

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

REKOMBİNANT *Geobacillus kaustophilus*
LON PROTEİNİNİN *E. coli*'den
SAFLAŞTIRMASI VE NİTELENDİRİLMESİ

Hatice Zişan ASAL
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE

2011

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

REKOMBİNANT *Geobacillus kaustophilus*
LON PROTEİNİNİN *E. coli*'den
SAFLAŞTIRMASI VE NİTELENDİRİLMESİ

Hatice Zişan ASAL
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. F. İnci ÖZDEMİR

GEBZE

2011



**GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ
ENSTİTÜSÜ**

**MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
JÜRİ ONAY FORMU**

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
tarih ve sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından tarihinde tez
savunma sınavı yapılan'ın tez çalışması
..... Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak
kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE (TEZ DANIŞMANI) : Yrd. Doç. Dr. F. İnci ÖZDEMİR

ÜYE : Doç. Dr. Sedef TUNCA GEDİK

ÜYE : Yrd. Doç. Dr. Ali TÜRKAN

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../20... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

TEZ BAŞLIĞI: REKOMBİNANT *Geobacillus kaustophilus* LON PROTEİNİNİN *E. coli*'DEN SAFLAŞTIRMASI VE NİTELENDİRİLMESİ
YAZAR ADI: HATİCE ZİŞAN ASAL

Hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerde protein yıkımı büyük oranda ATP-bağımlı proteazlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Lon proteaz bütün canlı organizmalarda bulunan yegane ATP-bağımlı proteazdır ve birçok hücre içi kontrol noktasında önemli rol oynamaktadır. Bununla beraber Lon proteazın proteolitik aktivitesi ve çeşitli substratları nasıl tanıyabildiği hala tam olarak açık değildir. Farklı organizmalardan yeni Lon proteazların izole edilmesi ve bu enzimlerin biyokimyasal ve genetik nitelendirilmelerinin yapılması, hem bu özgün proteaz sisteminin hücre içinde oynadığı biyolojik rolün, hem de protein hidroliz mekanizmasının anlaşılmasına yarar sağlayacaktır. Bu çalışmada *G. kaustophilus*'a ait *lon* geni pET-28a(+) vektörüne altklonlama ile aktarılmıştır. Gk-Lon proteaz, N-terminal bölgesine 6xHis kuyruk ekli şekilde *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildikten sonra, Ni-NTA IMAC yöntemi ile saflaştırılmış ve biyokimyasal nitelendirilmesi gerçekleştirilmiştir. 6xHis eklentili Gk-Lon proteazın moleküler büyüklüğü SDS-PAGE'de yaklaşık 103 kDa olarak belirlenmiştir. Gk-Lon bir kimotripsin benzeri serin proteaz substratı olan Glt-Ala-Ala-Phe-MNA'yı etkin bir şekilde hidrolize etmiştir, ancak treonin proteaz substratını yıkıma uğratamamıştır. Gk-Lon ATP-bağımlı bir proteazdır, ancak ATP yokluğunda da peptit hidrolizi gerçekleştirebilmiştir. Gk-Lon peptidaz aktivitesi için Mg^{2+} 'a ihtiyaç duymaktadır, peptidaz aktivitesinin maksimum seviyede olabilmesi için ise, hem ATP hem de Mg^{2+} 'un bir arada olması gerekmiştir. ADP enzimin peptidaz aktivitesini inhibe etmiştir. Gk-Lon peptidaz aktivitesi için optimum sıcaklık 55°C ve optimum pH 8.5 olarak belirlenmiştir. Gk-Lon peptidaz aktivitesi PMSF ve laktasistin ile inhibe olmuştur. Gk-Lon proteaz bir protein substrat olan α -kazeini ATP-bağımlı ve bağımsız olarak hidroliz etmiştir. Gk-Lon ATPaz aktivitesi de göstermektedir. Protein yıkımı Gk-Lon ATPaz aktivitesini arttırırken, tetrapeptitler aktivitenin azalmasına sebep olmuştur. Mg^{2+} 'un, α -kazein proteininin ve artan ATP konsantrasyonunun ATPaz aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir.

SUMMARY

TITLE OF THESIS: PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT *Geobacillus kaustophilus* LON PROTEIN FROM *E. coli*

AUTHOR: HATİCE ZİŞAN ASAL

Both in prokaryotic and eukaryotic cells, protein degradation is carried out by ATP dependent proteases. Lon protease is a unique ATP-dependent protease found in all living organisms and plays important role in many control mechanisms in the cells. However proteolytic activity and substrate recognition of Lon protease is still unclear. Isolation of new Lon proteases from different organisms and their biochemical and genetic characterization will provide to understand biological role of this specific protease system and protein hydrolysis mechanism in the cells. In this study, *lon* gene from *G. kaustophilus* was subcloned into pET-28a(+) expression vector. Gk-Lon protease with N-terminal 6xHis-tag was overexpressed in *E. coli* BL21(DE3) cells, then purified by Ni-NTA IMAC method and biochemically characterized. Molecular weight of the 6xHis-tagged Gk-Lon protease was determined by SDS-PAGE as ~103 kDa. Gk-Lon protease efficiently hydrolyzed Glt-Ala-Ala-Phe-MNA, a substrate of trypsin-like serine proteases; however substrate of threonin proteases was not hydrolyzed. Gk-Lon protease is an ATP-dependent protease, but also peptidase activity was observed in the absence of ATP. Gk-Lon protease requires Mg^{2+} cation for peptidase activity but maximum enzyme activity requires presence of both ATP and Mg^{2+} . Gk-Lon peptidase activity was inhibited by ADP. Optimum temperature for Lon protease activity was observed at 55°C and optimal pH determined at 8.5. Gk-Lon peptidase activity was inhibited by PMSF and lactacystin. Gk-Lon protease degraded α -casein, as a protein substrate, ATP-dependent and independent manner. Gk-Lon also showed ATPase activity. Gk-Lon ATPase activity was stimulated by protein substrates, but not tetrapeptides. Mg^{2+} , α -casein protein and increasing amounts of ATP concentrations stimulated ATPase activity of Gk-Lon.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana danışmanlık yapan, hiçbir zaman desteğini ve anlayışını esirgemeyen, değerli bilgi ve görüşlerini benimle paylaşan sevgili hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. F. İnci Özdemir'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvarında çalışırken her zaman desteğini ve güler yüzünü gördüğüm Arş. Gör. Tuğrul Doruk'a, omuz omuza çalıştığımız canım arkadaşlarım Tuba Korkmaz, Zeynep Demir, Aybike Yedekçi ve Arş. Gör. Zeynep Girgin'e her zaman yanımda oldukları ve en olumsuz anlarda bile bana moral ve mutluluk verdikleri için sonsuz teşekkür ederim. Ablam gibi gördüğüm ve çok sevdiğim Özlem Asker'e desteği için çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımın tüm aşamasında bana olan yardımı, ilgisi, sabrı ve sevgisi için Ahmet Kılıç'a, yanımda olmasa da desteğini her zaman hissettiğim canım dostum Özde Çelik'e, her zaman arkamda olan ve bana güç veren ailem, annem Sare Ölke'ye ve kardeşim Çağrı Asal'a çok teşekkür ederim.

Beni her zaman güler yüzle karşılayan ve yardımcı olan çalışma arkadaşım Fulya Dursun'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim sırasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Sayın hocam Prof. Dr. Füsün Gümüsel'e ve laboratuvar çalışmalarım sırasında desteğini esirgememiş olan Sayın Doç. Dr. Sedef Tunca Gedik'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Proteoliz ve Proteazlar	1
1.2. ATP-Bağımlı Proteazlar	2
1.2.1. 26S Proteazom	6
1.2.2. ClpAP (Ti) Proteaz	9
1.2.3. HsLVU Proteaz	10
1.2.4. FtsH Proteaz	11
1.2.5. Lon Proteaz	13
1.2.5.1. Lon Proteazların Yapısal Özellikleri	15
1.2.5.2. Lon Proteazların Fizyolojik Özellikleri	18
1.2.5.3. Lon Proteazların Biyokimyasal Özellikleri	21
1.3. <i>Geobacillus kaustophilus</i>	23
1.4. Tez Çalışmasının Amacı	24
2. GEREÇ ve YÖNTEMLER	25
2.1. Gereçler	25

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar	25
2.1.2. Kullanılan Enzimler ve Tamponları	25
2.1.3. Kullanılan Kitler	26
2.1.4. Kullanılan DNA ve Protein Moleküler Belirteçleri	26
2.1.5. Kullanılan Peptit ve İnhibitörler	27
2.1.6. Kullanılan Nükleotitler	27
2.1.7. Kullanılan Proteinler	27
2.1.7. Kullanılan Plazmit Vektörler	27
2.1.7.1. pET-28a (+) Vektörü	27
2.1.8. Kullanılan Saflaştırma Materyali	29
2.1.9. Kullanılan Bakteri Soyları	30
2.1.10. Kullanılan Besiyeri ve Çözeltiler	31
2.1.11. Kullanılan Cihazlar	35
2.2. Yöntemler	36
2.2.1. <i>lon</i> geninin pGEX-6P-1/ <i>lon</i> Plazmitindeki Varlığının İspatlanması	36
2.2.2. pGEX-6P-1/ <i>lon</i> ve pET-28a(+) Plazmitlerinin İzolasyonu	36
2.2.3. Gk- <i>lon</i> Geninin pGEX-6P-1/ <i>lon</i> Ekspresyon Vektöründen Kesilerek Çıkartılması	37
2.2.4. pET-28a (+) Ekspresyon Vektörünün <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesilmesi	37
2.2.5. Gk- <i>lon</i> Geninin pET-28a (+) Vektörüne Aktarımı	38
2.2.6. Transformasyon ve Rekombinant Hücre Seçimi	38
2.2.7. <i>E. coli</i> BL21(DE3) Hücrelerinin pET-28a (+)/ <i>lon</i> ile Transforme Edilmesi	39

2.2.8. Lon Proteaz Ekspresyonu ve Hücre Özütlerinin Hazırlanması	40
2.2.9. Rekombinant 6xHis -Lon Proteininin Saflaştırılması	41
2.2.10. Lon'un Biyokimyasal Nitelendirilmesi	41
2.2.10.1. Gk Lon Peptidaz Aktivitesinin Tayini	41
2.2.10.2. ATP Konsantrasyonunun Gk-Lon Peptidaz Aktivitesine Etkisi	42
2.2.10.3. Gk-Lon Peptidaz Aktivitesi için Optimum Reaksiyon Süresinin Belirlenmesi	43
2.2.10.4. Substrat Konsantrasyonunun Gk-Lon Peptidaz Aktivitesine Etkisi	43
2.2.10.5. pH'nın Gk-Lon Peptidaz Aktivitesine Etkisi	43
2.2.10.6. Sıcaklığın Lon Peptidaz Aktivitesine Etkisi	44
2.2.10.7. Mg^{2+} 'nin Lon Peptidaz Aktivitesine Etkisi	44
2.2.10.8. Lon Tarafından Çeşitli Florojenik Peptidlerin Yıkımı	44
2.2.10.9. Çeşitli Proteaz İnhibitörlerinin Lon Peptidaz Aktivitesine Etkisi	44
2.2.10.10. Lon Tarafından Fluorescein Isothiocyanate (FITC)- Kazein Yıkımı	45
2.2.10.11. Lon Tarafından α -Kazein Yıkımı	45
2.2.10.12. Lon ATPaz Aktivitesinin Tesbiti	46
2.2.11. SDS- Poliakrilamid Jel Elektroföresi	46
2.2.12. BCA Yöntemi ile Protein Miktarı Tayini	47
3. BULGULAR	48
3.1. pGEX-6P-1/lon ve pET-28a (+) vektörlerinin <i>E. coli</i> BL21(DE3) Hücrelerinden İzolasyonu	48
3.2. Gk-lon Geninin pGEX-6P-1 Vektöründen Restriksiyon Endonükleazlar ile kesilerek çıkartılması ve pET-28a (+) Vektörüne Klonlanması	49

3.3. Transformasyon ve Rekombinant Koloni Seçimi	51
3.4. Lon Proteazın Ekspresyonu	52
3.5. Lon'un Saflaştırılması	53
3.6. <i>G. kaustophilus</i> Lon'un Biyokimyasal Nitelendirilmesi	55
3.6.1. Lon'un Peptidaz Aktivitesinin Tayini	55
3.6.2. ATP Konsantrasyonunun Gk-Lon Peptidaz Aktivitesine Etkisi	56
3.6.3. Lon Peptidaz Aktivitesi için Optimum Reaksiyon Süresinin Belirlenmesi	57
3.6.4. Substrat Konsantrasyonunun Lon Peptidaz Aktivitesine Etkisi	58
3.6.5. pH'nın Lon Peptidaz Aktivitesine Etkisi	59
3.6.6. Sıcaklığın Lon Peptidaz Aktivitesine Etkisi	60
3.6.7. Mg^{2+} 'nin Lon Peptidaz Aktivitesine Etkisi	61
3.6.8. Lon Tarafından Çeşitli Florojenik Peptitlerin Yıkımı	62
3.6.9. Çeşitli Proteaz İnhibitörlerinin Lon Peptidaz Aktivitesine Etkisi	63
3.6.10. Lon Tarafından FITC-kazein Yıkımı	65
3.6.11. Gk-Lon Tarafından α -Kazein Yıkımı	65
3.6.12. Gk-Lon ATPaz Aktivitesinin Belirlenmesi	66
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	69
5. KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ	93

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

~	Yaklaşık
AAA+	Çeşitli hücrel aktivitelere sahip ATPaz'lar
ADP	Adenozin difosfat
Ala	Alanin
APS	Amonyum persülfat
Arg	Arjinin
Asp	Aspartat
ATP	Amonyum persülfat
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H endonükleaz
Bç	Baz çifti
BSA	Bovin serum albumin
CBZ	Karboksibenzoksil
ClpA	Kazeinolitik Proteaz A
ClpP	Kazeinolitik Proteaz P
DMSO	Dimetilsülfoksit
DTT	Ditiyotritol
Ec	<i>Escherichia coli</i>
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i> endonükleaz I
EDTA	N,N,N',N',-Tetrametiletildienamin
EtBr	Etidyum Bromür
FITC	Florescein izosiyonat
FtSH	Flament oluşturuu sıcaklık hassas ATPaz
Gk	<i>Geobacillus kaustophilus</i>
Glt	Glutaril
Gly	Glisin
HCl	Hidroklorik asit
His	Histidin
HslU	Isı şoku bölgesi U
HslV	Isı şoku bölgesi V
IPTG	İzopropil-beta-D-tiyo-galaktopiranozid
K	Potasyum

Kan	Kanamisin
kDa	Kilodalton
L	Litre
LB	Luria Broth
Lon	Proteaz La
Lys	Lizin
M	Molar
Mg²⁺	Magnezyum katyonu
MgCl₂	Magnezyum klorür
MgSO₄	Magnezyum sülfat
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MNA	Metoksi-β-naftilamit
MOPS	3-(n-Mortofolino) Propan Sülfonik Asit
NaCl	Sodyum Klorür
ng	nanogram
nm	nanometre
NaOH	Sodyum Hidroksit
Ni	Ni
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
Phe	Fenilalanin
pmol	pikomol
PMSF	Fenilmetansülfanilflorit
RecA	Rekombinaz A
Rpm	Dakika başı dönüş
Sc	Saccharomyces cerevisiae
Ser	Serin
SDS	Sodyum dodesilsülfat salt
SOB	Süperoptimal Brot
SOC	Süperoptimal Brot (Katabolik Baskılama)
SSD	Substat ayırıcı ve algılayıcı domain
SulA	SOS hücre bölünmesi inhibitörü
Suc	Süksinil
TCA	Triklor asetik asit

TEMED	Tetrametiletildiamin
Thr	Treonin
TSS	Toplam katı solüsyonu
UmuC	DNA polimeraz V, altbirim C
UmuD	DNA polimeraz V, altbirim D
U	Unit
V	Volt
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μ	Mikron
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
σ	Sigma
σ^{32}	RNA polimeraz faktör sigma-3

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Heteromerik (ClpAP) ve homomerik (Lon) ATP-bağımlı proteazların ultra yapıları	5
1.2. ATP-bağımlı proteazların önerilen genel mekanizması	6
1.3. 26S proteazom şeması ve katalitik mekanizması	7
1.4. ClpAP proteazın protein susbstratı yıkım şeması	10
1.5. FtsH ATP-bağımlı proteazın şematik gösterimi	12
1.6: <i>E. coli</i> Lon proteazın kristal yapısı	13
1.7. Lon proteazın bir alt biriminin domain organizasyonu	15
1.9. <i>Geobacillus kaustophilus</i> 'un <i>Geobacillus</i> cinsinin diğer türlerine göre filogenetik yeri	23
2.1. Moleküler DNA ve Protein Belirteçleri	26
2.2. pET-28a(+) ekspresyon vektörünün haritası ve açık okuma çerçevesi	28
2.1. Enzim aktivite ölçümleri MNA/Substrat kalibrasyon eğrisi	42
3.1. pGEX-6P-1/ <i>lon</i> ve pET-28a(+) plazmitlerinin <i>Bam</i> HI ve <i>Xho</i> I restiksiyon enzimleri ile kesildikten sonraki %0.8'lik agaroz jel görüntüsü	48
3.2. <i>Bam</i> HI ve <i>Xho</i> I restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilen pGEX-6P-1/ <i>lon</i> plazmitinin %0.8'lik agaroz jel görüntüsü	49
3.3. Agaroz jelden kit ile saflaştırılan Gk- <i>lon</i> geni DNA fragmanının agaroz jel görüntüsü	50
3.4. pET-28a(+)/ <i>lon</i> rekombinant plazmitini taşıyan <i>E. coli</i> BL21(DE3) soyundan yapılan kit ile plazmit izolasyonunun agaroz jeldeki görüntüsü	51
3.5. pET-28a(+)/ <i>lon</i> taşıyan BL-21(DE3) hücrelerinin ve boş pET-28a(+) vektörü taşıyan BL-21(DE3) hücrelerinin IPTG ile uyarılmasıyla zamana göre değişen Lon ekspresyonu	52
3.6. Gk-Lon proteaz proteinin Ni-NTA afinite kromatografisi ile saflaştırılması	53

3.7. 6xHis-Lon proteinlerinin saflaştırılması	54
3.8. Lon proteazın ATP ve Mg^{2+} varlığında peptidaz aktivitesi	55
3.9. ADP'nin Gk-Lon aktivitesine etkisi	56
3.10. ATP konsantrasyonun Gk-Lon peptidaz aktivitesi üzerindeki etkisi	57
3.11. Gk-Lon peptidaz aktivitesinin zamana bağlı değişimi.	58
3.12. Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	59
3.13. pH'nın Gk-Lon peptidaz aktivitesine etkisi	60
3.14. Sıcaklığın Lon peptidaz aktivitesine etkisi	61
3.15. $MgCl_2$ konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	62
3.16. PMSF inhibitörünün Gk-Lon peptidaz aktivitesine etkisi	64
3.17. Laktasistin inhibitörünün Gk-Lon peptidaz aktivitesine etkisi	64
3.18. Gk-Lon tarafından ATP-bağımlı ve ATP-bağımsız FITC-kazein yıkımı	65
3.19. Gk-Lon tarafından α -kazein yıkım reaksiyonunun SDS-jel görüntüsü.	66
3.20. Gk-Lon ATPaz aktivitesine peptit substratın ve ATP konsantrasyonunun etkisi	67
3.21. ATP konsantrasyonunun Gk-Lon ATPaz aktivitesi üzerine etkisi	67
3.22. Gk-Lon ATPaz aktivitesine Mg^{2+} ve α -kazein etkisi	68

TABLÖLAR DİZİNİ**Tablo****Sayfa****2.1 Gk-Lon proteaz tarafından çeşitli floröjenik peptitlerin hidrolizi****63**

1. GİRİŞ

1.1. Proteoliz ve Proteazlar

Yaşayan tüm organizmalarda proteinler devamlı olarak yıkılmakta ve yeniden sentezlenmektedir. Hücrelerde meydana gelen protein yıkımı hemen hemen her fizyolojik fonksiyon için anahtar görevi üstlenmektedir. Hücrelerde önemli metabolik kontrol basamaklarında görevli proteinlerin seviyesi o proteinlerin yıkımı ile düzenlenmekte, böylece hücrelerin değişen çevre koşullarına ve metabolik ihtiyaçlara karşı hızlı cevap verebilmeleri sağlanmaktadır. Aynı zamanda protein yıkımı hücrenin besin yetersizliği durumunda proteinleri enerji ve besin kaynağı olarak kullanabilmesine olanak sağlamaktadır. Hücre içindeki protein yıkımının bir diğer önemli fonksiyonu ise, transkripsiyonel ya da translasyonel hatalardan kaynaklanan hatalı ve işlevi olmayan proteinlerin ortadan kaldırılmasıdır. Hayati önem taşıyan tüm bu fonksiyonlar proteaz adı verilen proteinlerle gerçekleşmektedir ve bu enzimler peptit bağlarının yıkımını katalizleyerek substrat proteinleri hidrolize etmektedirler.

Proteazlar temel olarak iki kritere göre sınıflandırılmaktadırlar. Bu kriterlerden birincisi etki ettikleri bölgedir ve buna göre proteazlar ekzopeptidaz ve endopeptidazlar olarak iki büyük gruba ayrılmaktadırlar. Ekzopeptidazlar proteinin amino ya da karboksil uçlarında bulunan peptit bağlarının hidrolizini katalizlemektedirler. Endopeptidazlar ise proteinlerin iç bölgelerinde bulunan peptit bağlarını hidroliz etmektedirler. Proteazların ikinci sınıflandırma kriteri ise aktif bölgelerinde bulunan fonksiyonel gruplarıdır. Buna göre proteazlar MEROPS peptidaz veri bankasına göre 5 gruba ayrılmaktadır, bunlar; serin proteazlar, sistein proteazlar, metallo proteazlar, aspartik ve treonin proteazlardır.

Peptit bağının hidrolizi ekzergonik bir süreçtir ve geleneksel proteazlar tarafından protein yıkımı sırasında enerji bakımından zengin kofaktörlere ihtiyaç duyulmamaktadır (Hlavacek ve Vachova, 2002). Ancak birçok organizmada geleneksel proteazlara ek olarak, bu sınıflandırmalara dahil olmayan, çok temel

hücrel fonksiyonlardan sorumlu ve fonksiyonu için ATP hidrolizine ihtiyaç duyan bir proteaz gurubu bulunmaktadı. ATP-bağımlı proteazlar adı verilen bu proteaz ailesi anormal ya da yanlış katlanmış proteinlerin ortadan kaldırılmasında görev almakta ve birçok düzenleyici hücrel süreçte kritik rol oynamaktadır. Hem prokaryotik hem de ökaryotik organizmalarda toplam protein popülasyonu sabit tutulurken, anormal proteinler çok hızlı şekilde yok edilmektedir (Goldberg, 1992). Yüksek sıcaklık, ozmotik ya da oksidatif stres gibi ekstrem koşullar anormal ya da işlevsiz proteinlerin birikmesine yol açmakta ve bu proteinler ATP-bağımlı proteazlar tarafından ortadan kaldırılmaktadırlar. ATP-bağımlı proteazlar çok çeşitli hücrel aktiviteden sorumlu ATPazları içinde bulunduran AAA+ protein ailesi (ATPases Associated with Diverse Cellular Activities) grubuna dahil olan enzimlerdir.

1.2. ATP-Bağımlı Proteazlar

ATP-bağımlı proteazlar hücrede normal olmayan hasarlı proteinlerin ve hücrel fonksiyonlardan önemli görevleri olan kısa-ömürlü proteinlerin yıkımından sorumlu enzimlerdir. Bu enzimler hücrede birçok farklı aktivite ile ilişkili olan "AAA⁺ Protein Ailesi" (ATPases Associated with Diverse Cellular Activities) grubunda bulunmaktadırlar (Baker ve Sauer, 2006). Proteinlerin yıkımı hücre homeostasisinin korunması için çok temel bir rol üstlenmektedir. Birçok organizmada hücre içi protein yıkımının büyük bir kısmı ATP-bağımlı proteazlar tarafından gerçekleştirilmektedir. ATP-bağımlı proteazların birincil fonksiyonu hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerde hatalı transkripsiyon ya da translasyon, kimyasal fonksiyon bozukluğu, yanlış katlanma ya da ısı denatürasyonu sonucu meydana gelen hasarlı proteinlerin hızlı bir şekilde ortadan kaldırılmasını sağlamaktır (Goldberg, 1992, Gottesman, 1996). ATP-bağımlı proteazların bir diğer önemli fonksiyonu ise kısa ömürlü düzenleyici proteinlerin yıkımını sağlayarak transkripsiyon faktörlerinin aktivitesinin düzenlenmesi, hücre döngüsü, antijen tanınması, bakteriyofaj λ litik döngüsü, apoptoz gibi bir çok hücrel faaliyetin düzenlenmesidir (Starkova ve ark., 2000).

ATP-bağımlı proteazların içinde bulunduğu AAA⁺ protein ailesi (ATPases associated with various cellular activities) çok çeşitli hücrel aktiviter ile ilgili ATP'azları içeren büyük bir protein gurubudur. AAA⁺ proteinlerinin belirgin özelliği sahip oldukları ATP bağlayıcı domainidir. 200-250 amino asitlik ATP-bağlayıcı domain (AAA⁺ domain) oldukça korunmuş Walker A (P-loop) ve Walker B motiflerini içermektedir (Hanson ve Whiteheart, 2005). Bu domain aynı zamanda korunmuş ATPaz domaini (Conserved ATPase Domain; CAD) olarak da adlandırılmaktadır (Laksanalmai ve ark., 2004). Bu proteinlerin bir diğer belirgin özelliği ise C-terminalde bulunan substrat algılayıcı ve ayırıcı domain (Substrate sensor and discrimination, SSD)'dir. SSD nükleotitte bulunan γ -fosfatı algılayarak nükleotit hidrolizini katalizleyen rezidüler bulundurmaktadır (Smith ve ark., 1999).

Korunmuş diziler kullanılarak yapılan genomik veri taramaları AAA⁺ proteinlerin tüm organizma alemlerinde bulunduğunu göstermektedir (Hanson ve Whiteheart, 2005). Bu proteinlerin çok sayıda hücrel fonksiyonla ilişkili olduğu belirlenmiştir. AAA⁺ proteinleri protein yıkımı, DNA replikasyonu, protein katlanması gibi ortak fonksiyonların yanında, evrimsel olarak organizmaya özgü çok sayıda fonksiyondan da sorumlu olmaktadır. Bakteriler, mantarlar ve bitkilerde ısıya dayanıklılık, ökaryotlarda membran füzyonu ve mikrotübül hareketleri AAA⁺ proteinlerinin görev aldığı hücrel süreçlere örnek olarak verilebilir.

AAA⁺ proteinlerinin hepsinde ATPaz birimi (AAA⁺ domain) ve SSD ortak olarak bulunmaktadır. ATPaz birimi korunmuş Walker A ve Walker B motiflerini içermektedir. Walker A motifi Gly-(X)₄ - Gly-Lys-Thr dizisi şeklinde tanımlanırken, Walker B motifi ise (ϕ)₄-Asp-Glu-(X)₂ dizisi (ϕ : hidrofobik aminoasit, X: herhangi bir aminoasit) şeklinde tanımlanmaktadır (Walker ve ark., 1982). AAA⁺ domaini iki önemli alt domain içermektedir; bunlardan biri N-terminal α/β rossman katlanması, diğeri ise C-terminal α -helikal alt domainidir.

ATP-bağımlı proteazlarda protein yıkımı için ATP hidrolizi gerekmektedir ve bu proteinlerde bulunan Walker tipi motiflerin nükleotit bağlanması ve ATP hidrolizi ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Neuwald ve ark., 1999). SSD bölgesinin ise ATP hidrolizinde görevli olduğu bilinmektedir ve bu domainin bir diğer görevinin ise

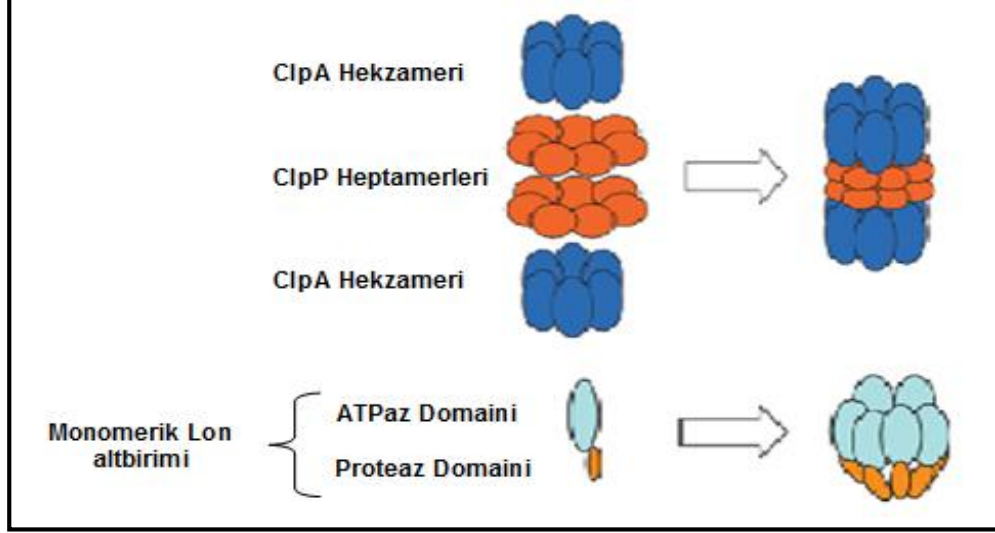
substratlar ile ilişki kurmak olduğu belirtilmiştir (Smith ve ark., 1999). ATPaz birimi SSD domain aracılığı ile protein substratındaki özgül tanıma peptit dizisi ile etkileşim kurmaktadır. Örneğin substrattaki ssrA dizisi FtsH ve Clp proteazlar için tanıma kuyruğudur ve bu dizi SSD bölgesi ile ilişki kurmaktadır (Herman ve ark., 1998, Lee ve ark., 2001).

ATP-bağımlı proteazlar bakteriler, arkealar ve ökaryotlar arasında oldukça yaygındır. Prokaryotlarda bulunan ATP-bağımlı proteazlar, Lon (Goff ve ark., 1984), HslVU (ClpYQ) (Rohrwild ve ark., 1997), FtsH (Tomoyosu ve ark., 1990a), ClpAP/ClpXP (Katayama-Fujimura ve ark., 1987) proteazlardır. 26S proteozom ise ökaryotlarda bulunan bir ATP-bağımlı proteazdır ve hücre içinde temel protein yıkımından sorumlu komplekstir (Pickart ve Cohen, 2004). Ayrıca ökaryotik hücre sitoplazma, mitokondri ve kloroplastlarında prokaryotik ATP-bağımlı proteazların homologları bulunmaktadır (Wang ve ark., 1993, Goldberg, 1990).

ATP-bağımlı proteazlar oligomerik (birden fazla alt birimden oluşan) enzimlerdir. 6 veya 7 alt birimden oluşan 4 ya da 6 halkasal oligomer, merkezinde bir oyuk bulunan yüzük ya da fiçı benzeri yapılar oluşturacak şekilde bir araya gelmektedir. Merkezdeki oyuk proteolitik oda olarak da adlandırılmaktadır ve katları açılmış protein substratların nakledildiği ve yıkıma uğratıldığı proteolitik bölgedir (Licht ve Lee, 2008). Proteolitik olarak aktif bölgenin enzimin merkezinde yer alan oyukta gizlenmiş halde bulunmasının hatalı protein yıkımının engellenmesi olduğu belirtilmiştir (Lupas ve ark., 1997). ATP-bağımlı proteazlar benzer (homomerik) ya da farklı (heteromerik) alt birimlerden meydana gelebilmektedir (Şekil 1.1). Clp proteazlar gibi heteromerik ATP-bağımlı proteazlarda ATPaz ve proteaz domainleri ayrı polipeptitler üzerinde yer alırken, Lon ve FtsH proteaz gibi homomerik proteazlarda bir ATPaz ve bir proteaz domaini aynı polipeptit ünitesinde yer almaktadır (Licht ve Lee, 2008).

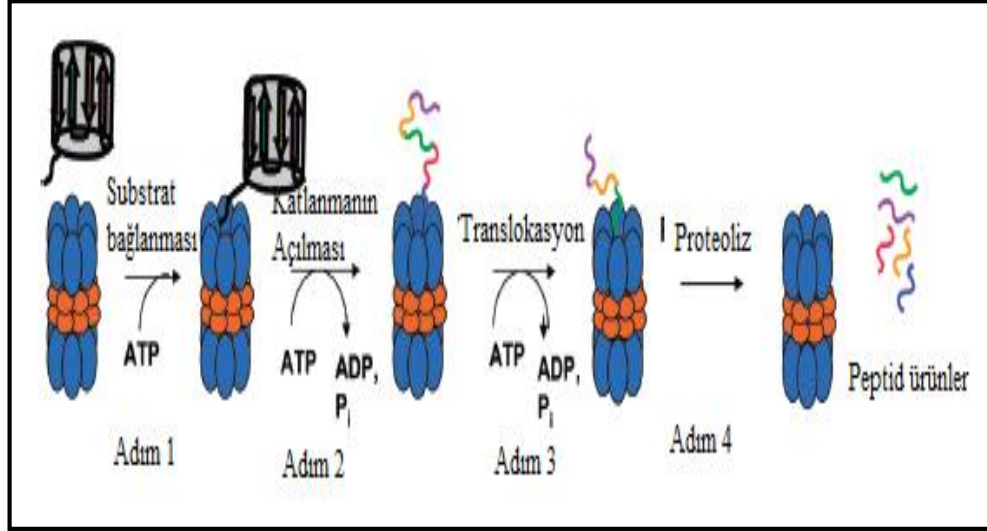
ATP-bağımlı proteazlarda protein substratların yıkımı ATP varlığı gerektirmektedir. Protein substratın yıkımı sırasında ATP hidrolizleri meydana gelmektedir, ancak peptit bağının kesilmesi ile ATP hidrolizinin eş zamanlı olarak meydana gelmediği gösterilmiştir (Fischer ve Glockshuber, 1993). Substratları

yeniden modellendiren proteinlerde korunmuş ATPaz domaininin moleküler şaperon ya da motor fonksiyonu sağladığı bilinmektedir. Buradan yola çıkılarak ATP-bağımlı proteazlarda bulunan ATPaz domainin, protein substratların katlanmalarının açılması ve bu substratların proteolitik bölgeye nakledilmesi fonksiyonuna sahip olduğu ileri sürülmüştür (Baker ve Sauer, 2006).



Şekil 1.1: Heteromerik (ClpAP) ve homomerik (Lon) ATP-bağımlı proteazların ultra yapıları (Licht ve Lee, 2008).

AAA⁺ proteinleri ile yapılan ve biyokimyasal analizler ve mutasyon deneyleri ile desteklenen kristallografik çalışmalar ATPaz modülü ile ilgili genel bir sonuç ortaya çıkartmıştır; buna göre ATPaz modülü tekrarlanan ATP hidrolizleri sayesinde meydana gelen konformasyonel değişiklikler ile substrat katlanmalarının açılmasını, substratların proteolitik alana nakledilmesini ve proteolitik bölgenin aktifleşmesini sağlamaktadır (Wang ve ark., 2004, Licht ve Lee, 2008). ATP varlığında Lon, Clp ve FtsH proteazlar protein substratları kısmen yıkıma uğramış protein ara ürünleri oluşturmada hidroliz etmektedirler. Bu konformasyonel değişikliklerin ortaya çıkmasında korunmuş arjinin rezidüleri kritik rol oynamaktadır (Ogura ve Wilkinson, 2001). Protein substrat, enzimin dar merkez oyuğuna hemen hemen lineer konformasyonda transport edilmekte ve merkezde bulunan proteolitik bölgede yıkıma uğratılmaktadır (van Melder ve ark., 1996, Hlavacek ve Vachova, 2002) (Şekil 1.2).



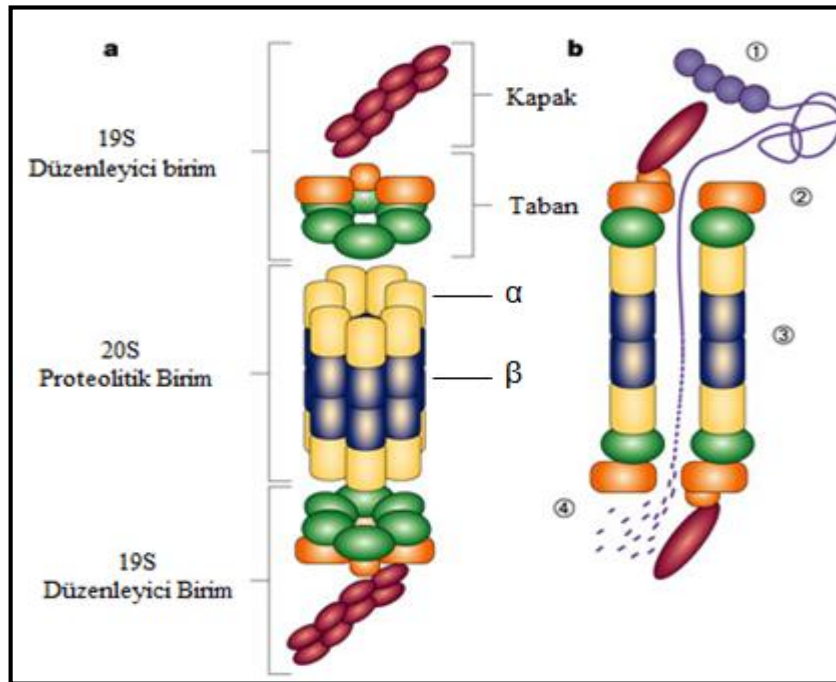
Şekil 1.2: ATP-bağımlı proteazların önerilen genel mekanizması. Bu şekilde bir hetero altbirimli ATP-bağımlı proteazın oligomerik yapısı örnek verilmiştir (Licht ve Lee, 2008).

1.2.1. 26S Proteazom

En büyük ATP-bağımlı proteaz olarak bilinen 26S proteazom, ökaryotik hücrelerde ubiquitin ile bağlanmış ya da bağlanmamış proteinlerin yıkımını katalizleyen çoklu-katalitik proteaz kompleksidir (Coux ve ark., 1996). 26S proteazom hasarlı veya yanlış katlanmış proteinlerin yıkımını gerçekleştirerek proteinlerin geri dönüşümünde rol oynamasının yanı sıra, hücre döngüsünde de etkin rol oynamaktadır.

26S proteazom, 20S proteazom (700 kDa) ile 19S proteazom (900 kDa) bileşenlerinden meydana gelmektedir ve yaklaşık 2600 kDa büyüklüğünde bir yapı göstermektedir (Pickart, 1997, Baumeister ve ark., 1998). Bu bileşenlerden 20S proteazom proteolitik aktiviteyi gerçekleştiren komplekstir; 19S düzenleyici kompleks ise hem poliubikitine bağlanmayı sağlamakta, hem de ATPaz domainlerini içermektedir (Ciechanover, 1994, Coux ve ark., 1996) (Şekil 1.3).

19S kompleksi kapak (lid) ve taban (base) alt-komplekslerinden oluşmaktadır ve moleküler ağırlıkları 25-110 kDa arasında değişen 20 farklı alt birim içermektedir (Hilt ve Wolf, 1996, Groll ve ark., 2005). Kapak alt kompleksi sekiz alt birimden oluşmaktadır, fonksiyonunun ise ubiquitinlenmiş protein substratların tanınması ve substratın ubiquitinden ayrılması olduğu sanılmaktadır. 20S proteolitik komplekse yakın olan taban kompleksinde ise ATPaz aktivitesi içeren domainler bulunmaktadır. Bu kompleks proteinlerin katlanmalarının açılmasında ve protein substratın 20S proteolitik komplekse yönlendirilmesinde fonksiyon göstermektedir (Groll ve ark., 2005).



Şekil 1.3: 26S proteazom şeması ve katalitik mekanizması. **a.** 26S proteazom 19S düzenleyici ATPaz birimleri ve 20S katalitik birim birleşenlerinden meydana gelir. **b.** Yıkım sırasında önce ubiquitin kuyruk 19S düzenleyici birim tarafından tanınır. Daha sonra aktivitesinin şaperon benzeri olduğu düşünülen taban kısmına doğru iletilir ve buradan katlanmalarının açılması ile proteolitik 20S bileşenine nakledilir. Burada β altbirimleri (mavi) ile ilişkili olan tripsin-benzeri, kimotripsin-benzeri ve peptidil glutamil hidrolizi benzeri proteaz aktiviteleri ile yıkıma uğratılır. Yıkım sonunda ortaya çıkan kısa peptidler yeni proteinlerin sentezinde kullanılmak üzere sitoplazmaya salınır (Sullivan ve ark., 2003).

26S proteazomun proteolitik olarak aktif kısım olan 20S kompleksi, 7 α ve 7 β alt birimlerinin oluşturduğu 4 tabakalı silindirik bir yapı meydana getirmektedir. 20S proteazomda α alt birimleri yapının dış kısımlarında bulunurken, proteolitik olarak aktif olan β alt birimleri yapının iç kısmında bulunmaktadır (Groll ve ark., 1997, Voges ve ark., 1999). Kompleks ökaryotik proteazomlarda 14 β alt biriminin sadece üç tanesi ($\beta 1$, $\beta 2$ ve $\beta 3$) fonksiyonel aktif bölge içermekte ve N-terminal hidrolaz aktivitesi göstermektedir (Orlaowski, 1990). Bu alt birimler substrat özgüllüğü ve aktivitelerine göre, kimotripsin-benzeri, tripsin-benzeri ve post glutamil peptid hidrolaz-benzeri olarak isimlendirilmektedirler (Groll ve ark., 2005).

Ökaryotik organizmalara ek olarak, *Thermoplasma acidophilum*, *Methanococcus jannaschii*, *Haloferax volcanii*, *Methanocaldococcus jannaschii*, *Thermoplasma volcanium* gibi birçok arkeal bakteride de 20S proteazom yapısı tanımlanmıştır (Benaroudj ve Goldberg, 2000, Barber ve Ferry, 2001, Kocabıyık ve ark., 2010). Arkeabakteri *Thermoplasma acidophilum* proteazomu gibi arkeal proteazomlarda bir tip α ve bir tip β alt birimleri bulunmaktadır ve bu alt birimler birbirine bitişik 7 alt birimli 4 halkasal yapı oluşturmaktadırlar (Löwe ve ark., 1995). Ökaryotik proteazomlarda ise 7 farklı α ($\alpha 1$ – $\alpha 7$) ve 7 farklı β ($\beta 1$ – $\beta 7$) alt birimi bulunmaktadır ve bu alt birimler bulundukları halkasal yapılarda özgül pozisyonlarda yerleşmişlerdir. Organizmalar arasında farklılık gösteren çeşitli α ve β alt birimleri yapısal olarak ilişkilidir ve %15–30 oranında dizi benzerliği göstermektedir (Groll ve ark., 1997).

26S proteozom hasarlı ya da yanlış katlanmış proteinlerin geri dönüşümünü sağlamanın yanı sıra, hücre döngüsünde de etkin rol oynamaktadır. 26S proteazom tarafından yıkıma uğratılan önemli düzenleyici proteinlere örnek olarak transkripsiyon faktörü c-Fos, G1-fazına özgül siklinler, siklin bağımlı kinaz inhibitörleri, omitin dekarboksilaz (ODC) ve çeşitli onkoproteinler verilebilir (Hilt ve Wolf, 1996). Ökaryotik hücre içi protein yıkımlarının çoğu ubiquitin-proteazom yoluyla gerçekleşmektedir. Yıkım için ubiquitin ile işaretlenmiş olan proteinler 26S proteazom tarafından tanınırlar ve çok hızlı bir şekilde kısa peptitlere parçalanırlar (Coux ve ark., 1996). Ökaryotik hücrelerde ubiquitin ile düzenlenen protein yıkım yolağı hücre döngüsü, transkripsiyonel düzenleme, apoptoz gibi birçok hücresel

sürecin düzenlenmesinin yanında, yanlış katlanmış ya da hasarlı anormal proteinlerin ortadan kaldırılmasında da çok önemli bir rol oynamaktadır.

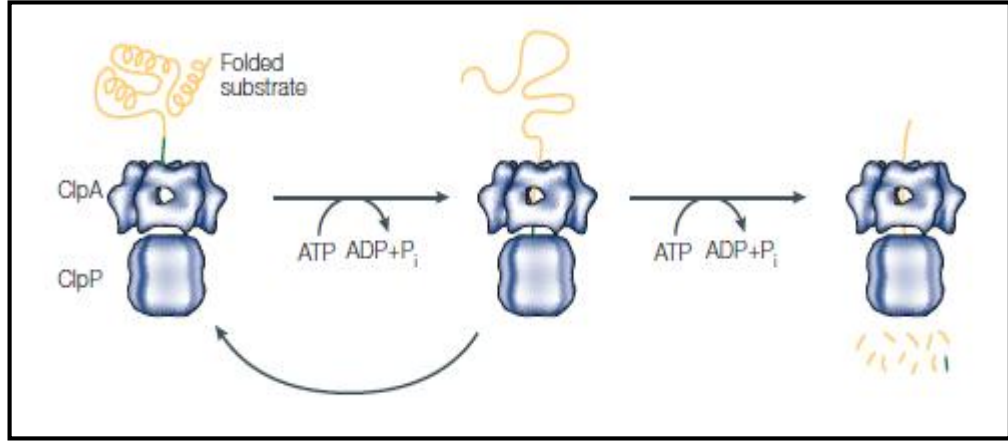
1.2.2. ClpAP (Ti) Proteaz

ClpAP proteaz ilk olarak Lon yoksun *E. coli* hücrelerinde ATP-bağımlı kazein yıkıcı proteinaz olarak keşfedilmiştir (Katayama-Fujimura ve ark., 1987). Daha sonra yapılan çalışmalar ClpAP proteazın bazı füzyon proteinlerinin, plazmit ekleyici sistem proteini MazE'nin ve anormal N-terminal uçlu bazı proteinlerin yıkımından da sorumlu olduğunu ortaya koymuştur (Hlavacek ve Vachova, 2002).

Heteromerik bir ATP-bağımlı proteaz olan ClpAP proteazda ATPaz ve proteaz domainleri ayrı bileşenler üzerinde yer almaktadır; bu bileşenler ATPaz domainini içeren ClpA ve proteolitik olarak aktif olan ClpP bileşenleridir. ClpA 84 kDa büyüklüğünde, hekzamerik yapıda bir ATPaz'dır. Hsp100/Clp ailesinin bir üyesidir ve şaperon aktivitesi de göstermektedir (Wickner ve ark., 1994). ClpA ATP yokluğunda bir trimer iken, ATP varlığında ise 6 alt birimden oluşan tek bir halka oluşturmaktadır. ClpA'da bulunan iki ATP bağlanma bölgesinden biri hekzamer oluşumuyla ilişkili olup, diğer ATP bağlanma bölgesi ise enzimin ATPaz aktivitesi için gerekmektedir. Aynı zamanda ClpA ve ClpP komplekslerinin bir araya gelmesi için de ATP hidrolizi gerektirmektedir (Chung ve ark., 1997).

21 kDa büyüklüğünde olan ClpP ise proteolitik birimdir ve her biri 7 alt birimden oluşmuş iki halkasal yapıdan oluşmaktadır. ClpP'yi oluşturan halkaların iç kısmında 14 proteolitik aktif bölge bulunmaktadır. ClpP tek başına iken sadece kısa peptitlerin yıkımını gerçekleştirebilmektedir. ClpP'nin merkez oyğunun çapı çok küçük olduğu için, ClpP'nin proteolitik merkezine katlanmış proteinlerin giriş yapabilmesi ATPaz alt ünitesinin fonksiyonunu gerektirmektedir. ClpA'nın protein yıkımı olmadığı zaman substratların katlanmalarını açan bir şaperon gibi davrandığı gösterilmiştir (Hoskins ve ark., 2000a). Yapılan çalışmalarda ClpA'nın da DnaK ve DnaJ gibi plazmit P1 replikasyon başlangıç proteininin *in vitro* aktivasyonunda şaperon fonksiyonu gösterdiği belirlenmiştir.

ATPaz halkaları (ClpA hekzameri), proteolitik kompleks (ClpP heptamerleri) ile birleşerek tam aktif proteaz formunu oluşturmakta ve bu oligomerizasyon ATP hidrolizi ile gerçekleşmektedir. Protein substratlar ATPaz domainine bağlandıktan sonra katlanmaları açılarak proteolitik bölgelerin bulunduğu merkez oyuğa iletilmekte ve yıkıma uğratılmaktadırlar (Wickner ve Maurizi, 1999, Hoskins ve ark., 2000b) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4: ClpAP proteazın protein susbstratı yıkım şeması (Hanson ve Whiteheart, 2005).

1.2.3. HsLVU

HsIVU (ClpQY ya da CodWX) iki bileşenden oluşan bir ATP-bağımlı proteazdır ve ilk olarak *E. coli*'de keşfedilmiştir. HsIVU'yu meydana getiren bileşenler yaklaşık 20 kDa büyüklüğünde olan HsIV (ClpQ) ve yaklaşık 50 kDa büyüklüğünde olan HsIU (ClpY) ısı şoku proteinleridir ve bu proteinler *hslvu* (heat shock lokus VU) operonundan kodlanmaktadır (Chuang ve ark., 1993). HsIV alt biriminin peptidaz aktivitesine sahip olduğu, HsIU alt biriminin ise hem ATPaz hem de şaperon aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. HsIV proteolitik alt birimi ökaryotik ve arkeal 20S proteazomların katalitik β alt üniteleri ile yüksek ölçüde benzerlik göstermektedir (de Mot ve ark., 1999). HsIVU yapısı ve yıkım mekanizması daha ayrıntılı olarak aydınlatılmasının ardından, enzim proteazomun bakteriyel homoloğu olarak kabul edilmektedir (Gille ve ark., 2003). HsIV aynı zamanda 20S proteazomun β alt ünitelerindeki gibi N-terminal bölgesinde iki korunmuş treonin

rezidüsüne sahiptir ve bu rezidüler proteolitik aktivitede önemli rol üstlenmektedirler (Seemüller ve ark., 1996).

HslU bileşeni bir ATPaz'dır ve korunmuş motifleri barındıran bir AAA⁺ modülü içermektedir HslV proteolitik bileşeni, merkezinde proteolitik çember bulunan bir hekzamer dimerinden oluşmuştur ve 20S proteazomlardan farklı olarak her bir halkasal yapı yedi (heptamer) değil, altı (hekzamer) üyeden meydana gelmektedir (Hlavachek ve Vachova, 2002). ATP varlığında HslU hem hekzamerik hem de heptamerik halkasal yapılar oluşturmakta ve bu HslU halkaları HslV halkalarının her iki ucuna bağlanarak HslVU kompleksini meydana getirmektedir (Altın, 2008).

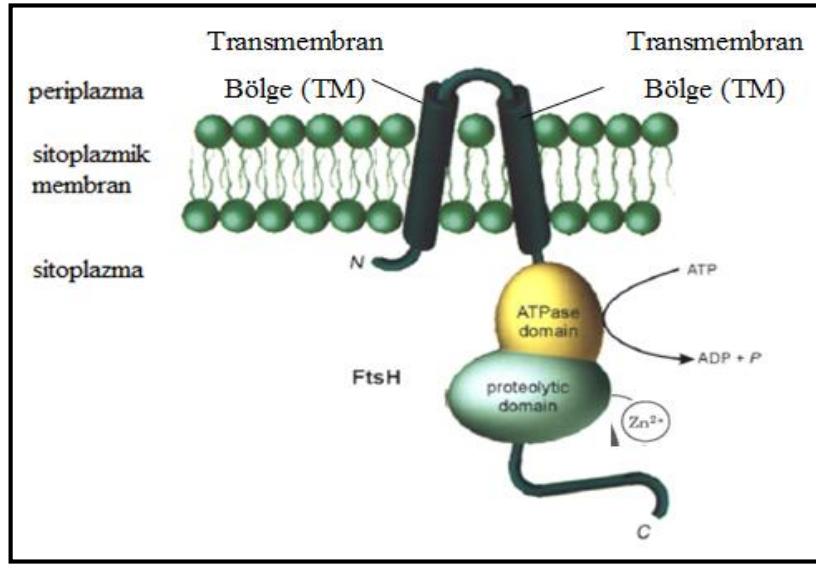
HslUV proteaz hücre bölünmesi inhibitör proteini SulA'yı Lon proteaza oranla daha az da olsa hidroliz edebilmektedir ve böylece hücrelerde çok önemli bir rol üstlenmektedir. HslU yalnızken ise moleküler şaperon gibi davranmakta ve SulA'nın agregasyonunu engellemektedir (Seong ve ark., 2000).

B. subtilis'de HslVU benzeri bir proteaz bulunmaktadır. CodWX olarak adlandırılan bu proteazın bileşenleri *cod* operonundan kodlanmaktadır ve CodW ve CodX aminoasit dizilimi bakımından HslV ve HslU'ya %52 oranında benzerlik göstermektedir. Ancak CodW HslV'den farklı olarak proteolitik olarak aktif N-terminal serin rezidüleri bulundurmaktadır ve CodWX bu özelliğe sahip olduğu belirlenen ilk proteazdır (Kang ve ark., 2001).

1.2.4. FtsH Proteaz

Proteolitik aktivitesi Zn²⁺ tarafından düzenlenen ATP-bağımlı bir metalloproteazdır (Akiyama ve ark., 1995). FtsH integral bir membran proteindir (Tomoyosu ve ark., 1993) ve internal membran proteinlerinin yıkımının yanında, sitoplazmik proteinlerin yıkımından da sorumlu olduğu belirlenmiştir (Ito ve Akiyama, 2005). Birçok bakteri türüne ek olarak, ökaryotik hücrelerin mitokondri ve kloroplastlarında da FtsH homologları bulunmaktadır (Langer, 2000).

FtsH proteaz *E. coli*'de *ftsH* geni tarafından kodlanan yaklaşık 70 kDa büyüklüğünde homoheksamerik bir proteindir. Birbirine eşit her alt biriminde bir ATPaz birimi ve bir proteaz domaini bulunmaktadır. FtsH'nin yapısında ATPaz ve proteaz domainlerini içeren C-terminal sitozolik bölge ile, N-terminal transmembran bölgeler (TM) bulunmaktadır (Şekil 1.5). ATPaz domaininde ATP-bağımlı proteazlarda görülen korunmuş Walker A, Walker B motifleri ve SRH domainleri bulunmaktadır (Tomoyasu ve ark., 1993b). Proteolitik bölgede korunmuş HEXXH motifini içeren Zn^{2+} metalloproteaz bölgesi bulunmaktadır.



Şekil 1.5: FtsH ATP-bağımlı proteazın şematik gösterimi (Hlavacek ve Vachova, 2002).

FtsH *E. coli*'de ATP sentetaz F_1F_0 alt ünitesi, SecY, YccA gibi membran proteinlerinin yıkımını katalizlediği bilinmektedir (Akiyama ve ark., 1996). En önemli işlevlerinden biri ısı şokuna cevap proteini σ^{32} 'nin yıkımını düzenlemesidir (Okuno ve ark., 2004). FtsH faj enfeksiyonu sırasında lamda fajı CII proteininin seviyesinin düzenlenmesinden de sorumludur (Shotland ve ark., 1997). *Bacillus subtilis*'te spor oluşması için gerekli olan SpoVM FtsH'nin yıkımını gerçekleştirdiği diğer bir proteindir. *A. thaliana*'da 3 tanesi mitokondride, 9 tanesi de kloroplastta konumlanmış 12 farklı FtsH homologu bulunmaktadır. İnsanda bulunan bir FtsH ortaloğunda meydana gelen bir mutasyon nörodejeneratif bir hastalığa neden olmaktadır (Casari ve ark., 1998). FtsH'nin aynı zamanda şaperon görevi de üstlendiği sanılmaktadır (Suzuki ve ark., 1997).

1.2.5. LON PROTEAZ

ATP-bağımlı proteazların bir diğer grubu da Lon proteazlardır. (EC 3.4.21.53; MEROPS: S16.001) ve hücrelerde hasarlı ya da kısa-ömürlü düzenleyici proteinlerin yıkımından sorumlu enzimlerdir. Lon proteaz homologları organizmalar arasında oldukça yaygındır; prokaryotlarda sitozolik bir proteaz olan Lon, ökaryotlarda ise nükleustan kodlanmakta ve mitokondriyal matrikste ve kloroplastlarda yer almaktadır. Lon proteazlar hücre homeostasisi, protein kalite kontrolü ve metabolik düzenleme gibi önemli hücresel fonksiyonlarla ilişkilidirler.

Lon proteaz ilk kez *E. coli*'de keşfedilmiştir ve aynı zamanda La proteaz ya da CapR olarak da adlandırılmaktadır (Chung ve Goldberg, 1981) Lon proteazın birbirinin eşi alt birimler ile bir homooligomer oluşturan, 87 kDa büyüklüğünde bir ATP-bağımlı proteaz olduğu belirlenmiştir (Chiarette ve ark., 1981, Goldberg ve ark., 1981, Zehnbaue ve ark., 1980). Daha sonra Chin ve arkadaşları tarafından *E. coli* ATP-bağımlı Lon proteazın *lon* geni tarafından kodlandığı ve bu genin aynı zamanda ısı şoku cevabı ile ilişkili olduğu bulunmuştur (1988).



Şekil 1.6: *E. coli* Lon proteazın kristal yapısı (Botos ve ark., 2004a).

Lon proteazlar *E. coli*'den sonra, *Bacillus brevis* (Ito ve ark., 1992), *Mycobacterium smegmatis* (Roudiak ve ark., 2001), *Brevibacillus thermoruber* (Lee ve ark., 2004a), *Bacillus subtilis* (Duman ve Löwe, 2010) gibi birçok bakteri türünde, *Thermus thermophilus* (Watanabe ve ark., 1999), *Thermoplasma acidophilum* (Beche ve Zwickle 2004a) gibi arkealarda tanımlanmıştır. Ökaryotik organizmalara

bakıldığında, Goldberg ve arkadaşları (1992) sıçan akciğer mitokondri matrikslerinde Lon-benzeri ATP-proteazın varlığını keşfetmişlerdir. Daha sonra insan Lon proteazı kodlayan gen klonlanmış ve bu genin *E. coli* Lon ile %58 oranında benzerlik gösteren 106 kDa büyüklüğünde bir protein kodladığı ortaya çıkarılmıştır (Wang ve ark., 1993). PIMI olarak da ifade edilen maya *lon* geni ise 120 kDa'luk, esnek halka şeklinde, heptamerik bir protein kodlamaktadır (Szuki ve ark., 1994). Maya Lon proteazın *E. coli* Lon proteaz ile %60 oranında dizi benzerliği gösterdiği ortaya çıkarılmıştır (Tomoyosu ve ark., 1993).

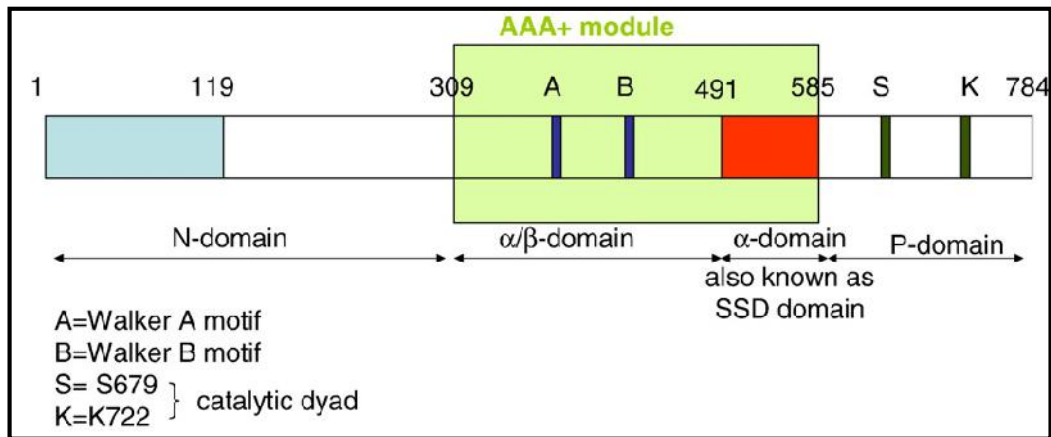
Lon oligomerik kompleksi, organizmaya bağlı olarak değişen 4-8 Lon polipeptidinin birbirine bağlanması ile meydana gelen halka şeklinde bir yapı göstermektedir. Proteolitik aktif bölge halkasal yapının iç kısmında yer almaktadır. Yapılan çalışmalar *E. coli* Lon'un hem tetramerik hem de oktamerik formda bulunabildiğini göstermiştir (Chung ve Goldberg, 1981, Goldberg ve ark., 1994). *Mycobacterium smegmatis* Lon ise hekzamer yapıda olduğu bulunmuştur (Roudiak ve Shrader, 1998). *Saccharomyces cerevisiae* Lon proteaz ise heptamerik bir enzimdir (Szuki ve ark., 1994). Oligomeri oluşturan alt birimlerin sayısı organizmalar arasında değişim göstermesine rağmen, her Lon proteazda tek bir polipeptit zinciri üzerinde kovalent olarak bağlanmış bir N-terminal ATPaz domaini ve bir C-terminal proteaz domaini bulunmaktadır (van Melderen ve Aertsen, 2009).

Lon evrimsel olarak organizmalar arasında oldukça korunmuştur. *E. coli* Lon'un (Ec-Lon), aminoasit dizisi bakımından arkea *Thermoplasma acidophilum* Lon proteazına (Ta-Lon) %50, *Saccharomyces cerevisiae* Lon proteazına (ScLon) ve insan Lon proteazına (HsLon) %25 oranında benzerlik gösterdiği ortaya konmuştur (Lee ve Szuki, 2008).

1.2.5.1. Lon Proteazların Yapısal Özellikleri

Lon proteazlar Lon A ve Lon B olmak üzere iki alt aile ile sınıflandırılmaktadırlar. Her iki alt ailede de ortak olarak aynı alt birim üzerinde oldukça korunmuş bir ATPaz domain (AAA+ modülü) ile bir proteolitik domain bulunmaktadır. Bakteriyel ve ökaryotik Lon proteazların içinde olduğu Lon A alt ailesine ait Lon proteazlar protein bağlayabilme özelliğine sahip olan ve substrat tanınması ve enzim fonksiyonelliği ile ilişkili olduğu düşünülen büyük bir N-terminal domaine sahiptir (Melnikov ve ark., 2008). Arkeal Lon proteazların içinde olduğu Lon B alt ailesinde bulunan Lon proteazlar ise proteini membranın sitoplazmik bölgesine bağlayan bir ara membran domain içermektedirler (Rotanova ve ark., 2006).

Lon proteazlar temelde yapısal olarak, bir N-terminal domain, orta kısımda bir α/β -domain ile bir α domain içeren AAA⁺ modülü ve C-terminalde proteolitik aktif bölge olan P domaininden oluşmaktadırlar (Şekil 1.7). Lee ve arkadaşları tarafından 2004 (b) yılında yapılan çalışmalarla enzimin N-terminal domaininin hidrofobik aminoasitler içerdiği ve enzimin protein substrat ile etkileşim bölgesi olduğu gösterilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalar ile AAA⁺ modülün substrat ayırımı ve ATP hidrolizini gerçekleştirdiği ve N ve C-terminal bölgeler arasında bulunduğu ortaya konmuştur (Botos ve ark., 2004b, Lee ve ark., 2004b).



Şekil 1.7: Lon proteazın bir alt biriminin domain organizasyonu (Lee ve Szuki, 2008).

Temel bir AAA⁺ modülünün iki yapısal domain içermekte olduğu bilinmektedir. Bu domainlerden büyük olan α/β -domaindir ve nükleotit bağlanmasında görev yapmaktadır. Bu bölgede ATP bağlanmasını ve hidrolizini düzenleyen korunmuş Walker A ve Walker B motifleri bulunmaktadır (Licht ve Lee, 2008). ATPaz domain`de bulunan diğer önemli motifler ise sensör 1 ve arjinin parmak motifleridir. Sensör 1 motifi ATP hidrolizi sırasında nükleofil görevi yapan su molekülünün konumlanmasında görev yapmaktadır. Arjinin parmak motifi ise alt birim etkileşimleri ile ATP hidrolizini aktive etmektedir (Neuwald ve ark., 1999). AAA⁺ modülünün daha küçük olan domaini ise helikal α -domaindir ve aynı zamanda substrat algılayıcı ve ayırıcı domain (SSD) olarak da adlandırılmaktadır. Bu domainde korunmuş Sensör-2 motifi bulunmaktadır. Bu motif genellikle bir arjinin (nadiren lizin) rezidüsü içermekte ve hem ATP bağlanma ve hidrolizine katkı sağlamakta, hem de protein substratlarla ilişki kurarak, protein substratın yeniden modellenmesini sağlamaktadır (Neuwald ve ark., 1999, Iyer ve ark., 2004).

Lon proteazın C-terminalindeki P domain ise katalitik bölgeyi oluşturmaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalarda, bu bölgede gerçekleştirilen mutasyonların proteolitik aktiviteyi engellediği fakat ATPaz aktivitesine herhangi bir etkisinin olmadığı ortaya konmuştur (Fischer ve Glockshuber, 1993, Starkova ve ark., 1998). *E. coli* Lon proteaz ile gerçekleştirilen mutasyon çalışmaları ile Lon proteolitik bölgesinde, serin proteazların klasik Ser-His-Asp tiradı ile benzerlik göstermeyen bir Ser-Lys katalitik ikilisinin anahtar görev üstlenmekte olduğu belirlenmiştir (Botos ve ark., 2004b). Lon proteazların Ser-Lys katalitik ikilisinin organizmalar arasında oldukça korunmuş olduğu ortaya çıkarılmıştır (Chandu ve Nandi, 2004) (Şekil 1.8).

E.coli_Lon	PDFYEKRDHIVHVPAGATPKDGFSAAGIAMCTALVSLTGNPVRADVAMTGEITLGGQVLPVGGIKKEKLL-----AAHRGGI	731
B.subtilis_LonA	PDFHESKYDINHVPAGATPKDGFSAAGITMATALVSALTGRVSRVGMTGEITLGRVLPVGGIKKEKAL-----GAHRAGL	729
M.pneumoniae_Lon	PNLFKKVDINHVPGGGIPKDGFSAGAALVTAIISSLTGKKVDPKIAMTGEITLGRVMTIGGVKEKTI-----SAYRGGV	754
M.genitalium_Lon	PSLFKKDINHVPGGGIPKDGFSAGAALVTAIISSLTGKKVDPTVAMTGEITLGRVLPVGGIKKEKTI-----SAYRGGV	754
M.penetrans_Lon	PKIFGEIDLHVHVPGGGIPKDGFSAGIALTTAILSALKKIVKIPSNVAMTGEITLGRVLPVGGIKKEKTI-----SAYRGA	740
M.pulmonis_Lon	DFDWENNSIHHVPDGATPKDGFSAAGTFTTAAIISSLTGKKVSPVGMTGEITLGRVLPVGGIKKEKSI-----AANKFGI	799
M.musculus_Lon	FDLLDNTDIHLHFPAGAVTKDGFSAAGTIVTCLASLFSGRLVRSADVAMTGEITLGRVLPVGGIKKVKL-----AAHRAGL	795
M.musculus_mLon1	FDLLDNTDIHLHFPAGAVTKDGFSAAGTIVTCLASLFSGRLVRSADVAMTGEITLGRVLPVGGIKKVKL-----AAHRAGL	375
H.sapiens_pLon	FDLLDNTDIHLHFPAGAVTKDGFSAAGTIVTCLASLFSGRLVRSADVAMTGEITLGRVLPVGGIKKVKL-----AAHRAGL	795
H.sapiens_Lon-plant1	FDLLDNTDIHLHFPAGAVTKDGFSAAGTIVTCLASLFSGRLVRSADVAMTGEITLGRVLPVGGIKKVKL-----AAHRAGL	658
H.sapiens_mLon1	FDLLDNTDIHLHFPAGAVTKDGFSAAGTIVTCLASLFSGRLVRSADVAMTGEITLGRVLPVGGIKKVKL-----AAHRAGL	524
A.thaliana_Lon1	MNVLDGRDIHHFPAGAVPKDGFSAAGTIVTALVSLFSQKRVRADTAMTGEITLGRVLPVGGIKKVKL-----AAHRYGI	504
H.sapiens_Lonlike	NDYLVTSIHHLHVPAGATPKDGFSAAGTIVTALLSLAMGRPVRQNLAMTGEVSLTGKILPVGGIKKEKTI-----AAKRAGV	793
H.sapiens_mLon	NDYLVTSIHHLHVPAGATPKDGFSAAGTIVTALLSLAMGRPVRQNLAMTGEVSLTGKILPVGGIKKEKTI-----AAKRAGV	910
M.musculus_mLon	NDYLVTSIHHLHVPAGATPKDGFSAAGTIVTALLSLALGQVLPQNLAMTGEVSLTGKILPVGGIKKEKTI-----AAKRAGV	896
D.melanogaster_LD30525	NLFLEQEHHLHVPAGATPKDGFSAAGTIVTALVSLATGKPVQDIAMTGEVSLTGKILPVGGIKKEKTI-----AARRSGV	758
D.melanogaster_CD8798	NLFLEQEHHLHVPAGATPKDGFSAAGTIVTALVSLATGKPVQDIAMTGEVSLTGKILPVGGIKKEKTI-----AARRSGV	932
C.elegans_mLon	NKFFDKAHIHVPAGATPKDGFSAAGTIVTSSLSLALDRPVQDIAMTGEISLTGKILPVGGIKKEKVI-----AAKRVGA	930
A.thaliana_nLonm	NQFFANSKLHLHVPAGATPKDGFSAAGTIVTSSLSLALDRPVQDIAMTGEVTLTGRIILPVGIGVKEKTI-----AARRSQI	894
A.thaliana_mLon	NQFFANSKLHLHVPAGATPKDGFSAAGTIVTSSLSLALDRPVQDIAMTGEVTLTGRIILPVGIGVKEKTI-----AARRSQI	384
A.thaliana_Lon	NLFFANSKLHLHVPAGATPKDGFSAAGTIVTSSLSLALDRPVQDIAMTGEVTLTGRIILPVGIGVKEKTI-----AARRSQI	880
A.thaliana_LonLike	NKLFANSKLHLHVPAGATPKDGFSAAGTIVTSSLSLALDRPVQDIAMTGEVTLTGRIILPVGIGVKEKTI-----AARRSQV	898
S.cerevisiae_PIM1	NRFEEKASIHLCPEGATPKDGFSAAGTIVTATFSLALNKSIDPTVAMTGEISLTGKILPVGGIKKEKAV-----AAKRSQA	1067
C.elegans_Lon	--TLEDQDIHVLPAAGAVNKDGFSAAGTIVTSSLSLALDRPVQDIAMTGEISLTGKILPVGGIKKEKVI-----AAQREGL	724
B.subtilis_LonB	GMKPSDYDIHINFPGG-IPIDGFSAGIAMAGIPSAIHKIPIDNTVAMTGEISLNLGVKPIGGVVPKIK-----AAKQSGA	497
T.acidophilum_Lon	-----MDIHQVGTGYEGVEGGSASVSIAATVISAENIPVDQSVAMTGSLSVRGDLVPVGGVTAKVE-----AABEAGL	577
E.coli_sms	GLQMAQDVVFVNVVGGVKTET-SADLALLAM/SSLRDRPLPQDLVVFGEVGLAGEIRVPVPSQGERIS-----EAAKHGF	424
E.coli_b0955	-----FSASLTPEQSYSEVDGGSASMAELCALISALADVPVQSIATIGSDVDQFGRAQPVGGIKKEKTI-----EAAKHGF	497

Sekil 1.8: Çeşitli organizmalarda bulunan Lon proteazların primer dizilerinin karşılaştırılması ve korunmuş Ser-Lys katalitik ikilisi (Chandu ve Nandi, 2004).

Lon ve diğer ATP-bağımlı proteazların ATPaz domainleri arasındaki önemli ölçüde belirgin dizi benzerliği, Lon proteazlarda da ATP bağlama ve hidrolizinin, substrat katlanmalarının açılması ve substratın aktif bölgeye taşınması için gerekli olduğunu düşündürmektedir (Licht ve Lee, 2008). Daha önce yapılmış olan bir çalışmada Ebel ve arkadaşları ATP-hidrolizinin konformasyonel değişiklikleri uyararak Lon aktif bölgesinin substrat kabul edebilirliğini nasıl kontrol ettiğine dair bir model öne sürmüşlerdir (1999). Bu modele göre enzimde biri özgül olmayan substratlar için (başlatıcı bölge), diğeri de özgül substratlar için (SSD-substrat algılayıcı ve ayırıcı bölge) olmak üzere iki bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Düşük afinite ile bağlanan substratlar başlatıcı bölgeye bağlanmakta ve yıkıma uğramadan ayrılmaktadırlar. SSD ise yüksek afinite gösteren özgül substratları bağlamakta ve ATP hidrolizi aktif olana kadar substratın bağlı kalmasını sağlamaktadır. Bu sırada enzimde konformasyonel değişiklikler meydana gelmekte ve substrat aktif bölgeye aktarılacak yıkıma uğratılmaktadır.

1.2.5.2. Lon Proteazların Fizyolojik Özellikleri

Lon proteazlar hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerde çeşitli yollardaki farklı birçok proteinin yıkımından sorumludur ve birçok hücresel işlevin düzenlenmesini sağlamaktadır. *E. coli* Lon proteazın hücrede hasar görmüş anormal proteinlerin yanında (Chung ve Goldberg, 1981), UV ile oluşan DNA hasarı sonucu hücre bölünmesini engelleyen protein SulA (Mizusawa ve Gottesman, 1983), kapsüler polisakkarit sentezinden sorumlu RcsA (Torres-Cabassa ve Gottesman, 1987) ve SOS cevap proteinleri UmuD ve UmuC (Gonzalez ve ark., 1998) gibi önemli düzenleyici fonksiyonları olan kısa ömürlü proteinlerin yıkımından da sorumlu olduğu bilinmektedir.

Lon proteaz normal büyüme koşullarında çoğu bakteri türü için yaşamsal bir enzim değildir fakat yokluğu hücrelerde birçok fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır. *E. coli* K-12 *lon* mutantları yaşamlarını sürdürebilirler fakat DNA'ya hasar verici ajanlara ve anormal protein toplanmalarına duyarlı hale gelmektedirler (Torres-Cabassa ve Gottesman, 1987). Lon hasarlı *E. coli* hücrelerinin anormal fenotipik özellikler gösterdikleri belirlenmiştir; buna göre Lon mutant koloniler tipik bir mukoid fenotip göstermektedirler (Torres-Cabassa ve Gottesman, 1987). Bu şekilde mukoid koloni oluşumu, transkripsiyonel aktivatör RcsA'nın stabilizasyonuna bağlı olarak kapsüler polisakkaritlerin aşırı üretilmesinden kaynaklanmaktadır. Bazı Lon mutantlarında ipliksi büyüme (Schoemaker ve ark., 1984) gözlenirken, bazı Lon mutant hücrelerin ise lag fazından log fazına geçemedikleri saptanmıştır (Kuroda ve ark., 2001). Bu durum serbest ribozomal proteinleri yıkıma uğratamadıkları ve anahtar enzimlerin sentezi için gereken aminoasitleri elde edemedikleri için ortaya çıkmaktadır.

Lon proteazın çeşitli bakteri türlerinde hücre döngüsü ve farklılaşma ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. *Caulobacter crescentus* Lon proteazının DNA metiltransferaz (CcrM) yıkımı ile ilişkili olduğu ve böylece kromozomal DNA metilasyonunda ve hücre farklılaşmasında düzenleyici rol oynadığı gösterilmiştir (Wright ve ark., 1996). *E. coli*'nin aksine bazı bakterilerde *lon* mutantları yaşamlarını sürdüremez (Tojo ve ark., 1993). *Myxococcus* genomunda birbiriyle yakın ilişkili iki *lon* geni olduğu ve bu

genlerden bir tanesi vejetatif büyüme için, diğerinin ise gelişim için gerekli olduğu belirlenmiştir (Tojo ve ark., 1993).

Brazas ve arkadaşları 2007 yılında *Brucella abortus* ve *Salmonella enterica* gibi patojenik bakterilerde transkripsiyon düzenleyici faktör HlA'nın Lon ile düzenlenen yıkımının virülans genlerin doğru zamanda ekspresyonunu kontrol ettiğini göstermişlerdir. *Pseudomonas aeruginosa*'da Lon'un indüklenmesinin organizmanın antibiyotikle muamelesine karşı uyarılabilir direncine yardımcı olduğu ortaya konmuştur (Whistler ve ark., 2000). Aynı bakteride quorum sensing (QS) düzenlenmesinin Lon-bağımlı proteoliz ile gerçekleştiği belirlenmiştir (Bertani ve ark., 2007). *lon* mutant *Pseudomonas aeruginosa*'da en temel sinyal molekülü olan homoserin laktonların (AHLs) yaban tiplere göre çok daha fazla üretildiği saptanmıştır ve bu da Lon'un QS'i negatif olarak düzenlediğini ortaya koymaktadır. Bazı bakteri türlerinde flagella sentezini düzenleyen faktörlerden FhlDC ATP-bağımlı proteoliz ile kontrol edilmektedir. *Salmonella typhimurium*'da FhlDC yıkımı ClpXP tarafından gerçekleştirilirken (Claret ve Hughes, 2000), *Proteus mirabilis*'te Lon proteaz tarafından gerçekleştirilmektedir (Claret ve Hughes, 2000).

Ökaryotlarda Lon proteaz mitokondri matriksindeki oksidatif olarak modifiye olmuş proteinleri yıkmakta ve sitoplazmadaki 26S proteozom kompleksine benzer fonksiyon göstermektedir (Bota ve ark., 2002). *Saccharomyces cerevisiae*'de mitokondriyal matrikste bulunan tek proteaz Lon'dur ve Sc-Lon proteazın substratları genellikle yanlış katlanmış ya da katlanmamış elektron transport zincir kompleks proteinleri, ribozomal proteinler ve metabolik enzimlerdir. Mayalarda Lon proteazın mitokondrinin normal fonksiyonunu sürdürebilmesi için esas olduğu belirlenmiştir. *S. cerevisiae*'de Lon'un yokluğu mitokondriyal matrikste ATP-bağımlı degradasyonun olmamasına, yoğun agregatların birikmesine ve büyük mt-DNA delesyonlarına yol açmaktadır (Suzuki ve ark., 1994). Memeli hücrelerinin mitokondri matrikslerinde bulunan; sitokrom c oksidaz (COX), oksitlenmiş mitokondriyal akonitaz (tri-karboksilik asit döngüsü için gereken bir protein), StAR (sitozolden mitokondri iç membranına kolesterol transferini düzenleyen steroidojenik akut düzenleyici protein) Lon proteazın substratlarına örnek olarak verilebilir (Suzuki ve ark., 1994, Rep ve ark., 1996).

Lon proteazın proteolitik aktivitesinin yanında hem bakterilerde hem de ökaryotlarda şaperon protein benzeri aktivite de göstermekte olduğu bilinmektedir; bu görevi kapsamında Lon proteaz çeşitli proteinlerin membranlara yerleşmesinde ve protein komplekslerinin oligomerizasyonunda rol oynamaktadır (Szuki ve ark., 1997).

Chung ve Goldberg 1982’de yaptıkları çalışmalar ile *E. coli* Lon’unun DNA’ya bağlanabilme özelliğinin de olduğunu ortaya çıkarmışlardır. *E. coli*’de Lon proteazın DNA’da diziye özgül olarak timin ve guanince (TG) zengin promotor elementlerine bağlanmakta olduğu gösterilmiştir (Fu ve ark., 1998). Lon proteazın DNA’ya bağlanma özelliği birçok bakteride ve mayalarda çalışılmıştır. 2004 yılında Liu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada insan Lon proteazının mitokondriyal DNA promotorlarına tek zincirden, bölgeye özgül olarak bağlanabilme özelliği olduğu ve bu özelliğin ATP bağlanması ile engellendiği gösterilmiştir (2004). Mitokondriyal Lon’un mitokondri DNA’sına bağlanma özelliğine sahip olmasının yanında, solunum zincir komplekslerinin birleşmesi için *E. coli* Lon gibi şaperon görevi de üstlenmekte olduğunu belirlenmiştir (Ngo ve Davies, 2007). Simmons ve arkadaşları 2008 yılında *Bacillus subtilis* LonA proteazın normal büyüme süresince nükleotit ile birlikte lokalize olduğunu göstermişlerdir.

Bakteri ve mayalarda yapılan *in vivo* çalışmalar Lon’un gen ekspresyonunun düzenlenmesinde transkripsiyon faktörlerinin seviyesini düzenleyerek ve mRNA transkriptlerinin kalıcılığına etki ederek görev yaptığı öne sürmektedir (Gill ve ark., 1993) ve bu çalışmalar sonucunda Lon’un mitokondri genomunun kalıcılığı ve ekspresyonunda rol oynadığı düşünülmektedir. Lon proteazın DNA’ya bağlanma özelliğinin fizyolojik fonksiyonu henüz kesin olarak belirlenememiştir.

1.2.5.3. Lon Proteazların Biyokimyasal Özellikleri

Birçok temel hücre sel fonksiyonda görevli olan Lon proteazların mekanizmalarının daha iyi anlaşılabilmesi için gerçekleştirilmiş çok sayıda çalışmada çeşitli organizmalara ait Lon proteazlar biyokimyasal olarak karakterize edilmişlerdir. Waxman ve Goldberg 1985'te yaptıkları çalışmalar ile *E. coli* Lon'un Glt-Ala-Ala-Phe-MNA ve Suc-Ala-Ala-Phe-MNA gibi çeşitli florojenik substratları ATP ve Mg^{2+} varlığında yıktığını ortaya koymuşlardır. *E. coli* Lon tarafından peptit yıkımı tamamen Mg^{2+} varlığına gerek duymaktadır ancak ATP olmaksızın da gerçekleşebilmektedir. ATP varlığında ise peptit yıkımında büyük oranda artış görülmektedir. Bu çalışmada ADP'nin, heparin, diizopropil florofosfat ve Benzonil-Arg-Gly-Phe-Phe-Leu-MNA substratlarının peptit yıkımını engellediği, DNA'nın ise peptit yıkımını uyardığı belirlenmiştir. Çalışmada *E. coli* Lon peptit hidroliz reaksiyonu için optimum pH'nın 9.0-9.5 arasında olduğu sonucuna varmışlardır.

Lon proteazlar peptitlerin ya da kazein gibi ikincil yapıları olmayan proteinlerin yıkımında ATP'den bağımsız olarak da işlev gösterebilmektedirler (van Melder ve ark. 1996). Ancak bazı Lon proteazlar protein substratları kesinlikle ATP-bağımlı olarak hidroliz etmektedirler. Örneğin saflaştırılmış mitokondriyal Lon proteazın kazein proteinini ATP-bağımlı olarak hidroliz ettiği ortaya konmuştur (Van Dyck ve ark., 1994, Suzuki ve ark., 1994). Lon proteaz tarafından kazein, BSA ve λ N proteini ve peptit substratların yıkımının ATP ile uyarıldığı belirlenmiştir (Goldberg ve ark., 1994). Fischer ve Glockshuber 1994 yılında yayınladıkları çalışmalarında Lon proteazın ATP hidroliz edebilmesi için proteolitik aktivitenin gerekli olmadığını göstermişlerdir. Yapılan çalışmada proteolitik bölgede gerçekleştirilen mutasyonların ATPaz aktivitesi üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Fukui ve arkadaşları 2002 yılında arkea *Thermococcus karkadensis* Lon proteazının ATP olmadığı zaman çok daha yüksek peptidaz aktivitesi gösterdiğini belirlemişlerdir. *T. karkadensis* Lon proteaz *E. coli* Lon proteaza benzer olarak pH 9'da aktivite göstermekte ve çeşitli protein substratların reaksiyon ortamına eklenmesi Lon'un peptit yıkım aktivitesini arttırmaktadır. *E. coli* Lon'a benzer olan bir diğer özelliği α -kazein yıkımı için ATP'ye ihtiyaç duymazken, hemoglobin A ve

Rubisco gibi ikincil yapılara sahip substratların hidrolizi tamamen ATP-bağımlı olarak gerçekleşmektedir.

2004 yılında Lee ve arkadaşları *Brevibacillus thermoruber* Lon proteaz genini tanımlamışlar, *E. coli*'ye klonlamışlar ve bu genden kodlanan enzimi karakterize etmişlerdir. Bu çalışmada *B. thermoruber* Lon'un ATPaz aktivitesi için optimal sıcaklığın 70°C, peptidaz ve DNA'ya bağlanma aktivitesi için ise optimal sıcaklığın 50°C olduğu belirlenmiştir. Çalışmaya göre *B. thermoruber* Lon'un peptidaz aktivitesi ATP-varlığında belirgin olarak artmaktadır. Enzim ATP'den bağımsız olarak denatüre olmuş insülin β zinciri üzerinde şaperon-benzeri aktivite sergilemektedir.

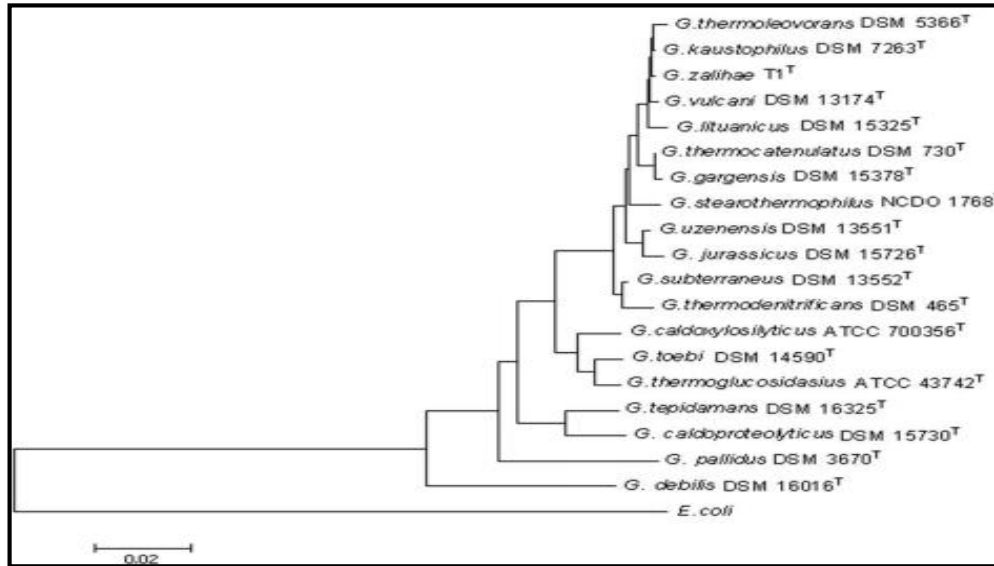
Maehara ve arkadaşları, 2008 yılında termofilik bakteri *Thermus thermophilus*'un 3 Lon proteazının (TTC0418, TTC0746 ve TTC1975) genlerini, pUC19 ve pET-21a plazmitlerini kullanarak *E. coli*'ye klonlamışlar ve karakterize etmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda *T. thermophilus* Lon proteaz TTC0418 ve TTC0746'nın ATP-bağımlı peptidaz ve proteaz aktivitesi gösterdikleri ve substrat varlığında güçlü ATPaz aktivitesi sergiledikleri gözlenmiştir. Ayrıca TTC0418 ve TTC0746 üzerinde yapılan çeşitli mutasyon çalışmaları sonucunda *T. thermophilus* Lon mutantlarında *E. coli* lon mutantlarına benzer büyüme özellikleri (örneğin; besin küçültülmesinden sonra lag fazında büyüme bozukluğu) gözlenmiştir. Maehara ve arkadaşlarının çalışmaları *T. thermophilus* Lon proteazlarından TTC0418 ve TTC0746'nın Lon A ailesine ait enzimler olduklarını, TTC1975'in ise Lon proteaz olarak sınıflandırılmayacağını ortaya çıkarmıştır.

Yapılan birçok çalışmada Lon'un plazmit, dana timus ve somon sperm DNA'larına özgül-olmayarak bağlandığı gösterilmiştir (Chung ve Goldberg, 1982, Chiarette ve ark., 1984, Nomura ve ark., 2004). Chung ve Goldberg'in 1982'de yaptıkları çalışmalar Lon'un plazmit, dana timus ve bakteriyofaj DNA'ları gibi büyük DNA moleküllerine bağlanmasının ATPaz ve proteaz aktivitelerini uyardığını göstermişlerdir. Ancak daha sonra yapılan başka bir çalışma (Chiarette ve ark., 1984) DNA'nın ATP hidrolizini uyardığını fakat protein hidrolizini engellediğini göstermiştir. Lon'un DNA'ya bağlanmasının nedeni henüz kesinleşmiş değildir fakat

DNA metilasyonu ve RNA transkripsiyonu ile ilişkili bazı proteinlerin yıkımından sorumlu olduğu bilinmektedir (Gottesman ve ark., 1981, Wright ve ark., 1996).

1.3. *Geobacillus kaustophilus*

Geobacillus kaustophilus (HTA426) Pasifik Okyanusu'nun dibinde bulunan Mariana adlı sıcak su çukurunun derin sedimentlerinden izole edilmiş olan, termofilik, aerobik, endospor oluşturan, flagellalı, çubuk şeklinde gram pozitif bir bakteridir (Takami ve Ark., 2004). Bakterinin genel yaşam alanı sulu ortamlardır fakat petrol rezervlerinde ya da toprakta yaşayabilen soylarının da olduğu bilinmektedir.



Şekil 1.9. *Geobacillus kaustophilus*'un *Geobacillus* cinsinin diğer türlerine göre filogenetik yeri (Leow ve ark., 2007).

Optimal büyüme sıcaklığı 60°C olan *Geobacillus kaustophilus*'un maksimum büyüme sıcaklığı 74°C'tır. *G. kaustophilus* pH 2-12 aralığında yaşayabilmektedir, ancak büyüebildiği en uygun pH aralığı 6-7.5 aralığıdır. Bakteri aynı zamanda %0-30 tuzluluktaki yaşam koşullarına dayanabilmektedir (Priest ve ark., 1993).

G. kaustophilus'un genomu 3.54 Mb büyüklüğünde halkasal bir kromozom ve 4.79 kb büyüklüğünde bir halkasal plazmit DNA'sından oluşmaktadır. Genomunda

bulunan 3498 adet genin protein kodlamakta olduğu belirtilmiştir ve protein kodlayan kısım toplam genomunun %86'sını oluşturmaktadır (Leow ve ark., 2006). Bakterinin genomunda bulunan protamin-benzeri gen *G. kaustophilus*'a özgüdür (Takami ve Ark., 2004). *G. kaustophilus*' un kodladığı protamin, spermin sentetaz ve tRNA metiltransferaz proteinlerinin DNA'nın daha sıkı ve kararlı olmasında ve bakterinin yüksek sıcaklıklara dayanıklı olmasında görev yaptıkları düşünölmektedir.

1.4. Tez Çalışmasının Amacı

Arkealardan insanlara kadar birçok farklı organizmada keşfedilmiş olan Lon proteazların yapıları ve çalışma prensipleri devamlı olarak aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Özellikle Lon proteazların hücre içindeki protein kalite kontrol mekanizmasının dışında, diğerkontrol döngülerinde de oynadığı önemli rolün keşfedilmesi ile birlikte bu ailenin üzerinde yapılan bilimsel çalışmalar daha da artmıştır. Farklı organizmalardan yeni Lon proteazların izolasyonu, biyokimyasal ve genetik nitelendirilmesinden elde edilecek veriler, bu özgün proteaz sisteminin hücre içinde oynadığı biyolojik rolü ve çalışma prensiplerini anlamakta yarar sağlayacaktır.

Bu tez çalışması Yüksek Lisans öğrencisi Haluk Camcı'nın tezini oluşturan ve GYTE Bilimsel Araştırma ve Projeleri Komisyonu tarafından desteklenen “ATP-bağımlı Lon proteaz geninin *Geobacillus kaustophilus*'tan klonlanması, DNA dizisinin belirlenmesi ve ekspresyonu” başlıklı proje çalışmasının (2008-A-17) devamını oluşturmaktadır. Bu tez çalışmasında daha önce pGEX-6P1 vektörüne klonlanmış bulunan *G. kaustophilus lon* geninin pET-28a(+) vektörüne altklonlanma ile aktarıldıktan sonra, *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinde ekspresyonu, oluşan 6xHis-Lon füzyon proteininin saflaştırılması ve biyokimyasal olarak nitelendirilmesi hedeflenmiştir.

2. GEREÇ ve YÖNTEMLER

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

2-propanol (Merck), Asetik Asit (Merck), %99.5 Etanol (Merck), β -Merkaptoetanol (Merck), Sodyum Klorür (NaCl) (Merck), Sodyum Hidroksit (NaOH) (Merck), Hidroklorik Asit (HCl) (Merck), Fenol (Riedel de Haen), Kloroform (Riedel de Haen), İzamilalkol (Merck), Tris (Roche), Ampisilin (Sigma-Aldrich), Kanamisin, Agaroza (Bioron), EDTA (Alfa Aesar), Triton X-100 (Applichem), Sükröz (Merck), Etidyum Bromid (EtBr) (Sigma-Aldrich), Bakto Tripton (BD), Bakto Maya özütü (BD), Agar (Fluka), Sodyum fosfat (NaH_2PO_4) (Riedel de Haen), Magnezyum Fosfat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Merck), Magnezyum Sülfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Fluka), Ditiotreitol (DTT) (Sigma-Aldrich), İzopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozit (IPTG) (MBI Fermentas), Glisin (Applichem), Amonyum Persülfat (Applichem), TEMED (Sigma-Aldrich), Sodyum Dodesil Sülfat (Merck), Akrilamid (Sigma), Bisakrilamid (Applichem), Metanol (Merck), Coomassie Brilliant Blue R250 (Merck), Ni-NTA agaroza (Qiagen), İmidazol (Sigma), Bikinkoninik Asit (Alfa Aesar), DMSO (Riedel de Haen), Metoksi- β -naftilamid (MNA) (Bachem), Amonyum Molibdat Tetrahidrat (Sigma-Aldrich), Askorbik Asit (Sigma-Aldrich), Triklor Asetik Asit (TCA) (Sigma-Aldrich).

2.1.2. Kullanılan Enzimler ve Tamponları

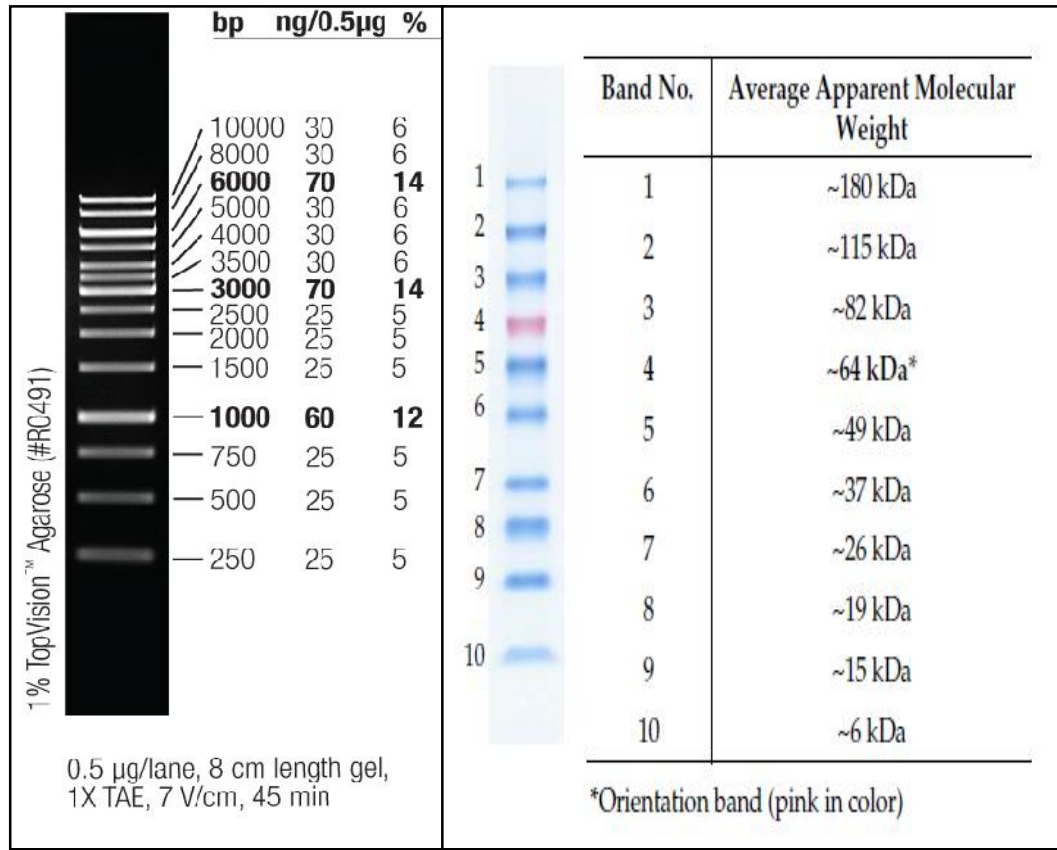
Lizozim (Roche), RNaz A (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), *Bam*HI Restriksiyon Endonükleaz, 10X Tampon O, *Xho*I Restriksiyon Endonükleaz, 10X Tango Evrensel Tampon, T4 DNA Ligaz, 1X Ligasyon Tamponu (MBI Fermentas AB, Vilnius, Lithuania).

2.1.3. Kullanılan Kitler

Mini Plazmit İzolasyon Kiti (Promega Corporation, Madison, USA), Jelden DNA Saflaştırma Kiti (QIAGEN, Standford, USA).

2.1.4. Kullanılan DNA ve Protein Moleküler Belirteçleri

Moleküler DNA Belirteci (MBI Fermentas, O'GeneRular™ 1 kb DNA Marker, SM1163), Moleküler Protein Belirteci (Invitrogen, BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder, 10748-010) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Moleküler DNA ve Protein Belirteçleri. **A.** 1kb Moleküler DNA Belirteci, **B.** Moleküler Protein Belirteci

2.1.5. Kullanılan Peptit ve İnhibitörler

Glutaril-Ala-Ala-Phe-4-metoksi- β -naftilamid (Glt-AAF-MNA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Süksinil-Ala-Ala- Phe-7-amido-4-metilkoumarin (Suc-AAF-AMC) (Bachem Feinchemikalien AG, Switzerland), Karbobenzoksi-Gly-Gly-Leu-7-amido-4-metilkoumarin (Cbz-GGL-AMC) (Bachem Feinchemikalien AG, Switzerland), Fenilmetilsülfonil florit (PMSF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Laktasistin (Calbiochem, San Diego, CA).

2.1.6. Kullanılan Nükleotitler

Adenozin-5'-trifosfat (ATP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Adenozin-5'-difosfat (ADP) (Bachem Feinchemikalien AG, Switzerland).

2.1.7. Kullanılan Proteinler

Sığır Serum Albumin (BSA) (Bioron, Ludwigshafen, Germany), α -Casein Dephosphorylated from bovine milk (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), FITC- α -casein (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

2.1.7. Kullanılan Plazmit Vektörler

2.1.7.1. pET-28a (+) Vektörü

pET vektörleri rekombinant proteinlerin *E. coli*`ye klonlanması, ekspresyonu ve saflaştırılması için geliştirilmiş çok etkili sistemlerdir (Studier ve ark., 1990). Bu vektörlerde klonlanan genlerin transkripsiyonu güçlü bakteriyofaj promotörü T7 kontrolü altında gerçekleşmektedir. pET-28a(+) ekspresyon vektörü N-terminal His-Tag/thrombin/T7-Tag bölgesi içermektedir ve rekombinant proteinler N-terminal histidin kuyruk uzantısı ile eksprese olmaktadır (Şekil 2.2). Rekombinant proteine eklenmiş histidin kuyruk (6xHis) Ni-NTA agaroz kullanılarak gerçekleştirilen afinite

pET-28a(+) vektöründe T7 RNA polimeraz geni *lacUV5* promotorunun kontrolü altındadır. Bu promotor *lac* promotorunun mutasyonla değiştirilmiş bir versiyonudur. *lacUV5* bir laktoz analogu olan IPTG (izopropil β -D tiogalaktozid) ile uyarılır. Ortama IPTG ilave edildiği zaman, T7 RNA polimeraz eksprese olmakta ve klonlanmış hedef genin transkripsiyonunu gerçekleştirmektedir. Böylece N-terminal histidin kuyruk içeren hedef proteininin ekspresyonu gerçekleşir.

2.1.8. Kullanılan Saflaştırma Materyali

İmmobilize metal afinite kromatografisi (IMAC), aminoasitler ile metal iyonları arasında oluşan kovalent bağlara dayanarak geliştirilmiş bir protein saflaştırma tekniğidir. IMAC yönteminde histidin içeren proteinleri ya da peptidleri saflaştırmak için kobalt, nikel ya da bakır gibi immobilize metal iyonları içeren saflaştırma materyalleri; fosforlanmış protein ya da peptidlerin saflaştırılması için ise demir, çinko gibi metal iyonları içeren saflaştırma materyalleri tercih edilmektedir. IMAC yöntemi ile saflaştırılacak olan proteinlere kolon materyalinde bulunan metal iyonlarına karşı afinite göstermelerini sağlayacak bazı ek peptit dizileri eklenmektedir. Kolondaki metal iyonlarına tutunmuş olan proteinler pH değiştirilmesi ya da kolona imidazol gibi bir rekabetçi eklenmesi ile saf bir şekilde kolondan elde edilmektedirler.

Nikel-Nitrilotriasetik Asit (NTA) agaroz (Qiagen) IMAC için sıklıkla tercih edilen bir saflaştırma materyalidir. Ni-NTA polihistidin kuyruk taşıyan proteinlerin bakteriyel lizatlardan saflaştırılması için kullanılan bir metal afinite kromatografi matriksidir. Matrikste bulunan Ni^{+2} iyonları saflaştırılacak hedef proteinlere ekli halde bulunan histidin aminoasitleri ile kovalent olarak bağlanmakta ve 6xHis kuyruğu bağlı proteinlerin kolonda bağlı kalmasını sağlamaktadır. Kolonda tutunmuş proteinler histidin rezidülerine karşı daha yüksek afinite gösteren imidazol içeren elüsyon tamponları ile kolondan indirilmektedir.

2.1.9. Kullanılan Bakteri Soyları

Tez çalışmasında *Geobacillus kaustophilus lon* geninin pGEX-6P1 vektöründen çıkarılarak pET-28a(+) vektörüne altklonlanması sırasında *E. coli* DH5 α hücre soyu kullanılmıştır. *E. coli* DH5 α soyu GYTE Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Moleküler Genetik Laboratuvarı, Doç. Dr. Sedef Tunca Gedik'ten temin edilmiştir. *E. coli* DH5 α rekombinant DNA çalışmaları için oldukça kullanışlı bir soydur. Bu bakteriler hücre içi endonükleaz A1 mutantıdır ve bu sayede hücrelerdeki plazmit kararlılığı oldukça yüksektir. *E. coli* DH5 α hücrelerinde *hsdR17* mutasyonu ile *EcoKI* restriksiyon-modifikasyon sistemi ortadan kaldırılmıştır; böylece DNA'nın metilasyona bağlı yıkımı engellenmektedir. Bu hücrelerin diğer bir özelliği ise RecA mutantı olmalarıdır ve bu sayede homolog rekombinasyon, plazmit multimerizasyonu ve yapısal delesyonların oluşması engellenmektedir. *E. coli* DH5 α hücre kültür stokları %20 gliserol içeren Luria Broth besiyerindeki -80°C'ta saklanmışlardır.

Tez çalışmasının daha sonraki basamağında *G. kaustophilus* Lon proteazın yüksek oranda ekspresyonunun sağlanması amacıyla pET-28a(+)/*lon* DNA'sı kompetan *E. coli* BL-21(DE3) hücrelerine aktarılmıştır. Laboratuvarımızda daha önceden de kullanılmış olan *E. coli* BL-21 CodonPlus (DE3) hücreleri National Bio-Reaearch Project, National Institute of Genetics (NIG) (Japan)'dan temin edilmiştir. Bu hücreler pET-28a(+) gibi T7 promotörü kontrolü altında olan plazmitlerden yüksek oranda protein ekspresyonuna olanak sağlar. Ayrıca *E. coli* BL-21(DE3) hücreleri bir dış membran proteaz kodlayan *ompT* geninde mutasyon taşırlar ve böylece eksprese olan rekombinant proteinin hücrede uzun süre stabil kalır. Bu nedenle *E. coli* BL-21(DE3) protein ekspresyon çalışmalarında yüksek oranda tercih edilen bir hücre soyudur. Konakçı *E. coli* soylarında kaynak hücrelerde bulunan bazı tRNA'ların az miktarda bulunması heterolog proteinlerin ekspresyonunu sınırlanmaktadır. BL21-CodonPlus (DE3) hücreleri bu nadir bulunan tRNA genlerinin fazladan kopyalarını taşırlar ve bu sayede hücrelerde oluşabilecek tRNA eksikliği engellenmiş olur. BL21-CodonPlus (DE3) hücreleri 80°C'ta bulunan gliserol stoklardan alınarak çoğaltılmışlardır.

2.1.10. Kullanılan Besiyeri ve Çözeltiler

Hazırlanan çözeltiler, besiyerleri ve solüsyonlar 121°C'ta 20 dakika süre ile otoklavlanarak sterilize edilmişlerdir.

➤ **Luria Broth (1 L, pH 7.5)**

- Tripton 10 g
- Maya Özütü 5 g
- NaCl 10 g

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.

➤ **SOB Medyum (1 L)**

- Tripton % 2
- Maya Özütü % 0.5
- NaCl 10 mM
- KCl 2.5 mM
- MgCl₂ 10 mM
- MgSO₄ 10 mM

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.

➤ **SOC Medyum (1 L)**

SOB medyuma son konsantrasyon 20 mM olacak şekilde Glikoz eklenir.

➤ **Ampisilin (5 ml, 100 mg/ml)**

0.5 g Ampisilin dH₂O ile 5 ml'ye tamamlanır. Filtreden geçirilerek sterilize edilir.

➤ **Kanamisin (5 ml, 30 mg/ml)**

0.15 g Kanamisin dH₂O ile 5 ml'ye tamamlanır. Filtreden geçirilerek sterilize edilir.

➤ **IPTG (100 mM, 10 ml)**

0.238 g IPTG 10 ml dH₂O ile çözülür. Filtreden geçirilerek sterilize edilir.

Plazmit İzolasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar

➤ STET Tamponu (pH 8, 1 L)

- Sükroz % 8
- Tritron X-100 % 5
- EDTA 50 mM
- Tris 50 mM

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.

➤ Lizozim (5 ml, 10 mg/ml)

5 mg Lizozim 10 mM Tris-EDTA (pH 8) içinde çözülür.

➤ Alkali Lizis- Solüsyon I (pH 8)

- Tris 25mM
- Glikoz 50 mM
- EDTA 10 mM

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.

➤ Alkali Lizis- Solüsyon II (1 L)

- NaOH 0.2 N
- SDS % 1

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.

➤ Solüsyon III (100 mL)

- 5 M Potasyum Asetat 60 ml
- 43.5 M Glasiyal Asetik Asit.....11.5 ml
- dH₂O 28.5 ml

➤ Kloroform-İzoamilalkol (50 ml)

- Kloroform 48 ml
- İzoamilalkol 12 ml

Transformasyon İçin Kullanılan Solüsyon

➤ TSS Tamponu (pH 6.5)

- PEG (6000 g/mol) % 10
- DMSO % 5
- $MgCl_2$ 50 mM

Ni-NTA Saflaştırma İçin Kullanılan Solüsyonlar

➤ Lizis Tamponu (pH 8,)

- NaH_2PO_4 50 mM
- NaCl 300 mM
- İmidazol 5 mM

➤ Yıkama Tamponu (pH 8)

- NaH_2PO_4 50 mM
- 300 mM NaCl
- 20 mM İmidazol

➤ Elüsyon Tamponu (pH 8)

- NaH_2PO_4 50 mM
- NaCl 300 mM
- İmidazol 250 mM

➤ 200 mM $MgCl_2$ (50 ml)

2.03 g $MgCl_2$, dH₂O ile 50 ml'ye tamamlanır.

BCA İçin Kullanılan Solüsyonlar

➤ Solüsyon A (100 ml)

- Sodyum Bikinkoninik Asit (BCA) 1 g
- Sodyum Karbonat 2 g
- Sodyum Tartarat 0.16 g
- NaOH 0.4 g

- Sodyum Bikarbonat 0.95 g
- pH 11.25'e ayarlanarak, dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

➤ **Solüsyon B (10 ml)**

- Bakır Sülfat. 5H₂O 0.4 g
- dH₂O ile 10 ml'ye tamamlanır.

Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Solüsyonlar

➤ **50X TAE Tamponu (1L)**

- Tris 242 g
- Glasiyal Asetik Asit 57.1 ml
- 0.5 M EDTA (pH 8.0) 100 ml

➤ **%0.8'lik Agaroz Jel (40 ml)**

- Agaroz 0.32 g
- EtBr (10µg/µl stoktan) 3 µl
- 1X TAE Tamponu 40 ml

SDS-PAGE İçin Kullanılan Solüsyonlar

➤ **4X Örnek Tamponu (Laemmli Tamponu, pH 6.8)**

- SDS % 4
- Gliserol % 20
- 2-merkapttoetanol % 10
- Bromofenol Mavisi % 0.004
- Tris HCl 0.125 M

➤ **10X SDS Yürütme Tamponu (1 L)**

- Tris 151.5 g
 - Glisin 720 g
 - SDS 50 g
- dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.

➤ **%30 Akrilamid-Bisakrilamid Solüsyonu (pH 7, 1 L)**

- Akrilamid 290 g
 - N.N'-Metilbisakrilamid 10 g
- dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.

➤ **Coomassie Blue Boyama Solüsyonu (1 L)**

- Coomassie Blue R-250 1 g
- Metanol 450 ml
- Glasiyal asetik asit 100 ml
- dH₂O 450 ml

➤ **Boyadan Arındırma Solüsyonu (1L)**

- Metanol 400 ml
- Glasiyal Asetik Asit 100 ml
- dH₂O 500 ml

2.1.11. Kullanılan Cihazlar

+4°C ve -20°C Buzdolabı (Arçelik), -80°C derin dondurucu (Thermo, Forma - 86°C ULT Freezer), Steril Kabin (Heraeus, HP48), Masa Üstü Santrifüj (Heraeus, Labofuge 400R), Masa Üstü Santrifüj (BACKMAN COULTER, Microfuge 22R), Spektrofotmetre (BIO-RAD, Smartspec 3000), Yatay Elektforez Sistemi (BIO-RAD, Mini-Sab Cell CT), Güç kaynağı (BIO-RAD, PowerPac Basic), Otoklav (HIRAYAMA, HİCLA HVE-50), UV Görüntüleme Cihazı (Vilmer Loumart), Dikey Elektforez Sistemi (Bio-Rad Mini-Sab Cell CT), UV Görüntüleme Cihazı (Vilmer Lourmart), Spektrofotmetre (BIO-RAD, Smartspec 3000), pH Metre (Hana Instruments, pH 211 Microprocessor pH Meter), Su banyosu (TECHNE, TE-10A Tempette) Buz makinesi (BAR-LİNE BF85), Floresans Spektrofotometre (VARIAN, EClipse), Elisa okuyucu (Elx800, Universal Microplate Reader, BIOTEK. INS.) UV Spektrofotometre (Beckman Coulter DU 530), Mikrodalga Fırın (Kumtel).

2.2. Yöntemler

2.2.1. *lon* geninin pGEX-6P-1/*lon* Plazmitindeki Varlığının İspatlanması

Geobacillus kaustophilus lon geni laboratuvarımızda daha önce bir yüksek lisans öğrencisi tarafından pGEX-6P-1 ekspresyon vektörüne klonlanmıştır (Camcı, 2009). Bu tez çalışmasında *lon* geni altklonlama ile pET-28a(+) ekspresyon vektörüne aktarılmıştır. pGEX-6P-1/*lon* plazmitini taşıyan DH5α hücreleri -80°C`de bulunan gliserol stoklardan alınarak 100 µg/ml ampisilin içeren LB-agar besiyerine ekilmiş ve gece boyunca 37°C`ta büyütülmüştür. Bu petriden tek bir koloni seçilerek 1.5 ml taze LB`ye ekim yapılmış ve hücreler 37°C`ta gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. pGEX-6P-1/*lon* plazmiti miniprep yöntemi kullanılarak *E. coli* BL-21 hücrelerinden izole edilmiştir (Sambrook ve ark., 1989). Elde edilen plazmitin Gk-*lon* genini taşıyıp taşımadığı, restriksiyon endonükleaz ile kesilerek doğrulanmıştır. Buna göre 420 ng pGEX-6P-1/*lon* DNA'sı, 1X Tampon (*Bam*HI), 10U endonükleaz *Bam*HI içeren 10 µl'lik reaksiyon karışımında 37°C`ta 2 saat boyunca kesilmiştir. Kesim reaksiyonu bittikten sonra reaksiyon karışımı %0.8`lik agaroz jele, moleküler DNA belirteci varlığında yüklenmiş ve 85 V`da 1 saat yürütülerek genin varlığı UV altında görüntülenmiştir.

2.2.2. pGEX-6P-1/*lon* ve pET-28a (+) Plazmitlerinin İzolasyonu

Gk-*lon* geninin pGEX-6P-1 vektöründen çıkartılarak pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanabilmesi için pGEX-6P-1/*lon* vektörünü taşıyan *E. coli* DH5α hücreleri 100 µg/ml ampisilin içeren 5 ml LB besiyerine ve pET-28a(+) plazmitini bulunduran *E. coli* DH5α hücreleri de 30 µg/ml kanamisin içeren 5 ml LB besiyerine ekilmiş ve 37°C`ta 200 rpm`de çalkalanarak 1 gece inkübasyona bırakılmışlardır. Bu kültürler ertesi gün ön kültür olarak kullanılmış ve hücreler 1:100 oranında 100 ml LB-Amp ve 100 ml LB-Kan besi yerlerine inoküle edilmişlerdir. Gece boyu 37°C`ta, 200 rpm`de büyütülen kültürlerden plazmitler, alkali lizis yöntemi ile izole edilmiştir (Sambrook ve ark., 2001).

Ayrı ayrı pGEX-6P-1/*lon* ve pET-28a(+) plazmitlerini içeren peletler nükleaz içermeyen suda çözülmüştür. İzole edilen plazmitlerin varlığı %0.8'lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

2.2.3. Gk-*lon* Geninin pGEX-6P-1/*lon* Ekspresyon Vektöründen Kesilerek Çıkartılması

İzole edilen 4200 ng rekombinant pGEX-6P-1-*lon* plazmit DNA'sı 1X Evrensel Tampon (Tango Buffer), 100 U endonükleaz *Bam*HI varlığında 37°C'ta 3 saat boyunca kesildikten sonra reaksiyon karışımına Evrensel Tampon, 2X olacak şekilde eklenmiş ve ikinci kesim için 100 U *Xho*I eklenerek 37°C'ta 3 saat boyunca kesilmiştir. Reaksiyon örneği agaroz jele yüklenmiş ve DNA fragmanının büyüklükleri 1 kb moleküler DNA belirteci (MBI Fermentas) ile karşılaştırılarak doğrulanmıştır. İstenilen DNA fragmanı UV altında steril bisturi ile kesilerek ependorf tüplere aktarılmıştır. Gk-*lon* gen fragmanının saflaştırılması için jelden DNA saflaştırma kiti kullanılmıştır (QIA Quick Gel Extraction Kit, Qiagen). Kit için belirtilen prosedüre göre saflaştırılan *lon* genine ait DNA, ligasyon reaksiyonunda kullanılmak üzere -20°C'ta saklanmıştır.

2.2.4. pET-28a (+) Ekspresyon Vektörünün *Bam*HI/*Xho*I Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesilmesi

pET-28a(+) vektörü *Bam*HI ve *Xho*I restriksiyon endonükleazlar ile birbirini takip eden iki ayrı reaksiyonda kesilmiştir. 6300 ng pET-28a(+) plazmit DNA'sı 1X Evrensel Tampon, 100 U endonükleaz *Bam*HI varlığında 37°C'ta 3 saat boyunca kesildikten sonra reaksiyon karışımına Evrensel Tampon 2X olacak şekilde eklenmiş ve ikinci kesim için 100 U *Xho*I eklenerek 37°C'ta 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. Reaksiyon ürünü %0.8'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. Restriksiyon endonükleazlarla doğrusal hale getirilmiş 5400 bp büyüklüğündeki pET-28a(+) plazmiti jelden DNA saflaştırma kiti kullanılarak (QIA Quick Gel Extraction Kit,

Qiagen) arındırılmıştır. Saf olarak elde edilen doğrusal pET-28a(+) plazmit DNA'sı ligasyon reaksiyonunda kullanılmak üzere -20°C'ta saklanmıştır.

2.2.5. Gk-*lon* Geninin pET-28a(+) Vektörüne Aktarımı

Rekombinant pGEX-6P-1-*lon* plazmitinden uygun ikili restriksiyon endonükleazlarla kesilip agaroz jelden izole edilen *lon* geni fragmanı, pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. Bu amaçla uygun ikili restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilen pET-28a(+) doğrusal DNA'sı ve *lon* fragmanını içeren ligasyon reaksiyon karışımı; 10X Ligasyon Tamponu içinde 100 ng vektör DNA'sı, 139 ng DNA fragmanı ve 10 U T4 DNA Ligaz içermektedir. Hazırlanan ligasyon karışımı gece boyunca 16°C'ta inkübe edilmiştir.

2.2.6. Transformasyon ve Rekombinant Hücre Seçimi

Altıklonlama çalışmalarında konakçı olarak *E. coli* DH5α hücrelerinin kompetan hale getirilmesi ve transformasyonu için Chung ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem (1989) kullanılmıştır. *E. coli* DH5α hücreleri 5 ml sıvı LB'ye ekilmiş ve 37°C'ta gece boyu 200 rpm'de çalkalanarak inkübe edilmiştir. Ertesi gün bu kültürden 1/10 oranında alınarak kanamisin içeren taze sıvı LB'ye ekilmiş, hücreler 37°C'ta büyümeye bırakılmıştır. Hücrelerin büyüme oranları spektrofotometre ile 600 nm'de ölçülerek takip edilmiştir ve kültürün 0.4-0.5 OD değerine gelmesi beklenmiştir. Kültür istenen OD değerine geldiğinde +4°C'de 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj ile çöktürülmüş ve pelet kültür hacminin 1/10'u kadar TSS ile buz içerisinde çözülmüş ve bu hücreler transformasyon için kullanılmıştır.

Transformasyon için buzda soğutulmuş 1.ml'lik ependorf tüplere yeni hazırlanmış kompetan *E. coli* DH5α hücrelerinden 50 µl hacimlerde dağıtılmış ve her bir ligasyon reaksiyonu 7.5 µl'lik hacimler halinde ayrı ayrı ependorf tüplere aktarılmıştır. Pozitif kontrol olarak 1 µl halkasal pET-28a(+) plazmiti, negatif kontrol için de 1 µl *Bam*HI-*Xho*I restriksiyon enzimleri ile kesilmiş doğrusal pET-28a(+) plazmiti kompetan hücrelere eklenmiştir. Tüpler, buzda 30 dakika inkübe edildikten

sonra 42°C'ta 45 saniye ısı şoku uygulanmış, ısı şokundan hemen sonra buzda 2 dakika bekletilen her bir tüpe, 950 µl SOC medyum eklenmiş, ardından 37°C'ta, 200 rpm'de 1,5 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda tüpler, 10,000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş, üst sıvıdan 500 µl uzaklaştırılmış ve hücre peleti geriye kalan 500 µl besiyeri içinde çözülerek daha yoğun bir süspansiyon elde edilmiştir. Çözölmüş her bir örnekteki hücrelerin tamamı petrilerde kanamisin içeren LB-agar besiyerine yayılmış ve 37°C'ta gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

37°C'ta yapılan inkübasyondan sonra olası rekombinant hücreler toplanmış ve yeni ortama çizilerek saf kültür hazırlanmıştır. Rekombinant koloniler, ortamında geliştirildikten sonra, her birinden mini plazmit izolasyon kiti (Promega Corporation, Madison, USA) kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen rekombinant plazmitlerin analizi, uygun restriksiyon endonükleazlar ile kesilerek yapılmıştır. Kesim reaksiyonları sona erdikten sonra reaksiyon karışımı %0.8'lik agaroz jele 1 kb moleküler DNA belirteci varlığında yüklenmiş ve klonlamanın doğruluğu enzim kesimleri ile de kesinleştirilmiştir.

2.2.7. *E. coli* BL21(DE3) Hücrelerinin pET-28a(+)/lon ile Transforme Edilmesi

E. coli DH5α hücrelerinden izole edilen pET-28a(+)/lon DNA'sı Lon ekspresyonu için daha uygun konakçı olan *E. coli* BL21(DE3) hücresine aktarılmıştır. Transformasyon için yukarıda anlatıldığı şekilde Chung ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem (1989) kullanılarak kompetan BL21(DE3) hücreleri hazırlanmıştır. Kompetan hücelere pET-28a(+)/lon DNA'sının aktarımı ısı şoku transformasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Gece boyu büyütülen transformant BL21(DE3) hücrelerinden olası klonlar seçilmiştir.

Seçilen BL-21 hücrelerinin *lon* genini taşıdıkları tek (pET-28a(+)/lon *Bam*HI ya da *Xho*I) ve çift (pET-28a(+)/lon *Bam*HI ve *Xho*I) restriksiyon endonükleaz kesimleri ile belirlenmiştir. Tek enzim kesimleri için 60 ng pET-28a(+)/lon DNA'sı, 1X tampon (*Xho*I), 10 U endonükleaz *Xho*I içeren 10 µl'lik reaksiyon karışımı

37°C'ta 2 saat boyunca kesilmiştir. Çift enzim kesimlerinde ise 90 ng saat/*lon* DNA'sı 2X Tango tamponu ve 20 U endonükleaz *Bam*HI varlığında 37°C'ta 2 saat kesildikten sonra, reaksiyon karışımı 20 U endonükleaz *Xho*I ve toplam 2X olacak şekilde Tango tamponu eklenerek 2 saat daha 37°C'ta inkübe edilmiştir. Kesim reaksiyonları sona erdikten sonra reaksiyon karışımı %0.8'lik agaroz jele 1 kb moleküler DNA belirteci varlığında yüklenmiş ve klonlamanın doğruluğu enzim kesimleri ile de kesinleştirilmiştir.

2.2.8. Lon Proteaz Ekspresyonu ve Hücre Özütlerinin Hazırlanması

pET-28a(+) plazmiti üzerinde Gk-*lon* genini içeren rekombinant BL21(DE3) *E. coli* hücreleri kanamisin içeren sıvı LB'de gece boyu büyütüldükten sonra 1/20 oranında taze LB besiyerine ekilmişlerdir. İkincil kültürler 37°C'ta, 200 rpm'de, optik yoğunlukları 600 nm'de 0.6'ya gelene kadar büyümeye bırakılmışlardır. Kültürler istenen OD değerine ulaştığı zaman kültür son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG ile uyarılmıştır. Kültürler her saat başı 1'er ml örnek alınarak 37°C'ta 200 rpm'de 4 saat büyütülmüştür. Kontrol grubu olarak *E. coli* BL21(DE3) hücreleri, *lon* geni içermeyen pET-28a(+) plazmiti ile transforme edilmiştir ve benzer şekilde 1 mM IPTG ile uyarılarak 4 saat büyütülmüştür. Kültürlerin IPTG ile uyarılmasından önceki ve sonraki protein ekspresyon profilleri %12'lik SDS-PAGE'de gözlenmiştir.

4. saat sonunda Gk-Lon'un yüksek oranda eksprese olmuş olduğu BL21(DE3) hücre kültürleri +4°C'ta, 4000 rpm'de, 20 dakika santrifüj ile çöktürülmüştür. Hücre peletleri, Ni-NTA saflaştırma protokolüne göre hazırlanmış lizis tamponu içinde çözülmüşlerdir. Hücre çözeltisi üzerine 1mg/ml lizozim eklenerek karıştırılmış ve buz içerisinde 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda hücreler 64 mikronda aralarında 10'ar saniye soğutma süresi olan 10'ar saniyelik 6 sonikasyon prosedürü ile parçalanmıştır. Homojenat, 10000 g'de +4°C'ta 25 dakika santrifüj edilerek hücre kalıntılarından uzaklaştırılmış ve üst sıvı steril şişelere alınarak -20°C'ta saflaştırma işlemleri için saklanmıştır. 6xHis-Lon proteinlerini içeren hücre özütleri %12'lik SDS-PAGE'de görüntülenmiştir.

2.2.9. Rekombinant 6xHis -Lon Proteininin Saflaştırılması

Rekombinant 6xHis-Lon proteinini bulunduran hücre özütleri Ni^{2+} -Nitrilotriasetik asit (Ni-NTA) kolonunda (Qiagen, Stanford, USA) immobilize metal afinite kromatografisi ile tek basamakta üreticinin önerdiği şekilde saflaştırılmıştır. Hücre özütleri 0.45 μm filtreden geçirildikten sonra her 4 ml hücre özütü için 1 ml olacak şekilde Ni-NTA agaroz rezin ile karıştırılmış ve $+4^\circ\text{C}$ 'ta 200 rpm'de 1 saat çalkalanmıştır. Ni-NTA ile karışmış hücre özütü kolona yüklenmiştir ve kolon 20 mM imidazol içeren 4 ml yıkama tamponu ile 2 kez yıkanarak bağlanmayan proteinlerin tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ni-NTA'ya bağlanmış 6xHis-Lon proteinlerinin elde edilmesi için kolondan 250 mM imidazol içeren elüsyon tomponu geçirilmiştir. Elde edilen fraksiyonlardaki protein miktarı 280 nm ve 235 nm dalga boyunda UV spektrofotometre (BIO-RAD, Smartspec 3000) ile ölçülerek belirlenmiştir. Toplanan fraksiyonlar aynı zamanda %12'lik SDS-PAGE ile görüntülenmiştir.

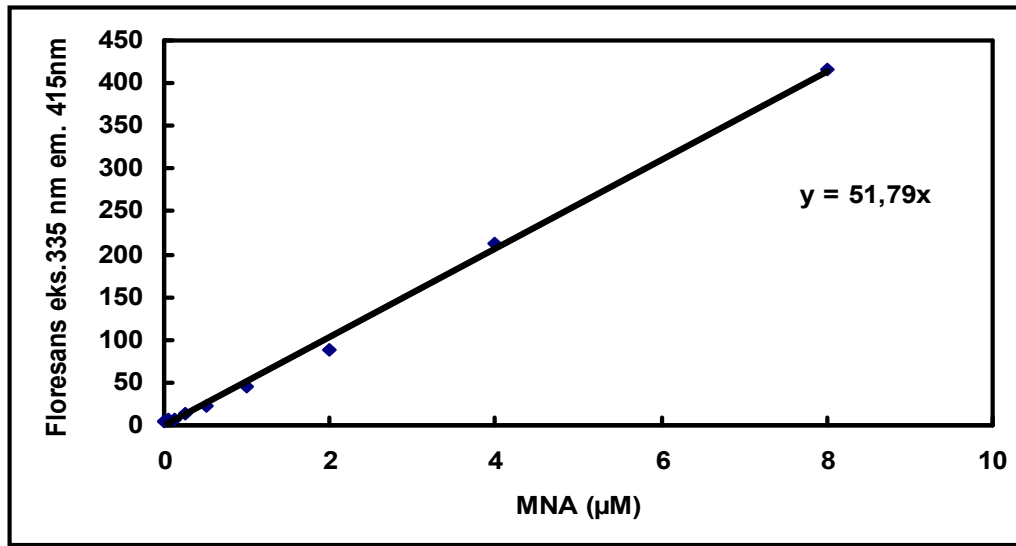
2.2.10. Gk-Lon'un Biyokimyasal Nitelendirilmesi

2.2.10.1. Gk Lon Peptidaz Aktivitesinin Tayini

Saflaştırılmış 6xHis ekli *G. kaustophilus* Lon proteinin *in vitro* ortamda peptidaz aktivitesinin belirlenmesi için bir florojenik peptit olan Glutaril-Ala-Ala-Phe-4-metoksi- β -naftilamit (Glt-AAF-MNA) kullanılmıştır (Waxman ve Goldberg, 1985). 5 μg Lon proteaz, toplam hacim 100 μl olacak şekilde 50 mM Tris-HCl, 1 mM DTT (pH 8.0) içeren deney tamponunda, 7.5 mM MgCl_2 ile birlikte, 1 mM ATP varlığında ve yokluğunda, 10 dakika oda sıcaklığında ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Peptidaz aktivitesi, son yoğunluğu 2.5 μM olacak şekilde substrat ilavesi ile başlatılmıştır. 55°C 'ta 20 dakika süre ile gerçekleştirilen reaksiyon, 900 μl %1 SDS eklenmesi ile durdurulmuştur. Serbest kalan MNA miktarı 335 nm eksitasyon ve 415 nm emisyon dalga boyunda Floresans Spektrofotometrede (VARIAN, Eclipse).ölçülmüştür.

Gk-Lon peptidaz aktivitesi aynı zamanda, diğer bir adenin nükleotit olan ADP varlığında (1 mM) ve yokluğunda yukarıda belirtilen deney koşullarında ölçülmüştür.

Enzim aktivite ölçümleri için MNA/Substrat kalibrasyon eğrisi seri dilüsyonlar yapılarak hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin denklemi $y=51.79x$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 2.1). Emisyon 415 nm dalga boyunda elde edilen değerler denklemde y yerine konulmuş ve açığa çıkan MNA miktarı nmol olarak hesaplanmıştır. MNA hidroliz aktivitesinin bir ünitesi bir dakikada nmol MNA çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.



Şekil 2.1: Enzim aktivite ölçümleri için MNA/Substrat kalibrasyon eğrisi.

2.2.10.2. ATP Konsantrasyonunun Gk-Lon Peptidaz Aktivitesine Etkisi

Gk-Lon peptidaz aktivitesinde ATP konsantrasyonunun etkisinin belirlenebilmesi için 10 µg Gk-Lon, 0,5 ile 3 mM arasındaki farklı konsantrasyonlarda ATP varlığında, 2.5 µM Glt-Ala-Ala-Phe-MNA ile 7.5 mM MgCl₂ içeren deney tamponu içinde standart koşullarda inkübe edilmiştir. Her bir reaksiyon 55°C'ta 20 dakika inkübe edildikten sonra enzim aktivitesi durdurulmuştur. Serbest kalan MNA miktarı daha önce belirtilen standart reaksiyon koşulları altında ölçülmüştür.

2.2.10.3. Gk-Lon Peptidaz Aktivitesi için Optimum Reaksiyon Süresinin Belirlenmesi

Gk-Lon peptidaz aktivitesi için optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi amacıyla enzim, 7.5 mM $MgCl_2$ içeren deney tamponu içinde oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiş ve 1 mM ATP ve florojenik peptit substrat Glt-Ala-Ala-Phe-MNA ilavesi ile 55°C'de enzimatik reaksiyonlar başlatılmıştır. Reaksiyonlar, 10-90 dakika arasında değişen farklı süreler sonunda %1'lik SDS ilavesi ile durdurulmuştur ve peptidaz aktivitesi standart reaksiyon koşulları altında ölçülmüştür.

2.2.10.4. Substrat Konsantrasyonunun Gk-Lon Peptidaz Aktivitesine Etkisi

Gk-Lon peptidaz aktivitesi için optimum substrat konsantrasyonu farklı konsantrasyonlardaki florojenik Glt-Ala-Ala-Phe-MNA substratının kullanılması ile belirlenmiştir. Enzim, standart deney tamponu içinde oda sıcaklığında 10 dakika ön inkübasyona tutulduktan sonra farklı konsantrasyonlardaki (1 -5 μM) substrat ilavesi ile reaksiyonlar başlatılmıştır. Her bir reaksiyon 55°C'ta 20 dakika inkübe edildikten sonra enzim aktivitesi durdurulmuştur. Serbest kalan MNA miktarı daha önce belirtilen standart koşullar altında ölçülmüştür.

2.2.10.5. pH'nın Gk-Lon Peptidaz Aktivitesine Etkisi

Gk-Lon peptidaz aktivitesinin optimum pH'sını belirlemek için farklı pH değerlerinde reaksiyon tamponları kullanılmıştır. Bu tamponlar: pH 4.0-5.0 aralıklarında 50 mM Sodyum asetat, pH 6.0-7.5 aralıklarında 50 mM MOPS, pH 8.0-9.0 aralıklarında 50 mM Tris-HCl, pH 9.5-11 aralıklarında 50 mM Glisin tamponlarıdır (Her bir tampon 1 mM DTT içermektedir). Enzim belirtilen tamponlar içinde 10 dakika oda sıcaklığında ön inkübasyona tabi tutulduktan sonra, 1 mM ATP ve 7.5 mM $MgCl_2$ varlığında peptit substrat Glt-Ala-Ala-Phe-MNA ilavesi ile 55°C'ta 20 dakika inkübe edilmiştir. Aynı şekilde gerçekleştirilen fakat enzim içermeyen reaksiyonlar kontrol olarak kullanılmıştır.

2.2.10.6. Sıcaklığın Lon Peptidaz Aktivitesine Etkisi

Enzimin aktivitesi için optimum sıcaklık, substrat olarak Glt-Ala-Ala-Phe-MNA kullanılarak belirlenmiştir. Gk-Lon-substrat karışımı daha önce belirtilen standart reaksiyon koşulları altında 20-80°C arasındaki sıcaklıklarda 20 dakika süre ile inkübe edilmiştir.

2.2.10.7. Mg^{2+} 'nin Lon Peptidaz Aktivitesine Etkisi

Mg^{2+} metal iyonunun Gk-Lon aktivitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi için 0-15 mM arası değişen konsantrasyonlarda magnezyum tuzları ($MgCl_2$) reaksiyon karışımına ilave edilmiştir. Enzim aktivitesi 1 mM ATP varlığında daha önce belirtilen şartlarda 55°C'ta 20 dakika süren reaksiyon sonunda ölçülerek belirlenmiştir.

2.2.10.8. Lon Tarafından Çeşitli Florojenik Peptidlerin Yıkımı

Lon proteazın farklı florojenik peptitlerin Glutaril-Ala-Ala-Phe-MNA'ya göreceli yıkım aktivitesinin belirlenebilmesi için standart deney tamponu ile birlikte substrat olarak 250 μ M Suksinil-Ala-Ala-Phe-7-amido-4-metilkoumarin (Suc-AAF-AMC) ve 250 μ M Benziloksikarbonil-Gly-Gly-Leu-7-amido-4-metilkoumarin (Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC) kullanılmıştır. Enzim reaksiyonları 55°C'ta 20 dakika inkübasyondan sonra durdurulmuştur. Enzim aktivitesi 335 nm eksitasyon ve 415 nm emisyon dalga boyunda serbest kalan AMC miktarına göre ölçülerek belirlenmiştir.

2.2.10.9. Çeşitli Proteaz İnhibitörlerinin Lon Peptidaz Aktivitesine Etkisi

Saflaştırılan Gk-Lon proteazın inhibitörlere karşı hassasiyetini belirlemek için farklı oranlarda olan Fenilmetilsülfonit Florit (PMSF) (serin proteaz inhibitörü) ve Laktasistin (proteazom inhibitörü) ile oda sıcaklığında 15 dakika ön inkübasyona tabi

tutulmuşlardır. Enzimin inhibitör ile muamelesinden sonra kalan enzim aktivitesi substrat olarak Glt-Ala-Ala-Phe-MNA kullanılarak 1 mM ATP ve 7.5 mM MgCl₂ varlığında daha önce belirtilen koşullarda belirlenmiştir. Kalan aktivite aynı şartlar altında inhibitör yokluğundaki enzim aktivitesinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

2.2.10.10. Lon Tarafından Fluorescein Isothiocyanate (FITC)- Kazein Yıkımı

Kazein birçok bakteri de olduğu gibi ökaryotik ATP bağımlı proteazlarda da kullanılan bir protein substrattır (Twining, 1984). Floresan Isotiosiyanat ile etiketlenirilmiş kazeinin (FITC) yıkımı, floresan ile etiketlenmiş peptit oluşumu ile sonuçlanmakta ve oluşan ürün miktarı florometrik spektrofotometre ölçülmektedir. Gk-Lon proteazın FITC-kazein substratını yıkım aktivitesinin belirlenmesi amacıyla Lon enzimi ve 10 µg-FITC-kazein ile 7,5 mM MgCl₂ ve 1 mM ATP varlığında 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tampon içinde 55°C`ta 1 saat inkübe edilmiştir. Reaksiyonlar, 1 mg/ml BSA ve %10 TCA eklenmesi ile durdurulmuştur. Reaksiyon tüpleri 10 dakika buz içinde bekletildikten sonra, TCA`den arındırılmak için 13000 rpm`de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra yeni tüplere aktarılan süpernatant 0.5 M CHES-Na, pH 12 ile nötralize edilmiştir. Reaksiyon sonucunda açığa çıkan FITC miktarı eksitasyon 490 nm ve emisyon 525 nm dalga boyunda floresans spektrofotometre (VARIAN, Eclipse) ile ölçülmüştür.

2.2.10.11. Lon Tarafından α -Kazein Yıkımı

Gk-Lon`un proteaz aktivitesi diğer bir protein substrat olan sığır sütünden elde edilen α -kazein kullanılarak SDS-PAGE ile analiz edilmiştir. Farklı miktarlardaki substrat protein (5, 10 ve 15 µg), Gk-Lon (15 µg) ile 7.5 mM MgCl₂ ve/veya 1 mM ATP varlığında toplam reaksiyon hacmi 100 µl olacak şekilde 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tampon içinde 55°C`ta 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra hacmi liyafizator ile buharlaştırılarak azaltılan örneklerden 20 µl alınarak SDS-PAGE`de yüklenmiştir. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel Coomassie Brilliant Blue-R250 boyanarak Gk-Lon`un α -kazeini yıkıma uğratıp uğratmadığı tespit edilmiştir.

2.2.10.12. Lon ATPaz Aktivitesinin Tesbiti

Lon ATPaz reaksiyonu 50 mM Tris-HCl ve 1 mM DTT (pH 8.0) içeren deney tamponunda, 7.5 mM MgCl₂, 1 mM ATP ve/veya 250 µM Glt-Ala-Ala-Phe-MNA varlığında, 55°C'ta 20 dakikada gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar 200 µl %1 sodyum dodesil sülfat (SDS) ilavesi ile durdurulmuştur. Oluşan inorganik fosfatın ölçümü Ames yöntemine göre yapılmıştır (1966). Bu yöntemle göre durdurulan reaksiyonların üzerlerine 100 µl %10 askorbik asit, 600 µl 1 N H₂SO₄ içinde %4,2 Amonyum molibdat içeren karışım ilave edilmiş ve tüpler 37°C'ta 1 saat inkübe edilmiştir. Açığa çıkan inorganik fosfat miktarı 820 nm dalga boyunda UV spektrofotometre (Beckman Coulter, DU530) ile ölçülmüştür.

2.2.11. SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Sodyum dodesil sülfat- poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) %0,1 aniyonik deterjan SDS varlığında, Laemmli (1970) tarafından tanımlanan %12 ayırma jeli ve %5 yükleme jeli üzerinde gerçekleştirilmiştir. Dikey jel elektroforezi için için Bio-Rad Mini-Slab Cell CT (Bio-Rad Laboratories INC, USA) kullanılmıştır.

15 µl enzim örnekleri %1 SDS içeren 4X örnek tamponu ile karıştırılarak kaynar suda 5 dakika bekletilmişlerdir. Daha sonra protein örnekleri moleküler ağırlık belirteci (Invitrogen, BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder) ile birlikte jele yüklenmiştir ve jel 90 V'da yürütülmüştür. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel Coomassie Brilliant Blue-R250 ile boyanmış ve daha sonra boyadan arındırma çözeltisi ile birkaç kez yıkanarak boyadan arındırılmıştır. Proteinlerin oluşturduğu bantlar moleküler ağırlık belirtecindeki ağırlığı bilinen protein bantları ile karşılaştırılmış ve proteinlerin moleküler ağırlıkları belirlenmiştir. Her proteinin göreceli mobilitesi (Rf) ayırma jelinin en üst noktasından protein bandının merkezine kadar olan mesafe ile ölçülmüştür. Rf değerleri protein belirtecinin bilinen moleküler ağırlıklarına karşı logaritmik bir grafik ile yerleştirilmiştir ve bir standart eğri

oluşturulmuştur. Proteinlerin moleküler büyüklüklerinin hesaplanması için bu eğri kullanılmıştır.

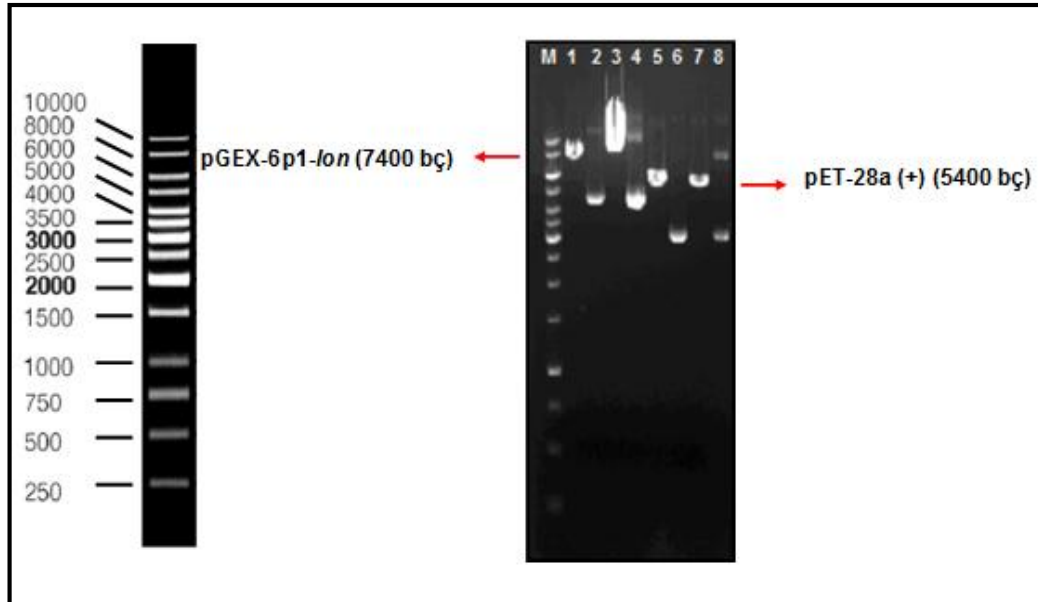
2.2.12. BCA Yöntemi ile Protein Miktarı Tayini

Aktivite deneylerinde kullanılacak olan saflaştırılan protein miktarı BCA (Bicinchoninic asit) yöntemi ile tayin edilmiştir. Elde edilen protein örneklerinden 10 µl 96 kuyulu mikropate plakasına konulmuştur. Taze hazırlanmış 50 hacim solüsyon A ile 1 hacim solüsyon B karıştırılarak oluşturulan BCA solüsyonundan 200 µl her bir örnek üzerine eklenmiştir. Standart olarak farklı konsantrasyonlarda (1-20 µg) sığır serum albumini (BSA) kullanılmıştır. 37°C'ta 45 dakika inkübasyona bırakılan örnekler 490 nm absorbans eliza okuyucu (Elx800, Universal Microplate Reader, Biotek. İns.).ile ölçülmüştür. Örnekler içindeki protein miktarları BSA standartlarından elde edilen değerlere göre çizilen standart eğriye dayanarak hesaplanmıştır.

3. BULGULAR

3.1. pGEX-6P-1/*lon* ve pET-28a(+) Vektörlerinin *E. coli* BL21(DE3) Hücrelerinden İzolasyonu

Geobacillus kaustophilus lon geni laboratuvarımızda daha önce bir yüksek lisans öğrencisi tarafından pGEX-6P-1/*lon* ekspresyon vektörüne klonlanmış ve *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine transforme edilmiştir. Gk-*lon* geninin pGEX-6P-1 vektöründen çıkarılıp pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanabilmesi için plazmitler *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinden LiCl ile plazmit izolasyon protokolüne göre izole edilmişlerdir. Bu izolasyonlar ile elde edilen pGEX-6P-1/*lon* ve pET-28a(+) plazmitleri klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere -20°C'ta saklanmışlardır. İzolasyon sonrasında pGEX-6P-1/*lon* ve pET-28a(+) plazmitleri *Bam*HI ve *Xho*I endonükleaz restriksiyon enzimleri ile ayrı ayrı kesilmiş ve kesim reaksiyonu %0.8'lik agaroz jelde analiz edilmiştir (Şekil 3.1).

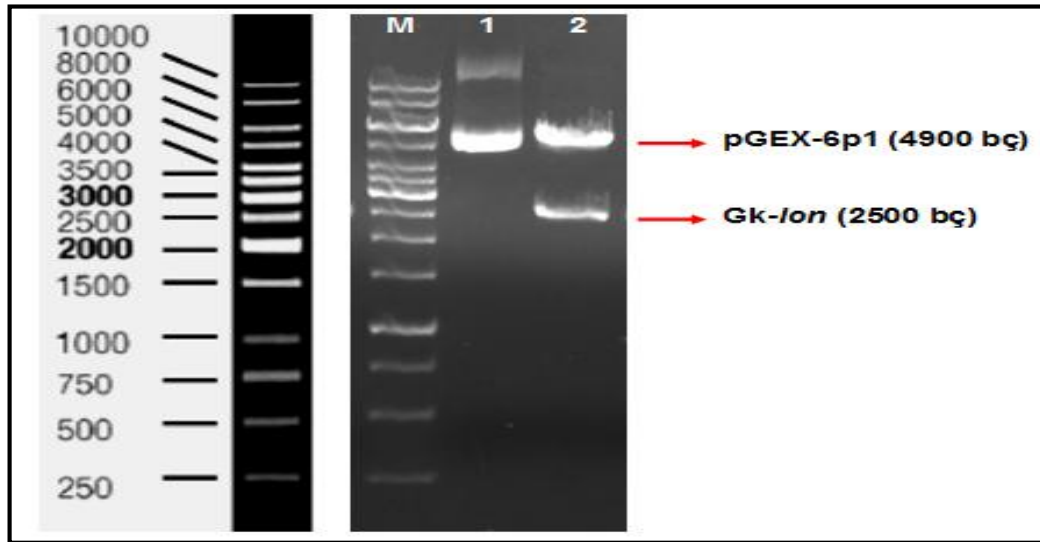


Şekil 3.1: pGEX-6P-1/*lon* ve pET-28a(+) plazmitlerinin *Bam*HI ve *Xho*I restiksiyon enzimleri ile kesildikten sonraki %0.8'lik agaroz jel görüntüsü. **M.** 1 kb moleküler DNA belirteci, **1.** pGEX-6P-1/*lon*'un *Bam*HI ile kesimi, **2.** pGEX-6P-1/*lon*, **3.** pGEX-6P-1/*lon* 'un *Xho*I ile kesimi, **4.** pGEX-6P-1/*lon*, **5.** pET-28a(+)'nın *Bam*HI ile kesimi, **6.** pET-28a(+), **7.** pET-28a(+) 'ın *Xho*I ile kesimi, **8.** pET-28a(+).

Analiz sonunda UV altında görüntülenen jelde 4900 bç uzunluğunda olan pGEX-6P-1 plazmitinin 2500 bç'lik *lon* geni ile birlikte 7400 bç'lik bir bant oluşturduğu, pET-28a(+) plazmitinin ise 5400 bç uzunluğunda olduğu şekil 3.1'de görülmektedir.

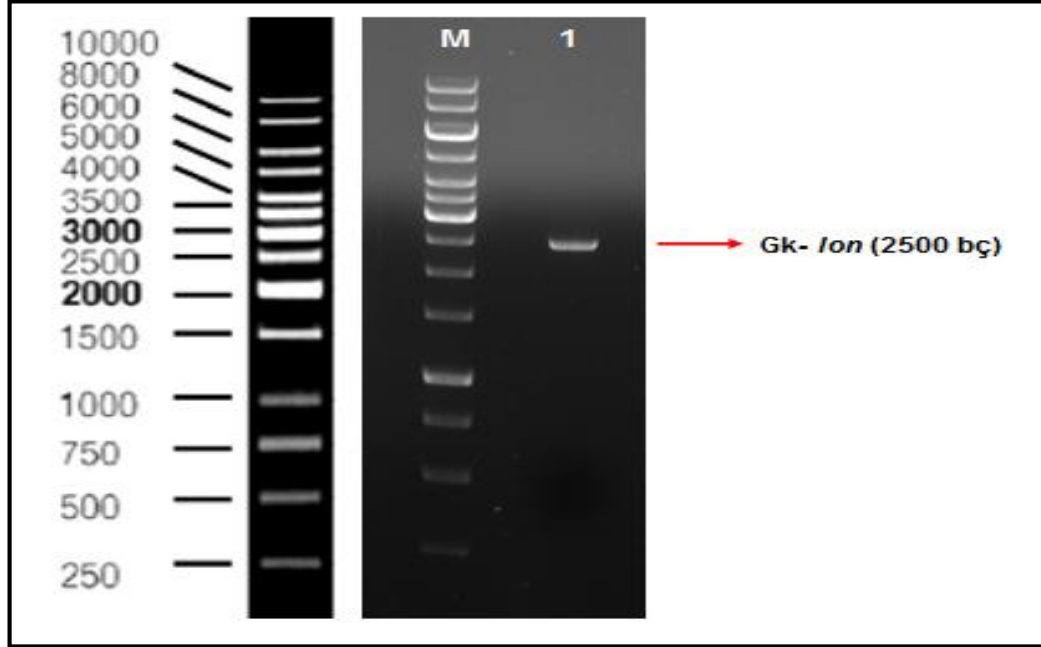
3.2. Gk-*lon* Geninin pGEX-6P-1 Vektöründen Restriksiyon Endonükleazlarla Kesilerek Çıkartılması ve pET-28a(+) Vektörüne Klonlanması

pGEX-6P-1 vektörüne klonlanan 2500 bç uzunluğundaki Gk-*lon* DNA'sı *Bam*HI ve *Xho*I endonükleaz enzimleri ile kesildikten sonra aynı kesim bölgelerinden pET-28a(+) ekspresyon vektörüne bağlanmıştır. pGEX-6P-1 plazmitinde bulunan Gk-*lon* DNA'sı ligasyon reaksiyonlarında kullanılmak üzere uçlarında bulunan *Bam*HI ve *Xho*I restriksiyon endonükleazlar ile kesim bölgelerinden birbirini takip eden iki ayrı reaksiyonda kesilmiştir. Kesim reaksiyonları agaroz jele yüklendiğinde 2500 bç'lik *lon* ve 4900 bç'lik pGEX-6P-1 vektörüne ait DNA fragmanları gözlenmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: *Bam*HI ve *Xho*I restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilen pGEX-6P-1/*lon* plazmitinin %0.8'lik agaroz jel görüntüsü. **M.** Moleküler DNA belirteci, **1.** pGEX-6P-1/*lon*, **2.** pGEX-6P-1/*lon*'un *Bam*HI ve *Xho*I ile kesimi.

E. coli BL21(DE3) soyundaki pGEX-6P-1/*lon* plazmitlerinden elde edilen yapışkan uçlu *lon* fragmanı pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanmak üzere jelden kit ile saflaştırılmıştır (Şekil 3.3).

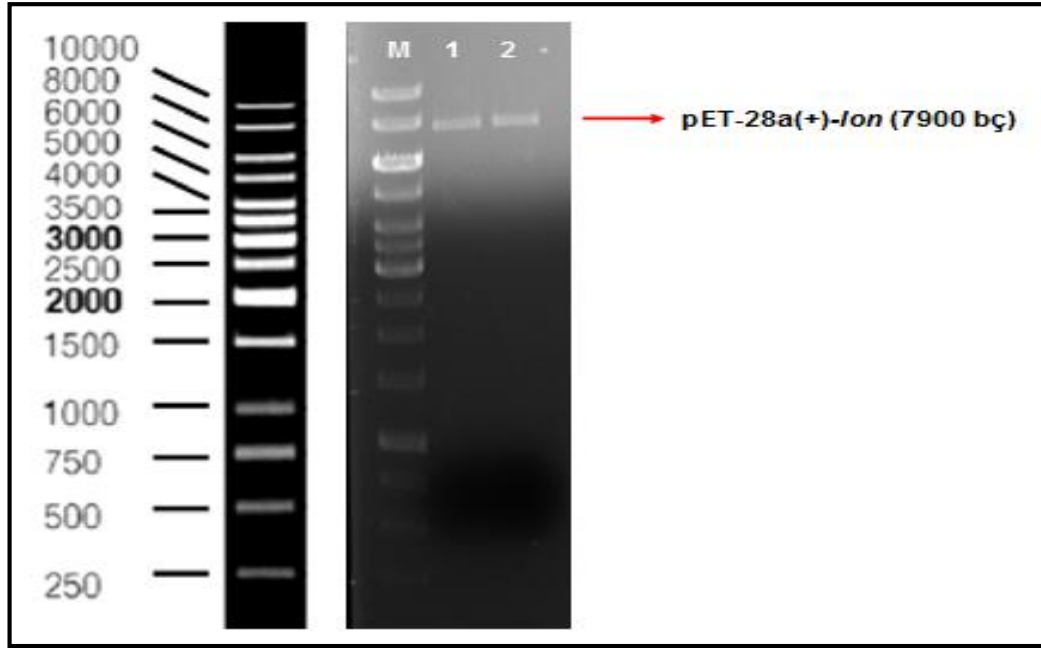


Şekil 3.3: Agaroz jelden kit ile saflaştırılan Gk-*lon* geni DNA fragmanının agaroz jel görüntüsü. **M.** Moleküler DNA belirteci, **1.** Gk-*lon* geni fragmanı.

Klonlamanın yapılacağı pET-28a(+) plazmiti de çoklu klonlama bölgesinden aynı restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve %0.8'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Doğrusal pET-28a(+) plazmitine ait olan 5400 bç'lik DNA fragmanı agaroz jelden kit ile saflaştırılmıştır. *Bam*HI ve *Xho*I enzimleri ile kesildikten sonra elde edilen yapışkan uçlu *lon* DNA fragmanı ile pET-28a(+) plazmiti ligasyon ile birbirlerine bağlanmışlardır.

3.3. Transformasyon ve Rekombinant Koloni Seçimi

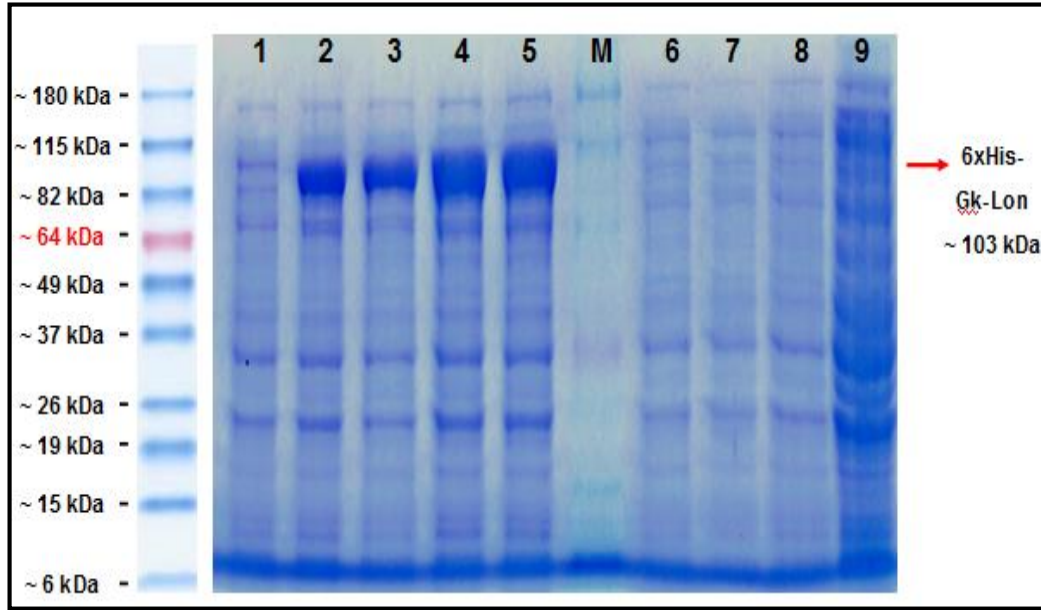
Elde edilen ligasyon ürünü pET-28a(+)/lon plazmiti önce *E. coli* DH5 α hücrelerine transformasyon ile aktararak çoğaltılmıştır. Hücreler kanamisin içeren seçici LB besiyerinde büyütülmüş ve oluşan kolonilerin rekombinant plazmit içerip içermedikleri plazmit izolasyonları ile kontrol edilmiştir. Bu kolonilerden elde edilen rekombinant pET-28a(+)/lon plazmit varlığı restriksiyon endonükleaz kesimleri ile doğrulanmıştır. Buna göre pET-28a(+)/lon DNA'sı *Bam*HI veya *Xho*I ile kesildiğinde kesim sonrası agaroz jelde yaklaşık 7500 bç olması beklenen bir bant Şekil 3.4'te görülmektedir. Elde edilen pET-28a(+)/lon rekombinant plazmiti protein ekspresyonu için daha avantajlı olan *E. coli* BL-21(DE3) hücrelerine aktarılmıştır.



Şekil 3.4: pET-28a(+)/lon rekombinant plazmitini taşıyan *E. coli* BL21(DE3) soyundan yapılan kit ile plazmit izolasyonunun agaroz jeldeki görüntüsü. **M.** Moleküler DNA Belirteci, **1.** pET-28a(+)/lon plazmitinin *Bam*HI ile kesimi, **2.** pET-28a(+)/lon plazmitinin *Xho*I ile kesimi.

3.4. Lon Proteazın Ekspresyonu

Protein ekspresyonu için *lon* geninin klonlandığı pET-28a(+) ekspresyon vektörü *E. coli* BL21(DE3) konakçı hücrelerine transforme edilmiştir. *E. coli* BL21(DE3) hücresi T7 promotoru ile kontrol edilen genler ve genleri içeren plazmitler için tasarlanmıştır. Büyütülen kültür IPTG ile uyarıldığında LacUV5 promotoru ve LacZ geninin küçük bir kısmını içeren yapının kontrolü altında olan T7 polimeraz sentezlenerek salgılanmaya başlar ve T7 promotoru aktifleşerek genin transkripsiyonunu gerçekleştirir. Protein ekspresyonunun en yüksek olduğu zamanı belirlemek amacıyla hücreler IPTG ile uyarıldıktan sonra farklı zamanlarda örnekler alınmıştır. Hücrelerin uyarım öncesi ve sonrasındaki ekspresyon profilleri poliakrilamid jelde görüntülenmiştir (Şekil 3.5).

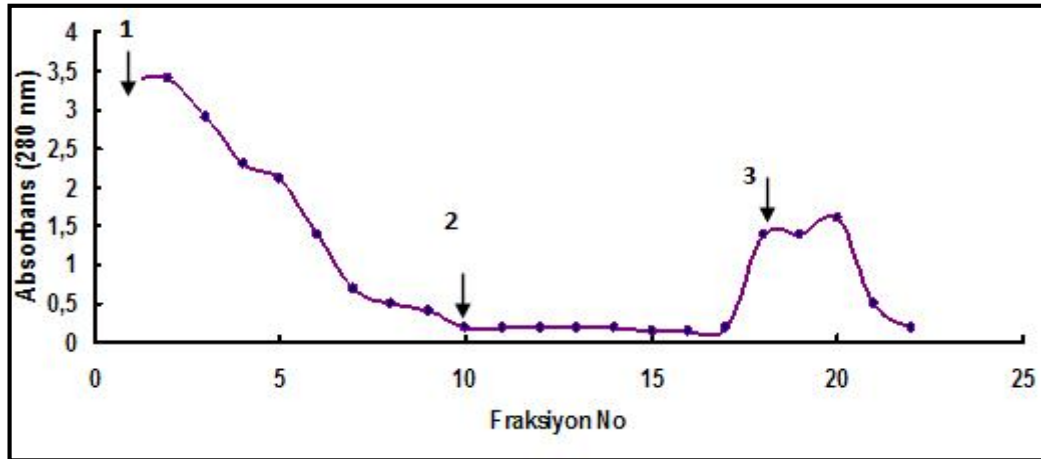


Şekil 3.5: pET-28a(+)/*lon* taşıyan BL-21(DE3) hücrelerinin ve boş pET-28a(+) vektörü taşıyan BL-21(DE3) hücrelerinin IPTG ile uyarılmasıyla zamana göre değişen Lon ekspresyonu. **1.** pET-28a(+)/*lon* BL-21(DE3) IPTG öncesi, **2, 3, 4, 5.** Sırasıyla pET-28a(+)/*lon* BL-21(DE3) IPTG eklenmesinden sonra 1., 2., 3. ve 4. saatler, **M:** Moleküler Protein Belirteci, **6.** pET-28a(+) plazmiti taşıyan BL-21(DE3) IPTG öncesi protein profili, **7, 8, 9.** Sırasıyla pET-28a(+) BL-21(DE3) IPTG eklenmesinden sonra 2., 3. ve 4. saatler.

Jel analizinde 6xHis-Lon proteinin uyarım sonrası 4. saatte yüksek oranda eksprese edildiği saptanmıştır. Jel analizi sonucu 0.84 kDa büyüklüğündeki 6xHis ile füzyon halinde bulunan Lon proteininin yaklaşık 103 kDa olduğu gözlenmiştir. Bununla beraber kontrol grubu olarak *E. coli* BL21(DE3) hücreleri, *lon* geni içermeyen pET-28a(+) plazmiti ile transforme edilmiştir. pET-28a(+) plazmiti taşıyan *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin IPTG ile uyarılması sonucu meydana gelen protein profilinin SDS jeldeki görüntüsü de Şekil 3.6`da görülmektedir.

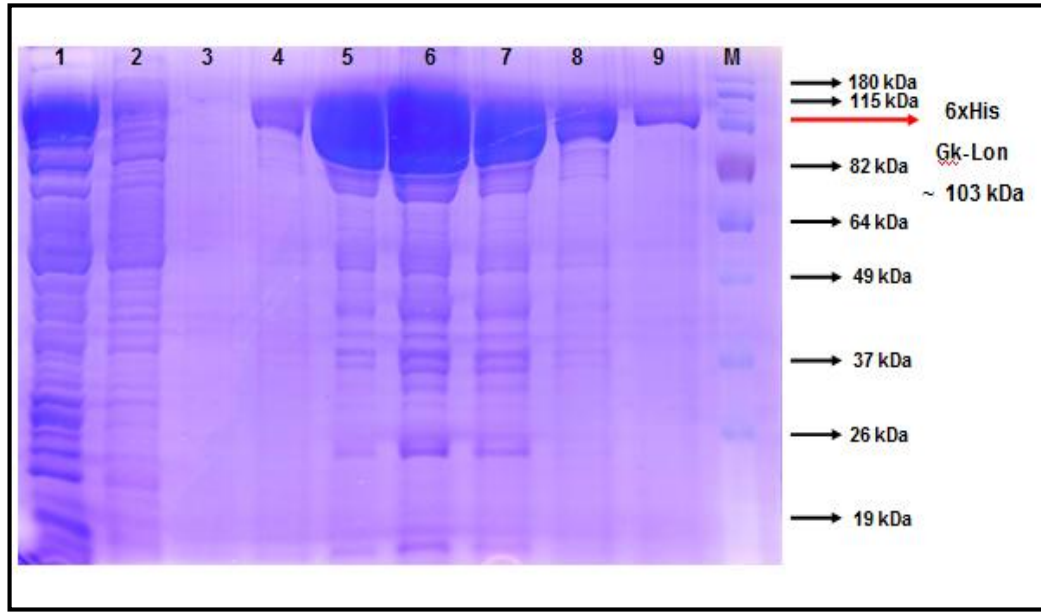
3.5. Lon`un Saflaştırılması

Amino terminalinde ilave olarak 6xHis rezidü içeren *G. kaustophilus* Lon proteini bir immobilize metal afinite kromatografi yöntemi (IMAC) olan Ni-NTA afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Lon`un yüksek oranda eksprese edildiği *E. coli* BL21(DE3) hücre kültürleri sonikasyon ile parçalanmış ve elde edilen hücre özütü, Ni-NTA ile +4°C`ta inkübe edildikten sonra kolona yüklenmiştir. Ni-NTA`ya bağlanmamış proteinler kolondan uzaklaştırıldıktan sonra 6xHis-Lon proteini 250 mM imidazol içeren tampon yardımı ile Ni-NTA`dan ayrılarak kolondan toplanmıştır. Saflaştırmadan sonra toplanan fraksiyonlar 280 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülmüştür (Şekil 3.6).



Şekil 3.6: Gk-Lon proteaz proteininin Ni-NTA afinite kromatografisi ile saflaştırılması. **1-2.** Ni-NTA rezine bağlanmayan proteinlerin fraksiyonları, **2-3.** Yıkama tamponu ile bağlanmayan proteinlerin yıkanması, **3.** Elüsyon tamponu ile elde edilen 6xHis- Lon proteinleri.

Lon proteazın saflaştırma profili SDS-PAGE ile görüntülenmiştir (Şekil 3.7). SDS-PAGE analizi sonucu 6xHis kuyruk ile saflaştırılan Lon proteazın 103 kDa olduğu belirlenmiştir. Bradford analizi sonucu her bir elüsyon fraksiyonundaki proteinlerin miktarı sırasıyla 0.327, 1.219, 1.414, 1.344, 0.477, 0.254 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak tespit edilmiştir. Şekil 3.7’de görülen SDS-PAGE sonuçlarına göre 2, 3 ve 4. elüsyon fraksiyonlarının %70’e varan saflıkta, diğer elüsyon fraksiyonlarının ise %95’e varan saflıkta elde edildiği gözlenmiştir.



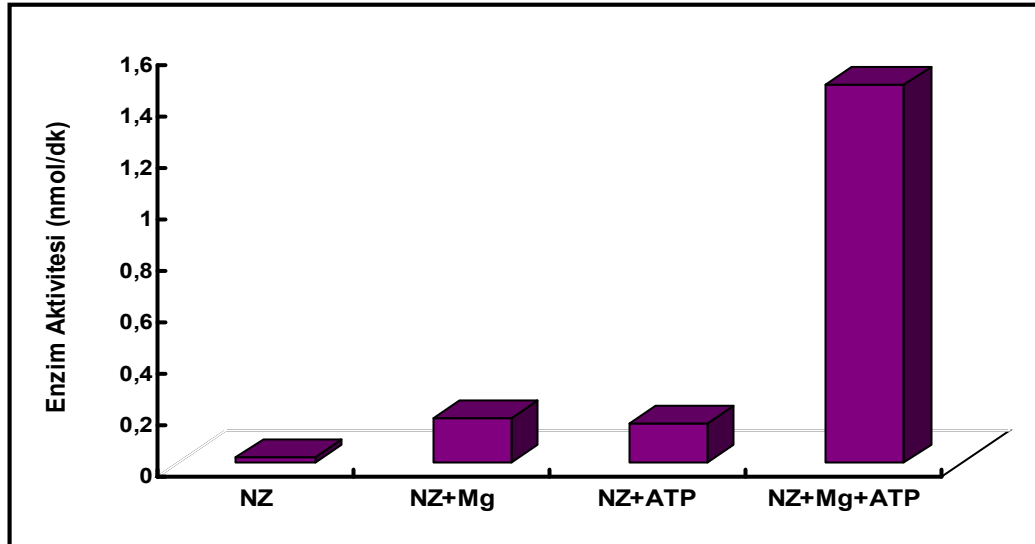
Şekil 3.7: 6xHis-Lon proteinlerinin saflaştırılması. **1.** Kolona bağlanmayan fraksiyonlar, **2-3** Bağlanmayan proteinlerin yıkama örnekleri, **4-9.** 6xHis-Lon elüsyon örnekleri, **M.** Moleküler Protein Belirteci.

3.6. *G. kaustophilus* Lon'un Biyokimyasal Nitelendirilmesi

3.6.1. Lon'un Peptidaz Aktivitesinin Tayini

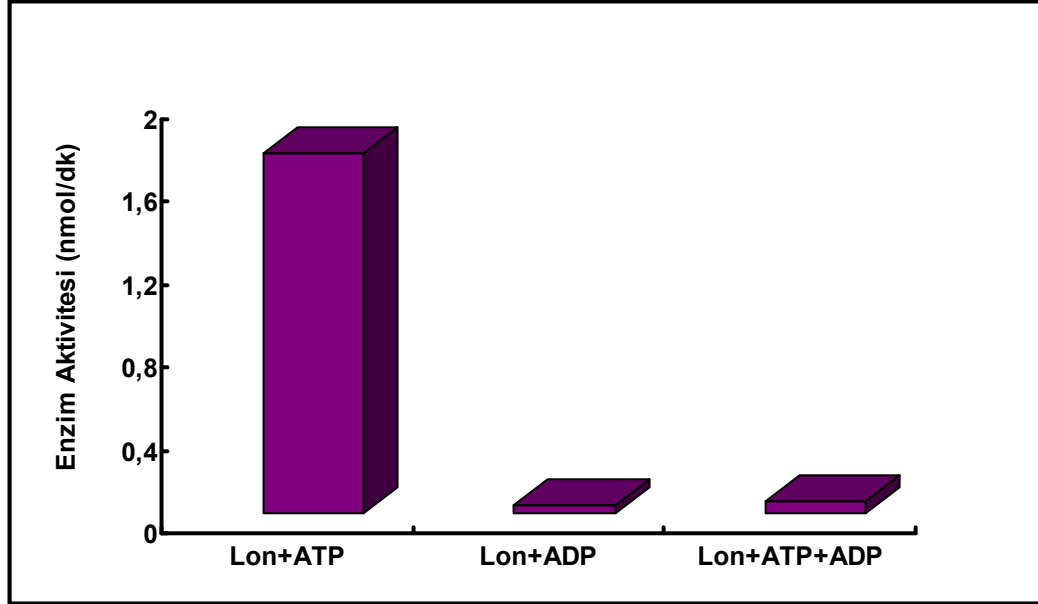
Saflaştırılan 6xHis-Lon proteinin *in vitro*'da aktif peptidaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla daha önceki çalışmalarda Lon tarafından etkin olarak yıkıma uğratıldığı belirlenen florojenik bir substrat olan Glt-Ala-Ala-Phe-MNA kullanılmıştır. Reaksiyonlar gereç ve yöntemlerde belirlenen koşullarda oluşturulmuş ve Lon proteazın, ATP varlığı ve yokluğunda peptit yıkım aktivitesi incelenmiştir (Şekil 3.8).

Şekil 3.8'de görüldüğü gibi Gk-Lon tek başına Glt-Ala-Ala-Phe-MNA'yı bazal seviyede (0.019 nmol/dk) hidrolize ederken, 1 mM ATP varlığında enzim aktivitesinde yaklaşık 7 kat artış gözlenmiştir. Sadece 7.5 mM Mg^{2+} varlığında enzim aktivitesinde (0.17 nmol/dk) bazal seviyedeki enzim aktivitesine göre 9 kat artış gözlenmiştir. Hem ATP hem de Mg^{2+} varlığında ise Gk-Lon, Glt-Ala-Ala-Phe-MNA'yı etkin olarak yıkıma uğratmış (1.47 nmol/dk) ve enzim aktivitesi bazal seviyeye göre 77 kat artmıştır. Enzim aktivite analiz sonuçları 6xHis kuyruğu ile ekli olan Lon proteazın florojenik peptit substratı etkin bir şekilde yıktığını göstermiştir.



Şekil 3.8: Lon proteazın ATP ve Mg^{2+} varlığında peptidaz aktivitesi. (Peptit hidrolizi 5 μ g Gk-Lon, 300 μ M Glt-Ala-Ala-Phe-MNA, 7.5 mM $MgCl_2$ ve 1 mM ATP varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilmiştir.)

Saflaştırılan Lon proteazın peptidaz aktivitesi üzerinde diğer bir nükleotit olan ADP'nin etkisi de incelenmiştir (Şekil 3.9). Lon peptidaz ATP varlığında Glt-Ala-Ala-Phe-MNA'yı 1.74 nmol/dk oranında yıkıma uğrattırken, bu oran ADP varlığında 0.04 nmol/ml olarak tespit edilmiştir. Reaksiyonda ATP varken ADP ilave edildiğinde ise enzim aktivitesinde %96.6 oranında azalma gözlenmiştir.



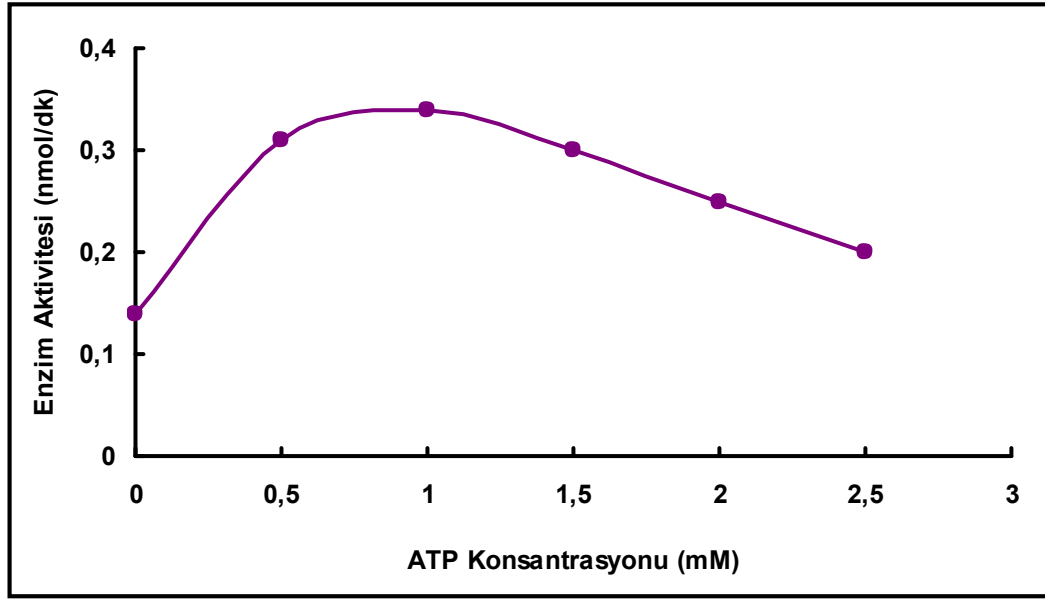
Şekil 3.9: ADP'nin Gk-Lon aktivitesine etkisi. (Peptit hidrolizi 5 µg Gk-Lon, 300 µM Glt-Ala-Ala-Phe-MNA, 7.5 mM MgCl₂ 1 mM ATP ve/veya 1 mM ADP varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilmiştir.)

3.6.2. ATP Konsantrasyonunun Gk-Lon Peptidaz Aktivitesine Etkisi

ATP konsantrasyonunun Gk-Lon peptidaz aktivitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla, enzimin Glt-Ala-Ala-Phe-MNA hidroliz aktivitesi standart reaksiyon koşulları içinde 0-2.5 mM arasında değişen ATP konsantrasyonlarında gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.10).

Daha önce belirtildiği gibi Lon ATP'den bağımsız olarak da florojenik peptit substratı düşük oranda da olsa (0.14 nmol/dk) hidroliz etmiştir. ATP varlığında ise enzim aktivitesi artış göstermiştir. En yüksek enzim aktivitesi ise 1 mM ATP

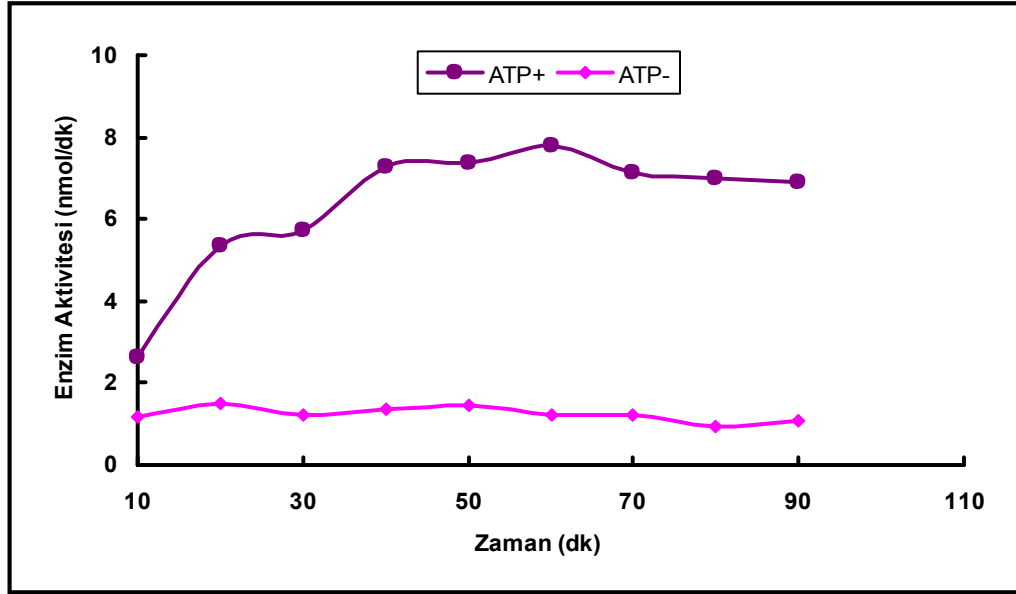
varlığında gözlenmiştir. 1 mM'ın üstündeki ATP konsantrasyonlarında enzim aktivitesinde azalma meydana gelmiştir.



Şekil 3.10: ATP konsantrasyonunun Gk-Lon peptidaz aktivitesi üzerindeki etkisi (Peptit hidrolizi 5 µg Gk-Lon, 300 µM Glt-Ala-Ala-Phe-MNA, 7.5 mM MgCl₂ ve 0-2.5 mM ATP varlığında gerçekleştirilmiştir.)

3.6.3. Lon Peptidaz Aktivitesi için Optimum Reaksiyon Süresinin Belirlenmesi

Gk-Lon'un en aktif çalıştığı reaksiyon süresinin belirlenmesi için enzimin hidroliz aktivitesi 55°C'ta 10-90 dk arasında değişen zaman aralıklarında Glt-Ala-Ala-Phe-MNA ile inkübe edilerek gereç ve yöntemlerde belirtilen standart reaksiyon koşullarında ölçülmüştür. 1 mM ATP varlığında ilk 20 dakikada rekombinant *G. kaustophilus* Lon peptidaz aktivitesi hızlı bir şekilde artış göstermiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11: Gk-Lon peptidaz aktivitesinin zamana bağlı değişimi. (Peptit hidrolizi 10 μ g Gk-Lon, 300 μ M Glt-Ala-Ala-Phe-MNA, 7.5 mM $MgCl_2$ ve 1 mM ATP varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilmiştir.)

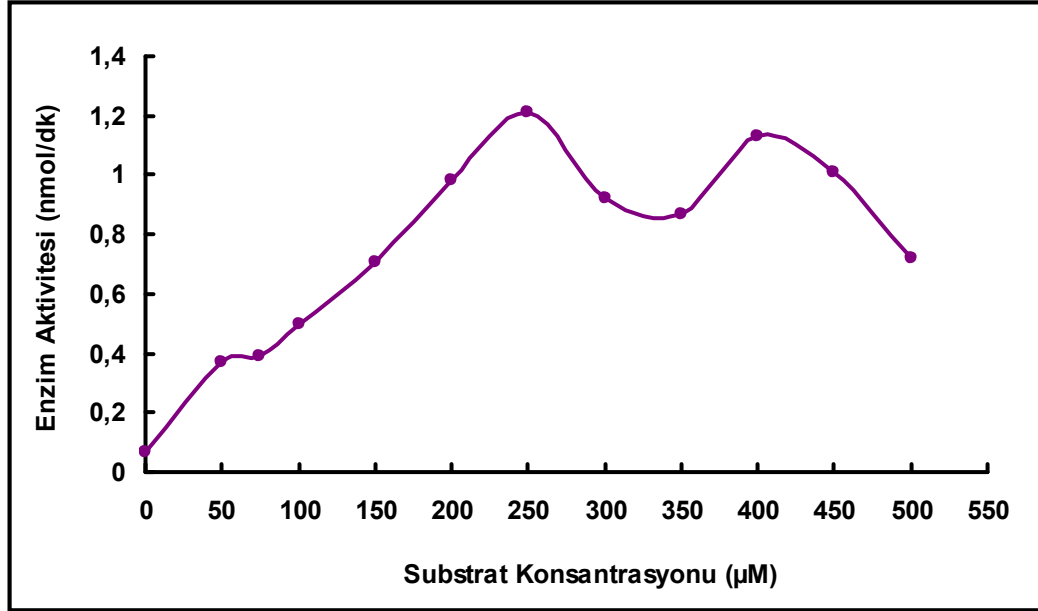
Buna göre Lon peptidaz aktivitesi 40. dakikada doygunluk göstermiştir. Artan reaksiyon süresiyle birlikte enzim aktivitesinde çok az düşüş gözlenmekle beraber enzim aktivitesi korunmuştur. Zamana bağlı reaksiyonların ATP'siz gerçekleştiği benzer koşullarda ise oldukça düşük enzim aktivitesi gözlenmiş olup zamana bağlı olarak değişiklik gözlenmemiştir. Bundan sonraki enzim aktivite çalışmalarında reaksiyon süresi olarak, aktivitenin lineer artış gösterdiği 20 dakika belirlenmiştir

3.6.4. Substrat Konsantrasyonunun Lon Peptidaz Aktivitesine Etkisi

Lon peptidazın en yüksek oranda enzim aktivitesi gösterdiği substrat konsantrasyonunu belirlemek amacıyla farklı miktarlarda florojenik substrat Glt-Ala-Ala-Phe-MNA kullanılarak 1 mM ATP varlığında standart deney şartlarında reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir.

Yapılan üç deneyin sonuçlarında benzer sonuçlar alınmıştır. Bu sonuçlara göre enzim aktivitesinde artan substrat konsantrasyonuna bağlı olarak artış gözlenmiş ve

en yüksek enzim aktivitesi 250 μM substrat konsantrasyonunda gözlenmiştir. Ancak 300 μM ve üzeri substrat konsantrasyonlarında enzim aktivitesinde Şekil 3.12’de görüldüğü gibi dengesizlik gözlenmiştir. Bundan sonra yapılan bütün enzim aktivite deneylerinde 250 μM substrat kullanılmıştır.



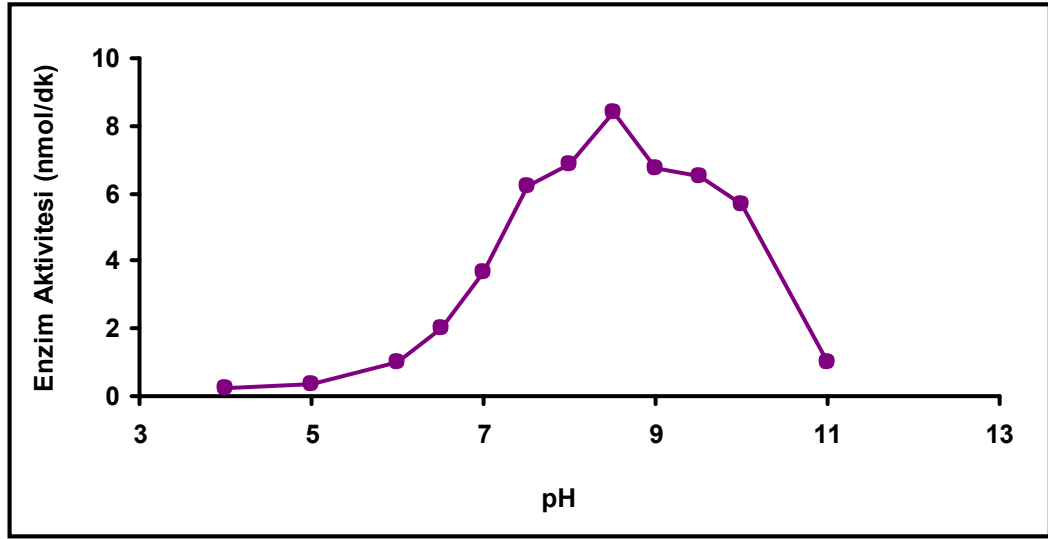
Şekil 3.12: Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi (Peptit hidrolizi 5 μg Gk-Lon, 0-500 μM Glt-Ala-Ala-Phe-MNA, 7.5 mM MgCl_2 ve 1 mM ATP varlığında gerçekleştirilmiştir.)

3.6.5. pH'nın Lon Peptidaz Aktivitesine Etkisi

Gk-Lon proteazın optimum pH'sını tayin etmek için 4-11 arasında değişen pH değerlerinde tampon çözeltiler hazırlanmıştır. Bunlar; 50 mM Sodyum asetat (pH 4.0-6.0), 50 mM MOPS (pH 6.0-7.0), 50 mM Tris-HCl (pH 7.0-9.0) ve 25 mM Glisin (pH 9.5-11.0) tampon çözeltileridir. Lon'un peptidaz aktivitesi 1 mM ATP ve 7.5 mM MgCl_2 varlığında farklı pH'larda Glt-Ala-Ala-Phe-MNA'nın substrat olarak kullanıldığı standart reaksiyon koşullarında ölçülmüştür.

Şekil 3.13'te görüldüğü gibi pH 4.0-6.0 aralığında düşük Lon peptidaz aktivitesi gözlenirken, pH 7.5-9.5 aralığında enzim aktivitesinde artış gözlenmiştir.

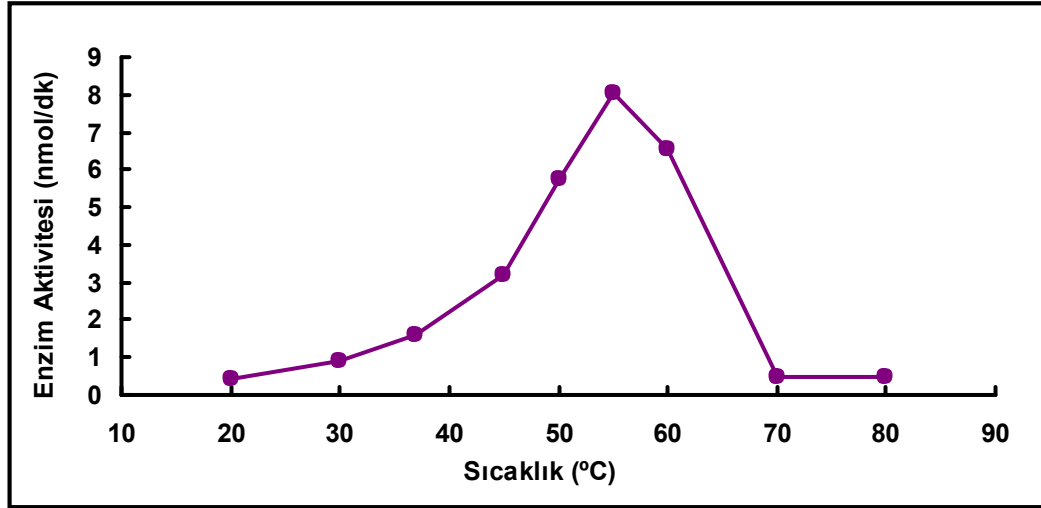
Gk-Lon en yüksek peptidaz aktivitesini ise pH 8.5'da göstermiştir. Bu sonuçlara göre Lon proteaz pH 7.5 ile pH 9.5 arasında yüksek aktivite gösteren alkali bir proteazdır.



Şekil 3.13: pH'nın Gk-Lon peptidaz aktivitesine etkisi (Peptit hidrolizi 5 µg Gk-Lon, 250 µM Glt-Ala-Ala-Phe-MNA, 7.5 mM MgCl₂ ve 1 mM ATP varlığında gerçekleştirilmiştir.)

3.6.6. Sıcaklığın Lon Peptidaz Aktivitesine Etkisi

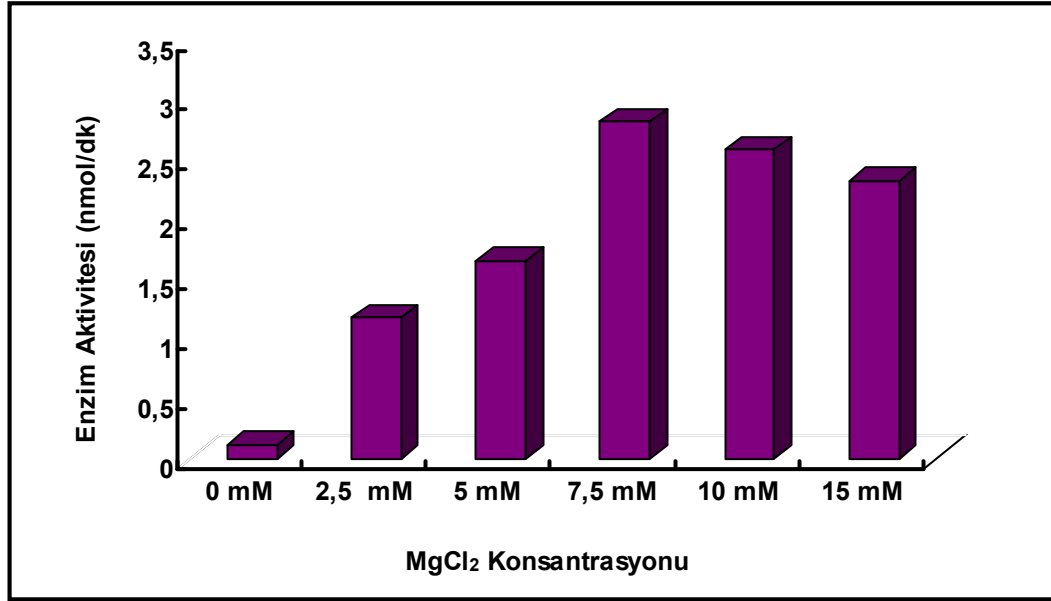
Saflaştırılan *Geobacillus kaustophilus* Lon proteazın optimum reaksiyon sıcaklığının belirlenmesi için, enzim reaksiyon tamponunda oda sıcaklığında 10 dakika ön inkübasyona tabi tutulduktan sonra ATP ve Glt-Ala-Ala-Phe-MNA varlığında 20 dakika boyunca 20-90°C arasındaki sıcaklıklarda inkübe edilmiştir. Gk-Lon proteaz termofilik bir enzimdir. Şekil 3.14'te görüldüğü gibi peptit yıkım aktivitesi 45°C'tan itibaren yüksek oranda artış göstermeye başlamıştır. En yüksek enzim aktivitesi ise 55°C'ta saptanmıştır; ancak 70°C ve üzeri sıcaklıklarda enzim aktivitesinde büyük ölçüde azalma gözlenmiştir.



Şekil 3.14: Sıcaklığın Lon peptidaz aktivitesine etkisi (Peptit hidrolizi 5 µg Gk-Lon, 250 µM Glt-Ala-Ala-Phe-MNA, 7.5 mM MgCl₂ ve 1 mM ATP varlığında gerçekleştirilmiştir.)

3.6.7. Mg²⁺’nin Lon Peptidaz Aktivitesine Etkisi

Lon peptidaz aktivitesinin en etkin olduğu Mg²⁺ konsantrasyonunu belirlemek amacıyla enzimin Glt-Ala-Ala-Phe-MNA hidrolizi 1 mM ATP varlığında standart deney tamponu içinde 0-15 mM arasında değişen konsantrasyonlarda MgCl₂ kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.15’de görüldüğü gibi Mg²⁺ iyonunun yokluğunda düşük bir aktivite gözlenmiştir (0,3 nmol/dk). Giderek artan MgCl₂ oranlarına bağlı olarak enzim aktivitesi de artmıştır. Gk-Lon peptidaz, en yüksek enzim aktivitesini 7.5 mM MgCl₂ varlığında göstermiştir (3,2 nmol/dk) ve MgCl₂ içermeyen reaksiyon sonucuna göre peptit hidrolizi 11 kat artmıştır.



Şekil 3.15: MgCl₂ konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi (Peptit hidrolizi 10 µg Gk-Lon, 250 µM Glt-Ala-Ala-Phe-MNA, 0-15 mM MgCl₂ ve 1 mM ATP varlığında gerçekleştirilmiştir.)

3.6.8. Lon Tarafından Çeşitli Florojenik Peptitlerin Yıkımı

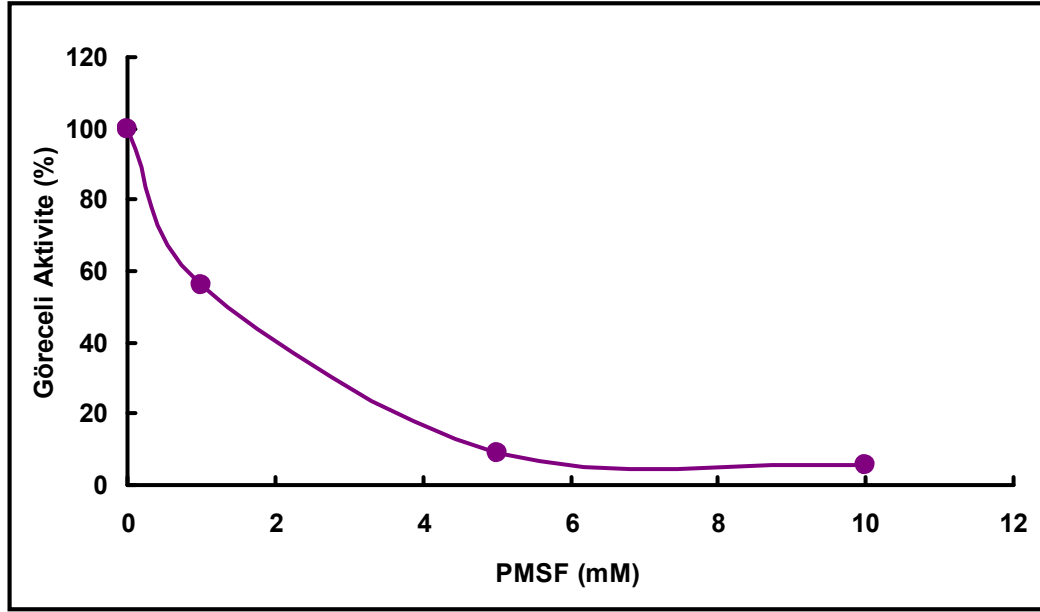
Gk-Lon proteazın çeşitli florojenik substratlara karşı özgülüğü standart deney koşulları altında incelenmiştir. Glt-Ala-Ala-Phe-MNA çeşitli Lon proteazların aktivite deneylerinde yaygın olarak kullanılan bir substrattır (Waxman ve Goldberg, 1985; Fukui ve ark., 2002) ve Gk-Lon proteaz tarafından da yüksek oranda hidrolize edildiği yaptığımız çalışmalarda belirlenmiştir. Lon enzimin diğer peptidlere karşı olan özgülüğü, kimotripsin ve benzeri serin proteazlar için etkin bir substrat olan Suc-Ala-Ala-Phe-AMC, 26S proteazom ve HslVU'yu da içeren çeşitli proteazların aktivite deneylerinde kullanılan Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC kullanılarak incelenmiştir. Gk-Lon proteaz Suc-Ala-Ala-Phe-AMC'yi Glt-Ala-Ala-Phe-MNA substrat hidrolizine göreceli olarak %50 oranında yıkıma uğratmıştır. Ancak, saflaştırılan Gk-Lon, Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC'i hidrolize edememiştir.

Tablo 3.1: Gk-Lon proteaz tarafından çeşitli florojenik peptitlerin hidrolizi. Enzim aktiviteleri her bir substratın varlığında (250 μ M) daha önce açıklanan reaksiyon koşullarında belirlenmiş ve Glt-Ala-Ala-Phe-MNA'ya göreceli olarak ifade edilmiştir. (Peptit hidrolizi 10 μ g Gk-Lon, 250 μ M florojenik substrat, 7.5 mM $MgCl_2$ ve 1 mM ATP varlığında gerçekleştirilmiştir).

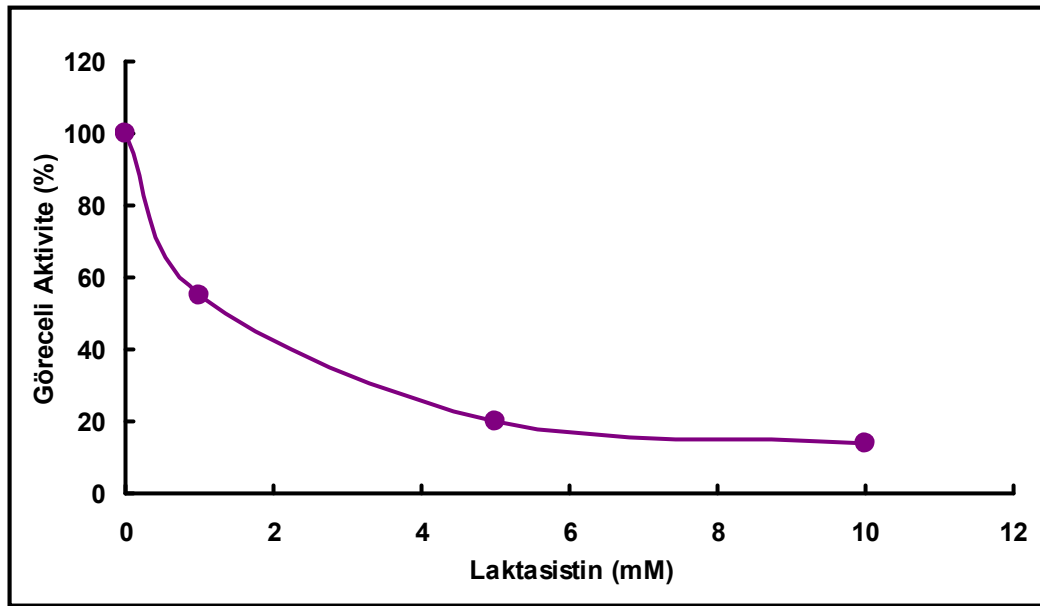
Florojenik Substratlar (250 μ M)	Göreceli Aktivite (%)
Glt-Ala-Ala-Phe-MNA	100
Suc-Ala-Ala-Phe-AMC	48.4
Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC	0

3.6.9. Çeşitli Proteaz İnhibitörlerinin Lon Peptidaz Aktivitesine Etkisi

Lon proteazın katalitik mekanizmasını daha fazla karakterize edebilmek için çeşitli proteaz inhibitörlerinin Glt-Ala-Ala-Phe-MNA'yı hidroliz aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. Bir serin proteaz inhibitörü olan PMSF'nin 1 mM derişimde kullanılması halinde enzim aktivitesinde %50 oranında azalma gözlenmiştir (Şekil 3.16). 5 mM PMSF ise peptit yıkım aktivitesini %91 gibi yüksek bir oranda inhibe etmiştir. Bununla beraber memeli ya da arkea proteazomlarının aktif bölgesinde bulunan treonine bağlanarak enzim aktivitesini inhibe eden 1 mM laktasistin varlığında aynı deney koşullarında Lon peptidaz aktivitesi %50 oranında inhibe olmuştur (Şekil 3.17). 10 mM laktasistin varlığında ise Lon aktivitesinde %85 oranında inhibisyon gözlenmiştir. Bu sonuçlar Lon'un katalitik aktivitesinde Ser rezidüsünün temel rol oynadığına ve bir Thr rezidüsünün de katalitik aktiviteye katkı sağladığına işaret etmektedir.



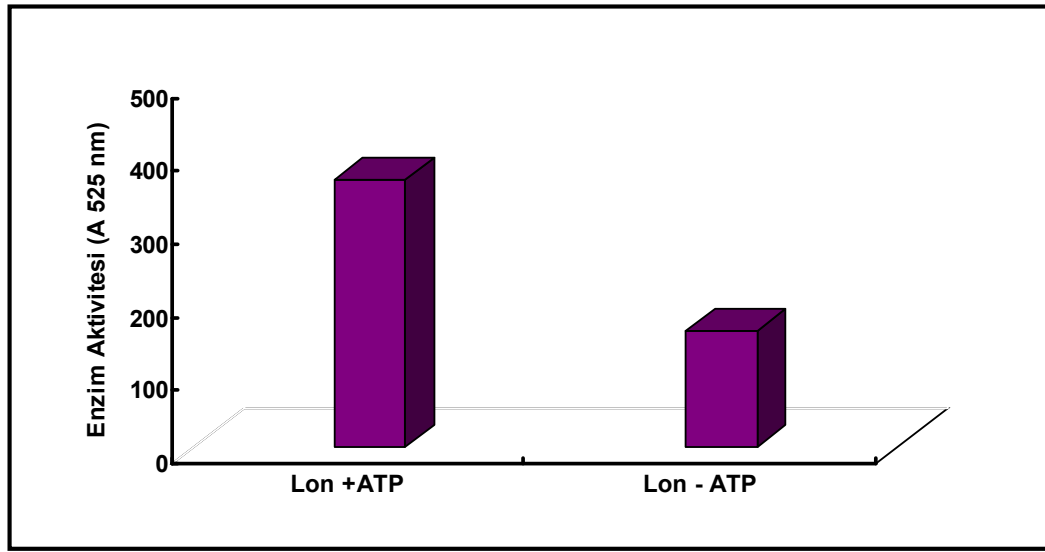
Şekil 3.16: PMSF inhibitörünün Gk-Lon peptidaz aktivitesine etkisi (Peptit hidrolizi 10 µg Gk-Lon, 250 µM Glt-Ala-Ala-Phe-MNA, 7.5 mM MgCl₂ ve 1 mM ATP varlığında gerçekleştirilmiştir.)



Şekil 3.17: Laktasistin inhibitörünün Gk-Lon peptidaz aktivitesine etkisi (Peptit hidrolizi 10 µg Gk-Lon, 250 µM Glt-Ala-Ala-Phe-MNA, 7.5 mM MgCl₂ ve 1 mM ATP varlığında gerçekleştirilmiştir.)

3.6.10. Lon Tarafından FITC-kazein Yıkımı

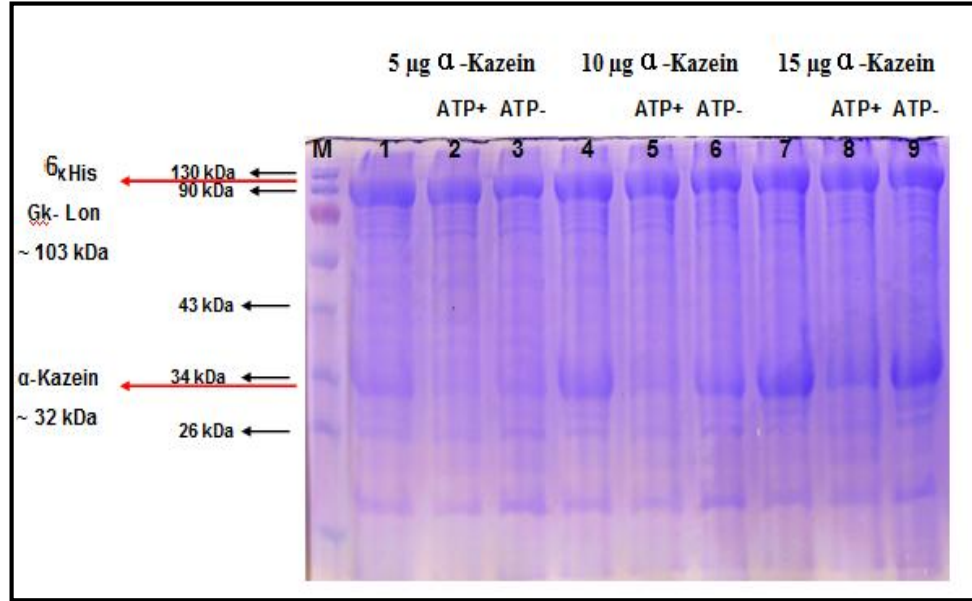
Rekombinant Gk-Lon proteazın FITC- α -kazein hidroliz aktivitesinin belirlenmesi için gereç ve yöntemlerde belirtilen koşullarda reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.18’de görüldüğü gibi 1 saatlik reaksiyon sonunda Lon proteazın 1 mM ATP ve 7.5 mM MgCl₂ varlığında FITC- α -kazein’i yüksek oranda hidroliz ettiği görülmüştür. Peptit yıkımında gözlemlendiği gibi, ATP yokluğunda da Gk-Lon FITC kazeini hidrolize edebilmiştir.



Şekil 3.18: Gk-Lon tarafından ATP-bağımlı ve ATP-bağımsız FITC-kazein yıkımı (Protein hidrolizi 15 μ g Gk-Lon, 10 μ g FITC-kazein, 7.5 mM MgCl₂ ve 1 mM ATP varlığında gerçekleştirilmiştir.)

3.6.11. Gk-Lon Tarafından α -Kazein Yıkımı

Gk-Lon proroteazın α -kazein hidroliz aktivitesi SDS-PAGE ile analiz edilmiştir (Şekil 3.19) SDS-PAGE analizine göre Lon proteazın 1 mM ATP varlığında α -kazein konsantrasyonuna bağlı olarak 55°C’da 1 saat inkübasyonu sonucu, bu protein substratını etkin bir şekilde hidrolize ettiği gözlemlenmiştir. 5 μ g kazein varlığında yaklaşık 32 kDa olan α -kazein bandı tamamen yok olmuştur. ATP yokluğunda gerçekleştirilen benzer reaksiyonlarda ise Gk-Lon α -kazeini hidrolize edebilmiştir ancak kazein miktarı arttıkça daha düşük oranda kazein yıkımı gerçekleşmiştir.

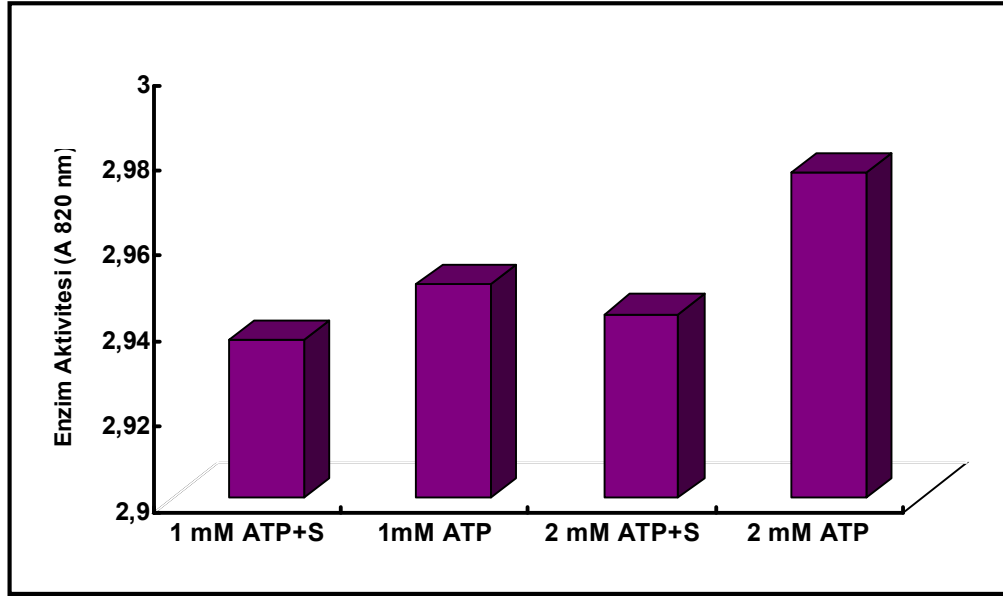


Şekil 3.19: Gk-Lon tarafından α -kazein yıkım reaksiyonunun SDS-jel görüntüsü. **1, 4 ve 7.** 1 mM ATP varlığında sırasıyla 5, 10 ve 15 μ g α -kazein ve Gk-Lon inkübasyon öncesi; **2, 5 ve 8.** 1 mM ATP varlığında sırasıyla 5, 10 ve 15 μ g α -kazein ve Gk-Lon 1 saat inkübasyon sonrası; **3, 6 ve 9.** 1 mM ATP yokluğunda sırasıyla 5, 10 ve 15 μ g α -kazein ve Gk-Lon 1 saat inkübasyon sonrası.

3.6.12. Gk-Lon ATPaz Aktivitesinin Belirlenmesi

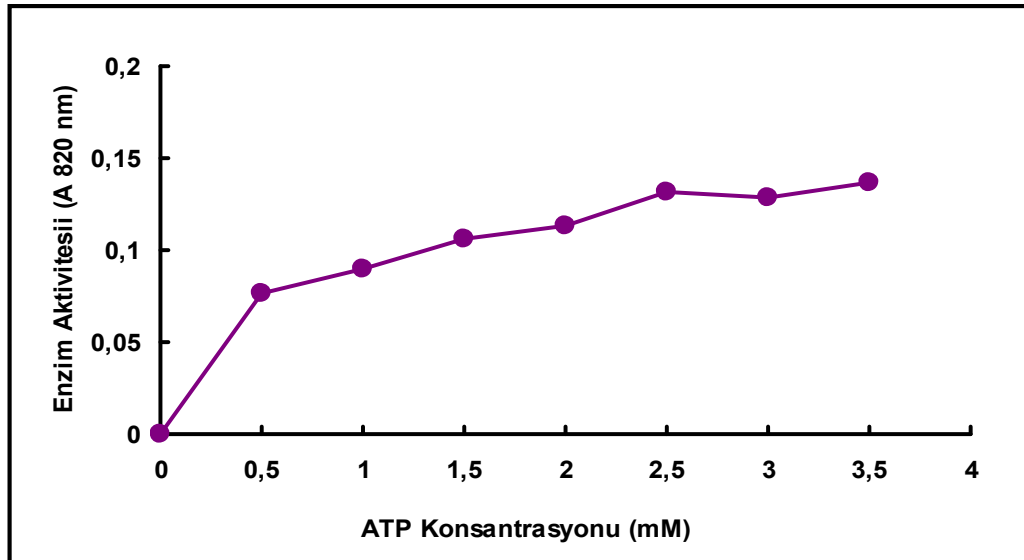
Geobacillus kaustophilus Lon proteini ATP-bağımlı proteazlarda korunmuş olan Walker A tipi ATP bağlanma motifine sahiptir (Camcı, 2009). Bu nedenle Gk-Lon'un ATPaz aktivitesi gereç ve yöntemlerde belirtilen şekilde ölçülerek analiz edilmiştir.

Öncelikle florojenik substrat Glt-Ala-Ala-Phe-MNA'nın ATPaz aktivitesine nasıl etki gösterdiği araştırılmıştır. Şekil 3.20'de görüldüğü gibi peptit substratın reaksiyon ortamında olmadığı koşullarda daha yüksek Gk-Lon ATPaz ölçülürken substratın olduğu koşullarda ATPaz aktivitesi düşmüştür. Aynı zamanda ATPaz aktivitesi artan ATP konsantrasyonu ile birlikte artış göstermiştir.



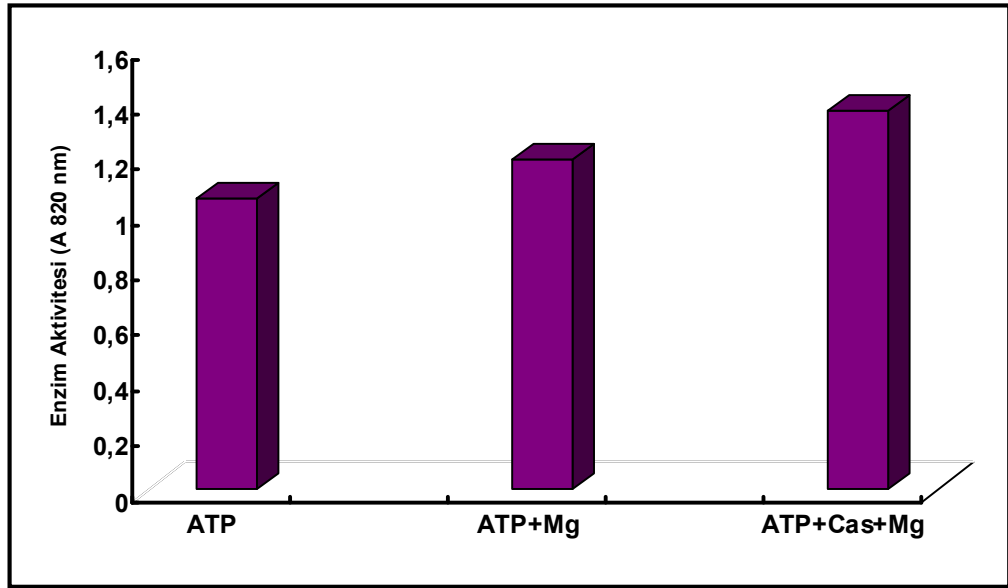
Şekil 3.20: Gk-Lon ATPaz aktivitesine peptit substratın ve ATP konsantrasyonunun etkisi (ATP hidroliz reaksiyonu 10 µg Gk-Lon, 250 µM Glt-Ala-Ala-Phe-MNA, 7.5 mM MgCl₂ ve 1 mM ATP varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilmiştir.)

ATP'nin farklı konsantrasyonlarının Lon ATPaz aktivitesi üzerine etkisine bakıldığında artan ATP miktarının ATP hidrolizini artırdığı saptanmıştır (Şekil 3.21).



Şekil 3.21: ATP konsantrasyonunun Gk-Lon ATPaz aktivitesi üzerine etkisi (ATP hidroliz reaksiyonu 10 µg Gk-Lon, 7.5 mM MgCl₂ ve 0-3.5 mM ATP varlığında gerçekleştirilmiştir.)

Daha önce Lon proteaz ile yapılan çalışmalarda Mg^{2+} iyonunun ve α -kazein proteininin ATPaz aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Bu amaçla Gk-Lon ATPaz aktivitesi 1 mM ATP ve 7.5 mM varlığında daha önce gereç ve yöntemlerde belirtildiği gibi ölçülmüştür. Şekil 3.22'de görüldüğü gibi reaksiyon ortamına Mg^{2+} eklendiği zaman ATPaz aktivitesinde %14 gibi çok az bir artış olmuştur. Aynı reaksiyon ortamına α -kazein de ilave edildiği zaman ise Gk-Lon ATPaz aktivitesi %30'luk bir artış göstermiştir.



Şekil 3.22: Gk-Lon ATPaz aktivitesine Mg^{2+} ve α -kazein etkisi (ATP hidroliz reaksiyonu 10 μ g Gk-Lon, 15 μ g α -kazein, 7.5 mM $MgCl_2$ ve 1 mM ATP varlığında gerçekleştirilmiştir.)

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

ATP-bağımlı proteazlar yanlış katlanmış proteinlerin ya da kısa ömürlü düzenleyici proteinlerin ortadan kaldırılmasını katalizleyerek gen ekspresyonunun düzenlenmesi, protein kalite kontrolü ve çevresel koşullara göre hücre içi protein seviyelerinin düzenlenmesi gibi birçok hücrel süreçte rol oynamaktadırlar. Lon proteazlar bütün organizmalarda bulunan ve birçok hücrel fonksiyon ile ilişkisi tanımlanmış ATP-bağımlı proteazlardır. Bu proteazlar hücre homeostasisi, protein kalite kontrolü ve metabolik düzenleme gibi önemli hücrel fonksiyonlarda rol oynamaktadır. İlk kez *Escherichia coli*'de keşfedilmiş olan Lon proteaz (Chung ve Goldberg, 1981), daha sonra birçok bakteri ve arkea türünün yanında, ökaryotik hücrelerin mitokondri ve kloroplastlarında tanımlanmıştır (Maehara ve ark., 2008, Fukui ve arkadaşları, 2002, Stahlberg ve ark., 1999).

Lon proteaz ile yapılan birçok genomik çalışma bu enzimin organizmalar arasında önemli ölçüde korunmuş olduğunu ortaya koymuştur (Tomoyosu ve ark., 1993, Lee ve Szuki, 2008, Chandu ve Nandi, 2004). Lon proteazlar hücre içindeki anormal ya da yanlış katlanmış proteinlerin yanı sıra, transkripsiyonel düzenleyiciler, serbest ribozomal proteinler, metilazlar, antitoksinler, küçük histon benzeri proteinler ve biyosentetik enzimler gibi farklı birçok yolda görevli substratların hidrolizinden de sorumludurlar. Evrimsel korunmuşluğu ve çok sayıda hücrel süreçte görevli olmaları Lon proteazları oldukça ilgi çekici kılmaktadır.

Bu çalışmada, laboratuvarımızda daha önce bir yüksek lisans öğrencisi tarafından pGEX-6P1 vektörüne klonlanmış olan termofilik bakteri *Geobacillus kaustophilus*'a ait *lon* geni pET-28a(+) ekspresyon vektörüne altklonlanma ile aktarılmıştır. Daha sonra *G. kaustophilus* Lon proteaz *lon* geni içermeyen *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinde N-terminal 6xHis eklentisi ile birlikte ilk defa eksprese edilmiş, saflaştırılmış ve biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir.

pET-28a(+) vektöründe bulunan *lon* geninin ekspresyonu T7 promotörü kontrolü altındadır. LacUV5 promotörünün ardında bulunan T7 RNA polimeraz

ekspresyonu IPTG ile uyarılmıştır ve böylece ortaya çıkan T7 RNA polimerazın Gk-Lon genini eksprese etmesi sağlanmıştır. IPTG ile uyarıldıktan sonra hücrelerde yüksek oranda eksprese edilen *G. kaustophilus* Lon proteazın saflaştırılması için hücreler sonikasyon ile parçalanmıştır. Elde edilen hücre özütlüleri N-terminal bölgelerine eklenmiş 6xHis kuyruğa bağlanma özelliği olan Ni-NTA agaroz kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonucu elde edilen fraksiyonlar SDS-PAGE ile analiz edilmiş ve fraksiyonlarda bulunan protein miktarları BCA yöntemi ile tayin edilmiştir. SDS-PAGE sonucu 6xHis-Lon içeren saflaştırma fraksiyonlarının bazılarının %70 oranında saflıkta, bazı fraksiyonların ise %95 saflıkta elde edilmiş olduğunu ortaya koymuştur. SDS-PAGE analizleri sonucunda belirlenen Rf değerlerine göre Gk-Lon proteazın büyüklüğü yaklaşık 103 kDa olarak tespit edilmiştir.

SDS-PAGE`de gözlenen sonuçlar Gk-Lon proteazın daha önce çalışılmış bakteriyel Lon proteazlara göre daha büyük olduğunu göstermektedir. Lon proteaz homo-oligomerik bir enzimdir ve moleküler büyüklüğü organizmalar arasında değişkenlik göstermektedir. Lon proteazların moleküler büyüklükleri organizmalar arasında oldukça değişkenlik göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda ilk kez keşfedilen Lon proteaz olan *E. coli* Lon`un moleküler büyüklüğü ~87 kDa olarak belirlenmiştir (Goldberg, 1981). Bir arkea bakteri olan *Thermococcus thermophilus* Lon proteaz ise ~90 kDa olarak belirlenmiştir (Maehara ve ark., 2008). Stahlberg ve arkadaşları, 1999 yılında yaptıkları çalışma ile *Saccharomyces cerevisiae* Lon proteazın ~120 kDa olduğunu belirlemişlerdir (Wang ve ark., 1993).

Tez çalışmasında Gk-Lon proteazın aktivite tayini için bir florojenik peptit olan Glt-Ala-Ala-Phe-MNA kullanılmıştır. Glt-Ala-Ala-Phe-MNA sulu tamponlarda kolayca çözülebilen ve kimotripsin-benzeri serin proteazlar için yaygın olarak kullanılan bir substrattır. Florojenik Glt-Ala-Ala-Phe-MNA peptit substrat birçok farklı organizmaya ait Lon proteazlarla gerçekleştirilen aktivite çalışmalarında da sıklıkla kullanılmıştır. Serin proteaz Glt-Ala-Ala-Phe-MNA üzerinde bulunan hidrofobik amino asit fenilalanini (Phe) tanıyarak peptit bağının hidrolizini gerçekleştirmektedir. Peptit bağının hidrolizi sonucu açığa çıkan MNA miktarı enzimin aktivitesi ile orantılı olarak artmaktadır. Bu çalışmada, Gk-Lon proteazın

Glt-Ala-Ala-Phe-MNA hidroliz aktivitesi, reaksiyon için gereken çeşitli parametreler (Substrat konsantrasyonu, ATP ve ADP varlığı, $MgCl_2$ konsantrasyonu, pH, sıcaklık, reaksiyon süresi, substrat çeşitliliği, inhibitörlerin etkisi) değiştirilerek ayrıntılı olarak incelenmiştir.

Enzim aktivitesinin tayin edilmesi için yapılan ilk çalışmalar, saflaştırılan N-terminal 6xHis kuyruk ekli Gk-Lon proteazın Glt-Ala-Ala-Phe-MNA'yı ATP ve Mg^{2+} varlığında etkin olarak hidroliz ettiğini ortaya koymuştur. Gk-Lon proteaz reaksiyon ortamında ATP ve Mg^{2+} olmadığı zaman, %1'lik oranda da olsa Glt-Ala-Ala-Phe-MNA'yı yıkıma uğratabilmektedir. Bununla beraber enzim ortamda Mg^{2+} olduğu zaman, ATP'ye ihtiyaç duymaksızın peptit substratı %12 oranında hidroliz edebilmektedir. Ancak elde edilen veriler Gk-Lon peptidaz aktivitesinin maksimum seviyede olabilmesi için, Mg^{2+} 'un yanında ATP varlığının da gerektiğini göstermektedir. Yaptığımız çalışmalarda Mg^{2+} 'un Gk-Lon proteaz aktivitesine direkt etki ettiği, ancak asıl rolünün ATP ile birlikte gerçekleştiği belirlenmiştir.

Gk-Lon peptidaz için Mg^{2+} , daha önce Lon proteazlar ile yapılmış çalışmalarda da belirtilmiş olduğu gibi, kofaktör görevi üstlenmektedir (Ruidyak ve ark., 1998, Fukui ve ark., 2002, Lui ve ark., 2004, Park ve ark., 2006) Yaptığımız çalışmalarda Gk-Lon peptidaz aktivitesi için optimum $MgCl_2$ konsantrasyonu 7.5 mM olarak belirlenmiştir. Daha önce birçok bakteriyel Lon proteaz ile gerçekleştirilmiş aktivite çalışmalarında kullanılan $MgCl_2$ konsantrasyonunun ortalama olarak 5-10 mM arasında değişmekte olduğu görülmektedir (Waxman ve Goldberg, 1985, Roudiak ve ark., 1988, Besche ve ark., 2004a, Lee ve ark., 2004a, Coleman ve ark., 2009).

Lon proteazların ATP-bağımlı olarak çalıştığı, enzimin proteolitik aktivitesinin ATP hidrolizleri ile oldukça arttığı ve protein substratların Lon tarafından yıkımı için ATP hidrolizinin gerekmekte olduğu *E. coli* soyunda yapılan aktivite ve mutasyon çalışmalarıyla ortaya konmuştur (Chiarette ve ark., 1981, Waxman ve Goldberg, 1985, Fischer ve Glockshuber, 1993). Yaptığımız aktivite deneyleri Gk-Lon proteazın florojenik peptit Glt-Ala-Ala-Phe-MNA'yı 1 mM ATP varlığında yüksek oranda hidroliz ettiğini göstermiştir. Aynı zamanda Gk-Lon'un ortamda ATP olmadığı zaman da peptidaz aktivitesi gösterdiği ortaya konmuştur. Elde edilen bu

sonuçlar 1985'te Waxman ve Goldberg'in *E. coli* Lon proteaz için yaptıkları çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Waxman ve Goldberg *E. coli* Lon proteazın florojenik substratları 7.5 mM MgCl₂ varlığında (Glt-Ala-Ala-Phe-MNA, Suc-Ala-Ala-Phe-MNA gibi) ATP' den bağımsız olarak da hidroliz edebildiğini, ancak ATP varlığında aktivitenin oldukça arttığını belirlemişlerdir. Yine benzer olarak *Brevibacillus thermoruber* Lon proteazın peptit yıkım aktivitesi 1mM ATP ve 10 mM MgCl₂ varlığında büyük oranda artış göstermesine karşılık, ATP yokluğunda da florojenik peptitin yıkımı gerçekleşebilmektedir (Lee ve ark., 2004a). Bu sonuçlardan farklı olarak Fukui ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, bir arkeabakteri olan *Thermococcus kodakaraensis* 'den elde edilen membrana bağlı Lon proteazın 10 mM MgCl₂ varlığında, florojenik peptitler gibi katlanmamış substratları ATP'den tamamen bağımsız olarak hidroliz ettiği belirtilmiştir (2002).

ATP hidrolizinin Lon proteaz yapısındaki konformasyonel değişiklikler ve protein substratların katlanmalarının açılmasıyla ilgili olduğu bilinmektedir (Lee ve ark., 2004a). Gk-Lon proteazın ATP yokluğunda da peptidaz aktivitesi göstermesi, Glt-Ala-Ala-Phe-MNA gibi küçük peptitlerin sekonder ya da tersiyer katlanmaları olmadığı için, substratın katlarının açılmasının ve protein substratta bulunan Lon proteaz kesim bölgelerinin ortaya çıkarılmasının gerekmediği şeklinde yorumlanabilir. Buna göre ATP yokluğunda da peptit hidrolizi meydana gelebilmektedir. ATP'nin ise enzimdeki allosterik etkileşimleri arttırmasının yanı sıra, substrat katlanmalarının açılmasını da sağlayarak protein yıkımına katkı sağladığı gösterilmiştir (Gottesman ve Maurizi, 1992, Hoskins ve ark., 2000a, Wickner ve ark., 1999). Gk-Lon peptidaz aktivitesinin de ATP varlığında artış göstermesine dayanarak, ATP hidrolizleri ile meydana gelen konformasyonel değişikliklerin sadece substrat katlanmaları ile ilişkili değil, enzimin proteolitik aktivitesi ile de ilişkili olduğu öne sürülebilir.

Bu çalışmada diğer bir nükleotit olan ADP'nin Lon proteaz aktivitesine olan etkisi de incelenmiştir. Gk-Lon, Mg²⁺ varlığında ADP ile yok denecek kadar düşük miktarda enzim aktivitesi göstermiştir. ATP'nin bulunduğu reaksiyon ortamına ADP eklendiğinde ise, Lon peptidaz aktivitesi yaklaşık %96.5 oranında inhibe olmuştur. Daha önce yapılan çalışmalarda da ADP'nin Lon proteaz aktivitesine inhibitör olarak

etki gösterdiği belirtilmiştir (Chiarette ve ark., 1981, Waxman ve Goldberg, 1985, Chiarette ve ark., 1981, Fukui ve ark., 2002). Benzer olarak, artan ATP konsantrasyonu ile birlikte Gk-Lon aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir. Bu azalmanın, ATP hidrolizleri sonucu açığa çıkan ürün olan ADP'nin, Gk-Lon'un aktivitesini inhibe etmesi nedeniyle ortaya çıktığı sonucuna varılabilir.

Gk-Lon proteazın ATP ve Mg^{2+} varlığında Glt-Ala-Ala-Phe-MNA'yı hidroliz etmesi için gereken optimum sürenin belirlenmesi için yapılan aktivite deneylerinde, 60. dakikaya kadar enzim aktivitesinde artış görülmüş, 60. dakikadan sonra enzim aktivitesinin az miktarda bir düşüşle birlikte, sabit denilebilecek bir değerde kaldığı belirlenmiştir. Aynı reaksiyonların ATP'siz gerçekleştiği koşullarda ise, düşük oranda ve zamana bağlı değişiklik göstermeyen bir peptit yıkım aktivitesi gözlenmiştir.

Termofilik Gk-Lon proteazın Glt-Ala-Ala-Phe-MNA'yı yıkıma uğrattığı optimum sıcaklığın belirlenmesi için gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucunda, enzim aktivitesinin 40°C'tan itibaren arttığı, 60°C üzerindeki sıcaklıklarda ise çok hızlı bir şekilde düştüğü gözlenmiştir. Enzim aktivitesi için gereken optimum sıcaklık 55°C olarak belirlenmiştir.

Yaptığımız çalışmalarda Gk-Lon proteaz pH 7.5-10 arasında aktivite gösterirken, en yüksek enzim aktivitesini ise pH 8.5'da gösterdiği belirlenmiştir. Saflaştırdığımız Gk-Lon proteaz alkali bir proteazdır. Daha önce yapılan çalışmalarda bakteriyel Lon proteazların ortalama olarak pH 8.5-9.5 aralıklarında yüksek aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (Waxman ve Goldberg, 1985, Fukui ve ark., 2002, Lee ve ark., 2004a, b, Besche ve ark., 2004b).

Tez çalışmasında Gk-Lon proteazın çeşitli florojenik substratlara karşı özgülüğü incelenmiştir. Çalışmada Glt-Ala-Ala-Phe-MNA'nın yanında, Suc-Ala-Ala-Phe-AMC ve Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC florojenik substratları kullanılmıştır. Bu substratlar literatürde çeşitli ATP-bağımlı proteazların aktivite deneylerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Elde ettiğimiz bulgulara göre Gk-Lon Glt-Ala-Ala-Phe-MNA'yı

%100 oranında hidroliz ederken, aynı peptit dizisine sahip fakat farklı N-terminal bloklayıcı grup içeren Suc-Ala-Ala-Phe-MNA'yı %50 oranında hidroliz etmektedir. Glt-Ala-Ala-Phe-MNA ve Suc-Ala-Ala-Phe-AMC substratları hem negatif yükleri hem de bulundurdıkları alanin ve fenilalanin gibi hidrofobik amino asitler nedeniyle, bir serin proteaz olan Lon tarafından etkin olarak hidroliz edilen substratlardır. Gk-Lon aktivite ölçümlerinde ortaya çıkan farklılığın substratların suda çözünme oranlarıyla bağlantılı olduğu düşünülebilir.

Daha önce *E. coli* Lon proteazla yapılan bir çalışmada (Waxman ve Goldberg, 1985) Glt-Ala-Ala-Phe-MNA yıkım oranı %100 iken, Suc-Ala-Ala-Phe-MNA yıkım oranı ise %75 olarak ifade edilmiştir. Glt-Ala-Ala-Phe-MNA bir *Bacillus* türü olan *B. thermoruber* Lon proteaz için de etkin bir substrattır (Lee ve ark., 2004a). Bir arkeabakteri olan *Thermococcus kodakaraensis* Lon proteaz için yapılmış olan çalışmalarda ise, bu enzimin Suc-Ala-Ala-Phe-MNA'yı Glt-Ala-Ala-Phe-MNA'ya göre çok daha fazla oranda yıkıma uğrattığı belirlenmiştir (Fukui ve ark., 2002). Yaptığımız çalışmada diğer florojenik peptit Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC kullanılmıştır. Bu peptit substrat Gk-Lon proteaz tarafından hidroliz edilmemiştir. Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC, 20S proteazom ve HslVU gibi, katalitik bölgelerinde nükleofil olarak treonin amino asitinin görev yaptığı proteazlar için uygun olan bir substrattır (Kang ve ark., 2001, Altın, 2009). Peptitte bulunan glisin ve lizin bazik amino asitleri, enzimin aktif bölgesinde bulunan treonin amino asitinin atak yapması için uygundur. Bu nedenle Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC'nin bir serin proteaz olan Lon için uygun bir substrat olmadığı ortaya konmuştur.

Gk-Lon katalitik aktivitesinin daha iyi anlaşılabilmesi için, geri dönüşümsüz serin proteaz inhibitörü olan PMSF ve memeli proteazom inhibitörü olan laktasistin inhibitörlerinin Gk-Lon peptidaz aktivitesini nasıl etkiledikleri incelenmiştir. Elde ettiğimiz bulgulara göre Gk-Lon 5 mM PMSF varlığında tamamen inhibe olmuştur. PMSF'nin *E. coli* Lon proteaz için de inhibitör aktivitesi gösterdiği bilinmektedir (Waxman ve Goldberg, 1985). PMSF proteazın aktif bölgesinde bulunan serin amino asitine etki ederek serin proteaz aktivitesini tamamen engellemektedir (Beyon ve Salvasen, 1989). Elde edilen sonuçlar Gk-Lon proteazın aktif bölgesinde bir serin rezidüsünün varlığına dikkat çekmektedir ve bu sonuçlara göre Gk-Lon bir serin

proteazdır. Kullanılan diğer inhibitör olan laktasistin ise, bilinen bir proteozom inhibitörüdür. Laktasistin 20S proteozomun katalitik β -alt birimini hedef almakta ve katalitik nükleofil olarak görev yaptığı bilinen treonin amino asitinin hidroksil grubuna etki ederek, proteazom aktivitesini bloke etmektedir (Fenteany ve ark. 1995). Yaptığımız çalışmalar sonucunda Gk-Lon proteazın 10 mM laktasistin varlığında %85 oranında inhibe olduğu belirlenmiştir. Gk-Lon proteazın 20S proteazom ve HslVU gibi proteazlar için etkin inhibitör olduğu bilinen laktasistin ile inhibe olması, katalitik bölgede bir treonin amino asitinin varlığına dikkati çekmektedir. Ancak daha önce yaptığımız çalışmada Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC substratının Gk-Lon tarafından hidroliz edilmemiş olması, treonin amino asitinin katalitik aktivitede etkin olmadığını göstermektedir. Gk-Lon proteazın hem serin proteaz inhibitörü olan PMSF ile etkin şekilde inhibe olması, hem de serin proteaz substratları olan Glt-Ala-Ala-Phe-MNA ve Suc-Ala-Ala-Phe-AMC'yi etkin olarak yıkıma uğratması katalitik bölgede serin amino asitinin aktif görev yaptığını göstermektedir. Daha önce Botos ve arkadaşlarının 2004 (b) yılında yayınladıkları bir çalışmada, *E. coli* Lon proteazın aktif bölgesinde Ser (679), Lys (722), Gly (717) ve Thr (704) amino asitlerinin varlığı gösterilmiştir. Ayrıca Birgham ve arkadaşları Lon ailesinde Thr-Gly korunmuş rezidülerinin varlığına dikkat çekmişlerdir (2000). Elde ettiğimiz bulgular Gk-Lon aktif bölgesinde bulunan treonin amino asitin önemli bir konumda bulunduğu, ancak enzimin aktivitesinde etkin rol oynamadığına işaret etmektedir.

Saflaştırılan Gk-Lon enziminin proteaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla iki farklı α -kazein proteini substrat olarak kullanılmıştır. İlk olarak fluorescein ile işaretlenmiş florojenik α -kazein (FITC- α -kazein) ile ATP varlığında ve yokluğunda reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, Gk-Lon proteaz ATP varlığında FITC- α -kazeini etkin bir şekilde hidrolize etmiştir. 2009 yılında Coleman ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, *Borrelia burgdorferi* Lon proteazın FITC-kazeini sadece ATP varlığında hidroliz ettiği gösterilmiştir. Bundan farklı olarak yaptığımız çalışmada, Gk-Lon proteazın FITC- α -kazeini peptit substratta olduğu gibi ATP yokluğunda da yıkıma uğratabildiği gözlenmiştir. α -kazein bilinen bir ikincil yapısı olmadığından, Lon proteaz tarafından hidrolizi sırasında proteolitik alana nakledilirken katlanmalarının açılmasına gerek yoktur. ATP varlığında Gk-Lon'un FITC- α -kazein hidroliz aktivitesinin yaklaşık %100 oranında artıyor olması, ATP

hidrolizinin sadece protein substratların katlamalarının açılmasıyla ilişkili olmadığına bir kez daha işaret etmektedir.

Elde edilen bulguları desteklemek amacıyla Gk-Lon proteazın α -kazeini yıkım aktivitesi farklı oranlarda substrat kullanılarak, yine ATP varlığında ve yokluğunda SDS-PAGE'de incelenmiştir. SDS-PAGE sonuçlarına göre Gk-Lon α -kazeini miktarına bağlı olarak ATP varlığında etkin şekilde hidroliz etmiştir. Aynı reaksiyonların ATP'siz gerçekleştirildiği reaksiyonlarda ise, peptit yıkım aktivitesinin daha düşük, ancak belirgin ölçüde gerçekleştiği gözlenmiştir. Buna göre yukarıda da belirtildiği gibi, Gk-Lon'un α -kazein proteinini hidroliz aktivitesinin büyük ölçüde ATP-bağımlı olduğu, ancak ATP yokluğunda da gerçekleşebildiği belirlenmiştir.

Lon proteazların proteolitik domainlerinin yanında korunmuş motiflere sahip ATPaz domainleri de içermekte ve ATP-bağımlı olarak çalışmakta oldukları bilinmektedir (Gottesman ve Maurizi, 1992, Rotanova, 1999). Bu nedenle Gk-Lon proteazın ATPaz aktivitesi incelenmiştir. Gk-Lon ATP varlığında beklenildiği üzere ATPaz aktivitesi göstermiştir. Ancak peptit substrat varlığında Gk-Lon ATPaz aktivitesinin düştüğü belirlenmiştir. Elde ettiğimiz veriler, Gk-Lon'un ATPaz aktivitesinin peptit substratın varlığına bağlı olarak gerçekleşmediğini ortaya koymuştur.

Gk-Lon ATPaz aktivitesine Mg^{2+} 'un etkisi incelenmiştir. Yaptığımız çalışmalarda Mg^{2+} 'un enzimin ATPaz aktivitesine az da olsa bir katkı sağladığı belirlenmiştir. Benzer şekilde Fukui ve arkadaşları 2002 yılında yayınlamış oldukları çalışmada, metal iyonlarının Lon proteazlarda proteolitik aktivitenin yanında, ATP bağlanmasında da etkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Aynı zamanda ATP konsantrasyonunun Gk-Lon ATPaz aktivitesine etkisi incelenmiş ve Gk-Lon ATPaz aktivitesinin, artan ATP konsantrasyonu ile orantılı olarak artış gösterdiği belirlenmiştir.

Son olarak α -kazein proteininin Gk-Lon ATPaz aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir ve α -kazeinin ATPaz aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Benzer olarak

daha önce yapılmış çalışmalarda *E. coli* ve *Mycobacterium smegmatis* gibi bakteriyel Lon proteazların ATPaz ve peptidaz aktivitelerinin, α -kazein gibi protein uyarıcıların etkisi ile artmakta olduğu gösterilmiştir (Fischer ve Glockshuber, 1993, Ruidyak ve Shrader, 2000). Aynı şekilde Fukui ve arkadaşları 2002 yılında yayınladıkları çalışmalarında α -kazeinin arkeabakteri *Thermococcus kodakaraensis* Lon proteazın ATPaz aktivitesini 2-8 kat, peptidaz aktivitesini ise 10 kat stimule ettiğini belirtilmişlerdir. Yapılan bu çalışmalarda α -kazeinin enzimde bulunan düzenleyici bir bağlanma bölgesine bağlandığı ve ATP hidrolizini arttırdığı öne sürülmüştür ancak bu mekanizma tam olarak aydınlatılmamıştır. Bizim Gk-Lon proteaz ile elde ettiğimiz sonuçlar da α -kazeinin ATPaz aktivitesini arttırdığı yönündedir.

SONUÇLAR

Bu çalışmada *Geobacillus kaustophilus*'a ait Lon proteaz saflaştırılmış ve biyokimyasal nitelendirilmesi yapılmıştır.

1. Çalışmada öncelikle *G. kaustophilus*'a ait 2500 bp uzunluğunda olan *lon* geni daha önce klonlanmış olduğu pGEX-6P1 vektöründen çıkartılarak, pET-28a(+) vektörüne altklonlama ile aktarılmıştır.
2. Gk-Lon proteaz *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinde N-terminal bölgesine 6xHis kuyruk ekli şekilde yüksek oranda eksprese edildikten sonra, Ni-NTA immobilize metal afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan 6xHis Gk-Lon proteazın moleküler büyüklüğü SDS-PAGE'de yaklaşık 103 kDa olarak görüntülenmiştir.
3. Enzim peptidaz aktivite deneylerinde substrat olarak bir kimotripsin benzeri serin proteaz substratı olan florojenik peptit Glt-Ala-Ala-Phe-MNA kullanılmıştır. Saflaştırılan enzimlerin Glt-Ala-Ala-Phe-MNA'yı etkin bir şekilde hidroliz ettikleri belirlenmiştir.
4. Gk-Lon proteaz ATP-bağımlı bir proteazdır, ancak ATP yokluğunda da peptit hidrolizi gerçekleştirebilmektedir. ATP varlığında Mg^{2+} 'dan bağımsız olarak peptit hidroliz aktivitesi, ATP yokluğundaki aktiviteye göre yaklaşık 7.8 kat artış göstermiştir.
5. Gk-Lon peptidaz aktivitesinin etkin olabilmesi için Mg^{2+} 'nın varlığı gerekmektedir. Mg^{2+} , ATP den bağımsız olarak enzimin peptidaz aktivitesini yaklaşık 9.3 kat arttırmıştır.
6. Gk-Lon peptidaz aktivitesinin maksimum seviyede olabilmesi için hem ATP hem de Mg^{2+} 'un bir arada olması gerekmektedir. İki kofaktör bir arada olduğu zaman enzim aktivitesi 77 kat artış göstermiştir. ADP ise enzimin peptidaz aktivitesini inhibe etmiştir.

7. Gk-Lon proteaz enziminin Glt-Ala-Ala-Phe-MNA hidroliz aktivitesi için optimum sıcaklık 55°C ve optimum pH 8.5 olarak belirlenmiştir.
8. Gk-Lon proteaz Glt-Ala-Ala-Phe-MNA'dan başka, diğer bir serin proteaz substratı olan Suc-Ala-Ala-Phe-MNA'yı da etkin bir şekilde hidrolize etmiş, ancak bir treonin proteaz substratı olan CBZ-Gly-Gly-Leu-AMC'yi yıkıma uğratmamıştır.
9. Gk-Lon peptidaz aktivitesi PMSF ile güçlü bir şekilde inhibe olması enzimin bir serin proteaz olduğunu desteklemiştir. Gk-Lon peptidaz aktivitesinin laktasistin ile etkin bir şekilde inhibe olması ise proteolitik aktivitede görev yapmayan, ancak aktif bölgede etkin olarak yer alan bir treonin amino asitin varlığını düşündürmektedir.
10. Gk-Lon proteaz bir protein substrat olan α -kazeini ATP-bağımlı ve bağımsız olarak hidroliz etmiştir. ATP yokluğunda α -kazein Gk-Lon tarafından düşük oranda hidroliz edilirken, ATP varlığında α -kazein hidrolizi çok daha etkin bir şekilde gerçekleşmiştir.
11. Gk-Lon ATPaz aktivitesi göstermektedir. Protein yıkımı Gk-Lon ATPaz aktivitesini arttırırken, tetrapeptitler aktivitenin azalmasına sebep olmuştur.
12. Mg^{2+} un, α -kazein proteininin ve artan ATP konsantrasyonunun ATPaz aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir.

5. KAYNAKLAR

1. **Akiyama K., Yokota K., Kagawa S., Shimbara N., DeMartino G. N., Slaughter C. A., Noda C., Tanaka K. (1995)** cDNA cloning of a new putative ATPase subunit p45 of the human 26S proteasome, a homolog of yeast transcriptional factor Sug1p. *FEBS Lett.*; 363(1-2):151-6.
2. **Akiyama Y., Kihara A., Tokuda H., Ito K. (1996)** FtsH (HflB) is an ATP-dependent protease selectively acting on SecY and some other membrane proteins. *J Biol. Chem.*; 271(49):31196-201.
3. **Altın G. (2008)** Rekombinat *Geobacillus kaustophilus* HslV ve HslU proteinlerinin *E. coli*'den Saflaştırılması ve Nitelendirilmesi, GYTE Biyoloji Bölümü Yüksek Lisans Tezi.
4. **Ames B. N. (1966)** Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatase. *Methods Enzymol.*; 8:115-118.
5. **Baker A. T. and Sauer R. T. (2006).** ATP-dependent proteases of bacteria: recognition logic and operating principles. *Biochemical Sciences*; 31:647-653.
6. **Barber R. D. and Ferry J. G. (2001)** Archaeal proteasomes. *Methods Enzymol.*; 330:413-24.
7. **Baumeister W., Walz J., Zühl F., Seemüller E. (1998)** The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*, 92(3):367-80.
8. **Benaroudj N., Goldberg A. L. (2000)** PAN, the proteasome-activating nucleotidase from archaebacteria, is a protein-unfolding molecular chaperone. *Nat Cell Biol.*, 2(11):833-9.
9. **Bertani I., Rampioni G., Leoni L., Venturi V. (2007)** The *Pseudomonas putida* Lon protease is involved in N-acyl homoserine lactone quorum sensing regulation. *BMC Microbiol.*;7:71.
10. **Besche H., Tamura N., Tamura T., Zwickl P. (2004a)** Mutational analysis of conserved AAA+ residues in the archaeal Lon protease from *Thermoplasma acidophilum*. *FEBS Lett.*; 10; 574(1-3):161-6.
11. **Besche H., Zwickl P. (2004b)** The *Thermoplasma acidophilum* Lon protease has a Ser-Lys dyad active site. *Eur J Biochem.*; 271(22):4361-5.

12. **Beyon, R. J. and Salvensen G.** (1989). Commercially available protease inhibitors. *In*. Proteolytic enzymes: A practical approach. R.J. Beyon and J.S. Bond (eds.). *Oxford University Press*, Oxford, U.K., p. 241–249.
13. **Bota D. A., Van Remmenb H. and Davies K. J. A.** (2002). Modulation of Lon protease activity and aconitase turnover during aging and oxidative stres. *FEBS Letters*; 532:103-106.
14. **Botos I., Melnikov E. E., Cherry S., Khalatova A., Rasulova F., Tropea J. E., Maurizi M. R., Rotanova T. V., Gustchina A. and Wlodawer A.** (2004a) Crystal structure of the AAA+ a domain of *E. coli* Lon protease at 1.9 Å resolution. *Journal of Structural Biology*; 146:113–122.
15. **Botos I., Melnikov E. E., Cherry S., Tropea J. E., Khalatova A. G., Rasulova F., Dauter Z., Maurizi M. R., Rotanova T. V., Wlodawer A., Gustchina A.** (2004b) The catalytic domain of *Escherichia coli* Lon protease has a unique fold and a Ser-Lys dyad in the active site. *J. Biol Chem.*; 279(9):8140-8.
16. **Brazas M. D., Breidenstein E. B., Overhage J., Hancock R. E.** (2007) Role of Lon, an ATP-Dependent Protease Homolog, in Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.*; 51:4276–4283.
17. **Camcı H.** (2007) ATP-bağımlı Lon proteaz geninin *Geobacillus kaustophilus*"tan klonlanması, DNA dizisinin belirlenmesi ve ekspresyonu, GYTE Biyoloji Bölümü, Yüksek Lisans Tezi.
18. **Chandu D. and Nandi D.** (2004). Comparative genomics and functional roles of the ATP-dependent proteases Lon and Clp during cytosolic protein degradation. *Research in Microbiology*; 155:710–719.
19. **Chiarette M. F., Henderson G. W. and Markovitz A.** (1981). ATP hydrolysis-dependent protease activity of the lon (capR) protein of *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 78(8):4728-32.
20. **Chiarette M. F., Henderson G. W., Doane L. and Markovitz A.** (1984). DNA-Stimulated ATPase Activity on The Lon (CapR) Protein. *Journal of Bacteriology*; Vol. 158, No. 1:p. 195-201.
21. **Chin D. T., Goff S. A., Webstern T., Smithn T. and Goldberg A. L.** (1988). Sequence of the lon Gene in *Escherichia coli* a Heat-Shock Gene Which

Encodes The ATP-Dependent Protease La. *The Journal of Biological Chemistry*; 263(24):11718-11728.

22. **Chuang S. E., Burland V., Plunket D., Daniels D. L., Blattner F. R.** (1993) Sequence analysis of four new heat-shock genes constituting the hslTS/ibpAB and hslVU operons in *Escherichia coli*. *Gene*; 134(1):1-6.

23. **Chung C. H. and Goldberg A. L.** (1982). DNA stimulates ATP-dependent proteolysis and protein-protein-dependent ATPase activity of protease La from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 79(3):795-9.

24. **Chung C. H., Goldberg A. L.** (1981) The product of the lon (capR) gene in *Escherichia coli* is the ATP-dependent protease, protease La. *Proc Natl Acad Sci USA*; 78(8):4931-5.

25. **Chung C. T., Niemela S. L., Miller R. H.** (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA*; 86(7):2172-5.

26. **Chung C. H., Yoo S. J., Seol J. H., Kang M. S.** (1997) Characterization of energy-dependent proteases in bacteria. *Biochem Biophys Res Commun.*; 241(3):613-6.

27. **Ciechanover A.** (1994) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*; 79(1):13-21.

28. **Claret L., Hughes C.** (2000) Rapid turnover of FlhD and FlhC, the flagellar regulon transcriptional activator proteins, during *Proteus* swarming. *J Bacteriol.*; 182(3):833-6.

29. **Coleman J. L., Katona L. I., Kuhlow C., Toledo A., Okan N. A., Tokarz R., Benach J. L.** (2009) Evidence that two ATP-dependent (Lon) proteases in *Borrelia burgdorferi* serve different functions. *PLoS Pathog.*; (11):e1000676.

30. **Coux O., Tanaka K., Goldberg A. L.** (1996) Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem.*; 65:801-47.

31. **de Mot R., Nagy I., Walz J. and Baumeister W.** (1999) Proteasomes and other self-compartmentalizing proteases in prokaryotes. *Trends in Microbiol.*; 7:88-92.

32. **Duman R. E., Löwe J.** (2010) Crystal structures of *Bacillus subtilis* Lon protease. *J. Mol Biol.*; 401(4):653-70.
33. **Ebel W., Skinner M. M., Dierksen K. P., Scott J. M. and Trempey J. E.** (1999) A Conserved Domain in *Escherichia coli* Lon Protease Is Involved in Substrate Discriminator Activity. *J. Bacteriol.*; 181: 2236-2243.
34. **Fenteany G., Standaert R. F., Lane W. S., Choi S., Corey E. J., Schreiber S. L.** (1995) Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science*; 268:726-731.
35. **Fischer H. and Glockshubers R.** (1993). ATP Hydrolysis Is Not Stoichiometrically Linked with Proteolysis in the ATP-dependent Protease La from *Escherichia coli*. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.*; Vol. 268, No. 30, 25:22502-22507.
36. **Fischer H. and Glockshuber R.** (1994) A. point mutation within the ATP-binding site inactivates both catalytic functions of the ATP-dependent protease La (Lon) from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*; 356 (1):101-3.
37. **Fu G. K. and Markovitz D. V.** (1998). The Human LON Protease Binds to Mitochondrial Promoters in a Single-Stranded, Site-Specific, Strand-Specific Manner. *Biochemistry*; 37 (7):1905–1909.
38. **Fukui T., Eguchi T., Atomi H. and Imanaka T.** (2002). A Membrane-Bound Archaeal Lon Protease Displays ATP-Independent Proteolytic Activity towards Unfolded Proteins and ATP-Dependent Activity for Folded Proteins. *Journal of Bacteriology*; Vol. 184, No. 13:3689–3698.
39. **Gill R. E, Karlok M. and Benton D.** (1993). *Myxococcus xanthus* encodes an ATP-dependent protease which is required for developmental gene transcription and intracellular signaling. *J. Bacteriol.*; 175(14):4538-44.
40. **Gille C., Goede A., Schlöetelburg C., Preissner R., Kloetzel P.M., Göbel U.B., Frömmel C.** (2003) A comprehensive view on proteasomal sequences: implications for the evolution of the proteasome. *J Mol Biol.*; 326(5):1437-48.
41. **Goff S.A., Casson L.P., Goldberg A.L.** (1984) Heat shock regulatory gene *htpR* influences rates of protein degradation and expression of the *lon* gene in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 81(21): 6647–6651.

42. **Goldberg A. L, Moerschell R. P, Chung C. H. and Maurizi M. R.** (1994) ATP-dependent protease La (lon) from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.*; 244: 350–375.
43. **Goldberg A. L.** (1990) ATP-dependent proteases in prokaryotic and eukaryotic cells. *Semin Cell Biol.*; 1:423-32.
44. **Goldberg A. L.** (1992) The mechanism and functions of ATP-dependent proteases in bacterial and animal cells. *Eur. J. Biochem.*; 203(1-2):9–23.
45. **Goldberg A. L., Moerschell R. P., Chung C. H. and Maurizi M. R.** (1981). ATP-dependent protease La (Lon) from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.*; 244:350-75.
46. **Gonzalez M., Frank E.G., Levine A.S. and Woodgate R.** (1998). Lon-mediated proteolysis of the *Escherichia coli* UmuD mutagenesis protein: in vitro degradation and identification of residues required for proteolysis. *Genes Dev.*; 12:3889-3899.
47. **Gottesman S., Gottesman M., Shaw J.E., Pearson M.L.** (1981) Protein degradation in *E. coli*: the *lon* mutation and bacteriophage lambda N and cII protein stability. *Cell*; Apr;24(1):225-33.
48. **Gottesman S. and Maurizi M.R.** (1992) Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets. *Microbiol Rev.*; (4):592-621.
49. **Gottesman S.** (1996). Proteases: and their targets in *Escherichia coli*. *Annual Reviews in Genetics*; 30:465-506.
50. **Groll M., Ditzel L., Löwe J., Stock D., Bochtler M., Bartunik H. D. and Huber R.** (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*; 386, 463–471.
51. **Groll M., Bochtler M., Brandstetter H., Clausen T., Huber R.** (2005) Molecular machines for protein degradation. *Chembiochem.*; (2):222-56.
52. **Hanson P. I., Whiteheart S. W.** (2005) AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat. Rev. Mol Cell Bio.*; 6(7):519-29.

53. **Herman C., Thévenet D., Boulloc P., Walker G.C., D'Ari R.** (1998) Degradation of carboxy-terminal-tagged cytoplasmic proteins by the *Escherichia coli* protease HflB (FtsH). *Genes Dev.*; 12(9):1348-55.
54. **Hilt W., Wolf D. H.** (1996) Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem Sci.*; (3):96.
55. **Hlavacek O., Vachova O.** (2002). ATP-Dependent Proteinases in Bacteria. *Folia Microbiology*; 47 (3):203- 212.
56. **Hoskins J.R., Kim S.Y., Wickner S.** (2000a) Substrate recognition by the ClpA chaperone component of ClpAP protease. *J Biol Chem.*; 275(45):35361.
57. **Hoskins J.R., Singh S.K., Maurizi M.R., Wickner S.** (2000b) Protein binding and unfolding by the chaperone ClpA and degradation by the protease ClpAP. *Proc. Natl. Acad. Sci.; USA* 97(16):8892-7.
58. **Ito K., Udaka S. and Yamagata H.** (1992). Cloning, Characterization, and Inactivation of the *Bacillus brevis* lon gene. *J. Bacteriol.*; 174(7): 2281–2287.
59. **Ito K., Akiyama Y.** (2005) Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *Annu Rev Microbiol.*; 59:211-31.
60. **Iyer L.M., Leipe D.D., Koonin E.V., Aravind L.** (2004) Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J. Struct Biol.*, 146:11-31.
61. **Kang, M. S., Lim, B. K., Seong, I. S., Seol, J. H., Tanahashi, N., Tanaka, K., and Chung, C. H.** (2001). The ATP-dependent CodWX (HslVU) protease in *Bacillus subtilis* is an N-terminal serine protease. *Embo J.*; 20, 734-742.
62. **Katayama-Fujimura Y., Gottesman S. and Maurizi M. R.** (1987). A multiplecomponent, ATP-dependent protease from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*; 262:4477-4485.
63. **Kocabiyik S., Ozdemir I., Zwickl P., Ozdoğan S.** (2010) Molecular cloning and co-expression of *Thermoplasma volcanium* proteasome subunit genes. *Protein Expression and Purification*; Volume:73, Issue:2, Pages:223-230.
64. **Kuroda A., Nomura K., Ohtomo R., Kato J., Ikeda T., Takiguchi N., Ohtake H. and Kornberg A.** (2001). Role of inorganic polyphosphate in promoting

ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*. *Science*.; 293(5530):705-8.

65. **Laemmli U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 15; 227(5259):680-5.

66. **Laksanalamai P., Whitehead T. A. and Robb F. T.** (2004) Minimal protein-folding systems in hyperthermophilic archaea. *Nature Reviews Microbiology*; 2, 315-324.

67. **Langer, T.** (2000). AAA proteases cellular machines for degrading membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.*; 25, 247-251.

68. **Lee A., Tsay S., Chen M. and Wu S.** (2004a). Identification of a Gene Encoding Lon Protease from *Brevibacillus thermoruber* WR-249 and Biochemical Characterization of its Thermostable Recombinant Enzyme. *Eur. J. Biochem.*; 271:834–84.

69. **Lee A., Hsu C. and Wu S.** (2004b). Functional Domains of *Brevibacillus thermoruber* Lon Protease for Oligomerization and DNA Binding. Role of N-Terminal and Sensor and Substrate Discrimination Domains. *The Journal of Biological Chemistry*; Vol. 279, No. 33, 34903–34912.

70. **Lee C., Schwartz M. P., Prakash S., Iwakura M., Matouschek A.** (2001) ATP-dependent proteases degrade their substrates by processively unraveling them from the degradation signal. *Mol Cell*.; Mar, 7(3):627-37.

71. **Lee I. and Szuki C. K.** (2008). Functional mechanics of the ATP-dependent Lon protease- lessons from endogenous protein and synthetic peptide substrates. *Biochim. Biophys. Acta.*; May, 1784 (5):727-35.

72. **Leow T. C., Rahman R. N., Basri M., Salleh A. B.** (2007) A thermoalkaliphilic lipase of *Geobacillus* sp. T1. *Extremophiles*; May;11(3):527-35.

73. **Licht S. and Lee. I.** (2008). Resolving Individual Steps in the Operation of ATP-Dependent Proteolytic Molecular Machines: From Conformational Changes to Substrate Translocation and Processivity. *Biochemistry*; 47:3595-3605.

74. **Liu T., Lu B., Lee I., Ondrovicova G., Kutejova E., Suzuki C. K.** (2004). DNA and RNA binding by the mitochondrial Lon protease is regulated by nucleotide and protein substrate. *J. Biol. Chem.*; 279(14):13902-10.

75. **Löwe J., Stock D., Jap B., Zwickl P., Baumeister W., Huber R.** (1995) Crystal structure of the 20S **proteasome** from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science*.; 268(5210):533-9.
76. **Lupas A., Flanagan J. M., Tamura T., Baumeister W.** (1997) Self-compartmentalizing proteases. *Trends Biochem Sci*.; (10):399-404.
77. **Maehara T., Hoshino T. and Nakamura A.** (2008) Characterization of three putative Lon proteases of *Thermus thermophilus* HB27 and use of their defective mutants as hosts for production of heterologous proteins. *Extremophiles*; 12:285–296.
78. **Melnikov E. E., Andrianova A., Morozkin A. D., Stepnov A. A., Makhovskaya O. V., Botos I., Gustchina A., Wlodawer A. and Rotanova T. A.** (2008). Limited proteolysis of *E. coli* ATP-dependent protease Lon a unified view of the subunit architecture and characterization of isolated enzyme fragments. *Acta Biochimica Polonica*; Vol. 55 No. 1/2008, 1–000.
79. **Neuwald A. F., Aravind L., Spouge J. L. ve Koonin E. V.** (1999). AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res*.; 9:27–43.
80. **Ngo J. K., Davies K. J. and Ann N. Y.** (2007). Importance of the Lon protease in mitochondrial maintenance and significance of declining Lon in aging. *Acad Sci*.; 1119:78-87.
81. **Nomura K., Kato J., Takiguchi N., Ohtake H. and Kuroda A.** (2004) Effects of inorganic polyphosphate on the proteolytic and DNA-binding activities of Lon in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*.; 279(33):34406-10.
82. **Ogura T., Wilkinson A. J.** (2001) AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells*.; 6(7):575-97.
83. **Okuno T., Yamada-Inagawa T., Karata K., Yamanaka K., Ogura T.** (2004) Spectrometric analysis of degradation of a physiological substrate sigma32 by *Escherichia coli* AAA protease FtsH. *J Struct Biol*.;146(1-2):148-54.
84. **Orlowski, M.** (1990) The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry*; 29, 10289 -10297.

85. **Pickart C. M. and Cohen R. E.** (2004). Proteasomes and their kinds: proteases in the machine age. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*; 5:177–187.
86. **Pickart C. M.** (1997). Targeting of substrates to the 26S proteasome. *FASEB J.*; Nov; 11(13):1055-66.
87. **Priest, F. G.** (1993). Systematics and ecology of *Bacillus*. In *Bacillus subtilis and other Gram-positive Bacteria*, pp. 3–33. Edited by A. L. Sonenshein, J. A. Hoch & R. Losick. *American Society for Microbiology*; Washington, DC.
88. **Rep M., van Dijl J.M., Suda K., Schatz G., Grivell L.A., Suzuki C.K.** (1996) Promotion of mitochondrial membrane complex assembly by a proteolytically inactive yeast Lon. *Science*; 274(5284):103-6.
89. **Rohrwild M., Pfeifer G., Santarius U., Muller S. A., Huang H. C., Engel A., Baumeister W. and Goldberg A. L.** (1997). The ATP-dependent HslVU protease from *Escherichia coli* is a four-ring structure resembling the proteasome. *Nat Struct Biol.*; 4:133–139.
90. **Rotanova T. V., Botos I., Melnikov E. E., Rasulova F., Gustchina A., Maurizi M. R, Wlodawer A.** (2006). Slicing a protease: Structural features of the ATP-dependent Lon proteases gleaned from investigations of isolated domains. *Protein Sci.*; 15:1815-1828.
91. **Rotanova T. V.** (1999) Structural and functional characteristics of ATP-dependent Lon-proteinase from *Escherichia coli*. *Bioorg Khim.*; 25(12):883-91.
92. **Roudiak S. G., Seth A., Knipfer N., Shrader T. E.** (1998) The lon protease from *Mycobacterium smegmatis*: molecular cloning, sequence analysis, functional expression, and enzymatic characterization. *Biochemistry*; 37 (1):377–386.
93. **Sambrook J., MacCallum P., Russell, D.** (2000) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition). *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York.
94. **Schoemaker J. M., Gayda R. C., Markovitz A.** (1984) Regulation of cell division in *Escherichia coli*: SOS induction and cellular location of the sulA protein, a key to lon-associated filamentation and death. *J Bacteriol.*; 158(2):551-61.
95. **Seemüller E., Lupas A. and Baumeister W.** (1996) Autocatalytic processing of the 20S proteasome. *Nature*; 382, 468-470.

96. **Seol J. H., Kwon J. A., Yoo S. J., Kim H. S., Kang M. S., Chung C. H.** (1997) Site-directed mutagenesis of the Cys residues in ClpA, the ATPase component of protease Ti (ClpAP) in *Escherichia coli*. *Biol Chem.*; 378(10):1205-9.
97. **Seong I. S., Oh J. Y., Lee J. W., Tanaka K., Chung C. H.** (2000) The HslU ATPase acts as a molecular chaperone in prevention of aggregation of SulA, an inhibitor of cell division in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*; 477(3):224-9.
98. **Shotland Y., Koby S., Teff D., Mansur N., Oren D. A., Tatematsu K., Tomoyasu T., Kessel M., Bukau B., Ogura T., Oppenheim A. B.** (1997) Proteolysis of the phage lambda CII regulatory protein by FtsH (HflB) of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.*; 24(6):1303-10.
99. **Simmons L. A., Grossman A. D., Walker G. C.** (2008) Clp and Lon proteases occupy distinct subcellular positions in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*; 190(20):6758-68.
100. **Smith, C. K., Baker, T. A. and Sauer, R. T.** (1999) Lon and Clp Family Proteases and Chaperones Share Homologous Substrate-Recognition Domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 96, 6678-6682.
101. **Stahlberg H., Kutejova E., Suda K., Wolpensinger B., Lustig A., Schatz G., Engel A., Suzuki C. K.** (1999). Mitochondrial Lon of *Saccharomyces cerevisiae* is a ring-shaped protease with seven flexible subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 96 (12):6787–6790.
102. **Starkova N. N., Koroleva E. P., Rotanova T. V.** (2000) Intracellular proteolysis: signals of selective protein degradation. *Bioorg Khim.*; 26(2):83-96.
103. **Starkova N. N., Koroleva E. P., Rumsh L. D., Ginodman L. M. and Rotanova T. M.** (1998). Mutations in the proteolytic domain of *Escherichia coli* protease Lon impair the ATPase activity of the enzyme. *FEBS Letters*; 422:218-220.
104. **Sullivan, J. A., Shirasu, K., and Deng, X. W.** (2003). The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants. *Nat. Rev. Genet.*; 4, 948–958.
105. **Suzuki C. K., Rep M., van Dijl J. M., Suda K., Grivell L. A. and Schatz G.** (1997). ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis. *Trends in Biochemical Sciences*; Volume 22, Number 4:118-123.

106. **Suzuki C. K., Suda K., Wang N. and Schatz G.** (1994). Requirement for the yeast gene Lon in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration. *Science*; 264 (5161):273-276.
107. **Suzuki T., Suzuki N., Hosoya T.** (1993) Limited proteolysis of rat liver nucleolin by endogenous proteases: effects of polyamines and histones. *Biochem J.*; 289 (Pt 1):109-15.
108. **Takami, H., Takaki, Y., Chee, G., Nishi, S., Shimamura, S., Suzuki, H., Matsui, S., Uchiyama, I.** (2004) Thermoadaptation trait revealed by the genome sequence of thermophilic *Geobacillus kaustophilus*. *Nucleic Acids Research*; 32.21: 6292-6303.
109. **Tojo N., Inouye S., and Komano T.** (1993) The lonD gene is homologous to the lon gene encoding an ATP-dependent protease and is essential for the development of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.*; 175(14):4545-4549.
110. **Tomoyasu T., Yuki T., Morimura S., Mori H., Yamanaka K., Niki H., Hiraga S. and Ogura T.** (1993a). The *Escherichia coli* FtsH protein is a prokaryotic member of a protein family of putative ATPases involved in membrane functions, cell cycle control, and gene expression. *J. Bacteriol.*; 175:1344–1351.
111. **Tomoyasu T., Yamanaka K., Murata K., Suzaki T., Bouloc P., Kato A., Niki H., Hiraga S., Ogura T.** (1993b) Topology and subcellular localization of FtsH protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*; 175(5):1352-7.
112. **Torres-Cabassa A. S. and Gottesman S.** (1987). Capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12 is regulated by proteolysis. *J. Bacteriol.*; 169(3):981-9.
113. **Twining S. S.** (1984). Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes. *Anal. Biochem.*; 143, 30-4.
114. **van Dijl J. M., Kutejova E., Suda K., Perecko D., Schatz G. and Szuki C. K.** (1998). The ATPase and protease domains of yeast mitochondrial Lon: Roles in proteolysis and respiration-dependent growth. *PNAS*; Vol. 95, No. 18:10584-10589.
115. **van Melder L., Thi M. H., Lecchi P., Gottesman S., Couturier M., Maurizi M. R.** (1996) ATP-dependent degradation of CcdA by Lon protease. Effects of secondary structure and heterologous subunit interactions. *J Biol Chem.*; 271(44):27730-8.

116. **van Melder L. and Aerts A.** (2009). Regulation and quality control by Lon-dependent proteolysis. *Research in Microbiology*; 160:645-651.
117. **Voges D., Zwickl P., Baumeister W.** (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem.*; 68:1015-68.
118. **Walker J. E., Saraste M., Runswick M. J., Gay N. J.** (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.*; 1(8):945–51.
119. **Wang J.** (2004). Nucleotide-dependent domain motions within rings of the RecA/AAA(+) superfamily. *J. Struct. Biol.*; 148 (3):259- 67.
120. **Wang N., Gottesman S., Willingham M. C., Gottesman M., and Maurizi M. R.** (1993). A human mitochondrial ATP-dependent protease that is highly homologous to bacterial Lon protease. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 90 (23):11247–11251.
121. **Watanabe S., Muramatsu T., Ao H., Hirayama Y., Takahashi K., Tanokura M., Kuchino Y.** (1999) Molecular cloning of the Lon protease gene from *Thermus thermophilus* HB8 and characterization of its gene product. *Eur. J. Biochem.*; 266(3):811-9.
122. **Waxman L. and Goldberg A. L.** (1985). Protease La, the lon Gene Product, Cleaves Specific Fluorogenic Peptides in an ATP-dependent Reaction. *The Journal of Biological Chemistry*; Vol. 260, No. 22:12022-12028.
123. **Whistler C. A., Stockwell V. O. and Loper J. E.** (2000). Lon Protease Influences Antibiotic Production and UV Tolerance of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Applied and Environmental Microbiology*; Vol. 66, No. 7, 2718-2725.
124. **Wickner S., Gottesman S., Skowrya D., Hoskins J., McKenney K., Maurizi M. R.** (1994) A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 91(25):12218-22.
125. **Wickner S., Maurizi M. R.** (1999) Here's the hook: similar substrate binding sites in the chaperone domains of Clp and Lon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 96(15):8318-20.

126. **Wright R., Stephens G., Zweiger G., Shaphiro L. and Alley M. R.** (1996). *Caulobacter* Lon Protease has a Critical Role in Cell-Cycle Control of DNA Methylation. *Genes & Development*; 10:1532-1542.
127. **Zehnbauer B. A., Markovitz A.** (1980) Cloning of gene lon (capR) of *Escherichia coli* K-12 and identification of polypeptides specified by the cloned deoxyribonucleic acid fragment. *J. Bacteriol.*; 143(2):852–863.

ÖZGEÇMİŞ

H. Zişan ASAL 10 Temmuz 1988`de İstanbul`da doğdu. 2004 yılında Haliç Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü`nde lisans eğitime başladı. 2008 yılında lisans eğitimini tamamladıktan sonra, 2009 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı`nda yüksek lisans eğitime başladı. Yüksek lisans eğitime halen devam etmektedir.

