

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



KEMİKLİ BALIKLARDA RNA'YA BAĞLANAN
LARP6 PROTEİNLERİNİN
N-TERMINAL ALANININ KARAKTERİZASYONU

Hatice KÜLKÖYLÜOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TC
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KEMİKLİ BALIKLARDA RNA'YA BAĞLANAN
LARP6 PROTEİNLERİNİN
N-TERMINAL ALANININ KARAKTERİZASYONU

Hatice KÜLKÖYLÜOĞLU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SAMSUN
2018

Her hakkı saklıdır.

TEZ ONAYI

Hatice KÜLKÖYLÜOĞLU tarafından hazırlanan “Kemikli Balıklarda RNA'ya Bağlanan LARP6 Proteinlerinin N-terminal Alanının Karakterizasyonu” adlı tez çalışması .../.../20.. tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü BİYOLOJİ Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman **Prof. Dr.Arif GÖNÜLOL**
Biyoloji Anabilim Dalı

İkinci Danışman **Asst. Prof. Dr. Karen Adell LEWIS**
Texas State University
Chemistry and Biochemistry A.B.D.

Jüri Üyeleri:

Başkan Prof. Dr. Arif GÖNÜLOL imza.....
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Biyoloji Anabilim Dalı

Üye Doç. Dr. Elif Neyran SOYLU imza.....
Giresun Üniversitesi
Biyoloji Anabilim Dalı

Üye Doç. Dr. Emine DIRAMAN imza.....
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Biyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım..../.../2018
.....imza.....

Prof. Dr. Bahtiyar ÖZTÜRK
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

26/10/2018

Hatice KÜLKÖYLÜOĞLU

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KEMİKLİ BALIKLARDA RNA'YA BAĞLANAN LARP6 PROTEİNLERİNİN N-TERMINAL ALANININ KARAKTERİZASYONU

Hatice KÜLKÖYLÜOĞLU

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Arif GÖNÜLOL

İkinci Danışman: Asst. Prof. Dr. Karen Adell LEWIS

Balık ve insan proteinleri yapı ve fonksiyon bakımından oldukça benzer özellikler göstermektedir. Bu nedenle insan proteinlerinin kullanılmadığı biyokimyasal ve moleküler çalışmalarda balıklar kullanılabilir. Tüm La-ilişkili proteinler (LARP'lar), iki bağımsız olarak katlanan alandan oluşan "La Modül" olarak adlandırılan korunmuş bir RNA bağlanma alanını paylaşır. La Modül, La motif (LaMot) ve RNA Tanıma Motifi (RRM) alanlarından oluşur. Her bir LARP alt ailesi ek protein domaini (alanı) ve RNA ligand özellikleriyle ayırt edilir. Örneğin, LARP6 alt familyası, fonksiyonu bilinmeyen LaM ve S1 ilişkili Motif (LSA motifi) olarak adlandırılan korunmuş bir C-terminal motifi ile karakterize edilir. LARP6 alt familyasının biyolojik işlevi henüz tanımlanmamıştır. Bununla birlikte, La Modülünün dışındaki LARP6 alanlarının tam uzunluktaki protein yapısının RNA bağlanma aktivitesine katkıda bulunup bulunmadığı veya modüle edip etmediği belirsiz kalmıştır. Bu belirsizliğin anlaşılmasına katkıda bulunmak için üç türden (memeli *Homo sapiens* ve iki kemikli balık, *Xiphophorus maculatus* ve *Danio rerio*) N-terminal domain-LaModül LARP6 proteinlerinin yapısını ortaya çıkartmak için klonlama işlemi sonrası saflaştırma basamakları uygulanmıştır. N-terminal alanının (insan LARP6 numaralandırma şemasındaki 1-70 amino asitleri), RNA bağlanma aktivitesini modüle eden kararlı bir NTD-La Modül çoklu domain yapısını oluşturmak için La Modül (LaMod, 70-300 amino asitleri) ile etkileştiği hipotezi

varsayılmıştır. Bu hipotez doğruysa, LARP6 içinde moleküller arası etkileşimin ilk gösterimini temsil edecektir. Bu sonuç, hücreler içindeki LARP6'nın N-terminal domain La Modül yapısı ve işlevi için yeni bir model oluşturacaktır.

Çalışmamızın sonuçlarına göre (i) N-terminal domain ve LaModül'ün RNA'ya kararlı bir biçimde bağlandığı görülmüştür, (ii) bu bağlanma sırasında balıkların insan proteinlerine göre daha kararlı bir yapı ve fonksiyon gösterdiği bulunmuştur ve (iii) balık proteinlerinin gerçekten insan proteinleri yerine deneysel amaçlarla kullanılabilirdiği desteklenmiştir.

Ekim 2018, 69 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Xiphophorus maculatus*, *Danio rerio*, LARP6, Klonlama, Protein Saflaştırma, LaModül, RNA Bağlanma Aktivitesi

ABSTRACT

Master's Thesis

CHARACTERIZATION OF THE N-TERMINAL DOMAIN OF THE RNA-BINDING LARP6 PROTEINS FROM TELEOST FISH

Hatice KÜLKÖYLUOĞLU

Ondokuz Mayıs University

Institute of Science

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Arif GÖNÜLÖL

Co-Supervisor: Asst. Prof. Dr. Karen Adell LEWIS

Fish and human proteins are very similar in structure and function. For this reason, fish can be used in biochemical and molecular studies where human proteins are not used. All La-related proteins (LARPs) share a conserved RNA binding domain called the "La Module" consisting of two independently folded domains. La Module contains La motif (LaMot) and RNA Recognition Motif (RRM) domains. Each LARP subfamily is distinguished by additional protein domain and RNA ligand properties. For example, the LARP6 subfamily is characterized by a conserved C-terminal motif, termed the "LSA motif", whose function is unknown. The biological function of the LARP6 subfamily has not yet been identified. However, it remains unclear whether the full-length protein structure of the LARP6 domains outside the La module contributes to or modulates RNA binding activity. In order to contribute to the understanding of this ambiguity purification steps were carried out after cloning to reveal the structure of the N-terminal domain-LaModule LARP6 proteins from three species (mammalian *Homo sapiens* and two bony fish, *Xiphophorus maculatus* and *Danio rerio*). We assume the hypothesis that the N-terminal domain (1-70 amino acids in the human LARP6 numbering scheme) interacts with the La Modulus ("LaMod", amino acids 70-300) to generate a stable NTD-LaModule multiple domain structure modulating RNA binding activity. If this hypothesis is true, it will represent the first demonstration of intermolecular interaction in LARP6. This result will be a new model for the N-terminal domain LaModule structure and function of LARP6 in cells.

According to the results of our study, (i) the N-terminal domain and LaModule were found to bind to RNA in a stable manner, (ii) fish were found to have a more stable structure and function than human proteins during this binding, and (iii) it was supported that fish proteins could be used for experimental purposes instead of human proteins.

October 2018, 69 pages

Key Words: *Xiphophorus maculatus*, *Danio rerio*, LARP6, Cloning, Protein Purification, LaModule, RNA Binding Activity



ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmam boyunca her türlü yardım ve desteği esirgemeyen değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Arif GÖNÜLOL'a teşekkür ederim. Deney çalışmalarımnda her türlü fırsatı tanıyan, bilgi ve birikimlerini esirgemeyen, bana güvenen, beni sonuna kadar cesaretlendiren, çok değerli İkinci Danışman Hocam Asst. Prof. Dr. Karen Adell LEWIS'e sonsuz teşekkürü bir borç bilirim. Tez çalışmam boyunca her türlü fırsatı sağlayan Texas State Üniversitesine ve Asst. Prof. Dr. Karen Adell LEWIS' in laboratuvar ekibine (Eliana PENA, Melissa CARRIZALES, Chelsea TONER, Leticia GONZALEZ, José CASTRO, Eliseo SALAS, Samantha ZEPEDA, Corina FOSWTER, Jessica FOSTER, Courtney PETRILL, Charles SANDERS, Avery GUZMAN), deneylerimde, bilgi ve tecrübesiyle bana her zaman yardımcı olan laboratuvar arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Ayrıca, bu süreç boyunca samimi desteğini esirgemeyen sayın Dr. Rachell BOOTH ve Dr. Marilyn BANTA'ya teşekkür ederim.

Eğitim hayatıma tekrar dönmemi sonuna kadar destekleyen değerli ağabeyim Prof. Dr. Necati MENEK'e, Yüksek Lisans tez programım süresince yeterince vakit ayıramadığım canım çocuklarım Uras ve Poyraz'a ve başından sonuna kadar her türlü desteği esirgemeyen değerli eşim Prof. Dr. Okan KÜLKÖYLÜOĞLU' na sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışmam canım annem Feride MENEK ve canım babam Mustafa MENEK'e adanmıştır.

Bu tez çalışması Texas State Üniversitesi'nde (ABD) Dr. Karen Adell LEWIS'in Kimya ve Biyokimya laboratuvarından alınan destek ile gerçekleştirilmiştir.

Ekim 2018, Samsun

Hatice KÜLKÖYLÜOĞLU

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Balıklar Genetik Model Sistemleri Olarak Oldukça Kullanışlıdır.....	4
2.2. Balık Proteinleri Yapısal Biyolojik Sistemlerde Oldukça Kullanışlıdır...	5
2.3. Lupus Antijen İlişkili Proteinler (LARP) RNA Bağlayıcı Proteinlerdir.	7
2.4. RNA Bağlanma Proteinlerinin Moleküler Mekanizması.....	8
2.5. La-İlişkili Proteinler (LARP) Ailesi.....	9
2.6. La-İlişkili Protein 6 (LARP6).....	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1. Materyal	20
3.2. Yöntem	21
3.2.1 Klonlama.....	21
3.2.1.1. PCR yöntemi.....	21
3.2.1.2. Gen bölgelerinin çıkartılması.....	25
3.2.1.3. Ligasyon ve transformasyon.....	27
3.2.1.4. Ligasyon ve transformasyon işleminin doğrulanması.....	27
3.2.2. Protein ekspresyonu denemesi.....	29
3.2.3. Protein saflaştırılması.....	31
3.2.3.1. Geniş ölçekli protein ekspresyonu.....	31
3.2.3.2. Nikel affinite kromatografisi.....	31
3.2.3.3. Kütle ayırım kromatografisi.....	34
3.2.4. Sınırlı protealiz.....	34
3.2.5. Elektro mobilite değişim analizi (EMSA)	35
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	36
4.1. <i>Danio rerio</i> , <i>Xiphophorus maculatus</i> ve <i>Homo sapiens</i> Türlerine Ait Klonlama sonuçları.....	36

4.2. Büyüklük Ayrıştırma Kromatografisi.....	48
4.3. Sınırlı Protealiz.....	55
4.4. LARP6'nın Biyokimyasal Karakterizasyonu.....	58
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	61
KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ.....	69



SİMGELER VE KISALTMALAR

CTD	: C Uç Domaini
DM-15	: DM-15 Tekrarı İçeren Motif
dk	: Dakika
EMSA	: Elektroforez Hareketlilik Kayma Analizi
EB	: Elüsyon Tampon
FT	: Doğrudan akış
IPTG	: 0,1 M izopropil β -D-1-thiyogalactopyranoside
La	: Lupus Antijen
LaMot	: La Motif
LaMod	: La Modül
LARP	: Lupus Antijen İlgili Protein
LB	: Lizis tampon
LuB	: Luria Broth agar
<i>Hs</i> LARP6	: İnsan LARP6'sı
LSA Motif	: La ve S1 ilişkili Motif
LAM-RNA	: La Motif RNA
L	: Litre
M	: Markır
MWCO	: Moleküler Ağırlığa İndirgiyerek kesim İşlemi
mgL	: Miligram litre
NLS	: Nuklear Lokalizasyon Sinyali
NTD	: N- Terminal Alanı
P-TEFb	: Pozitif Transkripsiyon Uzama Faktörü b
PAM2w	: Poli (A) Bağlanma Protein Etkilişimi Motifi
RCD	: RNA Şaperon Domaini
RNA	: Ribonükleik Asit
rRNA	: Ribozomal RNA
tRNA	: Taşıyıcı RNA
snRNA	: Küçük Çekirdek RNA'ları
RNA pol III b	: RNA Polimeraz III b
RRM	: RNA Tanıma Motifi
RRM-L	: RNA Tanıma Benzeri Motifi
SL	: Asıl Kıvrım
SS-B	: Sjogren Sendromu Antijen B
SUMO	: Küçük Ubiquitin-benzeri Değiştirici
UUU	: Uridilat
3' UUU-OH	: 3' Uridilat-Hidroksil
5' UTR	: 5' Translasyonu Çevrilmemiş Alan
WB	: Yıkama Solüsyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Proteinin 4 farklı yapı (NHGRI 2018).....	6
Şekil 2.2	Toplam 11 türe ait RBP ailelerinin sayısı (Gerstberger vd, 2014).....	7
Şekil 2.3	La ilişkili protein ailesi	10
Şekil 2.4	Genel LARP protein modeli.....	10
Şekil 2.5	İnsan LARP proteinlerine ait La Modül (La Motif + RRM) domain yapısının sekans dizilimi.....	13
Şekil 2.6	LARP ailesinin domain yapıları ile birlikte şekilsel gösterimi.	14
Şekil 2.7	İnsanda kolajen $\alpha 1(I)$ mRNA yapısına ait 5'SL (stem-loop) sekansı (Cai vd, 2010).....	16
Şekil 2.8	LARP proteinlerinde La Modüldeki sekans ve yapı ayırımı.	18
Şekil 4.1	Band ekstraksiyonundan sonraki PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	37
Şekil 4.2.	Protein kodlama DNA'sı ve plazmid DNA'sını iki taraflı NdeI ve XhoI enzimleri kullanılarak yapılan kesme işlemi sonrası agaroz jelde yürütme işlemi.....	38
Şekil 4.3	(A) LARP6 proteini kodlayan bölge DNA'sı ve plazmid DNA'sı ile klonlama işlemi yapıldıktan sonra yapılan kontrol çalışması.....	39
Şekil 4.4	<i>Dr</i> LARP6a (1-290) proteinin Rosetta™ (DE3) pLysS kompedan hücresi kullanılarak yapılan ekspresyon çalışması.....	40
Şekil 4.5	<i>Hs</i> LARP6 (1-300) proteinin Rosetta™ (DE3) pLysS kompedan hücresi kullanılarak yapılan ekspresyon çalışması.....	41
Şekil 4.6	<i>Xm</i> LARP6 proteinin Rosetta™ (DE3) pLysS kompedan hücresi kullanılarak yapılan ekspresyon çalışması.....	42
Şekil 4.7	<i>Dr</i> LARP6A La Modül (60-290) proteinin Rosetta™ (DE3) pLysS kompedan hücresi kullanılarak yapılan ekspresyon çalışması.....	43
Şekil 4.8	<i>Hs</i> LARP6 (1-300) proteininin afinite kromatografi fraksiyonlarının görünümü.....	46
Şekil 4.9	<i>Xm</i> LARP6 (1-280) proteininin afinite kromatografi fraksiyonlarının görünümü.....	47
Şekil 4.10	<i>Dr</i> LARP6A (1-290) proteininin afinite kromatografi fraksiyonlarının görünümü.....	48
Şekil 4.11	<i>Hs</i> LARP6 NTD ve La Modül (1-300)' ün S200 büyüklüğe dayalı ayrıştırma kromatografisi.	49
Şekil 4.12	<i>Hs</i> LARP6 proteinine ait fraksiyonların SDS-PAGE görüntüsü.....	50
Şekil 4.13	<i>Xm</i> LARP6 NTD ve La Modül (1-280)' ün S200 büyüklük ayrıştırıcı kromatografisi.....	51
Şekil 4.14	<i>Xm</i> LARP6 proteinine ait fraksiyonların SDS-PAGE görüntüsü.....	52
Şekil 4.15	<i>Dr</i> LARP6A NTD ve La Modül (1-290)' ün S200 büyüklük ayrıştırıcı kromatografisi.....	53
Şekil 4.16	<i>Dr</i> LARP6 proteinine ait fraksiyonların SDS-PAGE görüntüsü.....	54
Şekil 4.17	<i>Hs</i> LARP6 (1-300) alanının sınırlı protealizi.....	56
Şekil 4.18	<i>Xm</i> LARP6 (1-280) alanının sınırlı protealizi.....	57
Şekil 4.19	<i>Dr</i> LARP6a (1-290) alanının sınırlı protealizi.....	58
Şekil 4.20	LARP6 proteinlerinin (<i>Xm</i> LARP6 (1-280), <i>Dr</i> LARP6a (1-290), <i>Hs</i> LARP6 (1-300)) insan kollajen <i>Hs</i> COL1A1 mRNA stem-loop ile bağlanma aktivitesini gösteren EMSA deney sonuçları.....	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1	PCR için kullanılan DNA oligonükleotid primerleri.....	22
Çizelge 2	PCR işleminde kullanılan yapılar, template DNA, forward primer, reverse primer ve baz çift sayısı.....	23
Çizelge 3	PCR işlem sırası ve kullanılan ısı değerleri.....	24
Çizelge 4	DNA seçili gen bölgesinin çıkarılmasında kullanılan miktarlar.....	26
Çizelge 5	Klonlama işlemi sonrası proteinlerin sekans sonuçları.....	28
Çizelge 6	Protein ekspresyonunda kullanılan protein yapısı, ekspresyon plazmid boyu, protein ürününün tahmini boyu, asidik aminoasit % miktarı ve protein ürününün tahmini pI miktarı.....	30
Çizelge 7	Pürifikasyon tampon listesi.	33
Çizelge 8	Protein konsantrasyon değerleri.....	35

1. GİRİŞ

Balıklar evrimsel süreçte memelilere göre çok daha eski bir zaman diliminde oluşmuşlardır. Ancak bu süreçte aralarında benzer birçok genetik ve morfolojik yapıyı da hala taşımaktadırlar. Kemikli balıklar neredeyse dünyanın her yerindeki sucul habitatlarda bulunmaktadır ve balıklara ait çeşitlilik, genomik adaptasyon, türleşme, morfolojik ve fizyolojik değişim ve davranış çeşitliliği araştırmalarında oldukça önemli avantajlar sunmaktadır. Bu benzerlik nedeniyle genetik modelleme çalışmalarında balık proteinlerinin kullanılması oldukça yararlı sonuçlar vermektedir. DNA'nın keşfiyle birlikte DNA'da var olan genetik bilgi transkripsiyon adı verilen işlem ile RNA'ya dönüşmekte ve oluşan RNA'daki bu bilgi ise translasyon işlemi adı verilen hücre içersindeki fonksiyon ile birlikte protein yapıları oluşmaktadır. DNA ve RNA molekül yapıları, hücre için hangi protein yapısının oluşmasını sağlayacak genetik bilgiyi taşımaktadır. Proteinler aminoasit olarak adlandırılan yapı taşlarının yanyana peptid bağı oluşturarak bir araya geldiği yapılardan oluşmaktadır. Protein yapı ve fonksiyonu da bu oluşumun meydana getirdiği üç boyutlu yapı tarafından belirlenmektedir. Proteinler daha sonra oluşturdukları bu yapı sayesinde birbirleriyle veya hücre içersindeki diğer makromoleküller ile etkileşime girerek hücre içersindeki fonksiyonlarını gerçekleştirmektedirler.

Lupus antijen (La) proteinleri ilk olarak otoimmün hastalarda antikorların hedef olarak bağlandığı protein yapıları olarak tanımlanmıştır ve daha sonra yapılan çalışmalarda bu proteinlerin ökaryotik hücrelerde yaygın bir şekilde var olduğu ortaya çıkmıştır (Maraia vd. 2017). Bu konuda yapılan çalışmalar La proteinlerinin hücre içersinde değişik yapı ve fonksiyonlara sahip olduğunu ortaya çıkartmıştır. Bu nedenle La ilişkili proteinler kısaca LARP olarak adlandırılmış ve temel olarak çeşitliliği LARP1, LARP4, LARP6 ve LARP7 olarak sınıflara ayrılmıştır. Başlangıçta LARP2, LARP3 ve LARP5 bu sınıflandırmada yer alırken daha sonra yapılan çalışmalar aslında bu yapıların sırasıyla LARP1b, asıl (genuine) La yapısı ve LARP4b olduğu kabul edilmiştir. Tüm LARP proteinlerinin ortak özelliği yapılarında La Modül (LaMod) domain yapılarını içerirler ki bu yapı da La Motif (LaMot) yapısı ve RNA Tanıma Motifi (RRM) yapılarının kısa bir bağlantı uzantısı ile bir araya gelerek oluşturduğu aminoasit dizilimlerinden oluşan oldukça benzer yapıları taşırlar.

İnsan LARP6 LaMot ve RRM'nin moleküler yapıları, NMR spektroskopisi ile çözülmüş ve RRM'nin ayrıntılı bir şekilde tanımlanmıştır. La-ilişkili protein süper ailesi ökaryotlarda gen ekspresyonunu transkripsiyon sonrası regüle etmek için çeşitli RNA ligandlarına bağlanır. Balık proteinlerinden elde edilmiş birçok protein yapısı bilinmektedir. Balık proteinlerinin insan proteinlerine yapı ve fonksiyon olarak benzerliği bulunduğu için insan proteinlerinin kullanılmadığı durumlarda balıklar üzerindeki deneyler kolaylıkla yapılabilir. Balık LARP6 proteinlerinin proteolitik olarak dirençli yapıları, daha önce tanımlanan La Modülleri kapsadığı gibi, tüm N-Terminal Alanını (NTD) da kapsamıştır. Bulunan bu sonuç, tez önerisinin temelini oluşturmaktadır. LARP6 proteinin, protein sentezinde transkripsiyonun son aşamasında düzenleyici (regülatör) rolü bulunmaktadır. Bununla birlikte, LARP6 aktivitesinin kontrol edildiği mekanizmalar bilinmemektedir.

Bu çalışmanın amacı NTD-LaMod yapısının RNA bağlanma aktivitesinde nasıl bir rol oynadığını ve bu iki yapının birbirini nasıl etkilediğini ortaya çıkarmaktır. Bu amaca uygun olmak üzere üç türden, memeli (*Homo sapiens* Linnaeus, 1758) ve iki kemikli balık, plati balığı [*Xiphophorus maculatus* (Günther, 1866)] ve zebra balığı [*Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822)] NTD-LaMod LARP6 proteinleri rekombinant olarak eksprese edilmiş ve *Escherichia coli* T. Escherich, 1885'den saflaştırılmıştır. LARP6'ya ait önceki çalışmalar tam uzunluktaki protein yapısını anlamaya ve RNA'ya bağlanma aktivitesini ortaya çıkarmak üzerine yoğunlaşmıştır. NTD-LaModül kısımlarına ait detaylı bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmamın temel hipotezi LARP6 proteinin RNA bağlanma aktivitesinin NTD tarafından düzenlendiği temeline dayanmaktadır. Bu hipotezi test etmek için, rekombinant yöntemlerle eksprese edilmiş sadece NTD ve LaMod içeren insan ve balık LARP6 proteinlerinin yeni formlarına ihtiyaç duyulmuştur. Bu işlem uygulanırken insan, *X. maculatus* ve *D. rerio* LARP6 proteinleri kullanılmıştır. Bu protein yapısının kararlı bir yapı olduğu ortaya çıkarabilmek adına saflaştırma işlemi yapılmış ve elde edilen protein yapılarına sınırlı protealiz (limited proteolysis) işlemi yöntemiyle proteinlerin kararlı yapısı doğrulanmaya çalışılmıştır. Son olarak saflaştırılan NTD-LaMod proteinlerinin RNA bağlanma aktivitelerini değerlendirmek amacıyla daha önceki çalışmalarda belirlenen (Castro vd, 2017) insan LARP6 için tanımlanan RNA ligandı olan kolajen tip I mRNA ligand yapısı kullanılmıştır. Bu çalışmayla saflaştırılan NTD-LaMod protein yapılarının biyokimyasal karakterizasyonu LARP6 proteinlerinde yapılan tam-uzunluk (full-

length) çalışmasıyla karşılaştırma yapılabilecek ve LARP6 proteinlerinde var olan domain yapılarının kararlılıklarını ortaya çıkmasına yardım edecek bir çalışma olacaktır.

Bu çalışmanın amaçlarından birisi de NTD' nin varlığı ile LARP6 proteinin kollajen Tip I mRNA SL yapısına bağlanabilme kabiliyeti arasındaki ilişkinin olup olmadığını ortaya çıkartmaktır. Eğer bu domainler arası bir etkileşim var ise bu çalışma bu alanda yapılmış bir model olma yönünde yapılmış ilk çalışma olacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Balıklar Genetik Model Sistemleri Olarak Oldukça Kullanılırlar

Kemikli balıklar neredeyse dünyanın her yerindeki sucul habitatlarda bulunmaktadır ve balıklara ait çeşitlilik, genomik adaptasyon, türleşme, morfolojik ve fizyolojik değişim ve davranış çeşitliliği araştırmalarında oldukça önemli avantajlar sunmaktadır. Kemikli balıklarda en yaygın tür teleost balıklardır ve bu balıklar taksonomik sıradaki biyoçeşitliliği, gen regülasyonu, morfolojik evrimi üzerine yapılan çalışmalarda oldukça özgün avantajlar sunarken aynı zamanda bu çalışmalar diğer balık sistemleri üzerine de uygulanabilir avantajları beraberinde getirmektedir (Nelson, 2006). Brasch vd (2015) balıklar üzerine yaptıkları çalışmada zebra balığı (*D. rerio*) ve medaka balığı [*Oryzias latipes* (Temminck ve Schlegel, 1846)] seçmelerinin nedenini, küçük genom büyüklüğü, hızlı bir şekilde genomik veriye ulaşabilmeleri ve düşük maliyet olarak açıklamışlardır. Bunun yanısıra balıklara ait poliploid yapı ve tekrarlayan elementler balık üzerine yapılan çalışmalarda dezavantaj olmuştur. Bazı balıklar örneğin plati balıkları (*X. maculatus*) ve medaka balıkları (*O. latipes*) gibi poliploid genomlara sahip olurken, bazıları ise değildir. Genellikle, geniş bir evrimsel süreç ve çeşitliliğe sahip olan ve omurgalı olarak bilinen kemikli balıklar biyomedikal genetik model organizma olarak kullanılmaktadır.

Zebra balığı üzerine çalışmalarda bulunan Spence vd (2008) bu balık hakkında şu güncel genel bilgileri vermektedir: Zebra balığı genetik, nörofizyoloji ve biyotip alanlarında kullanılan önemli bir model organizmadır. Doğal ekolojik ve davranış özellikleri hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Hindistanda az akıntılı, sığ iç sulara özgü bir balıktır. Çoğunlukla pirinç tarımı ile bağlantılı, sığ göletlerde ve durağan sucul habitatlarda görülürler. Buldukları yerde en bol balık türü arasında bulunurlar. Balığın bağırsak içeriği analizlerinden fitoplankton, filamentli algler ve vasküler bitki materyali, sporlar ve omurgasız yumurtaları, alüvit, kum, çamur olmak üzere, zooplankton ve böceklerle beslendikleri anlaşılmaktadır (Spence vd, 2008).

Zebra balığı çok sayıda üreme potansiyeli olan bir balıktır. Zebra balıklarının gelişimsel ve fizyolojik çalışmalarda kullanımı yaklaşık 1930'lu yıllara denk gelir. Bu alanda ilk çalışmaları Oppenheimer (1936) yapmıştır. Bunu takiben, bu balıkla ilgili olarak kısa sürede çok fazla yeni nesil balık elde edilebilir bilgisi ile beraber

yola çıkan Streisinger vd (1981) ilk kez bu balığı genetik çalışmalarda kullanmıştır. Bu araştırmacılar, genetik olarak aktif olmayan spermeler elde ederek, homozigot suşları üretebilmenin yolunu geliştirmişlerdir (Vascotto vd, 1997; Rinkwitz vd, 2011).

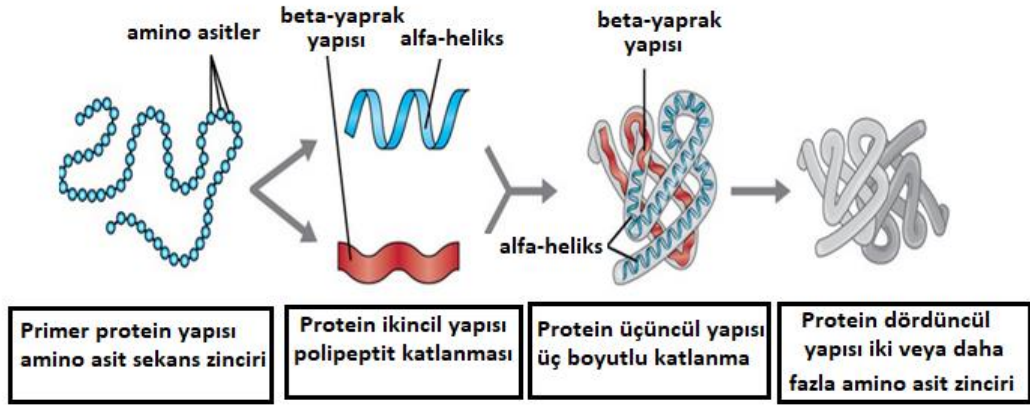
Bu alanda diğer bir kullanılan model balık ise plati balıktır. Bunlar özellikle melanom kanser çalışmalarında kullanılmaktadır. Bu aile grubundaki bireyler çaprazlama yapılarak elde edilen nesil yoğun pigmentli yavrular kanser belirtisi göstermiştir (Braasch vd, 2015).

Rodriguez'e (1997) göre *Xiphophorus* cinsi Atlantik okyanusu kıyılarından Meksika'nın kuzeyinden Honduras'a uzanan bir dağılım göstermektedir. Genel anlamda Orta Amerika kıyılarına özgü bir balıktır.

Zebra ve plati balıkları genomik seviyede referans model olarak kullanılabilir, tanımlanabilir ve kullanılabilir embriyolojik gelişim basamaklarına sahip aynı zamanda transgenik ve genom ayarlama özelliğine sahip olarak tanımlanmıştır (Schartl, 2014).

2.2. Balık Proteinleri Yapısal Biyolojik Sistemlerde Oldukça Kullanışlıdır

Balıklar hem protein hemde genetik seviyedeki çalışmalarda model sistemler olarak kullanılabilir. Uluslararası veri bankasında (www.rcsb.org/pdb), balık proteinlerinden elde edilmiş yaklaşık 300 protein yapısı verisi bulunmaktadır. Balık proteinlerinin insan proteinlerine yapı ve fonksiyon olarak benzerliği bulunduğu için insan proteinlerinin kullanılmadığı durumlarda balıklar üzerindeki deneyler kolaylıkla yapılabilir. Laboratuvar ortamında yapılacak balık proteinleri üzerindeki çalışmalar ise genetik modellerin çıkartılmasında önemli katkılarda bulunur. Biyolojik bilgi DNA'dan RNA'ya daha sonra proteine aktarılır. Buna da biyolojide "biyolojinin temel dogmatik yaklaşımı" denir. Proteinler biyolojinin çalışma alanlarından bir tanesidir. Bir insan hücresinde yaklaşık 18.000 farklı çeşit protein molekülü vardır (Bahar vd, 2017). Protein linear bir sekanstır (Şekil 2.1) ve monomer olarak adlandırılan yapıların tekrarlı bir şekilde yan yana gelerek oluşturduğu polimer bir moleküldür. Monomerler azot ve karbonil karbonlar arasında olan kimyasal bağlar aracılığı ile birbirlerine bağlanırlar ve buna peptid bağları denir. Bu nedenle bu moleküllere polipeptid denir.



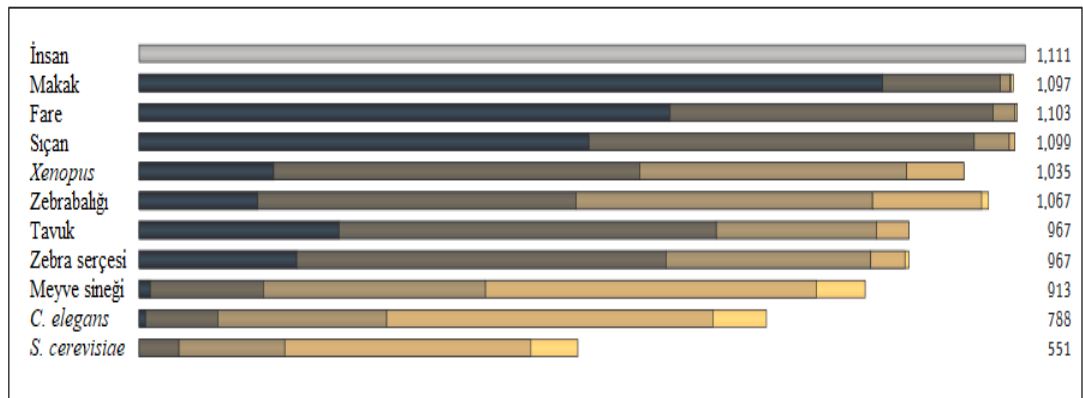
Şekil 2.1. Proteinin 4 farklı yapısı (NHGRI, 2018).

Proteinlerin temel birimine aminoasit ya da diğer bir deyişle “rezidu” denir. Bilinen 20 adet farklı aminoasit vardır. Bir protein molekülü aminoasitlerin birbirleriyle oluşturdukları kovalent bağlar sonucu ortaya çıkarlar. İlk protein yapısı çalışmaları, X-ray kristolografisi ve NMR spektroskopisi kullanılarak miyogloblin üzerine yapılan çalışmalardır (Kendrew vd, 1958). Proteinleri oluşturan aminoasitler bir adet amino grup (-NH₂), diğer yanında bir karboksilik asit (-COOH) grup içerir ve bu nedenle aminoasit bir ucu asidik (-) ve bir ucu bazik (+) olarak yüklüdür. Amino grup ve karboksil grubu arasında karbon bağı vardır. Bu üçünün oluşturduğu yapı proteinin asıl zinciri ya da omurgası olarak adlandırılır. Karbon (C_α) 20 aminoasidin her birinin sahip olduğu kendine özgü ayırt edilebilir yan zincire bağlıdır ve 20 çeşit aminoasit için herbiri farklı yan zincire sahiptir. Her bir aminoasit bu nedenle farklı kimyasal yapıya sahiptir. Proteinler bu aminoasitlerin yan yana gelerek dizilimleri ile oluşturdukları yapı kaynaklı farklı yapı ve fonksiyonlara sahiptirler. Bunlara örnek olarak; bazı proteinler oksijen taşımada görev yapar, bazıları enerji depolar ve enerjiyi aktarırlar, bazı proteinler ise iyonların veya taşınacak moleküllerin membrandan geçişlerinde görev alırlar (Bahar vd, 2017). Bazı proteinler ise yapılar arasındaki kollajen ve keratin yapısını oluşturur. Diğer bazıları ise DNA ve RNA'nın onarılmasında işlev görür. Bu örneklerden de görüldüğü gibi canlı organizma içinde proteinlerin birçok görev üstlendiği ve işleve katıldığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Bahar vd, 2017).

2.3. Lupus Antijen İlişkili Proteinler (LARP) RNA Bağlayıcı Proteinlerdir

Proteinler kompleks yapılar oluşturmak üzere diğer moleküller ile etkileşime girebilir. Bazı proteinler enerji kullanırlar, bazıları ışığı enerjiye dönüştürebilir, diğer bazıları ise enerji kaynağı olarak kimyasal işlemlere katılır, oksijen taşırlar, enerjiyi depo ederler, bazıları ise iyon kanalları görevi yapar, bazıları da yapısal unsurları oluşturur, bazıları DNA ve RNA yı onarma görevi üstlenmiştir, bazıları ise dışarıdan hücre içine giren yabancı maddelere karşı savunma görevi görürler (Bahar vd, 2017).

Bu alanda yapılan çalışmalarda RNA'nın asıl amacın ya mRNA oluşumunda şablon olarak görev yaptığını ya bir adaptör olduğu, ya da tRNA ve rRNA tarafından desteklenen ve protein sentezi sırasında görev yapan bir yapı olduğu düşünülmektedir. Oysa ki RNA hücrede birçok alanda kullanılan bir moleküldür; hücre içerisinde düzenleyici fonksiyonu vardır, bazen RNA dizilim motiflerini tanıyan bir rehber gibi veya hedef RNA'larında bulunan tanıyıcı RNA elementleri gibi hareket eder ya da omurga destek yapısı gibi işlevsel rol oynar veya proteinlerin yeniden bir platformda toplanmasını sağlar (Gerstberger vd, 2014). Proteinlerin geçici veya stabil olarak RNA'lar ile etkileşime girmesi, RNA düzenleyici süreçlerin diseksiyonu için bir ön koşuldur (Gerstberger vd, 2014). RNA bağlanma proteinleri hakkında birçok bilgiye sahip olsak da, yanıt bekleyen birçok soru olduğu da bir gerçektir. Gerstberger vd (2014) proteinlerin biyokimyasal yapısı ve fonksiyonunun birbiriyle uyum içerisinde olması gerektiğini belirtmiştir. Şekil 2. 2 de insanın da dahil olduğu 11 türe ait RNA bağlanma proteinleri (RBP) ailelerine ait sayılar gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Toplam 11 türe ait RBP ailelerinin sayısı (Gerstberger vd, 2014).

Protein-RNA kompleks yapılarını anlamaya çalışırken en önemli nokta spesifik RNA bağlanma domain bölgelerini ve aminoasit sekans dizilerini tahmin edebilmektir. Elde edilecek doğru bulgular RNA bağlanma domaini içeren proteinlerinin hücre içerisindeki görevini de doğru bir şekilde açıklayacaktır (Auweter vd, 2006). Proteinin sahip olduğu her bir domain kendine ait özgüllük (spesifisite) ve ilgi (afinite) özelliğine sahip bağlanma alanlarına sahiptir ve buna uygun bağ (ligand) ile bağlantı kurar.

Benzer olarak RNA ligand yapısı ve sekansı önem taşır. Farklı RNAlar ile proteinler arasındaki ilişkiyi sağlayabilen birçok yapısal ve sekans dizisine sahip motifler vardır (Bandziulis vd, 1989). RNA, yapısı daha az kararlı ve buna göre DNA'dan daha fazla dinamik (hareketli) bir yapıdadır. Bu nedenle protein motiflerinin RNA ya bağlanması DNA ya bağlanmasından daha kompleks bir oluşum sergiler (Blackburn vd, 2006).

2.4. RNA Bağlanma Proteinlerinin Moleküler Mekanizması

Domainler farklı veya özel RNA'lara bağlanabilir ve onlarla özelliklerini ve eğilimlerini düzenleyerek reaksiyona girebilirler. Bu oluşumlar geniş RNA bağlanma yüzeyini kullanarak meydana gelebilirler. Bu geniş yüzey alanı, genellikle ikincil yapıya yakın olarak uzama veya kıvrım (loop) yapılarının düzenlenmesiyle protein/RNA ilişkisinde olabilirler. Bu sırada bağlanma bölgelerinin bir araya gelmesi ligandlar ile olan ilişkiyi arttırabilir. Bu da hem bağlanma eğilimini ve hem de özel olma durumunu arttırabilir (Maris vd, 2005).

Tek bağlanma domainlerine karşılık çoklu RNA protein bağlanma domainleri yüksek RNA özgüllüğü gösterirler. Bir araya gelmiş domain yapıları alan yüzeylerini arttırır ve potansiyel olarak daha özel etkileşimler oluşturur. Bu da proteinlerin daha uzun ligand bölgelerini tanımalarını sağlar. Ek olarak, protein domainleri arasındaki oryantasyon bağlanma aktivitesini arttırarak domainler arasındaki esneklik (fleksibilite) ve hareketlilik domainler arası bağlantılar tarafından sağlanır. Bu bağlantılar (veya bağlanma noktaları) ya sert (sağlam) yapıda (ki bu durumda domain özel bir konumda kalır), veya değişken yapıdadır (ki bu da yüzey alanını değiştiren dinamik durumdaki domainlerin bağlantılarına izin verir). RNA bağlayıcı domain bir RNA ligandına bağlandığında, özel bağlayıcılar (domainler arasındaki) diğer

domainleri ligandın yakınına getirirler. Bu durumda ikinci domain bağlantısı için gerekli olan enerji ihtiyacını azaltır (Shamoo vd, 1994).

2.5. La-İlişkili Proteinler (LARP) Ailesi

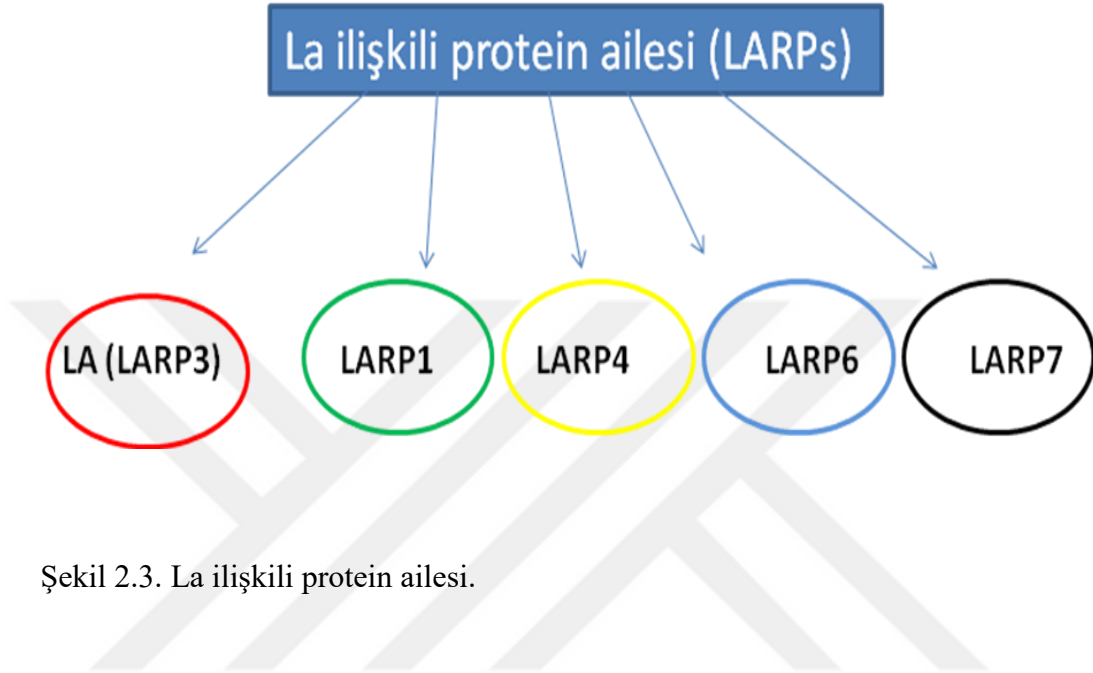
Bayfield vd. (2010) göre La proteini ilk olarak bir otoimmün hastalığı olan sistemik lupus eritamatozus hastalığından şikayet eden insanlarda otoantijen olarak tespit edilmiştir. Bu ilk hastanın adı Sjogren olması nedeniyle bu hastalığa Sjogren's Sendromu Antijen B (SS-B) denilmektedir.

Bu durumda kendisi de bir otoantijen olan La ilişkili proteinler (LARPs), diğer otoantijenleri etkisiz kılıp, vücudun kendini savunmasını engellemektedir. Ancak, bunun neden olduğu henüz açık olarak bilinmemektedir. La ilk olarak otoimmün hastalardaki antikorlar tarafından hedeflenen ribonükleik protein yapılarının bir polipeptit bileşeni olarak tanımlanmıştır. La'nın aynı zamanda ökaryot hücrelerde var olan bir protein olduğu bilinmektedir (Maraia vd, 2017).

Bu konuda yapılan bazı öncül çalışmalara göre La proteini esas olarak çekirdekte bulunmuştur ve burada 3' üridilat-hidroksil (3' UUU-OH) motifi ucunu tanıyıp ona bağlanma eğiliminde bulunur (Stefano, 1984; Wolin ve Cedervall, 2002). Bu motif RNA polimeraz III (RNA pol III) transkripsiyonunu sonlandıran önemli bir belirteç olduğu için La proteini her RNA pol III birincil transkriptine bağlanabilir.

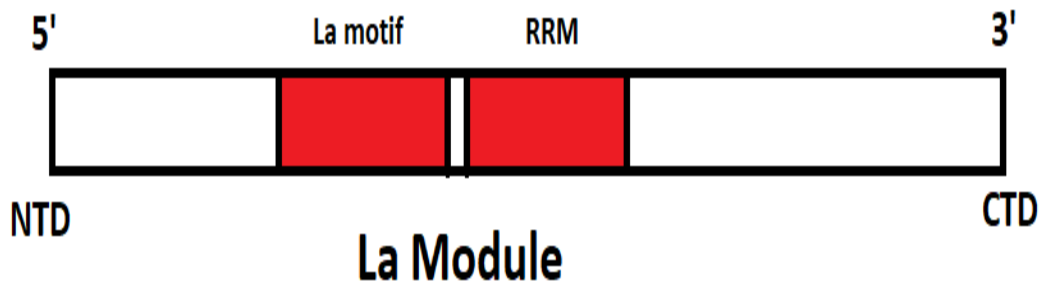
Bousquet-Antonelli ve Deragon (2009) çalışmalarında belirttikleri gibi La proteinlerinin şimdiye kadar bilinen en iyi görevini, transkriptin doğasına bağlı olarak 3'-ucun bozulmasını engellemektedir. La proteinleri aynı zamanda RNA aktiviterinde bir yardımcı rol de üstlenmektedir (Belisova vd, 2005) veya belirli pre-tRNA'ların doğru katlanmasını destekler (Chakshusmathi vd, 2003). Bununla birlikte, La proteinlerinin pre-tRNA'lar gibi kodlanmamış yeni sentezlenmiş RNA'ların kalite-kontrol mekanizmalarında önemli rol oynadığı da bilinmektedir (Copela vd, 2006). Ökaryot organizmalar arasında, La Motif ve RNA'yı tanıyan motif (RRM1) domainlerinden oluşan NH₂-terminal bölgesi (NTD) iyi korunmuş bir yapıya sahiptir. Ayrıca, La proteinlerinin yapısal olarak ayırt edici bir özelliğe sahip olduğu da bilinmektedir.

La modül hemen hemen bütün ökaryot organizmalarda bulunur ve La modül proteinleri geniş bir fonksiyona sahiptir (Maraia vd, 2017). La modül yapısı ile diğer motifler birlikte La ilişkili proteinler 7, 6, 4 ve 1 yapısını oluşturmaktadırlar (Şekil 2.3) ve bu yapıların herbiri kendilerine ait özelleşmiş fonksiyonlara sahiptirler.



Şekil 2.3. La ilişkili protein ailesi.

Genel olarak La modül proteinin merkezinde bulunur. Her bir alt aileye özel olan La modül yapısı çeşitli N-uç domainleri (NTD) ve C-uç domainleri (CTD) taşır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Genel LARP protein modeli.

La ve LARP proteinlerinde yapılan bilimsel çalışmalar bu yapıların tek olarak ya da diğer yapılarla birlikte nasıl bir fonksiyona sahip olduğunu ortaya çıkarmaya başlamıştır. La ile ilgili proteinler belli bir RNA hedefine doğru özel bir fonksiyon gösterir. Örneğin, LARP7 üyeleri küçük çekirdek RNA'ları ile birlikte fonksiyonlarını gerçekleştirirler (snRNAs) (Krueger vd, 2008; Muniz vd, 2013). Buna karşın diğer LARP 6 mRNA'da bulunan kararlı bir yapıya sahip asıl kıvrım (stem-loop veya SL) yapısını hedef alır ve kollojen I ve kollojen III translasyon işleminin düzenlenmesini sağlar. LARP4 yapıları, mRNA hedef bölgelerinin kararlılık ve translasyon işlemlerine yönelik çalışmaları vardır.

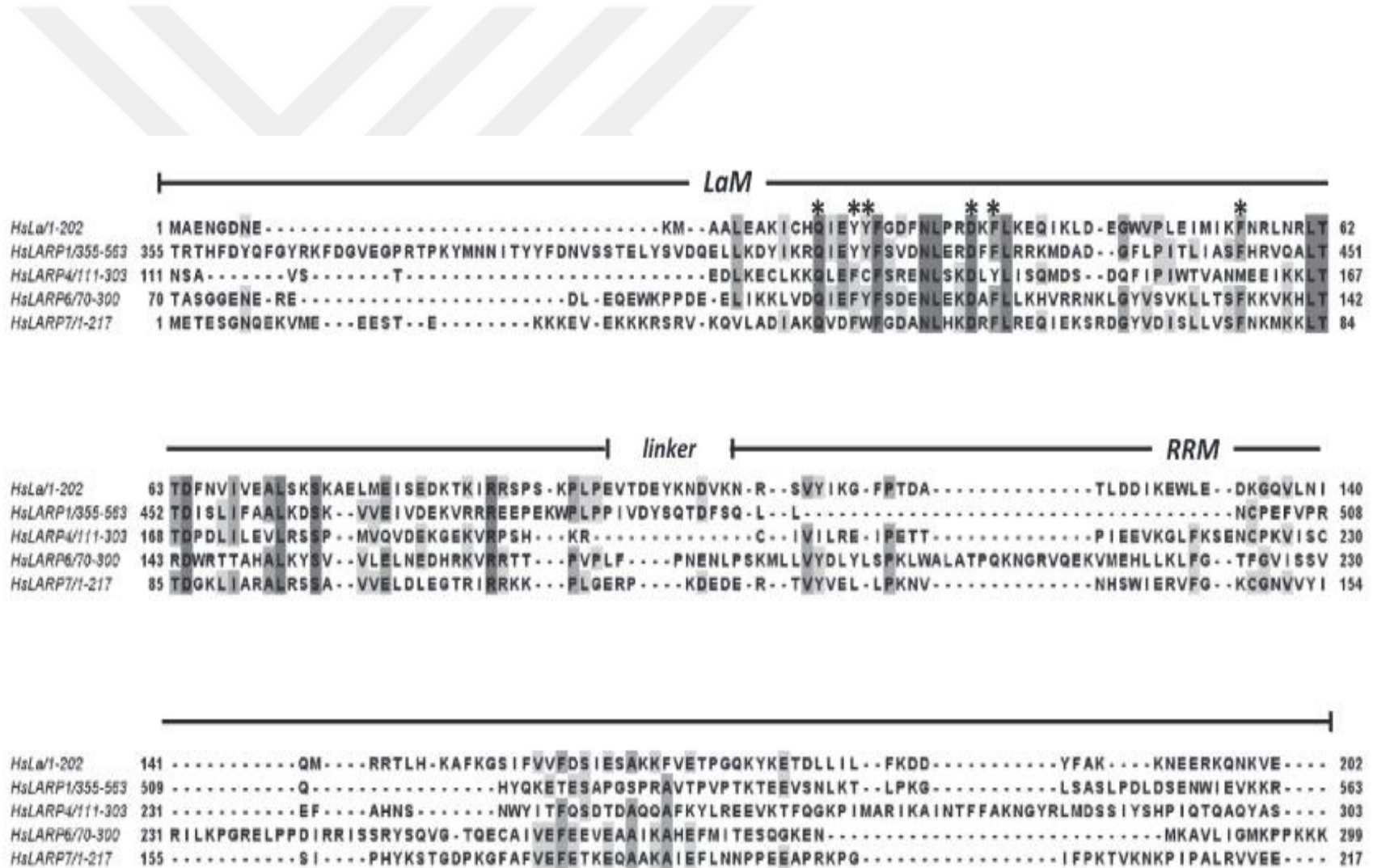
La proteinleri neredeyse tüm ökaryotlarda bulunan, RNA metabolizmasında oldukça önemli bir fonksiyona sahiptirler. Bu La proteinlerinin neden otoantijenler gibi hedef oldukları halen açıklanamamıştır (Bayfield, 2009). La proteinleri (LARP3 olarak da adlandırılır) üzerine yapılan birçok çalışma göstermiştir ki; LARP3 ve LARP7 proteinleri RNA'ların sonlarında bulunan üridilat (UUU) sekansına bir arada olduğu bölgeye bağlanmayı tercih eder ki bu yapı tüm RNA pol III yapılarının en sonunda bulunmaktadır (Bayfield, 2009). Bousquet-Antonelli ve Deragon'a (2009) göre La proteininin en önemli görevi transkript işlemi sırasında 3' egzonükleolitik bozulmalara karşı RNA'yı korumaktır. La proteininin bağlanması aynı zamanda RNA fonksiyonlarının düzenli devam etmesini de sağlar. La protein aynı zamanda pre-tRNA'ların doğru kıvrılmalarını sağlar, snRNA'larda üridinnükleotidinin bir araya gelmesini sağlayarak fonksiyonel ribonükleik protein yapısının oluşması rolüyle de RNA ya yardımcı rolünü de üstlenir. Böylece, La proteinleri (LARP3) yeni sentezlenmiş pre-tRNA'ların kalite kontrol mekanizmalarında görev yapar (Bousquet-Antonelli ve Deragon, 2009).

Evrimsel olarak korunmuş La ilişkili protein ailesi; asıl La (genuine La/LARP3), yukarıda tanımlandığı gibi ve LARP1, LARP1b, LARP4, LARP4b, LARP6 ve LARP7 altailerinden oluşmaktadır. Her bir LARP alt ailesinin kendine ait transkripsiyon ve/veya mRNA translasyonunda ayrı bir görevi vardır. Stavraka ve Blagdan (2015) yaptığı çalışmayla LARP1, LARP6, LARP7, LARP4 ve LARP4b kanser hücreleri üzerine olan fonksiyonunu ortaya çıkartmaya ve aynı zamanda kanser tedavi yöntemlerinde kullanılabilecek bir yöntem belirlemeye çalışmışlardır. Bu zamana kadar yaklaşık altı çeşit insana ait LARP proteini insan genomunda tanımlanmış ve HUGO Gene Nomenclature Committee European (HGNC)

Bioinformatik Enstitüsüne kayıt edilmiştir. Fakat bu zamana kadar tam fonksiyonları henüz netlik kazanmamıştır (Basquet-Antonelli ve Deragon, 2009). LARP7, pozitif transkripsiyon uzama faktörü b (p-TEFb) üzerine negatif etki yaparak antibüyüme/antitümör fonksiyonu olarak görev yapar aynı zamanda *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830' den elde edilen homolog LARP7 proteinleri larvaların kan hücrelerinin çoğalmasında ve farklılaşmasında tümör baskılayıcı (repressör) olarak ortaya çıkmıştır (Remillieux-Leschelle vd, 2002).

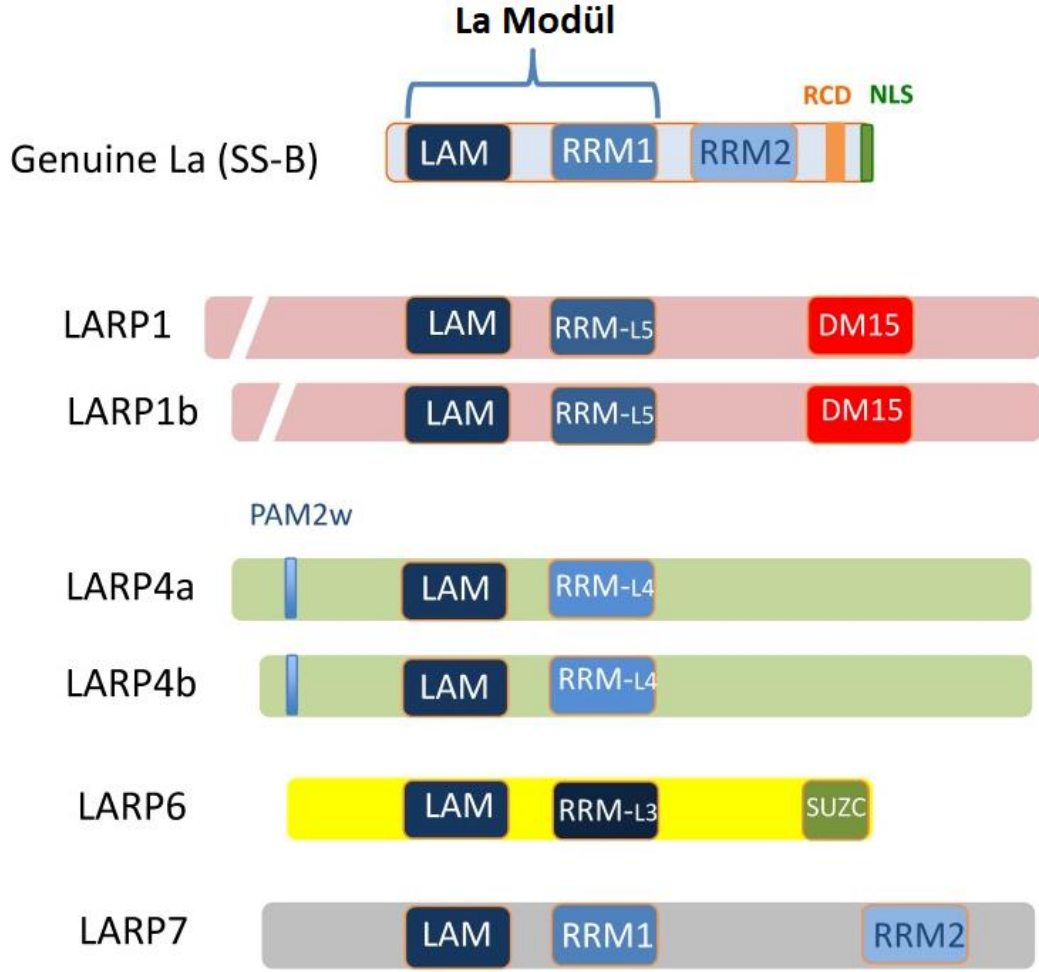
Bütün LARP proteinleri, proteinlerin N-ucu bölgesindeki iç kısımda kararlı bir RNA bağlanma domaini içerirler, bu yapıya da La Modül denir ve bu yapı içinde N-teminal La Motif ve domainlere sahiptir (Şekil 2.4.). Yapı olarak bu iki domain birbirlerine kısa bir bağlantı ile bağlıdır. LARP proteinlerinde bulunan La Modül domain yapıları uzunluk ve kimyasal karakterleri bakımından farklılıklar gösterirler (Şekil 2.5) (Martino vd, 2015).

Stravraka ve Blagden'a (2015) göre LARP ailesinin domain yapıları ile birlikte şekilsel gösterimi Şekil 2.6' da verilmiştir.



Şekil 2.5. İnsan LARP proteinlerine ait La Modül (La Motif + RRM) domain yapısının sekans dizilimi (Martino vd, 2015).

* LaM domainine ait en kararlı 6 amino asiti gösterir.



Şekil 2.6. LARP ailesinin domain yapıları ile birlikte şekilsel gösterimi. Bütün LARP ailesi La Motif (LaM) ve RNA tanıma motifinden (RRM) oluşan La Modül yapısına sahiptir. Aynı zamanda tüm LARP ailesi farklı bir fonksiyonu gerçekleştirmesini sağlayacak farklı bir domain yapısına sahiptir. (NLS) Nükleer lokalizasyon sinyali, (PAM2w) Poli A Bağlanma Protein etkileşimi Motifi, (RCD) RNA şaperon domaini, (RRM-L) RNA tanıma-benzeri motif, (LSA) La ve S1 ilişkili motif, DM15-tekrarı içeren motif aynı zamanda LARP1 motif olarak da bilinmektedir (Stavraka ve Blagdan, 2015'den uyarlanmıştır).

Her bir LARP alt ailesi (Şekil 2.6) belli bir ligand yapısına bağlanır (Bosquet-Antonelli ve Deragon, 2009). LARP1 proteinin C ucunda bulunan LARP1 domaini (DM15) ile mRNA'ya bağlanır. (Nykamp vd, 2008). Bir diğer protein olan LARP3: pre-tRNA; LARP7: pre-tRNA ve snoRNA; LARP4: mRNA; LARP1: mRNA

bağlanır. LARP6 proteini ile ilgili henüz kesinleşmiş bir bilgi bulunmamaktadır. Şu ana kadar yapılan araştırmalar belki mRNA'ya bağlanma eğilimi gösterdiğini ifade edebilir. Bu konuyla ilgili bütün bildiğimiz LARP6'nın kolajen tip I ve III mRNA'ların esas kıvrım bölgesine bağlandığıdır.

2.6. La-İlişkili Protein 6 (LARP6)

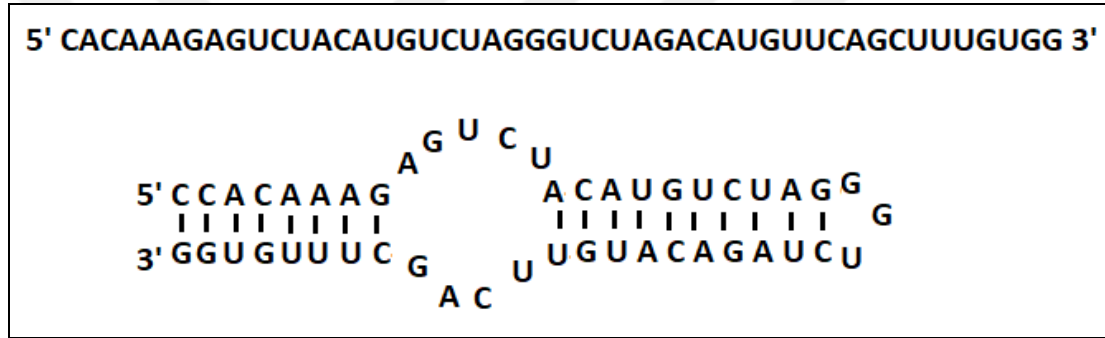
LARP6 alt ailesi domain yapısı ilk olarak Yoo ve Wolin (1994) tarafından yapılan çalışmada La Motif (LAM) RNA bağlanma domaini ve RNA tanıma motif (RRM) domain olarak tanımlanmış ve insan La otoantijen yapısının önemli bir gösterge yapısı olmuştur. Yapılan birçok araştırma sonucunda yapılan sekans dizilim sonuçları çok önemli korunmuş yapıların varlığını ortaya çıkarmıştır. Bunlar LAM, RRM ve C uçlu proline zengin bir yapıya sahip LSA motif domain yapılarıdır (Castro vd, 2017). LAM domain yapısı ayrıntılı bir sarmal-dönme-sarmal (helix-turn-helix) yapısına sahipken RRM domain yapısı tipik olarak $\beta 1\alpha 1\beta 2\beta 3\alpha 2\beta 4$ kıvrım yapısına sahiptir ve genellikle β yaprak yapısı RNA bağlanma yüzeylerini içerir.

Bousquet-Antonelli ve Deragon'nun (2009) yaptığı çalışmada ortalama protein uzunluğu 263 ile 770 aminoasit aralığında çıkarken ortalama olarak yaklaşık 400 aminoasit olarak hesaplanmıştır. Yine yaptıkları çalışmada LAM ile RRM1 arasındaki mesafe ortalama 18 aminoasit olurken, RRM1 ve RRM2 arasındaki uzunluk ortalama 68 aminoasit olarak bulunmuştur. Yapılan tam uzunluk sekans analiz sonuçlarında C ucuna yakın bölümde yaklaşık olarak 20-30 aminoasit uzunluğunda yeni bir kararlı bölgenin varlığı tespit edilmiştir. Bulunan bu kararlı yapı La ve S1 bağlantılı motif (LSA motif) olarak adlandırılmaktadır. Verimsel olarak LSA kararlı yapısının ökaryotlar arasında geçişi ve iki farklı nükleik asit bağlanma motifi (LAM ve S1) fonksiyonel olarak LARP6 proteinlerinde seçici bir bağlanma yapısını oluşturmaktadır.

Basquet-Antonelli ve Deragon'a (2009) göre aynı aileye ait LAM içeren proteinler yapısal ve evrimsel olarak ortak özelliklerinin yanında aynı zamanda fonksiyonel karakteristik özellikleri de aynı olabilir. Fakat bu yapılar aynı biyolojik işlemler ya da aynı homolog yapılara bağlanmayabilir ya da farklı yapıları (DNA, RNA ve protein) farklı hedef bölgelerinde aynı moleküler hareketlerini

benimseyebilirler. LARP7, La, LARP1 ve LARP4'ten farklı olarak, LARP6 La Modül yapısı, aminoasit ve oriyantasyon bakımından diğerlerinden oldukça farklıdır.

LARP6'nın bir fonksiyonu da omurgalılarda mRNA da bulunan tip I ve III kolajen yapıyı (Şekil 2.7) kodlayan ve onların translasyonu için regülasyon sağlayan 5' stem-loop (esas kıvrım) kısmına bağlanmasıdır (Manojlovic vd, 2017). Bu bağlanma özellikle hücrenin sitoplazma ve çekirdek kısmında gerçekleşirse de sitoplazma içinde bulunan LARP6, polizomlar ile ilişkili olmamasına rağmen fazla gelen LARP6 kolajen mRNA'lardaki ribosomal yüklenmeyi de bloke edebilir (Cai vd, 2010). Ancak, bundan farklı olarak LARP6 proteininin mRNA hedefleri ve ek farklı fonksiyonları bilinmemektedir.



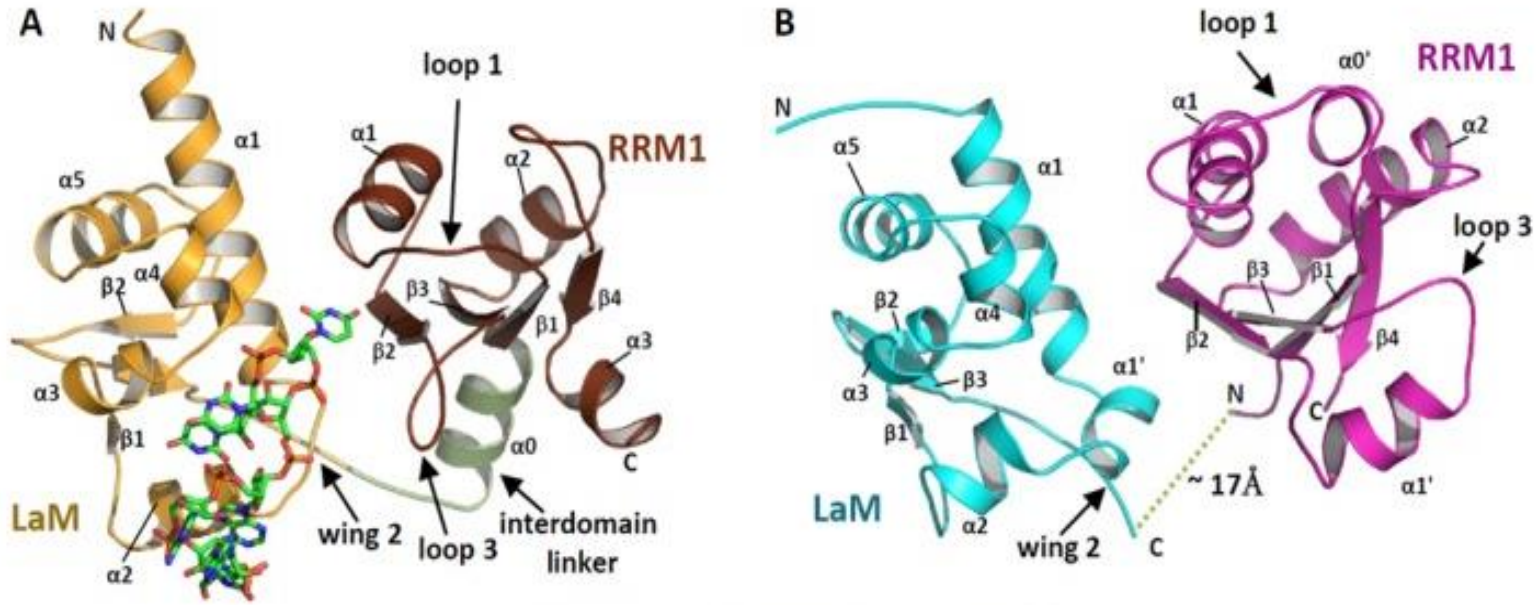
Şekil 2.7. İnsanda kolajen $\alpha 1(I)$ mRNA yapısına ait 5'SL (stem-loop) sekansı (Cai vd, 2010).

Balık ve memelilerde LARP6 proteinleri üzerine yapılan çalışmalarda, LARP6'in kasları farklılaşmasını sağlayan temel protein (MyoD) transkripsiyon faktör ile birlikte kas gelişimini ve kasların farklılaşmasını sağladığı gösterilmiştir (Wang vd, 2009). Farelerde yapılan bir diğer çalışmada ise 5'stem-loop mRNA da oluşan bir yapısal bozulmada LARP6'in bu bölgeye bağlanma özelliğini kaybederek, yaralar üzerinde kolajen yapıda bozukluğa neden olmuştur (Zhang ve Stefanovic, 2016). Zhang ve Stefanovic (2016), fiziksel bir yaralanma sonrası kollajenin hızlı üretiminin, transkripsiyon sonrası düzenlemeyle sağlanabileceğini ileri sürdü; kollajen mRNA'nın kararlılığı ve translasyon işleminin uyarılması bu iki olay da LARP proteinlerinin RNA ya bağlanması ile düzenlenmektedir. Bu çalışmalar göstermiştir ki, LARP6 proteinlerinin posttranskripsiyonel faktör olarak görev yaptığını ve kolajen gelişiminde ve kas gelişiminde önemli rol oynadığını göstermiştir.

LARP6 (“Acheron” olarak adlandırılır) proteini omurgalılarda kas gelişimi ve farklılaşmasında belirtilmiştir (Glen vd, 2010; Martino vd, 2015). Memeli proteini transkripsiyon düzenlenmesinde gelişimsel transkripsiyon faktörlerle etkileşime girerek rol oynar. RNA bağlanmaları kolajen $\alpha 1(I)$, $\alpha 2(I)$ ve $\alpha 1(III)$ sentezinin düzenlenmesi için gereklidir. Bu olay LARP6 proteinleri ve mRNA’nın 5’ translasyonu çevrilmemiş alan (5’UTR) daki SL yapısı ile etkileşime girer. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda 800 adet RNAbağlanma proteini tespit edilmiş ancak bunlardan sadece LARP6 protein ailesi tip I kollajen düzenlenmesinde özelleşmiştir (Zhang ve Stefanovic, 2016). LARP6’da oluşabilecek mutasyonlar veya kollajen mRNA’daki LARP6’nın bağlanma bölgesindeki mutasyonlar kollajen oluşum seviyesinde değişikliğe neden olmaktadır (arttırabilir veya azaltabilir). Bu durum da fibroproliferatif hastalıkların tedavisinde LARP6 proteinlerinin önemini artırır. Martino vd (2015)’ne göre insan LARP6 (HsLARP6) ile SL birlikteliği temel olarak elektrostatik olmayan ilişkileri etkilemekte ve LaM, RRM1 ve iki domain arasındaki bağlantının bir araya gelerek oluşturdukları yapı etkilemektedir. Bu araştırmacıların yaptıkları çalışma sonuçlarına göre *Hs* LARP6 La Motif yapısının insan La proteini ile homolog domain yapılarının oldukça benzer oldukları ortaya çıkmıştır. LAM yapısı gelişmiş kanatlı-heliks ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$) yapısıdır ve bu yapı da standart kıvrımlar üzerine doğru yerleşmiştir (Alfano vd, 2004).

Hs LARP6, LAM domain yapısı ile *Hs* LARP3’nin LAM domain (Şekil 2.8.) yapısındaki farklar ise şunlardır: i) heliks $\alpha 1$ insan LARP6 LAM’inde daha kısadır, ii) $\alpha 2$ ve $\beta 1$ kıvrımlarında fark gözükür. Bu kıvrım LARP6 da daha uzundur ve daha az tanımlanmıştır, iii) kanat 2’ nin yapılanması *Hs* La ile karşılaştırıldığında *Hs* LARP6’ nın LAM’inde farklılık gösterir; bu bölgede protein sekansında ayna görüntüsü gibi farklı bir ayırım görünür. RRM1 domain üzerinde yapılan mutasyonlar sonucu araştırmalar *Hs* LARP6 LaMod yapısının 48 ntRNA’ya bağlanma afinitesindeki eğilimin mutant yapılarına göre daha az olduğu ortaya çıkmış fakat bunun nedeni henüz açıklanamamıştır.

Yapılan araştırmalar LARP proteinlerinin LaMot domaini ve RRM domainleri arasında bulunan bağlantı yapısının hedef RNA seçimlerinde önemli bir rol oynadığını göstermekle beraber bunun sebebi henüz anlaşılammıştır. Ayrıca, LARP proteinlerinin fonksiyonel çeşitliliği sadece LaMod sekans farklılıklarından değil, aynı zamanda onların farklı yapısal yerleşimlerinden (Martino vd, 2015).



Şekil 2.8. LARP proteinlerinde La Modüldeki sekans ve yapı ayırımı. (A) *Hs* LARP3 La Modül, (B) *Hs* LARP6 La Modül (Martino vd, 2015).

Kollajen $\alpha 1(I)$ ve $\alpha 2(I)$ mRNA da bulunan 5'UTR bölgesinde bulunan stem loop yapısı 48 nükleotid uzunluğunda ve başlangıç kısmından 75-85 nükleotit uzaklığında yer almaktadır. Bu bölge tüm omurgalılarda korunmuş bir bölgedir ve tip I kollojen yapısının oluşmasını sağlamaktadır. SL içinde bulunan birinci hafif yuvarlak yapı (B1) içinde bulunan 2 nükleotit ve ikinci yuvarlak yapı (B2) içersinde bulunan 3 nükleotit LARP6 proteinlerinin bağlanmasında oldukça kritik önemi olan kısımlardır. Burada oluşacak bir mutasyon tip I kollojen oluşumunu ortadan kaldıracaktır (Zhang ve Stefanovic, 2016).

Castro vd (2017) yılında yaptıkları çalışmada iki balık (plati balığı ve zebra balığı) ve insan LARP6 proteinlerinin tam uzunluk yapısı ekspresyonu, RNA bağlanma aktivitesi ve saflaştırma yöntemi üzerine yeni yöntemler kullanarak başarıyla bunların karakterizasyon yapısını ortaya çıkarmıştır. Yaptıkları çalışmada protein miktarındaki artışı sağlamak amacıyla iki yöntem uygulanmıştır. Birincisi N ucuna Küçük I Ubiquitin-benzeri Değiştirici (SUMO) füzyon yapısı eklenerek kararlı protein yapısı daha kararlı hale getirilmiş ve saflaştırma affinitesi artırılmıştır. İkinci olarak filtrasyon-temelli bir yöntem kullanarak protein saflaştırma tamponlarında (tampon) kimyasal eklemeleri görüntüleyerek daha kararlı protein yapısını elde edebilmiştir. Elde ettikleri iki balık LARP6 proteinlerin N-terminal+La Modül yapılarının oldukça korunmuş homolog yapılar olduğu ortaya çıkmış ve oldukça sıkı bir RNA bağlanma aktivitesine sahip olduğunu saptamışlardır.

Castro vd (2017), LARP6 tam uzunluk NTD ile RNA bağlayıcı domain (LaMod) arasındaki potansiyel ilişkiyi tanımlamak için kütle spektrofotometri yöntemini kullanmıştır.

Yapılan Elektroforez Hareketlilik Kayma Analizi (EMSA) yöntemi sonucuna göre *Xm* LARP6 ve *Dr* LARP6 proteinleri HsCOL1A1 esas kıvrım (stem-loop) bölgesine insan LARP6 yapısından daha fazla bağlanma eğilimi göstermiştir (Castro vd, 2017). Moleküllerin mekanizmalarındaki iyileştirme, balıklardaki proteinlerin bağlanma eğilimlerinin arttırılmasına neden olabilir. Bunun nedeni bu 3 proteinin sahip olduğu aminoasit yapılarındaki farklılıklar veya proteinlerin üçüncül yapılarındaki farklılıklardan kaynaklanabilir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada iki balık zebra balığı (*Danio rerio*), plati balığı (*Xiphophorus maculatus*) ve insan (*Homo sapiens*) DNA örnekleri kullanılmıştır. DNA template (şablonları) rekombinant protein ekspresyon yapıları (pET28-SUMO-*Xm* LARP6, pET28-SUMO-*Dr* LARP6A ve pET28-*Hs* LARP6) Castro vd (2017) tarafından öncelikle elde edilmiş olup, bu çalışmada kullanılmıştır.

Kullanılan materyal:

i) DNA oligonükleotidler Integrated DNA Technologies (IDT Inc.) şirketi tarafından sentez edilmiştir (Çizelge 1).

ii) Taq DNA polimeraz New England BioLabs tarafından temin edilmiştir (Lot:0141412)

iii) Phusin DNA polimeraz Thermo Scientific tarafından temin edilmiştir (Lot: 00545475)

iv) dNTP mix, DNA ligase, restriction enzimler XhoI ve NdeI (XhoI Lot:0581409, NdeI Lot:0311409) New England BioLabs tarafından temin edilmiştir.

v) DNA markır Promega (Lot:83834)

vi) DH5 α ve Rosetta (DE3) *E. coli* Dr. Robert McLean (Texas State University, Biyoloji Bölümü) tarafından verilmiştir.

vii) Nükleaz free su Integrated DNA Technologies (IDT Inc.) şirketinden temin edilmiştir (Lot: 205938).

viii) Protein marker Thermo Scientific (Lot:26616)

ix) Proteaz inhibitor tablet Thermo Scientific (Lot:SJ2446071)

x) Deoxynucleotid solusyonu (dNTP) New Englands Bio Labs (Lot:0941705)

xi) Trans Blot Turbo 5x Tampon BIORAD Laboratories (cat:10026938)

xii) Bu çalışmada kullanılan diğer bütün materyal ise Fisher Scientific and Research Products International (RPI) tarafından temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1 Klonlama

3.2.1.1. PCR yöntemi

İlk olarak, iki balık (“*Hs* NTD-La Modül”, *Xm* NTD-La Modül”, “*Dra* NTD-La Modül”) ve insan LARP6 proteinlerinin NTD ve LaMod bölgesinin kodlandığı yeni bir DNA plazmidi elde edebilmek için konvensiyonel moleküler biyoloji (polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve ayırıcı enzim klonlaması) metotları uygulanmıştır. Buna ilaveten N-uçlu His6 sekans kodu baş uç kısma eklenerek rekombinant proteinin saflaştırılması ve saptanması sağlanmıştır.

Klonlama işlemine öncelikle PCR işlemi ile başlanmıştır. Zebra balığının *Dr* LARP6A PCR işleminde LARP6A prteininin ilgili olduğu bölge ve primer KAL 134 forward (ileri) primer, primer KAL 135 reverse (ters) primer dizilimleri kullanılarak yapılmıştır. *Dr* LARP6A proteinin La Modül bölgesinin çoğaltılmasında KAL 151 (forward primer), KAL 135 (reverse primer) primerleri kullanılmıştır. *Dr* LARP6A proteinin La Motif gen bölgesinin çoğaltılmasında ise KAL 151 (forward primer) ve KAL152 (reverse primer) primerleri kullanılmıştır. *Dr* LARP6A proteinin RRM gen bölgesinin çoğaltılmasında KAL 153 (reverse primer) ve KAL 135(forward primer) dizaynları kullanılmıştır. Plati balığının *Xm* LARP6 PCR işleminde ise cDNA, KAL 176 (forward primer) ve KAL 177 (reverse primer) kullanılmıştır. İnsan örneklerinde ise *Hs* LARP6 PCR işleminde ise DNA, KAL 132 (forward primer) ve KAL 102 (reverse primer) kullanılmıştır (Çizelge 1 ve 2). Yapılan PCR işlemi Çizelge 3 de verilen değerler kullanılarak çoğaltma işlemi her bir örnek için ayrı ayrı yapılmıştır. PCR işlemi ile çoğaltılan bu yapı % 0,8 agaroz jel kullanılarak 90 V da bir saat yürütme işlemi uygulanmıştır. Jelde yürütme işleminin ardından çoğaltılan DNA EZNA kit yardımı ile jelden arındırılmış ve NANODROP cihazı kullanılarak DNA konsantrasyonu tespit edilmiştir. Tüm reaksiyonlarda 10X Taq Tampon, 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTPs, IDT H₂O (nükleer serbest su) ve Taq DNA polimeraz en uygun miktar ve konsantrasyonlarında kullanılmıştır.

Çizelge 1: PCR için kullanılan DNA oligonükleotid primerleri.

Primer adı	Amaç	Hedef yapı	DNA sekansı
KAL 176	Forward Primer	<i>Xm</i> LARP6 (1-280)	5' GGAGACACGACAAATCAAGACACAGTGGTGCCGGCACCAGTGGAG
KAL 177	Reverse Primer	<i>Xm</i> LARP6 (1-280)	5' CTCCACTGGTGCCGGCACCAGTGTGTCTTGATTTGTCGTGTCTCC
KAL 134	Forward Primer	<i>Dr</i> LARP6A (1-290)	5' AGCCATATGATGAGCAGCGAGCAGCCG
KAL 135	Reverse Primer	<i>Dr</i> LARP6A (1-290)	5' GCACTCGAGCTATTATTTCTTCGGTGGCTTGGTGCCGATTAGCAC
KAL 102	Reverse Primer	<i>Hs</i> LARP6 (1-300)	5' GCAACTCGAGTCATTAAGGTTTCTTTTTGGGTGGCTTCATACCAATCAGGACAG
KAL 132	Forward Primer	<i>Hs</i> LARP6 (1-300)	5' GTACCATGGATGGGCAGCAGCCATCATCATCAT
KAL 151	Forward Primer	<i>Dr</i> LARP6A La Modül (60-290)	5' GTACATATGGGCACCAGCGGTGGCGAGC
KAL 135	Reverse Primer	<i>Dr</i> LARP6A La Modül (60-290)	5'GCACTCGAGCTATTATTTCTTCGGTGGCTTGGTGCCGATTAGCAC
KAL 152	Reverse Primer	<i>Dr</i> LARP6A La Motif (60-157)	5' GATTCCTCGAGTTATCAGGTCGACCTGCGGCGCACCTTC
KAL 151	Forward Primer	<i>Dr</i> LARP6A La Motif (60-157)	5'GTACATATGGGCACCAGCGGTGGCGAG
KAL 153	Forward Primer	<i>Dr</i> LARP6A RRM (157-290)	5'GTACATATGACCGTGCCAGTTTTCGCCAGTGAATCTC
KAL 135	Reverse Primer	<i>Dr</i> LARP6A RRM (157-290)	5'GCACTCGAGCTATTATTTCTTCGGTGGCTTGGTGCCGATTAGCAC

Çizelge 2. PCR işleminde kullanılan yapılar: template DNA, forward primer, reverse primer ve baz çifti sayısı. (Protein yapılarının aminoasit sayıları parantez içinde verilmiştir).

Yapı	Template DNA	Forward Primer	Reverse Primer	Baz Çift Sayısı
<i>Dr</i> LARP6A (1-290)	pET28-SUMO- <i>Dr</i> LARP6A	KAL 134	KAL135	894 bp
<i>Dr</i> LARP6A La Modül (60-290)	pET-28-SUMO- <i>Dr</i> LARP6A	KAL151	KAL135	717 bp
<i>Dr</i> LARP6A La Motif (60-157)	pET-28-SUMO- <i>Dr</i> LARP6A	KAL151	KAL152	324 bp
<i>Dr</i> LARP6A RRM (175-290)	pET-28-SUMO- <i>Dr</i> LARP6A	KAL153	KAL135	423 bp
<i>Xm</i> LARP6 (1-280)	pET-28-SUMO- <i>Xm</i> LARP6	KAL176	KAL177	864 bp
<i>Hs</i> LARP6 (1-300)	pET-28-SUMO- <i>Hs</i> LARP6	KAL132	KAL102	985 bp

Çizelge 3. PCR işlem sırası ve kullanılan ısı değerleri. (**Xm* LARP6 (1-280) için kullanılan PCR reaksiyonunda tavlama ve uzatma basamakları birleştirilerek istenilen sonuca ulaşılmıştır).

	<i>Dr</i> LARP6A (1-290)	<i>Xm</i> LARP6 (1-280)*	<i>Hs</i> LARP6 (1-300)	<i>Dra</i> LARP6 La Modül (60-290)	<i>Dra</i> LARP6 La Motif (60-157)	<i>Dra</i> LARP6 RRM (157-290)
İşlem adı	Isı – Zaman	Isı - Zaman	Isı - Zaman	Isı – Zaman	Isı - Zaman	Isı - Zaman
Başlangıç denatürasyon	94°C - 30 sn	98°C - 45 sn	94°C - 30 sn	94°C - 30 sn	94°C - 30 sn	94°C - 30 sn
Denatürasyon	94°C - 30 sn	98°C - 15 sn	94°C - 30 sn	94°C - 30 sn	94°C - 30 sn	94°C - 30 sn
Tavlama/Bağlanma	60°C - 45 sn	68°C - 8 dk	56°C - 45 sn	55°C - 45 sn	55°C - 45 sn	55°C - 45 sn
Uzatma	68°C - 1 dk		65°C - 2 dk	63°C - 1 dk	63°C - 1 dk	63°C - 1 dk
Son uzatma	68°C - 5 dk	--	68°C - 5 dk	68°C - 5 dk	68°C - 5 dk	68°C - 5 dk
Döngü	22 döngü	30 döngü	23 döngü	22 döngü	22 döngü	22 döngü
Saklama	4°C - ∞	4°C - ∞	4°C - ∞	4°C - ∞	4°C - ∞	4°C - ∞

3.2.1.2. Gen bölgelerinin çıkartılması

PCR işlemi sonucu elde ettiğimiz DNA yapıları ve temin edilen plasmid (pET 28), NdeI (Lot:0311409 New England BioLabs) ve XhoI (Lot:0581409 New England BioLabs) enzimleri kullanılarak çift taraflı kesme işlemi yapılmıştır. Bu yapı yine aynı enzimler (NdeI ve XhoI) kullanılarak kesilen plasmid pET28a taşınmış ve bağlanması sağlanmıştır. Çizelge 4' de verilen miktarlar ve plasmidimiz bir saat 37°C de inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. Sonrasında ise plasmid içine 1 µl Antarctic fosfataz enzimi (Lot:0221406 New England BioLabs) eklenerek tekrar bir saat 37°C de inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. Çıkarılan gen bölgelerine % 0,8 lik agaroz jel ile 90 voltta 1 saat yürütme işlemi uygulanmıştır. Agoras jelden EZNA kit (Omega Bio-tek, Norcross, Georgia, USA) kullanılarak ekstre edilen DNA parçalarının (fragmentlerinin) NanoPhotometer (Implen, München, Germany) cihazında konsantrasyonları ölçülmüştür.

Çizelge 4. DNA seçili gen bölgesinin çıkarılmasında kullanılan miktarlar.

	<i>Dra</i> LARP6	<i>Xm</i> LARP6	<i>Hs</i> LARP6	<i>Dr</i> LARP6 La Modul	<i>Dra</i> LARP6 La Motif	<i>Dra</i> LARP6 RRM	Plasmid
10x Cut Smart	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Jel pürifikasyonu	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	15µl
IDT H ₂ O	23 µl	23 µl	23 µl	23 µl	23 µl	23 µl	28µl
NdeI (enzim 1)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1µl
XhoI (enzim 2)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1µl

3.2.1.3. Ligasyon ve transformasyon

Dr LARP6A La Modül (60-290), *Dr* LARP6A La Motif (60-157), *Dr* LARP6A La RRM (175-290), *Hs* LARP6 (1-300), *Dr* LARP6A (1-290) ve *Xm* LARP6 (1-280) bölgeleri plazmid DNA' sını ile birlikte 2x ligasyon tampon (Lot:0011410 New England BioLabs) ve T4 QUICK (Lot:1171602 New Engln BioLabs) ligaz enzimi kullanılarak hazırlanan karışım 5dk oda sıcaklığında inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. Klonlama işlemi sırasında *Escherichia coli* DH5α kompedan (alıştırılmış) hücreleri kullanılmıştır. Hücreler ve DNA 30 dakika buz üzerinde inkübasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra 37°C de 90s de hızlı şok uygulanmıştır. Bunu takiben tekrar 2dk buz üzerinde inkübasyon yapılmıştır. DNA ve hücre karışımına 700µl otoklavlanmış steril Luria Broth (LuB) sıvı besiyeri eklenerek 37°C 60dk çalkalanma işlemi uygulanmıştır. Bu işlem ile elde edilen hücreler, kanamisin antibiyotik eklenerek hazırlanmış LuB agar besiyerine ekilerek 1 gece 37°C de inkübasyona bırakılmıştır. LuB besiyeri ve kanamisesin antibiyotik karışımına elde edilen kolonilerden süspansiyon elde edip, 24 saat 37°C de çalkalama işlemi ile beraber inkübasyon yapılmıştır. Plazmid DNAsı QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAgen, Hilden, Germany) uygulamasına göre toplanmıştır. Plazmidlerin doğru bir şekilde sentezlendiğini doğrulanması amacıyla deoksiniükleotid sekans analizi yöntemi için hazırlanmıştır. Elde edilen plazmid DNA'sının bir kısmı sekans analizine gönderilmiştir ve geri kalan kısım -20°C de korunmaya alınmıştır.

3.2.1.4. Ligasyon ve transformasyon işleminin doğrulanması

Bir önceki basamakta elde edilen plasmide Cut Smart, NdeI, XhoI, deiyonize su eklenerek elde edilen master mix karışımına 1 saat 37°C inkübasyon işlemi uygulandıktan sonra 6x DNA boyası eklenerek 90 voltta 1 saat agaroz jelde yürütme işlemi uygulanmıştır. Elde edilen pozitif sonuçlar sekans analizi için hazırlanmıştır (Genewiz, Inc., South Plainfield, New Jersey, USA). Bu işlem sonucu elde edilen analiz sekans sonuçları Çizelge 5'de verilmiştir.

Çizelge 5. Klonlama işlemi sonrası proteinlerin sekans sonuçları.

DNA	Sekans sonucu
pET28-DrLARP6A La Modül	MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MGTSGGELEE ESWQPPDPEL IQKLVAQIEY YLSDENLEHD AFLLKHVRRN KLGFSVSKLL TSFKKVKHLT RDWRRTAYAL RHSNLELND EGRKVRRRST VPVFAESLP SRMLLSELK RWPELGIALG GDSNNGSGPT QQERLMELL LKAFGNYGPIA SVRVLPKPKD LPADLKKLSG RYSQLGTEEC AIVEFEEVEA AMKAHEAVGG EGGNRGPLGL KVVVIGTKPP KK
pET28-DrLARP6A La Motif	MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MGTSGGELEE ESWQPPDPEL IQKLVAQIEY YLSDENLEHD AFLLKHVRRN KLGFSVSKLL TSFKKVKHLT RDWRRTAYAL RHSNLELND EGRKVRRRST
pET28-DrLARP6A RRM	MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MTPVFASES LPSRMLLSE LKRWPELGIA LGGDSNNGSG PTQQERLMEL LLKAFGNYGP IASRVLPKPG KDLPADLKKL SGRYSQLGTE ECAIVEFEEV EAAMKAHEAV GGEGGNRGL GLKVVVIGTK PPKK
pET28-XmLARP6- NTD-LaModül	MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MMSSEQPPRE ISAPVTITVA IQAAEEDDEP DEEPCNTIE LQTGSGSEDE LGRHDKSSGA GTSGGELEEE SWQPPDPELI QKLVAQIEYY LSDENLEHDA FLLKHVRRNK LGFVSVKLLT SFKKVKHLTR DWRTTAYALR HSNLELND GRKVRRRSTV PVFAESLPS RMLLSELKR WPELGIALGG DSNNGSGPTQ QERLMELLK AFGNYGPIAS VRVLPKPKDL PADLKKLSGR YSQLGTEECA IVEFEEVEAA MKAHEAVGGE GGNRGPLGLK VVIGTKPPK K
pET28-HsLARP6- NTD-LaModül	MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MAQSGGEARP GKPTAVQIRV AIQEAEDVDE LEDEEGAET RGAGDPARYL SPGWGSASEE EPSRGHSGTT ASGENERED LEQEWKPPDE ELIKKLDQI EFYFSDENLE KDAFLLKHVR RNKLGYSVK LLTSFKKVKH LTRDWRTTAH ALKYSVLEL NEDHRKVRRT TPVPLFPNEN LPSKMLLVYD LYLSPKLWAL ATPQKNGRVQ EKVMEHLLKL FGTFGVISSV RILKPGREL PDIRRISSRY SQVGTQECAL VEFEEVEAAI KAHEFMITES QGKENMKAVL IGMKPPKKP
pET28-DrLARP6A- NTD-LaModül	MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MMSSEQPPRE ISAPVTITVA IQAAEEDDEP DEEPCNTIE LQTGSGSEDE LGRHDKSSGA GTSGGELEEE SWQPPDPELI QKLVAQIEYY LSDENLEHDA FLLKHVRRNK LGFVSVKLLT SFKKVKHLTR DWRTTAYALR HSNLELND GRKVRRRSTV PVFAESLPS RMLLSELKR WPELGIALGG DSNNGSGPTQ QERLMELLK AFGNYGPIAS VRVLPKPKDL PADLKKLSGR YSQLGTEECA IVEFEEVEAA MKAHEAVGGE GGNRGPLGLK VVIGTKPPK K

3.2.2. Protein ekspresyonu denemesi

Daha önceki işlemlerde elde edilen plazmidler, rekombinant protein üretimi için Rosetta™ (DE3) pLysS'ye aktarılmıştır. Bu işlem yapılırken protein sentezi için tanımlanan optimal koşullar göz önünde bulundurulmuştur (bakteriyal dizilim, ekspresyon zamanı ve sıcaklığı).

Protein ekspresyonu ve saflaştırılması Castro vd'ye (2017) göre gerçekleştirilmiştir. Miniprep kiti kullanılarak elde edilen DNA (pET28-*Dr* LARP6A La Modül (60-290), pET28-*Dr* LARP6A (1-290), pET28-*Hs* LARP6 (1-300), pET28-*Xm* LARP6 (1-280)) (Çizelge 6) ile Rosetta™ (DE3) pLysS aşırtılmış hücrelerine 30dk buzda inkübasyon uygulanmıştır. 42°C de 45s de hızlı şok uygulanan karışım tekrar buzda inkübasyona alınmıştır. 700µl otoklavlanmış steril LB sıvı besiyeri eklenerek 37°C 60 dk çalkalanma işlemi uygulanmıştır. Bu işlem ile elde edilen hücreler, kanamiyesin ve kloromiyasin antibiyotik eklenerek hazırlanmış LB agar besiyerine ekilerek 1 gece 37°C de inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen hücre kolonileri, kanamisin ve kloromisin antibiyotikleri eklenerek hazırlanmış 50ml LB sıvı besiyerinde 37°C de 24 saat çalkalanarak inkübasyon işlemine alınmıştır. Sonrasında elde edilen kültürden kanamiyesin ve kloromiyesin antibiyotikleri eklenerek hazırlanmış 1L LB besiyerine ekim işlemi yapılmıştır. Hazırlanan kültür 37°C de çalkalama işlemi ile beraber çoğalmaya bırakılmıştır. Bu karışım, OD600 cihazında (Spectronic, Thermo Scientific) 0.5 ve 0.7 (mid-log aralığı) aralığına ulaşınca kadar üremesine izin verilmiştir. İstenilen yoğunluğa ulaşıldıktan sonra kültür buz içinde 15dk tutulmuştur. Protein ekspresyonu 0,1 M İzopropil β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) eklenerek 18°C de 8 saat çalkalama işlemi ile devam etmiştir. Bu süreç içerisinde her iki saatte 1ml örnek alınmış santrifüj işleminden sonra elde edilen çökelti (pelet) -20°C ye konulmuştur. Protein sentezinin başarılı olduğunu göstermek amacıyla N-uçlu His6 ekli protein tanımlanması western blotting yöntemi uygulanarak görüntüleme yapılmıştır.

Elde edilen peletlere 500µl 1X SDS tampon (5X tampon: 0.5 M Tris [pH 7,5, 4°C], 4 mM β-mercaptoethanol 0,4 M SDS) eklenip, %10 polyacrylamide jelde 1X Tris-Glycine tampon (50 mM Tris ve 0,5 M glycine) kullanılarak 200v ta yaklaşık 1 saat yürütme işlemi uygulanmıştır. Elde ettiğimiz jel üzerinde Coomassie mavisi boyaması ve anti-His Western Blot analizi yapılmıştır.

Elde edilen toplam protein içeriğini belirlemek için hazırlanan jel 30dk Coomassie boyasında bekletildikten sonra boya uzaklaştırıcı (destaining) solüsyonda 1 saat bekletilmiştir. Görüntüleme cihazı kullanılarak jel görüntüsü alınmıştır.

Anti-His Western Blot yöntemi protein ekspresyon yönteminin etkinliğini belirleme amacıyla yapılmıştır. Bio-Rad® Trans-Blot Turbo™ Transfer System ve kiti kullanılarak proteinler SDS jelden nitroselüloz membrana Mixed Molecular Weights programı (1,3A 25 V 7dk) kullanılarak transfer edilmiştir. Transfer edildikten sonra, membran 1 saat bovine serum albumin (%10) (BSA) ve TBS-T (TBS (1 litre için: 80gr NaCl, 2 grKCl,30gr Tris Base, 800 ml deiyonize su; TBS-T: %0,05 Tween içerikli 1x Tris-tampon tuz solüsyonu) karışımında tutulmuştur. Yapılan bu bloklama işleminden sonra anti-His probe (Thermo Fisher Scientific) ve TBS-T karışımında 1 saat oda sıcaklığında çalkalama işlemiyle birlikte inkübasyon yapılmıştır. Membranımız 1X TBS-T solüsyonu ile 10 dk iki kez yıkama işlemi yapılmıştır. Ardından TBS solüsyonunda 10 dk yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra membran görüntüleme cihazı için hazırlanan solüsyon (chemiluminescence reagent) (0,1 M Tris (pH 8,8, 25°C), DMSO içinde 1,25 mM luminol, DMSO içinde 2 mM 4-IPBA) ve 12 µl %30 H₂O₂ (Haan ve Behrmann, 2007; Castro vd, 2017) ile inkübasyon yapılmıştır. Son olarak membran görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir.

Çizelge 6. Protein ekspresyonunda kullanılan protein yapısı, ekspresyon plazmid boyu, protein ürününün tahmini boyu, asidik aminoasit % miktarı ve protein ürününün tahmini pI miktarı.

Protein yapısı	Ekspresyon plazmid boyu	Protein ürünün tahmini boyu	Asidik aminoasit (%)	Protein ürünün tahmini pI miktarı
pET28- <i>Xm</i> LARP6 NTD-La Modül (1-280)	6142 bp	33.023 kDa	14,6	6,28
pET28- <i>Dr</i> LARP6A NTD-La Modül (1-290)	6172 bp	35.156 kDa	14,8	5,93
pET28- <i>Hs</i> LARP6 NTD-La Modül (1-300)	6199 bp	36.080 kDa	15,3	6,55
pET28- <i>Dr</i> LARP6A La Modül (60-290)	5995 bp	27.931 kDa	12,3	9,06

3.2.3. Protein saflaştırılması

Proteinler *E. coli*' den konvensiyonel kromatografi yöntemleri (nikel bağlayan kromatografi ve moleküler büyüklüklerine göre tanımlayıcı kromatografi) ile izole edilmiştir. Saflaştırılmış NTD-LaMod proteinleri sınırlayıcı proteoliz ve diferansiyal tarayıcı kalorimetrik yöntemler ile yapısal kararlılıkları analiz edilmiştir. Proteinlerin “*Xm* LARP6 NTD+LaModül (1-280), *Dr* LARP6A NTD+LaModül (1-290), *Hs* LARP6 NTD+LaModül (1-300)” saflaştırılmasında kullanılan kalibrasyon ve seçilen tampon solusyonları Hussain vd (2013) ve Castro vd (2017)'ye göre düzenlenmiştir.

3.2.3.1. Geniş ölçekli protein ekspresyonu

Rosetta™ hücreleri (*Hs* LARP6-NTD-LaModül, *Dr* LARP6A-NTD-LaModül, *Dr* LARP6A La Modül ve *Xm* LARP6-NTD-LaModül) protein saflaştırma işleminde kullanılmıştır. Daha önce transformasyon işlemi sonucu miniprep kiti kullanılarak elde ettiğimiz DNA ve Rosetta™ hücreleri kullanarak katı besi yerinde ürettiğimiz koloniler kullanılmıştır. Kanamisin ve kloromisin antibiyotikleri eklenerek hazırlanmış 50ml LB sıvı besiyerine 1-2 koloni eklenerek 37°C de 24 saat çalkalanarak inkübasyon işlemi yapılmıştır. İşlemi takiben elde edilen kültürden kanamisin ve kloromisin antibiyotikleri eklenerek hazırlanmış 11 LuB besiyerine bir önceki gün elde ettiğimiz sıvı besiyeri kullanarak ekim işlemi yapılmıştır. Hazırlanan kültür 37°C de çalkalama işlemi ile beraber çoğalmaya bırakılmıştır. Bu karışım, OD600 cihazında 0,5 ve 0,7 (mid-log aralığı) aralığına ulaşınca kadar üremesine izin verilmiştir. İstenilen yoğunluğa ulaşıldıktan sonra kültür buz içinde 15dk tutulmuştur. Protein ekspresyonu IPTG eklenerek 18°C de 8 saat çalkalama işlemi ile devam etmiştir. 4°C de 5000 xg de 8dk santrifüj ile hücrelerden elde edilen pelet -20°Cde saklanmıştır.

3.2.3.2. Nikel affinite kromatografisi

Protein ekspresyonu işlemi sonucu elde ettiğimiz peletler öncelikle hazırladığımız Lysis/Wash Tampon (L/WB) ve proteaz inhibitör tableti (Thermo Fisher Scientific) karışımında yeniden süspansiyon edilip 20 atımlık ve 30sn aralıklı 6 döngülük sonikasyon işlemiyle parçalanıp 18000 xg da 4°C de 1dk santrifüj yapılmıştır. Ni²⁺ - agoros tanecikleri öncelikle deiyonize su ile yıkama işlemine tabi tutulduktan sonra

L/WB ve proteaz inhibitör karışımı eklenerek tekrar yıkama işlemi yapılmıştır. Elde ettiğimiz Ni²⁺-agroz tanecikli karışım ile santrifüj işlemi ile parçaladığımız hücreler 1 saat 4°C de çalkalama işlemi uygulanarak inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra bu karışım kolonda 15dk bekletildikten sonra kolondan geçen solüsyon toplanmıştır. Kolona L/WB 1 eklenerek işleme devam edilmiştir. Kolondaki çökelti iki kere WB solüsyonundan geçirilmiştir. Son olarak elüsyon tamponu 6 kez (6x 4ml) tekrar edilerek kolondan geçirilmiştir. Kullanılan tampon solüsyon içerikleri her örnek için ayrı bir şekilde hazırlanmış ve Çizelge 7’de verilmiştir. Elde edilen fraksiyonlara (kısımlar) SDS-PAGE işlemi uygulanıp, Coomessie mavisini ile boyandıktan sonra moleküler görüntüleme cihazı ile jel görüntüsü elde edilmiştir.



Çizelge 7. Pürifikasyon tampon listesi.

Proteinler	Lysis/Wash Tampon #1	Wash Tampon #2	Elution Tampon	SEC Tampon
<i>Dr</i> LARP6A-NTD-La Modül	50 mM Sodium Phosphate pH 8,0 200 mM NaCl 300 mM NaI 500 mM Glucose 10 mM Imidazole	50 mM Sodium Phosphate pH 8,0 200 mM NaCl 300 mM NaI 500 mM Glucose 30 mM Imidazole	50 mM Sodium Phosphate pH 8,0 200 mM NaCl 300 mM NaI 500 mM Glucose 300 mM Imidazole	50 mM Sodium Phosphate pH 8,0 300 mM NaI 500 mM Glucose 200 mM NaCl
<i>Xm</i> LARP6- NTD-La Modül	50 mM Sodium Phosphate pH 8,0 200 mM NaCl 300 mM NaI 500 mM Glucose 10 mM Imidazole	50 mM Sodium Phosphate pH 8,0 200 mM NaCl 300 mM NaI 500 mM Glucose 30 mM Imidazole	50 mM Sodium Phosphate pH 8,0 200 mM NaCl 300 mM NaI 500 mM Glucose 300 mM Imidazole	50 mM Sodium Phosphate pH 8,0 300 mM NaI 500 mM Glucose 200 mM NaCl
<i>Hs</i> LARP6- NTD-La Modül	50 mM Sodium Phosphate pH 7,4 300 mM NaCl 10 mM Imidazole	50 mM Sodium Phosphate pH 7,4 300 mM NaCl 30 mM Imidazole	50 mM Sodium Phosphate pH 7,4 300 mM NaCl 300 mM Imidazole	50 mM Tris+HCl pH 7,4 100 mM NaCl %5 Gliserol 1mM DTT

3.2.3.3. Kütle ayırım kromatografisi

Ni²⁺ afinite kolon ile ayrıştırılan fraksiyonlar SDS-PAGE de görülen band yoğunluklarına göre ait olduğu fraksiyonlar ön yıkama (pre-rinsed) VivaspinTM santrifüj yoğunlaştırıcısı (MWCO 10000, Sartorius) kullanılarak 4000 xg, 4°C ve 10 dk santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. 0,2 µm şırınga filtresi kullanılarak yoğunlaştırılmış protein, S200 büyüklük ayırıştırıcı (size exclusion) kolonu üzerinden, AKTA Pure Fast Protein Liquid Chromatography cihazına (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) yüklenmiştir. Cihaz, 1ml/dk akış hızında toplamda 180 mL ayırışım olacak şekilde ayırışım için ayarlanmıştır. Fraksiyonlar toplanırken UNICORN analiz programı (GE Healthcare) kullanılmıştır. Absorbans değeri A280 ile görüntülenen fraksiyonlar elde edilen sonuçlar esas alınarak alınarak 5x SDS örnek tampona eklenmiştir. Sonrasında ise 90°C'de 5 dakika inkübasyon işlemi uygulandıktan sonra SDS-PAGE ve Coomassie boyama işlemi tanımlamak için kullanılmıştır. Bu işlemden sonra elde edilen jeller görüntüleme cihazında görüntüleme işlemi yapılmıştır. Elde edilen protein 50µl'lik miktarlar (aliquat) şeklinde sıvı azot kullanılarak -70°C de stoklanmıştır.

3.2.4. Sınırlı Protealiz

Dr LARP6 NTD-La Modül, *Xm* LARP6 NTD-La Modül ve *Hs* LARP6 NTD-La Modül proteinlerinin yapısal şekillerini ortaya çıkartmak amacıyla, tripsin enzimi kullanılarak sınırlı (limited) protealiz işlemi yapılmıştır. Nanodrop cihazı ile ölçülen 280 nm de iç absorbans değeri ve yok olma kat sayısı (mol) kullanılarak her bir protein için protein konsantrasyonu hesaplanmıştır (Çizelge 8). Elde edilen sonuç 200µl de 2µmol olacak şekilde hesaplanarak dilüsyon işlemi yapılmıştır. İlk örnek başlangıçta (T₀) alındıktan sonra tripsin (0,1 mg/ml stok konsantrasyonu) eklenmiştir. Bu işlemden sonra 1., 2., 5., 10., 20., 30., 45., 60. ve 120. dakikalarda (T₁, T₂, T₅, T₁₀, T₂₀, T₃₀, T₄₅, T₆₀, T₁₂₀) protein örnekleri alınmıştır. Elde edilen örneklere 5x SDS örnek tampon eklenmiş ve 90°C'de 5 dakika inkübasyon işlemi uygulandıktan sonra -20°C de muhafaza edilmiştir. Elde edilen örnekler SDS-PAGE de yürütülerek (200V, 50dk) elde ettiğimiz jellere gümüş boyama işlemi uygulanmıştır. Boyama işleminden sonra jeller görüntüleme cihazıyla görüntülenmiştir.

Çizelge 8: Protein konsantrasyon değerleri.

Protein	Absorbans Değeri (A_{280nm})	Yok Olma Katsayısı (mol)(ϵ)	Protein Konsantrasyonu ($A_{280nm} = \epsilon \cdot c \cdot l$)
<i>Dr</i> LARP6A-NTD-La Modül	0,260	24075	10,8 μ M
<i>Xm</i> LARP6-NTD-La Modül	0,114	22585	50,5 μ M
<i>Hs</i> LARP6-NTD-La Modül	0,743	32430	22,91 μ M

3.2.5. Elektro mobilite değişim analizi (EMSA, Elektro mobility shift assay)

Saflaştırılmış NTD-La Modül proteinlerinin RNA bağlanma aktiviteleri değerlendirilmesinde EMSA kullanılmıştır. Bu işlem için öncelikle insan LARP6 proteini için RNA ligand tanımlanması yapılmalıdır.

Saflaştırılan NTD-La Modül proteinlerinin karakterizasyonu aynı zamanda her bir protein için izole edilmiş La Modüller ve tam uzunluk LARP6 proteinler ile karşılaştırılmıştır.

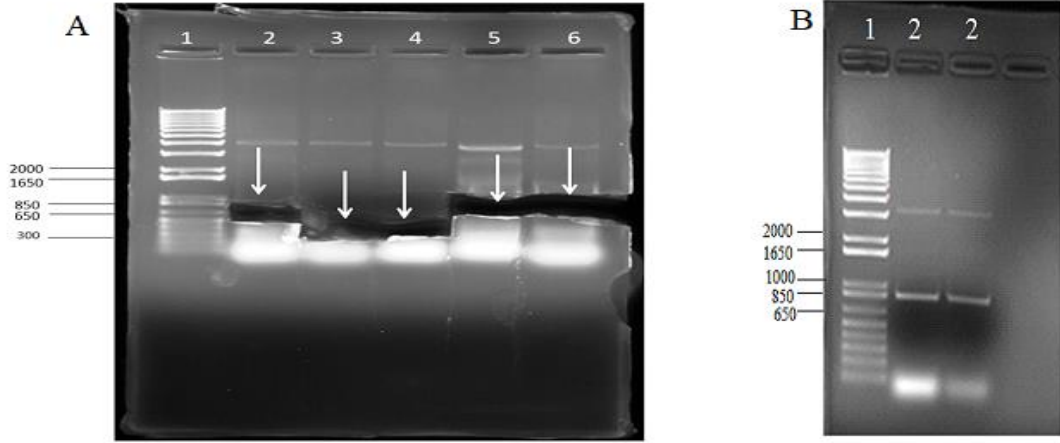
LARP 6 proteini ve RNA ligandları arasındaki bağlanma ilişkisini ölçme amacıyla EMSA testi uygulanmıştır. İlk olarak 10X bağlanma tampon stok hazırlanmış (100 mM Tris-HCl (pH 7,46 4°C'de), 200 mM KCl ve 10 mM MgCl₂) ve -20°C de saklanmıştır. Daha sonra 1X bağlanma tampon + %15 gliserol hazırlanmıştır. Biotinlenmiş RNA 80°C de iki dakika ısıtılmadan önce buz üstünde bekletilmıştir. Protein dilüsyonları 0,5 mL steril otoklav mikrosantrifüj tüplerde gerçekleştirilmıştir. Bağlayıcı tampon (Binding tampon) ve protein (2 mM) karışımına seri bir şekilde dilüsyon işlemi yapılmıştır. Hazırlanan dilüsyon karışımlarına RNA dilüsyonları eklenip, bir saat dengeye ulaşması için buz üzerinde inkübasyon uygulanmıştır. Hazırlanan reaksiyonlar %5,5'luk poliakrilemit Jele yüklenmiştir. 200 V ve 15 dakikada -70°C de 1X TBE (tris-borate-EDTA) tampon uygulanarak elektroforez yapılmıştır. Elektroforez işleminin çalışıp çalışmadığını kontrol için %50 sukroz bromofenol mavi solüsyonuda elektroforez işlemine yüklenmiştir. Daha sonra protein RNA kompleksi Transblot Turbo (25 V, 1.0 A, 30 dk) işlemi ile Hybond-N+ membranına aktarılmıştır. Sonrasında ise 45 saniye, 120

mJ/cm² UV kullanıldıktan sonra bir gece kurumaya bırakılmıştır. Biotinlenmiş RNA, LightShift RNA EMSA Chemiluminescence Nucleic Acid Detection Module (ThermoScientific) kullanılarak saptanmıştır. Bunu takiben membranlar ChemiDoc XRS+moleküler imager cihazında kemiluminesens protokolü ile görüntülenmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. *Danio rerio*, *Xiphophorus maculatus* ve *Homo sapiens* Türlerine Ait Klonlama sonuçları

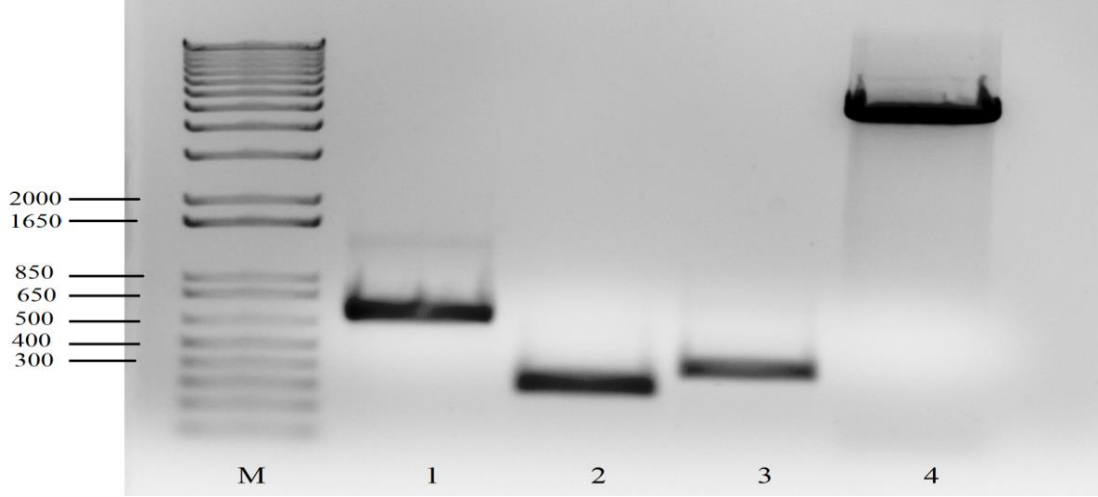
Zebra balığı (*D. rerio*), plati balığı (*X. maculatus*) ve insan (*H. sapiens*) örnekleri için kullanılan ekspresyon vektörü Castro vd (2017) tarafından açıklandığı gibi elde edilmiş ve deneylerimizde kullanılmıştır. Altı adet yapı elde edilmiştir: Bu altı yapıdan ilk üçü her bir LARP6 proteininin NTD-La Modül yapılarını içerir [*Xm* LARP6 (1-280) proteini, *Hs* LARP6 (1-300) proteini, *Dr* LARP6A (1-290) proteini]. İkinci gruptaki yapılar ise zebra balığı LARP6A yapısına ait kısımlardan (fragment) oluşur [*Dr* LARP6A La Modül (60-290) proteini, *Dr* LARP6A La Motif (60-157) proteini ve *Dr* LARP6A RRM (175-290)]. Proteinlerin kodlama dizinlerini çoğaltmak için PCR yöntemi kullanılmıştır (Çizelge 3). Oluşan PCR sonuçları % 0,8 agaroz jel elektroforezi ile saflaştırılmıştır. *Hs* LARP6 (1-300) proteini ve *Dr* LARP6A (1-290) proteini, *Dr* LARP6A La Modül (60-290) proteini, *Dr* LARP6A La Motif (60-157) proteini ve *Dr* LARP6A RRM (175-290) PCR sonucu Şekil 4.1.A'da gösterilmiştir. Şekil 4.1.B ise *Xm* LARP6 (1-280) kodlama sekansının agaroz jel elektroforezinin (% 0,8 konsantrasyon) sonuçlarını göstermektedir. Protein ekspresyon plasmidini oluşturmak için, PCR ürünleri ve plasmid vektörünün her biri NdeI ve XhoI sınırlar enzimleri ile çift taraflı kesilmiştir (Şekil 4.2). Kesilen ürünler tekrar % 0,8 jel elektroforezde yürütüldükten sonra saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Jel ekstraksiyonundan sonra, her iki ucu kesilmiş olan DNA parçaları plasmid ile birlikte bağlandıktan sonra bakterilere transformasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.1 Band ekstraksiyonundan sonraki PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. (A) DNA markır (1) , Dr LARP6a La Modül (2) , Dr LARP6a La Motif (3) , Dr LARP6a RRM (4), Hs LARP6 NTD-La Modül (5) , Dr LARP6a NTD-La Modül (6). (B) DNA markır (1) Xm LARP6-NTD-La Modül, (2) ve (3). Jeldeki bant aralıkları Dr LARP6a La Modül için ~717 bp, Dr LARP6a La Motif için ~324 bp, Dr LARP6a RMM için ~423 bp, Hs LARP6-NTD-La Modül için ~985 bp, Dr LARP6a-NTD-La Modül için ~894 bp ve Xm LARP6-NTD-La Modül için ~864 bp'dir.

Jeldeki bant aralığı beklentimiz doğrultusunda aralığında gözlenmiştir. Dr LARP6a La Modül , Dr LARP6a La Motif , Dr LARP6a RRM , Hs LARP6 NTD-La Modül , Dr LARP6a NTD-La Modül ve Xm LARP6-NTD-La Modül protein DNA sı Çizelge 1'de verilen primerler ile protein ile ilgili olan bölge (kodlanan sekans) kullanılarak çoğaltma işlemi yapılmıştır.

Protein kodlama DNA'sı ve plasmid DNA'sını iki taraflı NdeI ve XhoI enzimleri kullanarak yapılan kesme işlemi sonrası agaroz jelde yürütme işlemi yapılmıştır (Şekil 4.2).



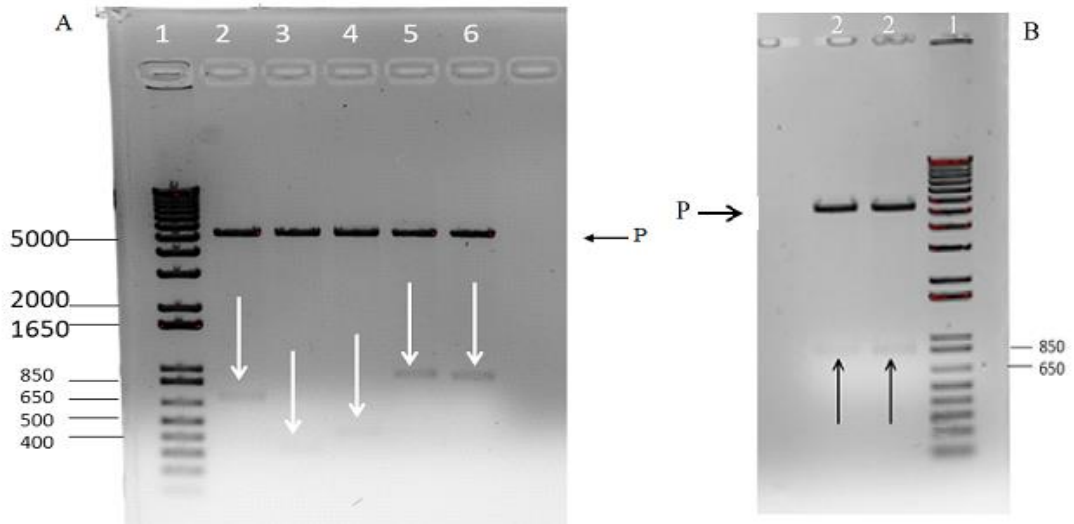
Şekil 4.2. Protein kodlama DNA'sı ve plazmid DNA'sının iki taraflı NdeI ve XhoI enzimleri kullanılarak yapılan kesme işleminden sonra agaroz jelde yürütme işlemi. (M) markır, (1) *Dr* LARP6a La Modül, (2) *Dr* LARP6a La Motif, (3) *Dr* LARP6a RRM (4) plazmid DNA (pET28a, ~5360 bp). Band aralıkları *Dr* LARP6a La Modül için ~717bp, *Dr* LARP6a La Motif için ~324bp, *Dr* LARP6a RRM için ~423bp ve plazmid DNA (pET28a) ~5360 bp olarak gözlemlenmiştir.

Transformasyon işlemi sonucu Kanamisin antibiyotiği içeren LuB agar plate ekilen *E. coli* 37°C'de bir gece inkübasyondan sonra koloniler gözlemlenmiştir. Bu da transformasyon işleminin başarıyla gerçekleştiğinin göstergesidir. Bu işlemden sonra plazmid DNA'sını ekstrakt edebilmek için DNA miniprep işlemi QIAprep Spin Miniprep kit uygulanarak elde edilmiştir. Miniprep protokolü başarı ile uygulandıktan sonra nanodrop ile konsantrasyon ölçümü yapıldıktan sonra etiketleme işlemi ile birlikte -20°C'de plazmid DNA'larımız bir sonraki işlem uygulanmak amacıyla saklanmıştır.

Xm LARP6 (1-280) proteini, *Hs* LARP6 (1-300) proteini, *Dr* LARP6a (1-290) proteini, *Dr* La Modül LARP6a (60-290) proteini, *Dr* LARP6a La Motif (60-157) proteini, *Dr* LARP6a RRM (175-290) proteinlerinin çift taraflı (NdeI/XhoI) enzimleri kullanılarak kesilmesi sonucu plazmid DNA'sına aktarılmasından sonra gerekli kontrol çalışması yapılmıştır.

Saflaştırma işlemini gerçekleştireceğimiz plazmidlerin doğru yapı içeriğine sahip olduğunu anlamak amacıyla NdeI/XhoI enzimleri kullanılarak küçük ölçekli iki

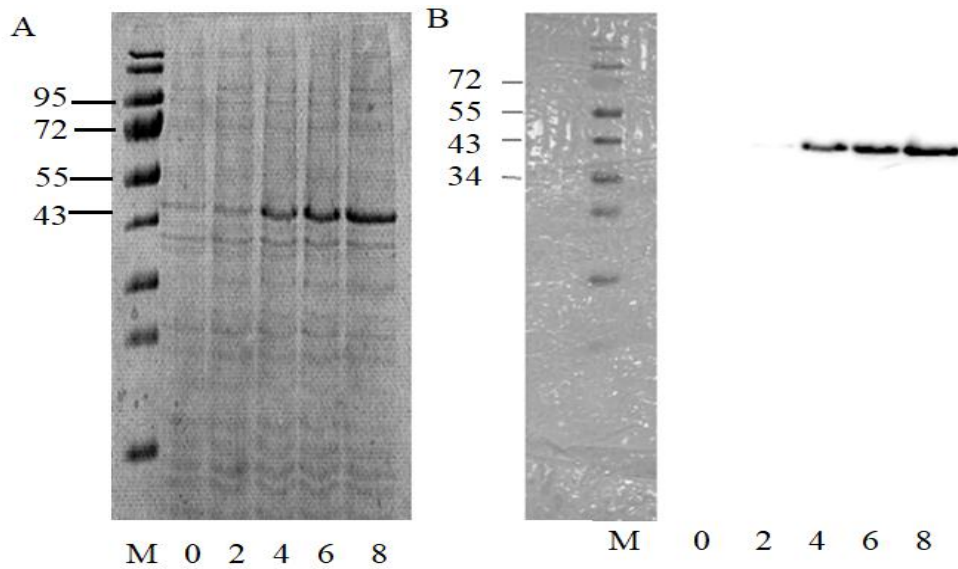
uçlu kesme işlemi yapılmıştır. Bir önceki deneyde elde ettiğimiz yapı ve plazmid doğru şekilde birleşme işlemi olmuş ise bu basamakta agaroz jelde çift taraflı kesme işlemi sonucu iki adet bant oluşumu gerçekleşmelidir. Bunlardan bir tanesi elde etmek istediğimiz yapı büyüklüğünde ve diğer bantta plazmidin büyüklüğünde olmalıdır. Bu deneyde tüm yapılarımız beklediğimiz bant büyüklüğünde çıkmıştır bu da kesme ve birleştirme prosedürümüzün başarılı şekilde gerçekleştiğini doğrulamıştır. Şekil 4.3'de bu doğrulama çalışmasının agaroz jeldeki (% 0,8 konsantrasyonunda) görüntüsü verilmiştir. Test ettiğimiz plazmid örneği ve DNA bölgelerinde elde edilen bütün bantların beklenen bölgedeki doğru büyüklükte ortaya çıktığını göstermiştir. Bu da yaptığımız ligasyon işleminin başarısını kanıtlamıştır. Bu işlemden sonrasında plazmidlerimiz sekans doğrulaması için Sanger firmasına gönderilmiştir (Genewiz, Inc).



Şekil 4.3. LARP6 proteinini kodlayan bölge DNA'sı ve plazmid DNA'sı (P) ile klonlama işlemi yapıldıktan sonra yapılan kontrol çalışması. (A): (1) markır, (2) *Dr* LARP6a La Modül (60-290), (3) *Dr* LARP6a La Motif (60-157), (4) *Dr* LARP6a RRM (175-290), (5) *Hs* LARP6 (1-300), (6) *Dr* LARP6a (1-290). Band aralıkları *Dr* LARP6a La Modül (60-290) için ~717bp, *Dr* LARP6a La Motif (60-157) için ~324bp, *Dr* LARP6a RMM (175-290) için ~423bp, *Hs* LARP6 (1-300) ~985bp, *Dr* LARP6a ~894bp dir. (B): (1) Protein markırı, (2), (2) *Xm* LARP6 (1-280) (aynı örnek iki kez jele yüklenmiştir) protein ilgili sekans kod bölgesi ve plazmid DNA'sı ayrıştırılarak yapılan kontrol çalışması.

DNA parçacığı ve plasmid beklendiği gibi ayrıştırılmış ve beklenen bölgelerde bant aralıkları gözlenmiştir. Jeldeki bant aralığı beklentimiz doğrultusunda *XmLARP6* (1-280) için ~864 aralığında olup plasmid ve protein ile ilgili sekans bölgesi parçacığının ayrışması ile bantlar beklenen bölgede görünmüştür.

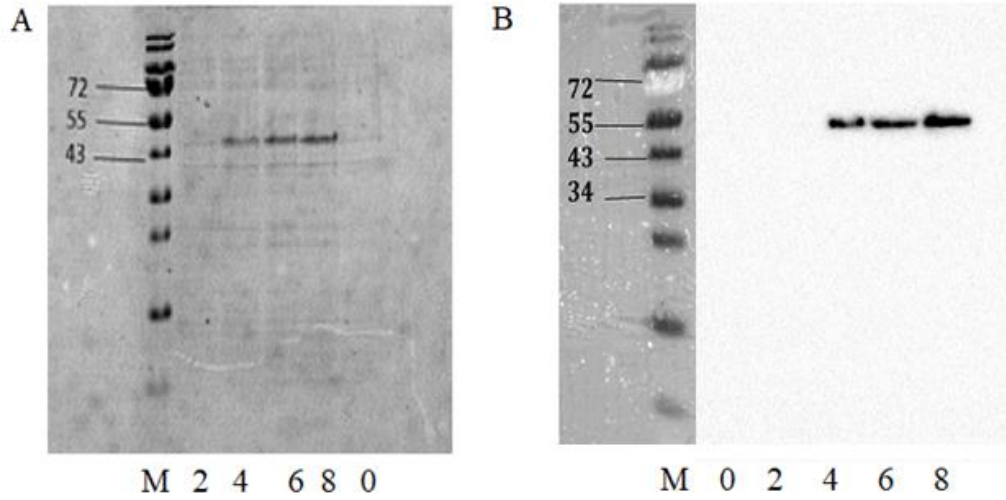
LARP6 NTD-La Modül proteinleri ve *Dr LARP6a* La Modülü için ekspresyon çalışması yapılmıştır. Rosetta™ (DE3) pLysS kompedan hücreleri insan *Hs LARP6* proteininin ekspresyonunda temel bir yönlendirmeye sahiptir. *X. maculatus* ve *D. rerio* balıkları LARP6 proteinleri için aynı yöntem kullanılmıştır (Şekil 4.4-4.7).



Şekil 4.4. *Dr LARP6a* (1-290) proteinin Rosetta™ (DE3) pLysS kompedan hücresi kullanılarak yapılan ekspresyon çalışması. (A) Coomassie boyası ile boyanmış, (B) anti-His western blot yöntemi. Not: Y eksenini kDa ve X eksenini saat olarak verilmiştir. (M, markır).

Yapılan bu çalışmada öncelikle His6-tagged bileşeni içeren rekombinant DNA protein bileşeni Rosetta (DE3) *E. coli* kompedan hücreleri kullanarak eksprese edilmiştir (Şekil 4.4). Bu işlem sırasında *E. coli* çalmasını indirmek amacıyla 1mM IPTG kullanılmıştır. 8 saat süre ile uygulanan 18°C de inkübasyon işlemi süresince düzenli her iki saat aralığında (0., 2., 4., 6. ve 8. saatte) örnekleme çalışması yapılmıştır. Belirli aralıklarla elde ettiğimiz hücreler 1x SDS-PAGE tampon kullanarak parçalanmıştır. Elde ettiğimiz örnekler Coomassie boyası (Şekil 4.4A) ve

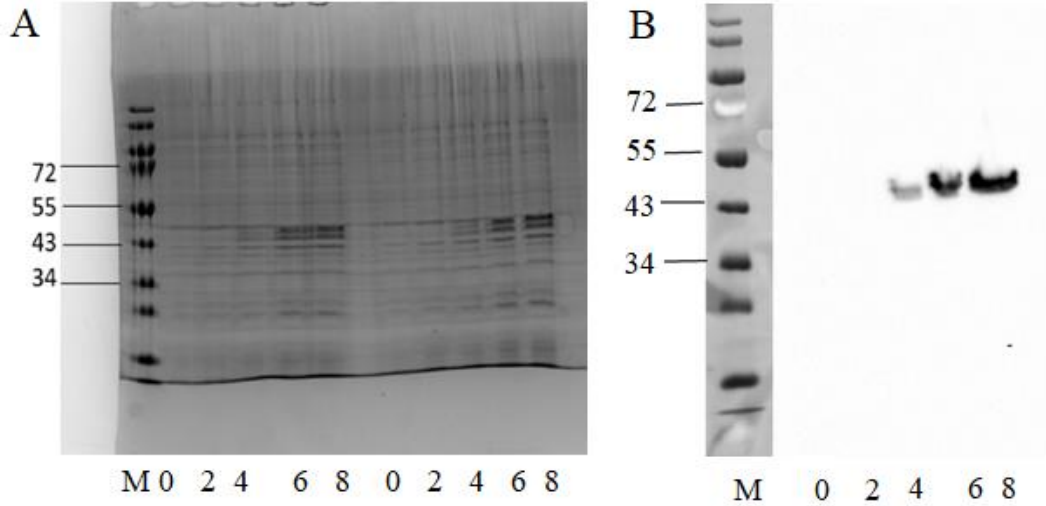
SDS-PAGE yöntemi kullanılmış ve anti-His western blot yöntemi uygulanmıştır (Şekil 4.4B). Elde edilen görüntülerde ~43-45 kDa seviyesinde, bantlarımız görüntülenmiş ve ilerleyen zamanlarda bantdaki yoğunluk artarak devam etmiştir. Bu da bize inkübasyon zamanındaki artış ile birlikte ekspresyon işleminin gerçekleştiğini ifade etmektedir.



Şekil 4.5. *Hs* LARP6 (1-300) proteinin Rosetta™ (DE3) pLysS kompedan hücresi kullanılarak yapılan ekspresyon çalışması. (A) Coomassie boyası ile boyanmış, (B) anti-His western blot yöntemi. Not: Y ekseni kDa ve X ekseni saat olarak verilmiştir. (M, markır).

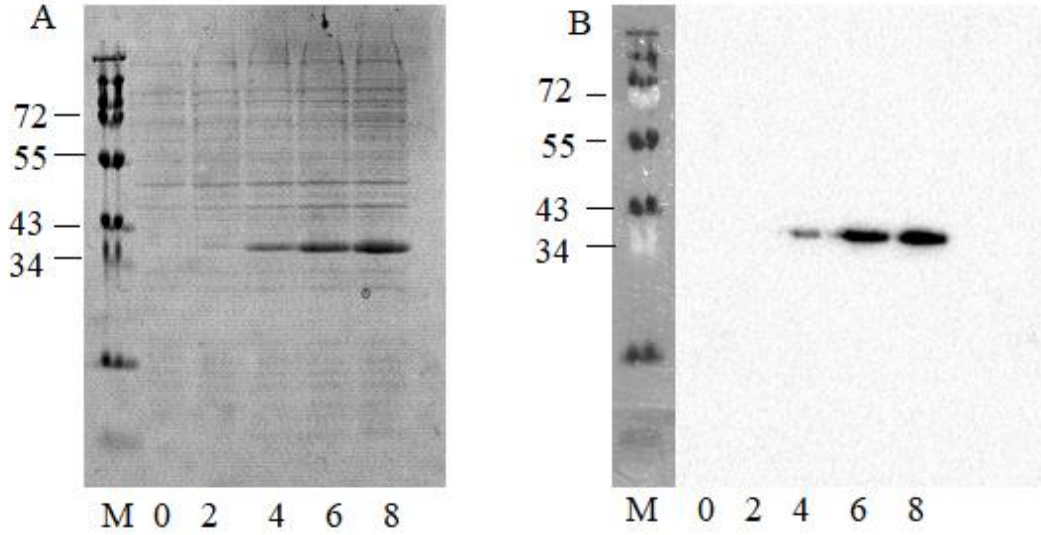
Yapılan bu çalışmada öncelikle His6-tagged bileşeni içeren rekombinant DNA protein bileşeni Rosetta (DE3) *E. coli* kompedan hücreleri kullanarak eksprese edilmiştir. Bu işlem sırasında *E. coli* çağalmasını indirgemek amaçlı 1mM IPTG kullanılmıştır. 8 saat süre ile uygulanan 18°C de inkübasyon işlemi süresince düzenli her iki saat aralığında (0., 2., 4., 6. ve 8. saatte) örneklendirme çalışması yapılmıştır. Belirli aralıklarla elde ettiğimiz hücreler 1x SDS-PAGE tampon kullanarak parçalanmıştır. Elde ettiğimiz örnekler SDS-PAGE yöntemi kullanılmış Coomassie boyası (Şekil 4.5A) ve anti-His western blot yöntemi (Şekil 4.5B) uygulanmıştır. Elde edilen görüntülerde ~50 kDa seviyesinde bantlarımız görüntülenmiş ve ilerleyen zamanlarda bantdaki yoğunluk artarak devam etmiştir. Bu da bize

inkübasyon zamanındaki artış ile birlikte ekspresyon işleminin gerçekleştiğini ifade etmektedir.



Şekil 4.6. *Xm* LARP6 proteininin Rosetta™ (DE3) pLysS kompedan hücresi kullanılarak yapılan ekspresyon çalışması. (A) Coomassie boyası ile boyanmış, (B) anti-His western blot yöntemi. Not: Y eksenini kDa ve X eksenini saat olarak verilmiştir. (M, markır).

Yapılan bu çalışmada öncelikle His6-tagged bileşeni içeren rekombinant DNA protein bileşeni Rosetta™ (DE3) *E. coli* kompedan hücreleri kullanarak eksprese edilmiştir. Bu işlem sırasında *E. coli* çoğalmasımı indirmek amacıyla 1mM IPTG kullanılmıştır. 8 saat süre ile uygulanan 18°C de inkübasyon işlemi süresince düzenli her iki saat aralığında (0., 2., 4., 6. ve 8. saatte) örneklendirme çalışması yapılmıştır. Belirli aralıklarla elde ettiğimiz hücreler 1x SDS-PAGE tampon kullanarak parçalanmıştır. Elde ettiğimiz örnekler SDS-PAGE yöntemi kullanılmış, Coomassie boyası (Şekil 4.6A) ile boyanmış ve anti-His western blot yöntemi (Şekil 4.6B) uygulanmıştır. Elde edilen görüntülerde ~50 kDa seviyesinde bantlarımız görüntülenmiş ve ilerleyen zamanlarda bantdaki yoğunluk artarak devam etmiştir. Bu da inkübasyon zamanındaki artış ile birlikte ekspresyon işleminin gerçekleştiğini ifade etmektedir.



Şekil 4.7. *Dr* LARP6A La Modül (60-290) proteinin Rosetta™ (DE3) pLysS kompedan hücresi kullanılarak yapılan ekspresyon çalışması. (A) Coomassie boyası ile boyanmış, (B) anti-His western blot yöntemi. Not: Y eksenini kDa ve X eksenini saat olarak verilmiştir. (M, markır).

Yapılan bu çalışmada öncelikle His6-tagged bileşeni içeren rekombinant DNA protein bileşeni Rosetta™ (DE3) *E. coli* kompedan hücreleri kullanarak eksprese edilmiştir. Bu işlem sırasında *E. coli* çalğalmasını indirmek amacıyla 1mM IPTG kullanılmıştır. Sekiz saat süre ile uygulanan 18°C de inkübasyon işlemi süresince düzenli her iki saat aralığında (0., 2., 4., 6. ve 8. saatte) örneklendirme çalışması yapılmıştır. Belirli aralıklarla elde ettiğimiz hücreler 1X SDS-PAGE tampon kullanarak parçalanmıştır. Elde ettiğimiz örnekler SDS-PAGE yöntemi kullanılmış, Coomassie boyası (A) ve anti-His western blot yöntemi (B) uygulanmıştır. Elde edilen görüntülerde ~36 kDa seviyesinde bantlarımız görüntülenmiş ve ilerleyen zamanlarda bantdaki yoğunluk artarak devam etmiştir. Bu da bize inkübasyon zamanındaki artış ile birlikte ekspresyon işleminin gerçekleştiğini ifade etmektedir.

Ekspresyon yaptığımız *Hs* LARP6 NTD-La Modül (1-300), *Xm* LARP6-NTD-La Modül (1-280), *Dr* LARP6a-NTD-La Modül (1-290) ve *Dr* LARP6a (60-290) La Modül örneklerinin molekül ağırlıkları sırasıyla 36.080 kDa, 33.023 kDa, 34.156 kDa ve 27.931 kDa'dır. Yaptığımız jel yürütme çalışmasında bantlar bu büyüklükte olmasına rağmen, bantlar *Hs* LARP6 (1-300) NTD La Modül yapılarının, *Xm* LARP6 (1-280) NTD La Modül yapısı ve *Dr* LARP6a (1-290) NTD La Modül

yapısı için ~48 kDa bant aralığında gözlenirken, *Dr LARP6* La Modül (60-290) için ~37 kDa büyüklüğünde ortaya çıkmıştır.

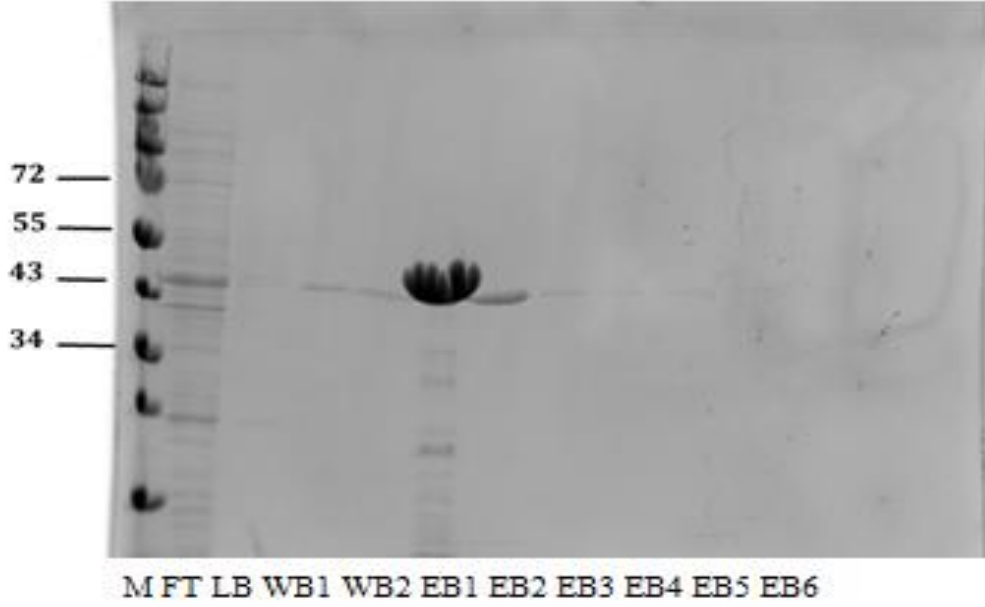
Diğer bir deyişle proteinler SDS-PAGE üzerinde yaklaşık olarak tahmin ettiğimiz moleküler ağırlıktan 10 kDa daha büyük miktarda görünmüştür. Protein moleküler ağırlıklarına göre yapılan ayrıştırma analizleride kullandığımız SDS-PAGE yöntemi negatif yükten pozitif yüke doğru hareket eden bir yöntemdir. Aynı zamanda analizde kullanılan tampon içerisindeki SDS negatif yüklüdür ve proteinin hidrofobik alanlarına bağlanarak yoğun ve kıvrımlı şekilde bulunan proteinin açılmasını sağlar.

Aynı zamanda SDS tampon içinde bulunan yükler proteinimizi oluşturan aminoasit yüzeylerini kaplayarak jelin üst bölgelerinde kalmasına neden olur. Guan vd (2015) tarafından yapılan çalışmada geliştirdikleri bir metotta SDS-PAGE' de gerçekte olan ve görünen moleküler ağırlık arasındaki farkın proteinin sahip olduğu negatif yükün sebep olup olmadığını ortaya çıkarmaya çalışmışlardır. Guan vd (2015)' ne göre $y=276.5x-31.33$ (x =asidik aminoasitlerin yüzdesi ($11.4\% \leq x \leq 51.1\%$ aralığında olmalı, y = her aminoasit için ortalama molekül ağırlığı) formülü uygulanarak beklenen molekül ağırlığı ile gözlelediğimiz molekül ağırlığı arasındaki fark hesaplanabilmektedir. Fakat araştırmacıların bu yaptıkları araştırmaları da bu bilgiyi desteklememektedir. Aynı hesaplama yaptığımız deneylere de uygulandığında aradaki fark 2.76 kDa olarak ortaya çıkmıştır ve bu da verilen bilgiyi doğrulamamaktadır. Hesaplanan bu fark beklenen ve ortaya çıkan moleküler ağırlık arasında var olan 10 kDa farktan oldukça küçük bir değerdir. Bu bilgilere dayanarak beklenen molekül ağırlığı ile jelde görüntülenen bantlar protein izoelektrik değerinin (pI) yeterince asidik olmamasından dolayı sonucu orantılı çıkmamıştır olarak yorumlanmıştır ve sonuç anlamlı çıkmamıştır. Proteinimizin ağırlığı ile asidik amino asitlerin toplamının yüzdesi ile SDS-PAGE de gözlenen moleküler ağırlık arasında doğrusal bir bağlantı vardır. Bir proteinin moleküler ağırlığı kendisini oluşturan aminoasit içeriğine bağlıdır. Aynı zamanda içerdikleri aminoasitlere bağlı olarak eksi ya da artı yüke sahiptirler. Bu aminoasitler içerisinde asıl belirleyici faktör ise hidrofobik aminoasit olan aspartik asit ile glutamik asit yüzdeleri toplamıdır. Bu bilgilere dayanarak beklenen molekül ağırlığı ile jelde görüntülenen bantlar anlamlı çıkmıştır.

Guan vd (2015) asidik aminoasit yüzdesi 11,4% and 51,1% arasında olan aminoasitler için uygun çalışabilen bir model önermelerine rağmen bizim LARP6 proteinimizde ise bu değerler 12,3 % ile 15,3 % arasında asidik aminoasit yüzdesine sahiptir. Guan modelinin bizim proteinimiz için uygun bir model olmadığı anlaşılmaktadır. Çalışılan proteinlerin pI değerleri arasında farklılıklar olduğu görülmektedir. Sundukları model % 10,3 asidik aminoasit yüzdesi içeren bir proteini doğru bir şekilde tahmin ederken, bu protein 8,6 pI değerine sahiptir. LARP6 proteinlerinin pI değerleri hesaplandığında 5,93 – 9,06 olarak bulunmuştur. Bu değerler asidik proteinlerin sınır çizgisine denk gelirken, bazıları Guan analizine uygun olup, bazıları olmamaktadır. Dikkate alınması gereken değişkenler (asidik aminoasit ile pI değeri) sadece proteinlerin ikincil yapısına ait asidik aminoasitler değil proteinlerin negatif yük dağılımlarıdır.

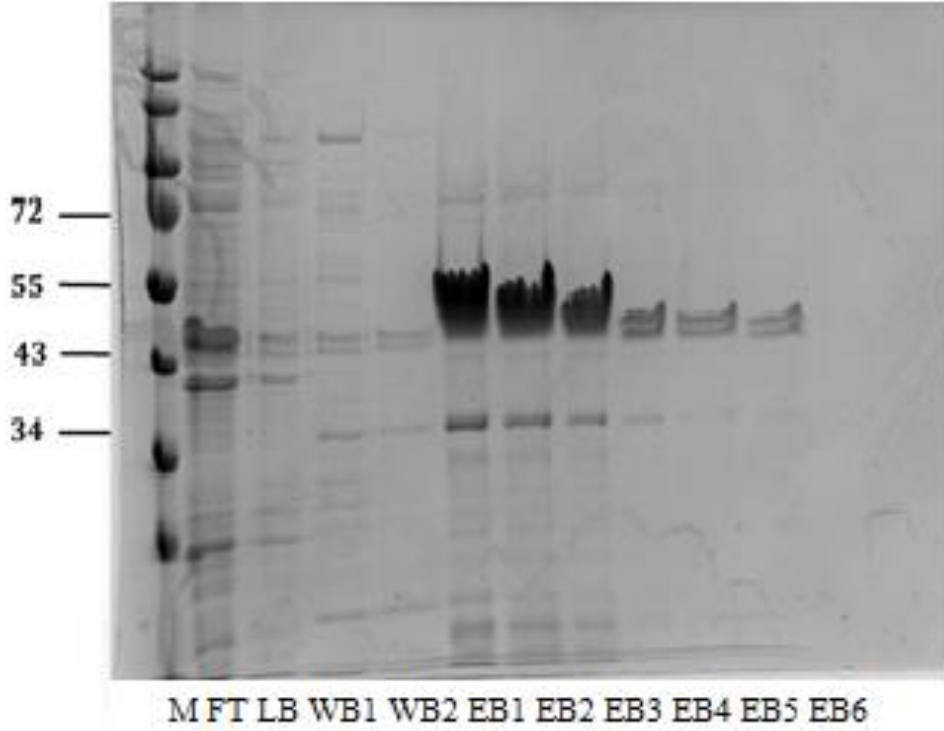
Proteinlerin saflaştırılması (*Hs* LARP6 (1-300), *Xm* LARP6 (1-280), *Dr* LARP6a (1-290): *Hs* LARP6 (1-300), *Xm* LARP6 (1-280) ve *Dr* LARP6A (1-290) proteinlerinin saflaştırılması uygun tamponların optimizasyonu ile mümkündür. Ekspresyon işlemi için Rosetta™ (DE3) *E. coli* hücreleri kullanarak hücre kültürü sonucu elde ettiğimiz peletler LB ile (*Xm* LARP6 (1-280) ve *Dr* LARP6a (1-290): için 50 mM sodyum fosfat pH 8,0, 200 mM NaCl, 300 mM NaI, 500 mM glukoz, 10 mM imidazol; *Hs*LARP6 (1-300): için 50 mM sodyum fosfat pH 7,4, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol içeren LB kullanılmıştır) sonikasyon işlemi uygulaması ile parçalanma işlemi yapıldıktan sonra nikel affinite kromografi işlemi için daha önceden Castro vd (2017) tarafından denenmiş tamponlar seçilmiş ve başarıyla uygulanmıştır. Churion vd'ye (2012) göre tampon seçimi yapılırken öncelikli olarak hangi kimyasal maddelerin çözünürlüğü artıracığı birinci konu iken optimal kimyasalların ve en iyi konsantrasyon seviyelerini belirlenmesi protein saflaştırma ve karakterizasyon çalışmalarının temel noktalarından bir tanesidir. 300 mM NaI ve 500 mM glukoz proteinde purifikasyon işleminde çözünürlüğü artırmakta ve balık proteinlerinde oluşabilecek bozulmaları en aza indirmektedir. Nikel affinite işlemi sonucu elde ettiğimiz fraksiyonlara jel elektroforez işlemi yapılmış daha sonra Coomassie boyası ile boyanmıştır. Elüsyon tampon (EB) içinde kullanılan yüksek konsantrasyondaki imidazolden faydalınarak LARP6 proteinlerinin nikel resineden (reçine) ayrılması sağlanmıştır.

Hs LARP6 (1-300) proteini için EB1; *Xm* LARP6 (1-280) ve *Dr* LARP6a (1-290) proteinleri için EB1, EB2, EB3 alınmıştır (Şekil 4.8., 4.9 ve 4.10.). Bir araya toplanan elüsyon fraksiyonları moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılmak üzere kullanılan kromatografik yöntem için yoğunlaştırılarak hazırlanmıştır.



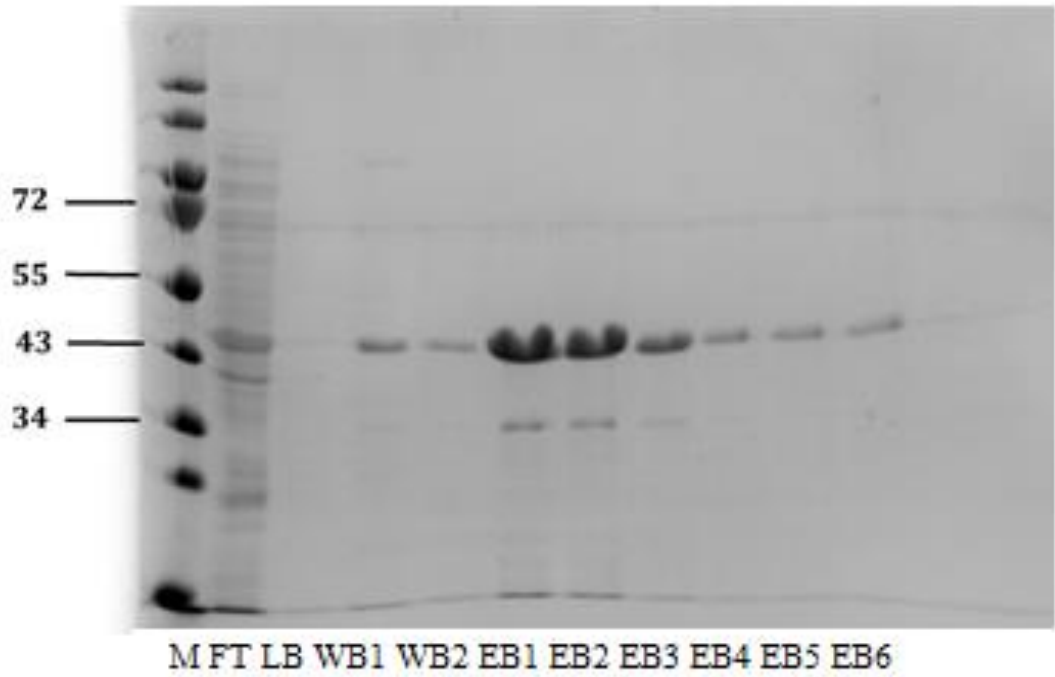
Şekil 4.8. *Hs* LARP6 (1-300) proteininin afinite kromatografi fraksiyonlarının görünümü: Kısaltmalar: M, markır; FT, doğrudan akış (Tampon uygulaması öncesi); LB, lizis tampon; WB, yıkama solüsyonu; EB, elüsyon tampon. Not: Y eksenı kDa.

Elde edilen fraksiyonlar jel elektroforez yöntemi ile ayrıştırılmış ve Coomassie boyası ile boyanmıştır. Elüsyon tampon 1 direkt olarak hiç bir işlem yapılmadan daha detaylı saflaştırma işlemi amacıyla AKTA Pure Fast Protein Liquid Chromatography cihazına yüklenmiştir. 42-43 kDa aralığında görünen bant *Hs* LARP6 (1-300) proteininin yapısıyla uyumlu olduğu görünmüş ve istenen protein büyüklüğü olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4.9. *Xm* LARP6 (1-280) proteininin afinite kromotografi fraksiyonlarının görünümü: Kısaltmalar: M, markır; FT, doğrudan akış (Tampon uygulaması öncesi); LB, lizis tampon; WB, yıkama solüsyonu; EB, elüsyon tampon. Not: Y eksenı kDa.

Elde edilen fraksiyonlar jel elektroforez yöntemi ile ayrıştırılmış ve Coomassie boyası ile boyanmıştır. Elüsyon tampon 1, elüsyon tampon 2 ve elüsyon tampon 3 tek bir havuzda toplanıp konsantrasyonu homojen hale getirildikten sonra Vivaspın™ santrifüj yoğunlaştırıcısı (MWCO 10000, Sartorius) kullanılarak 4000 xg, 4°C’de 5 dakika santrifüj işleminden sonra daha detaylı saflaştırma işlemi amacıyla AKTA Pure Fast Protein Liquid Chromatography cihazına yüklenmiştir. Yaklaşık olarak 45 kDa aralığında görünen bant *Xm* LARP6 (1-280) proteininin yapısıyla uyumlu olduğu görünmüş ve istenen protein büyüklüğü olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4.10. *Dr* LARP6A (1-290) proteininin afinite kromatografi fraksiyonlarının görünümü. Kısaltmalar: M, markır; FT, doğrudan akış (Tampon uygulaması öncesi); LB, lizis tampon; WB, yıkama solüsyonu; EB, elüsyon tampon. Not: Y ekseni kDa.

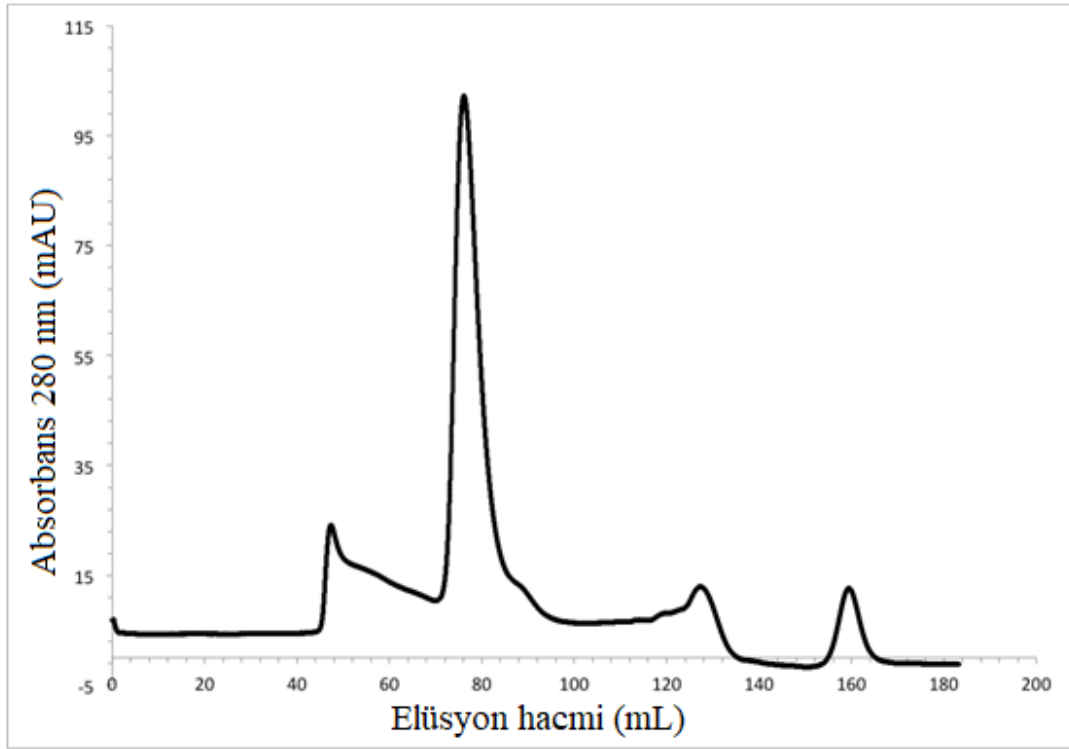
Elde edilen farksiyonlar jel elektroforez yöntemi ile ayrıştırılmış ve Coomassie boyası ile boyanmıştır. Elüsyon tampon 1, elüyon tampon 2 ve elüsyon tampon 3 tek bir havuzda toplanıp konsantrasyonu homojen hale getirildikten sonra VivaspinTM santrifüj yoğunlaştırıcısı (MWCO 10000, Sartorius) kullanılarak 4000 xg, 4°C'de 5 dakika santrifüj işleminden sonra daha detaylı saflaştırma işlemi amacıyla AKTA Pure Fast Protein Liquid Chromatography cihazına yüklenmiştir. Yaklaşık olarak 43 kDa aralığında görünen bant *Dr* LARP6a (1-290) proteininin yapısıyla uyumlu olduğu görünmüş ve istenen protein büyüklüğü olduğu anlaşılmıştır.

4.2. Büyüklük Ayrıştırma Kromatografisi

Büyüklüğe dayalı ayrıştırma kromatografisi (size exclusion chromatography) kullanılarak ek bir saflaştırma işlemi (nikel-saflaştırma) sonucu elde edilen proteinlere uygulanmıştır. Bu işlem yapılırken Sephadex 200 jel kolonu kullanılmıştır. Bu yöntem iki işlevi gerçekleştirir: (1) Elüsyon fraksiyonlarında

bulunan yüksek konsantrasyondaki imidazolü uzaklaştırır ve (2) karışım içinde bulunan proteinleri büyüklüklerine göre ayırır. Buda kümelenmiş ve monomerik proteinlerin ayrılmasına izin verir.

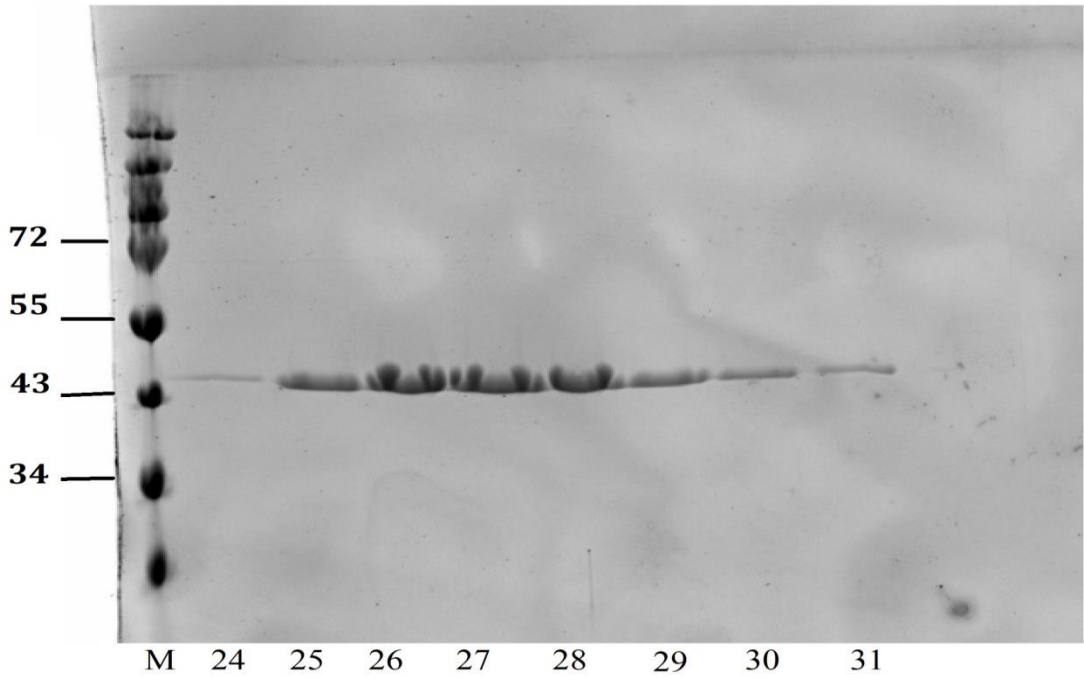
Şekil 4.11’de *Hs* LARP6 (1-300) örneği için elüsyon tamponunun kullanıldığı fraksiyonlar yaklaşık olarak 42-43 kDa seviyelerinde ortaya çıkmıştır. Şeklimizde çok açıkça görülmektedir ki elüsyon tampon 1’de ortaya çıkan bant proteinimizin yoğun bir şekilde tek bir fraksiyonda oldukça yoğun ve proteinde herhangi bir bozulma göstergesi olmadan düzgün bir şekilde işlemin gerçekleştiğini göstermektedir. Bu nedenle elüsyon tampon 1 ile elde ettiğimiz fraksiyon doğrudan olarak AKTA Pure Fast Protein Liquid Chromatography cihazına (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) yüklenmiş S200 Sephadex kolonu ile büyüklük ölçekli kromatografi yöntemi kullanılmıştır.



Şekil 4.11. *Hs* LARP6 NTD ve La Modül (1-300)’ ün S200 büyüklüğe dayalı ayırıştırma kromatografisi.

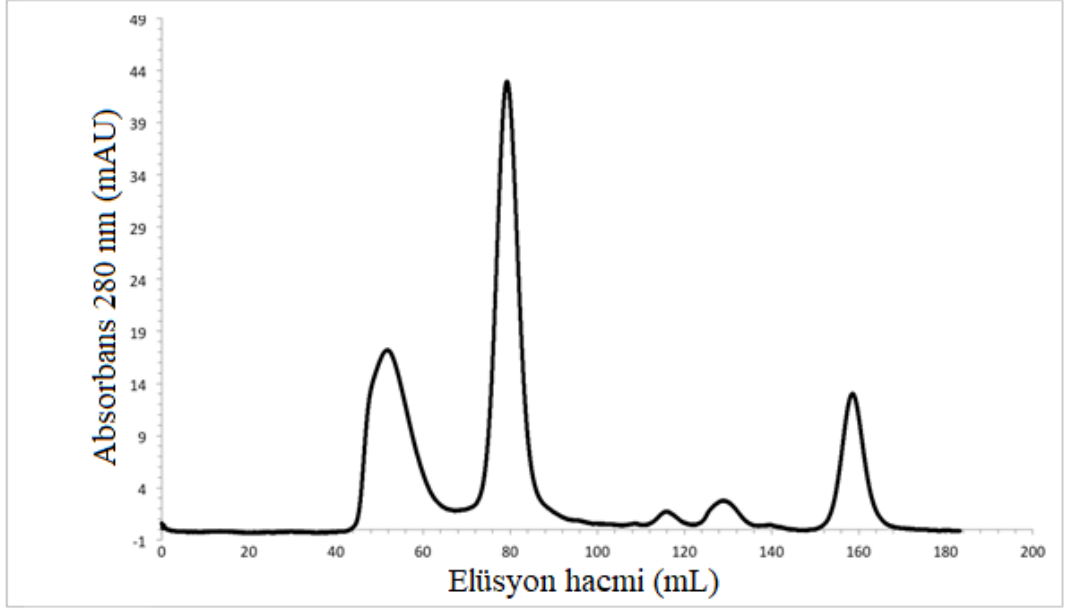
Nikel affinite kromatografisi sonucu elde ettiğimiz en uygun elüsyon tampon 1 fraksiyonu 0,2 μm ölçekli şırınga filtresi kullanılarak FPLC cihaza yüklenmiştir. UV

absorbans değeri 280 nm'de ve 1 ml/dak akış hızında proteinin görüntülemesi alınmıştır. Fraksiyonlar 2 mL lik alikuatlar olarak otomatik olarak alınmıştır. Elde edilen 4 pik görüntüsünden, sadece 80ml'de olan asıl pik görüntüsü proteinimize aittir. Yapılan hesaplamada protein moleküler ağırlığı ~100 kDa olarak belirlenmiştir, bu da proteinin dimer (iki monomer protein) yapısında olduğunu önermektedir (tahmin edildiği gibi proteinimize ait MW ~ 45 kDa'dır).



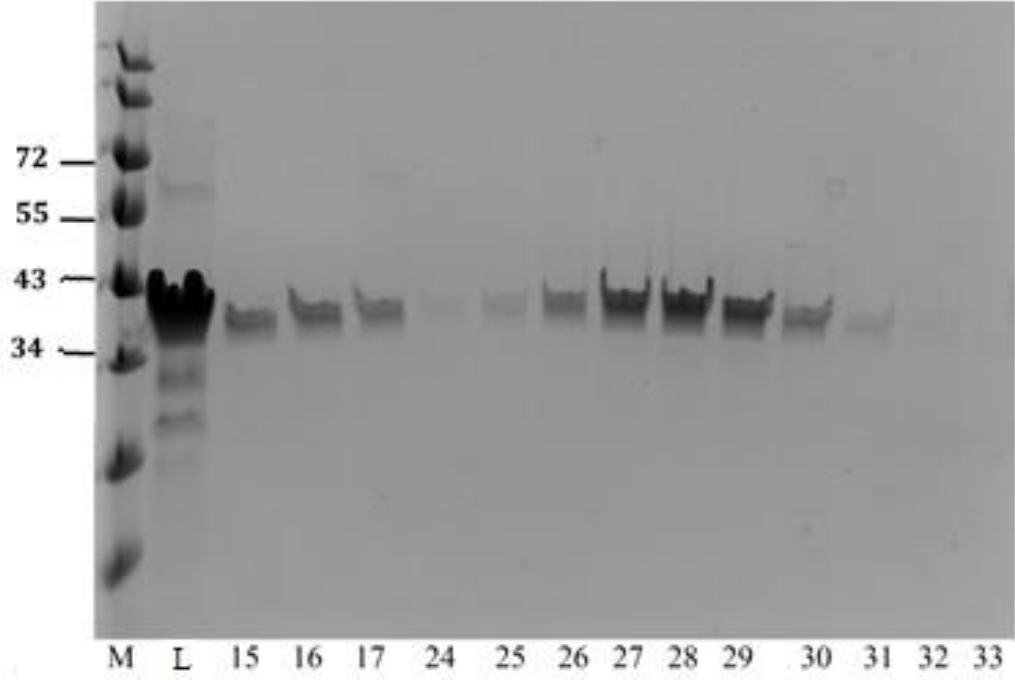
Şekil 4.12. *Hs* LARP6 proteinine ait fraksiyonların SDS-PAGE görüntüsü. Not: Y eksenini kDa, X eksenini fraksiyonlar, M markır.

Hs LARP6 büyüklük ölçekli kromatografi yöntemi ile ortaya çıkan protein karışımı 0,2 µm şırınga filtresi kullanılarak cihaza enjektörden sonra 2mL'lik alikuatlar elde edilmiş. Bu alikuatlar sırasıyla 24. fraksiyondan başlanarak 31. fraksiyonda dahil olmak üzere SDS-PAGE ile yürütülmüş protein moleküler büyüklüğünü belirlemek amacıyla ilk kuyucukta (markır) konulmuştur (Şekil 4.12). Elde edilen jel daha sonra Coomassie boyası ile boyama işlemi ile boyanmıştır. 25, 26, 27, 28 ve 29 numaralı alikuatlar bir araya getirilip maksimum bir şekilde homojen hale getirildikten sonra 50µl lik alikualar şeklinde sıvı azot yardımıyla hızlı bir şekilde dondurularak -70 °C'de stoklanmıştır.



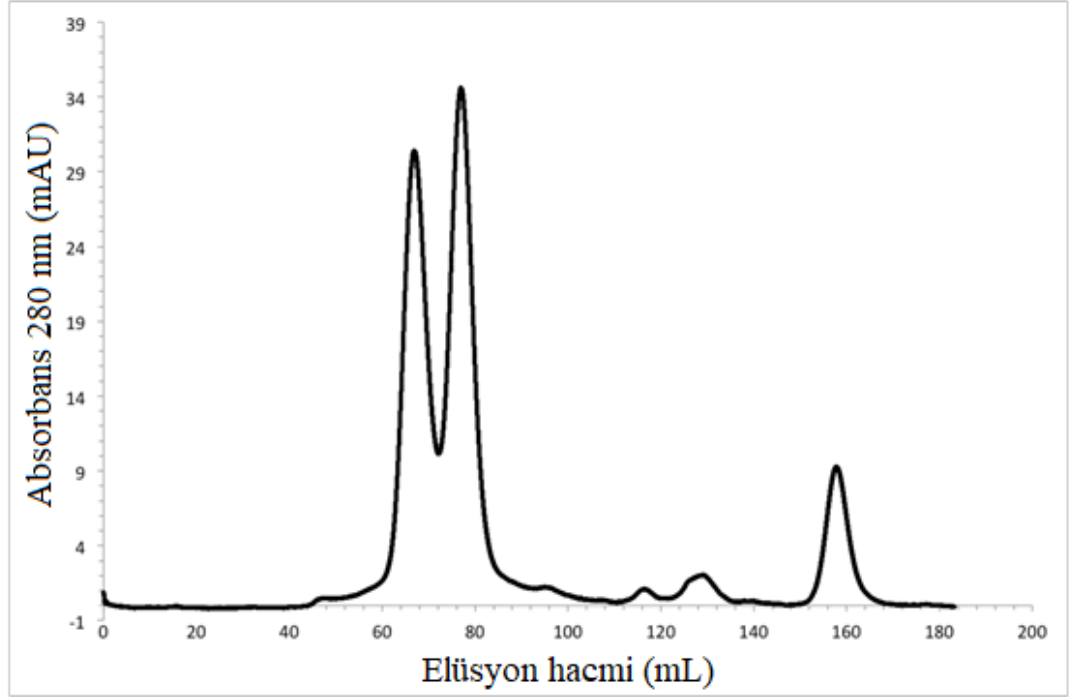
Şekil 4.13. *Xm* LARP6 NTD ve La Modül (1-280)' ün S200 büyüklük ayrıştırıcı kromatografisi.

Nikel affinite kromatografisi sonucu elde ettiğimiz en uygun elüsyon tampon 1, elüsyon tampon 2 ve elüsyon tampon 3 fraksiyonları konsantrasyonu 2-2,5 mL olacak şekilde 5000 xg santrifüj işlemi ile 10 kDa eşik değerinde moleküler ağırlığa indirgeyerek gözenek büyüklüğü 0,2 μ m ölçekli şırınga filtresi kullanılarak FPLC cihazına yüklenmiştir. UV absorbans değeri 280 nm'de ve 1 ml/dak akış hızında proteinimizin görüntülenmesi alınmıştır (Şekil 4.13). Fraksiyonlar 2 mL lik alikuatlar olarak otomatik olarak alınmıştır. Elde edilen görüntü sadece bir adet pik görüntüsüne sahiptir. Yapılan hesaplamada pikin moleküler ağırlığı 82 kDa olarak ölçülmüştür. Bu proteinin dimer yapıda olduğunu önermektedir (tahmin edilen miktar MW ~ 45 kDa).



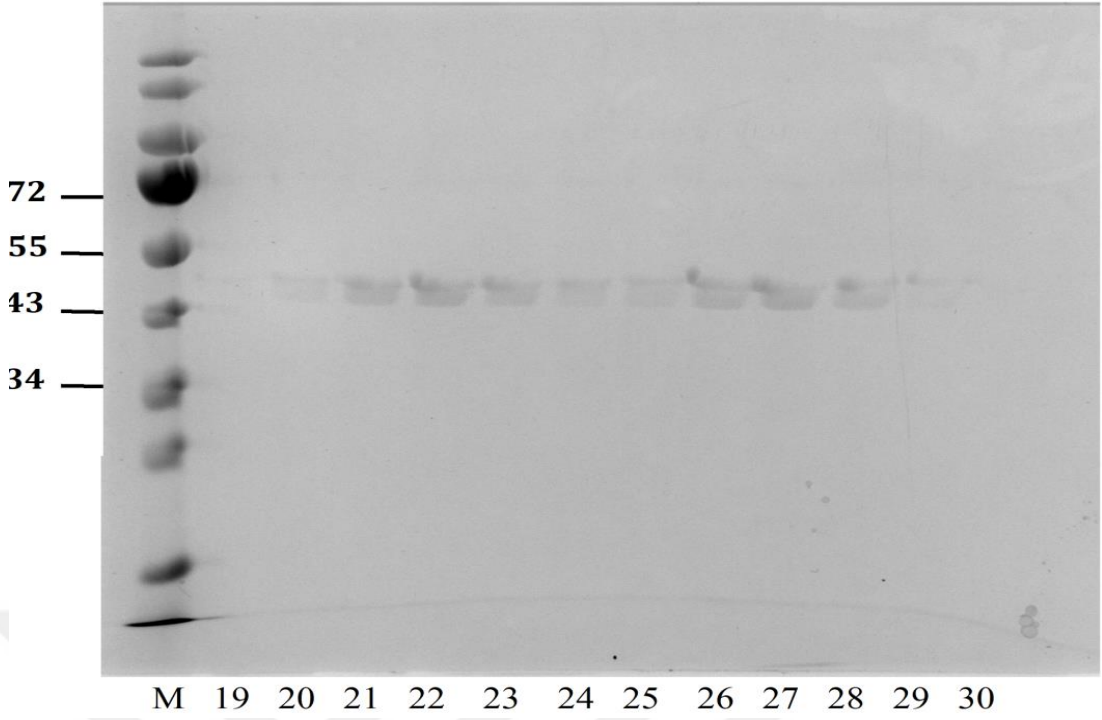
Şekil 4.14. *Xm* LARP6 proteinine ait fraksiyonların SDS-PAGE görüntüsü. Not: Y eksenini kDa, X eksenini fraksiyonlar, M markır.

Xm LARP6 FPLC büyüklük ölçekli kromatografi yöntemi ile ortaya çıkardığımız protein karışımı 0,2 µm şırınga filtresi kullanılarak cihaza enjektесinden sonra 2mL'lik alikuatlar elde edilmiş. Bu alikuatlar sırasıyla 14. fraksiyondan başlanarak 15. ve 16. fraksiyon ile 24. fraksiyondan 33. fraksiyon da dahil olmak üzere SDS-PAGE ile yürütölmüş protein moleköler büyüklüğünü belirlemek amacıyla ilk kuyucukta, sonraki kuyucuğa ise büyüklük ölçekli kromatografi yöntemi ile elde ettiğimiz protein konulmuştur. Elde edilen jel daha sonra Coomasie boyası ile boyama işlemi ile boyanmıştır (Şekil 4.14). 26, 27, 28, 29 ve 30 numaralı alikuatlar bir araya getirilip maksimum bir şekilde homojen hale getirildikten sonra 50µl lik alikutlar şeklinde sıvı azot yardımıyla hızlı bir şekilde dondurularak -70 °C'de stoklanmıştır.



Şekil 4.15. *Dr* LARP6A NTD ve La Modül (1-290)' ün S200 büyüklük ayrıştırıcı kromatografisi.

Nikel affinite kromatografisi sonucu elde ettiğimiz en uygun elüsyon tampon 1, elüsyon tampon 2, elüsyon tampon 3 ve elüsyon tampon 4 fraksiyonları konsantrasyonu 2-2,5 mL olacak şekilde 5000 xg santrifüj işlemi ile 10 kDa eşik değerinde moleküler ağırlığa indirgenip (molecular weight cutoff, MWCO) 0,2 µm ölçekli şırınga filtresi kullanılarak FPLC cihaza yüklenmiştir. UV absorbans değeri 280 nm'de ve 1 ml/dak akış hızında proteinimizin görüntülemesi alınmıştır (Şekil 4.15). Fraksiyonlar 2 mL' lik alikvatlar olarak otomatik olarak alınmıştır. Elde edilen görüntü iki ana pik içermektedir. 65ml ve 80ml' de olan bu pikler globular (küresel) moleküler yapısına uygun olduğunu düşünmekteyiz. Olası olarak bunlar sırasıyla 100 kDa ve 250 kDa moleküler ağırlığa sahip olarak pentamer ve dimer yapıları olabilirler.



Şekil 4.16. *Dr* LARP6 proteinine ait fraksiyonların SDS-PAGE görüntüsü. Not: Y eksenini kDa, X eksenini fraksiyonlar, M markır.

Dr LARP6A Büyüklük ölçekli kromotografi yöntemi ile ortaya çıkardığımız protein karışımı 0.2 μ m şırınga filtresi kullanılarak cihaza ejektesinden sonra 2mL'lik alikuatlar elde edilmiş. Bu alikuatlar sırasıyla 19. fraksiyondan başlanarak 30. fraksiyon da dahil olmak üzere SDS-PAGE ile yürütülmüş protein moleküler büyüklüğünü belirlemek amacıyla ilk kuyucukta (M) konulmuştur. Elde edilen jel daha sonra Coomasie boyası ile boyama işlemi ile boyanmıştır (Şekil 4.16). 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ve 28 numaralı alikuatlar bir araya getirilip maksimum bir şekilde homojen hale getirildikten sonra konsantrasyonu 2-2.5 mL olacak şekilde 5000 xg santrifüj işlemi ile 10 kDa eşik değerinde moleküler ağırlığa indirgindikten sonra (MWCO) 50 μ l lik alikualar şeklinde sıvı azot yardımıyla hızlı bir şekilde dondurularak -70 °C'de stoklanmıştır.

FPLC cihazı kullanılarak S200 tampon eşliğinde S200 Sephadex kolon kullanılarak daha önce büyüklük ölçekli kromotografi yöntemi sonucu elde ettiğimiz protein içerikli karışım 0.2 μ m şırınga filtresi ile cihaza verilmiş, 280 nm absorbans değerinde görüntülenerek 2 mL'lik alikuatlar elde edilmiştir. Elde edilen alikuatlar

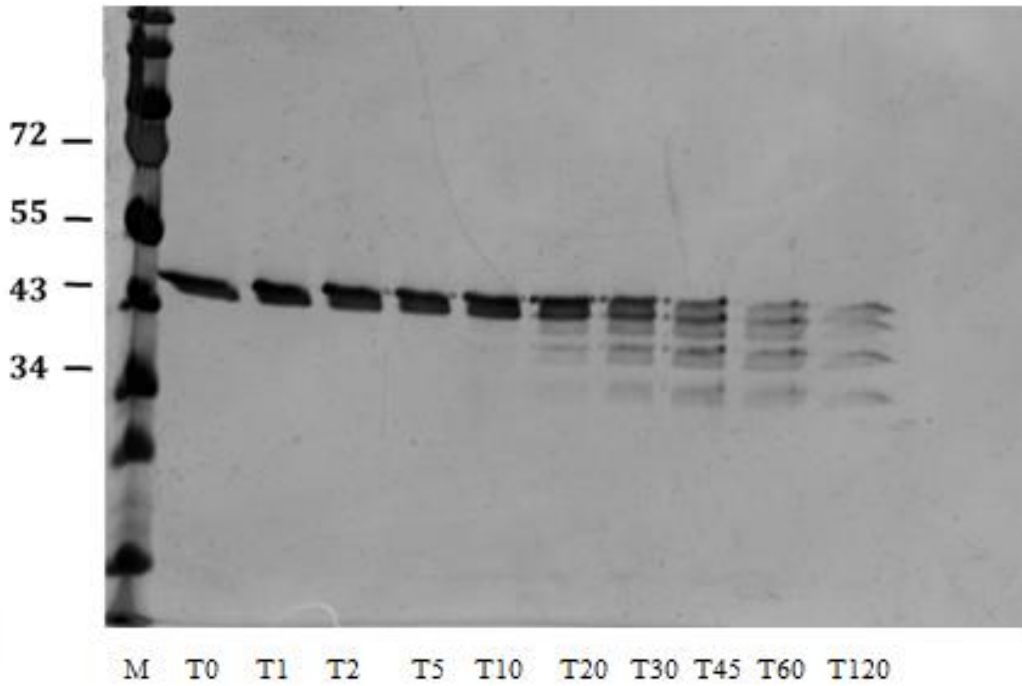
elde edilen piklerin yardımı ile yorumlanarak SDS-PAGE yöntemi ile jelde yürütülmüş ve Coomassie boyası ile boyanmıştır.

Büyüklik ayrıştırıcı kolonlardan elde edilmiş proteinler beklenen moleküler ağırlıktan yaklaşık iki kat fazladır. Bu sonuç proteinlerin dimer yapıda saflaşmış olduğunu ifade edebilmektedir. Bu sonuç Castro vd (2017)'nin tam-uzunluktaki balık ve insan proteinlerinde gözlemlendiği sonuçlara benzerlik göstermektedir.

4.3. Sınırlı Protealiz

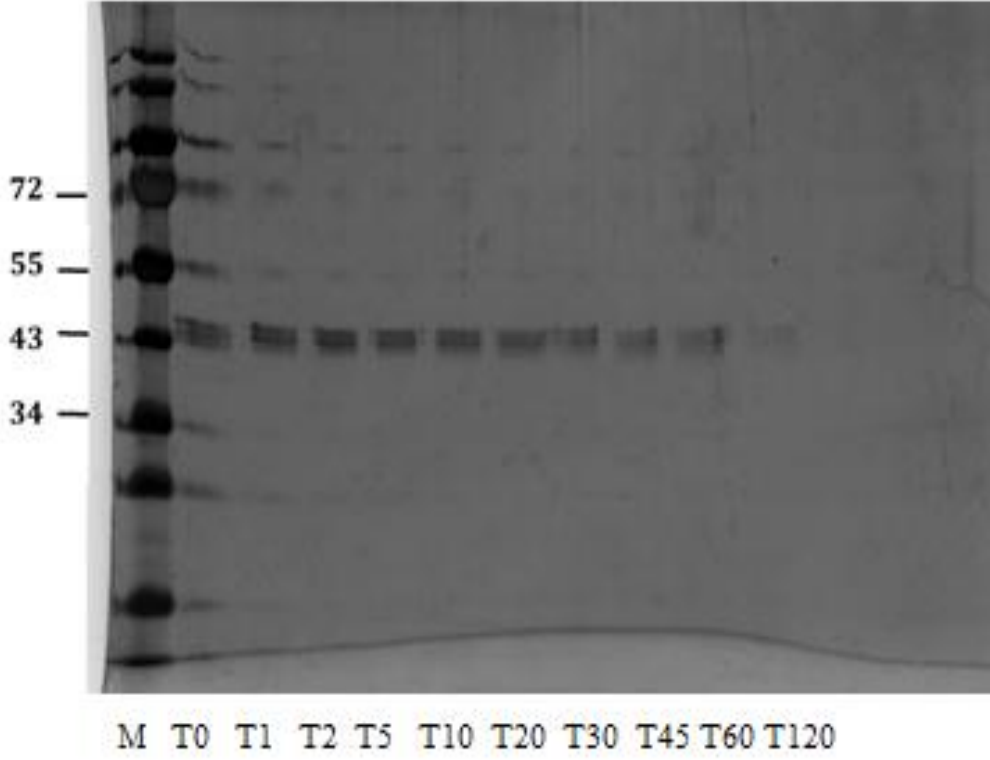
İnsan *Hs* LARP6 (1-300) ve iki balık türünün *Xm* LARP6 (1-280) ve *Dr* LARP6a (1-290) protein yapılarının birbirleriyle olan benzerliğini ve farklılığını ortaya çıkarmak amacıyla sınırlı protealiz yapılmıştır. Pürifikasyon işlemi sırasında *Hs* LARP6 (1-300) için kullanılan tampon *Xm* LARP6 (1-280) ve *Dr* LARP6a (1-290) kullanılan tampondan farklıdır. *Xm* LARP6 (1-280) ve *Dr* LARP6a (1-290) örnekleri için kullanılan tampon yüksek konsantrasyonda tuz ve ozmolit içermektedir. Bu nedenle *Hs* LARP6 (1-300), *Xm* LARP6 (1-280) ve *Dr* LARP6a (1-290) proteinlerinin yapı ve kararlılıklarını etkilemesini engellemek amacıyla örnekler öncelikle dilüsyon işlemi yapıldıktan sonra konsantrasyonu eşitlenen örnekler sınırlı protealiz deneyi yapılmıştır. Bu işlem sırasında tripsin enzimi kullanılmıştır. Tripsin enzimi kullanmamızın sebebi lizin ve arginin aminoasitlerinin yaptığı bağları kesme özelliğine sahip olmasıdır. Eğer tripsin lizin ve arginin aminoasitlerine ulaşabilirse bunun anlamı proteinin içiçe kıvrımlı olmayıp gevşek bir yapıya sahip olduğudur. Eğer protein yapısı yoğun bir şekilde kıvrımlı yani kararlı (stabil) bir protein yapısına sahip ise tripsin aminoasitlere ulaşamayacak ve kesme işlemini yapamayacaktır. *Hs* LARP6 (1-300), *Xm* LARP6 (1-280) ve *Dr* LARP6a (1-290) örnekleri +4 °C'de tripsin enzimi ile inkübasyonu sırasında belirli zamanlarda alınan (0., 1., 2., 5., 10., 20., 30., 45., 60. ve 120. dakika) örnekler SDS-PAGE yöntemi uygulandıktan sonra gümüş boya ile boyanmıştır. Gümüş boyama yöntemi diğer boyama yöntemlerine göre daha hassas bir yöntemdir ve buda proteoliz işleminde elde ettiğimiz küçük boyutlara ayırdığımız (örneğin, moleküler ağırlık olarak) yapıları küçük boyutlu ürünü göstermede kullanılmıştır. Görüntülenen tam-uzunluktaki, saflaştırılmış *Hs* LARP6 (1-300), *Xm* LARP6 (1-280) ve *Dr* LARP6a (1-290) örnekleri ~43 kDa bant aralığında çıkmıştır. *Hs* LARP6 (1-300)

(Şekil 4.17) örneğinde T20 den itibaren protein yapısındaki kararlı yapı bozulmaktadır. *Xm* LARP6 (1-280) ve *Dr* LARP6a (1-290) örneklerinin (Şekil 4.18 ve 4.19) jel üzerinde oluşan bantlar oldukça net ve kararlı bir görünüm sergilemektedir. NTD ve La modül yapısına ait bölümün parçalanarak ardından daha küçük moleküler ağırlığa sahip protein parçalarının ortaya çıkmasıyla bant aralığı 30-40 kDa arasında gözükmiştir.



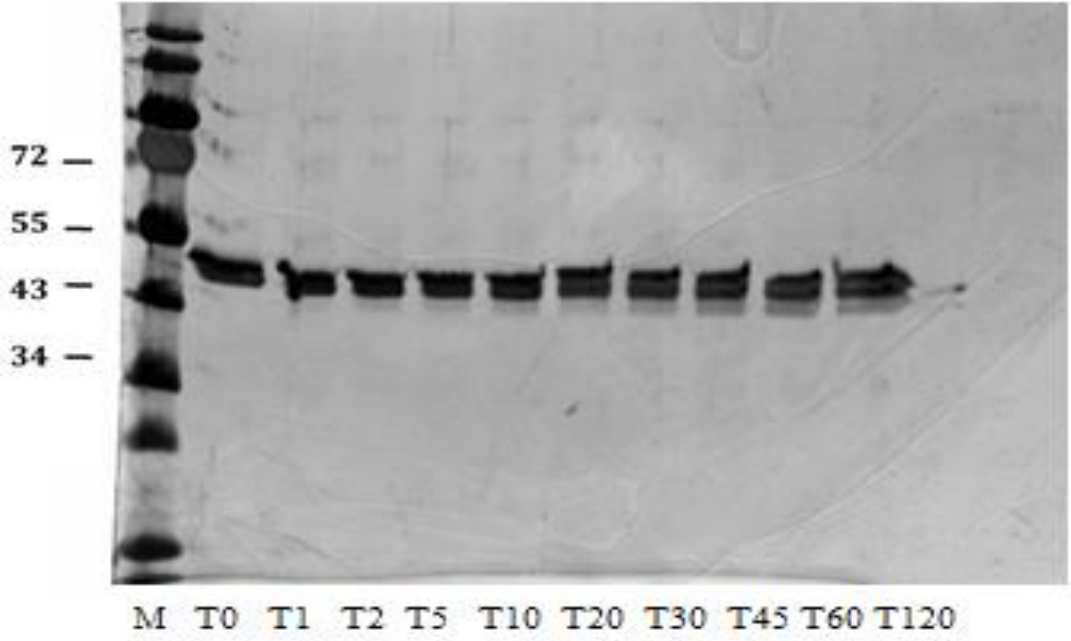
Şekil 4.17. *Hs* LARP6 (1-300) alanının sınırlı proteolizi. Not: Y ekseni kDa, X ekseni dakika, M markır.

Dilüsyon işlemi yapıldıktan sonra +4°C de T0 örneği alınmış ardından tripsin enzimi eklendikten sonra T1, T2, T5, T10, T20, T30, T45, T60 ve T120 örnekleri alınarak SDS-PAGE elektroforez yöntemi kullanılarak jelde yürütülüp gümüş boyasından sonra görüntülemesi yapılmıştır. T20, T30, T45, T60 ve T120 sürelerinde alınan örneklerde kararlılık yapısının bozulduğu görülmektedir.



Şekil 4.18. *Xm* LARP6 (1-280) alanının sınırlı proteolizi. Not: Y eksen kDa, X eksen dakika, M markır.

Dilüsyon işlemi yapıldıktan sonra +4°C de T0 örneği alınmış ardından tripsin enzimi eklendikten sonra T1, T2, T5, T10, T20, T30, T45, T60 ve T120 örnekleri alınarak SDS-PAGE elektroforez yöntemi kullanılarak jelde yürütülüp gümüş boyasından sonra görüntülemesi yapılmıştır.

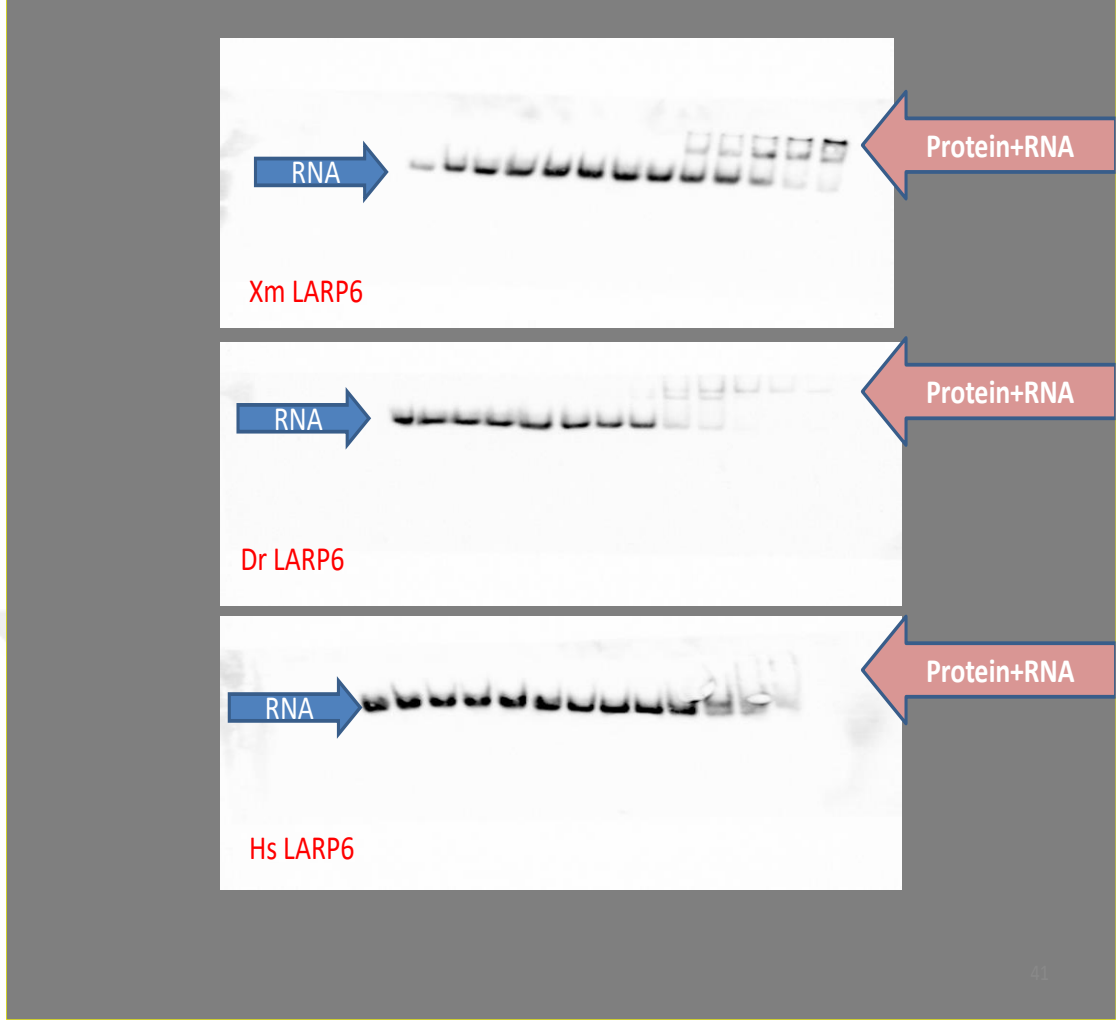


Şekil 4.19. *Dr* LARP6a (1-290) alanının sınırlı proteolizi. Not: Y eksenini kDa, X eksenini dakika, M markır.

Dilüsyon işlemi yapıldıktan sonra +4°C de T0 örneği alınmış ardından tripsin enzimi eklendikten sonra T1, T2, T5, T10, T20, T30, T45, T60 ve T120 örnekleri alınarak SDS-PAGE elektroforez yöntemi kullanılarak jelde yürütülüp gümüş boyasından sonra görüntülemesi yapılmıştır.

4.4. LARP6' nın Biyokimyasal Karakterizasyonu

LARP6 proteinlerinin RNA bağlanma afinitesini ölçmek amacıyla *Hs* LARP6 (N terminal domain+La Modül), *Xm* LARP6 (N terminal domain+La Modül) ve *Dr* LARP6 (N terminal domain+La Modül) EMSA yöntemi uygulanmıştır (Şekil 4.20). *Hs* COL1A1 mRNA nın 5'UTR sinden elde edilen SL sekansları kullanılarak yapılmıştır. RNA ve protein kompleksi ile serbest RNA %5,5 yerli (native) poliakrilamid jel kullanılarak buz kalıpları uygulamasıyla ısı kontrolü sağlanarak ısı düşürülüp, deney koşulları sabit tutulmaya çalışılmıştır. Bunun nedeni ise elektroforez işlemi sırasında proteinlerin katlanması engellenmiştir. Bu sayede RNA bağlama fonksiyonu ve protein yapısı korunmuştur.



Şekil 4.20. LARP6 proteinlerinin (*Xm* LARP6 (1-280), *Dr* LARP6a (1-290), *Hs* LARP6 (1-300) insan kollajen *Hs* COL1A1 mRNA SL ile bağlanma aktivitesini gösteren EMSA deney sonuçları.

Şekil 4.20'ye göre LARP6 proteinleri ile insan kollajen 1A1 mRNA SL bağlanma aktivitesi sırasıyla *Xm* LARP6 > *Dr* LARP6a > *Hs* LARP6 proteinlerinde görülmüştür. Bu durumda en fazla serbest kısımların insan LARP6 proteinlerinde olduğu anlaşılabilir. Castro vd (2017) çalışmalarında, çok kararlı homolog yapılar için olduğu gibi, rekombinant tam uzunluktaki balık proteinlerinin RNA ya bağlanma aktivitesini daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Buna neden olarak da, araştırmacılar bu üç protein arasındaki sekans farklılıklarının buna neden olabileceğini ve aynı zamanda uzunluk, bağlantılar (linkler) ve sekanslar arasındaki kıvrımlar (looplar) arasındaki farklılıkların da buna neden olabileceğini

vurgulamışlardır. Bu çalışmamızda ise Castro vd (2017) nin öngördüğü sonuçlara destek verecek bulgulara ulaşılmıştır. Ancak, bu araştırmacılar tam uzunluktaki LARP6 proteinleri üzerinde çalışma yaptıkları ve daha kısa alandaki proteinler üzerinde odaklanmadıkları için bu şekilde bir ifade de bulunmuşlardır. Oysa bu çalışmamızda söz konusu alana odaklanarak sonuçları daha net bir şekilde ifade edecek bulgular elde edilmiştir (Şekil 4.20). Sonuç olarak bu iki balık proteinlerinin insan LARP6 proteinine göre daha kararlı bir yapıya sahip olduğu söylenebilir. Evrimsel süreçte balıkların memelilerden (insan) önce ortaya çıkmalarını göz önünde tutarsak, daha uzun sürede buldukları ortam koşullarına uyum sağlayabildiklerini düşünebiliriz. Bu durumda söz konusu balık LARP6 proteinlerinin daha kararlı yapılara ulaşması olası olabilir. Gelecekte yapılabilecek daha özel alanlardaki (örn., sadece La Modül domaini üzerinde) çalışmalarda bu durumu aydınlatabilecek bulguların elde edilmesi, LARP6 proteinlerinin fonksiyon ve yapısının ortaya çıkmasını daha iyi bir şekilde ifade edilebilecektir.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, üç omurgalıya (plati balığı, zebra balığı ve insan) ait NTD-La Modül formlarından oluşan LARP6 proteinlerinin başarılı bir şekilde klonlanmasını, ekspresyonunu ve saflaştırılmasını ortaya çıkartmıştır.

Bu çalışmada *Dr* LARP6A NTD ve La Modül (1-290), *Xm* LARP6 NTD ve La Modül (1-280) ve *Hs* LARP6 NTD ve La Modül (1-280) pET28 plasmidi kullanılarak klonlama işlemi yapıldıktan sonra Rosetta hücreleri kullanılarak transformasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra Castro vd'ye (2017) göre ekspresyon ve saflaştırma basamakları gerçekleştirilmiştir. Büyüklük ölçekli kolon kromatografi yöntemi ile elde ettiğimiz büyüklüğe dayalı ayrıştırma kromatografisi jel görüntüsü *Dr* LARP6A NTD ve La Modül (1-290) yapısının molekül ağırlığının yaklaşık olarak 250 kDA ve 100 kDA molekül yapısının pentamer ve dimer yapısında olduğunu ortaya çıkarmıştır. *Xm* LARP6 NTD ve La Modül (1-280) büyüklük ölçekli kromatografi uygulamasında elde ettiğimiz sonuç değerlendirildiğinde yaklaşık molekül ağırlığının 100 Kda olarak ortaya çıkmaktadır. Bu bilgi bize protein yapısının dimer (iki monomer) yapıya sahip olduğunu ifade etmektedir. Her iki örneğimizin de karşılaştırma amaçlı tüm basamakları aynı şekilde uygulanmış ve saflaştırdığımız *Hs* LARP6 NTD ve La Modül (1-280) molekül ağırlığının yaklaşık olarak 100 kDA olarak dimer yapısında olduğunu göstermektedir. Bu bilgilere dayanarak LARP6 proteini mükemmel bir globüler yapıya sahip olmayabilir. Katlanmış küresel bir yapı yerine, LARP6 uzayabilen bir yapıya sahip olabilir. Buna göre uzun ve ince boyutlu olmak üzere görülen iki yapıdan sadece uzun boyutlu olan görüntü elde edilebilmektedir (Lewis, kişisel görüşme).

Saflaştırma işlemi sırasında kullanılan tampon solüsyonları hidrofobik ve hidrofobik özelliklerden faydalanılarak seçilmiş aminoasitler ile olan etkileşimler kontrol altına alınabilmiş, bu sayede proteinlerin stabilizasyonu sağlanmıştır. Daha önce Castro vd (2017) tarafından denenmiş tampon solüsyonları tez çalışmam sırasında uygulanması sonucu proteinlerin yapısında herhangi bir bozulmaya neden olmamış agregasyon kalıntısına rastlanmamıştır. *Hs* LARP6 NTD ve La Modül (1-280) saflaştırmada kullanılan tampon solüsyonlarında NaI ve glükoz eklemesi yapılmamıştır. Buna rağmen saflaştırma işlemi sorunsuz gerçekleşmiştir. Bunun nedeni *Hs* LARP6 NTD ve La Modül (1-280) protein yapısı *Dr* LARP6A NTD ve La

Modül (1-290) ve *Xm* LARP6 NTD ve La Modül (1-280) yapısına göre daha az kararlı bir yapı oldunun tripsin ile yaptığımız parçalama deneylerimizde ortaya çıktığını görmekteyiz. Bondos ve Bicknell (2003) de yaptıkları çalışmada glukozun agregasyonu engellediği ortaya çıkmıştır. İki balık ve insan protein saflaştırma işleminde kullanılan tamponların farklı olmasının temel nedenini insan proteininin enzim bozulmalarına karşı daha duyarlı olmasıyla açıklayabiliriz.

Fiziksel olarak yapısını ortaya çıkarmak için uyguladığımız tripsin enzimi ile parçalara ayırdığımız protein yapıları (sınırlı protealiz) *Dr* LARP6A NTD ve La Modül (1-290) ve *Xm* LARP6 NTD ve La Modül (1-280) için oldukça kararlı domain yapılarına ve polipeptid zincirinin kıvrılma yapılarının oluşumunun daha fazla kararlı olduğunu ve rezidüler arasında var olan bağların daha kararlı bir seviyeye ulaşmış olması gözlemlenirken *Hs* LARP6 NTD ve La Modül (1-280) molekül yapısındaki görüntü yayılım (smear) şeklinde olmuştur bu da daha az kararlı yapıya sahip olduğunun bir diğer göstergesi olarak yorumlanabilir.

Dr LARP6A NTD ve La Modül (1-290), *Xm* LARP6 NTD ve La Modül (1-280) ve *Hs* LARP6 NTD ve La Modül (1-280) yapıları fonksiyonel olarak *Hs* COL1A1 RNA yapısından elde edilmiş 48 nt 5' UTR SL bölgesi ile EMSA deneyi başarılı bir şekilde sonuçlanmıştır. *Dr* LARP6A NTD ve La Modül (1-290), *Xm* LARP6 NTD ve La Modül (1-280) yapılarının *Hs* LARP6 NTD ve La Modül (1-280) yapısından daha önce oluşması onların protein yapılarında ki kararlılığın ve affinitesinin daha fazla olmasına neden olurken fonksiyonel olarak deney sonuçlarımızda belirgin bir şekilde bu düşüncüyü desteklediği ortaya çıkmıştır.

Dr LARP6A NTD ve La Modül (1-290), *Xm* LARP6 NTD ve La Modül (1-280) ve *Hs* LARP6 NTD ve La Modül (1-280) protein moleküler yapılarının karakterizasyonunu ortaya çıkartmaya çalıştığımız bu tez çalışmasının bir sonraki basamağı, La Modül domain yapısını oluşturan La Motif ve RRM yapılarının ayrı ayrı karakterizasyonunun ve fonksiyonel olarak hedeflediği ligand yapılarının tanımlanması yönünde olabilir. Böylelikle molekül yapılarının karakterizasyon ve fonksiyonel yapılarının çalışması daha spesifik düzeyde olabilir. Bu çalışmadan bir sonraki adım bu üç proteine ait RNA bağlanma aktivitelerinin ölçülmesi ve bu üç proteinin RNA bağlanma aktivitesindeki eğilim ve özel unsurlar arasındaki farklılıkları ortaya çıkartmaktır.

Bu çalışmanın devamında NMR analizi yapılarak *Dr* LARP6A NTD ve La Modül (1-290), *Xm* LARP6 NTD ve La Modül (1-280) ve *Hs* LARP6 NTD ve La Modül (1-280) molekül yapılarının tam anlamıyla ortaya çıkması sağlanmaya çalışılacak ve fonksiyonlarını gerçekleştirebilmeleri için gerekli bağlanma yüzey alanları ve ilgili oldukları ligandların bağlanma yüzey alanları da ortaya çıkarılmaya çalışılacaktır. Bu bilgi ışığında bir sonraki çalışma sadece domain yapılarını içererek yapılabilirse, bu protein yapısından kaynaklı hastalıklarda tedavi yöntemi için kullanılabilir ilaç sektörüne faydalı bilgiler sağlanması olasıdır.



KAYNAKLAR

- Alfano, C., Sanfelice, D., Babon, J., Kelly, G., Jacks, A., Curry, S. ve Conte, M.R. 2004. Structural analysis of cooperative RNA binding by the La motif and central RRM domain of human La protein. *Nature Structural and Molecular Biology*,11: 323-329.
- Auweter, S.D., Oberstrass, F.C. ve Allain, F.H. 2006. Sequence-specific binding of single stranded RNA: is there a code for recognition? *Nucleic Acids Research*, 34: 4943-4959.
- Bahar, I., Jernigan, R. ve Dill, K. 2017. *Protein Actions: Principles and Modeling*. Garland Science, Taylor & Francis Group, 322, New York.
- Bandziulis, R.J., Swanson, M.S. ve Dreyfuss, G. 1989. RNA-binding proteins as developmental regulators. *Genes and Development*, 3(4): 431-437.
- Bayfield, M.A. ve Maraia, R.J. 2009. Precursor-product discrimination by La protein during tRNA metabolism. *Nature Structural and Molecular Biology*,16: 430-437.
- Bayfield, M.A., Yang, R. ve Maraia R.J. 2010. Conserved and divergent features of the structure and function of La and La-related proteins (LARPs). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1799: 365-378.
- Belisova, A., Semrad, K., Mayer, O., Kocian, G., Waigmann, E., Schroeder, R. ve Steiner, G. 2005. RNA chaperone activity of protein components of human Ro RNPs. *RNA*, 11:1084-1094.
- Blackburn, G.M., Gait, M.J., Loakes, D. ve Williams, D.M. 2006. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*. RSC publication, 503, Cambridge.
- Bondos, S.E. ve Bicknell, A. 2003. Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. *Analytical Biochemistry*, 316, 223-231.
- Bousquet-Antonelli, C. ve Deragon, J.M. 2009. A comprehensive analysis of the La-motif protein superfamily. *RNA*, 15: 750-764.
- Braasch, I., Peterson, S.M., Desvignes, T., McCluskey, B.M., Batzel, P. ve Postlethwait, J.H. 2015. A new model army: Emerging fish models to study the

- genomics of vertebrate. *Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution*, 324B:316–341.
- Cai, L., Fritz, D., Stefanovic, L. ve Stefanovic, B. 2010. Nonmuscle myosin-dependent synthesis of type I collagen. *Journal of Molecular Biology*, 401:564-578.
- Castro, J.M., Horn, D.A. ve Lewis, K.A. 2017. Recombinant expression and purification of the RNA-binding LARP6 proteins from fish genetic model organisms. *Protein Expression and Purification*, 134:147-153.
- Chakshusmathi, G., Kim, S.D., Rubinson, D.A. ve Wolin, S.L. 2003. A La protein requirement for efficient pre-tRNA folding. *The EMBO Journal*, 22(24): 6562-6572.
- Churion, K.A. ve Bondos, S.E. 2012. Identifying solubility-promoting tampons for intrinsically disordered proteins prior to purification. *Methods in Molecular Biology*, 896:415-427.
- Copela, L.A., Chakshusmathi, G., Sherrer, R.L. ve Wolin, S.L. 2006. The La protein functions redundantly with tRNA modification enzymes to ensure tRNA structural stability. *RNA*, 12(4): 644-54.
- Gerstberger, S., Hafner, M. ve Tuschl, T. 2014. 2014. A census of human RNA-binding proteins. *Nature Reviews Genetics*, 12:829-45.
- Glenn, H.L., Wang, Z. ve Schwartz, L.M. 2010. Acheron, a lupus antigen family member, regulates integrin expression, adhesion, and motility in differentiating myoblasts. *American journal of physiology. Cell physiology*, 298: C46-C55.
- Guan, Y., Zhu, Q., Huang, D., Zhao, S., Lo, L.J. ve Jinron, P. 2015. An equation to estimate the difference between theoretically predicted and SDS PAGE-displayed molecular weights for an acidic peptide. *Scientific Reports*, 5: 13370. [dx.doi.org/10.1038/srep13370](https://doi.org/10.1038/srep13370).
- Haan, C. ve Behrmann, I. 2007. A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. *Journal of Immunological Methods*, 318(1-2):11-19.

- Hussain, R.H., Zawawi, M. ve Bayfield, M.A. 2013. Conservation of RNA chaperone activity of the human La-related proteins 4, 6 and 7. *Nucleic Acids Research*, 41:8715–872.
- Kendrew, J.C., Bodo, G., Dintzis, H.M., Parrish, R.G., Wyckoff, H. ve Phillips, D.C. 1958. A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis. *Nature*, 181: 662–666.
- Krueger, B.J., Jeronimo, C., Roy, B.B., Bouchard, A., Barrandon, C., Byers, S.A., Searcey, C.E., Cooper, J.J., Bensaude, O., Cohen E.A., Coulombe, B. ve Price, D.H. 2008. LARP7 is a stable component of the 7SK snRNP while P-TEFb, HEXIM1 and hnRNP A1 are reversibly associated. *Nucleic Acids Research*, 36:2219-2229.
- Manojlovic, Z., Earwood, R., Kato, A., Perez, D., Cabrera, O. A., Didier, R. ve Kato, Y. 2017. La-related protein 6 controls ciliated cell differentiation. *Cilia*, 6, 4.
- Maraia, R.J., Mattijssen, S., Cruz-Gallardo, I. ve Conte, M.R. 2017. The La and related RNA-binding proteins (LARPs): structures, functions, and evolving perspectives. *WIREs RNA*, 8: null. doi: 10.1002/wrna.1430.
- Maris, C., Dominguez, C. ve Allain, F.H.T. 2005. The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS Journal*, 272(9): 2118-2131.
- Martino, L., Pennell, S., Kelly, G., Busi, B., Brown, P., Atkinson, R.A., Salisbury, N.J., Ooi, Z.H., See, K.W., Smerdon, S.J., Alfano, C., Bui, T.T. ve Conte MR. 2015. Synergic interplay of the La motif, RRM1 and the interdomain linker of LARP6 in the recognition of collagen mRNA expands the RNA binding repertoire of the La module. *Nucleic Acids Research*, 43:645–660.
- Muniz, L., Egloff, S. ve Kiss, T. 2013. RNA elements directing in vivo assembly of the 7SK/MePCE/LARP7 transcriptional regulatory snRNP. *Nucleic Acids Research*, 41: 4686-4698.
- NHGRI (National Human Genome Research Institute). 2018. <https://www.genome.gov>. (15.07.2018).
- Nelson, J.S. 2006. *Fishes of the World*. John Wiley & Sons., 601, Hoboken

(New Jersey, USA).

- Nykamp, K., Lee, M.H. ve Kimble, J.C. 2008. *Elegans* La-related protein, LARP-1, localizes to germline P bodies and attenuates RAS-MAPK signaling during oogenesis. *RNA*, 14:1378-1389.
- Oppenheimer, J. M. 1936. Structures developed in amphibians by implantation of living fish organizer. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 34, 461–463. doi: 10.3181/00379727-34-8659C
- Remillieux-Leschelle, N., Santamaria, P. ve Randsholt, N.B. 2002. Regulation of larval hematopoiesis in *Drosophila melanogaster*: a role for the multi sex combs gene. *Genetics*, 162(3): 1259-1274.
- Rinkwitz, S., Mourrain, P. ve Becker, T.S. 2011. Zebrafish: An integrative system for neurogenomics and neurosciences. *Progress in Neurobiology*, 93: 231-243.
- Rodriguez, C.M. 1997. Phylogenetic analysis of the tribe Poeciliini (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Copeia*, 4: 663-679.
- Schartl, M. 2014. Beyond the zebrafish: diverse fish species for modeling human disease. *Disease Models and Mechanisms*, 7(2): 181–192.
- Shamoo, Y., Abdul-Manan, N., Patten, A.M., Crawford, J.K., Pellegrini, M.C. ve Williams, K.R. 1994. Both RNA-binding domains in heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 contribute toward single-stranded-RNA binding. *Biochemistry*, 33: 8272-8281.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C. ve Smith, C. 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83:13-34.
- Stavraka, C. ve Blagden, S. 2015. The La-Related Proteins, a Family with Connections to Cancer. *Biomolecules*, 5:2701-2722.
- Stefano, J.E. 1984. Purified lupus antigen La recognizes an oligouridylate stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts. *Cell*, 36:145-154.
- Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D. ve Singer, F. 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, 28:291(5813):293-6.

- Vascotto, S.G., Beckham, Y. ve Kelly, G.M. 1997. The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. *Biochemistry and Cell Biology*, 75:479-485.
- Wang, Z., Glenn, H., Brown, C., Valavanis, C., Liu, J.X., Seth, A., Thomas, J.E., Karlstrom, R.O. ve Schwartz, L.M. 2009. Regulation of muscle differentiation and survival by Acheron. *Mechanisms of Development*, 126:700-709.
- Wolin, S.L. ve Cedervall, T. 2002. The La protein. *Annual Review of Biochemistry*, 71:375-403.
- Yoo, C.J. ve Wolin, S.L. 1994. La proteins from *Drosophila melanogaster* and *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast homolog of the La autoantigen is dispensable for growth. *Molecular and Cellular Biology*, 14:5412-5424.
- Zhang, Y. ve Stefanovic, B. 2016. LARP6 Meets Collagen mRNA: Specific Regulation of Type I Collagen Expression. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3):419.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Hatice KÜLKÖYLÜOĞLU

Doğum Yeri : Samsun

Doğum Tarihi : 19-02-1978

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : 19 Mayıs Lisesi, Samsun (1995)

Lisans : Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (İngilizce), Bolu

Yüksek Lisans : Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Öğretmenliği, Tezsiz Yüksek Lisans (2002-2004)

Yüksek Lisans: Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Tezli Yüksek Lisans (2016---)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

- 1) Bolu Fen Lisesi (2002-2003)
- 2) Dumlupınar İlköğretim Okulu, Mudurnu, Bolu (2004-2005)
- 3) Çok Programlı Lise, Bolu (2004-2005)
- 4) Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Tıp Fakültesi (2005-2014)
- 5) Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Bilimsel Endüstriyel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi, Bolu (2014- -)
- 6) Texas State University, Chemistry and Biochemistry Department (2017-2018)