

RESTRIKSİYON ENDONÜKLEAZLAR

- RE enzimleri, kısa DNA dizilerini özgül olarak tanıyan ve bu dizilimlere yakın bölgelerden veya bu dizilimler içindeki spesifik bölgelerden DNA'yı kesen yapılardır. Günümüzde 300'e yakın farklı DNA dizilimini tanıyan yaklaşık 3000'den fazla RE varlığından söz edilmektedir. RE enzimlerinin çok büyük bir kısmı bakterilerden, çok az bir kısmı da virüs ve ökaryotlardan izole edilmiştir.
- 1965'te Arber; DNA metilasyonunun bakteriyi restriksiyon ajanlarına karşı koruduğunu ortaya çıkarmıştır. Bakteri, kendi DNA'sını kendi endonükleazlarından korumak için metiller, demiştir.
- 1968'de Meselson ve Yuan; ilk RE'ı E.coli bakterisinden izole etmişlerdir. Fakat bu RE'ın spesifik tanıma bölgesi bulunmamaktaydı.
- 1970'de Smith ve Wilcox; H.influenza'dan spesifik DNA sekansını tanıyan ve kesim yapan bir endonükleaz (*Hind II*) izole ettiler.

- RE'ların doğal biyolojik fonksiyonu, bakteriyel savunma mekanizmasında oynadıkları roldür. Bakteriye giren yabancı DNA'ları da kesebildiklerinden, intraselüler bakteriyel patojenleri inaktive edebilmekte ve bakteriyi virüslerden ve yabancı DNA'lardan korumaktadırlar.
- Aynı zamanda, bakterilerde bulunan spesifik metilaz enzimleri de, restriksiyon bölgelerine metil grupları ekleyerek, RE'ların bakterinin kendi DNA'sını kesmesini engellemektedir.

1970'li yıllardan sonra restriksiyon endonükleaz kullanımına bağlı olarak rekombinant DNA teknolojisi hızla gelişmiş ve bu gelişme seçilen bir genin çoğaltılmasını, genin kodladığı proteinin üretilmesini, genin diziliminin belirlenmesini vb. mümkün hale getirmiştir. Bu teknolojideki merkezi konumu nedeniyle, RE enzimleri özellikle klonlama çalışmaları yapan araştırma laboratuvarlarında sıklıkla kullanılmıştır.

RE kullanım alanlarına örnekler:

- Rekombinant DNA elde edilmesi
- DNA haritası çıkarılması
- Polimorfizmlerin belirlenmesi
- Probların hazırlanması
- DNA modifikasyon durumlarının analizi

İSİMLENDİRME

- İsimlendirmede önce enzimin elde edildiği bakteri cinsinin ilk harfi, daha sonra bakteri türünün ilk iki harfi ve son olarak da soya ait bir harf ile ilk izolasyondan başlayarak Romen rakamı ile enzimin izolasyon sırası belirtilir.

- *EcoR I* E = genus *Escherichia*
 co = species *coli*
 R = strain RY 13
 I = first RE to be isolated from this species

- *Hind III* H = genus *Haemophilus*
 in = species *influenzae*
 d = strain Rd
 III = third RE to be isolated from this species

RE'ların DNA'ya BAĞLANMA ve KESME MEKANİZMALARI

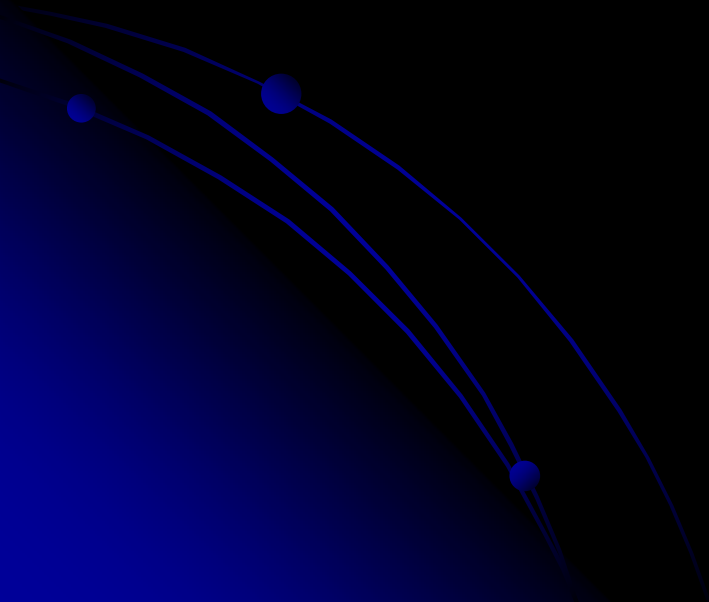
- RE'lar DNA tanıma bölgesi ve katalitik alan olmak üzere iki fonksiyonel alt birimden oluşmaktadır. DNA tanıma bölgesi spesifik bölgeyi tanır ve katalitik alanı buraya yerleştirir. Tanıma sekansına yerleşen katalitik alan heliksin fosfodiester bağlarını kırar.
- RE'lar, çift sarmal DNA'ya tanıma bölgelerinden bağlanabildikleri gibi, tanıma bölgeleri dışından da bağlanabilmektedirler. Tanıma bölgeleri dışından bağlandıktan sonra bu enzimler, çizgisel DNA boyunca kaymaktadırlar. Bu işlem esnasında DNA ile enzim arasını su molekülleri doldurmaktadır. Enzim tanıma bölgeleri bulunduğu zaman su moleküllerinin pek çoğu uzaklaştırılmaktadır. Enzim-DNA kompleks formunda, hem enzimde hem DNA dizilerinde konformasyonel değişiklikler meydana gelmektedir.

- RE'lar sadece bazlar arasında yatay konumda bulunan fosfodiester bağlarını kırarlar. Karşılıklı iki baz arasındaki hidrojen bağlarının kesilmesinden sorumlu değildirler. Hidrojen bağları, fosfodiester bağlarının kırılmasıyla ve çözeltideki termal hareketten doğan enerjinin etkisiyle kendiliğinden kırılırlar.



RE'ların TANIMA SEKANS ÖZELLİKLERİ

- RE'lar için substrat olan spesifik veya non-spesifik çift zincir DNA sekanslarına tanıma sekansları denilmektedir.
- Restriksiyon tanıma bölgelerinin uzunluğu değişebilmektedir.



- Farklı RE'lar aynı tanıma sekansına sahip olabilirler. Aynı sekansı tanıyan ve farklı organizmalardan elde edilmiş RE'lara **izoşizomer** denir (Ör: Sac I ve Sst I).

- İzoşizomerler sıklıkla farklı optimum reaksiyon koşullarına ve stabiliteye sahiptirler.

- İzoşizomerler aynı sekansı tanımlarına karşın, kesimi sekansın farklı bölgelerinden de yapabilirler. Bunlara ise **neoşizomerler** denir (Ör: Sma I ve Xma I).

Sma I ---- CCC ↓ GGG
 Xma I ---- C ↓ CCGGG
 Psp AI ---- C ↓ CCGGG

ENZİM

TANIMA SEKANSI

BamHI

GGATCC
 CCTAGG

NotI

GCGGCCGC
 CGCCGGCG

Sau3AI

GATC
 CTAG

Sac I

GAGCTC
 CTCGAG

RE'ların TEPKİME ŞARTLARI

RE'lar gerek uzun süreli saklanırken, gerekse aktivite gösterirken uygun şartlara ihtiyaç duymaktadırlar. Bir enzimden en iyi şekilde yararlanabilmesi için gerekli şartlar üretici firmalar tarafından kullanıcıya bildirilmelidir. RE'larla çalışırken, bu şartlara uyulmadığı takdirde sıkça problemlerle karşılaşılır. Enzimlerin star aktiviteleri, DNA ve enzim konsantrasyonunun uygun olmaması, pH ve iyonik dengenin uygun olmaması, çalışılan enzimin diğer enzimlerle kontaminasyonu gibi problemler uygun olmayan kesimlere neden olabilmektedir.

- 1) **Tampon kompozisyonu:** Tampon çözeltisinin fonksiyonu yeterli iyonik gücü (tuz konsantrasyonu), major katyonları (sodyum, potasyum) ve uygun pH ortamını oluşturmaktır. Pek çok RE genellikle pH 8.0'de aktiftir. RE'ların çoğu 50-150 mM NaCl veya KCl ortamında kesim yapmaktadır.
- 2) **Enzim kofaktörleri:** Ticari olarak mevcut RE'lar kofaktör olarak sadece magnezyuma (Mg) ihtiyaç duymaktadır. Diğer divalent katyonların varlığı problemlere neden olmaktadır.
- 3) **Gliserol:** RE'lar -20 oC'de saklanırken saklama tamponu içerisine gliserol (%50) katılmaktadır. Bu, enzimin donmasını engellemektedir. Böylece, enzimin dondurulup çözülmesi sırasında göreceği zarar önlenmektedir. Çoğu RE için çalışma sırasında son konsantrasyonda % 5'ten fazla gliserol istenmemektedir.

- 4) ***İnkübasyon sıcaklığı:*** Çoğu RE maksimum aktivitesini 37 °C'de göstermektedir. Fakat daha düşük veya daha yüksek sıcaklıklarda aktivitelerini gösteren RE'lar da vardır. Ör: Apa I → 30 °C , Bcl I → 50 °C , Taq I → 65 °C
- 5) ***Enzim konsantrasyonu:*** 1 aktivite ünitesi, 1µg DNA'yı 50 µL total reaksiyon hacmi içinde 1 saatte hidrolize edebilen enzim miktarıdır. Kullanılan enzim konsantrasyonları substrata göre ayarlanmakla birlikte, çok yüksek enzim konsantrasyonları star aktiviteye neden olabilmektedir.
- 6) ***Substrat konsantrasyonu:*** Substrat olarak kullanılan DNA'nın miktarı RE kesimini etkilemektedir. Az bir hacim içerisinde çok miktarda DNA bulunması enzimin difüzyonunu engellemekte ve etkinliğini düşürmektedir. Çok düşük DNA konsantrasyonları da kesimin verimini etkilemektedir.

STAR AKTİVİTE

- RE'ların özelliklerinden en dikkate değer olanı, bu enzimlerin optimal şartlarda özgül DNA'yı en yakın dizilimden kesebilme başarılarının optimal olmayan şartlarda oldukça değişmesidir. Optimal olmayan şartlarda enzimin tanıma sekansına olan spesifisitesi değişmektedir. Örneğin; Bam HI enzimi için tanıma sekansı (G↓GATCC) iken, optimal olmayan şartlarda (G↓GATCN) veya (G↓RATCC) şeklinde benzer bölgelerden de kesim yapabilmektedir. Bu duruma “ **star aktivite** ” veya “ **relaxed specificity** ” denilmektedir.

Bu durum, çalışmalarda oldukça önemli olmakta ve çalışmanın başarısında belirleyici konuma gelebilmektedir. Bu nedenle, kullanılan RE'ların star aktiviteye sahip olup olmadıkları bilinmeli, üretici firmalar tarafından da bildirilmelidir.

Star aktiviteye neden olan durumlar

- * Yüksek gliserol konsantrasyonu ($> \% 5$ v/v)
- * Çok yüksek enzim konsantrasyonu (genellikle > 100 U/ μ g DNA)
- * Düşük iyonik güç (< 25 mM)
- * Yüksek pH (genellikle > 8.0)
- * Organik maddelerin varlığı (DMSO, etanol, dimetilasetamid vb.)
- * Kofaktör Mg'un yerine diğer divalent katyonların varlığı (Mn⁺², Cu⁺² vb.)

RE'ların SINIFLANDIRILMASI

RE'lar; metilaz aktivitelere, alt ünite yapılarına, kesim özgüllüklerine ve kofaktör ihtiyaçlarına göre sınıflandırılmışlardır.

- **Tip I RE'lar:** Endonükleaz aktiviteri için ATP, S-adenozilmetionin ve Mg^{+2} 'a ihtiyaç duyarlar. Bilinen tüm tip I RE'lar tanıma sekansındaki adenin rezidülerini metilasyona uğratmaktadır. Bu enzimler tanıma sekanslarına bağlanmalarına rağmen, kesimleri sekans dışında tesadüfi olarak gerçekleştirmektedirler. 3 altüniteden oluşurlar. Birincisi, tanıma sekansını tanır; ikincisi, adenin rezidülerini metiller; üçüncüsü ise kesimden sorumludur.
- **Tip II RE'lar:** RE'lar denildiğinde ilk akla gelen ve en çok çalışılan gruptur. İzole edilen RE'ların çok büyük kısmı bu gruptadır. Çünkü tip II RE'lar, tam hedef nükleotitten veya çok yakınından kesim yapma özellikleri nedeniyle araştırmalar için ideal enzimlerdir. Mg^{+2} iyonlarının varlığında çift zincir DNA üzerindeki palindromik sekansları tanır ve bu sekans içindeki özel bölgeden kesim yaparlar. Kesimleri ATP'ye bağlı değildir. Restriksiyon fragmanları ve jelde band paternleri oluşturmaları bakımından diğer tip RE'lara göre çok üstündürler ve hemen hemen sadece bu grup RE'larla çalışılmaktadır.

Tip III RE'lar: Tip I RE'lar gibi metilasyon modifikasyon fonksiyonuna sahip olup, Mg^{+2} ve ATP'ye bağlı kesim gerçekleştirirler. Çok altüniteli enzimlerdir ve tam bir kesim yapma özellikleri zayıftır. DNA'ya tanıma sekanslarından bağlanmalarına rağmen, kesimi tanıma bölgesinden farklı bir yerden gerçekleştirirler.

Homing endonükleazlar: Protein yapıları bakımından diğer RE'lardan farklılık gösteren, uzun ve asimetrik bölgeleri tanıyıp kesen, aktivitesi için protein ve RNA'ya ihtiyaç duyan enzim grubudur. Daha az tanıma özgüllüğü göstermekte ve tanıma bölgelerindeki tek baz değişimlerini tolere edebilmektedirler.

Nicking endonükleazlar: RE'lar çift zincir DNA'ya bağlanıp kesim yaparlar. Tek zincire bağlanıp endonükleaz aktivitesi gösteren enzim grubuna da “nicking” endonükleazlar denilmektedir.