



T.C
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



RNA İŞLEME VE DÖNÜŞÜMÜNDE IF5A TRANSLASYON FAKTÖRÜNÜN ROLÜNÜN KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yeşim ÖZAY

Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir

2022

**EGE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**CHARACTERIZATION OF THE ROLE OF THE
TRANSLATION IF5A FACTOR IN RNA
PROCESSING AND TURNOVER**

Yeşim ÖZAY

Danışman : Doç. Dr. Savaş İZZETOĞLU

Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir

2022

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**RNA işleme ve dönüşümünde IF5A translasyon faktörünün rolünün karakterizasyonu**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

11/05/2022

Yeşim ÖZAY

ÖZET**RNA İŞLEME VE DÖNÜŞÜMÜNDE IF5A TRANSLASYON
FAKTÖRÜNÜN ROLÜNÜN KARAKTERİZASYONU**

ÖZAY, Yeşim

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Savaş İZZETOĞLU

Nisan 2022, 80 sayfa

Translasyondaki önemi bilinen Ökaryotik başlangıç faktörü eIF5A, Archaea'da homoloğu olan aIF5A ve bakterilerde EF-P, uzama aşamasında tekrarlayan prolin sekanslarına geldiğinde duraklayan ribozomların kurtarılması ve translasyonun devam etmesi işlevini üstlenirler. Bu işlevlerini yerine getirebilmeleri için translasyon sonrası Hipuzinasyon adında bir modifikasyonla fonksiyonel hale gelmeleri gerekir. Aday onkogen olarak belirlenen eIF5A'nın yüksek ifadesi, çeşitli kanser tipinde olumsuz prognostik etkiler göstermesi kanser biyobelirteçleri olarak bu protein faktörlere önem kazandırmıştır. Evrimsel olarak korunmuş bu önemli rollerinin yanı sıra RNA metabolizmasında rollerinin olduğu önerilmiştir.

Bu çalışmada Crenarchaeal model organizma olan *Sulfolobus solfataricus*'tan izole ettiğimiz Arkeal translasyon faktörü aIF5A'nın karakterizasyonu, RNA metabolizmasında rol oynayıp oynamadığı ve aIF5A'nın önerilen RNA bağlanma ile RNA yıkımı görevleri için translasyonda olduğu gibi modifikasyona ihtiyaç duyup duymadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda aIF5A genini içeren plasmid pETM11, *Escherichia coli* Rosetta suşu kompetent hücrelerinde rekombinant *Sulfolobus solfataricus* translasyon faktörü aIF5A ifade edilip daha sonra Afinite Kromatografisi ile saflaştırılmıştır.

S.solfataricus genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak cDNA dizileri hedef RNA moleküllerine spesifik primerler dizayn edilerek Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile çoğaltılmış ve cDNA dizilerinin İn Vitro Transkripsiyon ile hedef RNA moleküllerine çevirimi yapılmış. Rekombinant proteinler ile RNA'lar arasında çeşitli İn Vitro deneyler gerçekleştirilmiş ve daha sonra rekombinant protein ve RNA'lar ile Dinamik Işık Saçılımı (Dynamic light Scattering-DLS) deneyleri gerçekleştirilmiş solüsyon içerisindeki davranışları çeşitli sıcaklık değişimlerine tabi tutularak analiz edilmiştir.

In vitro Degredasyon Assay deneyleri sonucunda translasyon faktörü aIF5A proteininin hipuzin modifikasyonu olmaksızın mRNA bağlanma ve yıkım kapasitesine sahip olduğu, kodlanmayan RNA'ları ise yıkımdan koruduğu verileri elde edilmiştir. DLS deneylerinde aIF5A solüsyon içerisinde sıcaklık arttırıldıkça kümelenmeye başladığı gözlemlenmiş fakat kodlanmayan RNA ile birlikte yapılan ölçümlerde kümelenmenin azaldığı bulgusu elde edilmiştir.

Elde edilen bu bulgular aIF5A faktörünün RNA bağlanma ve yıkım aktivitelerine sahip olduğunu ve bunun için herhangi bir modifikasyona ihtiyaç duymadığını kanıtlamaktadır. Arkeal faktörün daha iyi anlaşılmasını sağlayan bu çalışma ökaryotik proteinin de anlaşılmasına katkı sağlayarak, ökaryotik protein eIF5A'nın gelecekte kanserde erken tanı ve tedaviye yönelik hedef moleküller olarak kullanılabilmesinin yolunu açmaktadır.

Anahtar Kelimeler: e/aIF5A, Protein sentezi, RNA-bağlanma, RNA degradesyon, Biyobelirteç, Kanser.

ABSTRACT
**CHARACTERIZATION OF THE ROLE OF THE
TRANSLATION IF5A FACTOR IN RNA PROCESSING AND
TURNOVER**

ÖZAY, Yeşim

MSc in Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Savaş İZZETOĞLU

April 2022, 80 pages

Eukaryotic initiation factor eIF5A, which is known to be important in translation. eIF5A with its homolog aIF5A in Archaea and EF-P in Bacteria. These factors are translation elongation factors which perform the essential task to rescue ribosomes from stalling during the synthesis of proteins bearing particular sequences such as polyproline stretches. Indispensable for this action is the characteristic and unique post-translation modification: hypusination.

High expression of eIF5A which is determined as a candidate oncogene, and its negative prognostic effects in various cancer types have given importance to these protein factors as cancer biomarkers. In addition to this evolutionary conserved roles, it has been suggested to have function in RNA metabolism.

In this study, it was aimed to characterize the Archaeal translation factor aIF5A, isolated from Crenarchaeal model organism *Sulfolobus solfataricus* to analyse its function in RNA metabolism. And whether aIF5A needs modification or not for this suggested function like it has in translation elongation.

In accordance with this aim, plasmid pETM11 containing aIF5A gene was expressed in *Escherichia coli* Rosetta strain competent cells and purified by Affinity Chromatography method. Using *S.solfataricus* genomic DNA as

template, specific primers were designed for target RNA molecules and cDNA sequences amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR). The cDNA sequences were translated into target RNA molecules by In Vitro Transcription. In Vitro Degradation Assay experiments were performed between recombinant protein aIF5A and RNAs. Dynamic Light scattering (DLS) experiments were performed with recombinant protein aIF5A and RNAs subjecting them various temperatures and analyse their behaviour in solution.

As a conclusion of In Vitro Degradation Assay experiments, according to the data have been obtained that translation factor aIF5A has the capacity of binding ve degrading mRNA molecules while it has binding and protection activity on ncRNAs without needing hypusine modification. In DLS experiments it was observed that aIF5A when its in the solution, it has clustering behaviour. When together with RNA molecule in the solution, a decrease in aggregation has been observed.

These findings clearly shows that factor aIF5A has RNA-binding and RNA-degrading activities and does not need any modification for this function. This study provides better understanding of archaeal factor as well as it contributes to understand the eukaryotic factor eIF5A to be used as a target molecules for early diagnosis and treatment of cancer in future studies.

Key words: e/aIF5A, Protein Sythesis, RNA-binding, RNA-degrading, Biomarker, Cancer.

ÖNSÖZ

Hayatım boyunca insanlık yararına bir şeyler yapma isteği ve arzusu içerisindeydim. Yüksek lisans, benim için hem bilime olan tutkumu taçlandırmak hemde insanlara yardım etme arzumu gerçekleştirme yolundaki ilk basamaktı. Bu süreç bana araştırmanın ve öğrenmenin sonu olmadığını öğretti. Hem akademik hemde insani olarak beni geliştirip değiştiren bu yolculukta sabretmeyi, kararlılığı ve azimle çalışmayı ilke edindim.

Ege Üniversitesi Biyoloji bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında gerçekleştirdiğimiz bu tez çalışması, COVID-19 pandemi sürecinin başlangıcına denk geldi. Bu nedenle hayatımızın birçok alanında olduğu gibi tez sürecimde de çeşitli engellerle karşılaştık, herbirinin üstesinden çok sevgili hocalarım sayesinde gelmeyi başardık.

Translasyon faktörü aIF5A ve RNA molekülleri ile yaptığımız bu yüksek lisans çalışması benim bilime ve moleküler biyolojiye olan tutkumu pekiştirdi. Aynı şekilde bu çalışmanın, benzer bir konuyla ilgili araştırma yapmak isteyenlere yol göstermesini diliyorum.

İZMİR

//2022

Yeşim ÖZAY

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Archaea'da Protein sentezi.....	2
2.2. Ökaryotik Translasyon Faktörü eIF5A.....	8
2.2.1 eIF5A Yapı ve Posttranslasyonel modifikasyonu.....	8
2.2.2 eIF5A'nın Translasyondaki işlevi.....	12
2.2.3 eIF5A'nın diğer işlevleri ve Patolojik Hücrenel süreçlere etkileri.....	16
2.3. Bakteriyel Translasyon faktörü EF-P.....	17
2.3.1 EF-P Yapı ve Post-translasyonel modifikasyonu.....	17
2.3.2 EF-P'nin fonksiyonu.....	20
2.4. Arkeal Translasyon faktörü aIF5A.....	21
2.4.1 aIF5A'nın Yapısal özellikleri.....	21
2.4.2 aIF5A'nın Posttranslasyonel Modifikasyonu.....	23
3. ARAÇ VE YÖNTEMLER.....	26
3.1 E.coli'de Rekombinant Histidin işaretli N-His-aIF5A proteininin ekspresyonu.....	26
3.2. Escherichia coli'den rekombinant N-His-aIF5A'nın saflaştırılması.....	29
3.3. PCR Assay ve Ürünlerin saflaştırılması.....	33
3.4. In vitro Transkripsiyon.....	35
3.5 In Vitro Degredasyon Assay.....	39
3.6 Dinamik Işık saçılımı (Dynamic Light Scattering-DLS) Deneyleri.....	40
4. BULGULAR.....	43
4.1. Saflaştırma sonrası faktör aIF5A proteinlerinin SDS-PAGE'te görüntülenmesi ve saflık tayini.....	43
4.2. Multiple PCR ile cDNA amplifikasyonu sonuçlarının analizi.....	43
4.3 İn Vitro Transkripsiyonu yapılan RNA'ların görüntülenmesi ve Degredasyon Assay sonuçlarının Üre-PAGE'te görüntülenmesi.....	46
4.4 Dinamik Işık Saçılımı deneyleri sonuçlarının analizi.....	49
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	53
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	57
TEŞEKKÜR.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	64

KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
ASD	Anti shinedalgarno
aIF5A	Archaeal initiation factor 5A
cDNA	Complementary DNA
DEPC	Dietyhylpyrocarbonate
DHS	Deoxyhypusine synthase
DLS	Dynamic Light Scattering
DOHH	Deoxyhypusine hydroxylase
eEF2	Eukaryotic Elongation Factor 2
eIF1A	Eukaryotic Translation Initiation Factor 1A
eRF1	Eukaryotic Translation termination Factor 1
eIF5A	Eukaryotic initiation factor 5A
EF-P	Translation Elongation Factor P
GC7	N1-guanyl-1,7-Diaminoheptan
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
HIV	Human immunodeficiency virüs
IF	Initiation factor
IPTG	β -D-1-thiogalactopyranoside
K50	Lysine 50
LB	Luria bertani medium
Lys	Lysine
MS	Mass Spectrometry
NAD ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide
ncRNA	Non coding RNA
ORF	Open Reading Frame
OB	Oligonucleotide binding
OD	Optic density
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride

KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
PoliP	Poli Prolin
PTC	Ribosomal peptidyl transferase center
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment
SD	Shine Dalgarno
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Sso	Sulfolobus solfataricus
TBE	Tris Borate EDTA
TIF51A	Translation Initiation Factor 51A
TIF51B	Translation Initiation Factor 51B
Pi	pre-initiation
PCR	Polymerase chain reaction

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Canlılığın üç Domaininde Translasyon başlangıç adımlarının şematik gösterimi.....	5
Şekil 2.2: Arkeal translasyon başlangıç kompleksinin Cyro-EM haritası.....	7
Şekil 2.3: İnsan eIF5A proteini'nin kristal yapısı.....	9
Şekil 2.4: Ökaryotik eIF5A'nın aminoasit dizisi.....	9
Şekil 2.5: eIF5A'da Hipusin biyosentezinin şematik gösterimi.....	10
Şekil 2.6: Saccharomyces cerevisiae 80S ribozomuna bağlı eIF5A'nın Cyro-EM haritası.....	15
Şekil 2.7: EF-P, eIF5A ve tRNA'nın üç boyutlu yapılarının karşılaştırılması.....	18
Şekil 2.8: Pyrococcus horikoshii'den translasyon başlangıç faktörü 5A'nın gösterimi.....	22
Şekil 3.1: Sıvı besiyerlerine inokülasyondan önce rekombinant E.coli hücrelerini içeren besiyeri.....	26
Şekil 3.2: Rekombinant proteinin üretiminin gerçekleştirildiği sıvı besiyerleri.....	27
Şekil 3.3: Hücrelerin santrifüjlenme aşaması.....	28
Şekil 3.4: Santrifüjden sonra rekombinant proteinleri içeren hücrelerin toplanması.....	28
Şekil 3.5: Hücrelerin parçalanması, proteinlerin açığa çıkması için liziz tamponu eklenen hücreler.....	29
Şekil 3.6: Hücrelerin liziz tamponu içerisinde vorteks yardımı ile süspanse edilmesi.....	30
Şekil 3.7: Liziz tamponu içerisinde yeniden süspanse edilmiş hücreler.....	30
Şekil 3.8: Hücrelerin sonikasyon ile liziz aşaması.....	31
Şekil 3.9: Yıkama tamponu eklenip kromatografik kolon'dan geçirilerek safsızlıkların giderilmesi.....	32
Şekil 3.10: Kromatografik kolondan geçirilerek ependorflarda toplanılan wash, elution ve flow through sıvıları.....	33
Şekil 3.11: İn Vitro Transkripsiyonu yapılmış RNA örneklerinin EtOH ile presipitasyonu.....	36
Şekil 3.12: Sentezi yapılmış RNA'ların Üre-PAGE'te elektroforezi ve görüntülenmesi.....	37
Şekil 3.13: RNA'ların Fenol/kloroform yöntemi ile saflaştırılmasında kullanılan ajanlar.....	38
Şekil 3.14: RNA'lara uygulanan EtOH presipitasyonu için hazırlanan EtOH ve Sodyum Asetat.....	39
Şekil 3.15: İn Vitro Degredasyon Assay deneyi için hazırlanan reaksiyon tamponu.....	40
Şekil 3.16: DLS enstrümanında rekombinant RNA ve proteinlerin analiz edildiği kuvars küvet.....	41
Şekil 3.17: Kuvars küvetin EtOH ile temizlenmesi.....	41
Şekil 3.18: Malvern Z-sizer'da DLS ile rekombinant RNA ve Proteinlerin analizi.....	37
Şekil 4.1: Saflaştırılmış Histidin etiketli aIF5A proteinlerinin ardışık elüsyonları.....	38
Şekil 4.2: Histidin etiketli ve Histidin etiketsiz rekombinant proteinlerin SDS-PAGE'te karşılaştırılması.....	38

Şekil 4.3: Multiple PCR ile amplifikasyonu gerçekleştirilen cDNA'ların Agaroz Jelde görüntülenmesi.....	38
Şekil 4.4: Multiple PCR ile amplifikasyonu gerçekleştirilen cDNA'ların Agaroz Jelde görüntülenmesi.....	39
Şekil 4.5: Sso genomik DNA'sından çoğaltılan ncRNA98'e tamamlayıcı cDNA'lar.....	40
Şekil 4.6: İn Vitro Transkripsiyon ile üretilmiş RNA'ların Üre-PAGE'te görüntülenmesi.....	40
Şekil 4.7: ncRNA98'in Sso aIF5A ile zamana bağlı Degredasyon Assay deneyi sonuçlarının Üre-PAGE'te görüntülenmesi.....	41
Şekil 4.8: mRNA 2184, mRNA 0910 ve ncRNA98 ile aIF5A arasında gerçekleştirilen Degredasyon Assay deneyi sonuçlarının Üre-PAGE'te karşılaştırmalı gösterimi.....	41
Şekil 4.9: ncRNA98 ile aIF5A'nın zamana bağlı Degredasyon Assay deneyi sonuçlarının Üre-PAGE'te görüntülenmesi.....	41
Şekil 4.10: mRNA 0910 ile aIF5A'nın zamana bağlı Degredasyon Assay deneyi sonuçlarının Üre-PAGE'te görüntülenmesi.....	42
Şekil 4.11: mRNA 0910 ile hipuzin modifikasyonlu aIF5A'nın zamana bağlı degredasyon Assay deneyi sonuçlarının Üre-PAGE'te görüntülenmesi.....	42
Şekil 4.12: Sso aIF5A'sı ve ncRNA98'in Dynamic Light Scattering ile farklı sıcaklıklarda yapılan ölçümlerinin sonucu elde edilen grafikler.....	43-44

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1: Üç Domainde Translasyon başlangıç faktörleri ve işlevleri.....	6
Tablo 3.1: <i>S.solfataricus</i> mRNA 2184, mRNA 0910 ve ncRNA 98'in amplifikasyonunda kullanılan PCR protokolü.....	35



1.GİRİŞ

Canlılığın temel süreçlerinden biri olan protein sentezi aynı zamanda en karmaşık süreçlerden biridir ve oldukça sıkı bir düzenleme gerektirir. Bu nedenle evrimsel süreçte yüksek oranda korunmuş çeşitli yardımcı protein faktörleri içerir. Bunlar arasında Ökaryotlarda eIF5A, Arkelerde homologu olan aIF5A ve bakterilerde EF-P, translasyon sırasında tekrarlayan prolin sıralarına geldiğinde duraklayan ribozomların kurtarılması ve translasyonun devam etmesi işlevini üstlenirler. Fakat bu görevlerini gerçekleştirebilmek için translasyon sonrası Hipuzinasyon adında 2 enzimli bir yolak ile modifikasyona uğramaları gerekir. Ökaryotik faktörün birbirine yakın genler tarafından sentezlenen eIF5A1 ve eIF5A2 olarak iki izoformu bulunur. Bunlardan eIF5A1 temel izoformdur, çoğu hücrede yüksek miktarda ifadeye uğrar ve hücre proliferasyonu için temeldir. İkinci izoform eIF5A2 ise sadece birkaç normal dokuda ifade edilirken, birçok kanser tipinde yüksek oranda ifadeye uğrar bu yüzden aday onkogen olarak belirlenmiştir. Ayrıca her iki izoformun da yüksek oranda ekspresyonu, birkaç kanser tipinde olumsuz prognostik etkiler göstermesi her ikisine de kanser biyobelirteçleri olarak önem kazandırmıştır. Hem arke ve ökaryotların filogenetik yakınlıkları, hemde eIF5A/aIF5A faktörlerinin yapısal ve fonksiyonel yönden benzerlikleri göz önünde bulundurulduğunda arkeal faktörleri anlamak ökaryotik faktörlerinde daha basit bir arka planda yorumlanmasını sağlayacak ve ileride ökaryotik faktör ile yapılacak çalışmalarda yol gösterici olması beklenmektedir. Son yıllarda yapılan çeşitli *in vitro* çalışmalarda e/aIF5A faktörlerinin RNA bağlanma ve RNA yıkım aktivitelerine sahip olabilecekleri ortaya çıkmıştır. Bu nedenle bu faktörlerin protein sentezinde olduğu kadar RNA metabolizmasında da yer alabilecek çok fonksiyonlu bir protein olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada Arkeal translasyon faktörü aIF5A'nın karakterizasyonu ve RNA metabolizması ile ilişkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda Crenarchaeal model organizma olan *Sulfolobus solfataricus*'tan izole ettiğimiz aIF5A proteininin karakterizasyonu ve RNA metabolizmasındaki rolünü anlamak için çeşitli *in vitro* deneyler gerçekleştirilmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Archaea'da Protein Sentezi

1958'de Francis Crick tarafından önerilen Biyoloji'nin 'Central Dogması', DNA'da bulunan genetik bilginin önce bir RNA molekülüne kopyalandığını ve daha sonra fonksiyonel bir protein ürününe dönüştürüldüğünü belirtir. Central Dogmadaki en önemli adım, ribozomların bilgiyi bir alfabeden diğerine çevirdiği yani, bir nükleotid dizisini aminoasit dizisine dönüştürdüğü, dolayısıyla genotip ve fenotip arasındaki bağlantıyı temsil ettiği çeviri sürecidir.

Protein sentezi canlılığın 3 domaininde de (Bakteri, Arke ve Ökaryot) komponentleri'nin sayısı ve moleküler etkileşimler açısından hücresel süreçlerin en karmaşık olanıdır ve hücre kaynaklarının çoğunu tüketir. Aynı zamanda evrimsel süreçte en fazla korunmuş olan süreçlerden biridir. Esasen Translasyon mekanizması yaşam formlarının son evrensel ortak atasında da mevcuttu.

İlksel üç domain'in her biri bir translasyon adımının varyasyonlarını geliştirmiştir: Başlangıç aşaması, ana hız sınırlayıcı adımdır ve translasyon regülasyonu'nun temel hedefidir. Ayrıca Termination ve Ribozom geri dönüşümü aşamaları ile birlikte Arke, Bakteri ve Ökaryotlarda spesifik özelliklere sahiptir (Londei, 2007). Fakat translasyonun Uzama aşaması tüm hücrelerde değişmezdir.

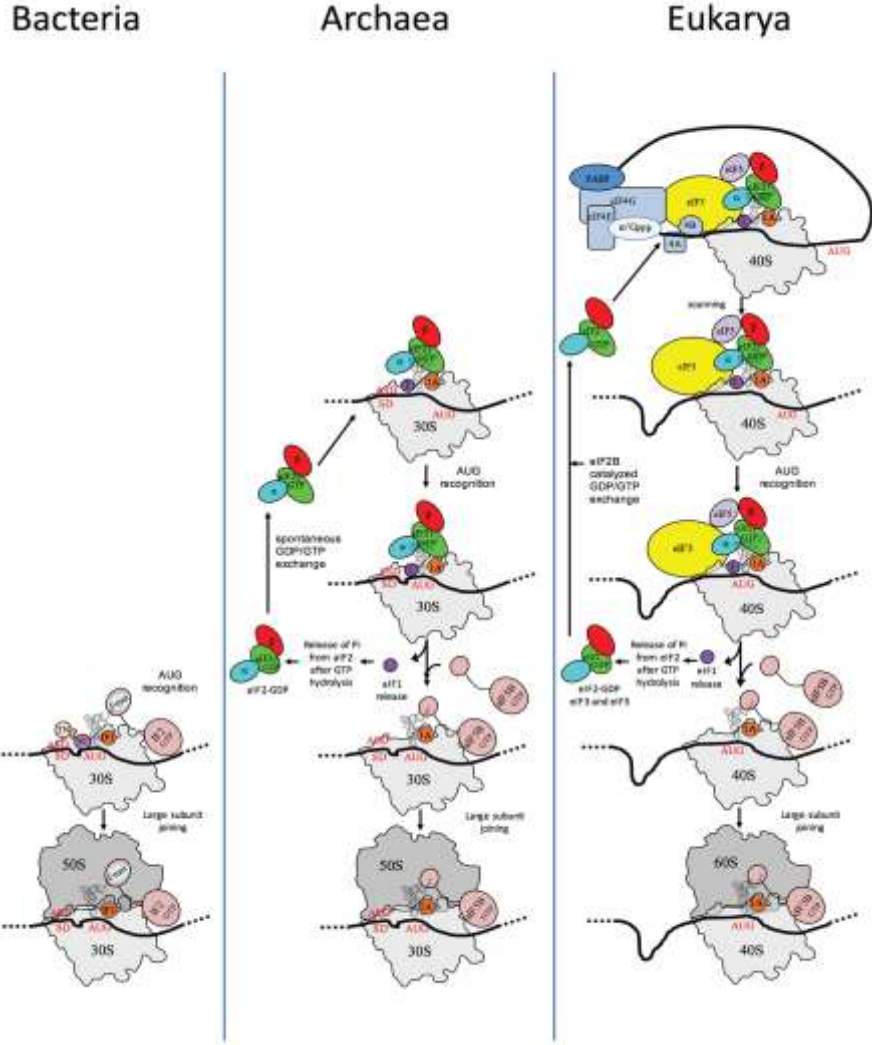
Son 20 yılda protein sentez mekanizmasını anlamak, translasyonun farklı adımlarına dâhil olan komponentleri karakterize etmek ve özellikle temel sorunu: mRNA başlangıç kodununun tanınması ve doğru okuma çerçevesi'nin (ORF) ayarlanması olan Başlangıç adımını anlayabilmek bir hayli çalışma gerektirdi. Ökaryot ve Prokaryotlarda translasyon başlangıç mekanizmasındaki temel farklılıkların çoğu mRNA'larının farklı olmasından kaynaklanır. Prokaryotik mRNA'lar polisistroniktir ve Ökaryot mRNA'ların aksine 5' ve 3' uçlarında modifikasyona uğramazlar. Ayrıca prokaryotik mRNA'lar Shine-Dalgarno adı verilen translasyon başlangıç kodunu'nun (AUG) upstream bölgesinde konumlanmış sekanslar içerirler. Bu sekanslar mRNA'nın, 16S rRNA ile etkileşim kurmasına izin verir. 16S rRNAda bu diziyeye komplementer Anti-Shine-Dalgarno sekansı olarak adlandırılır.

Buna karşılık ökaryotik mRNA'lar monosistroniktir ve 3', 5' uçlarında modifikasyona uğrarlar. Bunlardan biri ökaryotik mRNA'larının 5' uçlarına eklenen CAP (başlık) yapılarıdır. Transkripsiyonun başlangıcından hemen sonra ökaryotik mRNA'ların 5' ucuna alışılmadık 5'-5' trifosfat bağı ile eklenen 7-metilguanozin kalıntıları: mRNA'ların Ribozom tarafından tanınması ve RNaz'lardan korunması için çok önemli bir yapıdır. Ribozomlar translasyon faktörleri'nin yardımı ile transkript'in bu 5' ucuna bağlanır ve daha sonra mRNA üzerinde 5'→3' yönünde AUG (başlangıç kodonu) bulunana dek "Scanning" (tarama) adı verilen olay gerçekleşir. Başlangıç kodonuna gelindiğinde Kodon-Antikodon etkileşimi kurulur.

Arkelere ise translasyon mekanizmasıyla ilgili bilgiler çok sınırlıdır. Muhtemelen protein sentezinin erken aşamaları daha çok bakteriyel olanlara benzer. Şimdiye dek toplanan verilere göre iki mekanizmaya sahip olduğu görülmüştür (Benelli ve ark., 2003): biri mRNA-Ribozom ilişkisinin SD/Anti-SD interaksyonuyla kurulduğu polisistronik mRNA'lar ile çalışan mekanizma. Diğeri ise 5'UTR'den yoksun olan monosistronik mRNA'lar için kullanılan mekanizma. Lidersiz olarak adlandırılan bu mRNA türü doğrudan 30S Ribozomal alt birime bağlanamaz sadece tRNAi varlığını gerektiren kodon-antikodon etkileşimleri ile bağlanabilir. Crenarchaeota şubesine dâhil olan Halofiller ve Ekstrem Termofiller gibi bazı Arke türlerinde lidersiz mRNA çok fazladır (Haloferax volcanii'de %72, Sulfolobus solfataricus'ta %69). Lidersiz mRNA'lar yaşamın 3 Domaininde de mevcut olduğu için, evrimsel olarak en eski başlangıç mekanizması olduğu öne sürülmüştür. Ayrıca lidersiz mRNA'ların tüm farklı ribozom tipleri tarafından in vitro olarak translasyona uğrayabildiği görülmüştür (Grill ve ark., 2000).











Buna ek olarak: Arkeal ribozomlar, Bakteriyel ribozomlar ile aynı genel boyutlara sahiptir. Her ikisinde de 30S küçük alt birim ile 50S büyük alt birim, 70S olgun ribozomu oluşturur. Ve bunlar aynı rRNA moleküllerini içerir: 5S, 16S, 23S. Protein sentezini hedef alan çeşitli antibiyotiklere gösterdikleri direnç mekanizmalarının da benzer olması Arkeal ve Bakteriyel ribozomlar arasındaki benzerlikleri ortaya koymaktadır (Benelli ve ark., 2009). Buna karşılık Arke ve Ökaryotlar ribozomal protein içeriği açısından daha karmaşık bir benzerliğe sahiptir. Bakterilerin ribozomal proteinlerinin sayısı 57 iken, Arkeler'in 68,

Ökaryotlar'ın ise 78'dir. Bunların arasında 33 adet ribozomal protein sadece Ökaryot ve Arkelerde bulunmakla beraber yüksek homoloji gösterir (Lecompte ve ark., 2002). Buna benzer şekilde Arke ve Ökaryotlar, ribozomların etkileşim kurduğu, protein sentezine yardımcı özel proteinler olan translasyon başlangıç faktörleri (IFs) açısından da önemli benzerlikler paylaşırlar. IF'ler AUG başlangıç kodonunun bulunmasında ribozomlara yardım önderlik ederler, tRNAi ile etkileşime girerler ve Ökaryotik mRNA'ların 5' ucunda bulunan Cap yapısının tanınmasında işlev görürler. Bakterilerde yalnızca 3 adet monomerik başlangıç proteini bulunur: IF1, IF2, IF3; Ökaryotlarda ise en az 10 adet başlangıç faktörü bulunur, bunların birçoğu büyük multimerik komplekslerdir ve bakteriyel IF'ler ile herhangi bir homoloji göstermezler. Fakat Arkeler prokaryotik olmalarına rağmen bu açıdan da Ökaryotlara benzerdir. Şimdiye dek tanımlanmış altı adet Arkeal IF bulunur. Bu altı adet IF, ökaryotik IF'lere homologtur. Ve hiçbir faktör yalnızca bakteri ve arkeler tarafından paylaşılmaz (C.E. Aitken ve ark., 2012; E. Schmitt ve ark., 2020).

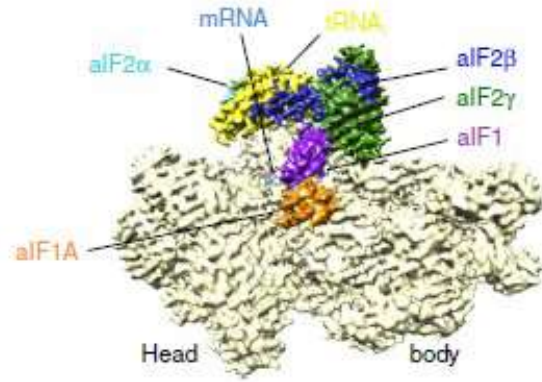


Şekil 2.1: Canlılığın üç domaininde translasyon başlangıç adımlarının şematik gösterimi. Şekil bakteriyel (solda), arke (ortada) ve ökaryota (sağda) temel adımları göstermektedir. Bakteriyel 30S altbirimi, genellikle bir Shine-Dalgarno (SD) dizisi ile 16S rRNA'nın 3' ucundaki bir Anti-Shine Dalgarno (ASD) dizisi arasındaki baz eşleşmesi sayesinde mRNA ile iletişim kurar. Başlangıç faktörleri olan IF1, IF2, IF3, başlatıcı tRNA'nın çağırılmasında ve başlangıç kodonu ile tRNA'nın eşleşmesinde görev alır. Başlatıcı tRNA'nın formil-metionin kısmı, IF2 tarafından tanıma için önemlidir. Başlangıç kodonu'nun tanınmasından sonra IF3 serbest bırakılır ve büyük ribozomal alt birim IF2'nin yardımı ile yapıya alınır. Arke ve Ökaryota, e/aIF1, e/aIF2 ve e/aIF5B'den oluşan ortak bir translasyon faktörleri grubunu paylaşır. e/aIF2 heterotrimer üç renkli bir kodla temsil edilir (α alt birimi mavi, β alt birimi kırmızı ve γ alt birimi yeşil). Ökaryotik translasyonda, mRNA'nın 5'-Cap ucunda: küçük ribozomal alt birim, metioninlenmiş başlatıcı tRNA ve initiation faktörlerini barındıran bir pre-initiation kompleksi oluşur. Bu kompleks daha sonra başlangıç kodonu (AUG) bulunana kadar mRNA'yı tarar (Scanning). tRNA antikodonunun AUG başlangıç kodonu ile baz eşleşmesi: eIF1 salınımını ve ardından eIF2 tarafından GTP hidrolizinden kaynaklanan P_i salınımını tetikler. Sırasıyla: eIF2, eIF3 ve eIF5 yapıdan serbest bırakılır ve eIF5B-GTP yapıya alınır. eIF5B-GTP büyük ribozomal alt birimin yapıya katılmasını sağlar. Archaea genellikle mRNA alımında bir SD dizisi kullanır. 30S alt birimi daha sonra, tRNA antikodonu ile baz eşleşmesi sayesinde P bölgesindeki başlangıç kodonu ile konumlandırılır. Genel olarak: aIF, aIF1A, aIF2 ve aIF5B faktörleri ökaryotik karşılıkları ile benzer roller oynar. Her üç durumda da, translasyon yetkin başlangıç kompleksi, e/aIF1A'nın (bakterilerde IF1) ve e/aIF5B'nin (bakterilerde IF2) yapıdan serbest bırakılmasından sonra oluşur. Ökaryota'da eIF4E, eIF4G ve eIF4A'nın oluşturduğu kompleks eIF4F olarak bilinir. eIF3 ise 6 (mayalarda) ila 13 (memeli) alt birimden oluşur (sarı renkle temsil edilmiştir) (Schmitt ve ark., 2020).

Tablo 2.1 : Üç Domainede translasyon başlangıç faktörleri. Arkeal translasyon faktörleri ve yapıları, ve ökaryot ve bakterilerdeki ortologlarının yapıları gösterilmektedir. e/aIF2, şekil 2.1'deki gibi renklendirilmiştir. Ökaryotik eIF2β'nın N-terminal'e özgü bilinmeyen yapısı oval olarak gösterilmiştir. aIF2'nin yapısı PDB 3V11'den alınmıştır (Schmitt ve ark., 2012), aIF1 ve aIF1A Coureux ve ark.(2016)'dan alınmıştır. eIF2, eIF1 ve eIF1A'nın yapıları PDB 6FYX'den (Llacer ve ark., 2018). IF1 PDB 3140'tan (Hatzopoulos and Mueller-Dieckmann, 2010). Bakteriye IF3 iki adet alt birimden oluşmuş bir proteindir. IF3 ve e/aIF1 arasındaki benzerlik, IF3 C-terminal ucun yapısal ve işlevsel benzerliğine dayanmaktadır. Bu benzerliğe rağmen, iki α-β kıvrımının topolojileri farklıdır. Bu da bize ortak bir atadan gelmediklerini gösterir. aIF5B PDB 1G7T'den (Roll-Mecak ve ark., 2000), eIF5B PDB 4N3N'den (Kuhle and Ficner, 2014), ve IF2 PDB 5LMV'dan alınmıştır (Hussain ve ark., 2016). e/aIF5B/IF2 için renk kodu şu şekildedir: G-domain ve domain II yeşil, domain III açık turuncu, linker sarı ve domain IV kırmızı. Domain IV'teki spesifik arkeal helix mavi renkle gösterilmiştir. eIF2B'nin katalitik γ ve ε alt birimleri arkeada bulunmaz. Arkeadaki eIF2B α, β, δ homologlarının işlevi net değildir ve translasyonun initiation aşamasıyla ilgisi olmayabilir (Dev ve ark., 2009; Gogoi ve ark., 2016). aIF4A ortoloğu birçok arkeada bulunur. Bununla birlikte , Haloferax volcanii'de karşılık gelen genin silinmesi, yalnızca küçük bir fenotip göstermiştir (Gabel ve ark., 2013).

Bacteria	Archaea	Eukarya	Function
-	aIF2 (α,β,γ) 	eIF2 (α,β,γ) 	Binds tRNA _i , GTP hydrolysis and releases Pi coupled to start codon recognition.
~IF3*	aIF1 	eIF1 	Participates in accuracy of start codon selection.
IF1 	aIF1A 	eIF1A 	Participates in accuracy of start codon selection.
IF2 	aIF5B 	eIF5B 	Binds tRNA _i , facilitates joining of the large ribosomal subunit
-	-	eIF5	Accelerates hydrolysis of GTP by eIF2 (GTPase activating protein, GAP).
-	aIF2B (α,β,δ)*	eIF2B (α,β,γ,δ,ε)	eIF2B catalyzes GDP/GTP exchange on eIF2 (guanine nucleotide exchange factor, GEF).
-	-	eIF3 (6 to 13 subunits)	Participates in the formation of the pre-initiation complex.
-	aIF4A**	eIF4F (4A, 4G, 4E)	eIF4F tethers the pre-initiation complex to the 5' cap of the mRNA before scanning.
-	-	eIF4B	Assists eIF4F.

Arkeal pre-initiation kompleksi'nin olası yapısı: 30S küçük alt birim, aIF1, aIF1A, Met-tRNA_i, mRNA, and $\alpha\beta\gamma$ -aIF2 dahil olmak üzere Cryo-EM (Kriyojenik elektron mikroskobu) analizi ile önerilmiştir.



Şekil 2.2: Arkeal initiation kompleksinin Cryo-EM haritası (Coureux ve ark., 2016). Haritanın farklı bölgeleri bileşenleri gösterecek şekilde renklendirilmiştir. 30S alt birim soluk sarı, aIF1A turuncu, aIF1 mor, Met-tRNA_i sarı, mRNA açık mavi, aIF2 γ yeşil, aIF2 β koyu mavi, aIF2 α turkuaz.

Trimerik aIF2, ökaryotik karşılığı gibi GTP bağımlı bir reaksiyonla Met-tRNA_i ile etkileşime girerek 30S alt birim'e bağlanmasını uyarır (Pedullà ve ark., 2005). Yakın zamanda, aIF2'nin γ alt biriminin, mRNA'ların 5' ucuna bağlanarak bu sayede mRNA'ları degradasyondan korudukları keşfedilmiştir. Böylece bu faktörlerin *S. solfataricus*'ta ikili bir işlev sergilediği ortaya çıkmıştır (Hasenöhrli ve ark., 2008). eIF1 ile homolog olan aIF1: 30S alt birime bağlanarak tRNA_i ve mRNA'nın ribozomla etkileşimini kolaylaştırır (Hasenöhrli ve ark., 2006). aIF1A Ökaryal eIF1A'nın bir homologudur fakat işlevi hala tam olarak anlaşılammıştır. IF6 translasyon faktörü Archea'da ve Eukarya'da bulunur ancak bakterilerde bulunmaz. Yapılan bir çalışmada termofilik *S.solfataricus*'taki aIF6'nın ribozomun 50S alt birimine bağlanarak 30S ile etkileşimini önlediği böylece 70S başlangıç kompleksi'nin oluşumunu önlediği ortaya konulmuştur. Ve ayrıca aIF6'nın stres koşulları altında aşırı eksprese uğradığı kanıtlanmıştır. Bu nedenle olası işlevi'nin belirli koşullar altında

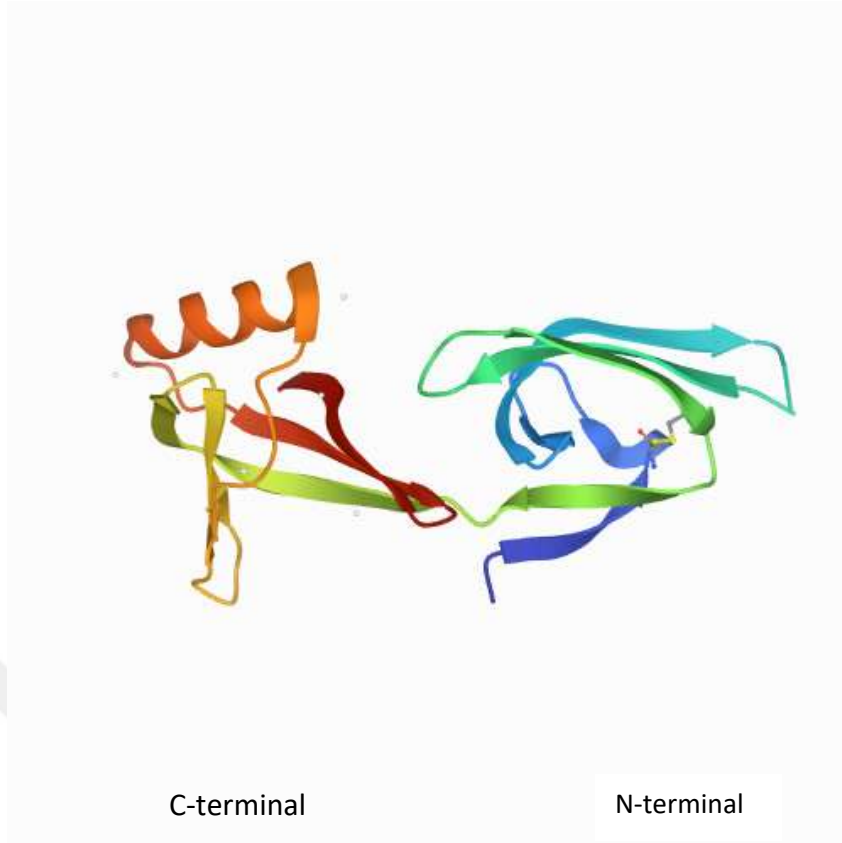
protein sentezini regüle etmek olabileceği öne sürülmüştür (Benelli ve ark., 2009). Yukarıdaki tabloda verilen başlangıç faktörleri arasında bulunmayan bir faktör daha bulunmaktadır. Arkeal translasyon faktörü aIF5A bu tezin temel odak noktasıdır. Bu faktör evrensel olarak korunmuş ve Eukarya ile homologtur. Prokaryotlarda EF-P ile ortologtur.

2.2 Ökaryotik Translasyon Faktörü eIF5A

2.2.1 eIF5A Yapı ve Post-translasyonel modifikasyonu

Ökaryotik translasyon faktörü eIF5A, Archaea'da (aIF5A) ve Bacteria'da (EF-P) homologları bulunan üç ana domaininde de yüksek oranda korunmuş 17 kDa'luk, küçük asidik bir proteindir. Bu protein Ökaryotlar ve Arkelere temeldir fakat bakterilerde temel moleküller değildir (Gäbel ve ark., 2013; Schnier ve ark., 1991; Park ve ark., 2010; Zhang ve ark., 2018; Balibar ve ark., 2013). İlk kez 1970'te tavşan retikülosit lizatlarından izole edilmiştir (Kemper ve ark., 1976; Benne ve ark., 1978).

İnsan eIF5A proteini'nin üç boyutlu yapısı, bu proteinin esas olarak β yaprak katlanmasına sahip olduğunu göstermektedir. Şekil 2.3'te gösterildiği gibi, iki farklı alandan oluşur: translasyon ile ilişkili diğer proteinlerde de bulunan, bir SH3 benzeri varil yapısına katlanmış temel bir N-terminal alanı ile, nükleik asitleri bağladığı bilinen ve eIF1A, eIF2 α ve diğer ribozomal proteinler gibi translasyon mekanizmasının bileşenleri proteinlerin tipik bir örneği olan beş iplikli bir β varil olan OB katlanmasını barındıran C-terminal alanı (Dias ve ark., 2013).



Şekil 2.3: İnsan eIF5A proteini'nin kristal yapısı (rcsb.org/protein data bank).

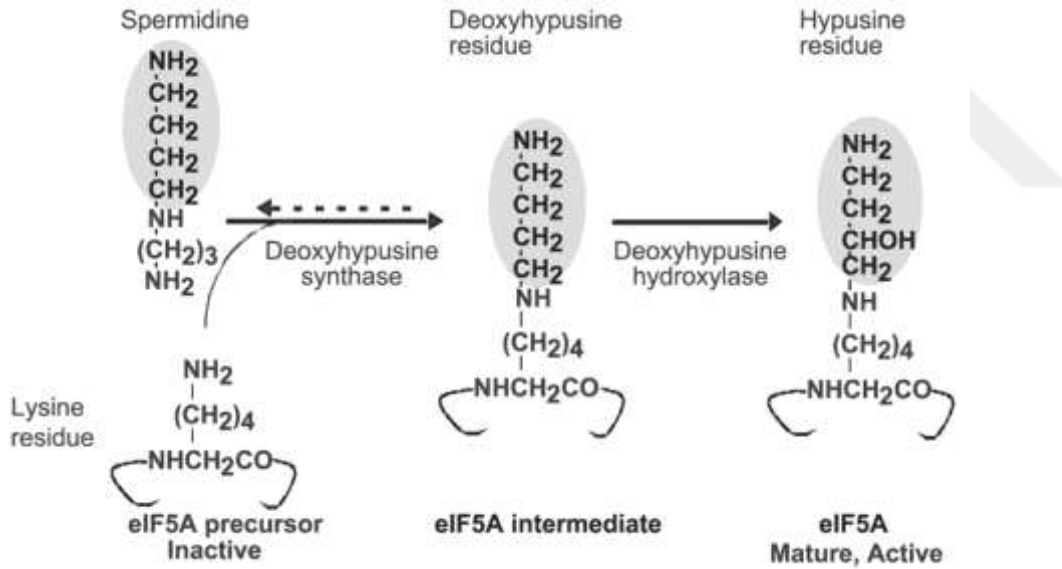
eIF5A proteini tüm ökaryotlarda, özellikle spesifik bir lizin aminoasitinde (insanda K50 ve maya eIF5A'sında K51) translasyon sonrası modifiye edildiği N-terminal alandaki $\beta 3$ ve $\beta 4$ ipliklerini bağlayan açıktaki bir halkada yüksek oranda korunmuş aminoasit dizileri içerir.



Şekil 2.4: eIF5A aminoasit dizisi (insanda bulunan dizi gösterilmiştir). Korunumun derecesi renk kodlaması ile gösterilmiştir; kırmızı %100 korunmuş bölgeleri ifade eder, koyu turuncudan sarıya >%80 ila >%50 oranında korunmuşluk, beyaz önemli bir benzerliğin görülmediği bölgeler (Wolff ve ark., 2007).

Modifikasyon bölgesinin (STSKTGKHHGAK) sahip olduğu aminoasit dizisi ökaryotlarda 100'den fazla farklı türde bulunur. Oldukça korunmuş, hidrofilik bir bölgedir (Park ve ark., 2010).

Hipuzin ilk kez, Shiba ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir (1971). Yeni amin bileşenleri araştırmaları sırasında sığır beyin özünden elde edilmiştir. Adı iki bileşeninden türetilmiştir: **hidroksi**putresin ve **lizin**. Yaklaşık 10 yıl sonra hipuzinin yalnızca translasyon faktörü eIF5A'da mevcut olduğu ve bir translasyon sonrası modifikasyon ile meydana geldiği keşfedilmiştir. Şuan halen eIF5A, hipuzin içeren bilinen tek proteindir. Bu benzersiz modifikasyon iki adımlı enzimatik bir yolak ile gerçekleşir (şekil 2.5): ilk adımda deoksihipuzin sentaz (DHS) bir aminobütil grubunu poliamin spermidinden eIF5A öncülünün lizin aminoasitine aktarır. Bu sayede bir ara bileşik olan deoksihipusin oluşumu katalizlenmiş olur. DHS, koenzim olarak NAD⁺ (Nikotinamid adenin dinükleotid)'a bağlıdır. Bu ara ürün daha sonra deoksihipusin hidroksilaz (DOHH) tarafından hidroksillenerek hipuzin aminoasitini meydana getirir. Böylece olgun ve aktif eIF5A oluşmuş olur (Park ve ark., 2010; Wolff ve ark., 2007).



Şekil 2.5: eIF5A'da Hipuzin biyosentezi (Park., 2006).

eIF5A'nın kuarterner yapısı ile ilgili olarak, proteinin hem solüsyonda hem de in vivo olarak homodimer olduğu gösterilmiştir. 2009'da yapılan bir çalışmada, Gentz ve çalışma arkadaşları *S. cerevisiae*'de eIF5A dimerinin oluşumunun, hücrel RNA moleküllerinin yanısıra hipuzin aminoasitinin varlığını gerektirdiğini gösterdi (Gentz ve ark., 2009). Mayada yapılan son deneylerde ise, eIF5A'nın hipuzin aminoasitinin varlığından bağımsız olarak, in vitro ve in

vivo RNA'ya bağımlı bir şekilde dimerler oluşturduğunu göstermiştir. Bu oligomer konformasyonu eIF5A dimerinin bakteriyel EF-P'ye benzeyen L şeklinde olduğunu ve bir tRNA'nın üçüncül yapısı ile üst üste binebileceğini gösteren SAXS (Small-angle X-ray scattering) analizi ile de doğrulandı (Dias ve ark., 2013). eIF5A ve hipuzin modifikasyonu ökaryotlar için temel bir öneme sahiptir. Ve eIF5A'nın yanısıra hipuzinasyonda işlev gören iki enzim: DHS ve DOHH da tüm ökaryotlarda oldukça korunmuştur (Wolff ve ark., 2007).

Ökaryotlarda eIF5A'nın çeşitli izoformları tanımlanmıştır (Jenkins ve ark., 2001). *S.cerevisiae* mayasında iki eIF5A geni vardır: TIF51A ve TIF51B, oksijen tarafından regüle edilir. TIF51A esas olarak aerobik koşullar altında ifade olurken, TIF51B sadece anaerobik koşullarda ifade olur (Schnier ve ark., 1991).

Bu iki genin mayada aynı işlevi yerine getirdiği ve bu genlerden birinin veya her ikisinin inaktivasyonu sonucu, *S. cerevisiae* organizmasının yaşamsal faaliyetlerini yerine getiremediği gözlemlenmiştir. eIF5A proteini'nin ifadesinin azaltıldığı hücrelerde, G1 tutuklanmasına benzer fenotip gözlemlenmiştir (Kang and Hershey ve ark., 1994). Buna karşın *Caenorhabditis elegans* gibi daha yüksek organizmalarda iki eIF5A geni, IFF-2 ve IFF-1 farklı fonksiyonlara ve doku lokalizasyonuna sahip iki izoformu kodlar: eIF5A1 ve eIF5A2.

eIF5A1 somatik doku gelişimi ve organizasyonu için gerekli iken eIF5A2 germline ve gametogenez için gereklidir (Hanazawa ve ark., 2004).

Translasyon sonrası Hipuzin modifikasyonuna ek olarak, maya eIF5A proteininin Ser2 aminoasitinde fosforillendiği bilinmektedir (Klier ve ark., 1993), ancak mutasyon çalışmaları, eIF5A'nın fosforilasyonunun, hipuzin modifikasyonunun aksine proteinin fonksiyonunda herhangi bir etkisi olmadığını ortaya koymaktadır.

2.2.2 eIF5A'nın Translasyondaki işlevi

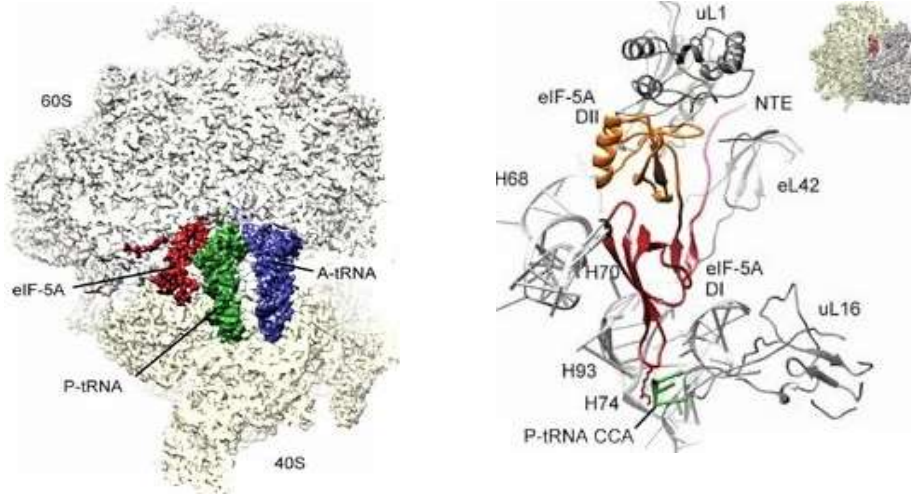
eIF5A ilk olarak 1978'de retikülosit lizatının ribozomlarından saflaştırıldığında ilk olarak akla protein translasyonuna dahil olduğu fikrini getirmiş olsa da tam olarak işlevi anlaşılamamıştı. Yıllar içinde maya eIF5A'sı ile yapılan biyokimyasal ve moleküler genetik çalışmalar bu faktörün işlevi hakkında bizlere yeni bilgiler sağladı. Mayada eIF5A seviyelerinin azalmasının

etkisi incelendiğinde, daha önce bildirilen orta derecede inhibisyonun aksine, total protein sentezinde belirgin kusurlar gözlemlenmiştir (Kang ve Hershey., 1994; Saini ve ark., 2009). Ayrıca diğer çalışmalarda eIF5A'nın translasyon sürecinin yapısal bileşenleri ile çeşitli etkileşimlere girdiği gösterilmiştir. Rekombinant etiketli eIF5A ile birlikte saflaştırılan proteinler, *S. cerevisiae*'de tanımlanmıştır. Bunların arasında: 60S ribozomal protein P0, 40S ribozomal protein S5 ve translasyon elongation faktör 2 (eEF2) bulunur. Hipüzinasyona maruz kalan bölgede Lizin 51'in arginin'e mutasyonu, eIF5A'nın bu komponentler ile etkileşiminin yoğunluğunu azaltmıştır. Özellikle eIF5A/eEF2 arasındaki etkileşim kaybı gözlemlendiğinde bu etkileşimlerin hipusin'e bağımlı olduğu görülmüştür (Zanelli ve ark., 2006). 2016' da yapılan bir çalışmada bu iki translasyon faktörünün ribozoma bağlanma konusunda negatif bir işbirliği gösterdikleri kanıtlanmıştır (Rossi ve ark., Rossi ve ark., 2016). Farklı bir çalışmada, eIF5A'nın ribozomlara bağlanması, eIF5A etiketli etkileşimli ortakların bir listesini sağlayan Jao ve Chen (2006) tarafından doğrulanmıştır. 19 proteinden 14'ü, 40S veya 60S'den gelen ribozomal proteinlerdir. Diğer proteinler translasyon faktör 1A (eIF1A) ve iki şaperonini içerir. eIF5A'nın translasyonda 80S ribozomuna bağlandığını ve bu etkileşimin RNA ve Hipusin modifikasyonuna bağlı olduğu hipotezi öne sürülmüştür. Endojen maya eIF5A'sını kullanarak aynı sonuca varılmıştır (Jao ve ark., 2006). eIF5A'nın translasyon uzama aşamasına dahil olduğuna dair başka bir kanıt, polizom profili analiz edilerek elde edilmiştir. Bu teknik esas olarak, devam eden translasyon uzama adımını inhibe eden sikloheksimid muamelesi ile mayadaki translasyonun fonksiyonunu değerlendirmek için kullanılır. Sıcaklığa duyarlı eIF5A mutantlarının polizom profilinin analizleri, sınırlayıcı sıcaklıkta polizom/monozom oranında bir artış göstermiştir buda bir translasyon uzama aşamasının bloke olması ile açıklanabilir (Zanelli ve ark., 2006). Benzer sonucun bir translasyon elongasyon faktörü inhibitörü olan Sordarin ile muamele edilen wild type hücrelerde de görülmesi (Saini ve ark.,2009), eIF5A'nın elongasyondaki rolünü bir kez daha desteklemektedir.

eIF5A'nın translasyondaki işlevi için dönüm noktasına, 2013 yılında Gutierrez ve çalışma arkadaşlarının, ardışık poliprolin aminoasitleri içeren spesifik proteinlerin translasyonunda eIF5A'nın oldukça önemli bir rol oynadığını ortaya

çıkarmak için *in vivo* ve *in vitro* deneyleri gerçekleştirmesi ile ulaşıldı (Gutierrez., 2013). *In vitro* analizlerin sonuçları, en az üç ardışık prolin aminoasiti içeren peptitler'in eIF5A'ya mutlak bağımlılık gösterdiği sonucunu doğruladı. Translasyon esnasında bu prolin motifleriyle karşılaşan ribozomlar duraklar, translasyona devam edemezler ve eIF5A tarafından kurtarılmaları gerekir.

Bunun nedeni, bazı amino asitler zayıf donör veya zayıf akseptörler olmaları nedeniyle, tüm peptit bağlarının eşit verimlilikte oluşturulmadığı gerçeğinde yatmaktadır. Prolin yan zincirindeki üç karbon atomu bir halka oluşturarak tekrar peptid bağındaki nitrojen atomuna bağlandığı için, birincil amino grubundan yoksundur. Yan zincirinin bu yapısı Prolin amino asidini peptidil transferaz reaksiyonlarında hem zayıf bir alıcı hem de zayıf bir verici yapar, bu nedenle ardışık prolin tekrarları ribozomun duraklamasına sebep olur. eIF5A'nın Ribozoma bağlanmasının yapısal çalışmaları, eIF5A'nın translasyon sırasında duraklayan ribozomların kurtarılmasına nasıl katkıda bulunabileceğini anlamaya yardımcı olmuştur. 2016 yılında Schmidt ve ekibi tarafından kriyo elektron mikroskobu ile bir model önerildi ve ardından aynı yıl Melkinov ve ekibi tarafından *S. cerevisiae* 80S ribozomlarına bağlanan eIF5A'nın kristal yapısı, eIF5A'nın P ve E bölgeleri arasında yer aldığı, tRNA'lar, rRNA ve ribozomal proteinler ile etkileşime girdiği bir model önerildi (Schmidt ve ark., 2016; Melnikov ve ark., 2016). Şekil 2.6'da gösterildiği gibi, eIF5A'nın domain I alanı, H74 ve H93 sarmallarında bulunan 25S rRNA nükleotitleriyle temas kurarken, II. alan, ribozomal protein L1 ve L2 ile temas eder. Ve yüklü hipusin, ribozomun PTC'sinde, peptidil-tRNA'nın CCA ucunun A76'sını etkileyerek P-bölgesindeki poliprolinlerin konumunu stabilize eder ve kısıtlar. Böylece, eIF5A yeni oluşan zincirin P'den A bölgesine transferini kolaylaştırır.



Şekil 2.6: *S.cerevisiae* 80S ribozomuna bağlı eIF5A'nın Cryo-EM haritası. **A.** eIF5A-80S kompleksinin kriyo-EM haritasının enine kesiti. eIF5A bağlanma bölgesi kırmızı ile gösterilmiştir. **B.** Domain I (kırmızı) ve II (Turuncu) ve eIF5A'nın N-terminal uzantısının (pembe), rRNA ve ribozomun protein komponentleri ile etkileşiminin moleküler modeli (Schmidt et al., 2016).

Proteomik bir yaklaşım ile yapılan bir çalışmada ise 3 ana domainde poliprolin motiflerinin sıklığı belirlenmiştir ve PPP veya PPG içeren proteinlerin sıklığının organizmanın karmaşıklığı arttıkça doğru orantılı olarak arttığı gözlemlenmiştir. *E.coli*'de % 5,8 , *S.cerevisiae*'de %9,7 , *H. Sapiens*'de ise %33,5'tir. Bu bize, bakterilerin EF-P'sinin aksine eIF5A'nın tüm ökaryotlarda neden hayati öneme sahip olduğunu açıklar niteliktedir (Mandal ve ark., 2014). Fakat bu görüş, mayadaki eIF5A tükenme suşunun ribozom profilinin, diğer birçok tri-peptid motifinin ribozomun durmasına neden olduğunu gösterdiği yakın tarihli bir çalışmada biraz değişmiştir. İlginç bir şekilde, bu motiflerin çoğu daha önce bildirildiği gibi sadece poliprolin değil aynı zamanda aspartik asit, glisin ve diğer amino asitlerin bir kombinasyonunu içerir ve bunlardan birkaçı hiç prolin içermez. Ayrıca, eIF5A eksikliğinin global translasyon elongasyon oranı üzerinde etkileri varken EF-P kaybının etkisi yoktur (Schuller ve ark., 2017). Bu bulgular, daha çok prolin tekrarları içeren proteinlerin translasyonuna spesifik bir protein olan ortolog EF-P'nin aksine, eIF5A'nın global bir translasyon elongasyon faktörü olduğu hipotezini doğrumuştur. Aynı çalışmada Schuller ve ekibi ayrıca, bu temel translasyon faktörü eIF5A'nın translasyon terminasyonundaki rolünü gösterdi. Aynı eIF5A tükenme suşu kullanılarak, in vivo ribozom profillemeye deneyleri yoluyla, stop kodonu sayısının wild-type ile karşılaştırıldığında 12 kat daha yüksek olduğunu ve 3'UTR bölgesinde ribozomun konumlanmasının, bir translasyon kusuru ile tutarlı olarak arttığını

kanıtlamışlardır. Buna karşın bu grubun önceki çalışmaları, EF-P'den yoksun *E.coli* hücrelerinde benzer bir etki göstermemiştir. Ayrıca in vitro translasyon sistemi kullanarak yapılan bir deneyde, hipusinlenmiş eIF5A'nın eRF1 (Eukaryotic translation termination factor 1) aktivitesini uyardığını göstererek, translasyonun sonlandırılmasında önemli bir rol oynadığı fikrini desteklemiştir.

2.2.3 eIF5A'nın diğer işlevleri ve Patolojik Hücresel süreçlere etkileri

Bir translasyon faktörü olarak translasyondaki rolüne ilaveten ökaryal eIF5A, mRNA dönüşümü (Zuk ve Jacobson, 1998), hücre döngüsünün ilerlemesi (Hanauske-Abel ve ark., 1994), apoptoz (Caraglia ve ark., 2013), hücre polaritesi (Chatterjee ve ark., 2006; Zanelli ve Valentini 2005), retroviral ve protozoan enfeksiyonu (Hoque ve ark., 2009; Olsen ve Connor, 2017) ve stres yanıtı (Gosslau ve ark., 2009) gibi çeşitli hücresel süreçlere dahil olduğu gösterilmiştir.

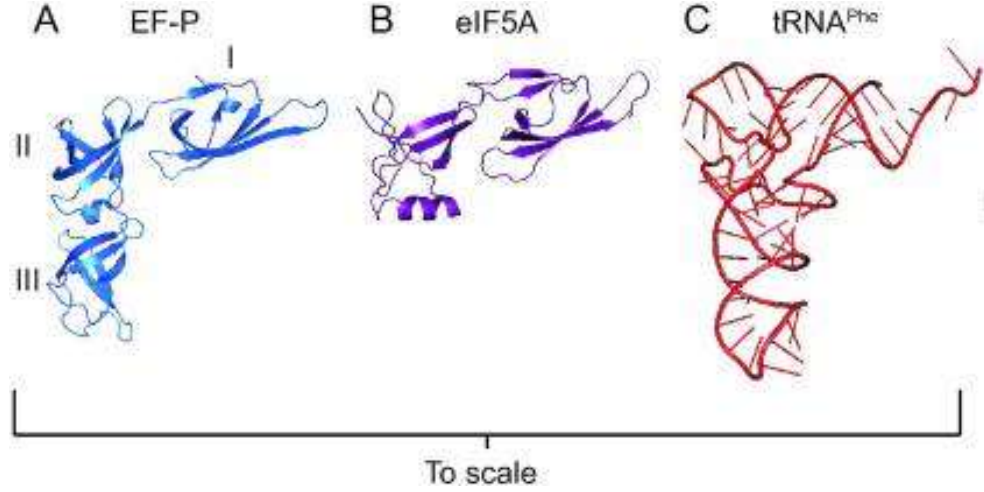
Bir dizi çalışma, eIF5A'nın doğrudan protein sentezi ile ilgili olmayan süreçlere dahil olduğunu göstermektedir. İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü (HIV) üzerine yapılan çalışmalar, eIF5A'nın viral mRNA'larla etkileşime girdiğini, bu mRNA'ların nukleustan sitoplazmaya yer değiştirmesine aracılık ettiğini ve bu etkileşimlere hipusinlenmiş proteinin spesifik mRNA ile stabil bir şekilde bağlanmasının olanak verdiği ortaya çıkmıştır. SELEX (üstel zenginleştirme ile ligandların sistematik evrimi) tekniği kullanılarak, eIF5A ile bağlanan, FLAG etiketli eIF5A ile birlikte immünpresipitasyon ile izole edilen mRNA'ların, korunmuş bir UAACCA ve AAAUGU motiflerini paylaştığı gösterilmiştir (Xu ve Chen, 2001). eIF5A-RNA etkileşiminin, saç tokası ve internal loop yapıları gibi RNA moleküllerindeki bazı yapısal unsurlardan kaynaklandığını ve ökaryotik translasyon faktörü 5A'nın aynı zamanda spesifik bir hipusin bağımlı RNA bağlayıcı protein olduğu önerilmiştir. Bu görüş, yukarıda da bahsedildiği gibi, nükleik asit bağlayıcı protein için tipik bir OB katlanmasına sahip olan eIF5A C-terminal domaininin yapısının analizinde destek bulur. Özellikle proteinin bu kısmı negatif yüklüdür ve bir RNA şaperon proteini CspA ile yapısal bir benzerlik paylaşır.

Diğer bir yandan eIF5A proteininin diyabet, sıtma, HIV-1 enfeksiyonları ve en önemlisi kanser gibi farklı hastalıkların patojenitesinde anahtar rol oynadığına dair kanıtlar da bulunmaktadır (Kaiser ve ark., 2012). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ise yine eIF5A'nın bir çok tümör tipinde etkisi olduğunu göstermiştir. Özellikle insan eIF5A'sının iki izoformunun farklı işlevler ve ekspresyon paternleri sergilediği gösterilmiştir. eIF5A-1 proteini tüm dokularda yapısal olarak eksprese olurken, eIF5A-2 izoformunun daha çok hücre ve dokuya spesifik olarak ifade olduğu ortaya çıkmıştır. Örneğin bazı ovaryum kanseri dokularında, kolorektalde (Clement ve ark., 2003), hepatokarsinom hücre dizilerinde ve fare embriyonik karaciğerinde (Lee ve ark., 2010) bu proteinin aşırı ifadesi hücre sel dönüşüme neden olmuştur. Bu bulgulara dayanarak eIF5A-2'nin bir onkogen olduğu öne sürülmüştür. Yapılan bir çalışmada tümör oluşumu ve hastalığın ilerlemesi için eIF5A'nın hipüsinasyonunun gerekli olduğunu ve hipüsin inhibisyonunun tümör oluşumunu engellediği gösterilmiştir (Nakanishi ve Cleveland, 2016). Bu nedenle bu alandaki araştırmalar, kanser hastalığının tedavisinde hâlihazırda var olan diğer terapilerle birlikte kullanılabilir, eIF5A proteinini ve hipüsinasyon yolağını hedefleyen terapötik bileşiklerin tanımlanmasına doğru ilerlemektedir.

2.3. Bakteriyel Translasyon Faktörü EF-P

2.3.1 EF-P Yapı ve Post-Translasyonel Modifikasyonu

Translasyon faktörü EF-P, Ökaryotik/Arkeal başlangıç faktörü 5A'ya homolog olan, evrensel olarak korunmuş bir bakteriyel translasyon faktörüdür. İlk kez 1975'te Glick ve Ganoza tarafından izole edilen EF-P, üç domaine sahip bir yapı sergileyen 21 kDa'lık küçük bir proteindir. Sahip olduğu L şekli bir tRNA molekülünü anımsatır.



Şekil 2.7: EF-P, eIF5A ve tRNA'nın üç boyutlu yapılarının karşılaştırılması. **A.** *Thermus thermophilus* EF-P'sinin üç boyutlu yapısı. Domain I, II ve III bölgeleri gösterilmiştir. **B.** *S. cerevisiae* eIF5A'sının üç boyutlu yapısı. **C.** *S. cerevisiae* tRNA-Phe'nin üç boyutlu yapısı (Hummels and Kearns., 2020)

N-terminal kısmı, L'nin bir kolunu oluşturan alan I ve II tarafından oluşturulur, son alan EF-P'nin C-terminalini oluşturur. Domain II ve III, *E. coli* soğuk şok proteininde, poliribonükleotid nükleotidiltransferazda, transkripsiyon faktörü Rho'da ve DNA veya RNA moleküllerini bağladığı bilinen diğer proteinlerde gözlemlenen OB-kat motifine (oligonükleotid bağlama motifi) benzerdir. Bununla birlikte, EF-P asidik bir proteindir ve genel yüzeyi çoğunlukla negatif yüklüdür. Özellikle domain II ve domain III negatif yüklü aminoasitleri barındıran bölgelerdir. EF-P'nin domain I bölgesi ile eIF5A'nın N-terminal alanı ve EF-P'nin Domain II alanı ile eIF5A'nın C-terminal alanı aynı katlanmaya sahiptir. Fakat Domain 3 EF-P'ye özeldir ve domain II ile yüksek oranda homoloji gösterir. Buda bize EF-P'deki bu ek alanın bir duplikasyon olayı ile oluştuğunu göstermektedir (Lassak ve ark., 2016). Bakteriyel EF-P ve ökaryotik eIF5A'nın dizilerine bakıldığında her iki proteininde N-terminal bölgesinde Lys50 aminoasitine karşılık gelen bölgenin yüksek oranda korunmuş olduğu görülmüştür (Park ve ark., 2011). *Thermus thermophilus* dahil bazı türlerde, lizin yerine arginin aminoasiti bulunmaktadır. Yapılan deneylerde, (tüm bakterilerde olmasada) EF-P'nin de translasyon sonrası modifikasyona maruz kaldığı kanıtlanmıştır. *E. coli* ve *Salmonella sp.*'de çalışılmış bu modifikasyona β-lizininasyon adı verilir. Ve YjeK, YjeA, YfcM enzimlerinin yardımıyla üç adımda gerçekleşir (Navarre ve ark., 2010; Yanagisawa ve ark., 2010; Peil ve ark., 2012). İlk adımda bir lizin-2,3-aminomutaz olan YjeK enzimi (EpmB

olarak da adlandırılır) serbest bir S- α -lizini, R- β -lizine dönüştürür (Behshad ve ark., 2006). Modifikasyonda yer alan ikinci enzim, lisil-tRNA sentetazların bir paraloğudur (YjeA aynı zamanda EpmA olarak da bilinir) ve bir R- β -Lizin'i ATP kullanarak spesifik bir lizinin ϵ -amino grubuna aktarır. Bu hipoteze dayanarak 2010'da yapılan bir çalışmada EF-P ile kompleks halinde bulunan *E.coli* YjeA'sının kristal yapısı çözülerek lys34'ün lisilasyonu gösterilmiştir (Yanagisawa ve ark.,2010). Ayrıca bir başka deneyde Aoki ve arkadaşları *E.coli*'den saflaştırılan natif EF-P'nin Lys34'te 144 Da'luk fazladan bir kütleyle sahip olduğunu ortaya koymuştur (Aoki ve ark., 2008). Sadece lisilasyonun EF-P'nin kütlesini yalnızca 128 Da arttıracığı tahmin edilmektedir. Bu tutarsızlık Peil ve arkadaşları tarafından gerçekleştirile bir deneyde; YfcM (EpmC) tarafından gerçekleştirilen başka bir modifikasyon aşamasının meydana geldiğini ortaya çıkarması ile çözülmüştür. Yapılan MS (kütle spektrometresi) analizlerinde YfcM'den yoksun hücrelerden gelen natif EF-P'nin kütlede 16 Da'luk bir azalma gösterdiği kanıtlanmıştır, bu da bu üçüncü enzimin *E.coli*'de EF-P'nin modifikasyon yolağını tamamladığını gösterir (Peil ve ark., 2012). YfcM modifiye edilmiş EF-P'yi tanıyarak lisil-lisin residüsünü hidroksiller. Her ne kadar hidroksilasyon ökaryotlarda da son modifikasyon adımı olsada, eIF5A'nın hipusinyasyonunda yer alan hidroksilazlar ile EF-P'nin lizilasyonu arasında herhangi bir evrimsel korelasyon yoktur. Bu modifikasyon tüm bakteri genomlarının yalnızca yaklaşık dördte birinde tanımlanmıştır (EpmA ve EpmB bakterilerin yaklaşık %26'sında bulunurken, EpmC neredeyse sadece γ -proteobakteriyel genomlarla sınırlıdır). Bu modifikasyonun organizmalardaki önemini ele alarak yapılan bir çalışmada tek modifikasyon mekanizmasının lizilasyon olmadığı öne sürülmüştür (Lassak ve ark., 2015). Bazı türler *E. coli*'de bulunan Lys34'e eşdeğer konumda EF-P'de korunmuş bir arginin residüsü (Arg32) ile karakterize edilirler. Model organizma olarak γ -proteobacterium *Shewanella oneidensis*'i kullanarak tanımlanan yol izinde ise 2'-deoxy-thymidine- β -L-rhamnose'un bir glikosiltransferaz (EarP) aracılığıyla EF-P Arg32'ye eklendiği rhamnosil modifikasyon yolağı tanımlanmıştır. Ayrıca deoksiheksoz oluşumu ile tutarlı olarak EF-P-Arg32 modifikasyon yolağı MS analizlerinde 146 Da'luk bir kütle kayması meydana getirmiştir. Ayrıca EarP aracılığıyla EF-P aktivasyonu gerçekleştiren bakteriler arasında; *Neisseria sp.*, *Bordetella pertussis* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi önemli patojen bakteriler

yer almaktadır ve efp veya earP genlerinin delesyonu bu organizmalarda patojenitenin yok olmasına yol açar. Özellikle *P. aeruginosa*'da mutant suşlar insan hücrelerini öldüremez (Lassak ve ark., 2015). Son olarak, hem EF-P'deki modifikasyonun hem de bu yollarda yer alan enzimlerin, mevcut bakteri genomlarının sadece yaklaşık %35'inde tanımlandığını belirtmek önemlidir. Buda bize muhtemelen henüz tanımlanmamış alternatif bakteriyel modifikasyon yolları olabileceğinin sinyallerini vermektedir.

2.3.2 EF-P'nin Fonksiyonu

EF-P yalnızca tek bir gen tarafından kodlanan bir proteindir, efp geni tarafından kodlanır. Bakterilerde evrensel olarak korunmuştur. eIF5A proteini için bildirilen aksine EF-P esansiyel bir protein değildir. Yapılan bir çalışmada, in vitro koşullar altında *E. coli* ve *P. aeruginosa*'da EF-P kodlayan gene nakavt uygulandığında büyüme yavaşlasada canlılığın devam ettiği gözlemlenmiştir (Balibar ve ark., 2013). EF-P proteini ağırlıklı olarak post-ribozomal süpernatanttan (%90) izole edildiği gibi, başlangıçta bir uzama faktörü olarak tanımlanmıştır. Bu modele göre, EF-P translasyon uzama aşamasında peptid bağı oluşumunu stimüle eder (Glick ve ark., 1975). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, EF-P'nin yüklü veya nispeten uzun aminoasit yan zincirine sahip olanlar gibi spesifik Aminoasit-tRNA'larda peptidil-transferaz aktivitesini arttırdığı üzerine çeşitli hipotezler ortaya atılmıştır (Glick ve ark., 1979; Ganoza ve Aoki 2000). EF-P için bir sonraki önemli bilimsel buluş, *Thermus thermophilus* EF-P'sinin 70S ribozomuna bağlı kristal yapısının tanımlandığı 2009 yılında olmuştur (Blaaha ve ark., 2009). EF-P'nin işlevine ilişkin, translasyon uzama aşamasında bir rolü olduğuna dair kanıt 2009'da gösterilen ökaryotik eIF5A çalışmalarıyla sağlanmıştır. EF-P, YjeA ve YjeK mutantları hücrede polizomların akümülyasyonuna neden olur (Bullwinkle ve ark., 2013). Ve bu mutantlara sahip bakteriler virülans, hücre hareketliliği, stres koşullarına karşı direnç gibi spesifik hücresel süreçlerle ilişkili pleiotropik fenotipler sergilemişlerdir. Bu sonuçlar daha önce ortaya konulmuş, translasyon uzama aşamasında EF-P'nin rolü olduğuna dair teorilerle tutarlılık göstermektedir. Özellikle eIF5A için tarif edildiği gibi spesifik mRNA'ların translasyonunda yer aldığı olasılığı oldukça yüksektir.

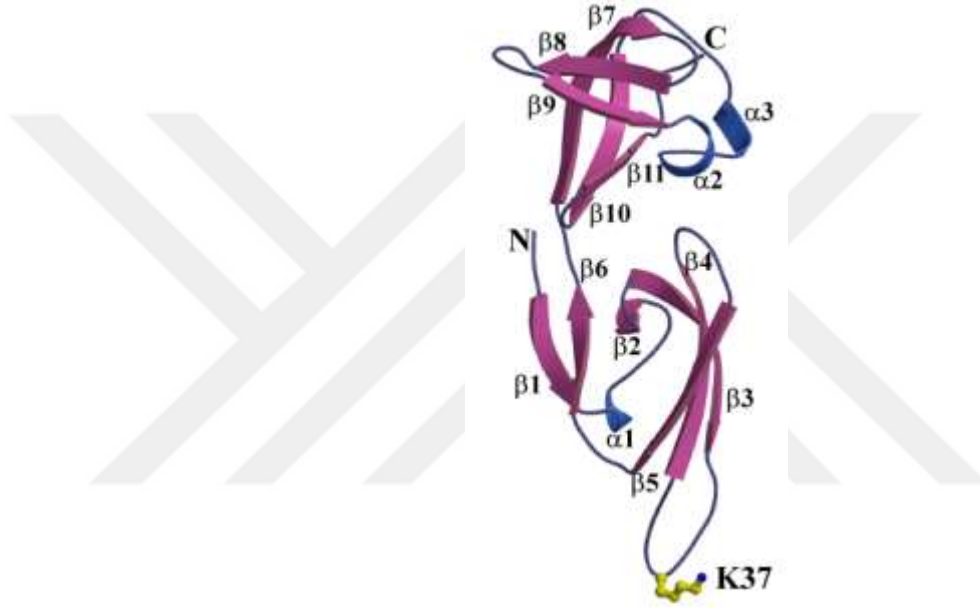
E.coli 'nin ribozom profillendirme deneyleri ile ilgili son çalışmalar, iki prolin motifi arasındaki peptid bağı oluşumunda EF-P'nin önemli rolü olduğunu göstermiştir. EF-P veya lizilasyon enzimi bulunmayan bakterilerde, ribozomlar translasyon esnasında bu motiflere geldiğinde durur ve translasyona devam edemezler. Ökaryotik karşılığı içi daha önce bahsedildiği gibi, bu durum siklin prolin yan zincirinin geometrisinden kaynaklanmaktadır ve EF-P işlevi peptidil-tRNA'nın CCA- ucunu stabilize etmektir. eIF5A için aynı poli-prolin spesifik fonksiyonu, mayada Gutierrez ve çalışma arkadaşları (2013) tarafından gösterilmiş olup, bu hipusin aminoasitinin tRNA'nın CCA- ucuyla doğrudan etkileşime girdiğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, poliP, PPG veya diğer duraklama motiflerini içeren proteinlerin sayısı ökaryotlarda daha fazladır. Buda bize bakteriyel EF-P canlılığın devamı için gerekli değilken eIF5A'nın niçin hayati öneme sahip olduğunu açıklayabilir. Hala EF-P ile ilgili birçok soru yanıtsız kalmaktadır bu soruları yanıtlamak için daha detaylı işlevsel ve yapısal çalışmaların yapılması gerekmektedir.

2.4 Arkeal Translasyon Faktörü aIF5A

2.4.1 aIF5A'nın Yapısal Özellikleri

Ökaryotik ve bakteriyel faktörlere güçlü yapısal ve işlevsel benzerlik gösteren Arkeal başlangıç faktörü 5A (aIF5A) olarak adlandırılan protein ilk kez 1992'de termofilik arke *Sulfolobus acidocaldarius*'tan izole edilmiştir. Ökaryotlar için bahsedildiği gibi hipuzin adı verilen bir lizin aminoasitinin translasyon sonrası modifikasyonu ile karakterize, 15 kDa'luk küçük bir proteindir (Bartig ve ark., 1992). Aynı zamanda üç domain arasında, hakkında en az bilgiye sahip olunan translasyon faktörüdür. Hipertermofilik arke *Pyrococcus horikoshii*'den izole edilen aIF5A'nın kristal yapısının analizi ökaryot proteine olan benzerliğini vurgulamaktadır. Bu aIF5A ağırlıklı olarak β ipliklerinden oluşur ve iki farklı etki alanı içerir; 1-69 aminoasitleri içeren N-terminal domain SH3 benzeri varil yapısını içerir bu alan α -heliks ve β -yaprak yapılarını içerir. Bu alan aynı zamanda, ökaryotlarda olduğu gibi hipuzin'e modifikasyonu yapılan spesifik bir lizin'i (lys37) barındıran 33-41 amino asitlerini kapsayan, L1 adında uzun bir saç tokası yapısı (hairpin loop) içerir. C-terminal domain 72-138 aminoasitlerinden oluşur ve iki kısa α -heliks ($\alpha 2$ - $\alpha 3$) ile beş iplikli anti paralel β -yaprak içeren bir OB katlanması (oligonucleotide

binding fold) motifine sahiptir. Bu iki alan yalnızca iki aminoasitten oluşan kısa bir linker ile bağlanır. Ayrıca, N- ve C- terminal domainleri arasındaki temel aminoasitler pozitif yüklü bir yüzey oluşturur. Aynı zamanda L1 hairpin bölgesi de pozitif yüklüdür. C-domani ise negatif yüklüdür. Proteinin elektrostatik potansiyelindeki bu fark, aIF5A'nın pozitif yüklü kısmı sayesinde nükleik asitler ile (özellikle RNA molekülleri) etkileşime girerken, negatif yüklü C-terminal kısmı ile de proteinlerle etkileşime girebilen bimodüler bir protein olarak hareket edebileceği fikrini doğurmuştur (Yao ve ark., 2003).



Şekil 2.8: *P. horikoshii*'den translasyon başlangıç faktörü 5A'nın gösterimi (Yao ve ark., 2003).

Şimdiye kadar bahsedilen üç faktörü karşılaştırdığımızda, eIF5A ve aIF5A proteinlerinin her ikisi de EF-P'de bulunan ek bir üçüncü domainden yoksun oldukları için, her ne kadar arkeal proteinin C-terminal domaininde bir alfa-helix bulunmasada aynı translasyonel modifikasyona sahip oldukları için aralarında daha fazla benzerlik paylaşıyor gibi görünmektedir. Ancak aIF5A ile EF-P'nin domain I ve II arasındaki aminoasit dizilerine bakıldığında aIF5A ve EF-P arasında benzerlik daha fazladır (Aoki ve ark.,2008). Genel şekillerine bakıldığında ise eIF5A ve aIF5A daha benzerdir fakat eIF5A solüsyonda bir dimer yapısı oluşturduğunda EF-P ile daha benzer bir şekil alır (Dias ve ark., 2013). Bu yapısal benzerlikler, evrim boyunca bu translasyon faktörlerinin muhtemelen yapısal ve işlevsel olarak korunduğunu göstermektedir.

2.4.2 aIF5A'nın Posttranslasyonel Modifikasyonu

Arkelerde aIF5A translasyon faktörü hakkında bilinenler çok sınırlıdır. En az ökaryotik olan eIF5A kadar aIF5A da önemlidir. Arke aIF5A geninin: *Haloferax volcanii*'de (Gäbel ve ark., 2013), *Sulfolobus acidocaldarius*'ta (La Teana ve Albers, veriler yayınlanmamıştır) ve daha yakın zamanda da *Sulfolobus islandicus*'ta (Zhang ve ark., 2018) önemli bir gen olduğu keşfedilmiştir.

Hipuzin Arkelerde ilk kez 1989'dan itibaren; *Sulfolobus acidocaldarius*, *Halobacterium cutirubrum* ve *Thermoplasma acidophilum* gibi bazı aerobik arke türlerinde tanımlanmaya başlamıştır (Schumann ve ark., 1990). Bu çalışmanın hemen ardından yapılan bir başka çalışma ise Arke domaininde hipuzin dağılımının heterojen olduğunu ortaya çıkardı. Zorunlu anaerobik termofilik; *Thermoproteus tenax*, *Pyrodictium oecultum* ve *Desulfurolobus ambivalens* gibi birkaç tür, hipuzin yerine ökaryotik modifikasyonda bir ara ürün olan deoksihipuzini içerir (Bartig ve ark., 1990). İlginç bir şekilde, *Thermoproteales sp.*'nin de hipuzine sahip olması, deoksihipuzinin ökaryotlarda olduğu gibi hipuzin modifikasyonunun bir ara maddesi olabileceğini, ancak anaerobik organizmalar oksijen içeren reaksiyonları gerçekleştiremeyecekleri için alternatif bir hidroksilasyon yoluyla olabileceğini düşündürmektedir. Hipuzin modifikasyonunun mekanizması ökaryotlarda geniş çapta çalışılmasına rağmen hipuzinasyon yolağı ve aIF5A'nın Archaea'daki rolü tam olarak anlaşılamamıştır. aIF5A, şimdiye kadar dizilenen tüm arke genomlarında mevcuttur ve ayrıca DHS homologları dizilenmiş tüm arke genomlarında mevcut iken bugüne kadar herhangi bir arke genom veya proteomunda hiçbir DOHH homologuna rastlanmamıştır (Park ve ark., 2006). Buda *Sulfolobaceae* gibi belirli bir arke familyasında hipuzin aminoasitinin nasıl sentezlendiği hakkında soruları gündeme getirmektedir. Arke DHS enziminin de önemli olduğu anlaşılmıştır (Jansson ve ark., 2000). Bu bulgular bize, Archaea'daki modifikasyonun ilk adımının korunduğunu ve Ökaryotlarda etkili bir DHS inhibitörü olan N1-Guanil-1,7-Diaminoheptan (GC7) tarafından büyümenin inhibisyonu dört arke türünde tanımlanmıştır; *S. acidocaldarius*, *S. solfataricus*, *Halobacterium haloboum* ve *Haloferax mediterranei*. Bu sebepten ökaryotlarda tarif edilene benzer bir mekanizma ile deoksihipuzinin sentezleniyor

olabileceğini göstermektedir. Bir spermidin analogu olan GC7, ökaryotlarda DHS'ye bağlanmak için Spermidin ile rekabet eder, bu bileşik spermidinin bağlanacağı bölgeden enzim ile birleşir böylece spermidin bileşiğinin N-bütül grubunun lizin'e transferini bloke eder ve böylece modifikasyon inhibe olur (Jakus ve ark., 1993). Böylece modifiye olmamış aIF5A, hücre döngüsünün ilerlemesinde rol oynayan bir set proteini sentezleyememiş ve bu da hücre G2 döngüsü sonunda bu organizmalarda büyümenin durmasına yol açmıştır.

Haloferax volcanii aIF5A'sında Prunetti ve ekibinin yaptığı yakın tarihli bir çalışmada; aIF5A'nın bir kütle spektrometrisi analizinin, bu organizmalarda korunmuş lizin 36'da deoksihipuzin'e modifiye edildiğini, fakat bu organizmalarda modifikasyon için gerekli olan Spermidin öncülünün bulunmadığını ve bir Spermidin analogu olan GC7 inhibitörünün (maya DHS enzimini ve bunun sonucu olarak büyümeyi inhibe ederken) *H. volcanii* büyümesi üzerinde hiçbir etkisi olmadığını kanıtlamıştır. Buda araştırmacıları, farklı bir yol izi ile modifikasyonun gerçekleşiyor olabileceği düşüncesine itmiştir ve halofillerde bulunan temel bir poliamin olan agmatin ile bir model ortaya konulmuştur. Bu teoriye göre ökaryotik yoldan farklı olarak, deoksihipuzin modifikasyonu için agmatin'in substrat olarak kullanılıyor olabileceği açıklanmıştır (Prunetti ve ark., 2016). Ayrıca, ökaryotik DHS ile uyumlu olarak, arke DHS enziminin ilk kez 148 kDa'lık bir tetramer kompleksi olarak karakterizasyonu yapılmıştır. Başka bir Arke türünün DHS aktivitesi bir kontrol olarak kullanıldığından, *H. Volcanii*'deki bu modifikasyonun tüm arkelerde bulunduğu varsayılması mümkün olmadığı düşünülmüştür. Ayrıca Prunetti ve ekibi aynı çalışmada yaptıkları *in vitro* deneylerde ilk kez, *Thermococcus kodakarensis* DHS'sinin 4-aminobütül grubunu spermidinden aIF5A'ya aktararak ökaryotiklere benzer yol izlediğini göstermiştir. Modifiye edilmiş aIF5A, kütle spektrometrisi ile analiz edildiğinde lizin 42 üzerinde deoksihipuzin aminoasitinin varlığını gösteren bulgulara rastlanmıştır. Bu bulgular, Archaea'da organizmadan organizmaya değişebilen translasyonel faktör aIF5A'nın hipuzinasyon yolunu aydınlatmak için gerekli olan daha ileri çalışmaların önünü açmıştır. Başta bahsedildiği gibi aIF5A'nın Arkelerdeki işlevi tam olarak karakterize edilemediğinden bu proteinin ökaryot eIF5A'ya benzer görünmesine rağmen protein sentezine katılımı henüz belirsizdir. Fakat

Bassani ve ekibinin yaptığı bir çalışmada *Sulfolobus solfataricus* organizmasının aIF5A geni, CRISPR aracılı transkripsiyon sonrası gen susturulması deneyleri ile transkripsiyonu susturulmuş ve sonuç olarak mutant *S.sulfolobus* hücrelerinde büyüme ve gelişim geriliği gözlemlenmiştir. Mutant hücrelerde lag fazının uzadığı ve kontrol suşunda görülen yüksek hücre yoğunluğuna erişemedikleri gözlemlenmiştir. Bu bulgular bize aIF5A nakavt suşunda translasyon gerilemesini işaret eder. Dolayısıyla aIF5A'nın translasyonda işlevi olabileceği belirlenmiştir (Bassani ve ark.,2019).

Bu çalışmada Crenarchaeal model organizma olan *Sulfolobus solfataricus*'tan izole ettiğimiz Arkeal translasyon faktörü aIF5A'nın karakterizasyonu, RNA metabolizmasında rol oynayıp oynamadığı ve aIF5A'nın önerilen RNA bağlanma ile RNA yıkımı görevleri için translasyonda olduğu gibi modifikasyona ihtiyaç duyup duymadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. ARAÇ VE YÖNTEMLER

3.1 E.coli'de Rekombinant Histidin işaretli N-His-aIF5A proteininin ekspresyonu

aIF5A genini içeren plasmid pETM11, E.coli (Rosetta) hücrelerinde, rekombinant *Sulfolobus solfataricus* aIF5A'sı eksprese edilip, daha sonra analiz edilmek üzere saflaştırılmıştır. (aIF5A genini içeren plasmid Camerino Üniversitesinden Prof. Dr. Roberto Spurio tarafından temin edilmiştir. Daha sonra E.coli Rosetta (DE3)/pLysS kompetent hücrelerine indüklenmiştir.). İlk olarak rekombinant bakterilerin büyümesi ve proteinin ekspresyonu için, her birinden ikişer adet olmak üzere 20 ml ve 500 ml'lik erlenlerde, sıvı LB ortamları hazırlanmıştır. Ortamlara otoklavdan sonra uygun sıcaklığa gelindiğinde Chloramphenicol ve Ampicillin antibiyotikleri eklenmiştir. Ampicillin için ml başına 100 µg, Chloramphenicol için 50 µg olacak şekilde hesaplanıp stok çözeltilerden sıvı besiyerlerine aktarılmıştır.



Şekil 3.1: Sıvı besiyerine inokülasyondan önce rekombinant E.coli hücrelerini içeren katı besiyeri.(LB+AMP+CLO)

Petrideki daha önce üretilmiş hücrelerimizden tek bir koloni alarak öncelikle 20 ml'lik ortamlara aktardık ve 37°C'de 180 RPM çalkalamalı inkübatörde 24 saat boyunca inkübasyona bıraktık. Ertesi gün 20 ml'lik ortamdan 1 ml numune alarak Spektrofotometre aygıtında optik densite ölçümü yapılmıştır. Hücre yoğunluğu Mid-Log fazında iken yani Optik Densite (OD)

600 nm’de 0,4 - 0,7 arası değere ulaştığında bakterileri 20 ml’lik ortamdan 500 ml’lik ortamlara inokülasyonu gerçekleştirilmiş ve tekrardan çalkalamalı inkübatörde yoğunluk 0,4 OD’ye ulaşana kadar inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra ortamlara rekombinant proteinimizin üretimini indüklenmesi için 0,5 mM IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalattopiranoside) molekülü eklenmiştir. (IPTG bileşiği; Lac operonu’nun transkripsiyonunu tetikleyen bir laktoz metaboliti olan allolaktöz’un bir çeşit moleküler taklididir. Bu sebepten genin, lac operatörünün kontrolü altında olduğu protein ekspresyonunu indüklemek için kullanılmıştır.)



Şekil 3.2: Santrifüjden önce, E.coli hücrelerinin çoğaltılıp rekombinant proteinlerin üretiminin gerçekleştirildiği besiyerleri (LB broth). Ortamın bulanık olması bakterilerimizin çoğaldığını göstermektedir.

IPTG eklediğimiz ortamları tekrardan 3 saat çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bıraktık. Daha sonra tekrar her bir besiyerinden alınan 1 ml örnek ile OD ölçümü yaparak istediğimiz yoğunluğa ulaştığımızdan emin olduk. Ve daha sonra 2’şer adet 500 ml olan sonuçta elimizde 1L’lik örneğimizin hepsini 4°C ‘de 30 dakika boyunca 5.000 RPM’de santrifüjledik. (Örneğimizin hacmi fazla olduğu ve santrifüj kapasitesi sınırlı olduğu için aynı adımı birkaç kez tekrarladık.) Daha sonra pellet’te bulunan (tüm hücresel içeriği ve rekombinant

proteinleri içeren) hcrelerimizi steril falconlara aktararak, süpernatantı atılmıştır.



şekil 3.3: Hücrelerin santrifüj aşaması.



şekil 3.4: Santrifüjden sonra rekombinant proteinleri içeren hücrelerin toplanması.

3.2 E.coli'den Rekombinant Histidin işaretli N-His-aIF5A proteininin Saflaştırılması

Falconlara toplanan hücreler saflaştırmanın ilk aşaması olarak 10 ml pH 8 soğuk Liziz tamponu (50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 15mM İmidazol, 1 mM PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride), 1 mg/ml Lizozim) hazırlanmıştır. Lizozim hariç elimizde tüm bileşenlerin hazır olmasından dolayı öncelikle toz haldeki lizozimden hassas terazide 10 mg tarttık ve üzerine 1 ml Milli-Q su ekledik. Böylelikle 10 mg/ml lizozim elde etmiş olduk. Daha sonra Liziz tamponunun tüm bileşenlerini steril bir falconda toplandı ve hazırladığımız tampon çözelti, pH metrede NaOH ile pH 8'e ayarlanmıştır.

Daha sonra önceki gün toplanan hücreler hazırlanan 10 ml Liziz tamponu ile yeniden süspansiyon edilerek pellet tampon içerisinde tamamen çözünüp opak hale gelene kadar vorteks yardımı ile karıştırılmıştır.



Şekil 3.5: Hücrelerin parçalanıp proteinlerin açığa çıkmasını sağlamak için Liziz tamponu eklenen hücreler.



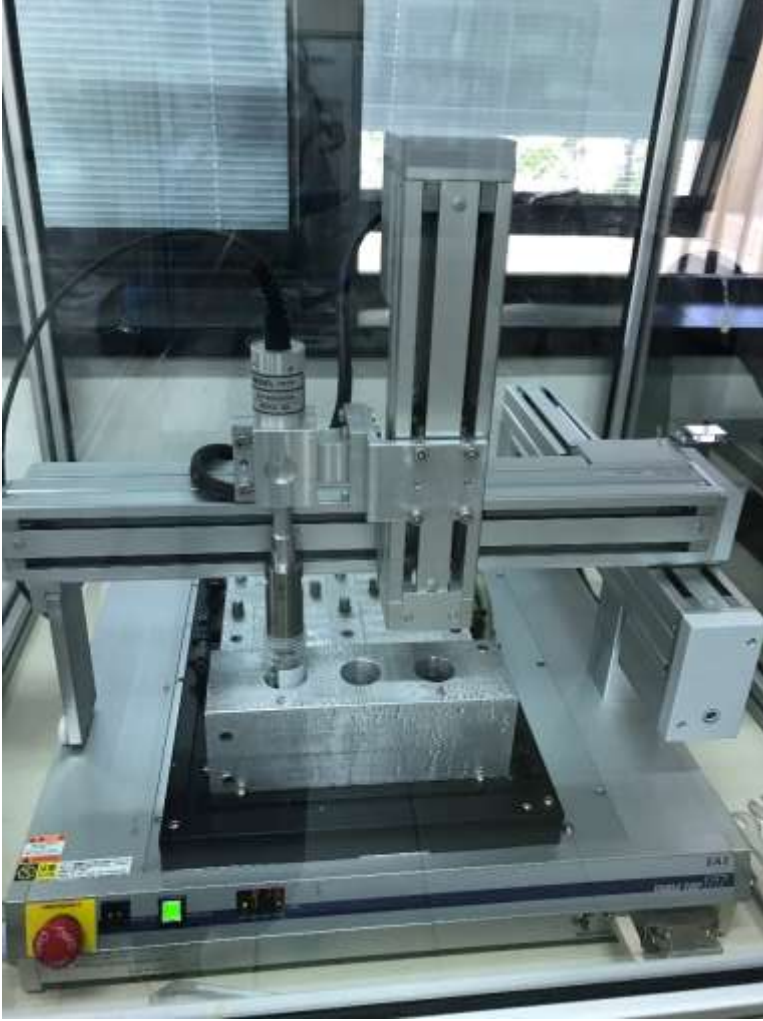
Şekil 3.6: Hücrelerin liziz tampon içerisinde vorteks yardımı ile süspansiyon edilmesi.



Şekil 3.7: Liziz tamponu içerisinde yeniden süspansiyon edilmiş hücreler.

Liziz tamponu içerisinde yeniden süspansiyon edilmiş hücreler, hedef proteinimizi hücre içeriğindeki proteazlardan korumak için buza konulup Brunswick çalkalamalı inkübatörde 30 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyondan sonra hücrelerin sonikasyon ile liziz aşamasına devam edilmiştir.



Şekil 3.8: Hücrelerin sonikasyon ile liziz aşaması.

Sonikasyondan sonra hücre lizati 4°C’de 30 dakika boyunca 25000 g’de santrifüjlendi. Santrifüjden sonra süpernatantı alarak bu kez pelleti attık. Hedef proteinimiz termofilik organizmaya ait olduğu için ısıya dayanıklı proteinlerdir, bu sebepten diğer proteinleri örneğimizden elemine etmek için santrifüjden sonra örneğimizi 65°C ‘de 30 dakika su banyosuna koyduk. Daha sonra su banyosundan aldığımız örneğe, Equilibration tamponu (pH.8 50 mM NaHPO₄, 150 mM NaCl, 20 mM İmidazol) ile dengeledikten sonra Ni-NTA (Nikel-nitrolotriacetic acid) (Quiagen) reçinesi eklenmiştir. N-His-aIF5A’nın reçinedeki Nikel’e bağlanması 24 saat boyunca 4°C’de rotasyonlu inkübatörde gerçekleştirilmiştir.

Ertesi gün Kromatografik kolon'u milli-q su ile temizledikten sonra inkübasyondan aldığımız örneğimizi kolon'a yükleyerek (her seferinde 10 ml) birkaç dakika rezin'in çökmesini bekledik (proteinimize bağlandığının bir



Şekil 3.9: Yıkama tamponu eklendikten sonra kromatografik kolon'dan geçirilerek safsızlıkların giderilmesi.

göstergesi) ve daha sonra kolon'un kapağını açarak sıvının kolondan geçmesi sağlanmıştır. "Flow through" olarak adlandırılan bu sıvı tüm istenmeye madde ve makromolekülleri içeren sıvıdır. Daha sonra kolon'a 30 ml Yıkama tamponu (Wash buffer- 50 mM NaHPO₄, 150 mM NaCl, 20 mM İmidazol) eklenerek tekrar kolondan geçmesi sağlanmış ve steril ependorflarda toplanmıştır. Wash buffer eklenmesinin sebebi filtrede kalmış tüm partikülleri ve diğer protein ve komponentleri elemine etmek ve hedef proteinlerimizi olabildiğince saf bir şekilde elde etmektir. Wash buffer'ın tamamen filtreden akması sağlandıktan sonra kolona 5 ml Elüsyon tamponu (Elution Buffer- 50 mM NaHPO₄, 150 mM NaCl, 250 mM İmidazol) eklenmiştir. Kolondan geçmesi sağlanmış ve steril

ependorflarda toplanmıştır. Proteinlerimiz bu sayede Nikel'den ayrılmış bir şekilde saf olarak yüksek konsantrasyonda elde edilmiştir. Histidin işaretli hedef proteinlerimizi taşıyıcı nikel'den ayırmak için imidazol'ün konsantrasyonu Elüsyon tamponunda yüksek tutulmuştur. Bunun sebebi Histidin'e benzeyen bu molekül ortamda bolca bulunduğu protein ile metal iyonlarına bağlanmak için aralarında oluşan rekabet sonucu imidazol'ün Nikel'e afinitesi daha yüksek olduğu için Nikel proteinlerden ayrılarak imidazol moleküllerine bağlanmıştır. Bu sayede proteinler saf bir şekilde elde edilmiştir.

Elüat daha sonra Diyaliz Tamponu (50 mM Tris HCl pH 7.4, 150 mM KCl, %5 Gliserol) içerisinde 4°C'de gece boyunca diyaliz'e bırakılmıştır. Daha sonra aIF5A konsantrasyonu Nanodrop ölçümleri ile belirlenmiş, saflık SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi) ve ardından Comassie-blue boyama ile değerlendirilmiştir. Ve protein alikotları sonraki deneylerde kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırılmıştır. Rekombinant proteinlerden daha sonra Histidin etiketlerin çıkartılması için Tev Proteaz kullanılmıştır.



Şekil 3.10: Ependorflarda toplanan wash, elution ve flow through.

3.3 PCR Assay ve Ürünlerin Saflaştırılması

Rekombinant proteinimizin RNA-binding işlevi ile ilgili verileri doğrulamak ve olası diğer işlevlerine açıklık getirebilmek için, aIF5A proteinini ile ilişkili olabileceğini düşündüğümüz RNA'ların, *Sulfolobus solfataricus* genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak çeşitli uzunluklarda cDNA dizilerini amplifiye eden primer çiftleri kullanılarak PCR amplifikasyonu yapılmıştır. İki adet mesajcı RNA ve bir adet kodlanmayan RNA. Bu RNAlar; 2184 mRNA, 0910 mRNA, ncRNA98. İlk PCR denememizde Sigma markasına ait standart Taq polimeraz ve inert boya içeren hazır PCR karışımı "REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix" kullanılmıştır. Fakat elektroforez sonucu jel görüntüsünde hiçbir şey gözlemlenmemiştir. Deney farklı DNA konsantrasyonları ile tekrar denenmiş fakat yine sonuç alınamamıştır. Bu sebepten dolayı deney daha spesifik, yüksek duyarlılıkta bir DNA Polimeraz enzimi kullanılarak tekrarlanmıştır.

- Sso 2184 mRNA:

Forward 5'- AGATAATACGACTCACTATAGGGTGCATGTGATAAGG
GAAACATTGAAAGG - 3'

Reverse 5' - TAATTTTCTCCACATCATCAAATCACC - 3'

- Sso 0910 mRNA:

Forward 5' - AGATAATACGACTCACTATAGGGATGTTTGATAAGTTAC
CATTATTTTAAACAACG - 3'

Reverse 5' –TTAACTCTCCACCGCTATTAGTCCCTTATTC - 3'

- Sso NcRNA 98:

Forward 5'- TAATACGACTCACTATAGGGATCTTTGGTTTAGCATCTCT
C - 3'

Reverse 5' – GTTAGAGAAAACGGAGAGG - 3'

Amplifikasyonu yapılacak bölgelerin uzunlukları şu şekildedir: mRNA2184 1184 Bp, mRNA0910 780 Bp, ncRNA98 90 Bp. DNA Polimeraz olarak iki farklı enzim kullanılmış ve farklı kalıp DNA konsantrasyonları kullanılarak çoklu PCR yapılmıştır. Enzimler; "KOD Hot Start DNA Polymerase" ve "Pfu DNA polimerase". Her RNA için 100 ng ve 200 ng kalıp DNA konsantrasyonu kullanılmıştır.

Tablo 3.1: Pfu enzimi ile Sso 2184, 0910 mRNA ve ncRNA98'in amplifikasyonu için kullanılan PCR programı. Kod enzimi ile gerçekleştirilen reaksiyonda extension sıcaklık ve süreleri değiştirilmiştir. Extension 70°C 1', Final Extension 70°C 5' olarak ayarlanmıştır.

	Temperature	Time	Cycle
Initial Denaturation	94°C	5'	1x
Denaturation	94°C	30"	35x
Annealing	50°C	30"	
Extension	72°C	2'30"	
Final Extention	72°C	5'	1x

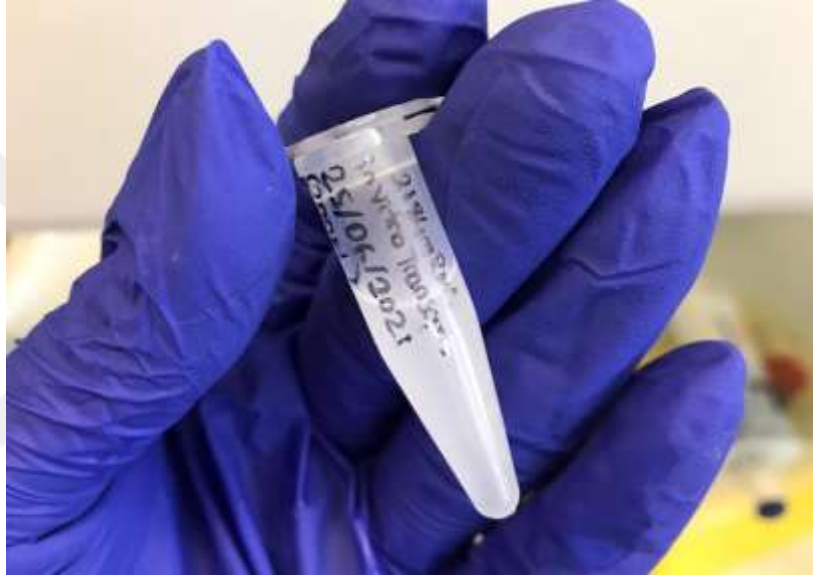
Daha sonra PCR ürünleri %1,5'luk Agaroz jele yüklendi. Elektroforez, Tris-Borate-EDTA tamponu içerisinde, yaklaşık 45 dakika boyunca başlangıçta 80V daha sonra 120V hızda olmak üzere gerçekleştirildi. Daha sonra Biorad jel görüntüleme sistemleri kullanılarak görüntülendi. (ncRNA98 çok küçük bir fragment olduğu için amplifikasyonu daha sonra tek başına yapılmış ve % 2'lik Agaroz jele yüklenmiştir ve düşük hızda yaklaşık 25-30 dk elektroforezi yapılmıştır.) PCR ürünlerinin pürifikasyonu: "Nucleospin Gel and PCR Clean-up-MACHEREY-NAGEL" kiti kullanılarak yapılmıştır.

3.4 In vitro Transkripsiyon

Sso 2184 mRNA, 0910 mRNA ve ncRNA 98 üretimi için *S. solfataricus* genomik DNA'sı ve oligonükleotidler kullanılarak (Forward primerler T7 promotör dizisi içerir) üretilen öncül DNA'lar ile In vitro transkripsiyon yapılarak RNA eldesi gerçekleştirilmiştir. Her üç RNA için ayrı bir reaksiyon ile T7 Polimeraz kullanılarak üretilmiştir. Her deney ortamına RNA'ların olası degradasyonundan kaçınmak için RNase inhibitörü eklenmiş ve DEPC su (diethylpirokarbonat ile muamele edilmiş ve otoklavlanmış su) kullanılmıştır.

İlk denemede sadece 2184 mRNA ve 0910 mRNA üretilmiştir. 300 ng kalıp DNA kullanılarak 10 µl toplam hacimde gerçekleştirilmiştir. RNA'lar 37°C'de 3 saat süreyle T7 RNA Polimeraz (Thermoscientific-EP0111), ve ardından 37°C'de 30 dakika DNase (Promega-RQ1 Rnase free Dnase-M6101) kullanılarak sentezlenmiştir. Daha sonra DNase Stop (Promega-M199A) solüsyonu eklenmiş ve 65°C'de 10 dakika inkübasyon ile reaksiyon

sonlandırılmıştır. İlk deneyden olumlu sonuçlar alındıktan sonra daha yüksek miktarda RNA eldesi ve optimizasyon için birden fazla kez tekrarlanmıştır. İkinci denemede 50 ng, 100 ng, 200 ng, 400 ng kalıp DNA konsantrasyonları ve toplam hacim öncekinin iki katına çıkarılarak tekrarlanmış. 100 µl ile tekrar denenmiş ve son olarak olabildiğince fazla miktarda RNA elde edebilmek için 200 µl toplam hacimde ve 2 µg kalıp DNA kullanılarak tekrarlanmıştır. İlk sentezi yapılan RNA'lar Fenol/Klorofom ekstraksiyonu ile daha sonra üretilenler Ethanol Presipitasyonu ile saflaştırılmıştır. 50 µl DEPC suyun içerisinde yeniden süspanse edilmiştir.

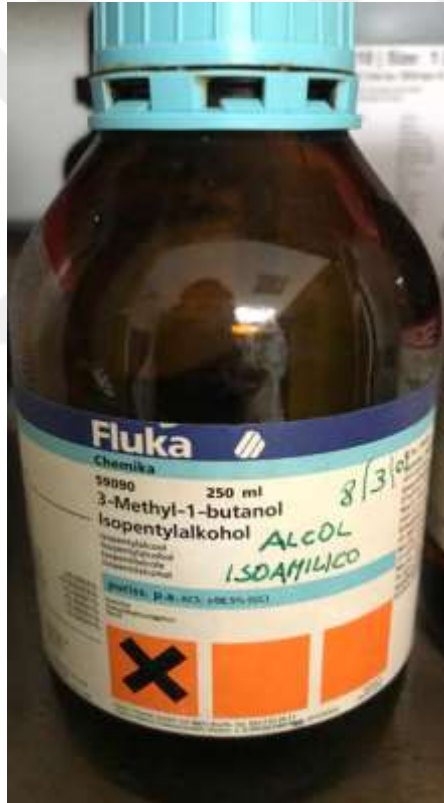
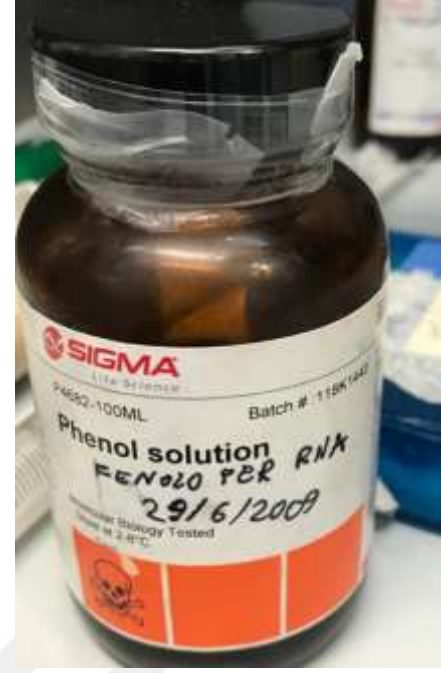


Şekil 3.11: İn Vitro Transkripiyonu yapılmış mRNA örneğinin EtOH ile presipitasyonu.

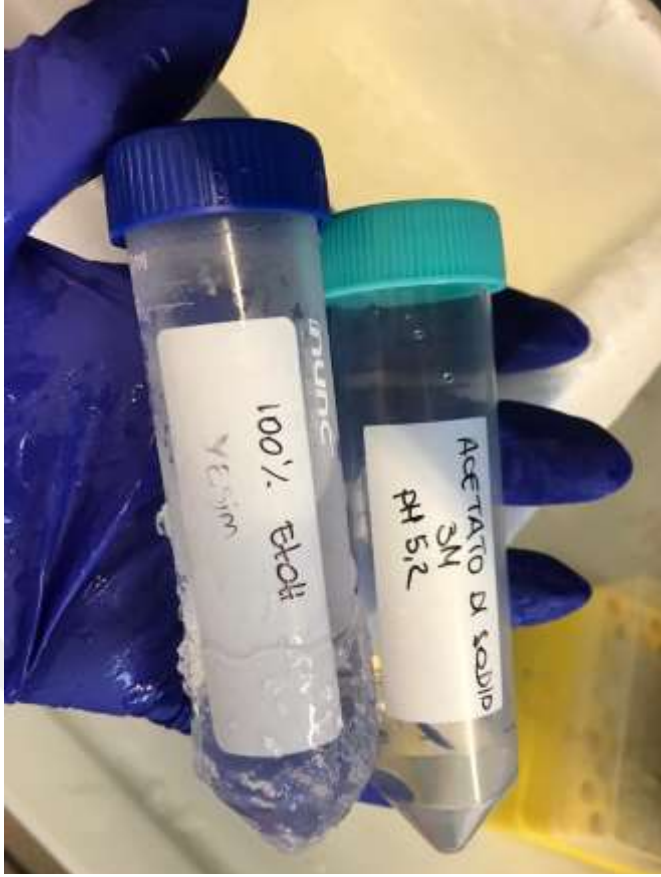


Şekil 3.12: Sentezi yapılmış RNA'ların Üre-Poliakrilamid jelde elektroforezi (mavi görünen bölgeler EtBr ile boyanmış RNA fragmentleridir).

RNA'lara daha sonra 1:2 oranında RNA Sample Loading Buffer (Sigma) eklenerek 85°C'de 3 dakika denatüre edilmiş ve TBE (Tris-Borate EDTA) tamponu içerisinde, 8 Molar , %8'lik ÜRE-PAGE (Denature üre poliakrilamid jel elektroforezi) ile görüntülenmiş ve tayini yapılmıştır. Üre-poliakrilamid jelin kullanılmasının sebebi: tek zincirli RNA'larımızdaki sekonder yapıları denatüre ederek gerçek yapısını anlayabilmemizi sağladığı içindir. Elektroforezden sonra jel Ethidium Bromide ile boyanmış ve BioRad sistemleri ile görüntülenmiştir.



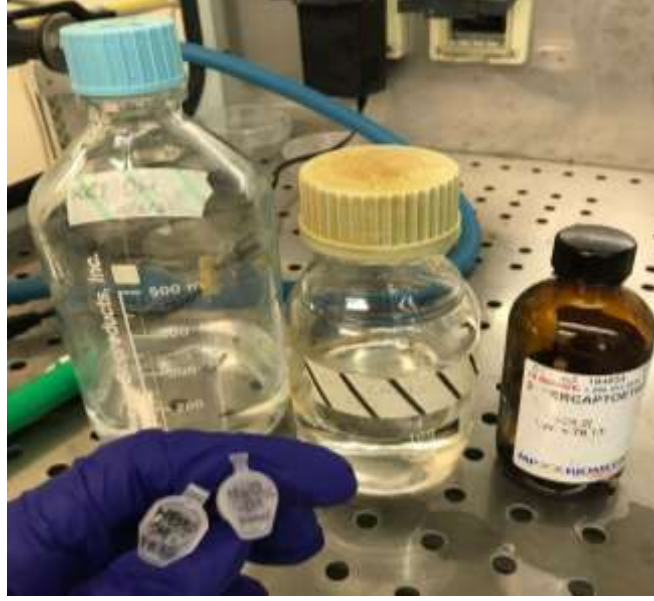
Şekil 3.13: RNA'ların Fenol/Kloroform saflaştırılmasında kullanılan ajanlar.



Şekil 3.14: RNA'lara uygulanan Ethanol Presipitasyonu için hazırlanmış Ethanol (EtOH) ve Sodyum Asetat ($C_2H_3NaO_2$).

3.5 In vitro Degradation Assay

In vitro transkribe edilmiş RNA'larımızın proteinimiz ile ilişkisine aydınlık getirmek amacı ile *In vitro* degradasyon deneyi gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle Degredation Buffer (10 mM Hepes pH.8, 40 mM KCl, % 0,5 Gliserol, 5 mM β -mercaptoethanol, 5 mM $MgCl_2$, DEPC su) hazırlanmıştır. Daha sonra protein ve RNA oranlarını kantitatif kesinliği arttırmak için moleküler ağırlıkları ve konsantrasyonları belirlendi daha sonra hesaplamalar Pikomol cinsine çevrilerek yapıldı. Degradation Assay deneyleri iki farklı yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlk deneyde konsantrasyona bağlı değişime bakılmıştır. Bu yüzden her deney tüpünde 20 pikomol RNA oranı sabit tutularak, protein oranı kademeli olarak arttırılmıştır (1:2, 1:4 ve 1:8). Ayrıca deney gruplarına RNA stabilitesinin kontrolü olarak protein içermeyen iki adet kontrol eklenmiştir. Ve kontrollerden biri 65°C'ye diğer örneklerle birlikte inkübasyona konulurken diğeri konulmamıştır (aIF5A proteini termofilik organizmaya ait olduğu için 65°C de aktiftir). RNA'lar 85°C'de 3 dakika



Şekil 3.15: Degredasyon tamponunun hazırlanması.

denatüre edildikten sonra proteinlerinde içerisinde bulunduğu deney ortamlarına eklenip 65°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir.

İkinci deneyde ise RNA/Protein oranı sabit tutularak zamana bağlı değişime bakılmıştır. Bunun için 40 µl hacimde 160 pmol RNA ile 640 pmol aIF5A (RNA/5A 1:4) 65°C’de 30 dakika inkübe edildi. Her 5 dk da bir deney ortamından 5 µl’lik numuneler (her biri 20 pmol RNA içerir) çekildi. Kontrol olarak protein içermeyen 20 pmol RNA da 65°C’de 30 dakika inkübe edildi. 30 dakika sonunda her numuneye eşit hacimde RNA loading buffer (jele yükleme boyası) ilave edildi ve tüm numuneler yine 85°C’de 3 dk denatüre edildikten sonra Üre-Poliakrilamid (8M, %8) jele yüklendi. Elektroforez Tris-Borate-EDTA (TBE) kullanılarak 30 dk boyunca 20 mA’de gerçekleştirildi ve jeller, 10 µg/ml EtBr ile 10 dk boyunca boyandı. Son olarak BioRad sistemleri ile görüntülendi.

3.6 Dinamik Işık saçılımı (Dynamic Light Scattering-DLS) Deneyleri

Rekombinant Sso N-His-aIF5A proteini, E.coli’de üretildi ve yukarıda bahsedildiği gibi Afinite Kromatografisiyle saflaştırıldı. Ardından proteinlerin genel yapısı daha detaylı bilgi elde edebilmek, değişik sıcaklıklarda çözelti içerisindeki konformasyonları ve aIF5A ile ncRNA98’nin solüsyon içerisindeki ilişkisini analiz etmek için Dinamik Işık Saçılımı deneylerine tabi tutulmuştur. Dinamik Işık Saçılımı çözelti içerisindeki moleküller veya parçacıklar saçılan lazer ışığının yoğunluğundaki hızlı değişimleri ölçerek numunelerin boyut

dağılımı ve kümelenme durumu hakkında bilgi verir. aIF5A proteininin analizi 20 mM Tris pH.7.7 ve %2 gliserol içerisinde sıcaklık değişimlerine tabi tutularak ölçülmüştür. Öncelikle küvet seyreltilmiş sabun solüsyonu ile daha sonra EtOH ve ardından milli-q su ile temizlenip tüm toz ve partiküllerden arındırılmıştır.



Şekil 3.16: DLS enstrümanında numunelerin analiz edildiği kuvars küvet.



Şekil 3.17: Numune analizinin yapılacağı kuvars küvetin EtOH ile temizlenmesi.

Sso aIF5A proteini başlangıçta 25°C’de 8.676 pmol total konsantrasyonda tek başına daha sonra ncRNA ile birlikte ölçüldü (2.169 pmol RNA eklenmiştir. RNA/Protein oranı 1:4). Daha sonra sıcaklık kademeli olarak 25°C’den 80°C’ye kadar arttırılmıştır ve belirli sıcaklıklarda ölçümler yapılmıştır. Tüm preparatlar ölçümden önce agregat ve/veya partikülleri uzaklaştırmak için 4°C’de 10 dk santrifüjlenmiştir. Analiz sırasında numuneler oda sıcaklığında tutulmuştur. Veri analizleri Biyofizik bölümü ile işbirliği içerisinde gerçekleştirilmiştir.

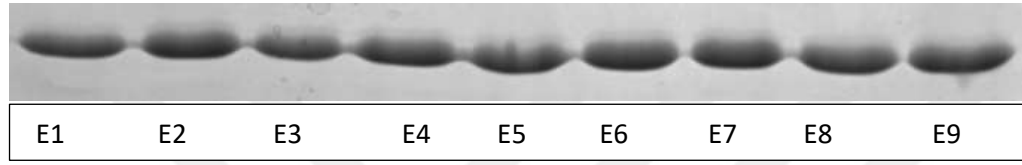


Şekil 3.18: Malvern Z-sizer enstrümanında Dynamic Light Scattering ile numunelerin analizi.

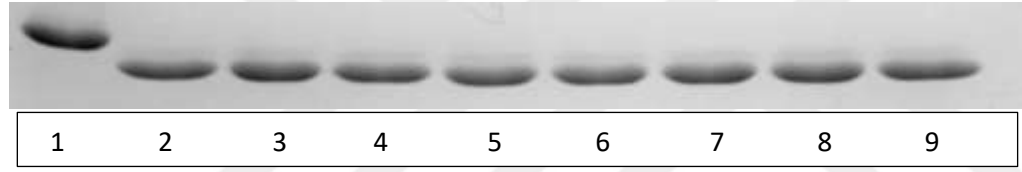
4. BULGULAR

4.1 Pürifikasyon sonrası faktör aIF5A proteinlerinin SDS-PAGE’te görüntülenmesi ve saflık tayini

aIF5A proteinini incelemek ve önerilen RNA metabolizmasındaki önerilen işlevine açıklık getirabilmek amacıyla ORF Ss0970 geni tarafından kodlanan proteinin E.coli hücrelerinde üretimi gereç ve yöntem bölümünde belirtilen şekilde gerçekleştirildikten sonra saflık tayini yapılmıştır. Moleküler ağırlığı 14491.8 Da civarında olan proteinin Histidin yüklü hali 17761.37 Da’dur.



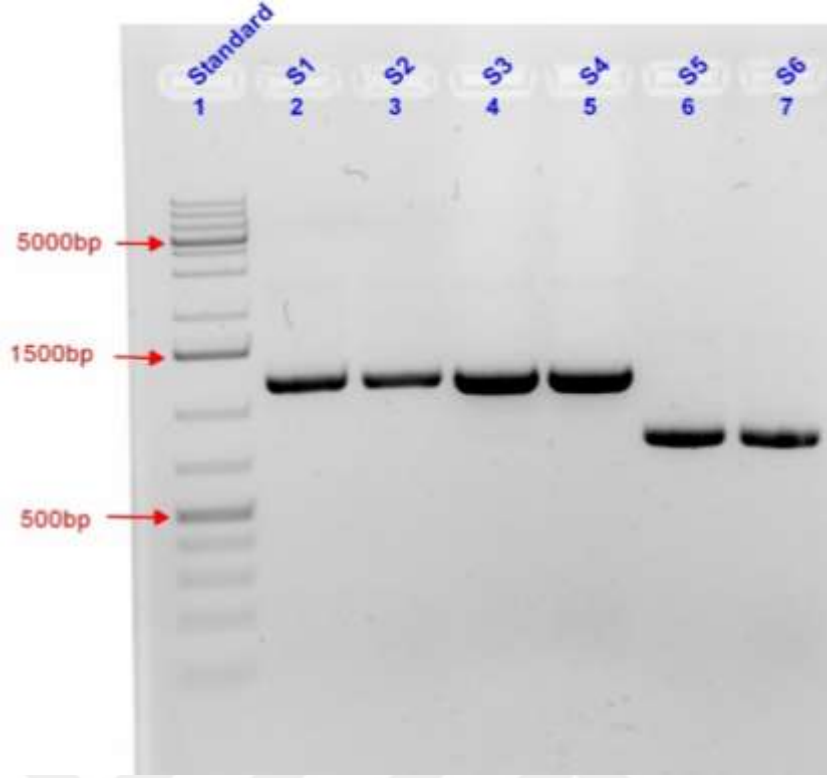
Şekil 4.1: Saflaştırılmış N-His-aIF5A proteinini içeren ardışık elüsyonlar.



Şekil 4.2: Pürifikasyondan sonra, ilk kuyucukta Histidin etiketli aIF5A (17 kDa), İkinci kuyucuktan itibaren His etiketi çıkartılmış aIF5A proteinleri (15 kDa). (Moleküler ağırlıklarındaki farkın gözlemlenmesi için aynı jele yüklenip görüntülenmiştir.)

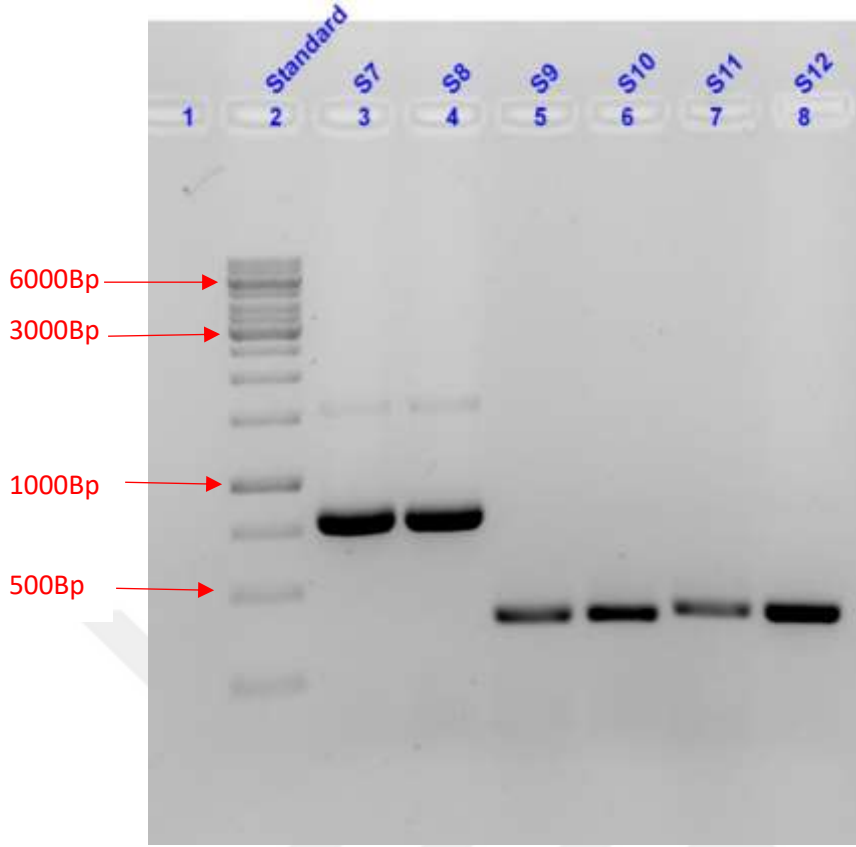
4.2 Multiple PCR ile cDNA Amplifikasyonu Sonuçları

Sulfolobus solfataricus genomik DNA’sından başlayarak bölgeye spesifik primerler ile elde edilen kalıp DNA’lardan daha sonra in vitro Transkripsiyon ile hedef RNA’lar gereç ve yöntem bölümünde bahsedildiği gibi çoğaltılmıştır.

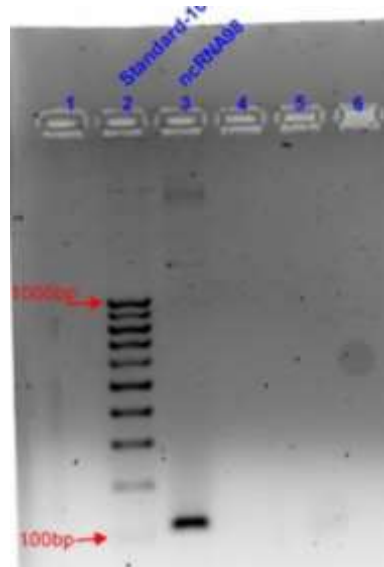


Şekil 4.3: S1, S2, S3, S4 olarak belirtilen kuyucuklarda sırasıyla: 100ng kalıp DNA ile 2184 mRNA bölgesi Pfu polimeraz ile çoğaltılmış; 200ng DNA ile 2184 mRNA, Pfu polimeraz; 100 ng DNA ile 2184 mRNA, Kod polimeraz; 200 ng DNA ile 2184 mRNA, Kod polimeraz; 100 ng DNA ile 0910 mRNA, Pfu Polimeraz; 200 ng DNA 0910 mRNA, Pfu Polimeraz ile amplifiye edilmiştir. İlk kuyucukta marker bulunmaktadır. (S: sample'ı ifade etmektedir. Bkz. Numune)

Gerçekleştirilen reaksiyon sayısı fazla olduğu için örnekler hazırlanan iki adet Agaroz jele paylaştırılarak yüklenmiştir.(Şekil 4.2'te gösterilen ikinci jelde elimizdeki marker bittiği için farklı bir marker kullanılmıştır.) Şekil 4.1 ve 4.2'te gözlemlendiği üzere Kod Polimerazla gerçekleştirilen reaksiyonlar daha verimlidir. Dolayısıyla daha sonra (olabildiğince fazla miktarda RNA elde edebilmek için) tekrarlanan deneylerde Kod Polimeraz enzimi kullanılmıştır. Aynı gen bölgesini çoğaltığımız örnekler bir araya konulmamıştır çünkü iki farklı enzim kullanıldığı için dolayısıyla kullanılan tamponlar farklıdır. DNA'lar aynı olsada tamponlar farklı olduğu için saflaştırma esnasında oluşabilecek presipitasyon veya istenmeyen bir reaksiyondan kaçınmak için ancak saflaştırmadan sonra aynı örnekler bir araya konulmuştur.



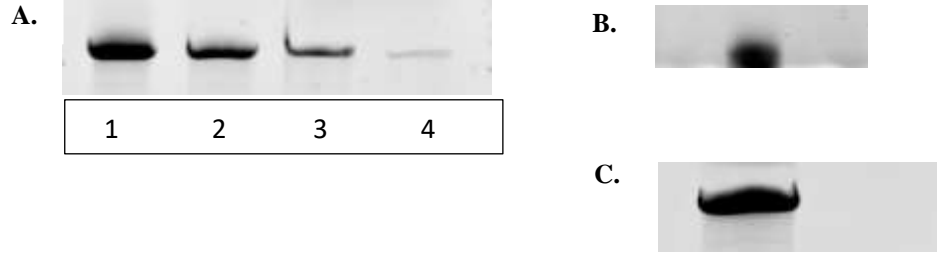
Şekil 4.4: Üçüncü kuyucuktan itibaren S7, S8 sırasıyla: 100 ng kalıp DNA ile üretilen 0910 mRNA bölgesi Kod Polimeraz ile; 200 ng DNA 0910 mRNA bölgesi Kod Polimeraz ile çoğaltılmıştır. S9, S10, S11, S12 ise pozitif kontrolleri ifade eder. Sırasıyla 200 ng, 200 ng, 100 ng ve 100 ng Sso genomik DNA kullanılarak aIF5A'ya spesifik primerler kullanılmıştır. Sırasıyla Pfu Polimeraz, Kod Polimeraz, Pfu Polimeraz, Kod Polimeraz ile çoğaltılmıştır.



Şekil 4.5: 100 ng Sso genomik DNA'sı kullanılarak Kod Polimeraz ile çoğaltılmış ncRNA98'ya tamamlayıcı cDNA.

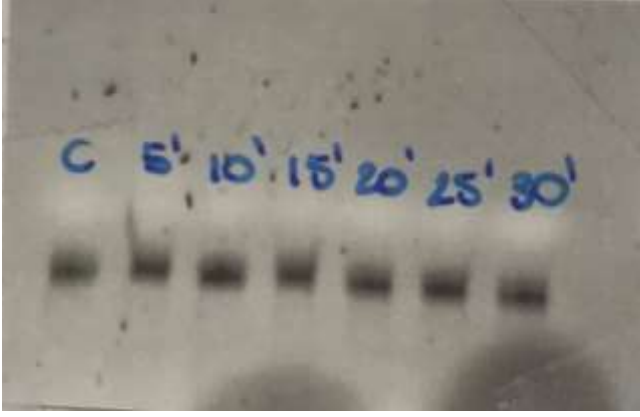
Her reaksiyondan Agaroz jele 5 µl yüklenip görüntülenmiştir. Doğru bölgenin çoğaltıldığından emin olunduktan sonra Transkripsiyon aşamasına geçilmiştir

4.3 İn Vitro Transkripsiyon ile çevrimi yapılan RNA'ların görüntülenmesi ve Degredasyon Assay Sonuçlarının Üre-PAGE'te görüntülenmesi

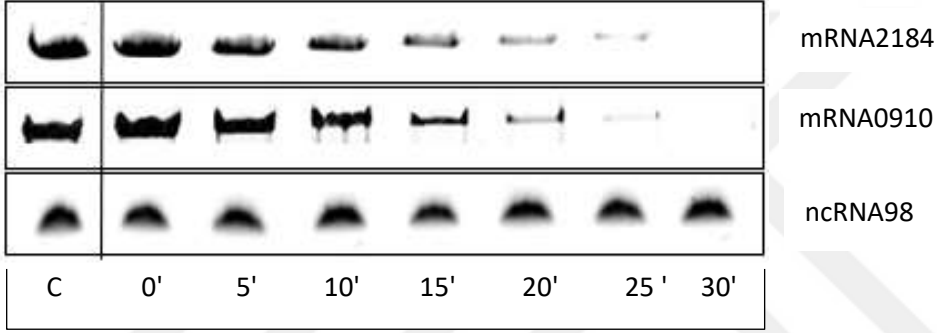


Şekil 4.6: In Vitro Transkripsiyon sonrası Denaturing Üre-PAGE'te görüntülenenen farklı konsantrasyonlarda kalıp DNA kullanılarak üretilmiş RNA numuneleri. **A.** 2184 RNA Soldan sağa: 400 ng, 200 ng, 100 ng ve 50 ng kalıp DNA kullanılmıştır. **B.** 100ng kalıp DNA kullanılarak üretilmiş ncRNA98. **C.** 1 µg kalıp DNA ve 100 µl total hacimde üretilen mRNA 0910.

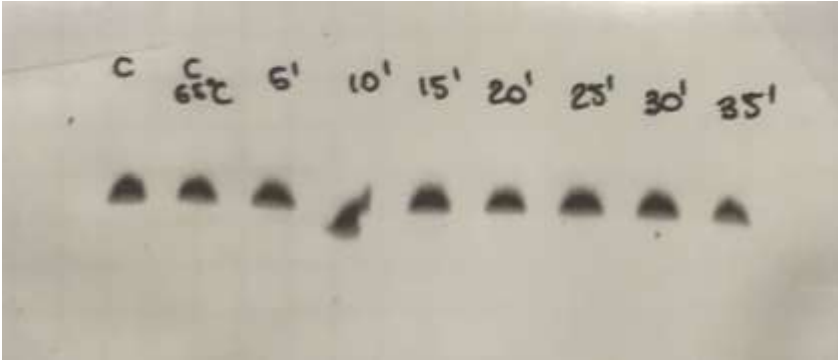
Şekil 4.6-A 'da , her ne kadar 400 ng kalıp DNA kullanılmış olan reaksiyon daha fazla RNA üretmiş gibi görünsede hepsi RNA olmayabilir, yüksek miktarda DNA kullanımı kendi içerisinde katlanmalara sebep olabileceği için 25 µl total hacimdeki reaksiyonlarda 100-200 ng arası kalıp DNA kullanılmıştır. Daha sonra yüksek miktarda RNA eldesi için kalıp DNA miktarı arttırılan reaksiyonlarda total hacim de orantılı olarak arttırılmıştır.



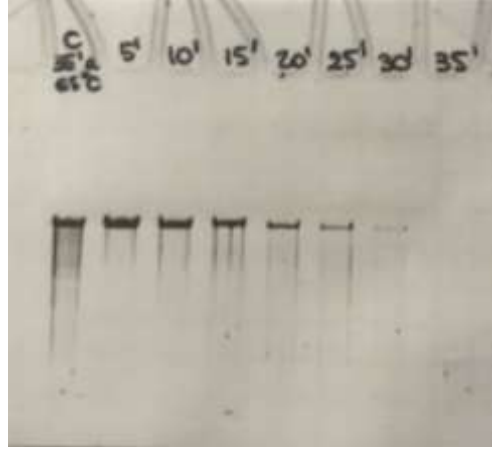
Şekil 4.7: ncRNA98 ile aIF5A'nın zamanı bağlı degradasyon Assay deneyi. RNA/Protein oranı 1:4. 8M, %8'lik Üre-PAGE'te görüntülenmesi.



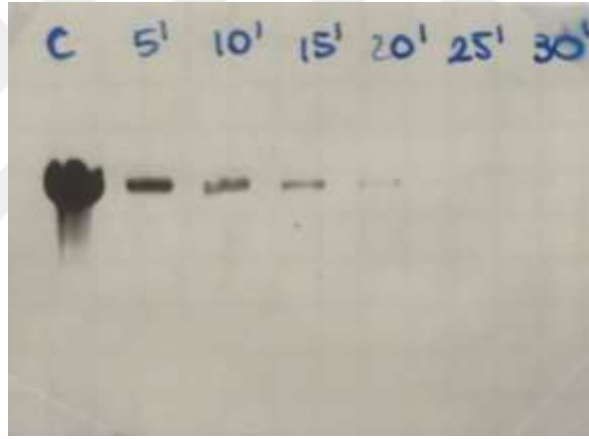
Şekil 4.8: Üç farklı RNA ile yapılan zamana bağlı Degradasyon deneyinin karşılaştırmalı gösterimi. RNA/Protein oranı 1:4, 65°C'de gerçekleştirilmiştir. (C kontrol grubunu ifade eder)



Şekil 4.9: ncRNA98 ile aIF5A'nın zamanı bağlı degradasyon Assay deneyi. Bu kez iki adet kontrol eklenmiştir. Kontrollerden biri RNA'ların yüksek sıcaklıkta stabilitesini kanıtlamak için 65°C'de 30 dakika inkübe edilirken diğeri jele yüklenene kadar buzda bekletilmiştir.



Şekil 4.10: 0910 mRNA ve aIF5A ile gerçekleştirilen zamana bağlı Degredasyon Assay deneyi. (RNA/Protein oranı 1:4), 65°C'de 35 dakika inkübasyon.



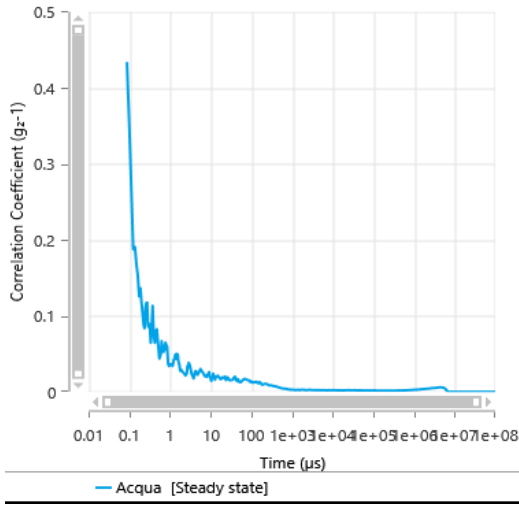
Şekil 4.11: 0910 mRNA ile Hipuzinlenmiş-aIF5A'nın zamana bağlı degradasyon Assay deneyi. RNA/Protein oranı 1:4, 65°C'de 35 dakika inkübasyon.

Kontrol gruplarına protein eklenmemiştir ve bu gruplarda beklendiği gibi RNA'larda hiçbir degradasyon gözlemlenmemiştir. Bu sonuç degradasyonun proteinden kaynaklandığının bir kanıtıdır. Buna karşılık mRNA ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda RNA'larda zamana bağlı degradasyon gözlemlenirken, kodlanmayan RNA'da herhangi bir yıkım gözlemlenmemiştir. RNA degradasyonunun aIF5A aktivitesinden kaynaklandığına kanıtlar kontrol gruplarına protein eklenmeyerek gerçekleştirilmiştir. aIF5A proteininin modifiye edilmemiş (hipuzinlenmemiş) formu ile tekrarlanan deneylerde modifiye edilmiş (hipuzinlenmiş) formu ile aynı sonuçlar elde edilmiştir.

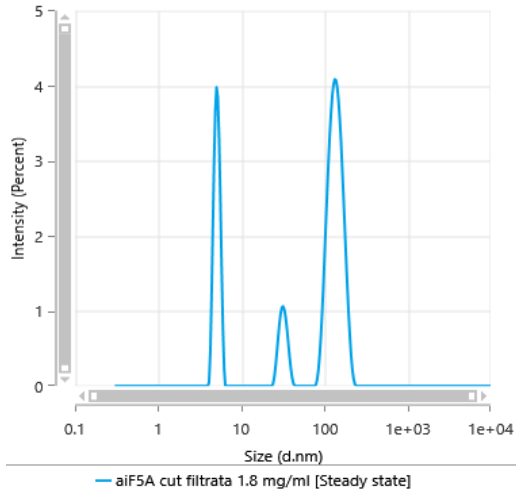
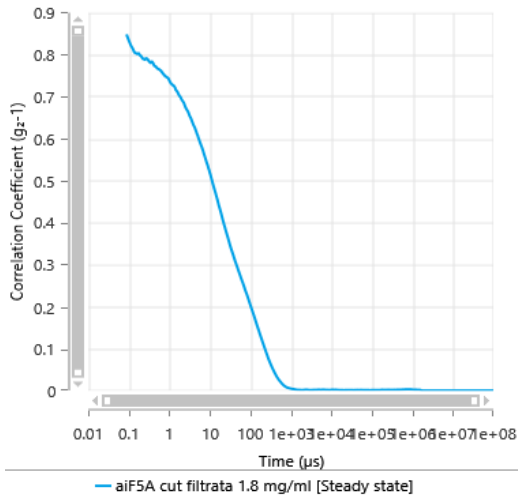
4.4 Dinamik Işık Saçılımı Deneyleri Sonuçlarının Analizi

Sulfolobus solfataricus aIF5A proteini'nin çözelti içerisindeki davranışını incelemek ve solüsyon içerisinde RNA ile ilişkisini gözlemleyebilmek için Dinamik Işık Saçılımı deneyi gerçekleştirildi. Bu teknik lazer ışık kaynağından çıkan ışığın çözeltideki partiküller tarafından geri saçılımı sayesinde çözeltideki makromoleküllerin genel boyutları ve oligomerik durumlarının analizi için küçük çaplı uygun bir tekniktir. Bu termofilik organizmanın proteini hakkında yapısal ayrıntılar elde etmek için yüksek sıcaklıklarda ölçümler gerçekleştirilmiştir.

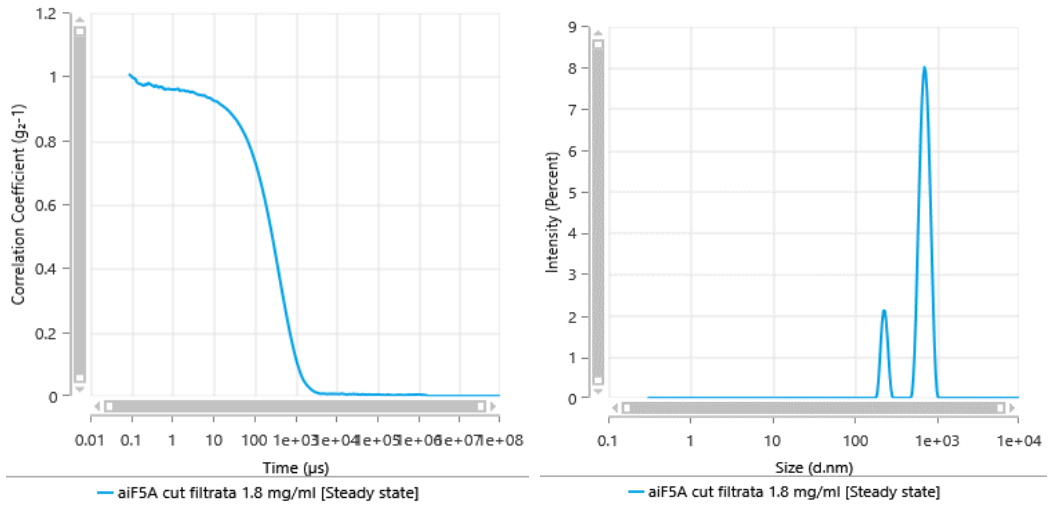
A



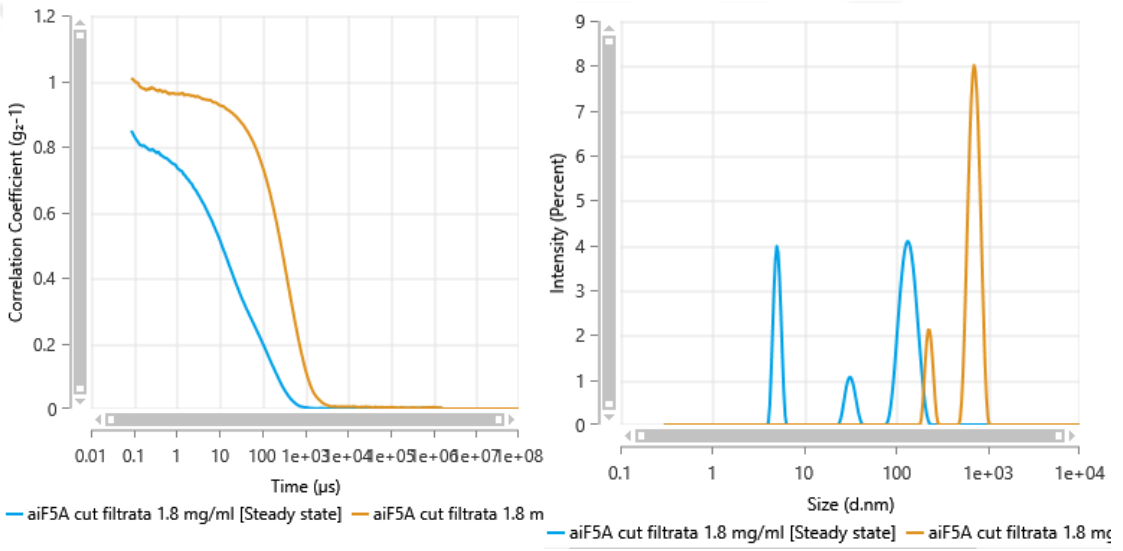
B.



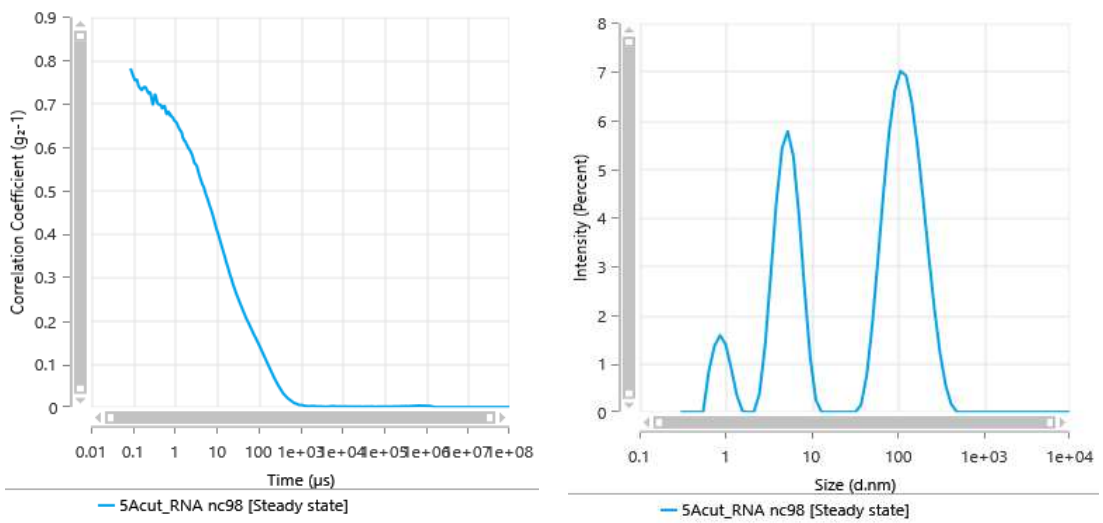
C.

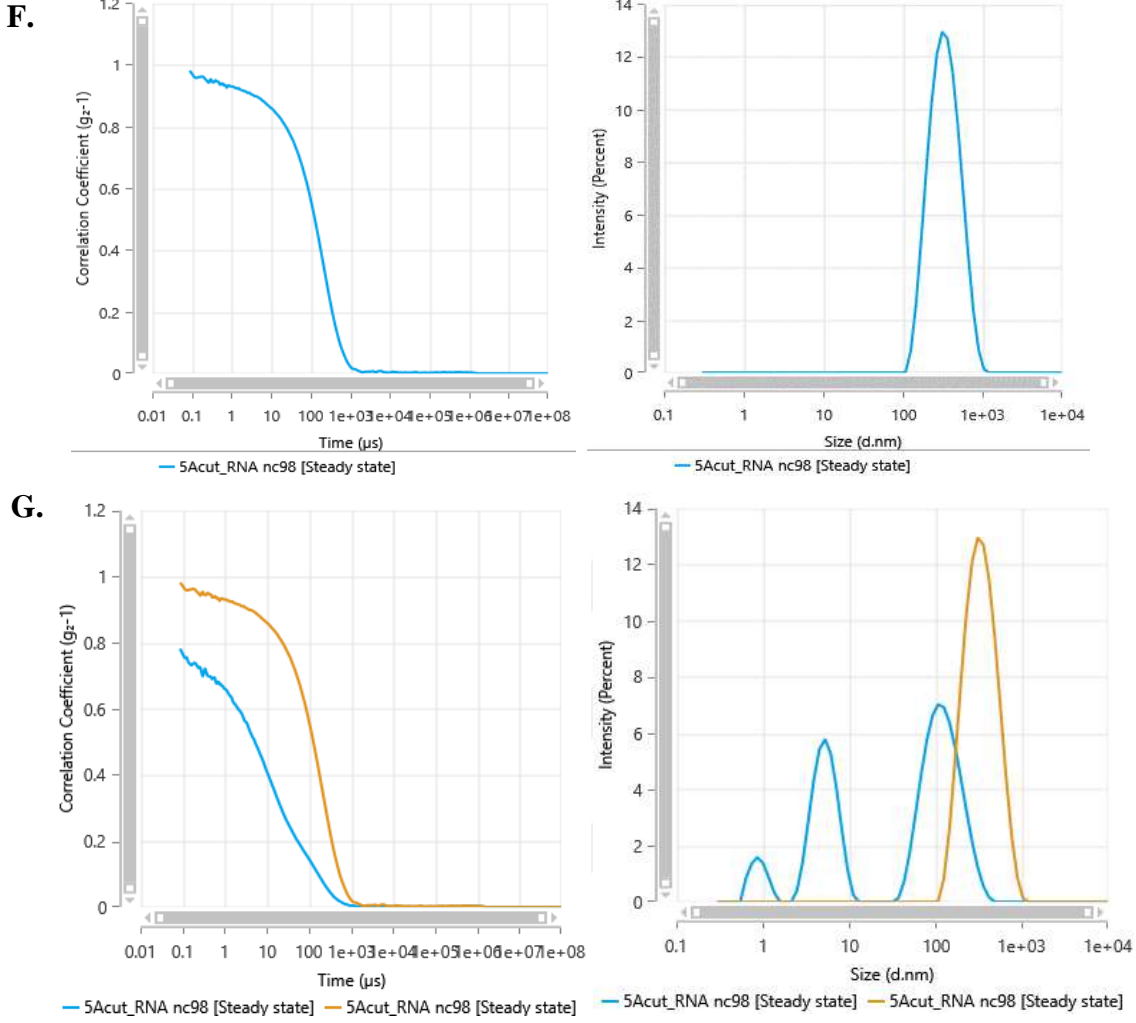


D.



E.





İlk ölçümün içerisinde herhangi örnek içermeden sadece su ile yapılmasının sebebi kuvvet yeterince iyi temizlenebilmiş mi, içerisinde toz, tanecik veya herhangi bir partikül var mı bunu anlamak, standart oluşturmak amacıyla yapılmaktadır. Numunelerle yapılacak ölçümlerin doğruluğu açısından önemlidir. Şekil 4.1, B'den itibaren solda gördüğümüz grafikler Korelasyon Katsayısının zamana bağlı değişiminin grafiğini ifade ederken, sağ tarafta gördüklerimiz ise Yoğunluğun zamana bağlı değişimini ifade eder. Ölçümler öncelikle 25°C den 80°C'ye kadar sadece aIF5A proteini ile yapılmıştır. Daha sonra ortama ncRNA eklenerek tekrar aynı ölçümler tekrarlanmıştır. Ve elde edilen veriler karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Bu analizlerde elde ettiğimiz kayda değer sonuç: proteinimizin sölüsyon içerisindeki stabil durumuna rağmen sıcaklık arttıkça özellikle 47°C'den sonra çözelti içerisinde kümelenmeye başlamıştır. Daha sonra RNA ile Proteinin birarada yapılan ölçümlerinde ise düşük sıcaklıkta dikkate değer bir değişim gözlemlenmezken, sıcaklık arttıkça proteinin yine agrege olması beklenirken çok daha az miktarda agregasyon gözlemlenmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Canlılığın en önemli süreçlerinden biri olan protein sentezi evrimsel süreçte oldukça korunmuş birçok protein faktörü içerir. Bunların arasında Bakterilerde EF-P, Arkelerde ve Ökaryotlarda aIF5A ve eIF5A proteinleri bulunur (Benelli ve ark., 2009). Bu faktörler protein sentezinde önemli işlevleri üstlenirler. İlk olarak translasyon başlangıç fazının son adımında ilk peptid bağının oluşumunda görevli olduğu bilinmekteydi (Benne ve ark., 1978). Fakat daha sonra translasyon uzama aşamasında önemli bir rolü üstlendikleri anlaşılmıştır. Protein sentezinin uzama fazında tekrarlayan prolin sekanslarına geldiğinde duraklayan ribozomların tekrar senteze devam etmesini sağlarlar (Gutierrez ve ark., 2013). 5A ailesi proteinlerinin translasyondaki bu işlevlerini gerçekleştirebilmeleri için translasyon sonrası bir modifikasyonla olgun forma ulaşmaları gerekir. Buda iki adımda gerçekleşen, Hipuzinasyon adı verilen enzimatik bir modifikasyondur (Zanelli ve ark., 2007). Bakterilerde de β -lizilasyon adında benzer bir modifikasyon gerçekleşir. eIF5A'da hipuzinasyon ve EF-P'de β -lizilasyon her iki preteinde de N-terminal bölgede bulunan bir lizin amino asitinde meydana gelir. Ökaryotlarda bu spesifik lizin, Deoksihipusin Sentaz (DHS) enzimi ile kataliz edilen reaksiyonla önce Deoksihipusin adında bir ara madde oluşur ve daha sonra Deoksihipusin Hidroksilaz (DOHH) adında ikinci bir enzimin katalizlediği reaksiyon ile hipusinlenmiş olgun eIF5A proteini oluşur. eIF5A'nın iki izoformu bulunur ve birbiriyle ilişkili genler tarafından üretilirler. aIF5A1 ana izoform olarak kabul edilir ve çoğu hücrede bol miktarda eksprese uğrar, hücre proliferasyonu için esastır. İkinci izoform aIF5A2 birkaç normal dokuda eksprese uğrar, ancak birçok kanserde yüksek oranda eksprese uğrar ve aday onkogen olarak belirlenmiştir (Caraglia ve ark., 2011; Dever ve ark., 2014). Her iki izoformun da yüksek ekspresyonu çeşitli kanser türlerinde olumsuz prognostik etkiler taşır bu yüzden her ikisi de kanser biyomarker'ı ve terapötik ajan olarak önem kazanmıştır (Wang ve ark., 2013). Her iki proteinin de a/eIF5A (arkeal ve ökaryotik) evrimsel süreçte korunmuş translasyon faktörü olan rollerinin yanı sıra multi işlevli proteinler olabilecekleri öne sürülmüştür..

Ökaryotlara kıyasla Arke genomların yapısı ve işlevi hakkında ortaya çıkan bilgilere rağmen pek çok mekanizma halen bilinmemektedir. Ekosistemde oldukça geniş bir alanda yayılım gösteren bu organizmalar özellikle ekstrem koşullarda yaşama adapte olmaları, Ökaryotlar ile birçok ortak özelliği paylaşmaları açısından benzersiz bir yaşam formunu oluştururlar. Arke ve Ökaryota'nın Filogenetik yakınlığı göz önünde bulundurulduğunda, 5A proteinini incelemeye karmaşık sistemlere sahip olan Ökaryotlardan başlamadan önce, Arkeleri bir model sistem olarak kullanmak ökaryotların daha basit bir arka planda yorumlanmasına olanak sağlayacaktır. Aynı zamanda Translasyon gibi önemli temel hücresel süreçlere aydınlık getirmek ökaryotları da daha iyi anlamamıza yardımcı olurken, bir yandan da evrimsel bir bakış açısıyla dünyadaki yaşamın kökenini anlamaya katkıda bulunacaktır. 3D yapıları oldukça benzer olan ökaryotik ve arkeal proteinlerin (eIF5A, aIF5A) her ikisi de aynı şekilde translasyon sonrası modifikasyona uğrar (Shiba ve ark., 1971; Yao ve ark., 2003). Daha önceki çalışmalarda Ökaryotik eIF5A'nın RNA bağlanma aktivitesine sahip olduğunun gösterilmesi (Xu ve ark., 2004; Xu ve ark., 2001) ve mayada sıcaklığa duyarlı bir eIF5A varyantı üzerine yapılan araştırmalarda bu proteinin mRNA dönüşümünde rol oynuyor olabileceği ve bunun belirli bir grup mRNA'nın yıkımına dahil olma olasılığını arttırdığını ileri sürmüştür (Schrader ve ark., 2006; Zuk ve ark., 1998). Bir başka çalışmada bir Euryarchaeon olan *Halobacterium sp.* NRC-1'in RNase aktivitesine ve RNA-binding aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Wagner ve Klug, 2007).

Wagner ve çalışma arkadaşları ilk kez *Halobacterium sp.*'de RNA aracılı işlemler'e aIF5A'nın katılımını göstermiştir. Ökaryot eIF5A için daha önce rapor edilmemiş bir RNA cleavage (kesim) ve RNA binding (bağlanma) aktivitesi göstermişlerdir. İkinci aktivite için hipuzin aminoasitinin gerekli olduğu (RNA-aIF5A kompleksini stabilize etmek için), bunun aksine aIF5A'nın aracılık ettiği RNA bozunması aktivitesinin hipusinyasyon gerektirmediği ve kesimin daha çok tek zincirli bölgelerde adenin ve sitozin nükleobazları arasında meydana geldiğini rapor etmiştir (Wagner ve ark., 2007). Bu iki faaliyetin nasıl düzenlendiği henüz belirsiz olmakla beraber, bu işlevleri aydınlatmak için daha fazla veri gereklidir.

Bu çalışmada Crenarchaeal model organizma olan *Sulfolobus solfataricus*'tan izole ettiğimiz aIF5A proteininin karakterizasyonunu ve RNA dönüşümündeki potansiyel rolü incelenmiştir. Bu kapsamda protein yapıda aIF5A faktörünü rekombinant bir şekilde üretimi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra hedef *S.solfataricus* genomik DNA'sın kalıp olarak kullanılarak PCR reaksiyonu ile hedef RNA dizilerine spesifik primer dizayn edilerek cDNA'ların sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA dizileri İn Vitro Transkripsiyon yöntemi ile RNA dizilerine çevirimi yapılmıştır. Çevirimi yapılan iki adet mRNA: mRNA 0910, mRNA 2184 ve bir adet kodlanmayan RNA: ncRNA98 ile rekombinant protein aIF5A arasında bir dizi Degredasyon Assay deneyleri gerçekleştirilmiştir. Deneyler aIF5A proteininin hem modifikasyona uğramış hemde modifikasyona uğramamış formu ile gerçekleştirilmiştir. Ve her iki durumdada sonuçlar aynı çıkmıştır. Buda aIF5A'nın, RNA metabolizmasındaki işlevleri için, translasyondaki görevlerinin aksine hipuzin modifikasyonuna ihtiyaç duymadıklarını göstermektedir. Bu deney sonucu açık bir şekilde rekombinant protein aIF5A, mRNA'lara bağlanarak yıkımına sebep olurken, kodlanmayan RNA'ya bağlanmış fakat herhangi bir yıkım gözlemlenmemiştir. Buradan yola çıkarak aIF5A'nın RNA bağlanma ve mRNA yıkımı özelliklerine sahip olduğunu söylemek mümkündür. mRNA'larda meydana gelen bozunma bize aIF5A'nın birden fazla fonksiyonu üstleniyor olabileceğini işaret eder. Görevini tamamlamış mRNA'ların degredasyonu, transkripsiyon sonrası gen ifadesinin düzenlenmesi ve etkin olmayan mRNA'ların yıkımı gibi.

Kodlanmayan RNA'ların transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel seviyede gen ifadesini regüle etme işlevleri ve epigenetik süreçlere de dahil oldukları göz önünde bulundurulduğunda aIF5A proteinine bağlanarak yıkıma uğramadan kalmasının sebebi olarak: aIF5A proteininin kodlanmayan RNA'ları yıkımdan koruyabileceğini düşündürmektedir.

IF5A proteininin yapısı ve genel durumu ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda aIF5A ile Statik Işık Saçılımı ve Küçük Açılı X-ray ışını saçılımı (SAXS), Boyut Dışlama Kromatografisi gibi çeşitli yöntemler kullanılmıştır. İlk olarak Chung ve ekibinin yaptığı çalışmada eritrositlerden

saflaştırılan eIF5A'nın oligomerler oluşturma kabiliyetine sahip ve çözelti içinde dimer olarak bulunduğunu öne sürmüştür (Chung ve ark., 1991). Bir başka çalışmada homolog protein eIF5A'nın çözelti içerisinde hipuzinden bağımsız bir şekilde *in vitro* ve *in vivo* dimerik bir konformasyon sergilediğini ve bu dimerin moleküler yapısının bakteriyel EF-P monomerine benzediği öne sürülmüştür (Dias ve ark., 2013). Buna benzer olarak başka bir çalışmada ise yine SAXS yöntemi ile arkeal aIF5A'nın solüsyonda oldukça stabil ve kompakt bir yapıya sahip olduğu ve proteinin monomer halde bulunduğunu fakat yinede dimer oluşturma eğiliminde olduğu belirtilmiştir (Romagnoli ve ark., 2020).

Bu çalışmada ise Dinamik Işık Saçılımı (DLS) ile yapılan analizlerde aIF5A proteininin solüsyon içerisindeki davranışı ve RNA ile ilişkisi incelenmiştir. aIF5A proteininin solüsyon içerisindeki kararlı durumuna rağmen sıcaklık arttıkça özellikle 47°C'den sonra çözelti içerisinde kümelenmeye başlamıştır. Daha sonra RNA ile Proteinin birarada bulunduğu ölçümlerde düşük sıcaklıkta dikkate değer bir değişim gözlemlenmezken, sıcaklık arttıkça proteinin yine kümeleşmesi beklenirken ortamda RNA varken kümeleşmede düşüş gözlemlenmiştir. Proteinin Termofilik bir organizmadan elde edildiğini düşünürsek bu veri bize aIF5A proteininin fonksiyonel olduğu sıcaklıklarda ortamda RNA bulunduğunda, RNA'lara bağlanmaya başladıkları ve bu yüzden kümeleşmenin azaldığı yorumuna götürmüştür.

Bu tez kapsamında sunulan çalışmalar Crenarchaeota (Thermoproteota) şubesine ait olan *Sulfolobus solfataricus* organizmasının sahip olduğu bir translasyon faktörü olan aIF5A hakkında bilinenleri bir adım ileriye taşımaktadır. Bu çalışma ile aIF5A proteinin çok işlevli bir protein ve RNA işleme yol izlerinde daha farklı işlevlere de sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bu proteinin olası diğer rollerinin anlaşılması ve ökaryotik formunun da detaylı araştırılması, kanser başlangıcı ve gelişiminde biyomarker ve terapötik bir ajan olarak kullanımı olasılığını attırarak insanlığa sağlayacağı fayda açısından çok büyük önem taşımaktadır. Bu bilgilerin ışığında daha sonra yapılacak çalışmalarda daha farklı yöntemler ile kanıtlar artırılarak tezin yayınlanma süreci ile birlikte yapılan keşfin literatüre katılması değerli olacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- **Aitken CE, Lorsch JR. (2012)** A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nature structural & molecular biology*, 19(6), 568-576.
- **Aoki H, Xu J, Emili A, Chosay JG, Golshani A, Ganoza MC. (2008)** Interactions of elongation factor EF-P with the *Escherichia coli* ribosome. *FEBS J. 275*: 671–81.
- **Aoki H, Xu J, Emili A, Chosay JG, Golshani A, Ganoza MC. (2008)** Interactions of elongation factor EF-P with the *Escherichia coli* ribosome. *FEBS J. 275*: 671–81.
- **Balibar CJ, Iwanowicz D, Dean CR. (2013)** Elongation factor P is dispensable in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Microbiol.* 67(3):293-9
- **Bartig D, Lemkemeier K, Frank J, Lottspeich F, and Klink F (1992)** The archaeobacterial hypusine-containing protein: structural features suggest common ancestry with eukaryotic translation initiation factor 5A. *Eur. J. Biochem.* 204: 751–758.
- **Bartig D, Schümann H, Klink F. (1990)** The unique posttranslational modification leading to deoxyhypusine or hypusine is a general feature of the archaeobacterial kingdom. *System. Appl. Microbiol.* 13: 112–116.
- **Bassani F, Zink IA, Pribasnig T, Wolfinger MT, Romagnoli A, Resch A, La Teana A. (2019)** Indications for a moonlighting function of translation factor aIF5A in the crenarchaeum *Sulfolobus solfataricus*. *RNA biology*, 16(5), 675-685.
- **Benelli D, Londei P. (2009)** a Begin at the beginning: evolution of translational initiation. *Res Microbiol.* 160: 493–501.
- **Benelli D, Marzi S, Mancone C, Alonzi T, la Teana A, Londei P. (2009) b** Function and ribosomal localization of aIF6, a translational regulator shared by archaea and eukarya. *Nucleic Acids Res.* 37: 256e267.
- **Behshad E, Ruzicka FJ, Mansoorabadi SO, Chen D, Reed GH, Frey PA. (2006)** Enantiomeric free radicals and enzymatic control of stereochemistry in a radical mechanism: the case of lysine 2,3-aminomutases. *Biochemistry* 45(42):12639-46
- **Benne R, Brown-Luedi ML, Hershey JWB. (1978)** Purification and characterization of protein synthesis initiation factors eIF-1, eIF-4C, eIF-4D, and eIF-5 from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem.* 253: 3070–3077.
- **Blaha G, Stanley RE, Steitz TA. (2009)** Formation of the first peptide bond: the structure of EF-P bound to the 70S ribosome. *Science* 325(5943):966-70
- **Bullwinkle TJ, Zou SB, Rajkovic A, Hersch SJ, Elgamal S, Robinson N, Smil D, Bolshan Y, Navarre WW, Ibba M. (2013)** (R)- β -Lysine-

modified elongation factor P functions in translation elongation. *J Biol Chem.* 288: 4416–23.

- **Caraglia, M, Park MH, Wolff EC, Marra M, & Abbruzzese A. (2013)** eIF5A isoforms and cancer: two brothers for two functions? *Amino acids*, 44(1), 103-109.
- **Chung SI, Park MH, Folk JE, & Lewis MS. (1991)** Eukaryotic initiation factor 5A: the molecular form of the hypusine-containing protein from human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1076(3), 448-451.
- **Coureur, P. D., Lazennec-Schurdevin, C., Monestier, A., Larquet, E., Cladière, L., Klaholz, B. P., ... & Mechulam, Y. (2016)** Cryo-EM study of start codon selection during archaeal translation initiation. *Nature communications*, 7(1), 1-10.
- **Clement PM, Henderson CA, Jenkins ZA, Smit-McBride Z, Wolff EC, Hershey JW, Park MH, Johansson HE. (2003)** Identification and characterization of eukaryotic initiation factor 5A-2. *Eur J Biochem.* 270(21):4254-63
- **Dever TE, Gutierrez E, Shin BS. (2014)** The hypusine-containing translation factor eIF5A. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology.* 49.5: 413-425.
- **Dias CA, Garcia W, Zanelli CF, Valentini SR. (2013)** eIF5A dimerizes not only in vitro but also in vivo and its molecular envelope is similar to the EF-P monomer. *Amino Acids.* 44(2):631-44
- **Gäbel K, Schmitt J, Schulz S, Näther DJ, Soppa J. (2013)** A comprehensive analysis of the importance of translation initiation factors for *Haloferax volcanii* applying deletion and conditional depletion mutants. *PLoS One.* 8(11): e77188
- **Ganoza MC, Aoki H. (2000)** Peptide bond synthesis: function of the efp gene product. *Biol Chem.* 381(7):553-9
- **Gentz PM, Blatch GL, Dorrington RA. (2009)** Dimerization of the yeast eukaryotic translation initiation factor 5A requires hypusine and is RNA dependent. *The FEBS Journal*, 276(3), 695-706.
- **Glick BR, Chladek S, Ganoza MC. (1979)** Peptide bond formation stimulated by protein synthesis factor EF-P depends on the aminoacyl moiety of the acceptor. *Eur J Biochem.* 97: 23–28.
- **Glick BR, Ganoza MC (1975)** Identification of a soluble protein that stimulates peptide bond synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72(11): 4257-60.
- **Gossiau A, Jao DLE, Butler R, Liu AYC, & Chen KY. (2009)** Thermal killing of human colon cancer cells is associated with the loss of eukaryotic initiation factor 5A. *Journal of cellular physiology*, 219(2), 485-493.
- **Gutierrez E, Shin BS, Woolstenhulme CJ, Kim JR, Saini P, Buskirk AR, Dever TE. (2013)** eIF5A promotes translation of polyproline motifs. *Mol Cell.* 51: 35–45.

- **Hasenöhrl D, Lombo T, Kaberdin V, Londei P, Bläsi U. (2008)** Translation initiation factor a/eIF2 (-gamma) counteracts 5' to 3' mRNA decay in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 2146e2150
- **Hasenöhrl D, Benelli D, Barbazza A, Londei P, Bläsi U. (2006)** *Sulfolobus solfataricus* translation initiation factor 1 stimulates translation initiation complex formation. *RNA*. 12: 674e682.
- **Hummels KR, Kearns DB. (2020)** Translation elongation factor P (EF-P). *Fems Microbiol Rev.* 44(2): 208-218.
- **Hanuske-Abel HM, Park MH, Hanuske AR, Popowicz AM, Lalonde M, Folk JE. (1994)** Inhibition of the G1-S transition of the cell cycle by inhibitors of deoxyhypusine hydroxylation. *Biochim Biophys Acta.* 1221(2):115-24.
- **Han Z, Sakai N, Bottger LH, Klinke S, Hauber J, Trautwein AX, et al. (2015)** Crystal Structure of the Peroxo-diiron (III) Intermediate of Deoxyhypusine Hydroxylase, an Oxygenase Involved in Hypusination. *Structure.* 23: 882–892.
- **Hanazawa M, Kawasaki I, Kunitomo H, Gengyo-Ando K, Bennett KL, Mitani S, Iino Y. (2004)** The *Caenorhabditis elegans* eukaryotic initiation factor 5A homologue, IFF-1, is required for germ cell proliferation, gametogenesis and localization of the P-granule component PGL-1. *Mech Dev.* 121(3):213-24.
- **Jansson BP, Malandrin L, Johansson HE. (2000)** Cell cycle arrest in archaea by the hypusination inhibitor N(1)-guanyl-1,7-diaminoheptane. *J Bacteriol.* 182: 1158–1161.
- **Jao DL, Chen KY. (2006)** Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. *J Cell Biochem.* 97(3):583-98.
- **Jenkins ZA, Hååg PG, Johansson HE. (2001)** Human eIF5A2 on chromosome 3q25-q27 is a phylogenetically conserved vertebrate variant of eukaryotic translation initiation factor 5A with tissue-specific expression. *Genomics* 71(1):101-9.
- **Kaiser A. (2012)** Translational control of eIF5A in various diseases. *Amino Acids.* 42(2-3):679-84
- **Kang HA, Hershey JW. (1994)** Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 269(6):3934-40
- **Kemper WM, Berry IW, and Merrick WC. (1976)** Purification and properties of rabbit reticulocyte protein synthesis initiation factors M2Ba and M2Bβ. *J Biol Chem.* 251: 5551–5557.
- **Klier H, Wohl T, Eckerskorn C, Magdolen V, Lottspeich F. (1993)** Determination and mutational analysis of the phosphorylation site in the hypusine-containing protein Hyp2p. *FEBS Lett.* 334: 360–4.
- **Lassak J, Keilhauer EC, Fürst M, Wuichet K, Gödeke J, et al. (2015)** Arginine-rhamnosylation as new strategy to activate translation

elongation factor P. *Nat. Chem. Biol.* 11:266–70. Corrigendum. *Nat. Chem. Biol.* 11: 299.

- **Lassak J, Wilson DN, Jung K. (2016)** Stall no more at polyproline stretches with the translation elongation factors EF-P and IF-5A. *Mol Microbiol.* 99(2):219-35
- **Lee NP, Tsang FH, Shek FH, Mao M, Dai H, Zhang C, Dong S, Guan XY, Poon RT, Luk JM (2010)** Prognostic significance and therapeutic potential of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 15: 968–976.
- **Liao DI, Wolff EC, Park MH, and Davies DR. (1998)** Crystal structure of the NAD complex of human deoxyhypusine synthase: an enzyme with a ball-and-chain mechanism for blocking the active site. *Structure* 6:23–32.
- **Maeda I, Kohara Y, Yamamoto M, Sugimoto A. (2001)** Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Curr Biol.* 2001 Feb 6;11(3):171-6.
- **Mandal A, Mandal S, Park MH. (2014)** Genome-wide analyses and functional classification of proline repeat-rich proteins: potential role of eIF5A in eukaryotic evolution. *PLoS One.* 9: e111800
- **Melnikov S, Mailliot J, Shin BS, Rigger L, Yusupova G, Micura R, Dever TE, Yusupov M. (2016)** Crystal Structure of Hypusine-Containing Translation Factor eIF5A Bound to a Rotated Eukaryotic Ribosome. *J Mol Biol.* 428(18):3570-3576.
- **Nakanishi S, Cleveland JL. (2016)** Targeting the polyamine-hypusine circuit for the prevention and treatment of cancer. *Amino Acids.* 48(10):2353-62.
- **Navarre WW, Zou SB, Roy H, Xie JL, Savchenko A, Singer A, Edvokimova E, Prost LR, Kumar R, Ibba M, et al. (2010)** PoxA, yjeK, and elongation factor P coordinately modulate virulence and drug resistance in *Salmonella enterica*. *Mol Cell.* 39: 209–221.
- **Park MH. (2006)** The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). *J Biochem.* 139(2):161-9.
- **Park JH, Dias CA, Lee SB, Valentini SR, Sokabe M, Fraser CS, Park MH. (2011)** Production of active recombinant eIF5A: reconstitution in *E. coli* of eukaryotic hypusine modification of eIF5A by its coexpression with modifying enzymes. *Protein Eng Des Sel.* 24: 301–9.
- **Park MH, Nishimura K, Zanelli CF, Valentini SR. (2010)** Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino Acids.* 38:491–500.
- **Patel PH, Costa-Mattioli M, Schulze KL, Bellen HJ. (2009)** The *Drosophila* deoxyhypusine hydroxylase homologue nero and its target eIF5A are required for cell growth and the regulation of autophagy. *J Cell Biol.* 185(7):1181-94

- **Pedullà N, Palermo R, Hasenöhrl D, Bläsi U, Cammarano P, Londei P. (2005)** The archaeal eIF2 homologue: functional properties of an ancient translation initiation factor. *Nucleic Acids Res.* 33: 1804e1812.
- **Peil L, Starosta AL, Virumäe K, Atkinson GC, Tenson T, Remme J, Wilson DN. (2012)** Lys34 of translation elongation factor EF-P is hydroxylated by YfcM. *Nat Chem Biol.* 8: 695–697.
- **Prunetti L, Graf M, Blaby IK, Peil L, Makkay AM, Starosta AL, de Crécy-Lagard V. (2016)** Deciphering the translation initiation factor 5A modification pathway in halophilic archaea. *Archaea*, 2016.
- **Romagnoli A, Bassani F, Moretti P, Spinozzi F, Bläsi U, Di Marino D, & La Teana A. (2020)** Characterization of aIF5A Protein: A Multifunctional Translation Factor in the Hyperthermophilic Archaeon *S. Solfataricus*. *Biophysical Journal*, 118(3), 194a.
- **Rossi D, Barbosa NM, Galvão FC, Boldrin PE, Hershey JW, Zanelli CF, Fraser CS, Valentini SR. (2016)** Evidence for a Negative Cooperativity between eIF5A and eEF2 on Binding to the Ribosome. *PLoS One*.11 (4)
- **Quintas-Granados LI, Carvajal-Gamez BI, Villalpando JL, Ortega-Lopez J, Arroyo R, Azuara-Liceaga E, Álvarez-Sánchez ME. (2015)** Bifunctional activity of deoxyhypusine synthase/hydroxylase from *Trichomonas vaginalis*. *Biochimie.* 24
- **Saini P, Eyler DE, Green R, Dever TE. (2009)** Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature.* 459: 118–21.
- **Schnier J, Schwelberger HG, Smit-McBride Z, Kang HA, Hershey JW. (1991)** Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1991 Jun;11(6):3105-14.
- **Schmidt C, Becker T, Heuer A, Braunger K, Shanmuganathan V, Pech M, Berninghausen O, Wilson DN, and Beckmann R. (2016)** Structure of the hypusinylated eukaryotic translation factor eIF-5A bound to the ribosome. *Nucleic Acids Res.* 44: 1944–1951.
- **Schmitt, E., Coureux, P. D., Kazan, R., Bourgeois, G., Lazennec-Schurdevin, C., & Mechulam, Y. (2020)** Recent advances in archaeal translation initiation. *Frontiers in Microbiology*, 2259.
- **Schuller AP, Wu CC, Dever TE, Buskirk AR, Green R. (2017)** eIF5A Functions Globally in Translation Elongation and Termination. *In: Molecular Cell.* 162: 872–884.
- **Schümann H, and Klink F. (1990)** Archaeobacterial protein contains hypusine, a unique amino acid characteristic for eukaryotic translation factor 4D. *Syst. Appl. Microbiol.* 11: 103–107.
- **Schrader, R., Young, C., Koziar, D., Hoffmann, R., & Lottspeich, F. (2006)** Temperature-sensitive eIF5A mutant accumulates transcripts targeted to the nonsense-mediated decay pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 281(46), 35336-35346.
- **Shiba, T., Mizote, H., Kaneko, T., Nakajima, T., & Yasuo, K. (1971).** Hypusine, a new amino acid occurring in bovine brain:

Isolation and structural determination. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 244(3), 523-531.

- **Spradling AC, Stern D, Beaton A, Rhem EJ, Laverly T, Mozden N, Misra S, Rubin GM. (1999)** The Berkeley Drosophila Genome Project gene disruption project: Single P-element insertions mutating 25% of vital Drosophila genes. *Genetics*. 153(1):135-77.
- **La Teana, A., Benelli, D., Londei, P., & Bläsi, U. (2013)** Translation initiation in the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*: eukaryotic features but bacterial route. *Biochemical Society Transactions*, 41(1), 350-355.
- **Wagner, S., & Klug, G. (2007)** An archaeal protein with homology to the eukaryotic translation initiation factor 5A shows ribonucleolytic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 282(19), 13966-13976.
- **Wang, FW, Guan XY, Xie D. (2013)** Roles of eukaryotic initiation factor 5A2 in human cancer. *International journal of biological sciences*, 9(10), 1013.
- **Wolff EC, Kang KR, Kim YS, Park MH. (2007)** Posttranslational synthesis of hypusine: evolutionary progression and specificity of the hypusine modification. *Amino Acids*. 33(2):341-50
- **Xu A, Chen KY. (2001)** Hypusine is required for a sequence-specific interaction of eukaryotic initiation factor 5A with postsystematic evolution of ligands by exponential enrichment RNA. *J Biol Chem*. 276(4):2555-61
- **Xu, A., Jao, D. L. E., & Chen, K. Y. (2004).** Identification of mRNA that binds to eukaryotic initiation factor 5A by affinity co-purification and differential display. *Biochemical Journal*, 384(3), 585-590.
- **Yanagisawa T, Sumida T, Ishii R, Takemoto C, Yokoyama S. (2010)** A paralog of lysyl-tRNA synthetase aminoacylates a conserved lysine residue in translation elongation factor P. *Nat Struct Mol Biol*. 17(9):1136-4.
- **Yao M, Ohsawa A, Kikukawa S, Tanaka I, Kimura M. (2003)** Crystal structure of hyperthermophilic archaeal initiation factor 5A: a homologue of eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A). *J Biochem*. 133(1): 75–81.
- **Zanelli CF, Maragno AL, Gregio AP, Komili S, Pandolfi JR, Mestriner CA, Lustri WR, Valentini SR. (2006)** eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun*. 348(4):1358-66.
- **Zanelli CF, Valentini SR. (2007)** Is there a role for eIF5A in translation?. *Amino acids*, 2007, 33.2: 351-358.
- **Zhang C, Phillips A, Wipfler R, Olsen G, Whitaker R. (2018)** The essential genome of the crenarchaeal model *Sulfolobus islandicus*. *Nature Commun*. 9:4908.
- **Zuk, D., & Jacobson, A. (1998)** A single amino acid substitution in yeast eIF-5A results in mRNA stabilization. *The EMBO journal*, 17(10), 2914-2925.

TEŞEKKÜR

Tüm yüksek lisans eğitimim boyunca akademik bilgi ve birikimini benden esirgemeyen, aynı zamanda insani ve etik değerleriyle de bana örnek olan, yoluma ışık tutan değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Savaş İZZETOĞLU'na

Tez çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak yardımlarını benden esirgemeyen hocalarım Assoc. Prof. Dr. Anna LA TEANA ve Prof. Dr. Tiziana CACCIAMANI'ye.

Tez çalışmalarım ve stajım boyunca hem teorik, hemde pratik bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan çalışma arkadaşlarım Astra PİCCİNİNİ, Dr. Lucia SİLVESTRİNİ ve Dr. Mattia D'AGOSTİNO'ya,

Tüm eğitim hayatım ve yüksek lisansım boyunca gerek laboratuvar gerekse teorik bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan sevgili ağabeyim Mustafa Onur ÖZAY'a ve bilim insanı olmak için çıktığım bu uzun ve meşakkatli yolda her daim bana desteğini, motivasyonunu hissettiren, bana pes etmemeyi öğreten, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan biricik annem Gülistan DEMİREL'e, her koşulda yanımda olan ve beni motive eden kıymetli hayat arkadaşım Leonardo LATTANZİ'ye ve biricik arkadaşım Ayper BOLAT'a,

Yüksek lisansım boyunca tüm sorularımı sabırla cevaplayan ve kıymetli tecrübe ve bilgilerini benimle paylaşan tüm hocalarıma ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim dalına en içten sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

Yeşim Özay, İzmir Bayraklı Piyale İlköğretim Okulunda ve İzmir Mithatpaşa Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesinde eğitimini tamamladıktan sonra Üniversite eğitimine 2013 yılında Ege Üniversitesi Biyoloji bölümünde başladı. Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalında eğitimine devam etti. Lisans eğitiminin son yılında Erasmus+ öğrencisi olarak gittiği Girit Üniversitesinde 1 yıl olarak hem teorik derslere katılmış hemde tüm yıl boyunca laboratuvarında çalışmıştır. Ve 2019 yılında Ege Üniversitesinden mezun olmuştur. Eğitimine ara vermeden 2019 yılında Ege Üniversitesi Biyoloji bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başlamıştır.

