

## TONSİL DOKUSUNUN VİRAL ENFEKSİYONLARA KARŞI YANITINDA RİBONÜKLEAZ L GENİNİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF THE ROLE OF RIBONUCLEASE L GENE IN THE RESPONSE OF TONSIL TISSUES AGAINST VIRAL INFECTIONS

**Fikret ŞAHİN\***, **Mehmet TAŞPINAR\*\***, **Djursun KARASARTOVA\***  
**Aykut ÖZKUL\*\*\***, **Devran GERÇEKER\***

**ÖZET:** Ribonükleaz L (RNaz–L) proteini, virus enfeksiyonlarına karşı hücrenin doğal savunmasında önemli bir faktör olarak gösterilmektedir. RNaz–L’nin fonksiyon kaybı, mutasyonlarla, en sık olarak da R462Q mutasyonu sonucu ortaya çıkabilmektedir. Bu çalışmanın amacı, herpes simpleks tip 1 virüsü (HSV–1), Epstein–Barr virus (EBV) ve insan herpes virüsü 6 (HHV–6) ile enfekte olan ve olmayan tonsillektomi hastalarından alınan tonsil dokularında RNaz–L gen ekspresyonlarının karşılaştırılması ve R462Q mutasyonunun araştırılmasıdır. Çalışmaya alınan altı tonsil dokusunun birisi her üç virüsü, ikisi bu virüslerden en az birisini içermekte, üçü ise bu virüslerden hiçbirisini içermemektedir. Bu dokularda viral DNA varlığı, daha önce yapılan bir çalışmamızda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile saptanmıştır. Bu çalışmada ekspresyon analizi ters transkriptaz PCR ile, mutasyon analizi ise “Single Strand Conformation Polymorfism” (SSCP) yöntemi ile genomik DNA’dan elde edilen ve mutasyon bölgesini içeren PCR ürünleri kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca, tonsil dokularından elde edilen RNaz–L cDNA’larının R462Q bölgesini içeren kısmi sekansları yapılarak mutasyon araştırılmıştır. Sonuç olarak, bu virüslerle enfekte olan ve olmayan tonsil dokularındaki RNaz–L ekspresyonlarında bir farklılık tespit edilememiş, SSCP ve sekans analizleri sonucunda bir mutasyon belirlenememiştir. Bu çalışmanın bulgularına göre, tonsil hücrelerinin virüslere karşı doğal savunmasında RNaz–L proteini dışında farklı başka faktörlerin rolü olduğu düşünülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** Ribonükleaz L, tonsil, multipleks polimeraz zincir reaksiyonu, “single strand conformation polymorfism”.

**ABSTRACT:** Mutations or variants that impair function of ribonuclease L (RNase–L), particularly R462Q, have been proposed as susceptibility factors for the innate antiviral response. The aim of this study was to investigate and

\* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

\*\* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

\*\*\* Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Ankara.

compare the expression levels of RNase-L and mutation of R462Q in the tonsils of tonsillectomy patients who were infected and not infected with herpes simplex virus type 1 (HSV-1), Epstein-Barr virus (EBV) and human herpes virus 6 (HHV-6). Six tonsils were included in the study. One tonsil was infected with all of these three viruses, two were infected with at least one of these viruses, and three were not infected with these viruses. The presence of viral DNAs in the tonsil tissues had been searched by polymerase chain reaction (PCR) in our previous study. Reverse transcriptase PCR method was used for RNase-L expression analyses, and single strand conformation polymorphism (SSCP) and direct sequencing methods were used for the mutation analyses. PCR products containing R462Q mutation site in the genomic DNA were used for SSCP analysis. In addition to SSCP analyses, partial sequencing of the cDNA PCR product containing R462Q mutation site were performed. As a result, no difference between the virus-infected and non-infected tonsils for the expressions of RNase-L were detected, and there were no mutations detected by SSCP and sequencing analyses. It was concluded that other factors than RNase-L protein, might be involved in the innate defense mechanisms of tonsil cells against viruses.

*Key words: Ribonuclease L, tonsils, multiplex polymerase chain reaction, single strand conformation polymorphism.*

## G İ R İ Ş

Virus enfeksiyonlarını takiben, hücre içerisinde erken dönemde interferon ekspresyonu başlar ve interferonlar konak hücrenin antiviral korunmasında büyük öneme sahiptirler<sup>1</sup>. Genel olarak, interferonlar etkilerini, antiviral etkisi olduğu bilinen bazı proteinlerin ekspresyonlarını artırarak gerçekleştirmektedir<sup>2</sup>. Bu proteinlerden birisi olan ribonükleaz L (RNaz-L), virus RNA'sını parçalayarak viral replikasyonu engellemektedir<sup>3-6</sup>. Hücrede bulunan ve bir endonükleaz olan RNaz-L'nin aktivasyonu, interferonlar tarafından kontrol edilen 2-5A sentetaz enzimi tarafından sentezlenen 2-5A oligoadenilat tarafından sağlanmaktadır<sup>7</sup>.

Kronik tonsillit olgularında herpes simpleks virus tip 1 (HSV-1), Epstein-Barr virus (EBV) ve insan herpes virus 6 (HHV-6)'nın araştırıldığı daha önceki bir çalışmamızda, ilginç olarak bir tonsil dokusunda bu virusların tümünün bulunduğu gözlemlenmesi, bu doku hücrelerinin doğal koruyucu sistemlerinde rol alan proteinlerde bir farklılık olabileceğini düşündürmüştür. Bu amaçla bu çalışmada, RNaz-L genindeki muhtemel farklılıkların en önemli göstergelerinden biri olarak bu genin ekspresyon miktarlarındaki değişikliklerin ve bu proteinin aktivitesini ortadan kaldıran en sık nedenlerden olan Q462R mutasyonunun sırasıyla multipleks ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve "Single Strand Conformation Polymorfism" (SSCP) yöntemleriyle araştırılması planlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

*Örnekler:* Çalışmaya, hastanemiz Kulak Burun Boğaz (KKB) kliniğince izlenen ve kronik lenfoid hiperplazi tanısı ile tonsillektomi yapılan 54 hastadan altısının tonsil dokuları dahil edildi. Daha önceki çalışmamızda, bu hastaların tonsil ve

adenoidlerinden DNA ürünleri elde edilmiş ve PCR yöntemi ile HSV-1, EBV ve HHV-6 nükleik asitlerinin varlığı araştırılmıştı. Bu çalışmada, her üç virus DNA'sını da içeren 39 numaralı tonsil dokusu, bu virüslerden en az birisinin DNA'sını içeren 10 ve 51 numaralı tonsil dokuları ve Bu virüslerden hiçbirisinin DNA'sının saptanmadığı 1, 11 ve 15 numaralı tonsil dokuları kullanıldı.

*RNaz-L Primerlerinin Tasarım ve Seçimi:* RNaz-L primerleri, GenBank erişim BC115697 no'lu cDNA sekansları ve AL138776 no'lu genomik DNA dizilimleri kullanılarak, multipleks PCR'da internal kontrol büyüklüğü göz önüne alınarak seçildi (Tablo I). İnternal kontrol G3PDH primerleri ile elde edilen PCR ürünü 1kb büyüklüğünde olup, daha önceki çalışmalarda belirlenmiş dizilimleri kullanıldı.

**Tablo I: Çalışmada Kullanılan Primerler, Dizilimleri, Beklenen PCR Ürün Uzunlukları ve Kullanım Amaçları**

| Primer Adı     | Dizilimi                 | Beklenen PCR Ürün Uzunluğu | Kullanım Amacı                          |
|----------------|--------------------------|----------------------------|-----------------------------------------|
| RNase L-368F   | GTGGAAGTCTGCTTCGTCATG    |                            | RNaz-L ekspresyon analizi               |
| RNase L-761R   | CTCCACATCACTATCGTCAG     | 399bp                      | RNaz-L ekspresyon analizi               |
| RNase L-1374-F | AGCCGAGAGAACAGTCACTTG    |                            | cDNA R462Q mutasyon analizi             |
| RNase L-1908-R | CATTCCGAAGCG TCCTATAG    | 534bp                      | cDNA R462Q mutasyon analizi             |
| RNase L-1374-F | AGCCGAGAGAACAGTCACTTG    |                            | Genomik DNA R462Q mutasyon SSCP analizi |
| RNase L-4160R  | AGGCCTTCTCTCTGCAATG      | 339bp                      | Genomik DNA R462Q mutasyon SSCP analizi |
| G3PDH-F        | TGAAGGTCGGAGTCAACGATTGG  |                            | İnternal kontrol                        |
| G3PDH-R        | CATGTCGGCCATGAGGTCCACCAC | 1000bp                     | İnternal kontrol                        |

*Genomik DNA Ekstraksiyonu:* Tonsil DNA ekstraksiyonu QIAamp DNA Mini Kit Qiagen (Qiagen Inc. Valencia, CA 91355) kullanılarak yapıldı ve agaroz jelde yürütülerek DNA saflığı ve sağlamlığı izlendi.

*RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi:* Toplam RNA ekstraksiyonu Trizol (Invitrogen, Life Technologies, USA) kullanılarak yapıldı. Tonsil dokuları küçük parçalara bölündükten sonra Trizol ile homojenize edildi, kloroform ile karıştırıldıktan sonra izopropanol ile çöktürülüp %70'lik etanol ile iki defa yıkandı. Daha sonra 50µl RNaz içermeyen bidistile suda (ddH<sub>2</sub>O) çözüldü. RNA hazırlanması esnasında RNaz kontaminasyonuna dikkat edildi. Elde edilen RNA miktarları spektrofotometre ile ölçüldü. cDNA sentezi için, içerisinde 1µg RNA bulunan tüplerin içine oligo dT, ters transkriptaz (RT) enzimi, tampon (buffer) ve dNTP eklenerek toplam 20µl karışım içerisinde 45°C'de 1 saat bekletildi. cDNA sentezinin kontrolü, G3PDH geninin cDNA'sına karşı hazırlanmış primerler kullanılarak test edildi.

*Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR):* PCR karışımı, 5µl PCR tampon, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, tüm nükleotidler (her biri 100µM konsantrasyonda olmak üzere) (Fermentas–Life Science Technologies, Lithuania), her bir primer (0.5µM konsantrasyonunda) ve 2.5Ü Taq DNA polimeraz enzimi (Fermentas– Life Science Technologies, Lithuania) olmak üzere toplam hacim 50µl olacak şekilde, ddH<sub>2</sub>O eklenerek steril 0.2 ml PCR tüplerinde hazırlandı. PCR döngüsü; 94°C’de 2 dk denatürasyon sonrasında, 94°C’de 1 dk, 60°C’de 1 dk ve 72°C’de 1 dk olacak şekilde belirlenerek ısı döngü sisteminde (BioRAD Thermal Cycler) gerçekleştirildi. Uzama fazının tamamlanması için PCR reaksiyonu 10 dk 72°C’de bekletildi ve ürünler jel elektroforezinde yürütülerek analiz edildi.

*Rölatif Multipleks RT–PCR (M–PCR):* Öncelikle, RNaz–L cDNA ekspresyonunun PCR reaksiyonundaki eksponensiyal fazı tespit edildi. Bu amaçla hazırlanan ve içerisinde RNaz–L primerleri ve tonsil dokusundan elde edilen cDNA bulunduran “master” karışımlar vorteksle karıştırıldıktan sonra 50µl’lik toplam hacimler içerisinde üç PCR tüpüne dağıtıldı ve yukarıda belirtilen PCR reaksiyon şartlarında PCR döngüleri başlatıldı. 30., 35. ve 40. PCR döngülerinin birleşme (annealing) fazlarında bir tüp alındı. Tüplerdeki PCR örnekleri eşit hacimlerde agaroz jelde yürütülerek RNaz–L geninin eksponensiyal fazı tespit edildi. İnternal kontrol G3PDH gen ekspresyonunun hücrede çok olacağı göz önüne alınarak 0.5 uM ve 10 katı dilüsyonları şeklinde seyreltilen G3PDH primerlerinin içerisinde eşit miktarda RNaz–L primerleri (0.5uM) bulunduran PCR tüplerinde karıştırılarak yukarıda belirlediğimiz PCR döngü sayısı kadar M–PCR işlemi yapıldı. PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek RNaz–L ve G3PDH genlerini mümkün olduğunca eşit oranda gösteren G3PDH primer konsantrasyonları tespit edildi ve diğer örneklerle kıyaslamada bu primer konsantrasyon miktarları ve PCR döngü sayısı sabit tutularak PCR işlemleri yapıldı.

*“Single Strand Conformation Polymorphism” (SSCP) analizi:* SSCP jeli, dikey elektroforez sisteminde, 10ml ddH<sub>2</sub>O, 8.3ml Bis–Sep (5.8g acrylamide ve 0.2g bisacrylamide 20mL ddH<sub>2</sub>O içerisinde çözülerek hazırlandı), 2.2ml jel tamponu (4.36g Tris 100mL ddH<sub>2</sub>O içerisinde çözülerek hazırlandı, pH: 8.4), 60uL APS (%1’lik solüsyonu), 40ul TEMED kullanılarak hazırlandı. SSCP için DNA örnekleri denatürasyon solüsyonu (%99 formamide, %1 xylene cyanol) ile 1:1 oranında karıştırıldı ve önce 5 dk 95°C’de, daha sonra 5 dk buz içerisinde bekletildi. Polimerize olmuş jel kuyucuklarına yüklenerek 200V’da 2–3 saat yürütüldü ve jel gümüş boyama yöntemi ile boyanarak görüntülendi.

SSCP analizinin doğrulanmasında, elimizde bulunmadığı için mutant (R462Q) dizi içeren kontrol kullanılamadı. Buna karşın SSCP testinin mutantları ayırt etmedeki duyarlılığının saptanmasında; elimizde bulunan ve myeloperoksidaz geninde 463G/A heterozigositesi olan mutantlar ile normal gen 320 bp PCR ürünleri SSCP ile analiz edildi.

*Virus İçeren Örneklerin (no: 10, 39, 51) RNaz–L Q462R Bölgesini İçeren cDNA’larının pBSK Vektör İçerisine Klonlanması:* cDNA kütüphanesi kullanılarak, Q462R bölgesine özgül primerler ile yapılan PCR sonucu elde edilen RNaz–L cDNA ürünleri, pBSK–T vektörü (Invitrogen, USA) içerisine T4 ligasyon enzimi (Fermentas Life Science Technologies, Lithuania) kullanılarak klonlandı ve dizileme işlemi yapıldı.

**DNA Dizi Analizi:** Bu işlem, BigDye Terminator (PE Applied Biosystems) dizi analiz kiti kimyasalları kullanılarak, otomatik DNA Sequencer ABI 377 (Applied Biosystems) sisteminde yapıldı.

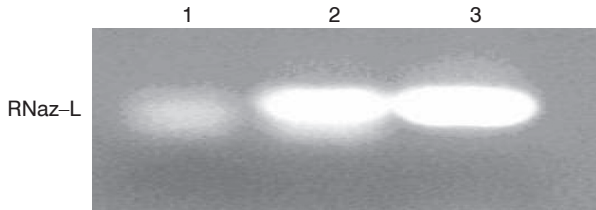
## BULGULAR

**Virus DNA'sı Bulunduran ve Bulundurmayan Tonsil Dokularının Tanımlanması:** Tonsil dokularında viral DNA'ların tanımlanması, her bir virusa özgül primerler kullanılarak PCR yöntemi ile yapılmış ve pozitif olan ve olmayan tonsil örnekleri belirlenmiştir (Tablo II). PCR ürünleri restriksiyon enzimleriyle kesilerek PCR ürünlerinin virus DNA'larına ait olduğu doğrulanmıştır.

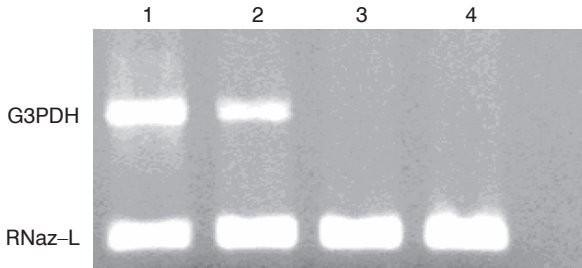
**Tablo II: Tonsil Örneklerinde Viral DNA-PCR Pozitifliği**

| Tonsil No. | HSV-1 | EBV | HHV-6 |
|------------|-------|-----|-------|
| 1          | –     | –   | –     |
| 10         | –     | +   | –     |
| 11         | –     | –   | –     |
| 15         | –     | –   | –     |
| 39         | +     | +   | +     |
| 51         | +     | +   | –     |

**M-PCR Yönteminin Değerlendirilmesi:** Şekil 1'de RNaz-L gen ekspresyonunun PCR yöntemi ile ekspanensiyal faz tespiti gösterilmiştir. 30., 35. ve 40. PCR döngülerinden elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde yürütülmüş ve 34. PCR döngüsü RNaz-L için uygun ekspanensiyal faz olarak belirlenmiştir. PCR döngüsünde kullanılacak internal kontrol primer konsantrasyonunun araştırılması sonunda; seyreltilmeden yapılan PCR reaksiyonunda RNaz-L ve G3PDH'a ait bantların yoğunlukları birbirine en yakın olduğundan, G3PDH primerleri 0.5 uM konsantrasyonda kullanılmıştır. Şekil 2'de internal kontrol primerlerinin 0.5µM ve 10x, 100x, ve 200x seyreltilmeleriyle yapılmış M-PCR reaksiyonu görülmektedir.



**Şekil 1:**  
RNaz-L gen ekspresyonunun ekspanensiyal fazdaki PCR döngü sayısının tesbiti.  
1. Otuzuncu,  
2. Otuzbeşinci,  
3. Kırkinci PCR döngülerindeki ürünlerin görüntüsü.



**Şekil 2:**  
G3PDH primer konsantrasyon tayini [RNaz-L primerleri sabit tutularak (0.2uM)  
1. 0.2uM  
2. 0.2uM<sup>-1</sup>  
3. 0.2uM<sup>-2</sup>  
4. 0.2uM<sup>-3</sup>  
konsantrasyonlarda G3PDH primerleri ile hazırlanan M-PCR].

*Belirlenen PCR Döngü Sayısı ve G3PDH Konsantrasyonlarındaki RNaz-L Ekspresyon Analizi:* Tonsil dokularından cDNA'ları elde edildikten sonra belirlenen PCR şartlarında ve primer konsantrasyonlarında M-PCR tamamlanmıştır. Resim 3'de dokulardaki RNaz-L ekspresyonu ve internal kontrol G3PDH ile oranları görülmektedir. M-PCR çalışması üç kez tekrar edilip elde edilen yoğunluk ortalaması alınarak tonsil dokularındaki RNaz-L ekspresyonu grafik olarak gösterilmiştir. Şekil 3 ve Grafik 1'de görüldüğü gibi dokulardaki RNaz-L ekspresyon miktarlarında anlamlı bir farklılık saptanamamıştır.

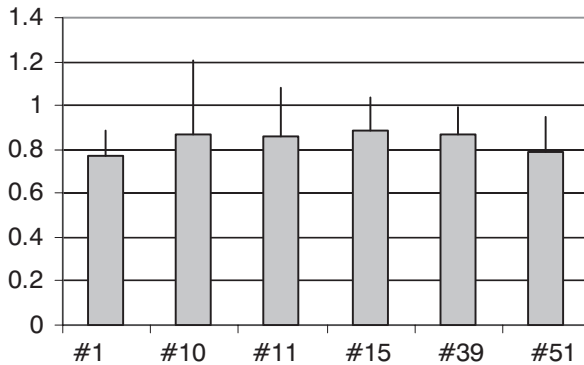
*SSCP Analizinin Duyarlılığı:* SSCP analizi, myeloperoksidaz gen mutasyonunu tespit etmek suretiyle mutant ve normal genleri ayırt edebilmiştir (Şekil 4).

*SSCP Analizi Sonuçları:* Tonsil örneklerine ait genomik DNA'ların Q462R mutasyon bölgesini içerecek şekilde tasarlanan primerlerle yaptığımız PCR sonucu, elde edilen ürünler SSCP analizine tabii tutulmuş ve DNA parçaları arasında bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 5).

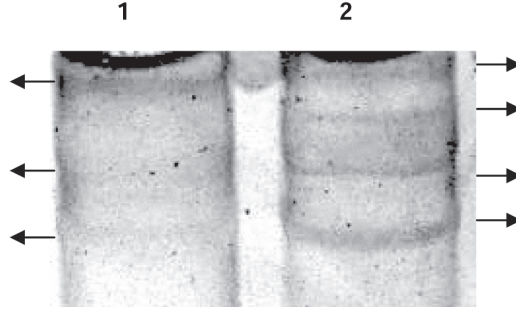
*Örneklerden Elde Edilen Kısmi (Parsiyel) cDNA'ların Dizi Analizi:* SSCP analizini doğrulamak amacı ile Q462R mutasyon bölgesini içerecek şekilde cDNA kütüphanesinden elde ettiğimiz PCR ürünleri, pBSK-T vektörü içerisine klonlandıktan sonra dizi analizleri yapılmış ve BLAST programı ile mutasyon varlığı araştırılmıştır. Örneklerden elde edilen dizilerde özellikle Q462R bölgesi ve klonan cDNA diziliminde mutasyona rastlanmamıştır (Resim 6).



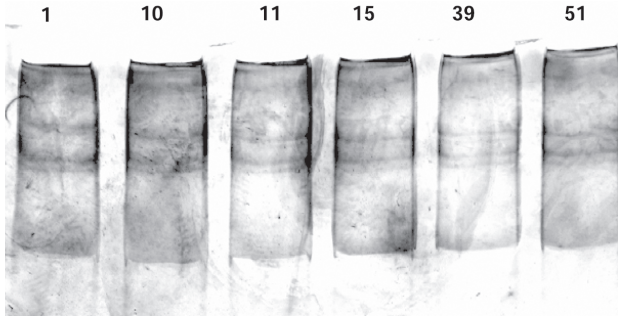
**Şekil 3:** RNaz-L ve G3PDH primerleri ile yapılan M-PCR.



**Grafik 1:** PCR bantları dansite ölçüm oranları (M-PCR üç kez tekrarlanmış ve ortalamalarına göre grafik yapılmıştır).



**Şekil 4:** SSCP analizi ile myeloperoksidaz gen mutasyonunun tespiti [1: Myeloperoksidaz normal geni (3 bant), 2: Myeloperoksidaz 463G/A heterozigot mutant (4 bant)].



**Şekil 5:** Genomik DNA kullanılarak, RNaz-L 1374-F ve RNaz-L 4160R primerleri ile elde edilen, Q462R mutasyon bölgesini içeren PCR ürünlerinin SSCP analizi.

```

1330 1340 1350 1360 1370 1380
RNase
LcDNA CTGGAAGCGTGTTTGGATGTGCACAGAGGGGAAGATGTGGAAGATGAATTT
.....
#39 CTGGAAGCGTGTTTGGATGTGCACAGAGGGGAAGATGTGGAAGATGAATTT
70 80 90 100 110 120

1390 1400 1410 1420 1430 1440
RNase
LcDNA GCCCGAAATGTCCTGTTATCTATATTTAAGGCTGTTCAAGAACTACACTTGTCTGTGGA
.....
#39 GCCCGAAATGTCCTGTTATCTATATTTAAGGCTGTTCAAGAACTACACTTGTCTGTGGA
130 140 150 160 170 180

1450 1460 1470 1480 1490 1500
RNase
LcDNA TACACCCACCAGGATCTGCAACCACAAAACATCTTAATAGATTCTAAGAAAGCTGCTCAC
.....
#39 TACACCCACCAGGATCTGCAACCACAAAACATCTTAATAGATTCTAAGAAAGCTGCTCAC
190 200 210 220 230 240

```

**Şekil 6:** Q462R mutasyon bölgesini içeren RNaz-L cDNA dizilimi (PubMed) ile 39 no'lu tonsilden elde edilen RNaz-L cDNA diziliminin "alignment" programı ile kıyaslanması (Koyu olarak basılan G nükleotidi mutasyon bölgesini göstermektedir).

## TARTIŞMA

Ribonükleaz L (RNaz-L) proteini, hücrenin viruslara karşı kendisini korumasında önemli bir faktör olarak bilinmektedir<sup>2,3</sup>. Yapılan çalışmalarda, RNaz-L genindeki Q462R mutasyonunun bu proteinin aktivitesini büyük ölçüde ortadan kaldırdığı ve bu mutasyonu bulunduran hücrelerin virus enfeksiyonlarına ve kansere yatkın oldukları belirtilmiştir<sup>8-11</sup>. Örneğin Xiang ve arkadaşları<sup>12</sup>, RNaz-L ile pankreas ve prostat kanseri gibi bazı kanser türleri arasındaki ilişkiyi göstermişlerdir.

RNaz-L tümör baskılayıcı gen olarak tarif edilmiş ve hücrenin proliferasyonu ile ilgili olduğu belirtilmiştir. RNaz-L'nin virus enfeksiyonlarındaki rolünün ortaya konması ve kanser ile ilişkisinin vurgulanması, mikrobiyolojide önem kazanmaya başlayan virus-kanser etkileşiminde bu proteinin önemini artırmaktadır<sup>11,13</sup>. RNaz-L'nin viral enfeksiyonlara karşı konak hücre savunmasında rol aldığının belirtilmesine rağmen, özel bir dokuda virus enfeksiyonlarına karşı genel bir koruyuculuk rolü ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, tonsillektomi sonrası tonsil dokularında herpes grubu bazı viruslara ait nükleik asit varlığını araştırdığımız önceki bir çalışmamızda, hastalardan birinin tonsil dokusunda HSV-1, EBV ve HHV-6 varlığının saptanması, bizi bu dokularda RNaz-L ekspresyonu ve mutasyon analizlerinin araştırılması ve sonuçların bu virusların saptanmadığı dokularla karşılaştırılması yönünde teşvik etmiştir. Bildiğimiz kadarıyla bu konu ilk kez çalışılmıştır.

Çalışmamızda, RNaz-L geninin Q462R mutasyonu "Single Strand Conformation Polymorfizm" (SSCP) yöntemi ile araştırılmıştır<sup>10</sup>. SSCP sonuçlarını doğrulamak amacıyla, mutasyon bölgesini de içeren RNaz-L cDNA'larının, pBSK vektörü içerisine klonladıktan sonra dizi analizi yapılmıştır. Çalışmamızın sonunda, HSV-1, EBV ve HHV-6 enfekte olan ve olmayan tonsil dokularındaki RNaz-L gen ekspresyonlarında anlamlı bir değişiklik saptanamamış ve mutasyon analizi sonucunda RNaz-L geni üzerinde araştırılan bölge içerisinde bir mutasyona rastlanmamıştır.

Urisman ve arkadaşları<sup>8</sup>, RNaz-L proteinin daha çok mutasyonlar, özellikle homozigot mutasyonlar sonucu inaktif olmasını, hücrelerde kanser ve enfeksiyonlar ile ilişkilendirmektedirler. Gen ekspresyonundaki değişiklikler daha öncede belirttiğimiz gibi konağın savunmasında önemlidir. Bir diğer önemli nokta, virusun konak hücre içerisinde bulunması neticesinde, konak proteinlerinin ekspresyonlarında epigenetik değişikliklerin ortaya çıkabilmesidir. Dolayısıyla RNaz-L gen ekspresyonunda bir değişikliğin belirlenmemesi, RNaz-L proteininin aktivitesi hakkında bir bilgi vermemektedir. Bu nedenle çalışmamızda, RNaz-L inaktivasyonunun en önemli ve en sık rastlanan nedeni olan Q462R mutasyonu, SSCP ve direk dizi analizleri ile araştırılmış ancak mutasyon tespit edilememiştir. Sobol ve Mossman'ın<sup>14</sup> çalışmasında, RNaz-L'nin içinde bulunduğu yolakta rol alan ve yine ekspresyonu interferonlar tarafından kontrol edilen çift iplikli RNA'ya bağımlı protein kinazın HSV-1'e karşı savunmada rolü olduğu belirtilmektedir. Sonuç olarak, tonsil doku hücrelerinin viruslara karşı savunmasında RNaz-L proteininin tek başına etkili olmadığı ve protein kinazlar ya da diğer başka faktörlerin rolü olabileceği kanısına varılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Kerr IM, Brown RE. pppA2'p5'A2'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 256–60.
2. Zhou A, Paranjape JM, Hassel BA, et al. Impact of RNase L overexpression on viral and cellular growth and death. *J Interferon Cytokine Res* 1998; 18: 953–61.
3. Zhou A, Paranjape J, Brown TL, et al. Interferon action and apoptosis are defective in mice devoid of 2',5'-oligoadenylate-dependent RNase L. *Embo J* 1997; 16: 6355–63.
4. Castelli JC, Hassel BA, Wood KA, et al. A study of the interferon antiviral mechanism: apoptosis activation by the 2–5A system. *J Exp Med* 1997; 186:967–72.
5. Zhou A, Hassel BA, Silverman RH. Expression cloning of 2–5A-dependent RNAase: a uniquely regulated mediator of interferon action. *Cell* 1993; 72: 753–65.
6. Floyd-Smith G, Slattery E, Lengyel P. Interferon action: RNA cleavage pattern of a (2'–5') oligoadenylate—dependent endonuclease. *Science* 1981; 212: 1030–2.
7. Dong B, Silverman RH. 2–5A-dependent RNase molecules dimerize during activation by 2–5A. *J Biol Chem* 1995; 270: 4133–7.
8. Urisman A, Molinaro RJ, Fischer N, et al. Identification of a novel gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL Variant. *PLoS Pathog* 2006; 2: e25.
9. Casey G, Neville PJ, Plummer SJ, et al. RNASEL Arg462Gln variant is implicated in up to 13 percent of prostate cancer cases. *Nat Genet* 2002; 32: 581–3.
10. Carpten J, Nupponen N, Isaacs S, et al. Germline mutations in the ribonuclease L gene in families showing linkage with HPC1. *Nat Genet* 2002; 30: 181–4.
11. Smith JA, Schmechel SC, Williams BR, Silverman RH, Schiff LA. Involvement of the interferon-regulated antiviral proteins PKR and RNase L in reovirus-induced shutoff of cellular translation. *J Virol* 2005; 79: 2240–50.
12. Xiang Y, Wang Z, Murakami J, et al. Effects of RNase L mutations associated with prostate cancer on apoptosis induced by 2',5'-oligoadenylates. *Cancer Res* 2003; 63: 6795–801.
13. Flodstrom-Tullberg M, Hultcrantz M, Stotland A, et al. RNase L and double-stranded RNA-dependent protein kinase exert complementary roles in islet cell defense during coxsackievirus infection. *J Immunol* 2005;174: 1171–7.
14. Sobol PT, Mossman KL. ICP0 prevents RNase L-independent rRNA cleavage in herpes simplex virus type 1-infected cells. *J Virol* 2006; 80: 218–25.