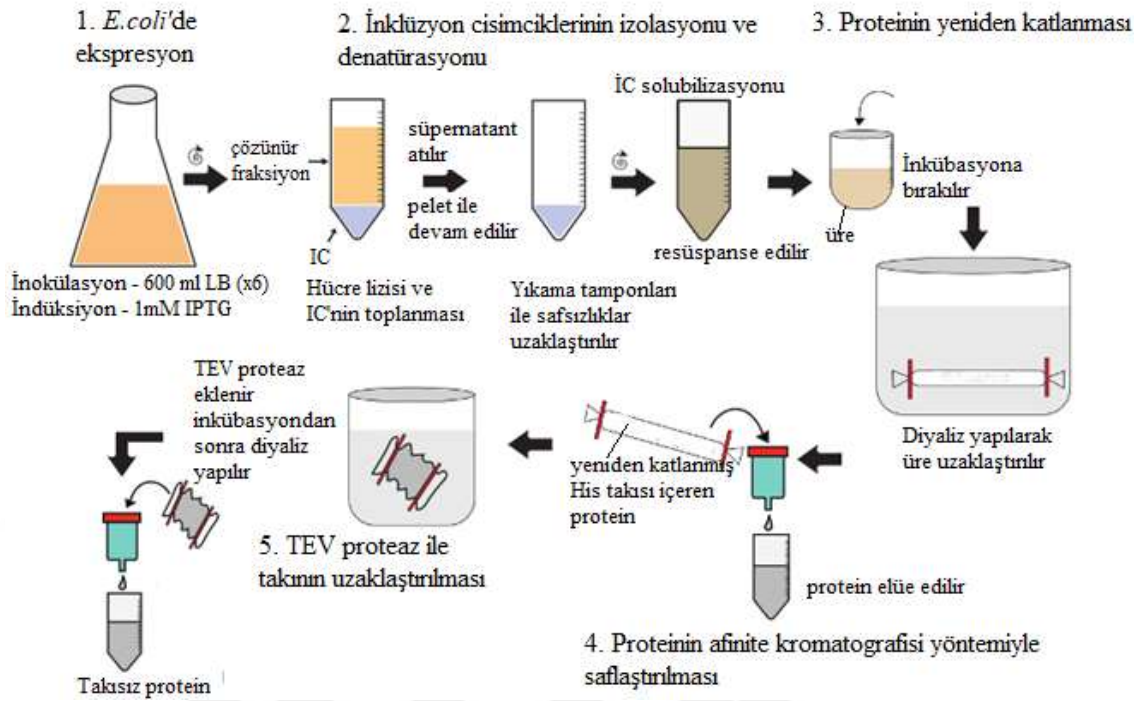
Çeşitli proteazlar arasında TEV proteaz, yüksek ve benzersiz özgünlüğü nedeniyle öne çıkmaktadır (Wu ve ark., 2009). TEV proteaz, ENLYFQG/S amino asit dizisini yüksek verimlilikle tanıyarak Q ile G/S arasındaki peptit bağına ayırmaktadır (Nam ve ark., 2020).

E. coli BL21 (DE3) RIL bir N-terminal 6x-His etiketi ve kendini in vivo parçalayan bir MBP füzyon proteini şeklinde Tobacco Etch Virus (TEV) proteazının katalitik alanını aşırı üretmektedir. Bu sayede ilgili protein TEV tanıma bölgesinden TEV proteaz ile füzyon etiketinden ayrılmaktadır.

-80 °C' den alınan stok hücreler ampisilin içeren 4 mL' lik LB sıvı besiyerine 20 µL inoküle edilmiştir. 37 °C' de 240 rpm' de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 4 mL' lik hücre kültürü, ampisilin ve kloramfenikol antibiyotiklerini içeren 600 mL'lik LB sıvı besiyerine inoküle edilerek 37 °C ve 240 rpm' de büyümeye bırakılmıştır. Hücreler, OD değeri 0.6 olduğunda 1 M IPTG ile indüklenerek 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından, inkübasyon sonrası hücreler 8 000 rpm' de 6 dk santrifüj edilerek toplandıktan sonra parçalama işlemi için -20 °C' de saklanmıştır. Başlık 3.2.2' nin altında belirtilen prosedüre uygun olarak hücrelerin parçalanması ve saflaştırılması işlemi gerçekleştirilmiştir. Belirli aşamalarda alınan örnekler SDS-PAGE' de analiz edilmiştir.

3.2.6 TEV proteaz kesimi

Kolondan imidazol yardımıyla saflaştırılan TEV proteaz enzimi ve *sGFP-RI* füzyon proteininden imidazolun uzaklaştırılması için 1x TEV proteaz tamponuna karşı yaklaşık 16 saat diyaliz işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5). Diyaliz sonrası *sGFP-RI* füzyon proteini TEV proteaz enzimi ile 30 °C' de 4 saat kesime bırakılmıştır. Kesim işlemi tamamlandıktan sonra kesim ürünlerinden örnekler alınarak SDS-PAGE' de analiz edilmiştir.



Şekil 3. 5. TEV proteaz ile kesim (Machuca ve Roujeinikova, 2017)

3.2.7 RI proteinin agaroz jel tabanlı aktivite tayini

Agaroz jel elektroforezi

Jel elektroforezi, molekülleri ayırmak için biyokimya ve moleküler biyolojide kullanılan bir yöntemdir. Özellikle DNA veya RNA gibi nükleik asitlerin ayrılması ve saflaştırılması için kullanılmaktadır. Bir elektrik yükü uygulayarak, nükleik asitler bir agaroz matriks alanı boyunca hareket etmektedir. Daha küçük moleküller, daha büyük moleküllerden daha hızlı hareket eder, çünkü matriks içinde daha kolay geçmektedirler. DNA veya RNA bantlarını görünür kılmak için farklı boyama yöntemleri mevcuttur. En yaygın boyama boyaları, SYBR-Green I veya DNA veya RNA'nın düzlemsel bazlarına giren etidyum bromürdür. Ultraviyole ışığa maruz kaldıklarında ışıma meydana gelmektedir.

RNA elektroforezi

RNA'nın elektroforezinin yapılmasının üç ana nedeni vardır. Birincisi ve belki de en yaygın nedeni, bir RNA örneğinin herhangi bir uygulamada kullanmadan önce bütünlüğünün kontrolüdür. RNA kararsız bir moleküldür; eğer başlangıç materyali bozulacak olursa herhangi bir RNA bazlı çalışmaya devam edilemez. İzolasyondan

hemen sonra veya ultra soğuk bir dondurucuda uzun bir saklama süresinden sonra RNA bütünlüğünü değerlendirmek önemlidir. İkinci olarak, RNA elektroforezi, Northern analizi için bir ilk adım olarak veya bir nükleaz koruma analizinde sondan bir önceki adım olarak gerçekleştirilebilmektedir. Üçüncüsü, klonlama deneyleri için seçilen RNA moleküllerini boyutlandırmak veya eş zamanlı olarak, daha önce gerçekleştirilen bir boyut seçim prosedürünün, örneğin kolon kromatografisinin, istenen boyut fraksiyonlama sonucunu üretmesini sağlamak mümkündür. Bir jel, hatta bir minijel çalıştırmak, bir numunenin bütünlüğünü ve olası faydasını değerlendirmek için mükemmel bir araçtır. Belirli bir sistemdeki bir RNaz inhibitörünün etkinliği, RNaz A, örnek RNA ve varsayılan inhibitörün kısa bir inkübasyonu ile belirlenebilmektedir. Inkübasyon sonrası ürünler daha sonra basit bir agaroz jel üzerinde görüntülenebilmektedir (Farrell, 2017).

Sentetik inhibitörler tarafından RNaz A inhibisyonunun kalitatif göstergesi, RNA'nın RNaz A tarafından bozunması izlenerek karşılaştırmalı bir agaroz jel bazlı tahlilden elde edilmiştir (Chakraborty ve ark., 2015).

Bu çalışmada da agaroz jel bazlı bir deney kullanılarak RNA örnekleri RI varlığında ribonükleolitik aktivite açısından taranmıştır. Kısaca, enzim, DTT içeren bir tampon RNA ve RI protein karışımı oda sıcaklığında 20 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyon, jel yükleme tamponu eklenerek durdurulmuştur. Daha sonra etidyum bromür içeren % 1.2 agaroz jel üzerinde elektroforeze tabi tutulmuştur (Gaur ve ark., 2001; Haigis ve ark., 2002).

RNaz kontaminasyonunu önlemek için, mümkün olduğunca tek kullanımlık plastik eşya ve RNaz içermeyen su kullanılmıştır. Stok konsantrasyonu 10 mg/mL olan RNaz A enzimi (sığır pankreatik enzim), konsantrasyonu 1.0 µg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. RNA örnekleri insan hücre kültüründen izole edilmiştir. Aktivite tayini için literatürde belirtilen bir tampon (50 mM Tris-Cl tampon (pH 7.4), 50 mM NaCl, 10 mM DTT) kullanılmıştır (Guo ve ark., 2011). Ürettiğimiz rekombinant RI proteinin konsantratör tüplerinde konsantre ettikten sonra aşağıdaki Çizelge 3.9' da belirtilen pipetlemeler gerçekleştirilmiştir. 100 mL TAE tampon içerisine 1.2 g agaroz eklenmiştir. Mikrodalgada ısı ile çözünmüştür. EtBr eklenerek jel donmaya

bırakılmıştır. Örnekler Orange G ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Örnekler 150 V, 150 mA, 20 dk yürütülmüştür. Ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir.

Çizelge 3. 9. Kullanılan reaktiflerin hacimleri (µL)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Tampon	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
RNaz A	-	-	1	-	1	1	1	1	1	2	2
RI	-	-	-	2	2	4	8	16	32	8	16
RNA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Orange G	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 *sfGFP*-RI Kimerik Füzyon Proteinini Kodlayan Gen Bölgesini İçeren Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması

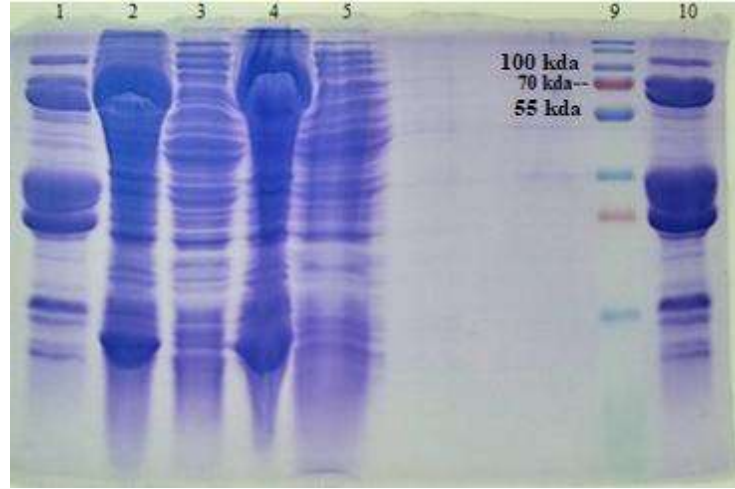
RI' nın C-terminali, RI-RNaz A kompleksinde RNaz A ile birçok temas noktası sağlamaktadır. Buna karşılık, RI' nın N-terminali RNaz A' nın bağlanmasında rol oynamaktadır. İnsan RI' sının N-terminali, doğal bir bağlayıcı olarak hareket eden RI kıvrımının ucundan uzanan dört amino asit kalıntısı içermektedir. GFP kompakt, silindirik bir protein ve RI da modüler bir protein olduğundan, *sfGFP*' nin RI' nın N-terminaline kaynaştırılmasının RI' nın işlevini bozmayacağı varsayılmıştır (Haigis ve ark., 2003). Gerektiğinde *sfGFP* ve RI proteinlerini ayırmak adına iki protein arasına TEV kesim bölgesi “ENLYFQ/G” eklenmiştir. Optimize edilen dizinin yapay sentezi Biomatik firması tarafından gerçekleştirilmiştir. Dizi *E. coli* pET30a ekspresyon sistemine NdeI ve BamHI enzimleri ile klonlanmış halde temin edilmiştir.

4.2 Bakteriyel Ekspresyon Sisteminde *sfGFP*-RI Üretimi

E. coli BL21(DE3) pLysE hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilen plazmitin, başarılı bir şekilde ekspresyonu sağlanmıştır. Santrifüjle çözünen ve çözünmeyen kısımlar ayrılmıştır. Rekombinant protein içeren süpernatant kolona yüklenmiştir. Proteindeki *sfGFP* belirteci sayesinde yüklenen kısmın kolondan aşağı aktığı görülmüş ve proteinin kolona zayıf bağlandığı anlaşılmıştır.

Elüsyon, indüklemeye öncesi ve sonrasında alınan numuneler, SDS-PAGE’de analiz edilmiştir (Şekil 4.1). Buna göre yaklaşık 78 kDa moleküler ağırlığında olması beklenen *sfGFP*-RI füzyon proteinin üretimi gerçekleştiği anlaşılmıştır. Elüsyon istenen saflıkta olmayıp farklı büyüklükte bantlar gözlemlenmiştir. Bunun nedeninin hücre içi degradasyon olduğu değerlendirilmiştir.

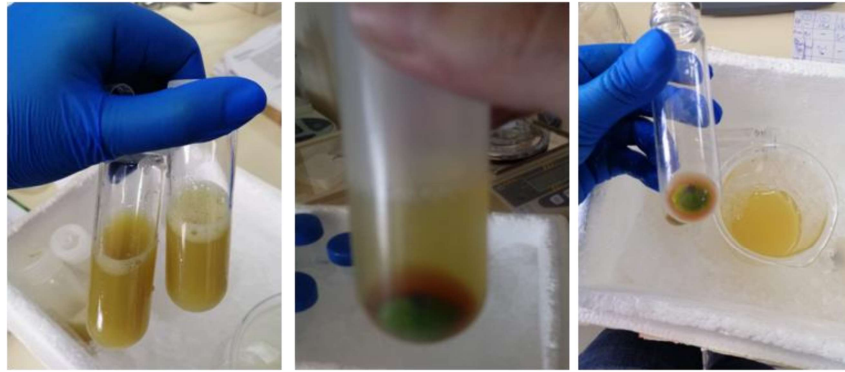
Bu sistemde, tiyol indirgeyici ajan olarak SDS ve β -ME varlığında denatüre edilen proteinler, moleküler ağırlıklarıyla orantılı olarak çubuk benzeri bir şekil ve tek tip bir yük-kütle oranı elde edilmiştir. Jeller, Coomassie boyası ile boyanmış ve protein bandının göçü bir moleküler kütle standardına göre karşılaştırılarak protein boyutları belirlenmiştir.



Şekil 4. 1. *sfGFP-RI*'nin (78 kDa) *E. coli* BL21 pLysE hücrelerinde üretimine ait SDS-PAGE görüntüsü. 1. Elüsyon, 2. *E. coli* BL21(DE3)pLysE hücrelerinin sonikasyon ile parçalama işleminden sonra alınan örnekleri, 3. Ultrasantrifüj sonrası süpernatant 4. Ultrasantrifüj sonrası pelet 5. Süpernatantın kolona verildikten sonra aşağıda biriken sıvıdan alınan örnek, 9. Protein marker (Thermo Scientific, PageRuler Plus Prestained Protein Ladder), 10. Elüsyon

SDS-PAGE sonuçları, hedef proteinin inklüzyon cisimcikleri şeklinde çöktüğünü göstermektedir. *E. coli* sitoplazmasındaki heterolog proteinlerin aşırı üretimine sıklıkla yanlış katlanmaları ve inklüzyon cisimcikleri olarak bilinen çözünmeyen agregatlara ayrılmaları eşlik etmektedir (Şekil 4.2).

Peletteki inklüzyon cisimciklerinin tespit edilmesi sonucunda proteinin doğru katlanmasına yardımcı olan şaperon sistemlerle birlikte üretilmesine karar verilmiştir.



Şekil 4. 2. Protein agregasyonu

4.2. Şaperon Sistemler ile Koekspresyon

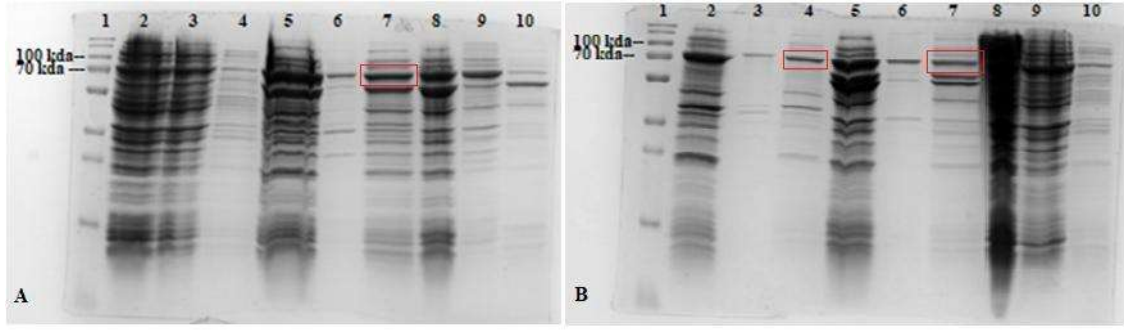
Hücrelerin inklüzyon cisimciği oluşturmalarını engellemek için HSP Research Institute tarafından geliştirilen şaperon proteinlerin çeşitli kombinasyonlarını içeren beş farklı

tipte plazmit sistemi kullanılmıştır. Şaperon proteinlerin gen dizisini içeren plazmitler (pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pG-Tf2, pTf16), RI genini taşıyan plazmit ile birlikte *E. coli* ekspresyon sistemine başarılı bir şekilde transforme edilmiştir (Şekil 4.3). Pozitif koloniler sıvı besiyerine inoküle edilerek ilgili indükleyiciler kullanılarak protein üretiminin gerçekleşmesi sağlanmıştır.



Şekil 4. 3. Şaperon sistemler ile koekspresyon. Şaperon plazmitlerin transformasyon sonrası petrilerdeki kolonileri, inoküle edilen hücrelerin falkon tüplerde indüklenmiş kültürleri, hücrelerin toplanması, parçalanma sonrası pellet ve supernatant kısımları (UV altında)

Bu çalışmada kullanılan şaperon sistemler kısaca Sp1-5 olarak kodlanmıştır.



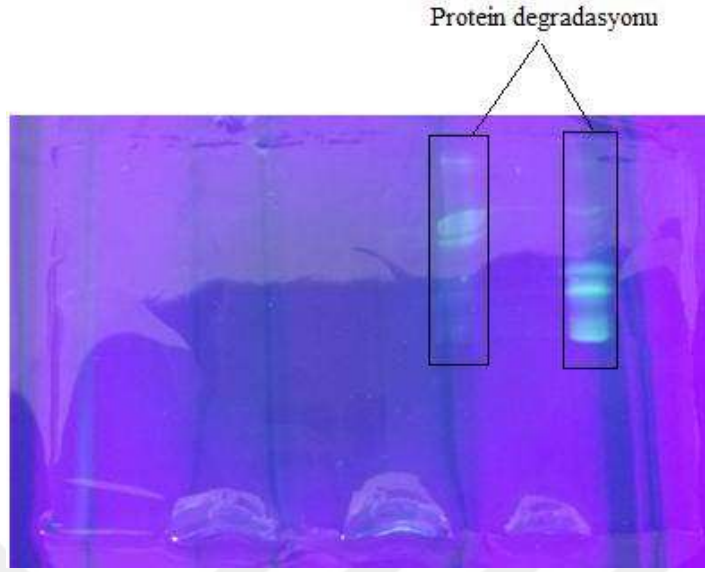
Şekil 4. 4. Şaperon proteinlerin üretimine ait SDS-PAGE görüntüsü A. Şaperon proteinlerin (Sp1, Sp2) *E. coli* BL21 pLysE hücrelerinde üretimine ait SDS-PAGE görüntüsü. 1. Protein marker (Thermo Scientific, PageRuler Plus Prestained Protein Ladder), 2. Kontrol olarak sadece *sfGFP-RI* içeren (78 kDa) *E. coli* BL21 pLysE hücrelerinden İndükleme sonrası kültür örneği, 3. Parçalama sonrası pelet, 4. Parçalama sonrası süpernatant, 5. Sp1 İndükleme sonrası kültür örneği, 6. Sp1 Parçalama sonrası pelet, 7. Sp1 Parçalama sonrası süpernatant, 8. Sp2 İndükleme sonrası kültür örneği, 9. Sp2 Parçalama sonrası pelet, 10. Sp2 Parçalama sonrası süpernatant B. Şaperon proteinlerin (sp3, sp4, sp5) *E. coli* BL21 pLysE hücrelerinde üretimine ait SDS-PAGE görüntüsü. 1. Kuyucuk Protein marker (Thermo Scientific, PageRuler Plus Prestained Protein Ladder), 2. Sp3 İndükleme sonrası kültür örneği, 3. Sp3 Parçalama sonrası pelet, 4. Sp3 Parçalama sonrası süpernatant, 5. Sp4 İndükleme sonrası kültür örneği, 6. Sp4 Parçalama sonrası pelet, 7. Sp4 Parçalama sonrası süpernatant, 8. Sp5 İndükleme sonrası kültür örneği, 9. Sp5 Parçalama sonrası pelet, 10. Sp5 Parçalama sonrası süpernatant

SDS-PAGE analizi sonucu Sp1, Sp3, Sp4 ile koekspresyon sonucu süpernatantta daha çözünür RI üretildiği tespit edilmiştir. dnaK-dnaJ-grpE/GroEL-GroES şaperonlarının ekspresyonu ile kültür hacmine göre en çözünür *sfGFP-RI* üretilmiştir. Süpernatant proteinin daha yoğun olduğu görülmüştür (Şekil 4.4). Bu yüzden Sp1' in kullanılmasına karar verilmiştir. Bu şaperon kompleksini ifade eden pG-KJE8 plazmiti ile birlikte transforme edilen hücrelerin büyük ölçekte kültürü Başlık 3.2.2' deki işlemler tekrarlanarak yapılmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4. 5. Sp1 ile büyük ölçekte üretim. Sp1 ile koekspresyonu yapılan rekombinant proteinlerin indüksiyon sonrası hücreleri toplanması, parçalanması ve yüksek hızlı santrifüjlenmesi işlemleri

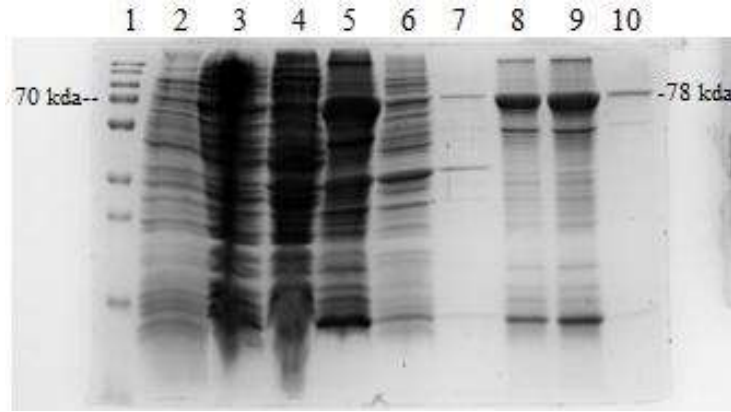
Toplanan hücreler parçalandıktan sonra kolona yüklenmiştir. Protein kolona istenilen düzeyde bağlanamamıştır ve protein tek bant halinde elde edilememiştir. Protein degrade olduğu için UV altında parçalı bantlar olarak renk vermiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4. 6. Poliakrilamid jelin UV'deki görüntüsü

4.3 Yeniden Katlama (Refolding)

Şaperonlar kullanılarak elde edilen yüksek verimdeki çözünür protein, saflaştırma basamağında veya sonrasında degrade olmuştur. Bu yüzden rekombinant *sfGFP-RI* proteini için inklüzyon cisimciği oluşumunun azaltılması amacıyla iki farklı prosedür takip edilmiştir. Sırasıyla aktif olmayan rekombinant proteinin izolasyonu, çözündürülmesi ve çözündürülmüş rekombinant proteinin aktivasyonu işlemleri gerçekleştirilmiştir. İkisinde de protein, yeniden katlama ile elde edilmiştir. Yüksek verim ve harcanan zaman açısından kıyaslandığında kolonda katlama diye tabir ettiğimiz ikinci prosedürün daha etkili olduğu anlaşılmıştır. Fakat indirgeyici ajan içermeyen tampon ile yüklenen numunelerin de bulunduğu jele boyamadan önce UV altında bakılmıştır ve SDS-PAGE jel görüntüsünde herhangi bir ışımaya rastlanamamıştır. Bu yüzden proteinin aktivite ile ilgili problemi olabileceği düşünülmüştür. Diğerine göre daha az verimde daha uzun sürede yeniden katlama sağlayan prosedür tercih edilmiştir.

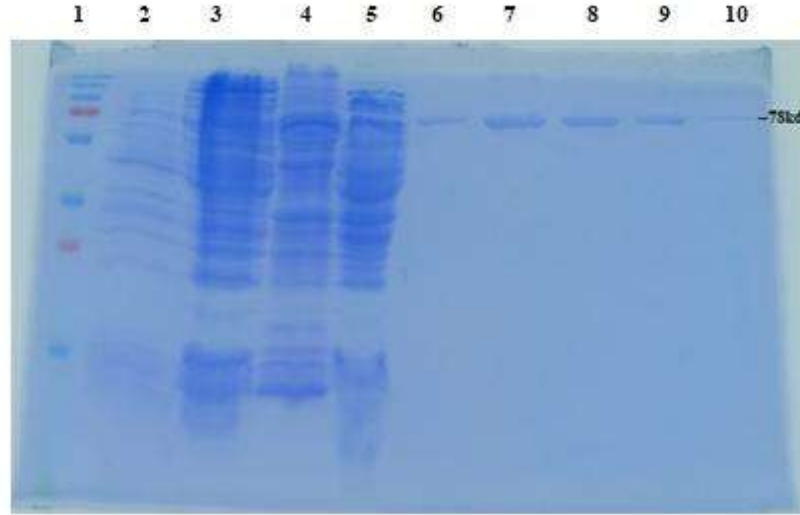


Şekil 4. 7. İnklüzyon cisimciklerinden sfGFP-RI proteinin yeniden kazanımı için kullanılan birinci prosedürün % 12'lik SDS-PAGE'de analizi. 1. Kuyucuk Protein marker (Thermo Scientific, PageRuler Plus Prestained Protein Ladder), 2. Sonikatör işlemi sonrası protein örneği 3. Santrifüj sonrası pelet örneğinin resüpsansiyonu ile elde edilen çözelti, 4. Santrifüj sonrası süpernatant, 5. L, 6. W1, 7. W2, 8. Elüsyon 1, 9. Elüsyon 2, 10. Elüsyon 3

Melissis ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışma takip edilerek yapılmıştır. Proteinler SDS-PAGE analizi ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.7). UV altında sfGFP etiketi sayesinde yeşil ışıma gerçekleşmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4. 8. Poliakrilamid jelin UV'deki görüntüsü



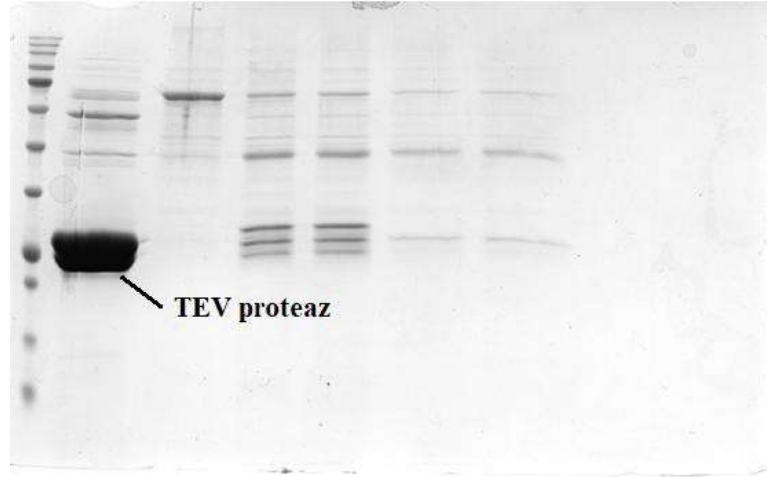
Şekil 4. 9. İnküzyon cisimciklerinden *sGFP-RI* proteinin yeniden kazanımı için kullanılan 2. prosedürün %12' lik SDS-PAGE'de analizi 1. Kuyucuk Protein marker (Thermo Scientific, PageRuler Plus Prestained Protein Ladder), 2. IPTG ile indükleme öncesi *E. coli BL21 pLysE* hücreleri, 3. IPTG ile indükleme sonrası *E. coli BL21 pLysE* hücreleri 4. 12 000 rpm santrifüjden sonra pelet 5. Lizis, yıkama ve ekstraksiyon işlemlerinden sonra elde edilen ve kolona yüklenen süpernatant örneği 6-10. Kolondan 300 mM imidazol içeren tamponun geçirilmesiyle elde edilen elüsyonlar (Sırasıyla E2, E3, E4, E5, E11).

GE Healthcare (2007) tarafından önerilen çalışma basamakları izlenmiştir. Yüksek saflıkta protein yeniden kazanılmıştır. Proteinler SDS-PAGE analizi ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.9).

4.4 TEV Proteaz Enziminin Üretilmesi ve Saflaştırılması

Füzyon halinde üretilen proteinin aktif olmadığı tespit edilmiştir. Bu yüzden *sGFP* etiketinden ayırdıktan sonra tekrar aktivitesinin belirlenmesine karar verilmiştir.

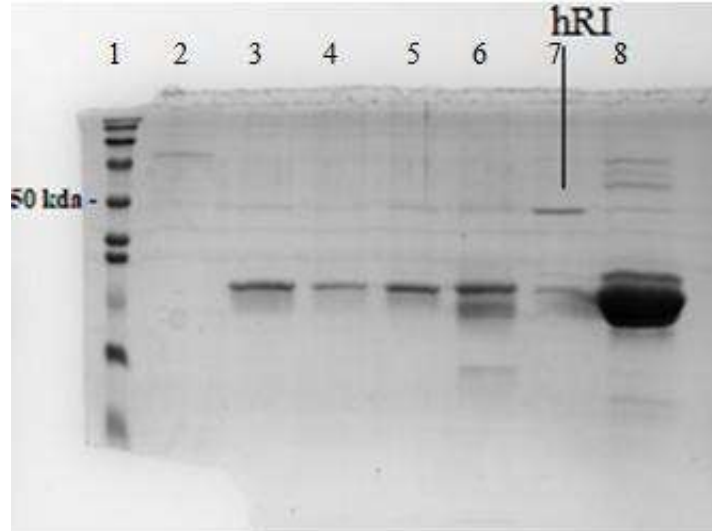
TEV proteini, *E. coli* içinde rekombinant olarak ifade edilmiştir. Proteinde bulunan N-terminal His etiketi ile TEV proteaz afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmıştır. Sonrasında konsantre hale getirilmiştir ve denatüre edici bir SDS-PAGE jeli üzerinde tek bir bant halinde tespit edilmiştir (Şekil 4.10). TEV proteaz saflaştırılırken hızlıca çöktüğü için RI ile eş zamanlı üretilmesine gayret edilmiştir.



Şekil 4. 10. TEV proteaz üretimine ait SDS-PAGE jel görüntüsü

4.5 TEV Proteaz Kesimi

sfGFP-RI rekombinant proteinini TEV proteaz tarafından spesifik ve verimli bölünme için optimize edilmiştir. Dolayısıyla füzyon etiketinin çıkarılması TEV proteaz ile mümkün olmuştur. N-terminalindeki hekza-histidin, afinite kromatografi saflaştırması için kullanılmıştır. Bu sayede *sfGFP*, RI' dan uzaklaştırılmıştır. Üretilen TEV proteaz, füzyon etiketlerinin bölünmesinde doğru ve verimli bir şekilde çalışmıştır.



Şekil 4. 11. *sfGFP-RI* proteininin TEV proteaz enzimi ile kesiminin % 12' lik SDS-PAGE' de analizi 1. Protein marker (Bio Basic Protein Ladder), 2. *sfGFP-RI* proteinin 1X TEV tamponu ile diyalizi sonrası alınan örnek, 3. TEV proteaz enziminin 1x TEV tamponu ile diyalizi sonrası alınan örnek, 4. *sfGFP-RI* proteinini ve TEV proteaz enziminin karışımı, 5. 4 saat inkübasyondan sonra *sfGFP-RI* proteinini ve TEV proteaz enziminin karışımı 6. FP-FRET biyosensörünün TEV proteaz ile kesimi sonucu oluşan ürünleri ve TEV proteaz enzimini içermektedir (TEV proteazın aktivitesini kontrol etmek için kullanılmıştır), 7. Sadece RI (50 kDa) 8. Sadece *sfGFP* (30 kDa)

TEV proteazın aktivitesinin varlığının anlaşılması için kontrol olarak daha önce laboratuvarında çalışılan FP-FRET biyosensörü kullanılmıştır (İncir, 2020). Bu biyosensörün TEV proteaz ile kesimi sonucu oluşan ürünlerin gözlemlenmesi TEV proteazın aktif bir şekilde üretildiğinin kanıtı olmuştur (Şekil 4.11).

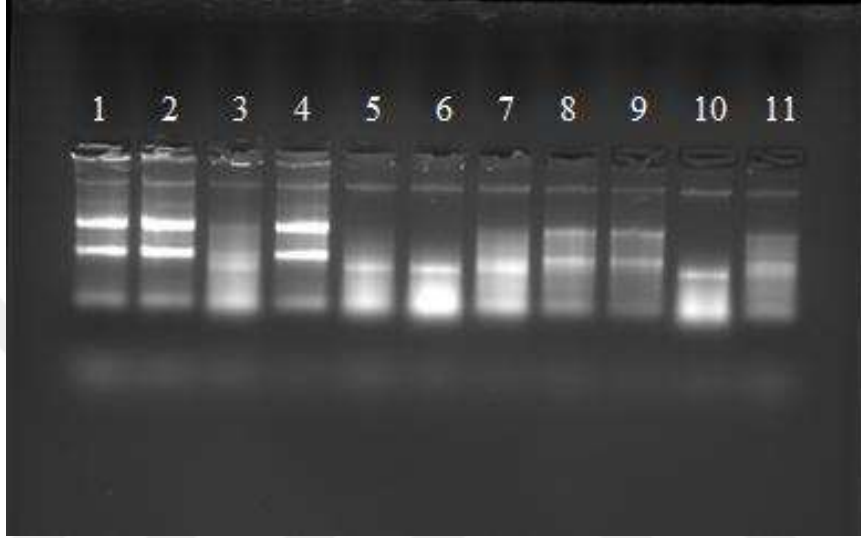
4.6 RI Proteinin Agaroz Jel Tabanlı Aktivite Tayini

RI varlığında ribonükleolitik aktivite, RNA elektroforezi kullanılarak kolaylıkla belirlenebilmektedir (Guo ve ark., 2011). RNA bütünlüğü, agaroz denatüre edici jel üzerinde 2-4 µg total RNA numunesi koşturularak değerlendirilebilmektedir. rRNA (hücrel RNA'nın % 80-85' i), transkripsiyonun en yaygın ürünüdür. Toplam hücrel veya sitoplazmik ökaryotik RNA' nın bir alikotunda, 28S ve 18S rRNA bantları elektroforetik olarak belirgin bir şekilde gözlemlenebilmektedir. Bu bantların görünümü, örneğin bozulmadığına ve bütünlüğünün korunduğuna kanıttır. Bu durum RNA' nın ekstrakte edildiği organizmaya bağlı olarak değişebilmektedir. Genel olarak, kaliteli RNA için bantlar smear olmadan belirgin olmalıdır ve 28S bandı (daha büyük) 18S bandının yaklaşık iki katı kadar yoğun olmalıdır. Floresan oranı yaklaşık 2:1 veya daha büyük olmalıdır. Genel olarak, 18S rRNA' lar 1.7 ila 1.9 kb arasında değişirken, 28S rRNA'ların aralığı yaklaşık 4.6-5.2 kb' dir (Farrell, 2017). Bu bantlara ek olarak en üstte mitokondri DNA' sı veya genomik DNA bantları görülebilmektedir. Geri kalanı (mRNA), ribozomal türlerin biraz üstünde, arasında ve hemen altında soluk bir bulaşma olarak görünür. Jelin en altındaki kısım, tRNA ile birlikte 5S ve 5.8S rRNA karışımıdır.

Bu aşamada öncelikle çok sayıda denemelerle kontrol olarak Ribolock marka ticari RI, RNaz A, RNA belli miktarlarda eklenerek reaksiyon tüpünde kullanacağımız optimum konsantrasyon ve hacim belirlenmiştir. 1.0 µg/mL stoktan 1.0 µL RNaz A enzimi 1.0 µL Ribolock RI ile total RNA korunabilmiştir. Bu sonuçlar baz alınarak kullanılacak RNaz A miktarları ayarlanmıştır. Çizelge 4.1' de kullanılan RNaz ve RI miktarları belirtilmiştir. Başlık 3.2.7' de belirtilen reaksiyon koşullarında gerçekleştirilmiştir. RNA elektroforezi, % 1.2 agaroz jel ile yapıp etidyum bromür boyama ile görüntülenmiştir.

Çizelge 4. 1. RNaz A ve RI' nin reaksiyon karışımında kullanılan miktarları (µL)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
RNaz A	-	-	1	-	1	1	1	1	1	2	2
RI	-	-	-	2	2	4	8	16	32	8	16



Şekil 4. 12. RNaz inhibitör aktivitesinin agaroz jel analizi

Jel sonucuna göre DTT içeren tamponun RNA üzerine herhangi bir olumsuz etkisi olmamıştır. RI' sız ortamda bu tampon RNaz A' nın inhibisyonuna da olumlu bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. RNA bütünlüğünü koruyamamıştır. 1 µg/mL konsantrasyondaki RNaz A' dan 1 µL kullanıldığında RNA' yı parçalamaya yetmiştir. 1 µL RNaz A' yı inhibe edip RNA' yı stabil kılan RI' nin aktivite gösterdiği hacim 16 µL - 32 µL arasındadır. Aynı konsantrasyondaki RNaz A' dan 2 µL kullanıldığında RNA, büyük ölçüde degrade olmuştur (Şekil 4.12).

Ditiyotritol (DTT) veya β-ME gibi indirgeyici ajanların yanı sıra antioksidanların (EDTA gibi metal şelatlayıcılar) varlığının, RI' nin stabil ve aktif tutulmasında önemli olduğu gösterilmiştir (Blázquez ve ark., 1996). Reaksiyon tamponunda bulunan DTT' nin RNaz A varlığında, RI olmadan RNA örneklerinin bütünlüğünün değerlendirilmesi yapılmıştır. Sonuç olarak RI olmadan tek başına DTT, RNaz A' yı inaktive edememektedir. Ortamdaki tampon optimum pH ve RI' nin stabilizasyonu için kullanılmıştır.

Sonuç olarak inklüzyon cisimciklerinden geri kazandığımız RI' nın aktif olduğu ve RNaz A bulunan ortamda RNA bozunmasını önleyebildiği tespit edilmiştir.



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çeşitli biyosistemlerde rekombinant proteinlerin üretiminin keşfi ile belirli bir proteinin küçük miktarlarının saflaştırılması için kilogramlarca hayvan ve bitki dokusunun veya büyük hacimlerde biyolojik sıvıların gerekliliği ortadan kalkmıştır. Günümüzde artık araştırmacılar, çalışmaları için saflaştırılmış bir proteine ihtiyaç duyduklarında, onu rekombinant formda elde etmenin çabasıındadırlar. İstenilen rekombinant proteini, yüksek düzeyde ifade etme ve saflaştırma yeteneği, proteinin biyokimyasal karakterizasyonuna, endüstriyel işlemlerde kullanımına ve ticari olarak geliştirilmesine izin vermektedir. Teorik olarak bakıldığında rekombinant bir protein elde etmek için gereken adımlar oldukça basittir. İlgili gen alınır, ifade vektörüne (seçtiğimiz konak organizma) klonlanır, indüklenir ve ardından protein saflaştırma ve karakterizasyon için hazır olmaktadır. Fakat pratikte birçok adımda terslik çıkabilmektedir. Örneğin, konakçının zayıf büyümesi, inklüzyon cisimciği oluşumu, proteinin az veya hatta hiç elde edilememesi bu sorunlardan birkaç tanesidir. Füzyon etiketlerinin kullanımı, moleküler şaperonlarla koekspresyon, inklüzyon cisimciklerinden hedef proteinin geri kazanımı gibi yenilikçi çalışmalarla bunların üstesinden gelinebilmektedir. Mikro düzeyde çalışmalar olduğu için kimi zaman problemin kaynağını bulabilmek oldukça güç olabilmektedir (Rosano ve Ceccarelli, 2014).

DNA' nın homojen genel moleküler yapısı, çeşitli genlerin saflaştırılmasını ve işlenmesini basit ve genelleştirilebilir hale getirirken, kodladıkları proteinlerin farklı kimyasal doğası, her yeni hedef için benzersiz bir saflaştırma protokolünün geliştirilmesini gerektirmektedir. Protein saflaştırmasının verimini ve kolaylığını arttırmada vazgeçilmez bir araç, afinite etiketlerinin kullanılması olmuştur. Afinite etiketleri, ilgilenilen bir protein ile birlikte tek bir ürün (bir füzyon proteini) olarak ifade edilen yardımcı proteinler veya kısa polipeptitlerdir; afinite etiketi genellikle saflaştırmayı kolaylaştıran bazı özelliklere sahiptir. *E. coli*' de eksprese edilen proteinlerin düşük çözünürlüğü, yüksek ekspresyon ve saflaştırma verimleri için önemli bir sorun teşkil etmektedir. Bu özellik, *E. coli*' de tek başına ifade edildiğinde sadece az çözünür olmakla kalmayıp, aynı zamanda çözünmeyen formundan verimli bir şekilde geri kazanılmayan RI için geçerlidir. Bu nedenle, bu çalışmada insan RI ekspresyonu için bölünebilir bir *sfGFP* füzyon protein vektörü seçilmiştir.

RI, RNA' nın parçalanmasını katalize eden bir enzim olan ribonükleazları (RNazlar) spesifik olarak inhibe eden insan plasentasından izole edilen bir proteindir. Geniş bir RNaz spektrumuna sıkıca bağlanarak işlev görür ve RNA' yı korumak için güçlü RNaz inhibisyonunun gerekli olduğu her yerde çok faydalı olabilmektedir. RI, araştırma ve diğer amaçlar için büyük umut vaat eden bir proteindir.

Ökaryotik ribonükleaz inhibitörleri (RI), benzersiz yapısıyla ayırt edilen bir protein grubudur. Hidrofobik lösin açısından zengin, tekrar motiflerinden oluşurlar ve yüksek miktarda indirgenmiş sistein kalıntıları içermektedirler. Bu grubun üyelerinin yüksek agregasyon eğiliminden dolayı *E. coli* ve diğer rekombinant konaklarında üretilmesi zordur. Hızlıca biriken hedef proteinin katlanmasıyla başa çıkabilecek, SH gruplarının etkili stabilizasyonlarını kolaylaştıracak ve doğru disülfid bağlarını oluşturacak veya yeniden düzenleyecek bir katlama mekanizmasının yetersizliği sonucu hedef proteinin agregasyonu *E. coli*' de yaygın bir olgudur (Šiurkus ve Neubauer, 2011b).

Rekombinant proteinlerin üretimindeki en büyük problemlerden biri disülfür köprülerinin tesadüfi veya yanlış oluşumudur (Vicentini ve ark., 1990). *E. coli*' de aktif, çözünür RI ekspresyonunu artırabilen bir başka gizli silah, hedef proteinin uygun şekilde katlanmasına yardımcı olan şaperon proteinlerinin birlikte ekspresyonudur. Moleküler şaperonların, proteinlerin katlanması işleminde yer aldığı bilinmektedir ve in vivo protein katlanmasının mekanizmalarını açıklamak için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Protein katlama işlemi için şaperonların bir takım olarak işbirliği içinde çalıştığı bilinmektedir. Birçok çalışmada, genellikle inklüzyon cisimciği oluşumunun geleneksel yöntemlerle engellenemediği proteinlerde, şaperon takımıyla birlikte ekspresyonun, çözünebilir formda proteinlerin geri kazanımını arttırdığı bildirilmiştir (Gupta ve Shukla, 2016). Temelde DnaK-DnaJ-GrpE, trigger faktör (TF), ve GroEL-GroES şaperon protein sistemleri kullanılmaktadır. Bu şaperon proteinlerini ifadeleyen genleri içeren plazmitler ile ilgili vektörün koekspresyonu sağlanmıştır. Protein daha çözünür halde elde edilmiştir fakat saflaştırma basamağında kolona zayıf afinite göstermiştir.

Hedef protein çözünmeyen inklüzyon cisimcikleri olarak çökerse veya polihistidin afinite etiketini kapatan üçüncül bir yapıya sahipse doğal koşullar altında saflaştırma engellenebilmektedir. 6x-His takısının katlandıktan sonra proteinin üç boyutlu yapısının

içine gömülmesinin sonucu olarak rezine erişilebilirliği kısıtlanmış olabilir (Bornhorst and Falke, 2000).

Diğer yandan disülfür köprülerinin, özellikle heterolog ekspresyon sistemlerinde kimerik olarak üretilen rekombinant proteinlerin birbirleri arasında oluşması durumunda protein aktivitesini olumsuz etkilemesi veya saflaştırma sırasında özellikle afinite etiketlerinin kolon ile yeterince etkileşememesinden dolayı verim ve aktivite kayıplarına da yol açması sıklıkla karşılaşılan bir durumdur (Ulus, 2019).

Bu nedenle saflaştırmada kullanılan tampon çözelti bileşenleri ve miktarları değiştirilerek optimizasyon işlemleri gerçekleştirilmeye çalışılmıştır (indirgeyici ajan olarak DTT, beta β -ME ilavesi, NaCl miktarı ve yıkama çözeltilerindeki imidazol miktarının artırılması vb.). Daha sonra refolding yöntemi kullanılarak proteinin yeniden katlanma işlemi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Aktivite gösterdiği yapılan deneylerle belirlenmiştir. Şekil 4.12' de gösterildiği gibi, RNA, RNaz inhibitörünün yokluğunda büyük ölçüde degrade olmuştur. RI' nın RNaz A' nın aktivitesini inhibe ettiği anlaşılmıştır. RNaz A miktarı arttırıldığında inhibisyonda azalma gözlemlenmiştir.

Elde edilen bu bulgular ışığında ileride rekombinant RI' nın ifadesini ve saflaştırılmasını kolaylaştıran optimizasyon çalışmaları yapılarak daha yüksek verimde aktif RI elde etmek mümkün görünmektedir.

Doğal proteinin amino asit analizi molekül başına 32 sistein gösterdiğinden, RI proteini bir dizi disülfid bağlantısına sahip olabilir. Bu bağlar sitoplazmanın indirgeyici ortamında doğru şekilde oluşmayabilir. Bu nedenle, proteini, daha oksitleyici koşullar altında doğru disülfid bağı oluşumunun gerçekleşebileceği bakteriyel periplazmik boşluğa salgılamaya yönlendirilebilir.

Disülfid bağlarının çoğu, proteinlerin tersiyer yapılarının oluşturulması ile ilgilidir. Doğal bir proteinde bulunan disülfid bağının ortadan kaldırılması veya yeni sisteinler ile yeni disülfid bağlarının teşekkülü yapıya bağlı olarak fonksiyonu etkileyebilmektedir. Bu husus göz önünde bulundurularak bazı çalışmalarda RI' daki sistein setlerinin konservatif olarak diğer amino asitlerle değiştirildiği RI varyantları oluşturulmuştur (Uebersohn, 2013).

Çeşitli RI varyant tasarımları ile yapı ve aktivite korunabilir, oksidatif duyarlılık azaltılabilir. Böylelikle daha kararlı bir ribonükleaz inhibitörü elde edilebilir ve istenmeyen ribonükleazların aktivitesinin engellenmesi daha muhtemel olabilir. Daha küçük ve daha verimli olabilecek yeni füzyon ortakları taranması ile RI' nın çözünürlüğü de arttırılabilir (Guo ve ark., 2011).

Šiurkus ve Neubauer (2011b), RNA polimeraz ekspresyon sisteminde *E. coli'* de aktif ökaryotik RI' nın yüksek düzeyde üretimi için (i) bir indirgeyici ajanın eklenmesi, (ii) düşük üretim sıcaklığı, (iii) oksijen sınırlaması ve (iv) şaperonlar ile ekspresyonu gerektiğini öne sürmüşlerdir.

Doğal ribonükleazların bolluğu ve çeşitliliği, inhibitör tasarımına ve keşfine sürekli artan bir ilgiye yol açmıştır. RNA içeren preparatlarla yapılan manipölasyonlarda RNaz aktivitesini bloke etmek için etkili sentetik veya doğal RNaz inhibitörleri, yoğun bir şekilde çalışılmaya devam etmektedir (Yakovlev ve ark., 2007).

Pandemi süreciyle birlikte tıbbi tanı kitlerinin bileşeni olan diğer yandan hastalardan alınan sürüntü örneklerinin korunması amacıyla sıklıkla kullanılan RI, birçok firmanın en çok satılan ürünü haline gelmiştir. Ülkemizde henüz üretimi olmayan bu proteinin eldesi için bazı optimizasyon çalışmalarına ihtiyaç vardır.

Bir proteinin in vitro olarak başarılı bir şekilde incelenmesi iki ana adımı gerektirir: üretimi ve saflaştırılması. Bu adımlar ileri teknolojilerle desteklendiğinde başarı kaçınılmaz olacaktır. Rekombinant RI ile ilgili ileride yapılacak çalışmalara kaynak olabilecek bu tez de gerekli iyileştirmeler yapıldığında ülke ekonomisine katkı sağlayabilecektir.

6. KAYNAKÇA

- Anonim, 2021a, https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ae/RNA_structure_%28full%29.png (1.8.21).
- Anonim, 2021b, PCR Biosystems launches RiboShield™ RNase Inhibitor to ensure reliable RNA protection, <https://pcrbio.com/row/news/pcr-biosystems-launches-riboshield-rnase-inhibitor/> (1.8.21).
- Abtin, A., Eckhart, L., Mildner, M., Ghannadan, M., Harder, J., Schröder, J. M., Tschachler, E., 2009. Degradation by stratum corneum proteases prevents endogenous RNase inhibitor from blocking antimicrobial activities of RNase 5 and RNase 7. *J. Invest. Dermatol.*, 129 (3), 2193–2201.
- Ahmad, I., Nawaz, N., Darwesh, N. M., ur Rahman, S., Mustafa, M. Z., Khan, S. B., Patching, S. G., 2018. Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.*, 144 (3), 12–18.
- Albers, S. V., Jonuscheit, M., Dinkelaker, S., Urich, T., Kletzin, A., Tampé, R., Driessen, A.J.M., Schleper, C., 2006. Production of recombinant and tagged proteins in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72 (3), 102–111.
- Aravind, L. and Koonin, E. V., 2001. A natural classification of ribonucleases. *Methods Enzymol.*, 341 (3), 3–28.
- Arnold, U., 2014. Stability and folding of amphibian ribonuclease A superfamily members in comparison with mammalian homologues. *FEBS J.*, 281 (3), 3559–3575.
- Arnold, U., Leich, F., Neumann, P., Lilie, H., Ulbrich-Hofmann, R., 2011. Crystal structure of RNase A tandem enzymes and their interaction with the cytosolic ribonuclease inhibitor. *FEBS J.*, 278 (3), 331–340.
- Arraiano, C. M., Andrade, J. M., Domingues, S., Guinote, I. B., Malecki, M., Matos, R. G., Moreira, R.N., Pobre, V., Reis, F. P., Saramago, M., Silva, I. J., Viegas, S. C., 2010. The critical role of RNA processing and degradation in the control of gene expression. *FEMS Microbiol. Rev.*, 34 (3), 883–923.
- Arraiano, C. M., Mauxion, F., Viegas, S. C., Matos, R. G., Séraphin, B., 2013. Intracellular ribonucleases involved in transcript processing and decay: Precision tools for RNA. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.*, 1829 (3), 491–513.
- Aryani, A. and Denecke, B., 2015. In vitro application of ribonucleases: Comparison of the effects on mRNA and miRNA stability. *BMC Res. Notes*, 8 (3), 1–9.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Struhl, K., 2003. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, New York, USA.
- Azghandi, M. V., Nassiri, M., Kayser, V., Javadmanesh, A., Ghovvati, S., 2020. A novel immuno-RNase based on engineered RNase a variants for targeted cancer therapy. *Res. Sq.*, 1–22.
- Bafna, K., Narayanan, C., Chakra Chennubhotla, S., Doucet, N., Agarwal, P.K., 2019. Nucleotide substrate binding characterization in human pancreatic-type ribonucleases. *PLoS One*, 14 (3), 1–25.
- Barboza, J. J., Chambergomichilot, D., Velasquez-sotomayor, M., Silva-Rengifo, C., Diaz-Arocutipa, C., Caballero-Alvarado, J., Garcia-Solorzano, F.O., Alarcon-Ruiz, C.A., Albitres-Flores, L., Malaga, G., Schlagenhaut, P., Rodriguez-Morales, A.J., 2020. Assessment and management of asymptomatic COVID-19 infection: A systematic review. *Travel Med. Infect. Dis.*, 41 (3), 102058.
- Bechhofer, D. H. and Deutscher, M. P., 2019. Bacterial ribonucleases and their roles in

- RNA metabolism. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 54 (3), 242–300.
- Beeram, E., 2019. RNases and their role in Cancer. *Korean J. Food Heal. Converg.*, 5 (3), 27–34.
- Blázquez, M., Fominaya, J. M., Hofsteenge, J., 1996. Oxidation of sulfhydryl groups of ribonuclease inhibitor in epithelial cells is sufficient for its intracellular degradation. *J. Biol. Chem.*, 271 (3), 18638–18642.
- Blumberg, D. D., 1987. Creating a Ribonuclease-Free Environment. *Methods Enzymol.*, 152 (3), 20–24.
- Bonnin, R. A. and Boulloc, P., 2015. RNA degradation in staphylococcus aureus: Diversity of ribonucleases and their impact. *Int. J. Genomics*, 2015 (3), 12.
- Bornhorst, J. A. and Falke, J. J., 2000. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods Enzymol.*, 326 (3), 245–254.
- Bregestovski, P. D., 2015. “RNA World”, a highly improbable scenario of the origin and early evolution of life on earth. *J. Evol. Biochem. Phys.*, 51 (3), 72–84.
- Brown, T. A., 2010. Gene cloning and DNA analysis: An introduction. Wiley-Blackwell, 336 p, USA.
- Bukasov, R., Dossym, D., Filchakova, O., 2021. Detection of RNA viruses from influenza and HIV to Ebola and SARS-CoV-2: a review. *Anal. Methods*, 13 (3), 34–55.
- Burrell, M. M., 1993. RNase A (EC 3.1.27.5). *Methods in Molecular Biology*. 16, 263–270.
- Canestrari, E. and Paroo, Z., 2018. Ribonucleases as Drug Targets. *Trends Pharmacol. Sci.*, 39 (3), 855–866.
- Castro, J., Ribó, M., Vilanova, M., Benito, A., 2021. Strengths and challenges of secretory ribonucleases as antitumor agents. *Pharmaceutics*, 13 (3), 82.
- Chakraborty, K., Dasgupta, S., Pathak, T., 2015. Carboxylated acyclonucleosides: Synthesis and RNase A inhibition. *Molecules*, 20 (3), 5924–5941.
- Chen, C. Z. and Shapiro, R., 1997. Site-specific mutagenesis reveals differences in the structural bases for tight binding of RNase inhibitor to angiogenin and RNase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 (3), 1761–1766.
- Cho, S., Beintema, J.J., Zhang, J., 2005. The ribonuclease A superfamily of mammals and birds: Identifying new members and tracing evolutionary histories. *Genomics*, 85 (3), 208–220.
- Clouet-D’Orval, B., Batista, M., Bouvier, M., Quentin, Y., Fichant, G., Marchfelder, A., Maier, L.K., 2018. Insights into RNA-processing pathways and associated RNA-degrading enzymes in Archaea. *FEMS Microbiol. Rev.*, 42 (3), 579–613.
- Cobb, M., 2017. 60 years ago, Francis Crick changed the logic of biology. *PLoS Biol.*, 15 (3), 1–8.
- Coffin, J. M. and Fan, H., 2016. The Discovery of Reverse Transcriptase. *Annu. Rev. Virol.*, 3 (3), 29–51.
- Crawford, S. E., Ramani, S., Tate, J. E., Parashar, U.D., Svensson, L., Hagbom, M., Franco, M. A., Greenberg, H.B., O’Ryan, M., Kang, G., Desselberger, U., Estes, M. K., 2017. Rotavirus infection. *Nat. Rev. Dis. Prim.*, 3 (3), 17083.
- Crick, F., 1970. Central Dogma of Molecular Biology. *Nature*, 227 (3), 561–563.
- Cuchillo, C. M., Nogués, M.V., Raines, R. T., 2011. Bovine pancreatic ribonuclease: fifty years of the first enzymatic reaction mechanism. *Bone*, 50 (3), 7835–7841.
- Da-wei, F., Ying-ying, S., Wei, X., 2019. Efficient Heterologous Expression, Purification and Activity Analysis of Fusion Protein NusA-hRI. *China*

- Biotechnology, 39 (3), 21–28.
- Dang, W., Luo, R., Fan, J., Long, Y., Tong, C., Xiao, F., Xiong, X., Liu, B., 2020. RNase A activity analysis and imaging using label-free DNA-templated silver nanoclusters. *Talanta*, 209 (3), 120512.
- Das, A., Dasgupta, S., Pathak, T., 2020. Design of configuration-restricted triazolylated β -d-ribofuranosides: A unique family of crescent-shaped RNase A inhibitors. *Org. Biomol. Chem.*, 18 (3), 6340–6356.
- Deans, T. L., 2014. Parallel networks: Synthetic biology and artificial intelligence. *ACM J. Emerg. Technol. Comput. Syst.*, 11 (3), 21.
- Demain, A. L. and Vaishnav, P., 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol. Adv.*, 27 (3), 297–306.
- Deutscher, M. P., 2015. Twenty years of bacterial RNases and RNA processing: How we've matured. *RNA*, 21 (3), 597–600.
- Dickson, K. A., 2006. Effect of the ribonuclease inhibitor on the biological activity of pancreatic-type ribonucleases (PhD Thesis). University of Wisconsin - Madison, Biochemistry.
- Dickson, K. A., Haigis, M. C., Raines, R. T., 2005. Ribonuclease Inhibitor: Structure and Function. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 80 (3), 349–374.
- Dickson, K. A., Raines, R. T., 2009. Silencing an Inhibitor Unleashes a Cytotoxic Enzyme. *Biochemistry*, 48 (3), 5051–5053.
- Dyer, K. D., Rosenberg, H. F., 2006. The RNase a superfamily: Generation of diversity and innate host defense. *Mol. Divers.*, 10 (3), 585–597.
- Earl, C. C., Smith, M. T., Lease, R. A., Bundy, B. C., 2018. Polyvinylsulfonic acid: A low-cost rnase inhibitor for enhanced RNA preservation and cell-free protein translation. *Bioengineered*, 9 (3), 90–97.
- Economopoulou, M. A. I., Fragoulis, E. G., Sideris, D. C., 2007. Molecular cloning and characterization of the human RNase κ , an ortholog of Cc RNase. *Nucleic Acids Res.*, 35 (3), 6389–6398.
- Eun, H.-M., 1996. Nucleases. *Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology*. Ed: Eun, H.-M. Academic Press, London, UK, 145–232.
- Farkas, D. H. and Holland, C. A., 2009. Overview of Molecular Diagnostic Techniques and Instrumentation, First Edit. ed, Cell and Tissue Based Molecular Pathology. Elsevier Inc.
- Farrell, R. E. J., 2017. RNA methodologies: a laboratory guide for isolation and characterization, 5th ed. Academic Press, 855 p, San Diego, USA.
- Fisher, B. M., Grilley, J. E., Raines, R.T., 1998. A new remote subsite in ribonuclease A. *J. Biol. Chem.*, 273 (3), 34134–34138.
- Fohrer, J., Hennig, M., Carlomagno, T., 2006. Influence of the 2'-hydroxyl group conformation on the stability of A-form helices in RNA. *J. Mol. Biol.*, 356 (3), 280–287.
- Fominaya, J. M., Garcia-Segura, J. M., Gavilanes, J. G., 1988. Ribonuclease-RNAase inhibitor complex from rat testis. Purification of the RNAase inhibitor 954 (3), 216–223.
- Ganser, L. R., Kelly, M. L., Herschlag, D., Al-Hashimi, H. M., 2019. The roles of structural dynamics in the cellular functions of RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 20 (3), 474–489.
- Gao, R., Yu, J., Zhang, M., Tarn, T., Li, J., 2009. A Mathematical Formulation of the Central Dogma of Molecular Biology, *Nanomedicine*. Ed: Zhang, M., Xi, N. Pan

- Stanford, USA, 81–116.
- Gaur, D., Swaminathan, S., Batra, J. K., 2001. Interaction of human pancreatic ribonuclease with human ribonuclease inhibitor: Generation of inhibitor-resistant cytotoxic variants. *J. Biol. Chem.*, 276 (3), 24978–24984.
- GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden 2007, Rapid and efficient purification and refolding of a (histidine) 6-tagged recombinant protein produced in *E. coli* as inclusion bodies; Application note 18-1134-37 <https://cdn.cytivalifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=16306> 24/07/2021
- Gillings, M. R., Westoby, M., 2014. DNA technology and evolution of the Central Dogma. *Trends Ecol. Evol.*, 29 (3), 1–2.
- Gómez-Márquez, J., 2020. What are the principles that govern life? *Commun. Integr. Biol.*, 13 (3), 97–107.
- Graur, D., 2018. “The Fallacious Commingling of Two Unrelated Hypotheses: ‘The Central Dogma’ and ‘DNA Makes RNA Makes Protein.’” *JudgeStarling*. <http://judgestarling.tumblr.com/post/177554581856/the-fallacious-commingling-of-two-unrelated>
- Green, M. R. and Sambrook, J., 2019. How to Win the Battle with RNase. *Cold Spring Harb. protoc.*, 2020 (3), 95–98.
- Grote, A., Hiller, K., Scheer, M., Münch, R., Nörtemann, B., Hempel, D. C., Jahn, D., 2005. JCat: A novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. *Nucleic Acids Res.*, 33 (3), W526–531.
- Guillet, V., Laphorn, A., Hartley, R., Mauguén, Y., 1993. Recognition between a bacterial ribonuclease, barnase, and its natural inhibitor, barstar. *Structure*, 1 (3), 165–176.
- Guo, W., Cao, L., Jia, Z., Wu, G., Li, T., Lu, F., Lu, Z., 2011. High level soluble production of functional ribonuclease inhibitor in *Escherichia coli* by fusing it to soluble partners. *Protein Expr. Purif.*, 77 (3), 185–192.
- Gupta, S. K., Haigh, B.J., Griffin, F.J., Wheeler, T.T., 2013. The mammalian secreted RNases: Mechanisms of action in host defence. *Innate Immun.*, 19 (3), 86–97.
- Gupta, S. K. and Shukla, P., 2016. Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications. *Critical reviews in biotechnology*, 36(6), 1089–1098.
- Haigis, M. C., Kurten, E. L., Abel, R. L., Raines, R. T., 2002. KFERQ sequence in ribonuclease A-mediated cytotoxicity. *J. Biol. Chem.*, 277 (3), 11576–11581.
- Haigis, M. C., Kurten, E. L., Raines, R. T., 2003. Ribonuclease inhibitor as an intracellular sentry. *Nucleic Acids Res.*, 31 (3), 1024–1032.
- Hoang, T. T., Tanrikulu, I. Ç., Vatland, Q. A., Hoang, T. M., Raines, R. T., 2018. A human ribonuclease variant and ERK-pathway inhibitors exhibit highly synergistic toxicity for cancer cells. *Mol. Cancer Ther.*, 17 (3), 2622–2632.
- Hofsteenge, J., 1997. Ribonuclease Inhibitor, in: D’Alessio, G., Riordan, J.F. (Eds.), *Ribonucleases: Structures and Functions*. Academic Press, New York, pp. 621–658.
- Hofsteenge, J., 1994. “Holy” proteins I: ribonuclease inhibitor. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 4 (3), 807–809.
- Houseley, J. and Tollervey, D., 2009. The Many Pathways of RNA Degradation. *Cell*, 136 (3), 763–776.
- Huysmans, H., De Temmerman, J., Zhong, Z., Mc Cafferty, S., Combes, F.,

- Haesebrouck, F., Sanders, N.N., 2019. Improving the Repeatability and Efficacy of Intradermal Electroporated Self-Replicating mRNA. *Mol. Ther. Acids*, 17 (3), 388–395.
- Ilinskaya, O. N. and Mahmud, R. S., 2014. Ribonucleases as antiviral agents. *Mol. Biol.*, 48 (3), 615–623.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H., 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96 (1), 23–28.
- İncir, İ., 2020. Floresan protein temelli fret biyosensörünün üretilmesi ve geliştirilmesi (Yüksek Lisans). Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji A.B.D., Tokat.
- Iyer, S., Holloway, D. E., Kumar, K., Shapiro, R., Acharya, K. R., 2005. Molecular recognition of human eosinophil-derived neurotoxin (RNase 2) by placental ribonuclease inhibitor. *J. Mol. Biol.*, 347 (3), 637–655.
- Jalali, M., Zaborowska, J., Jalali, M., 2017. The Polymerase Chain Reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Ed: Jalali, M., Saldanha, F., Jalali, M. Academic Press, London, UK, 1–18.
- Johnson, R. J., McCoy, J. G., Bingman, C. A., Philips Jr., G. N., Raines, R. T., 2007. Inhibition of Human Pancreatic Ribonuclease by the Human Ribonuclease Inhibitor Protein. *J. Mol. Biol.*, 368 (3), 434–449.
- Kaur, J., Kumar, A., Kaur, J., 2018. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *Int. J. Biol. Macromol.*, 106 (3), 803–822.
- Kevadiya, B. D., Machhi, J., Herskovitz, J., Oleynikov, M. D., Blomberg, W. R., Bajwa, N., Soni, D., Das, S., Hasan, M., Patel, M., Senan, A. M., Gorantla, S., McMillan, J. E., Edagwa, B., Eisenberg, R., Gurumurthy, C. B., Reid, S. P. M., Punyadeera, C., Chang, L., Gendelman, H. E., 2021. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. *Nat. Mater.*, 20 (3), 593–605.
- Kim, B. M., Schultz, L. W., Raines, R. T., 1999. Variants of ribonuclease inhibitor that resist oxidation. *Protein Sci.*, 8 (3), 430–434.
- Klink, T. A., Woycechowsky, K. J., Taylor, K. M., Raines, R. T., 2000. Contribution of disulfide bonds to the conformational stability and catalytic activity of ribonuclease A. *Eur. J. Biochem.*, 267 (3), 566–572.
- Kobe, B. and Deisenhofer, J., 1996. Mechanism of ribonuclease inhibition by ribonuclease inhibitor protein based on the crystal structure of its complex with ribonuclease A. *J. Mol. Biol.*, 264 (3), 1028–1043.
- Kobe, B., 2001. Crystallization and crystal structure determination of ribonuclease A-ribonuclease inhibitor protein complex. *Methods Mol. Biol.* 160, 201–211.
- Koczera, P., Martin, L., Marx, G., Schuerholz, T., 2016. The ribonuclease a superfamily in humans: Canonical RNases as the buttress of innate immunity. *Int. J. Mol. Sci.*, 17 (3).
- Kosuge, T., Isemura, M., Takahashi, Y., Odani, Sumiko, Odani, Shoji, 2003. Ribonuclease inhibitors in *malus x domestica* (Common Apple): Isolation and partial characterization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67 (3), 698–703.
- Kövér, K. E., Bruix, M., Santoro, J., Batta, G., Laurents, D. V., Rico, M., 2008. The solution structure and dynamics of human pancreatic ribonuclease determined by nmr spectroscopy provide insight into its remarkable biological activities and inhibition. *J. Mol. Biol.*, 379 (3), 953–965.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head

- of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680-685.
- Lanier, K. A., Petrov, A.S., Williams, L.D., 2017. The Central Symbiosis of Molecular Biology: Molecules in Mutualism. *J. Mol. Evol.*, 85 (3), 8–13.
- Lee, F. S. and Vallee, B. L., 1989. Expression of human placental ribonuclease inhibitor in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 160 (3), 115–120.
- Lee, J., Lee, M., Lee, K., 2021. Trans-acting regulators of ribonuclease activity. *J. Microbiol.*, 59 (3), 341–359.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M., 2000. *Lehninger principles of biochemistry*Worth Publishers, 1119 p, New York, USA.
- Leland, P. A. and Raines, R.T., 2001. Cancer chemotherapy - Ribonucleases to the rescue. *Chem. Biol.*, 8 (3), 405–413.
- Leland, P. A., Schultz, L. W., Kim, B. M., Raines, R. T., 1998. Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 95 (3), 10407–10412.
- Leonidas, D. D., Shapiro, R., Irons, L. I., Russo, N., Acharya, K. R., 1999. Toward rational design of ribonuclease inhibitors: High-resolution crystal structure of a ribonuclease A complex with a potent 3',5'- pyrophosphate-linked dinucleotide inhibitor. *Biochemistry*, 38 (3), 10287–10297.
- Lewis, M. K. ve Shultz, J. W., 1998. Human recombinant placental ribonuclease inhibitor and method of production. Google Patents EP 0 422 217 B1.
- Liu, T., 2006. *Physics and Bioinformatics of RNA* (PhD Thesis). Ohio State University.
- Lomax, J. E., 2014. *Ribonucleases and ribonuclease inhibitors : Structure, function and evolution* (PhD Thesis). University of Wisconsin–Madison, Cellular and Molecular Biology.
- Lomax, J. E., Bianchetti, C. M., Chang, A., Philips Jr., G. N., Fox, B. G., Raines, R. T., 2014. Functional Evolution of Ribonuclease Inhibitor: Insights from Birds and Reptiles. *J. Mol. Biol.*, 426 (3), 3041–3056.
- Lomax, J. E., Eller, C.H., Raines, R.T., 2017. Comparative functional analysis of ribonuclease 1 homologs: Molecular insights into evolving vertebrate physiology. *Biochem. J.*, 474 (3), 2219–2233.
- Lu, L., Li, J., Moussaoui, M., Boix, E., 2018. Immune modulation by human secreted RNases at the extracellular space. *Front. Immunol.*, 9 (3), 1012.
- Madigan, M. T. and Martinko, J. M., 2012. *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi, Çeviri Editörü, Çökmüş, C.*, 1058 s, Ankara, Türkiye.
- Machuca, M. A. and Roujeinikova, A., 2017. Method for efficient refolding and purification of chemoreceptor ligand binding domain. *J. Vis. Exp.*, 2017 (3), 1–9.
- Markiewicz, L., Drazkowska, K., Sikorski, P. J., 2021. Tricks and threats of RNA viruses—towards understanding the fate of viral RNA. *RNA Biol.*, 18 (3), 669–687.
- Martin, J., Hartl, F. U., 1993. Protein folding in the cell: molecular chaperones pave the way. *Structure*, 1 (3), 161–164.
- McCarthy, B. J. and Holland, J. J., 1965. Denatured DNA as a direct template for in vitro protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 54 (3), 880–886.
- Melissis, S. C., Papageorgiou, A. C., Labrou, N. E., Clonis, Y. D., 2010. Purification of M-MLVH-RT on a9-aminoethyladenine-(1,6-diamine-hexane)- triazine selected from a combinatorial library of dNTP-mimetic ligands. *J. Chromatogr. Sci.*, 48 (3), 496–502.
- Mierendorf, R. C., Morris, B. B., Hammer, B., Novy, R. E., 1998. Expression and Purification of Recombinant Proteins Using the pET System. *Methods Mol Med.*, 13 (3), 257–292.

- Miyamoto, T., Okano, S., Kasai, N., 2009. Irreversible thermoinactivation of ribonuclease-A by soft-hydrothermal processing. *Biotechnol. Prog.*, 25 (3), 1678–1685.
- Monti, D. M., Montesano Gesualdi, N., Matoušek, J., Esposito, F., D'Alessio, G., 2007. The cytosolic ribonuclease inhibitor contributes to intracellular redox homeostasis. *FEBS Lett.*, 581 (3), 930–934.
- Moussaoui, M., Guasch, A., Boix, E., Cuchillo, C. M., Nogués, M. V., 1996. The role of non-catalytic binding subsites in the endonuclease activity of bovine pancreatic ribonuclease A. *J. Biol. Chem.*, 271 (3), 4687–4692.
- Nam, H., Hwang, B. J., Choi, D. Y., Shin, S., Choi, M., 2020. Tobacco etch virus (TEV) protease with multiple mutations to improve solubility and reduce self-cleavage exhibits enhanced enzymatic activity. *FEBS Open Bio*, 10 (3), 619–626.
- Ni, J., Lin, H., Yang, W., Liao, Y., Wang, Q., Luo, F., Guo, L., Qiu, B., Lin, Z., 2019. Homogeneous Electrochemiluminescence Biosensor for the Detection of RNase A Activity and Its Inhibitor. *Anal. Chem.*, 91 (3), 14751–14756.
- Nichols, N. M. and Yue, D., 2008. Ribonucleases. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Ed: Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Struhl, K. Wiley, New York, USA, 1–8.
- Nicholson, A. W., 1999. Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiol. Rev.*, 23 (3), 371–390.
- Nora, L. C., Westmann, C. A., Martins-Santana, L., Alves, L. d. F., Monteiro, L. M. O., Guazzaroni, M. E., Silva-Rocha, R., 2019. The art of vector engineering: towards the construction of next-generation genetic tools. *Microb. Biotechnol.*, 12 (3), 125–147.
- Oroz, J. ve Laurents, D. V., 2019. RNA binding proteins: Diversity from microsurgeons to cowboys. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.*, 1862 (3), 194398.
- Park, J. H., Hwang, I. S., Kim, K. I., Lee, J. M., Park, Y. M., Park, C. H., Chung, I. S., 2008. Functional expression of recombinant human ribonuclease/angiogenin inhibitor in stably transformed *Drosophila melanogaster* S2 cells. *Cytotechnology*, 57 (3), 93–99.
- Parret, A., Besir, H., Meijers, R., 2016. Critical reflections on synthetic gene design for recombinant protein expression. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 38 (3), 155–162.
- Pasloske, B.L., 2001. Ribonuclease inhibitors. *Methods in Molecular Biology*, 160, 105–111.
- Pasloske, B. L. and Wu, W., 2004. Method and reagents for inactivating ribonucleases RNase A, RNase I and RNase T1. Google Patents US 6777210 B1.
- Pingoud, A. and Meiss, G., 2005. Ribonucleases. *Encycl. Life Sci.*, 1–11.
- Poltronieri, P., Sun, B., Mallardo, M., 2015. RNA Viruses: RNA Roles in Pathogenesis, Coreplication and Viral Load. *Curr. Genomics*, 16 (3), 327–335.
- Polydoridis, S., Leonidas, D. D., Oikonomakos, N. G., Archontis, G., 2007. Recognition of ribonuclease A by 3'-5'-pyrophosphate-linked dinucleotide inhibitors: A molecular dynamics/continuum electrostatics analysis. *Biophys. J.*, 92 (3), 1659–1672.
- Probst, J., Brechtel, S., Scheel, B., Herr, I., Jung, G., Rammensee, H. G., Pascolo, S., 2006. Characterization of the ribonuclease activity on the skin surface. *Genet. Vaccines Ther.*, 4 (3), 1–9.
- Qian, J., Boswell, S. A., Chidley, C., Lu, Z. xi., Pettit, M. E., Gaudio, B. L., Fajnzylber, J. M., Ingram, R. T., Ward, R. H., Li, J. Z., Springer, M., 2020. An enhanced

- isothermal amplification assay for viral detection. *Nat. Commun.*, 11 (3), 5920.
- Rademacher, F., Dreyer, S., Kopfnagel, V., Gläser, R., Werfel, T., Harder, J., 2019. The Antimicrobial and Immunomodulatory Function of RNase 7 in Skin. *Front. Immunol.*, 10 (3), 2553.
- Rademacher, F., Simanski, M., Harder, J., 2016. RNase 7 in cutaneous defense. *Int. J. Mol. Sci.*, 17 (3), 560.
- Raines, R. T., 1998. Ribonuclease A. *Chem. Rev.*, 98 (3), 1045–1065.
- Rampersad, S. and Tennant, P., 2018. Replication and Expression Strategies of Viruses. *Viruses*, 55–82.
- Rapley, R., 2010. Recombinant DNA and genetic analysis., *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*, Sixth Edition. Ed: Wilson, K., Walker, J. Cambridge University Press, UK, 138–194.
- Ren, J., Karna, S., Lee, H., Yoo, S. M., Na, D., 2019. Artificial transformation methodologies for improving the efficiency of plasmid DNA transformation and simplifying its use. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 103 (3), 9205–9215.
- Ribó, M., Benito, A., Vilanova, M., 2011. Antitumor ribonucleases. *Nucleic Acids and Molecular Biology: Ribonucleases*. Ed: Nicholson, A. W. Springer, Berlin, Germany, 55–88.
- Rosano, G. L. and Ceccarelli, E. A., 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Front. Microbiol.*, 5 (3), 1–17.
- Rosano, G. L., Morales, E. S., Ceccarelli, E. A., 2019. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Sci.*, 28 (3), 1412–1422.
- Rosenberg, H. F., 2008. RNase A ribonucleases and host defense: an evolving story. *J. Leukoc. Biol.*, 83 (3), 1079–1087.
- Rutkoski, T. J., Kurten, E. L., Mitchell, J. C., Raines, R. T., 2005. Disruption of shape-complementarity markers to create cytotoxic variants of ribonuclease A. *J. Mol. Biol.*, 354 (3), 41–54.
- Sambrook, J., Russell, D. W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2100 p, USA.
- Santos, I. A., Grosche, V. R., Bergamini, F. R. G., Sabino-Silva, R., Jardim, A. C. G., 2020. Antivirals against coronaviruses: Candidate Drugs for SARS-CoV-2 Treatment? *Front. Microbiol.*, 11 (3), 1818.
- Shapiro, R., 2001. Cytoplasmic ribonuclease inhibitor. *Methods in Enzymology*, 341, 611–628.
- Shapiro, R., Vallee, B. L., 1991. Interaction of human placental ribonuclease with placental ribonuclease inhibitor. *Biochemistry*, 30 (3), 2246–2255.
- Shigematsu, M., Kawamura, T., Kirino, Y., 2018. Generation of 2',3'-Cyclic Phosphate-Containing RNAs as a Hidden Layer of the Transcriptome. *Front. Genet.*, 9 (3), 1–13.
- Singha, T. K., Gulati, P., Mohanty, A., Khasa, Y. P., Kapoor, R. K., Kumar, S., 2017. Efficient genetic approaches for improvement of plasmid based expression of recombinant protein in *Escherichia coli*: A review. *Process Biochem.*, 55 (3), 17–31.
- Singhvi, P., Saneja, A., Srichandan, S., Panda, A. K., 2020. Bacterial Inclusion Bodies: A Treasure Trove of Bioactive Proteins. *Trends Biotechnol.*, 38 (3), 474–486.
- Šiurkus, J. and Neubauer, P., 2011a. Reducing conditions are the key for efficient production of active ribonuclease inhibitor in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.*,

- 10 (3), 1–15.
- Šiurkus, J. and Neubauer, P., 2011b. Heterologous production of active ribonuclease inhibitor in *Escherichia coli* by redox state control and chaperonin coexpression. *Microb. Cell Fact.*, 10 (3), 1–11.
- Smith, B. D., 2006. Ribonuclease Activity: Basis and Control (PhD Thesis). University of Wisconsin - Madison, Biochemistry.
- Smith, B. D., Soellner, M.B., Raines, R.T., 2003. Potent inhibition of ribonuclease A by oligo(vinylsulfonic acid). *J. Biol. Chem.*, 278 (3), 20934–20938.
- Smith, M. D., Mehdizadeh, R., Olive, J. E., Collins, R. A., 2008. The ionic environment determines ribozyme cleavage rate by modulation of nucleobase pKa. *RNA*, 14 (3), 1942–1949.
- Solovyov, K. V., Polyakov, D. S., Grudinina, N. A., Egorov, V. V., Morozova, I. V., Aleynikova, T. D., Shavlovsky, M. M., 2011. Expression in *E. coli* and purification of the fibrillogenic fusion proteins ttr-sfgfp and β 2M-sfGFP. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 41 (3), 337–349.
- Sorrentino, S., 2010. The eight human “canonical” ribonucleases: Molecular diversity, catalytic properties, and special biological actions of the enzyme proteins. *FEBS Lett.*, 584 (3), 2194–2200.
- Structural Genomics Consortium, China Structural Genomics Consortium, Northeast Structural Genomics Consortium, Gräslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Hallberg, B. M., Bray, J., Gileadi, O., Knapp, S., Oppermann, U., Arrowsmith, C., Hui, R., Ming, J., d, K.C., 2008. Protein production and purification. *Nat. Methods*, 5 (3), 135–146.
- Tan, S. C. and Yiap, B. C., 2009. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2009 (3), 10.
- Taylor, C. H., 2014. Physiological Role and Substrates of Rnase D and RNase BN in *Escherichia coli* (PhD Thesis). University of Miami, Biochemistry and Molecular Biology.
- Thomas, S. P., Hoang, T. T., Ressler, V. T., Raines, R. T., 2018. Human angiogenin is a potent cytotoxin in the absence of ribonuclease inhibitor. *RNA*, 24 (3), 1018–1027.
- Tsirkone, V. G., Dossi, K., Drakou, C., Zographos, S. E., Kontou, M., Leonidas, D. D., 2009. Inhibitor design for ribonuclease a: The binding of two 5'-phosphate uridine analogues. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 65 (3), 671–677.
- Turcotte, R. F. and Raines, R. T., 2009. Interaction of onconase with the human ribonuclease inhibitor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 377 (3), 512–514.
- Uebersohn, A. W., 2013. Purification and characterization of oxidation-resistant ribonuclease inhibitor variants. Lawrence University Honors Projects. 40.
- Ulus, Y., 2019. *Escherichia coli* Ekspresyon Plazmiti pTolT ' nin Nokta Mutasyonu Yöntemiyle Moleküler Modifikasyonu. *Avrupa Bilim ve Teknol. Derg.*, 1–8.
- Varani, G., McClain, W. H., 2000. The G·U wobble base pair: A fundamental building block of RNA structure crucial to RNA function in diverse biological systems. *EMBO Rep.*, 1 (3), 18–23.
- Velema, W. A., Kool, E. T., 2020. The chemistry and applications of RNA 2'-OH acylation. *Nat. Rcrisreviews Chem.*, 4 (3), 22–37.
- Vicentini, A. M., Kieffer, B., Matthies, R., Hemmings, B. A., Stone, S. R., Hofsteenge, J., Kieffer, B., Meyhack, B., 1990. Protein chemical and kinetic characterization of

- recombinant porcine ribonuclease inhibitor expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, 29 (3), 8827–8834.
- Vranken, D. V. and Weiss, G., 2012. *Introduction to Bioorganic Chemistry and Chemical Biology*. Garland Science, New York.
- Wang, B., 2020. Pairing human skin RNases with alcohol to reduce coronavirus infection rate. *Open Access J. Biomed. Sci.*, 1 (3), 182–183.
- Wang, B., 2017. Human skin RNases offer dual protection against invading bacteria. *Front. Microbiol.*, 8 (3), 624.
- Wang, S. and Li, H., 2006. Radical scavenging activity of ribonuclease inhibitor from cow placenta. *Biochem.*, 71 (3), 520–524.
- Waugh, D. S., 2011. An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Expr. Purif.*, 80 (3), 283–293.
- Wu, X., Wu, D., Lu, Z., Chen, W., Hu, X., Ding, Y., 2009. A novel method for high-level production of TEV protease by superfolder GFP tag. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2009 (3).
- Wuchty, S., Fontana, W., Hofacker, I. L., Schuster, P., 1999. Complete suboptimal folding of RNA and the stability of secondary structures. *Biopolymers*, 49 (3), 145–165.
- Yakovlev, G. I., Mitkevich, V. A., Struminskaya, N. K., Varlamov, V. P., Makarov, A. A., 2007. Low molecular weight chitosan is an efficient inhibitor of ribonucleases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 357 (3), 584–588.