

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

REKOMBİNANT *Geobacillus kaustophilus* HslV ve
HslU PROTEİNLERİNİN *E. coli*' den
SAFLAŞTIRILMASI VE NİTELENDİRİLMESİ

Gonca ALTIN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GEBZE

2009

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

REKOMBİNANT *Geobacillus kaustophilus* HslV ve
HslU PROTEİNLERİNİN *E. coli*' den
SAFLAŞTIRILMASI VE NİTELENDİRİLMESİ

Gonca ALTIN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

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

GEBZE

2009

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: Rekombinant *G. kaustophilus* HslV ve HslU Proteinlerinin *E. coli*’den saflaştırılması ve nitelendirilmesi

YAZAR ADI: Gonca ALTIN

Hem ökaryotik hem de prokaryotik hücrelerde, birçok hücre içi proteinin yıkımı ATP-bağımlı proteazlar ile başlatılmaktadır. Son yıllarda tanımlanan ve izole edilen HslVU, ATP-bağımlı bir proteaz olup ökaryotik ve arkea proteazomun prokaryotik homologudur. HslVU, proteaz aktivitesine sahip HslV ile ATPaz aktivitesine sahip HslU altünitelerinden oluşmaktadır. Genom ve kristal yapı çalışmaları sonunda HslVU proteazlar hakkında son yıllarda oldukça geniş bilgi sağlanmıştır. Ancak, HslVU proteazların katalitik aktiviteleri ve fonksiyonları hakkındaki bilgi yeterli değildir. Bu çalışmada PGEX 6P-1 ekspresyon vektörüne daha önceden klonlanmış olan *G. kaustophilus*’a ait *hslV* ve *hslU* genleri Glutasyon S-Transferaz ile füzyon protein olarak eksprese edilmiş, saflaştırılmış ve biyokimyasal nitelendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Ayrı ayrı *E. coli*’de eksprese edilip tek basamakta afinite kolan kromatografisi ile saflaştırılan HslV peptidaz ve HslU ATPaz proteinlerinin moleküler ağırlıkları, SDS-PAGE’de sırasıyla 19 kDa ve 50 kDa olarak belirlenmiştir. HslVU proteaz, proteazomun kimotripsin-benzeri aktivite deneylerinde kullanılan florogenik bir substrat olan CBZ-Gly-Gly-Leu-AMC’yi etkili bir şekilde hidrolize etmiştir. ATP varlığında, HslV peptidaz tek başına çok düşük aktivite göstermesine karşı HslU ile birlikte bulunduğu aktivitesinde 15 kat artış gözlenmiştir. HslVU’nun peptidaz aktivitesinin optimum sıcaklığı 55 °C ‘ve optimum pH aralığı 9.0- 11.0 olarak belirlenmiştir. HslVU proteaz aktivitesi için kofaktör olarak Mg^{2+} ’a ihtiyaç duymaktadır. *G. kaustophilus* HslVU peptidaz aktivitesi, laktasistin ile güçlü bir şekilde inhibe edilmiştir. HslVU proteaz kazeini ATP varlığında düşük oranda hidrolize ederken doğal bir protein substratı olan MBP-SulA’yı hidrolize edememiştir. HslU tek başına zayıf ATP hidroliz aktivitesi göstermiştir ancak HslV varlığında, HslVU ATPaz aktivitesinde 4.8 kat artış görülmüştür. Ayrıca, ATP ve HslV miktarındaki artış HslVU ATP hidrolizini artırmıştır.

SUMMARY

TITLE OF THESIS: : Purification and characterization of recombinant *G. kaustophilus* protein HslV and HslU from *E. coli*

AUTHOR: Gonca ALTIN

Both in eukaryotes and prokaryotes, degradation of many intracellular proteins is initiated by ATP-dependent proteases. Recently-identified and isolated heat-HslVU is an ATP-dependent proteolytic system and a prokaryotic homolog of the archaeal proteasome. HslVU consists of the proteolytic subunit HslV and ATPase subunit HslU. Important information on HslVU proteases has been obtained from the recent genomic and structural studies. However, little is known about the catalytic activities and functions of HslVU proteases. In this study, *G. kaustophilus*' *hslV* and *hslU* genes which are previously cloned into PGEX 6P-1 expression vector, were expressed with Glutathione S-Transferase, purified and biochemically characterized. The molecular weights of HslV peptidase and HslU ATPase proteins, which were separately expressed in *E. coli* and purified using one step affinity chromatography, were determined by SDS-PAGE as 19 kDa and 50 kDa, respectively. HslVU protease efficiently hydrolyzed CBZ-Gly-Gly-Leu-AMC, a fluorogenic substrate often used in chymotryptic-like proteasome activity assays. In the presence of ATP, HslV showed a very low peptidase activity, however when used together with HslU, the peptidase activity increased approximately 15 fold. Optimum temperature for HslVU protease activity was observed at 55 °C and optimal pH determined at 9.0-11.0. HslVU requires Mg^{2+} as a cofactor for peptidase activity. *G. kaustophilus* HslVU peptidase activity was strongly inhibited by lactacystin. While HslVU protease hydrolyze the casein in the presence of ATP weakly it can not hydrolyse the natural protein substrate MBP-SulA. HslU alone has a low ATP hydrolysis activity however HslV stimulated HslVU ATPase activity 4.8 fold. Also increasement of ATP and HslV induced HslVU ATP hydrolysis.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bana danışmanlık yapan, destekleri ile sürekli yanımda olan Yrd. Doç. Dr. F. İnci Özdemir'e, bu süre boyunca rehberliğini ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Füsun Gümüşel'e ve tez dönemim boyunca maddi manevi desteklerinden dolayı Doç. Dr. Sedef Tunca Gedik'e teşekkürlerimi sunarım.

Kadim dostum Merve Ayvazoğlu'na bana sonsuz yardımları, tüm maddi manevi desteği için -teşekkür ifadesi yetersiz kalsa da- yürekten teşekkür ederim.

Laboratuvarda omuz omuza çalıştığımız, zamanı bana eğlenceli ve mutlu kılan, yüzlerce olasılık içerisinde bu kombinasyonla buluştuğumuz için beraber sevindiğimiz değerli kader arkadaşlarım Kemal Avican'a, Haluk Camcı'ya, İrem Yalım'a, Ümmühan Savaş'a, Arş. Gör. Tuğrul Doruk'a ve Davut Erdoğan'a sonsuz teşekkür ederim.

Beraber sonike olduğumuz sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Irmak Şah'a ve Uzman Hüseyin Balcı'ya parçalanmış hücreleri için teşekkür ederim.

Tez dönemim boyunca maddi manevi destekleri ile yanımda olan sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Serda Kayman ve Birsu Çinçin'e teşekkür ederim.

Okuldaki varlıklarının benim için mutluluk olduğu Arş. Gör. Ercan Gürbulak, İbrahim Tan, Arş. Gör. Aytuğ Sivaslıgil Tekbaş ve Arş. Gör. Mesut Tekbaş'a desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Son olarak, beni yetiştiren, eğitimimin her döneminde destekleyen anneme, babama ve kendi bilgisayarımın yanı sıra bilgisayarlarına el koyduğum kardeşlerime de sabırlarından dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	IV
SUMMARY	V
TEŞEKKÜR	VI
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
TABLolar DİZİNİ	XIV
1.GİRİŞ	1
1.1 Proteazlar	1
1.1.1. ATP Bağımlı Proteazlar	3
1.1.1.1. 26S Proteozom	3
1.1.1.2 Lon(La) Proteaz	5
1.1.1.3 FtsH Proteaz	6
1.1.1.4 ClpAP (Ti) Proteaz	7
1.1.1.5 HslVU Proteaz	8
1.1.1.5.1. HslV	13
1.1.1.5.2. HslU	15
1. 2. <i>Geobacillus kaustophilus</i>	18
1.3. Tez Çalışmasının Amacı	19
2. GEREÇ VE YÖNTEMLER	21
2.1 Gereçler	21
2.1.1 Kullanılan Kimyasallar	21
2.1.2 Kullanılan Enzimler ve Tamponları	21
2.1.3 Kullanılan Peptitler ve İnhibitörler	21
2.1.4 Kullanılan Kitler	22
2.1.5 Kullanılan DNA ve Protein Moleküler Belirteçleri	22
2.1.6 Kullanılan Plazmit Vektörler	23
2.1.6.1 pGEX Vektör ve GST Füzyon Sistem	23
2.1.6.2 pMal-p2-SulA Rekombinant Vektörü	24
2.1.7 Kullanılan Saflaştırma Kolonu ve Kolon Materyali	25
2.1.8 Kullanılan Bakteri Soyları	26
2.1.9 Kullanılan Çözelti ve Besiyerleri	26

2.1.10 Kullanılan Cihazlar	31
2.2 Yöntemler	32
2.2.1 HslV ve HslU Ekspresyonu	32
2.2.2 pMal-p2-SulA'nın Transformasyonu ve Rekombinant Seçimi	32
2.2.3 pMal-p2-SulA Ekspresyonu	33
2.2.4 Protein Saflaştırması	34
2.2.4.1 HslV ve HslU Saflaştırması	34
2.2.4.2 MBP-SulA Protein Saflaştırması	34
2.2.5 HslV ve HslU Protein Kompleksinin Oluşumu ve HslV Peptidaz Aktivitesinin Tespiti	35
2.2.6 HslVU Tarafından Çeşitli Florojenik Peptitlerin Yıkımı	36
2.2.7 HslVU Peptidaz Aktivitesi için Optimum İnkübasyon Süresinin Tespiti	36
2.2.8 Sıcaklığın HslVU Peptidaz Aktivitesine Etkisi	37
2.2.9 pH'nın HslVU Peptidaz Aktivitesine Etkisi	37
2.2.10 Mg ⁺² 'un HslVU Peptidaz Aktivitesine Etkisi	37
2.2.11 HslVU'nun Çeşitli Proteinleri Yıkımı	38
2.2.11.1 HslVU Tarafından Kazein Yıkımı	38
2.2.11.2 HslVU Tarafından MBP-SulA Yıkımı	38
2.2.12 Çeşitli Proteaz İnhibitörlerinin HslVU Peptidaz Aktivitesine Etkisi	39
2.2.13 Substrat Konsantrasyonunun HslVU Peptidaz Aktivitesine Etkisi	39
2.2.14 HslVU ATPaz Aktivitesinin Tespiti	39
2.2.15 Poliakrilamid Jel Elektroforezi	40
2.2.16 BCA Yöntemi ile Protein Miktarı Tayini	40
3. BULGULAR	41
3.1 HslV Proteaz ve HslU ATPaz'ın Ekspresyonu	41
3.2 HslV ve HslU'nun Saflaştırılması	42
3.3. <i>E. coli</i> BL21(DE3) Hücrelerinin pMal-p2-SulA ile Transformasyonu	45
3.4 MBP-SulA'nın Ekspresyonu ve Saflaştırılması	46
3.5 HslVU'nun Biyokimyasal Nitelendirilmesi	47
3.5.1 HslVU Proteazın Kompleks Oluşumu ve Peptidaz Aktivitesinin Tespiti	47
3.5.2 HslVU Tarafından Çeşitli Florojenik Peptitlerin Yıkımı	48

3.5.3 HslVU Peptidaz Aktivitesi İçin Optimum İnkübasyon Süresi Tespiti	49
3.5.4 Sıcaklığın HslVU Peptidaz Aktivitesine Etkisi	50
3.5.5 pH'nın HslVU Peptidaz Aktivitesine Etkisi	51
3.5.6 Mg^{+2} 'un HslVU Peptidaz Aktivitesine Etkisi	52
3.5.7 HslVU Tarafından Kazein Yıkımı	53
3.5.8 HslVU Tarafından MBP-SulA Yıkımı	54
3.5.9 Çeşitli Proteaz İnhibitörlerinin HslVU Peptidaz Aktivitesine Etkisi	54
3.5.10 Substrat Konsantrasyonunun HslVU Peptidaz Aktivitesine Etkisi	56
3.5.11 HslVU ATPaz Aktivitesinin Tespiti	57
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	60
5. KAYNAKLAR	69

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

~	Yaklaşık
Å	Amströng
AAA ⁺	Çeşitli hücresel aktivitelere sahip ATPazlar
ADP	Adenozin difosfat
APS	Amonyum persulfat
Arg	Arjinin
ATP	Adenozin trifosfat
Bç	Baz Çifti
ClpA	Kazeinolitik Proteaz A
ClpP	Kazeinolitik Proteaz P
ClpQ	Kazeinolitik Proteaz Q
ClpX	Kazeinolitik Proteaz X
DTT	Ditiyotreitöl
EDTA	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin
EtBr	Etidyum Bromid
FtsH	Flament oluşturuç sıcaklık-hassas A
GST	Glutatyon-S-Transferaz
HCl	Hidroklorik asit
HsIU	Isı şoku bölgesi U
HsIV	Isı şoku bölgesi V
IPTG	İzopropil-beta-D-tiyo galaktopiranozid
K	Potasyum
KCl	Potasyum Klorid
kDA	Kilodalton
L	Litre
Lon	Proteaz La
M	Molar
MBP	Maltoz Bağlama Proteini
MgCl ₂	Magnezyum Klorür

MgSO₄	Magnezyum Sülfat
mL	Mililitre
mM	Milimolar
Mops	3-(n-Morfolino) Propan Sülfonik Asit
Na₂OAc	Sodium Asetat
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NBD	Nükleotit Bağlama Domaini
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEG	Polietilen Glikol
pmol	Pikomol
PMSF	Fenilmetansülfanilflorit
Rpm	Dakika başına dönüş
<i>SalI</i>	<i>Streptomyces albus</i> I endonükleaz
SDS	Sodyum Dodesil Fosfat
Ser	Serin
SOB	Süper-optimal Brot
SOC	Süper-optimal Brot (Katabolik Baskılama)
SulA	SOS hücre bölünmesi inhibitörü
TEMED	Tetrametiletilediamin
Thr	Treonin
TSS	Toplam katı solüsyonu
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μ	Mikron
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
σ	Sigma
σ^{32}	RNA polimeraz faktör sigma-3

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
1.1	Proteazomun şematik gösterimi
1.2	Membrana demirli FtsH proteazın şematik gösterimi
1.3	ClpAP proteazın alt birimlerinin ve protein yıkımının şematik gösterimi
1.4	HslVU proteazın alt birimlerinin birleşmesinin ve ayrılmasının şematik gösterimi
1.5	HslV proteaz ve 20S proteazomun β alt ünitesinin yapısal benzerliği
1.6	HslVU'nun kristal yapısına göre çizilmiş kurdela gösterimi.
1.7	<i>Geobacillus kaustophilus</i> 'un <i>Geobacillus</i> cinsinin diğer türlere göre filogenetik yeri
2.1	DNA ve Protein moleküler belirteçleri
2.2	GST füzyon vektörü pGEX-6p-1'in açık okuma çerçevesi
2.3	MBP füzyon vektörü pMal-p2'nin açık okuma çerçevesi
2.4	Enzim aktivite ölçümleri AMC/substrat kalibrasyon eğrisi
3.1	Yüksek seviyede eksprese edilen GST-HslV füzyon proteinin SDS-PAGE görüntüsü
3.2	HslU peptidaz proteininin GSTap-ff kolon ile saflaştırılması
3.3	HslVpeptidaz proteininin GSTap-ff kolon ile saflaştırılması
3.4	GST-HslU saflaştırması.
3.5	GST-HslV saflaştırması.
3.6	<i>EcoRI</i> ile kesilmiş pMal-p2-SulA plazmit DNAsının agaroz jel görüntüsü
3.7	MBP-SulA protein saflaştırması.
3.8	HslVU'nun ATP bağımlı aktif kompleks oluşumu ve peptidaz aktivitesi
3.9	HslU'nun HlsV peptidaz aktivitesine etkisi
3.10	HslVU peptidaz aktivitesi için inkübasyon süresi grafiği
3.11	Sıcaklığın HslVU peptidaz aktivitesine etkisi
3.12	pH'ın HslVU peptidaz aktivitesine etkisi
3.13	Mg^{+2} 'un konsantrasyonun enzim aktivitesine etkisi

3.14	HslVU proteaz tarafından kazein yıkımı	54
3.15	Laktasistin inhibitörünün enzim aktivitesine etkisi	55
3.16	PMSF inhibitörünün enzim aktivitesine etkisi	56
3.17	Substrat artışına karşılık HslVU enzimi için hız grafiği	57
3.18	ATP varlığında ve yokluğunda HslV ve HslVU'nun ATP hidrolizi	58
3.19	ATP miktarının ATP hidrolizine etkisi	58
3.20	HslV'nin HslU ATP hidrolizine etkisi	59

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
3.1	Çeşitli florojenik peptitlerin HsIVU tarafından göreceli hidrolizi	49

1.GİRİŞ

1.1 Proteazlar

Proteolitik enzimler bütün organizmalarda hücrelerdeki yaşam döngüsünde anahtar rol oynamaktadırlar. Proteazlar, transkripsiyon faktör kontrolü, öncü peptitlerin aktivasyonu ve işlevi, hücre gelişimi ve farklılaşma, hücre döngüsü ve apoptozun düzenlenmesi ile eşleşen protein yıkım işlevinde yer alırlar (Goldberg, 1992, Gottesman, 2003). Bu sebeple proteazlar son yıllarda sadece protein katabolizması ve peptit ve amino asit oluşumu için protein yıkımını sağlayan enzimler olmayıp hücre proteomunun sürekliliğini sağlanmasından sorumlu düzenleyici işlevlerin temel bileşenleri olarak göz önünde bulundurulmaktadır.

Seçici hücre yıkımı düzenleyici proteinlerin düşük temel seviyesinin korunması, zarar görmüş, hatalı yada potansiyel olarak zararlı proteinlerin uzaklaştırılması için gerekli olup ATP-bağımlı proteazlar olarak bilinen sıklıkla “protein yıkım nano-mekanizmaları” olarak tanımlanan özgül enzimlerle yürütülmektedir. ATP-bağımlı proteazlar, proteolitik aktiviteden sorumlu bir peptidaz ve ATP bağlanması ya da hidrolizinden sorumlu olan ATPaz domaini ya da alt biriminden oluşan çok alt birimli kompleks proteinlerdir (Goldberg, 1992). ATPazlar AAA⁺ protein ailesine aittirler. ATP-bağımlı yada AAA⁺ proteazların ATPaz bileşenleri, bu enzimlerin proteolitik aktivitesini düzenlemekte aynı zamanda hedef protein substratların seçiminde görev almaktadırlar.

Bütün AAA⁺ protein ailesinin üyeleri, korunmuş bölgeler içeren yaklaşık 230-250 aminoasit rezidüden oluşan özgül domain varlığı ile tanımlanmaktadırlar. Buna korunmuş ATPaz domaini (conserved ATPase domain-CAD) denmektedir ve içerisinde Walker motifini taşımaktadır. Walker A (P-loop) ve Walker B (Magnezyum bağlanma) kutularından oluşan AAA kaseti ATP hidrolizinden

sorumludur (Laksanalamai ve ark., 2004). Walker A motifi Gly- (X)₄-Gly-Lys-Thr (X=Herhangi bir aminoasit) dizisi şeklinde tanımlanmıştır. Walker B motifi de (φ)₄-Asp-Glu-(X)₂ (φ=Hidrofobik aminoasit, X=Herhangi bir aminoasit) dizisi şeklinde tanımlanmıştır (Walker ve ark., 1982).

Bütün AAA⁺ proteazlar genel olarak benzer yapısal özelliklere sahiptirler. Her biri birbiriyle bitişik 6 veya 7 altbirimden oluşan, 4 veya 6 halkanın bir araya gelmesiyle oluşturulan içi boş fiçı benzeri yapılara sahiptirler. Proteolitik aktif bölgeler, hatalı yıkımı engellemek için iç çember içinde gizlenmiş olarak bulunmaktadırlar. Hekzamerik AAA⁺ ATPaz'lar, proteaz silindirlerinin bir ya da her iki ucuna bağlanır ve substratları tanıyarak doğal substrat katlanmalarını açıp, katlanmaları açılmış polipeptit zinciri olarak proteaz çemberinin iç kısmına yıkım için transfer etmektedirler (Wenzel ve Baumeister., 1995; Van Melder ve ark., 1996; Horwich ve ark., 1999). Korunmuş AAA⁺ domainleri bu ortak aktivitelerden sorumluyken özgül domainler sıklıkla adaptör ya da substrat tanınmasında görev almaktadır (Mogk ve ark., 2004).

Her bir ATPaz altbiriminin AAA⁺ modülü, büyük αβ domain ve küçük α-helikal domain oluşturmaktadır. Nükleotit bağlanması komşu altbirimlerin birbirine bakan bölgelerinde gerçekleşmektedir. Birkaç korunmuş amino asit rezidüsü, nükleotit hidrolizinde rol oynamaktadır. Walker B motifinde oldukça korunmuş olan glutamik asit rezidüsünün mutasyonu, AAA⁺ proteinin ATP hidrolizini bozmak için yeterlidir. Buna ilave olarak, korunmuş arjinin rezidüleri, ATP bağlanması ve hidrolizine eşlik eden konformasyonel değişikliklerin yaratılmasında kritik rol oynamaktadır (Ogura ve ark., 2001; Ogura ve Wilkinson, 2003).

Çoğu AAA⁺ proteinler zarar görmüş, yıkıma uğrayacak ya da translasyondan sonra değiştirilmesi gereken proteinlerin katlanmalarının açılmasında veya tekrar katlanmasında işlevseldirler. Bazı AAA⁺ proteinler aynı zamanda şaperon rolü de görmektedirler. Clp/Hsp100 ailesine ait olan ClpB, polipeptidleri agregatlardan uzaklaştırıp katlanmalarını açtıktan sonra katlanmalarının yeniden düzenlenmesi için DnaK gibi koşaperonlarla etkileşimine olanak sağlamaktadır (Goloubinoff ve ark., 1999).

1.1.1. ATP Bağımlı Proteazlar

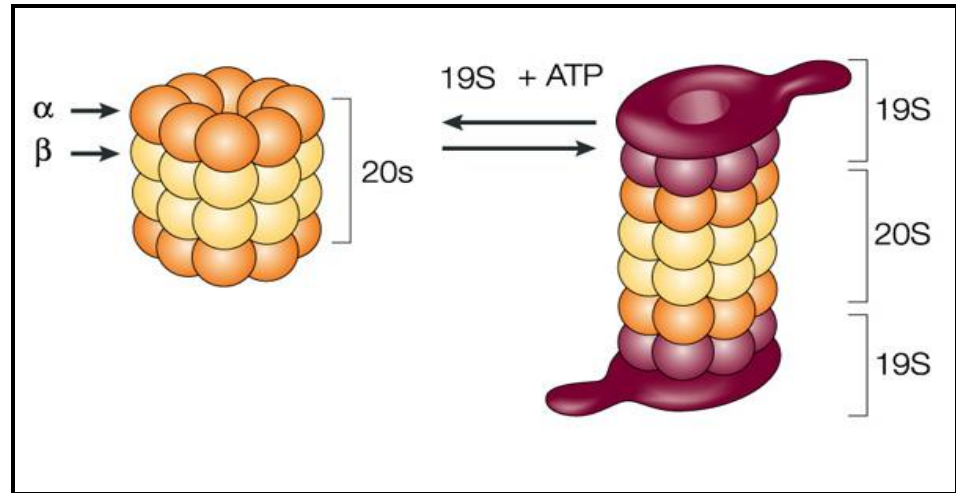
Ökaryotlarda bulunan 26S proteazom, bilinen en büyük ATP-bağımlı proteazdır. Sitoplazmada ve nükleusta bulunan ökaryotik proteazomlar “ubikuitin ile konjuge olmuş” ya da olmamış proteinlerin yıkımını katalize eden multikatalitik proteaz kompleksleridir (Baumeister ve ark., 1998, Ciechonever ve Schwartz, 1998).

Bakteriler ubikuitin-proteazom yoluna sahip olmamakla beraber anormal proteinleri elimine eden ve düzenleyici proteinlerin hızlı yıkımını sağlayan ve yapısal olarak birbirine benzer birçok ATP-bağımlı proteaz sistemine sahiptir. Bunlar Lon (Charette M.F. ve ark., 1981; Chung C.H. ve ark., 1981), Fts (Tomoyasu T. Ve ark., 1993), ClpAP/ClpXP(Ti) (Hwang B.J. ve ark. 1987, 1988 ; Katayama Y. ve ark., 1988) ve HslVU (Yoo S.J. ve ark., 1996; Rohrwild M. ve ark., 1996; Missiakas D. ve ark., 1996) proteazlarıdır.

1.1.1.1. 26S Proteozom

Genellikle *proteazom* olarak bilinen 26S proteazom, ökaryotik hücrelerin nükleus ve sitoplazmasında eksprese edilen çoklu katalitik etkiye sahip bir enzim kompleksidir. İlk zamanlarda proteozomun sadece hasarlı veya yanlış katlanmış proteinlerin geri dönüşümünde rol oynadığı düşünülse de son on yılda yapılan çalışmalar, hücre döngüsünde etkin rol oynadığını ve dolayısıyla hücrenin hayatta kalmasında kritik öneme sahip olduğunu açığa çıkarmıştır. Bugüne kadar proteazomun birçok hücresel süreçte merkezi ve vazgeçilmez bir öneme sahip olduğu ispatlanmıştır

Yaklaşık 2600 kDa büyüklüğünde olan 26S proteazom, silindirik şekilli proteolitik çekirdeği oluşturan 20S proteazom (700 kDa) ve poliubikitine bağlanmayı sağlayan enerji bağımlı 19S düzenleyici kompleksten (900 kDa) oluşur (Ciechonover, 1994; Coux ve ark., 1996; Baumeister ve ark., 1998) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Proteazomun şematik gösterimi (Adams, 2004)

20S kompleksin daha basit yapısal organizasyonu birçok Arkeal bakterilerde (*Thermoplasma acidophilum*, *Methanosarcina thermophila*, *Methanococcus jannaschii*, *Pyrococcus furiosus*, *Haloferax volcanii*, *Thermoplasma volcanium* gibi) ve Gram (+) *Actinomycetes*'lerde görülmektedir (Dahlmann ve ark., 1989; Bauer ve ark., 1997; Wilson ve ark., 1999; Barber ve Ferry, 2001; Özdemir, 2003). *T. acidophilum* 20S proteazomu, α ve β olmak üzere iki tip altbirimden oluşan 20S proteazom, birbirine bitişik yedi üyeli dört halkadan meydana gelir. İçteki halkalar proteolitik olarak aktif β -altbirimlerinden oluşurken dıştaki halkalar α -altbirimlerinden meydana gelmektedir (Zwickl ve ark., 1992; Löwe ve ark., 1995; Groll ve ark., 1997).

26S proteazomun 19S kompleksi, moleküler ağırlıkları 25 kDa ila 110 kDa arasında değişen 20 farklı altbirimden oluşmuştur. 19S kompleksinin ATPaz altbirimleri, birer AAA^+ alt-ailesi üyesi olup, proteazomun substrat proteinlere kovalent bağlanan poliubikitin zincirlerinin tanınması yoluyla substratın belirlenmesi, katlanmaların açılması ve substratın proteolitik bölgeye taşınmasından sorumludur (Groll ve ark., 2005).

20S proteazomun katalitik bölgesi, β -tipi halkaların oluşturduğu silindirin iç boşluğu olan kompartımanda yer almaktadır (Min Suk Kang ve ark., 2001). Ökaryotik 20S proteazomun β tipi alt birimlerinin sadece üç tanesi proteolitik olarak

aktif olup N-terminal hidrolaz aktivitesine sahiptirler ($\beta 1$, $\beta 2$ ve $\beta 5$) ve substrat özgülüğü ve aktivitelere göre kimotripsin-benzeri, tripsin-benzeri ve post glutamil peptid hidrolaz-benzeri olarak isimlendirilirler (Groll ve ark., 2001). Proteinler, 20S proteazom tarafından 3-25 amino asitlik peptidler oluşacak şekilde sürekli parçalanır (Nussbaum, 1998).

Ökaryotik hücrelerin çoğu sitozolik ve nükleer proteinleri ubiquitin(Ub)/proteazom yolağıyla gerçekleştirilir. Ub/proteazom yolağı protein kalite kontrolünden, antijen işlenmesinden, sinyal iletiminden, hücre döngüsü kontrolünden, hücre farklılaşmasından ve apoptosizden sorumludur. Bu yolak proteinleri yıkmak için kompleks enzimatik sistemler kullanmaktadır. Protein substratları poli-Ub zincirinin kovalent olarak eklenmesiyle işaretlenir ve 26S proteazom tarafından yıkıma uğratılır(Wilkinson, 1999; Pickart, 2001).

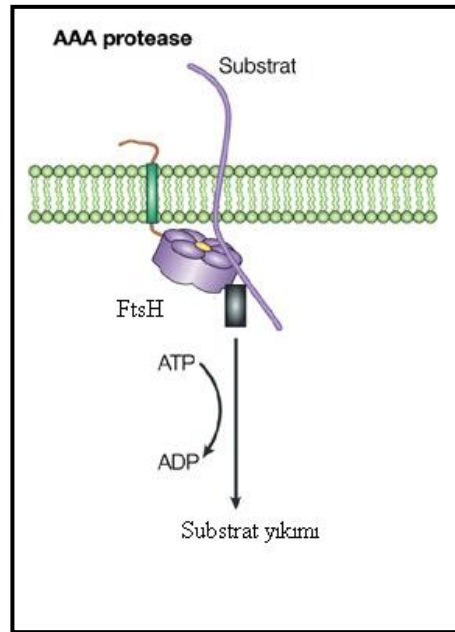
1.1.1.2 Lon(La) Proteaz

Proteaz La, *lon* geninin ürünü olan bir ısı şoku proteinidir. Bu enzim 87 kDa büyüklüğündeki alt ünitelerden oluşan bir tetramer (400-450 kDa) olarak karakterize edilmiştir (Goldberg, 1992; Goldberg ve ark., 1994). Her bir altbirim aktif serin bölgesi ve tekli ATP-bağlanma bölgesi taşımaktadır (Chung CH ve Goldberg, 1982). Lon proteaz aynı zamanda spesifik olmayan DNA bağlanma aktivitesi taşımakta ve proteaz aktivitesi DNA ile düzenlenmektedir.

Lon proteazın, kararsız düzenleyici proteinlerle birlikte bir çok anormal proteinin yıkımında birincil rol oynadığı gösterilmiştir. Bunlardan bazıları lamda N proteini, hücre bölünmesi regülatörü SulA, kapsül sentezi pozitif regülatörü RcsA ve F faktörü ekleme sistemi proteini CcdA'dır (Gottesman S., 1996).

1.1.1.3 FtsH Proteaz

E. coli'ye ait FtsH proteaz ATP-bağımlı sitoplazmik Zn metalloproteazdır. *ftsH* geni tarafından kodlanmaktadır ve yaklaşık 70 kDa ağırlığındadır. FtsH proteaz bir AAA⁺ üyesidir (Neuwald A., 1999). Prokaryotlarda ve ökaryotların mitekondri ve kloroplast ile ilişkili bölgelerinde yaygın olarak bulunmaktadır (Gottesman S, 2003). Bu proteaz iki tane *trans*-membran dizisine sahiptir ve bu sebeple iç membrana demirlenmiştir (Tomayasu ve ark., 1995) (Şekil-1.2.).



Şekil-1.2. Membrana demirli FtsH proteazın şematik gösterimi (Tsai ve ark., 2002)

E. coli'deki kanıtlar FtsH proteazın, çözünebilir ve membranla-ilişkili (asosiye) proteinleri yıkıma uğrattığını göstermektedir. Şaperon benzeri aktivite de gösteren FtsH proteazın en önemli işlevi ısı şoku ile uyarılan *E. coli* transkripsiyon faktörü σ_{32} 'nin yıkımıdır (Schumann W., 1999).

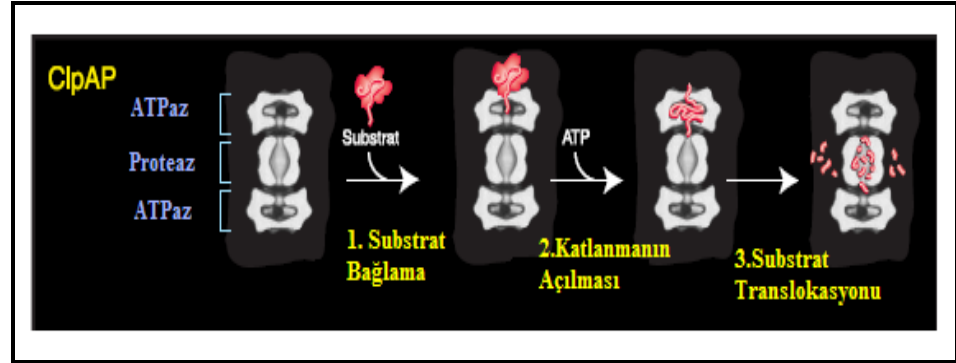
1.1.1.4 ClpAP (Ti) Proteaz

ClpAP proteaz, Lon proteazdan yoksun hücrelerde ATP-bağımlı kazein yıkımına sebep olmasıyla keşfedilmiştir. Lon proteazdan farklı olarak proteaz aktif bölgesi ve ATPaz rezidüsü farklı alt birimlerde bulunmaktadır (Gottesman S., 1996). ClpA Hsp100/Clp ailesine ait 84 kDa büyüklüğünde iki korunmuş ATP bağlanma motifine sahip bir ATPaz iken, ClpP 21 kDa'luk alt biriminde proteoliz için Ser aktif bölgesi taşıyan bir ısı şoku proteindir. ClpP her biri 7 alt birime sahip iki halkadan oluşmaktadır. ClpA ATP yokluğunda trimer iken, ATP varlığında ise 6 alt birimden oluşan tek bir halka oluşturmaktadır. Mutasyonel analizler ilk ATP bağlanma bölgesinin ClpA'nın hegzamer oluşumuyla ilişkili olduğunu, ikinci ATP bağlanma bölgesinin ise ATPaz aktivitesi için gerekli olduğunu göstermiştir. ClpA'da ki iki ATP bağlanma bölgesi de ClpA/ClpP kompleksinin oluşumunda gerekli görünmektedir (Chung ve ark., 1997).

ClpP proteaz, iki tane yedi üyeli halkalardan oluşan alt birimlerden meydana gelmektedir. ClpP'yi oluşturan çemberin iç kısmı 14 proteolitik aktif bölge taşımaktadır ve 51kDa'luk bir proteinin sığabileceği kadar geniştir. Fakat, giriş porunun çapı sadece 10Å'dur ve bu yüzden katlanmış proteinleri alabilecek kadar geniş değildir. ClpP proteazla sadece kısa peptitlerin yıkımı mümkündür. Proteinlerin yıkımı için ATPaz alt ünitesine ihtiyaç duymaktadır (Wang ve ark., 1997). Aktif bölgesine göre bir serin proteazdır.

ClpA ise hegzamerik bir halkadan oluşmaktadır ve ClpP'nin yedi alt üniteli halkasıyla etkileşim kurmaktadır. ATPaz halkaları proteolitik çemberin girişlerinin üzerinde pozisyon almaktadır (Grimaud ve ark., 1998) (Şekil 1.3). ClpP girişinin dar olması substrat katlanmalarının açılmasının ATPazdan proteaza geçiş işlemiyle eş zamanlı olduğun düşündürmektedir. ClpA'nın proteolizis yokluğunda substratların katlanmalarını açan bir şaperon gibi davradığı kanıtlanmıştır (Hoskins ve ark., 2000). Proteinle-aktivasyon moleküler şaperonların karakteristik özelliğidir. DnaK ve DnaJ gibi ClpA da plazmit P1 RepA replikasyon başlangıç proteininin *in vitro* aktivasyonunda şaperon gibi işlev görmektedir. Hsp100/Clp ailesine ait olan ve protein-aktivasyonlu ATPaz aktivitesine sahip olan ClpX de λ O proteininin ısı inaktivasyonundan korunmasında bir şaperon gibi görev alır. ClpX bir ısı şoku

proteinidir ve *clpPX* operonunda ClpP ile birlikte kodlanır. Bu ATPaz, ClpA'nın aksine sadece bir ATP bağlama bölgesine sahiptir. Fakat, ClpP ile λ O proteininin ve bakteriyofaj Mu vir represörünün yıkımını sağlayan alternatif bir Ti proteaz oluşturabilmektedir.



Şekil-1.3. ClpAP proteazın alt birimlerinin ve protein yıkımının şematik gösterimi (Wickner ve ark., 1999)

ClpP bazı canlılarda hücre döngüsünün G1 fazından S fazına geçişini sağlamak gibi fizyolojik süreçlerde rol alırken, *E.coli*'nin sporulasyon safhasında hayatta kalmasını sağladığı ve bazı hücre proteinlerinin miktarlarının düzenlenmesinde rol aldığı bilinmektedir (Weichart ve ark., 2003).

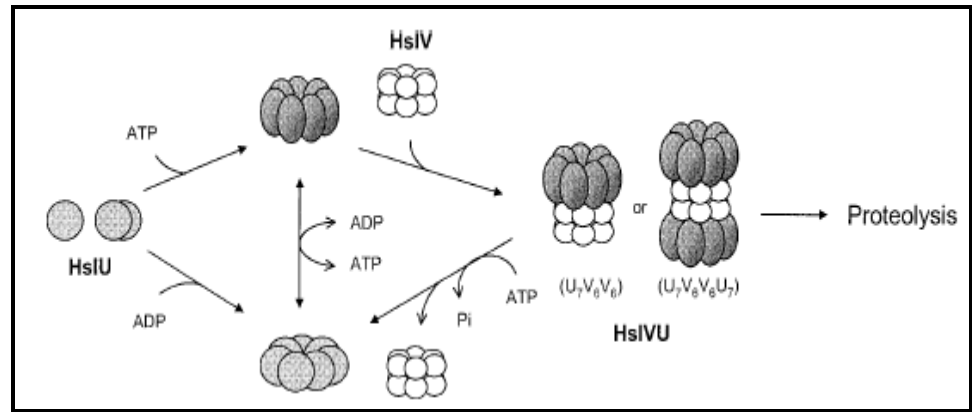
1.1.1.5 HslVU Proteaz

Blattner ve arkadaşları 1993'te *Escherichia coli*'de *hsl* olarak adlandırdıkları 26 yeni ısı şoku geni tanımlamışlardır. Bunlardan ikisi hslVU operonu oluşturmaktadır. (Chuang, and Blattner, 1993). HslVU, peptidaz aktivitesine sahip HslV ve ATPaz ve şaperon aktivitesine sahip HslU bileşenlerinden oluşan ATP-bağımlı bir proteazdır (Chung ve ark., 1993). ClpQY yada CodWX olarak da isimlendirilen ATP-bağımlı proteaz çok ilginç olarak ökaryotik proteazoma benzerlik göstermektedir ve bu sebeple 26S proteazomun analogu olarak kabul edilmektedir (Gille ve ark. 2003).

HslVU son zamanlarda mekanik olarak en iyi karakterize edilmiş ATP bağımlı proteazdır. Bu gruptaki diğer enzimlerle kıyaslandığında kompleksin kararsızlığından dolayı *in vivo* ATP bağımlı proteolitik aktivitesinin izolasyonu tüm denemelere rağmen yapılamamıştır. Bu ATP bağımlı proteazın varlığını kanıtlayan ilk ipucu bakteriyel ısı şoku genlerinin taranması ve hslVU operonunun dizilenmesi çalışmaları sonucu elde edilmiştir. (Chuang ve Blattner,1993). Dizi datası HslU Walker ATPaz motifine sahip bir Hsp 100 proteini olduğunu göstermiştir ve HslV'nin β alt üniteleri arkeabakteriyal ve ökaryotik proteazomlara dikkat çekici bir benzerlik göstermesiyle proteaz aktivitesine sahip olacağı tahmin edilmiştir. İki genin aynı operonda bulunması bunların bir ATP bağımlı proteaz oluşturacağı ihtimalini düşündürmüştür. Bu hipotez sonradan rekombinant olarak ekprese edilen ve saflaştırılan yapıların ATP bağımlı peptidaz aktivitesi göstermesiyle kanıtlanmıştır (Chuang ve ark., 1993). HslVU sonradan tekrar tekrar keşfedilmiştir (Missiakas ve ark., 1996). Bu enzim ayrıca ısı şoku tepkisiyle düzenlenen proteinlerin ve *Escherichia coli*'deki SOS aracılı hücre bölünmesinin baskılayıcılarının görüntülenmesi esnasında bağımsız olarak keşfedilmiştir (Khattar,1997). HslVU aşırı ekspresyonu veya delesyonu olan soylarda gözlenen biyolojik tepki HslVU substratlarının normal seviyelerinin azalması veya artması olmuştur. HslVU, ısı şoku faktörü σ^{32} 'yi yıkmasıyla ısı şoku tepkisini etkileyen ve hücre bölünme inhibitörü Sula yıkımıyla SOS tepkisini etkileyen bir ısı şoku proteinidir (Kanemori ve ark., 1997; Missiakas ve ark., 1999).

HslVU'nun fizyolojik rolünün gözlemlenmesi, HslVU substrat özgüllüğünün bakterideki diğer ATP bağımlı proteazlarla çakışması yüzünden sınırlı kalmıştır. *E.coli*'de HslVU delesyonu, normal büyüme sıcaklığında fenotipe etki etmemiştir, ancak yüksek sıcaklıklarda gözle görülür bir değişim olmuştur (Kanemori ve ark., 1997). Proteaz veri tabanı MEROPS'a göre bazı bakteriyel türler HslVU tipi peptidazdan yoksundur (Rawlings ve ark., 2002). Bu yüzden son zamanlarda bazı HslV ve HslU homologlarının ata ökaryotlarda bulunması şaşırtıcı bir gelişmedir (Couvreur ve ark.,2002). HslV kompleksinin kararsızlığı ve düşük oranda ekspresyonu yaban tip soylarda çalışılmasını zorlaştırmıştır. Ancak aşırı eksprese edilmiş ve saflaştırılmış bileşenlerin *in vitro* çalışılması mümkün olmuştur. Katlanmış substratların yıkımı için ATP'ye ihtiyaç duymaktadır. (Huang ve Goldberg, 1997).

HslVU proteaz bileşenlerinin dördüncül yapısı elektron mikroskobu ve imaj analizi çalışmaları sonucunda belirlenmiş ve 20S proteazoma benzerliği dikkati çekmiştir. HslV proteolitik bileşeni, merkezi proteolitik çemberi oluşturan hegzamer dimerinden oluşmuştur ve 20S proteazomlardan farklı olarak her bir halka yedi (heptamer) yerine altı üyeden (heksamer) oluşmaktadır. ATP varlığında HslU ATPaz hem heksamerik hem de heptamerik halkaları oluşturmaktadır ve bu HslU halkaları, HslV halkalarının her iki ucuna bağlanarak $U_6V_6V_6U_6$ yada $U_7V_6V_6U_7$ konfigürasyonlarında HslVU kompleksini oluşturmaktadır (Rohrwild ve ark., 1997) (Şekil- 1.2).



Şekil 1.4 HslVU proteazın alt birimlerinin birleşmesinin ve ayrılmasının şematik gösterimi (Chung ve ark.,1997)

HslVU ve bileşenlerinin yapı ve işlevlerine ilişkin bilgilerin büyük bir kısmı *E.coli*'de yapılan çalışmalar sonucunda sağlanmıştır. Bununla birlikte, HslVU'ya benzeyen bir proteaz *Bacillus subtilis*'te bulunmuştur. Bu proteinler (CodW peptidaz ve CodX ATPaz) *cod* operonu tarafından kodlanmakta ve *E. coli*'deki HslV-HslU'ya % 52 oranında amino asit benzerliği göstermektedir. İlginç olarak CodW, HslV'den ve proteazomun β alt birimlerinden farklı olarak, aktif bölge rezidüsü gibi işlev gören N-terminal treonin yerine N-terminal serin rezidüsünün hidroksil grubunu katalitik nükleofil olarak kullanmaktadır. CodWV aynı zamanda di-izopropilflorofosfat (DFP) ve fenilmetilsülfonil florofosfat (PMSF) gibi serine proteaz inhibitörleri tarafından çok güçlü olarak inhibe edilmiştir. CodWX, N-terminalinde aktif bölge olarak

davranan Ser residülerine sahip ilk ATP-bağımlı proteazdır (Min Suk Kang ve ark., 2001).

HslVU, son yıllarda Song ve arkadaşları tarafından (2003) bir hipertermofil olan *Thermotoga maritima*'dan izole ve karakterize edilmiştir. *T. maritima*'dan HslVU'yu oluşturan hslV ve hslU alt birimleri klonlanmış, dizileri belirlenmiş ve eksprese edilmiştir. *T. Maritima*, HslVU, CBZ-Gly-Gly-Leu-AMC ve kazeini sıcaklık (optimum 75-80°C) bağımlı olarak hidrolize etmektedir. Aynı zamanda, HslV'nin kristal yapısı belirlenmiş, dodekamerik enzim yapısı *E. coli*'deki benzerleri ile karşılaştırılmış ve korunmuş olduğu saptanmıştır.

Soon Ji Yoo ve arkadaşlarının (1996) yaptığı çalışmada *E. coli*'ye ait hslVU genleri pGEM-T vektörüne klonlanıp *E. coli* XL2-Blue hücrelerinde ifade edilmiştir. French Press yöntemi ve diyaliz yöntemleriyle saflaştırılan enzim immunoblot analizleriyle tespit edilmiştir. Peptit hidrolizi deneyleri için substrat olarak Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC kullanılarak karakterizasyon yapılmıştır. Bu nitelendirmede, enzimin ATP bağımlı çalıştığı, Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC florojenik substratını etkili bir biçimde hidroliz ederken, Suc-Ala-Ala-Phe-AMC florojenik hidrofobik peptiti hiç hidrolize etmediği tespit edilmiştir.

Markus Rohrwild ve arkadaşlarının (1996) yaptığı çalışmada *E. coli*'ye ait hslV ve hslU genleri pGEX-2T'ye klonlanmıştır. *E. coli* BL21(DE) soyu bu rekombinant plazmit ile transforme edilmiştir. GST saflaştırması ile elde edilen enzimin başta CBZ-Gly-Gly-Leu-AMC substratı olmak üzere çeşitli florojenik substratlar ve inhibitörler kullanılarak biyokimyasal nitelendirmesi yapılmıştır. Bu nitelendirme sonunda enzimin ATP-bağımlı bir proteolitik aktivite gösterdiği ve ATP varlığının Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC florojenik substratının yıkımını 150 kat artırdığı tespit edilmiştir. Enzimin Suc-Ala-Ala-Phe-AMC florojenik hidrofobik peptiti ise çok az hidrolize ettiği tespit edilmiştir. İnhibisyon çalışmaları yapılmış ve enzimin Calpain I ve laktasistin inhibitörleriyle tamamen inhibe olurken, PMSF ile çok az inhibe olduğu görülmüştür. Böylece elde edilen enzimin N-terminal Thr katalitik aktivitesine sahip olduğu düşünülmüştür.

Soon Ji Yoo ve arkadaşlarının (1997) yaptığı çalışmada HslVU, Soon Ji Yoo ve arkadaşlarının (1996) yaptığı çalışmadaki yöntemlerle saflaştırılmış. HslV'nin N-terminal Thr'i yönlendirilmiş mutagenezle mutasyona uğratılmıştır. Peptit hidrolizi çalışmalarında substrat olarak Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC kullanılarak HslU'nun N-terminalinin HslV'nin peptidaz aktivitesindeki rolüne bakılmıştır. HslV'nin N-terminal Thr'inin delesyonu aktiviteyi bozmuştur.

Mathias Bochtler ve arkadaşlarının (2000) yaptığı çalışmada pET12b vektörüne bağlanan *hslVU* genleri ifade edilip hücreler toplandıktan sonra proteinler lizozim, sonikasyon, ultrasantrifüj, Sefaroz kolonu, Q-Sefaroz FF kolonu ve Sephacryl S300 jel filtrasyon kolonu kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen enzimin yapısı kristallografik çalışmalar ile belirlenmiştir. ATP varlığında HslU ve HslV'nin HslVU kompleksini $U_6V_6V_6U_6$ yada $U_7V_6V_6U_7$ konfigürasyonlarında oluşturduğu tespit edilmiştir.

Min Suk Kong ve arkadaşlarının (2001) yaptıkları çalışmada *Bacillus subtilis*'e ait *codX(hslU)* ve *codW(hslV)* genleri pGEM-T klonlama vektörüne aktarılıp, aktif bölge tesbiti için PCR ile yönlendirilmiş mutagenez gerçekleştirilmiştir. *E. coli* bu mutant ve yaban genleri içeren plazmitlerle transforme edilmiştir. İfade edilen genlerden elde edilen enzimler Q-Sefaroz kolon, diyaliz ve hidroksiapatit kolan kullanılarak saflaştırılmıştır. Peptit hidrolizi için substrat olarak Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC kullanılmış, *Bacillus subtilis*'e ait CodWX enziminin ATP bağımlı proteolitik aktivitesinin N terminal Serinin katalitik aktivitesi ile şekillendiği bulunmuştur.

Ihn Sik Seong ve arkadaşlarının (2002) yaptığı çalışmada HslVU, Soon Ji Yoo ve arkadaşlarının (1996) yaptığı çalışmadaki yöntemlerle saflaştırılmış. HslU'nun C-terminali yönlendirilmiş mutagenezle mutasyona uğratılmıştır. Peptit hidrolizi çalışmalarında substrat olarak N-karbobenzoksi (Cbz)-Gly-Gly-Leu-7-amido-4-metilkoumarin (AMC) kullanılarak HslU'nun C-terminalinin HslV'nin peptidaz aktivitesindeki rolüne bakılmıştır. HslU'nun C-terminalinin HslU'nun kendi polimerizasyonunda ve HslV ile birleşmesinde etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Wataru Nishii ve Kanji Takahashi' nin (2003) yaptığı çalışmada ise *E. coli*' ye ait *hslVU* geni pET21a (+) vektörüne klonlanıp, *E. coli* BL21(DE3) soyunda ifade edilmiştir. Enzim, sonikasyon ve His-Bind kolonu (HslV için), kitin boncuk kolonu(HslU için) kullanılarak saflaştırılmıştır. Substrat olarak SulA'nın kullanıldığı çalışmada SulA'nın kesim bölgeleri belirlenmiştir.

Burton ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı çalışmada ise *E.coli*'ye ait HslVU pET21b vektörüne klonlanmış ve Ni-NTA resin ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzim ile HslVU'nun proteolitik aktivitesinin ATP bağımlılığı üzerine çalışılmıştır. Proteolitik aktivitenin ATP bağımlı olduğu ve Mg^{+2} iyonu gereksinimi duyduğu görülmüştür. ATP ve Mg^{+2} iyonunun HslU kararlılığını ve peptidin kesim bölgelerinin tanınmasını sağladığı sonucuna varmışlardır.

Azim ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptıkları çalışmada ise *E. coli*'ye ait HslVU genleri Bochtler ve arkadaşlarının 1997 yılında yaptıkları çalışmadaki gibi klonlanmış ve enzim burada anlatıldığı gibi saflaştırılmıştır. Substrat olarak florojenik bir peptit olan (Cbz)-Gly-Gly-Leu-7-amido-4-metilkoumarin (AMC) ve bir protein olan SulA kullanılarak HslU'nun HslV'ye olan afinitesi çalışılmıştır. HslU'nun HslV'ye olan afinitesinin substrat bağımlı olarak arttığı tespit edilmiştir.

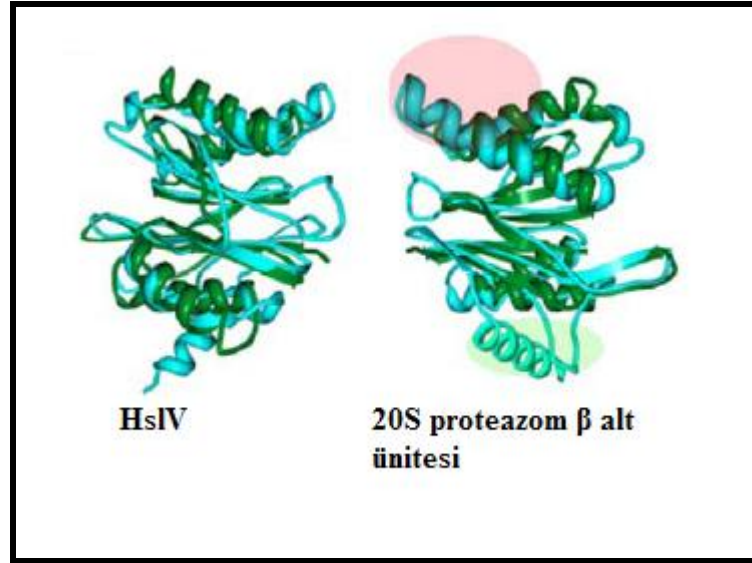
1.1.1.5.1. HslV

HslV temel gen dizisi, arkeal ve ökaryotik 20S proteazomun proteolitik “çekirdek ” β -tipi alt birimine oldukça benzerlik göstermektedir (Chuang ve ark., 1993, Seemüller ve ark., 1996, de Mot ve ark., 1999) (Şekil 1.3.). Rohrwild ve arkadaşlarının 1997'de yaptığı çalışmada rekombinant HslV'nin elektron mikroskobu ile elde edilen görüntülerinde, HslV'nin proteazomlarda olduğu gibi merkezi boşluğa sahip hekzamerlerden oluşan bir dimer yapısı oluşturduğu gösterilmiştir. HslV'nin tahmin edilmeyen hekzamerik simetrisi ve alt birimlerinin katlanması ökaryotik proteazomlara benzerliği X-ray kristallografisi ile gösterilmiştir (Bochtler ve ark., 1997).

Bu benzerliğin yanında HslV, 20S proteazom β -tipi alt birimlerindeki gibi, N-terminalinde iki korunmuş treonin rezidüsüne sahiptir (Seemüller ve ark., 1996). Yoo ve arkadaşlarının 1997 yılında yaptığı çalışmada N-terminal treonin delesyonu ya da valin ile yer değişimi (T1V), HslVU aktivitesini tamamıyla bozmuştur. Diğer mutasyonlar (T1S, T2V, T2S) ise aktiviteyi %70-80 oranında düşürmüştür. *Thermoplasma* proteazomunun tüm Ser rezidüleri mutasyona uğratıldığında aktiviteye hiçbir etkileri olmadığı görülmüştür. HslV'nin 5 Ser rezidüsü Ala ile değiştirilmiş, ilginç olarak S124A ve S172A mutasyonlarının aktiviteyi tamamen yok ettiği, S103A mutasyonunun ise aktiviteyi %50 düşürdüğü görülmüştür. Diğer yandan S5A ve S143A mutasyonlarının peptid hidrolizi aktivitesine çok az etki ettiği ya da hiç etki etmediği görülmüştür.

Seemüller ve arkadaşları ökaryotik ve öbakteriyel β alt birimlerinde iyi korunmuş Gly-Ser-Gly motifine dikkat çekmişler ve Ser rezidüsünün potansiyel nükleofil olabileceğini söylemişlerdir. Fakat, *Thermoplasma* β alt birimlerinde bu Ser rezidüsünün değişiminin aktiviteyi etkilemediği görülmüştür. *E. coli* HslV'de Ser¹²⁴ motif içindeki potansiyel nükleofil rezidüsüne benzemektedir. Ser124A mutasyonunun da aktiviteyi tamamen yok ettiği gözlenmiştir. Bu sebeple, Ser¹²⁴ rezidüsünün HslV'nin katalitik işlevinde yer alması olası görülmüştür. Ayrıca, bu ihtimal diğer Ser rezidüleri Ser¹⁰³ ve Ser¹⁷² için de olasıdır. Katalitik aktiviteye doğrudan etki etmese de katalitik bölgeye ya da peptid bağlanma bölgesine yakınlıklarıyla dolaylı etki ettikleri düşünülmüştür. Aynı zamanda, laktasistin (*Streptomyces* metaboliti), 20S proteazom β -tipi alt birimlerinde olduğu gibi spesifik olarak HslV'nin N-terminalindeki treonine özgül olarak bağlanıp, HslVU proteazının proteolitik aktivitesini inhibe etmektedir (Seemüller ve ark., 1995, Rohrwild ve ark., 1996, Yoo ve ark., 1996).

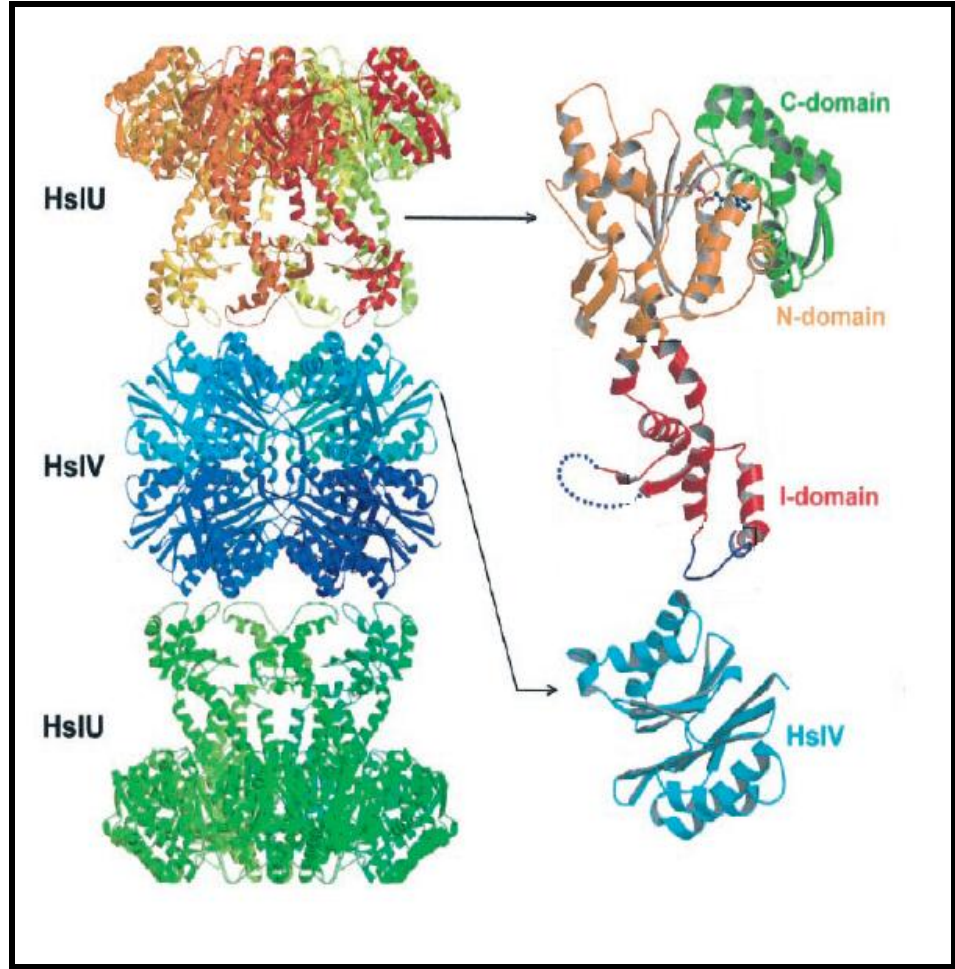
Bununla beraber, HslV'nin proteolitik aktivitesi üzerinde HslU ATPaz da rol oynamaktadır. HslU tek başına *E.coli* hücre bölünmesi proteini Sula'nın agregasyonunu önlerken, HslV ile kompleks haline geldiğinde HslV-aracılı Sula yıkımını gerçekleştirmektedir (Seong ve ark., 2002).



Şekil 1.5 HslV proteaz ve 20S proteazomun β alt ünitesinin yapısal benzerliği (Vallas ve Bourne, 2008)

1.1.1.5.2. HslU

HslU, Clp/Hsp100 protein ailesinin üyesi olan bir ATPazdır ve şaperon aktivitesi göstermektedir (Seol ve ark., 1997, Nuewald ve ark., 1999, Seong ve ark., 2000). Diğer taraftan HslU'nun, AAA-ATPaz ailesinin bir üyesi olduğu tespit edilmiştir. Yapısal analizler göstermiştir ki bu aile dikkat çeken iki domaine sahiptir. Bu domainlerden büyük olanı α/β karışık domaini olup nükleotit bağlanma cebin Walker A ve Walker B motiflerini içermektedir. Küçük domain ise daha çok α helikal yapıda olup AAA⁺ proteinlerin sensör-1 motifini içermektedir. Bunlara ek olarak, HslU ara domaine (Intermediate domain - domain I) sahiptir (Wang ve ark., 2001) (Şekil 1.4). dATP bağlı durumda HslU'nun C ucu bir loop ve heliks oluşturarak HslU-HslU iç yüzeyindeki hidrofobik cebe gömülmektedir. ATP bağlandığında ise şişerek HslV-HslV iç yüzeyine bağlanmaktadır. HslU'nun C ucunda yapılan mutasyon çalışmaları da göstermiştir ki HslU'nun C-ucu HslV'yle bağlanıp HslVU kompleksini oluşturmada ve kendi oligomerizasyonunu sağlamada temel rol oynamaktadır (Seong ve ark., 2002).



Şekil-1.6 HslVU'nun kristal yapısına göre çizilmiş kurdela gösterimi. N domaini turuncu, C domaini yeşil, I domaini kırmızı gösterilmiştir.

Bu sebeple HslU, AAA-ATPaz ailesine ait 6 bileşen içeren proteazomal 19S düzenleyici kapağın taban kısmı için kullanışlı bir model sistem oluşturmaktadır (Glickman ve ark., 1998).

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki HslU tek başına ATPaz aktivitesine sahipken, HslV tek başına zayıf bir proteaz olup N-Karbobenzoksi (CBZ)-Gly-Gly-Leu-7-amido-4-metil-koumarin (AMC) gibi belirgin florojenik hidrofobik peptitleri ve aynı zamanda insulin β -zinciri ve kazein gibi polipeptitleri yavaşça yıkıma uğratmaktadır, ancak ATP varlığında HslU ATPaz, HslV'nin proteolitik aktivitesini 20 kat güçlendirecek şekilde uyarmaktadır. Bununla beraber HslV'nin, HslU ATPaz aktivitesini 2-4 kat artırdığı ancak, HslU'nun ATP'ye olan afinitesini çok az etkilediği belirtilmiştir (Yoo ve ark., 1996, Rohrwild ve ark., 1996, Seol ve ark.,

1997). HslVU proteazın, hücre bölünmesi inhibitörü olan Sula (Medhat M. Khattar, 1997; Cordell ve ark., 2003), sıcaklık şoku faktörü σ^{32} (Kanemori ve ark.1997) ve transkripsiyon aktivatörü ResA (Torres-Cabassa ve Gottesman, 1987) gibi kısa yaşam süreli proteinlerin proteolizinde görev aldığı bilinmektedir.

Sula SOS regulonunun bir üyesidir ve sentezi mitomisin C gibi DNA'ya hasar veren ajanlarla indüklenir. Sula SOS tepkisi adı verilen işlemle transkripsiyonal olarak indüklendikten sonra FtsZ'nin kendi kendine birleşmesini önleyerek hücre bölünmesini inhibe eder. *In vivo'da* Sula yıkımı çoğunlukla Lon ATP bağımlı proteazın aktivitesi olarak görülse de HslVU onun yerini almaktadır. Bu hücre bölünmesini inhibe etmek için gerçekleşen SOS tepkisi esnasında Sula birikmiş Lon mutanlı bir *E.coli*'nin HslVU aşırı üretimi sonucunda baskılanmasıyla anlaşılmıştır.

FtsZ hücre bölünmesi sürecinin başlatıcı proteinidir. FtsZ polimer formu oluşturan tübülün benzeri bir proteindir. İki monomeri bir birinden ayıran GTPaz aktif bölgesine sahiptir. Bir monomer GTP bağlanmasını sağlar, diğeri ise T7 halkasıyla nükleotit hidrolizini sağlar. Sula dimeri FtsZ'nin nükleotit bağlanma bölgesine bağlanarak veya FtsZ'de konformasyonel değişiklikler meydana getirerek hücre bölünmesini inhibe eder. Sula T7 halkasına bağlandığında ise polimer oluşumunu bloke eder.

Sula proteini SOS tepkisi esnasında çok miktarda sentezlenir, miktarı toplam protein sentezinin %0.3'üne yaklaşır. Hücrede devinimi hızlıdır, yarı ömrü 1.2 dakikadır.

Lon proteaz, Sula'da belirli bölgeleri yıkıma uğratmaktadır. Örneğin Sula'nın fonksiyonu için önemli olan (hücre bölünmesini inhibisyonu ve Lon ile etkileşimi gibi) C terminalindeki ve merkezdeki Leu-Ser bölgeleridir. Sula'nın Lon ile yıkımı Sula'nın fonksiyonun hızlı bir düşüş sağlar. HslVU Lon'dan farklı bölgeleri yıkıma uğratmaktadır, fakat bu bölgeler de (C terminal Ala80-ser81 Ala150, ser151 leu54-Gln55, ile163-his164 leu67-thr68 leu49-leu50, leu65-trp66) Sula'nın fonksiyonları için önemlidir.

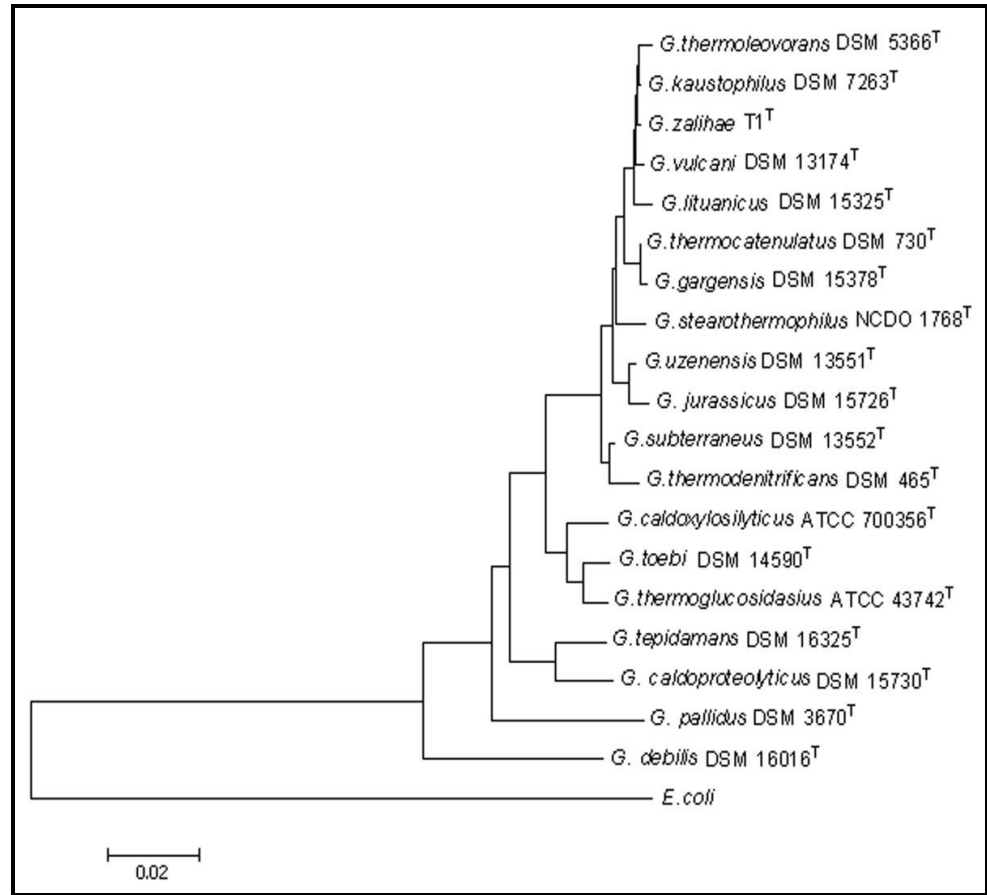
Özetle, HslVU *E. coli*'de bulunan ve hücre bölünmesi inhibitörü olan Sula proteininin yıkımını gerçekleştirerek ilgili hücrenin bölünmeye devam etmesini sağlamaktadır. *E. coli*'de DNA hasarı SOS tepkisi olarak adlandırılan sürecin bazı genlerini uyarır. SOS-uyarılabilir genlerden biri de *sfiA*'dır ve DNA tamir edilinceye kadar hücre bölünmesini geciktiren özel bir hücre bölünme inhibitörünü kodlar. Bu inhibitör protein Sula'dır ve hedefi temel hücre bölünmesi proteini olan FtsZ'dir. Sula, Lon proteaz tarafında yıkıma uğratılır. Bunun yanında Sula HslVU'nun aşırı üretimi ile HslVU tarafından da yıkıma uğratılır (Medhat M. Khattar, 1997).

1. 2. *Geobacillus kaustophilus*

Geobacillus kaustophilus (HTA426), Pasifik okyanusundaki Mariana çukurunun derin deniz sedimentlerinden izole edilmiş termofilik bir bakteridir. Bir memrana, flagellaya sahip, çubuk şeklinde, aerobik endospor oluşturan Gram pozitif bir bakteridir (Takami ve ark., 2004; Nazani ve ark., 2001).

Optimal büyüme sıcaklığı 60 °C olan *Geobacillus kaustophilus* 'un maksimum büyüme sıcaklığı 74 °C'tır. *Geobacillus kaustophilus* akuatik ortamlarda yaşamaktadır. *Geobacillus kaustophilus* cinsinin diğer türleri de petrol rezervlerinde ve toprakta bulunmuştur. Bu mikroorganizma pH 2-pH 12 arasında, 5 °C -78 °C sıcaklıkta ve % 0-30 tuzluluktaki yaşam koşullarına dayanabilmektedir (Priest ve ark., 1993; Uson ve ark., 2006).

Geobacillus kaustophilus 3.54 Mb dairesel kromozom taşımaktadır. Aynı zamanda 47.9 kb plazmit içermektedir. Genomu dizinlendiğinde protamin, sipermin sentetaz ve tRNA metil transferaz genleri bulunmuştur. Bu genlerin yüksek sıcaklıklarda mikroorganizmanın DNA/RNA kararlılığında rol oynadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte *Geobacillus kaustophilus* genomunun % 86'sı protein kodlamaktadır (Rahman ve ark., 2006).



Şekil 1.7. *Geobacillus kaustophilus*'un *Geobacillus* cinsinin diğer türlere göre filogenetik yeri (Rahman ve ark., 2007)

1.3. Tez Çalışmasının Amacı

HslVU yeni bir proteaz olmasına rağmen genomik ve kristal yapı çalışmaları sonucu bu ATP-bağımlı proteaz hakkında oldukça geniş bilgi sağlanmıştır, ancak ATP-bağımlı proteolizis mekanizması üzerinde yeterli bilgi bulunmamaktadır. Farklı organizmalardan yeni HslVU proteazların izolasyonu ve biyokimyasal ve genetik karakterizasyonlarından elde edilecek veriler bu özgün proteaz sisteminin moleküler biyolojisinin aydınlatılması çabalarına önemli katkılarda bulunacaktır. Bu tez çalışması Yüksek Lisans öğrencisi Kemal Avican'ın tezini oluşturan ve GYTE BAPK destekli olan “ATP-bağımlı proteaz geninin *Geobacillus kaustophilus*'tan klonlanması, DNA dizisinin belirlenmesi ve ekspresyonu” başlıklı proje çalışmasının (2006-A-03) çalışmasının devamını oluşturmaktadır. Bu tez çalışmasında daha önce

E. coli BL21 (DE) hücrelerine taşınan pGEX-6P-1 ekspresyon vektörü üzerine klonlanan (Avican, 2009) HslU ve HslV genlerinin ekspresyonu, oluşan füzyon proteinlerin saflaştırılması ve biyokimyasal olarak nitelendirilmesini hedeflenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1 Gereçler

2.1.1 Kullanılan Kimyasallar

2-propanol, Asetik asit, % 99,5 Etanol, β -Merkaptoetanol, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl, NaOH, HCl (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA), Tris Base, Ampisilin (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland), Agaroza (Prona, Madrid, Spain), EDTA (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Germany), Etidyum Bromid, Sodyum Asetat, Glisin, MgCl_2 , Kazein, SDS, MOPS, PEG (6000 g/mol), TEMED (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), IPTG, (MBI Fermentas AB, Vilnius, Lithuania), KCl (Riedel-de Haen, Hanover, Germany), Bacto Agar, Tripton, Maya Özü, Nutrient Broth (Difco, Detroit, USA), % 40 Akrilamid Solüsyonu (AppliChem).

2.1.2 Kullanılan Enzimler ve Tamponları

Lizozim (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland), *Hind*III Restriksiyon Endonükleaz, Tampon *Hind*III, *Eco*RI Restriksiyon Endonükleaz, Tampon *Eco*RI, (MBI Fermentas AB, Vilnius, Lithuania), PreScission proteaz (Amersham Pharmacia Biotech).

2.1.3 Kullanılan Peptitler ve İnhibitörler

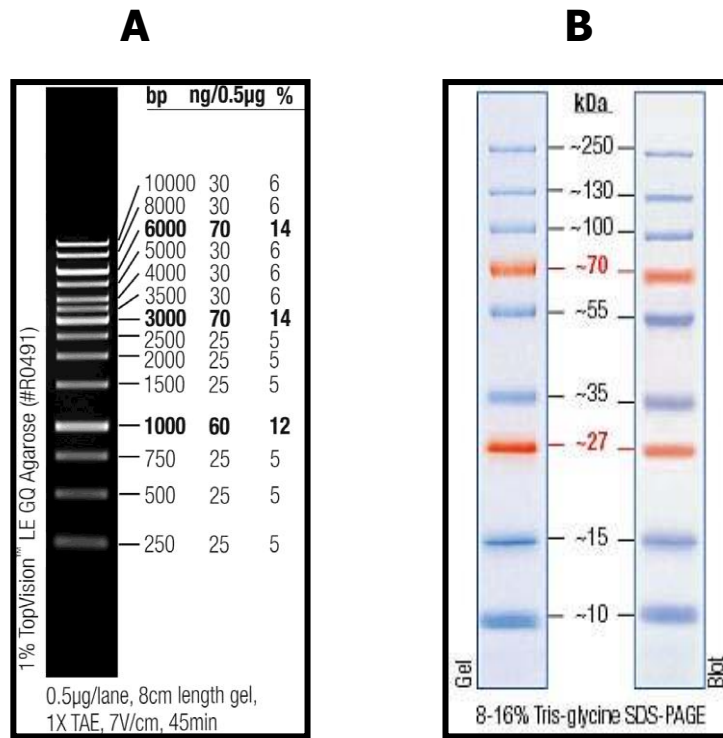
Karbobenzoksi- Gly-Gly-Leu- 7-amido-4-metilkoumarin (Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC), Suksinil-Ala-Ala-Phe-7-amido-4-metilkoumarin (Suc-AAF-AMC) (Bachem Feinchemikalien AG, Switzerland), Glutaril-Ala-Ala-Phe-4-metoksi- β -naftilamid (Glt-AAF-MNA), Laktasistin (Calbiochem San Diego, CA), Fenilmetilsülfonil florit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

2.1.4 Kullanılan Kitler

Mini Plazmit İzolasyon Kiti (Promega Corporation, Madison, USA)

2.1.5 Kullanılan DNA ve Protein Moleküler Belirteçleri

Moleküler DNA belirteçleri (MBI Fermentas, 1 kb DNA marker, SM1163), Protein Moleküler Belirteci (MBI Fermentas, PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, SM1812) (Şekil-2.1).



Şekil-2.1 Moleküler DNA ve protein belirteçleri . A: 1 kb Moleküler DNA belirteci B: Moleküler Protein Belirteci

2.1.6 Kullanılan Plazmit Vektörler

2.1.6.1 pGEX Vektör ve GST Füzyon Sistem

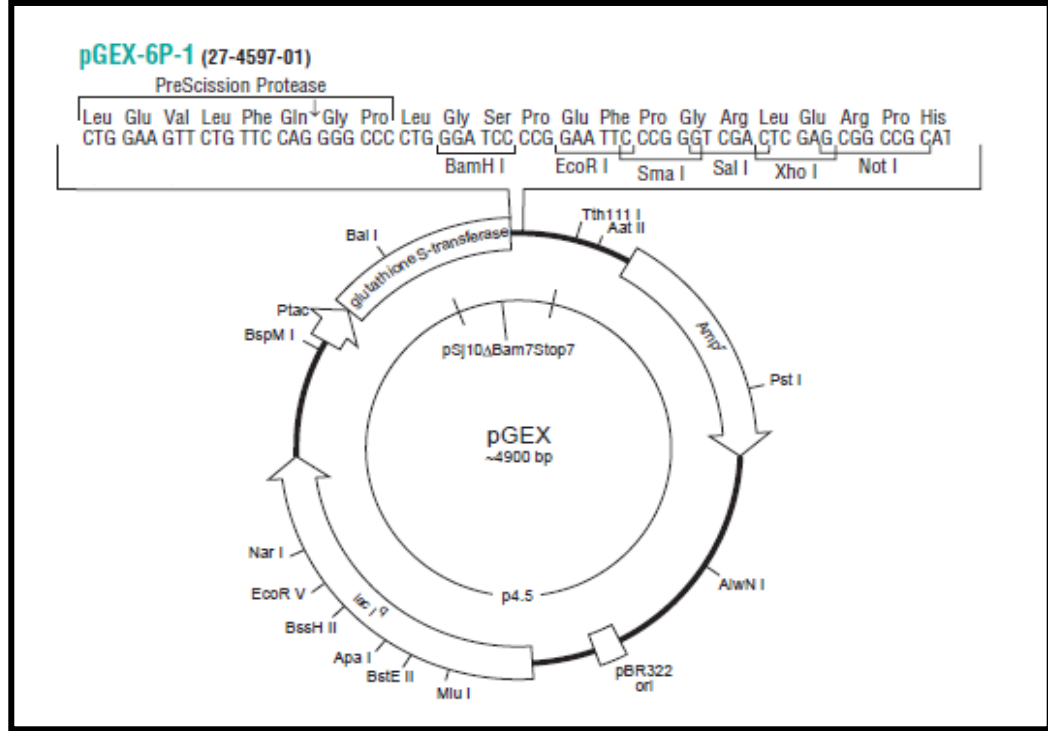
Glutasyon S-transferaz (GST) Gen Füzyon Sistemi, *Eschericia coli*'de üretilen proteinlerin ekspresyonu, saflaştırılması ve belirlenmesinde kullanılan çok yönlü bir sistemdir. Bu sistem, *Schistosoma japonicum* GST'ı ile füzyon halindeki gen ya da gen fragmanlarının yüksek derecede uyarılabilir ekspresyonunu temel almaktadır. *E. coli*'de ifade edilen füzyon proteinlerinin amino ucunda GST uzantısı yer alırken, ilgilenilen protein ise karboksi ucunda yer almaktadır. Oluşan füzyon proteini, hücre sitoplazmasında birikmektedir.

GST füzyon proteinleri, immobilize glutasyon kullanılarak bakteriyel hücre özütlerinden afinite kromatografisi ile saflaştırılmaktadır. GST füzyon proteinleri, kromatografi ortamında tutulur ve bağlanmayan proteinler, yıkama ile uzaklaştırılır. GST füzyon proteinin antijenik özellikleri ve fonksiyonları, saflaştırma süresince korunur. Füzyon proteinlerindeki GST uzantısı, tanıma dizileri pGEX plazmidlerinin çoklu klonlama bölgelerinin hemen üst tarafında bulunan, bölgeye özgü kesim yapan proteaz kullanılarak uzaklaştırılabilir (Şekil-2.2). Füzyon proteinler, kolorimetrik ya da immünolojik yöntemler kullanılarak belirlenebilir.

GST füzyon proteinleri, bir gen ya da gen fragmanının 10 pGEX vektöründen birinin çoklu klonlama bölgesine eklenmesiyle oluşturulmaktadır (Şekil-2.3). Ekspresyon, laktoz analogu izopropil β -D tiogalaktozid (IPTG) tarafından uyarılan *tac* promotorunun kontrolü altında gerçekleştirilir. Tüm pGEX vektörleri, ayrıca internal *lacI^q* geni içerir. Bu genin ürünü, *tac* promotorunun operatör bölgesine bağlanıp, IPTG ile uyarılana kadar proteinin ekspresyonunu engelleyerek aşırı ekspresyonu kontrol altına almaktadır.

Bu tez çalışmasında pGEX-6P-1 plazmidi, pGEM-T plazmidine klonlanan *hslv* ve *hslu* genlerinin ekspresyon vektörü olarak kullanılmıştır. pGEX-6P-1 plazmidi, Şekil-2.2'de görüldüğü gibi çoklu klonlama bölgesinde ilgili genlere uygun restriksiyon kesim bölgeleri içermektedir. Ayrıca, çoklu klonlama bölgesinin hemen

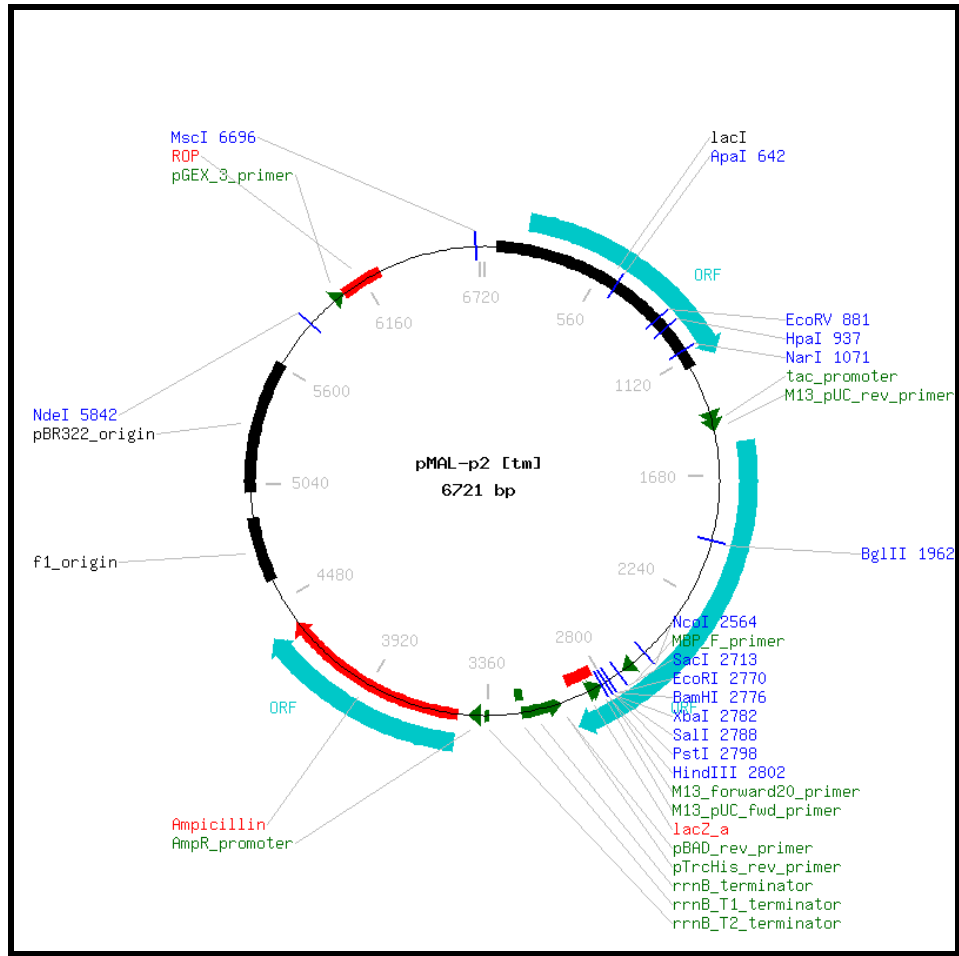
üzerinde GST füzyon proteinin saflaştırılması aşamasında kullanılacak olan PreScission Proteaz'ın tanıma bölgesini içermektedir.



Şekil-2.2. GST füzyon vektörü pGEX-6P-1'in açık okuma çerçevesi ve genel özelliklerini gösteren haritası.

2.1.6.2 pMal-p2-SulA Rekombinant Vektörü

pMal-p2-SulA plazmiti Dr. A. Higashitani (National Institute of Genetics, Japan) tarafından hediye edilmiştir. pMal ekspresyon sistemleri pMal-c2 ve pMal-p2 olmak üzere iki çeşittir. İki yapı da yüksek derecede ekspresyon sağlar. pMal-c2 vektörü Maltoz Bağlanma Proteini'nin (MBP) normalde sahip olduğu N-terminal sinyal dizisinden yoksundur ve füzyon proteinin sitoplazmada kalmasını sağlar. pMal-p2 ise N-terminal sinyal dizisine sahiptir. Proteinin periplazmaya salgılanmasını sağlar. Böylece, periplazmadan saflaştırmayı kolaylaştırır. Klonlanan protein MBP'den ayrılmak istendiği takdirde Faktör Xa enzimi ile kesilir.



Şekil-2.3. MBP füzyon vektörü pMal-p2'nin açık okuma çerçevesi ve genel özelliklerini gösteren haritası.

2.1.7 Kullanılan Saflaştırma Kolonu ve Kolon Materyali

GSTrap™ FF kolonları (GE Healthcare) bakteriyel lizatlardan GST-bağlı proteinlerin, glutatyon-S-transferazların veya diğer glutatyon-bağlı proteinlerin saflaştırılması için kullanılır. Hassas ayırıştırma koşulları proteinin işlevinin ve antijenisitesinin korunmasını sağlar. İndirgenmiş glutatyon içeren tamponla yıkama sonucu GST kolondan ayrılır.

Amiloz rezin (New England Biolabs) maltoza bağlanan protein (MBP) ile füzyon halinde eksprese edilen proteinlerin saflaştırılmasında kullanılan bir kolon materyalidir. Amiloz/agaroz boncuklarından oluşmuştur. Rezine bağlanan MBP-füzyon proteinler maltoz içeren tamponla yıkamak suretiyle rezinden ayrılır.

2.1.8 Kullanılan Bakteri Soyları

pGEX-6P-1'e klonlanan *hslV* ve *hslU* genlerinin ve pMal-p2-SulA klonundan MBP-SulA ekspresyonu için kompetan hücre olarak kullanılan *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) hücreleri National Bio-Research Project, National Institute of Genetics (NIG) (Japan)'den temin edilmiştir. 200 µl'lik hacimlerde ependorf tüplerde bulunan kompetan hücreler ve transformasyonda pozitif kontrol olarak kullanılacak pUC18 plazmidi, -80 °C'ta saklanmıştır.

2.1.9 Kullanılan Çözelti ve Besiyerleri

Sterilizasyon aşamında örnekler 121 °C'ta 20 dakika süre ile otoklav edilmiştir.

Lizis Tamponu

- 50 mM Tris.HCl
- 20 mM EDTA
- 50 mM Glikoz

Tris Tamponu (pH:7, 7.5 ,8, 9)

- 25 mM Tris
- 5 mM MgCl₂
- 1 mM DTT

MOPS Tamponu (pH:6, 6.5 ,7)

- 25 mM Mops
- 5 mM MgCl₂
- 1 mM DTT

Glisin Tamponu (pH:9.5, 10, 11)

- 25 mM Glisin
- 5 mM MgCl_2
- 1 mM DTT

Sodyum Asetat Tamponu (pH:4, 5, 6)

- 25 mM Sodyum Asetat
- 5 mM MgCl_2
- 1 mM DTT

Proteaz Deney Tamponu (pH:7.4)

- 25 mM Tris
- 5 mM MgCl_2
- 1 mM DTT

TE Tamponu

- 10 mM Tris
- 1 mM EDTA

Fosfat Tuz Çözeltisi (PBS) Tamponu

- 1,4 M NaCl
- 27 mM KCl
- 101 mM Na_2HPO_4
- 18 mM KH_2PO_4

PreScission Ayırma Tamponu

- 50 mM Tris-HCl (pH 8)
- 150 mM NaCl
- 1 mM EDTA
- 1mM DTT

Amiloz rezin Kolon Tamponu

- 20 mM Tris-HCl (pH 7,4)
- 1 mM EDTA

Amiloz rezin Yıkama Tamponu

- 20 mM Tris-HCl (pH 7,4)
- 0,2 M NaCl
- 1 mM EDTA

Amiloz rezin Ayırma Tamponu

- 20 mM Tris-HCl (pH 7,4)
- 0,2 M NaCl
- 1 mM EDTA
- 10 mM Maltoz

Elüsyon Tamponu

- 50 mM Tris-HCl (pH 7,4)
- 10 mM indirgenmiş glutatyon

2X Örnek Tamponu

- 50 mM Tris.HCl (pH: 6.8)
- % 10 (v/v) Gliserol
- % 1 (w/v) SDS
- % 0,01 (w/v) Bromo Fenol Mavisi

SDS-PAGE Yürütme Tamponu (1L)

- 2,02 g Tris
 - 14,4 g Glisin
 - 0,5 g SDS
- dH₂O ile 1L'ye tamamlanır.

Coomassie Blue Boyama Solüsyonu (1L)

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

Boyadan Arıtma Solüsyonu (1L)

- 400 ml Metanol
- 100 ml Glasiyal asetik asit
- 500 ml dH₂O

% 1'lik Agaroz Jel (40 ml)

- 0,4 g Agaroz,
 - 2 µl EtBr (10 µg/µl stoktan)
- 1X TAE Buffer ile 1 L'ye tamamlanır.

2M Glikoz (1 L)

360,3 g Glikoz, dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.

1 M MgSO₄ (1L)

246,48 g MgSO₄, dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.

1 M MgCl₂ (1 L)

203,30 g MgCl₂, dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.

1 M KCl (1 L)

74,56 g KCl, dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.

Luria Broth (1 L, pH:7,5)

- 10 g Tripton
 - 5 g Yeast Extract
 - 10 g NaCl
- dH₂O ile 1L'ye tamamlanır.

Nutrient Broth (1 L)

- 8 g Nutrient Broth
- dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.

TSS (pH:6,5)

- % 10 (w/v) PEG (6000 g/mol),
- % 5 (v/v) DMSO
- 50 mM MgCl₂

SOB Medyum

- % 2 (w/v) Triptone
- 5 g % 0,5 (w/v) Yeast Extract
- 10 mM NaCl
- 2,5 mM KCl
- 10 mM MgCl₂
- 10 mM MgSO₄

SOC Medyum (1 L)

SOB medyuma son konsantrasyon 20 mM olacak şekilde glikoz eklenir.

Ampisilin (5 ml, 10 mg/ml)

0,5 g Ampisilin, dH₂O ile 5 ml'ye tamamlanır.

IPTG (5 ml, 200 mg/ml)

1 g IPTG, dH₂O ile 5 ml'ye tamamlanır.

LB-Agar /Amp Besiyeri (1 L)

5 ml Ampisilin, LA ile 1 L'ye tamamlanır.

Solüsyon A (BCA için 100ml)

- 1 gr sodyum bicinchoninate (BCA)
- 2 gr sodyum karbonat
- 0.16 gr sodyum tartarat
- 0.4 gr NaOH
- 0.95 gr sodyum bikarbonat (pH: 11.25)

dH₂O ile 100 mL'ye tamamlanır.

Solüsyon B (BCA için 10ml)

0.4 gr Bakır sülfat. 5H₂O

dH₂O ile 10 mL'ye tamamlanır.

2.1.10 Kullanılan Cihazlar

+ 4 °C Soğutucu (Arçelik), - 20 °C derin dondurucu (Arçelik, No Frost), - 80 °C derin dondurucu (Thermo, Forma -86C ULT Freezer), Buz Makinesi (BAR-LINE BF85), Yatay Elektroferez Sistemi (BIO-RAD, Mını-Sab Cell CT), Güç kaynağı (BIO-RAD, PowerPac Basic), Dikey Elektroferez Sistemi (BIO-RAD, Mını-Sab Cell CT), Güç kaynağı (BIO-RAD, PowerPac Basic), Masa Üstü Santrifüj (Heraeus, Labofuge 400R), Masa Üstü Santrifüj (BECKMAN COULTER, Microfuge 22R), Otoklav (HIRAYAMA, HICLAVE HVE-50), pH Metre (Hana Instruments, pH 211 Microprocessor pH Meter), Steril Kabin (Heraeus, HP48), Etüv (BINDER, 9010-0078), İnkübatör (Heraeus, D-63450 Herau), Çalkalamalı İnkübatör (Edmund Bühler, KS-15), Su Banyosu (TECHNE, TE-10A Tempette), UV Görüntüleme Cihazı (Vilmer Lourmart), Mikrodalga Fırın (Kumtel), Sonikatör (BRANSON, Digital Sonifier), Spektrofotometre (BIO-RAD, Smartspec 3000), Econo Gradient Pompa (BIO-RAD), Econo UV Monitör (BIO-RAD), Fraksiyon Toplayıcı (BIO-RAD, Model 2110), Florasans Spektrofotometre (VARIAN, Eclipse).

2.2 Yöntemler

2.2.1 HslV ve HslU Ekspresyonu

pGEX-6P-1 üzerinde *hslV* ve *hslU* genlerini içeren rekombinant *E. coli* BL21 (DE3) kolonileri gece boyunca ampicilinli (100 µg/ml) besiyerinde büyütüldükten sonra, hücre kültürü ikinci besiyerine 1/10 oranında eklenerek ikincil kültürler elde edilmiştir. İkincil kültürler, optik yoğunluğu 600 nm'de 0,6'ya ulaşmıncaya kadar büyütüldükten sonra HslV ve HslU'nun ekspresyonu 0,1 mM IPTG ile 3 saat boyunca 37 °C'ta, 200 rpm'de inkübe edilerek uyarılmıştır.

HslV ve HslU'nun yüksek derecede eksprese edildiği hücre kültürleri, 8.000 g'de 15 dakika süre ile +4 °C'ta santrifüjlenerek toplanmıştır. Hücre pelletleri, 1X PBS içerisinde çözülüp buz üzerinde 30 dakika inkübe edilmiştir. Hücre özütleri, her biri toplamda 2 dakika sürdürülen 64 mikronda 15 saniye sonikasyon, 15 saniye buzda bekleme şeklindeki sonikasyon prosedürü ile parçalanmıştır. Homojenat, 10.000 g'de 15 dakika süre ile +4 °C'da santrifüj edilerek hücre kalıntıları çöktürülmüş, HslV proteaz ve HslU ATPaz proteinlerini içeren süpernatant, kullanılmıncaya dek -20 °C'ta saklanmıştır. GST-HslV ve GST-HslU proteinlerini içeren hücre özütleri % 12'lik SDS-PAGE'de görüntülenmiştir.

2.2.2 pMal-p2-SulA'nın Transformasyonu ve Rekombinant Seçimi

Klonlama çalışmalarında konakçı olarak kullanılan *E. coli* BL21 hücrelerinin kompetan hale getirilmesi ve transformasyonu için Chung ve arkadaşları (1989) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Bu prosedüre göre, kompetan hücre hazırlamak için LB'ye *E. coli* BL21 (DE) ekilip, gece boyu büyütülmüştür. Ertesi gün 1/100 oranında olacak şekilde bu kültürden LB'ye ekim yapılmıştır. Kültür 600 nm dalga boyunda OD'si 0,450'ye geldikten sonra +4 °C'ta 3000 rpm'de 5dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılıp en son kalan kültür hacminin %10'u kadar TSS eklenmiştir. Pellet buzda çözüldükten sonra hücreler transformasyon için kullanılmıştır.

Daha önce buzda tutulup soğutulan tüplere pMal-p2-SulA rekombinant plazmitinden 5 µl konulduktan sonra yeni hazırlanan kompetan *E. coli* BL21 hücrelerinden 50 µl eklenmiştir. Tüpler yavaşça karıştırıldıktan sonra buzda 20 dakika bekletilmiş ve hemen ardından hücrelere 42 °C'ta 45 saniyelik ısı şoku uygulandıktan sonra, buzda 2 dakika daha bekletilmiştir. Her bir tüpe 950 µl SOC medyum (SOB + 20 mM Glukoz) eklenip 37 °C'ta, 200 rpm'de 1,5 saat inkübe edilmiştir. Transformasyondan sonra hücreler, uygun seyreltmeden sonra, ampisilin içeren seçici besiyerine tek koloniler elde etmek üzere ekilmişlerdir.

37 °C'ta gece boyunca inkübasyondan sonra olası rekombinant hücreler toplanmış ve yeni katı besiyerine çizilerek saf kültür hazırlanmıştır. Rekombinant koloniler, ampisilinli besiyerinde bir gece büyütüldükten sonra her birisinden Mini Plazmit İzolasyon Kiti (Promega Corporation, Madison, USA) kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen rekombinant plazmitlerin analizi, uygun restriksiyon endonükleaz (*EcoRI*) ile kesilerek yapılmıştır. Agaroz jel elektroforezi ile *sulA* genini taşıyan pMal-p2-SulA doğrulanmıştır.

2.2.3 pMal-p2-SulA Ekspresyonu

pMal-p2 üzerinde *sulA* genini içeren rekombinant *E. coli* BL21 kolonileri gece boyunca ampisilinli (100 µg/ml) besiyerinde 37 °C'ta büyütüldükten sonra, hücre kültürü ikinci besiyerine 1/10 oranında eklenerek ikincil kültürler elde edilmiştir. İkincil kültürler, optik yoğunluğu 600 nm'de 0,5'e ulaşıncaya dek büyütüldükten sonra SulA'nın ekspresyonu 0,3 mM IPTG ile uyarılarak 4 saat boyunca 37 °C'ta, 200 rpm'de inkübe edilmiştir.

SulA'nın yüksek derecede eksprese edildiği hücre kültürleri, 5.000 g'de 20 dakika süre ile +4 °C'ta santrifüjlenerek toplanmıştır. Hücre pelletleri buz banyosunda kolon tamponu ile çözüldükten sonra her biri toplamda 1.30 dakika sürdürülen % 20 şiddetinde 15 saniye sonikasyon, 15 saniye buzda bekleme şeklindeki sonikasyon prosedürü ile parçalanmıştır. Homojenat, 10.000 g'de 30 dakika süre ile +4 °C'da santrifüj edilerek hücre kalıntıları çöktürülmüş, SulA proteinini içeren süpernatant, kullanılıncaya dek -20 °C'ta saklanmıştır.

2.2.4 Protein Saflaştırması

2.2.4.1 HslV ve HslU Saflaştırması

GST-füzyon proteinleri GST-Trap FF 5 ml (Amersham, pharmaceutical) afinite kolonu kullanılarak saflaştırılmıştır. Hücre özütleri 0.45 µm filtreden geçirildikten sonra fosfat tuz tamponu (PBS) ile dengelenmiş kolona yüklenmiştir. Kolona baēlanmayan proteinler, GST-baēlanma tamponu (PBS tamponu) ile uzaklaştırıldıktan sonra ayırıcı proteaz tamponu ile yıkanmıştır. Kolona baēlı GST ile füzyon halinde bulunan HslV ve HslU proteinleri, GST uzantısında yer alan Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln↓Gly-Pro tanıma bölgesinden kesilerek uzaklaştırmak için 250 U PreScission proteaz içeren ayırıcı proteaz tamponu kolona yüklenmiştir ve özgül enzim kesimi için 4 saat +4 °C'ta inkübe edilmiştir. Serbest kalan proteazlar, ayırıcı proteaz tamponu ile toplanmıştır. Fraksiyonlardaki protein miktarı 280 nm dalga boyunda ölçülerek belirlenmiştir. Elde edilen fraksiyonlar % 12'lik SDS-PAGE'de görüntülenmek ve aktivite deneylerinde kullanılmak üzere -20 °C'ta saklanmıştır. Kolona baēlı GST proteinleri 10 mM indirgenmiş glutatyon içeren elusyon tamponu ile kolondan uzaklaştırılmıştır. GST-Trap FF 5 ml kolon, 2 kolon hacminde 6 M Guanidin-HCl ile ve hemen onu takiben 5 kolon hacminde fosfat tuz tamponu ile yıkanmıştır.

2.2.4.2 MBP-SulA Protein Saflaştırması

MBP-SulA protein saflaştırması amiloz rezin ile hazırlanan kolon (1 ml) ile gerçekteşirilmıştir. Amiloz rezin kolon, 20 mM Tris-HCl, pH 7.2 ile dengelendikten sonra MBP-SulA proteinini içeren hücre özütleri 0.45 µm filtreden geçirilip kolona yüklenmiştir. Kolona baēlanamayan proteinleri uzaklaştırmak için 20 mM Tris-HCl, 0,2 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.2 içeren tampon ile yıkandıktan sonra MBP-SulA füzyon proteinleri 10 mM Maltoz içeren 20 mM Tris-HCl ile toplanmıştır. Elde edilen fraksiyonlar ise %12'lik SDS-PAGE'de görüntülenmek ve aktivite deneylerinde kullanılmak üzere -20 °C'ta saklanmıştır.

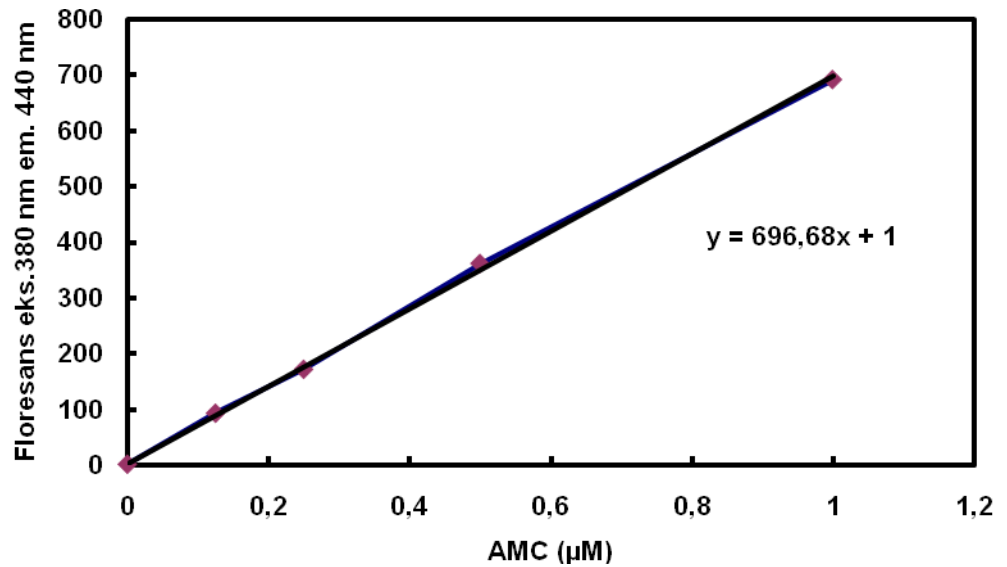
Amiloz resin kolon, % 20'lik etanolle yıkanıp, üreticinin tavsiye ettiği gibi % 20'lik etanolde saklanmıştır.

2.2.5 HslV ve HslU Protein Kompleksinin Oluşumu ve HslV Peptidaz Aktivitesinin Tespiti

Saflaştırılmış *G. kaustophilus* HslU ve HslV proteinlerinin *in vitro* ortamda aktif ATP-bağımlı HslVU proteaz oluşturup oluşturamadıklarını belirlemek amacıyla HslVU peptid hidrolizi aktivitesi bir florojenik peptid olan Cbz-Gly-Gly-Lys-AMC kullanılarak test edilmiştir (Rohrwild ve ark., 1996).

HslV (0,57µg) ve HslU (1,64µg) (~1:3 oranında), 1 mM ATP varlığında ve yokluğunda toplam hacim 100 µl olacak şekilde 25 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT (pH 7.4) içeren deney tamponunda 15 dakika buz üzerinde ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Peptidaz reaksiyonu, son konsantrasyonu 200 µM olacak şekilde substrat ilavesi ile başlatılmıştır. 55 °C'ta 20 dakika inkübe edilen reaksiyon karışımı, 900 µl % 1 SDS ilavesi ile durdurulmuştur. Serbest kalan AMC miktarı 380 nm eksitasyon ve 440 nm emisyon dalga boyunda izlenmiştir.

Enzim aktivite ölçümleri için AMC/substrat kalibrasyon eğrisi seri dilusyonlar yapılarak hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin denklemi $y=696,68x+1$ olarak hesaplanmıştır. Emisyon 440 nm dalga boyunda elde edilen değerler denklemde y yerine konulmuş ve açığa çıkan AMC miktarı pmol olarak hesaplanmıştır. AMC hidroliz aktivitesinin bir ünitesi bir dakikada 1 pmol AMC açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.



Şekil 2.4 Enzim aktivite ölçümleri AMC/substrat kalibrasyon eğrisi

2.2.6 HslVU Tarafından Çeşitli Florojenik Peptitlerin Yıkımı

HslVU enziminin farklı florojenik peptitlerin Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC'ya göreceli yıkım aktivitesini belirlemek için standart deney tamponlarına substrat olarak 200 μM Glutaril-Ala-Ala-Phe-4-metoksi-β-naftilamid (Glt-AAF-MNA) ve 200 μM Suksinil-Ala-Ala-Phe-7-amido-4-metilkoumarin (Suc-AAF-AMC) ilave edilmiştir. Enzim aktivitesi, daha önce belirtildiği gibi 55 °C'ta 40 dakika inkübasyondan sonra standart enzim koşulları altında ölçülmüştür.

2.2.7 HslVU Peptidaz Aktivitesi için Optimum İnkübasyon

Süresinin Tespiti

HslVU enzim aktivitesi için optimum inkübasyon süresini belirlemek amacıyla Hslv peptidaz ve HslU ATPaz proteinleri buz üzerinde 15 dakika ön inkübasyona tabi tutulduktan sonra daha önce belirtilen standart reaksiyon koşulları altında 5-60 dakika arasında değişen çeşitli zaman aralıklarında ve 55°C'ta inkübe edilmiştir.

2.2.8 Sıcaklığın HslVU Peptidaz Aktivitesine Etkisi

Enzimin aktivitesi için optimum sıcaklık, substrat olarak Cbz-Gly-Gly-Lys-AMC kullanılarak belirlenmiştir. Enzim-substrat karışımı daha önce belirtilen standart reaksiyon şartları altında 20 - 100 °C arasındaki çeşitli sıcaklıklarda optimum zaman olan 40 dakika süre ile inkübe edilmiştir. Kalan aktivite en yüksek enzimatik aktivitenin ölçüldüğü inkübasyon sıcaklıklarından bir tanesinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

2.2.9 pH'nın HslVU Peptidaz Aktivitesine Etkisi

HslVU proteaz aktivitesinin optimum pH'sı farklı pH değerlerinde, Cbz-Gly-Gly-AMC kullanılarak daha önce belirtilen standart deney şartlarında ölçülmüştür. Kullanılan tamponlar pH 4.0-5.0 aralığında 25 mM Sodyum asetat, pH 6.0-7.0 aralığında 25 mM MOPS, pH 7.5-9.0 aralığında 25 mM Tris HCl, pH 9.5-11.0 aralığında 25 mM Glisin tamponlarıdır ve her biri 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT içermektedir. Belirtilen reaksiyon tamponları dışında, diğer tüm reaksiyon bileşenleri yukarıda belirtildiği gibi hazırlanmış ve tüm örnekler 55 °C'ta 40 dakika inkübe edilmiştir. Kontrol amaçlı olarak kullanılan reaksiyon karışımları aynı şekilde hazırlanmış olup enzim içermemektedir. Optimum pH belirlendikten sonraki deneyler optimum olan pH 9'da gerçekleştirilmiştir.

2.2.10 Mg^{+2} 'un HslVU Peptidaz Aktivitesine Etkisi

Mg^{+2} iyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için farklı yoğunluklardaki (0-15 mM) magnezyum tuzları ($MgCl_2$) reaksiyon karışımına ilave edilmiştir. Enzim aktivitesi, daha önce belirtildiği gibi 55 °C'ta 40 dakika inkübasyondan sonra standart reaksiyon koşulları altında ölçülmüştür.

2.2.11 HslVU'nun Çeşitli Proteinleri Yıkımı

2.2.11.1 HslVU Tarafından Kazein Yıkımı

G. kaustophilus rekombinant HslVU proteazın kazein yıkım deneyi Anson (1938)' dan modifiye edilen metoda göre yapılmıştır. Enzim aktivite deneylerinde substrat olarak kazein kullanılmıştır ve %1'lik (w/v) stok çözeltisi taze hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı 0,57 µg HslV ve 1,64 µg HslU, 25 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT (pH 9.0) içeren deney tamponu içinde 700 µl kazein solüsyonu ve/veya 1 mM ATP içermektedir. Reaksiyon karışımları, 55 °C' ta 20 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyonlar 900 µl % 15 trikloro asetik asit (w/v) (TCA) ilavesi ile durdurulmuş ve karışımlar oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmişlerdir. Oluşan beyaz tortu 13.000 rpm'de 15 dakika süre ile oda sıcaklığında santrifüj edilerek uzaklaştırılmış ve üst sıvı Whatmann No.1 filtre kağıdından geçirilerek filtrelenmiştir. Süzülen örneklerin optik yoğunluğu 275 nm'de spektrofotometre ile ölçülmüştür. Bir ünite enzim aktivitesi 55°C'ta 60 dakikada 0,01 artan absorbans (A_{275}) olarak tanımlanmıştır.

2.2.11.2 HslVU Tarafından MBP-SulA Yıkımı

Saflaştırılan 2 µg MBP-SulA, toplam hacmi 100µl olacak şekilde 0,57µg HslV ve 1,64µg HslU, 25 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT (pH 9.0) içeren deney tamponunda ATP varlığında ve yokluğunda 55 °C' ta 2 saat inkübe edilmiştir. Reaksiyonlar 30 µl 0,75M Tris-HCl (pH8), % 7,5 SDS, % 10 β-Merkaptoetanol, içeren reaksiyon durdurucu ile sonlandırılıp ve %12'lik SDS jele yüklenmiştir (Laemmli, 1970).

2.2.12 Çeşitli Proteaz İnhibitörlerinin HslVU Peptidaz Aktivitesine Etkisi

Enzim örnekleri fenilmetilsülfonil florit (PMSF) (Serin proteaz inhibitörü), Laktasistin (proteazom inhibitörü) gibi inhibitörler ile oda sıcaklığında ATP varlığında 15 dakika ön inkübasyona tabi tutulmuşlardır. İnkübasyon sonrası 1 mM ATP, 200 μ M Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC örneklerle eklenmiş ve 55 °C'ta 40 dakika inkübe edilmişlerdir. Kalan aktivite aynı şartlar altında inhibitör yokluğundaki enzim aktivitesinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Ayrıca, EDTA'nın enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için 10mM EDTA HslV ve HslU ile 15 dakika ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Enzim aktivitesi, daha önce belirtildiği gibi 55 °C'ta 40 dakika inkübasyondan sonra standart reaksiyon koşulları altında ölçülmüştür.

2.2.13 Substrat Konsantrasyonunun HslVU Peptidaz Aktivitesine Etkisi

Enzim aktivite deneylerinde substrat olarak bir florojenik peptit olan Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC kullanılmıştır. HslV ve HslU, 15 dakika ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Reaksiyon karışımı (toplam hacim 100 μ l) 0,57 μ g HslV ve 1,64 μ g HslU, 25 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM ATP (pH 9.0) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımına 50-275 μ M Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC ilave edilerek reaksiyon başlatılmış ve tüm örnekler 55 °C'ta 40 dakika inkübe edilmiştir.

2.2.14 HslVU ATPaz Aktivitesinin Tespiti

HslVU ATPaz aktivitesi Ames yöntemine göre oluşan inorganik fosfatın ölçülmesiyle belirlenmiştir (Ames, 1966). ATPaz reaksiyonu 25 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT (pH 9.0) ve 1 mM ATP içeren 100 μ l deney tamponu içerisinde gerçekleştirilmiş ve reaksiyonlar 200 μ l % 1 SDS ilavesi ile durdurulmuştur. Her bir reaksiyona 100 μ l % 10 Askorbik asit, 600 μ l 1 N H₂SO₄ içinde % 0,42 Amonyum molibdat içeren karışım ilave edilerek 37 °C'ta 1 saat inkübe edilmiştir. Açığa çıkan inorganik fosfat miktarı 820 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

2.2.15 Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Poliakrilamid jel elektroforezi, % 0,1 anyonik deterjan SDS varlığında, Laemmli (1970) tarafından tanımlanan % 12 ayırma jeli ve % 5'lik yükleme jeli üzerinde gerçekleştirilmiştir. “PageRuler Plus Prestained Protein Ladder”, moleküler ağırlık belirteci olarak kullanılmıştır. 10 µl enzim örnekleri, % 1 SDS içeren 2X örnek tamponu ile karıştırılarak kaynar suda 5 dakika bekletilmişlerdir. Daha sonra protein örnekleri ve moleküler ağırlık standartları jele yüklenmiştir. Jel, 100 V'da yürütülmüştür. Elektroforez tamamlandıktan sonra Coomassie Brilliant Blue-R250 ile boyanmış ve daha sonra boyadan arıtma çözeltisi ile birkaç kez yıkanarak boyadan arındırılmıştır. Her bir proteinin göreceli hareketliliği, jelin baş kısmından protein bandının merkeze kadar olan göç mesafesi ölçülerek hesaplanmıştır. Göreceli hareketlilik, bilinen moleküler ağırlıklara dayalı olarak çizilmiştir. Standart eğri çizilmiş ve eğim, proteinlerin moleküler ağırlık hesaplamalarında kullanılmıştır.

2.2.16 BCA Yöntemi ile Protein Miktarı Tayini

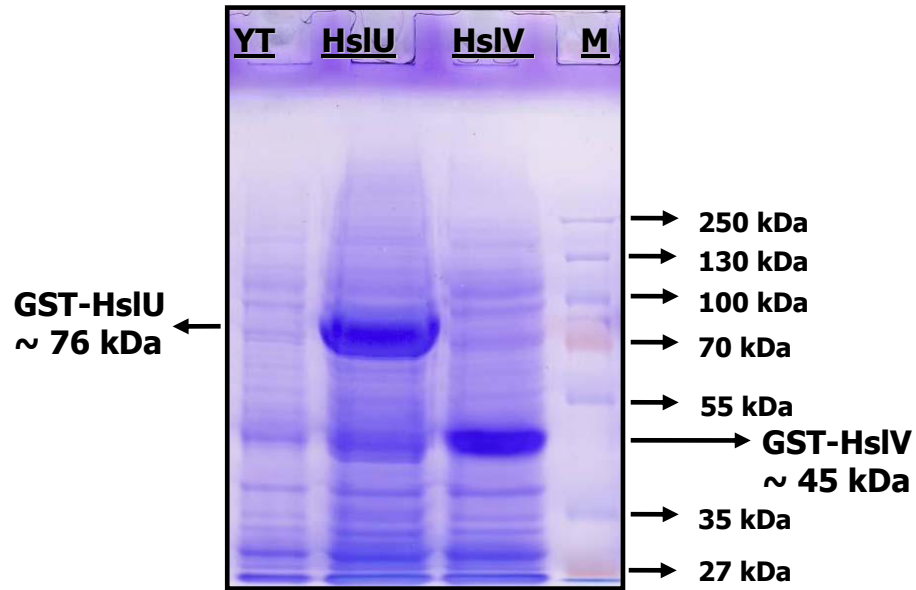
Aktivite deneylerinde kullanılacak saflaştırma fraksiyonlarında bulunan protein miktarı tayini BCA (Bicinchoninic asit) yöntemi ile tespit edilmiştir. Yeni hazırlanan 50 hacim solüsyon A + 1 hacim Solüsyon B karışımından 200 µl alınarak mikropilaya kuyularına konulmuş protein örneklerinin (5-10 µl) ve standart BSA (1mg/ml) solüsyonlarının üzerine eklenmiştir. Mikropilaya 37 °C'da 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra absorbans 490 nm ölçülmüştür. Protein konsantrasyonu standart BSA solüsyonundan elde edilen değerler ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır.

3. BULGULAR

3.1 HslV Proteaz ve HslU ATPaz'ın Ekspresyonu

Ayrı ayrı pGEX-6P-1 ekspresyon vektörlerine daha önce aktarılmış olan *hslV* ve *hslU* genleri (Avican, 2009) *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinde plazmit üzerindeki güçlü *tac* promotorunun kontrolü altında IPTG ile uyarılarak eksprese edilmişlerdir.

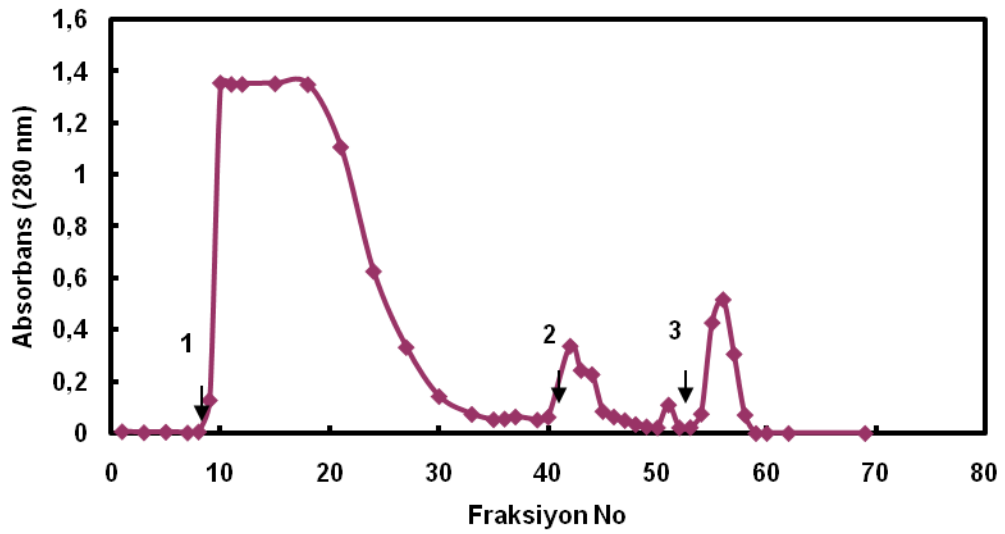
Yüksek seviyede üretilen HslV ve HslU proteinleri glutathion-S-transferase (GST) ile füzyon halinde eksprese edilmişlerdir. Rekombinant proteinlerin üretimi sağlandıktan sonra toplanan hücreler sonikasyon ile parçalanmış, elde edilen hücre özütleri poliakrilamid jele yüklenip proteinlerin ekspresyon düzeyine bakılmıştır. Jel analizi sonucu GST ile füzyon halinde bulunan HslV ve HslU (GST-HslV) proteinlerinin yüksek seviyede eksprese edildiği açığa çıkarılmıştır. GST (26 kDa) ve HslV'nin toplam moleküler ağırlığı yaklaşık 45 kDa'dur. GST ile füzyon halinde olan HslU proteininin moleküler ağırlığı ise yaklaşık 76 kDa'dur (Şekil-3.1).



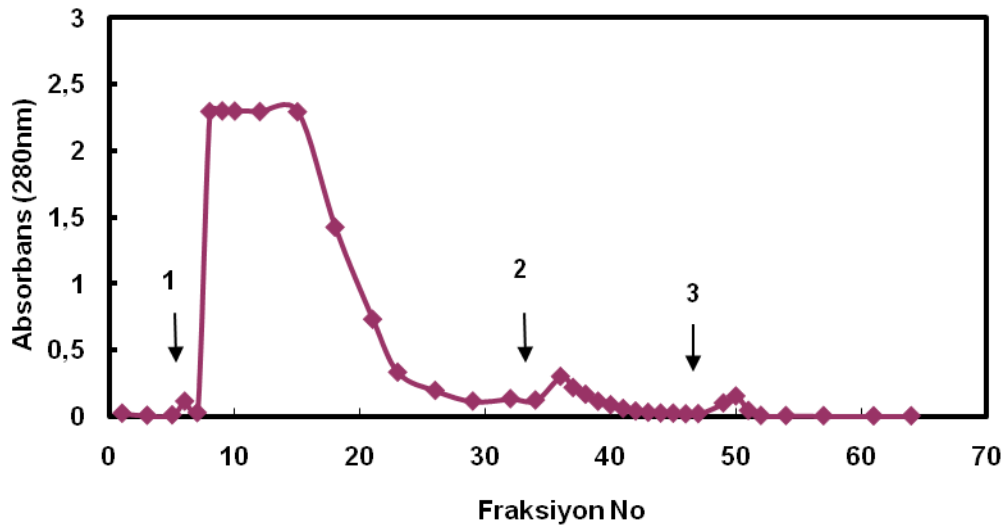
Şekil-3.1. Yüksek seviyede eksprese edilen GST-HslV ve GST-HslU füzyon proteinlerinin SDS-PAGE'deki görüntüsü. YT kuyusu: Yaban tip *E. coli* BL21 (DE3) hücre özütü, HslU kuyusu: GST-HslU füzyon proteininin yüksek seviyede eksprese edildiği rekombinant *E. coli* BL21 (DE3) hücre özütü, HslV kuyusu: GST-HslV füzyon proteininin yüksek seviyede eksprese edildiği rekombinant *E. coli* BL21 (DE3) hücre özütü, M: Moleküler Protein Belirteci.

3.2 HslV ve HslU'nun Saflaştırılması

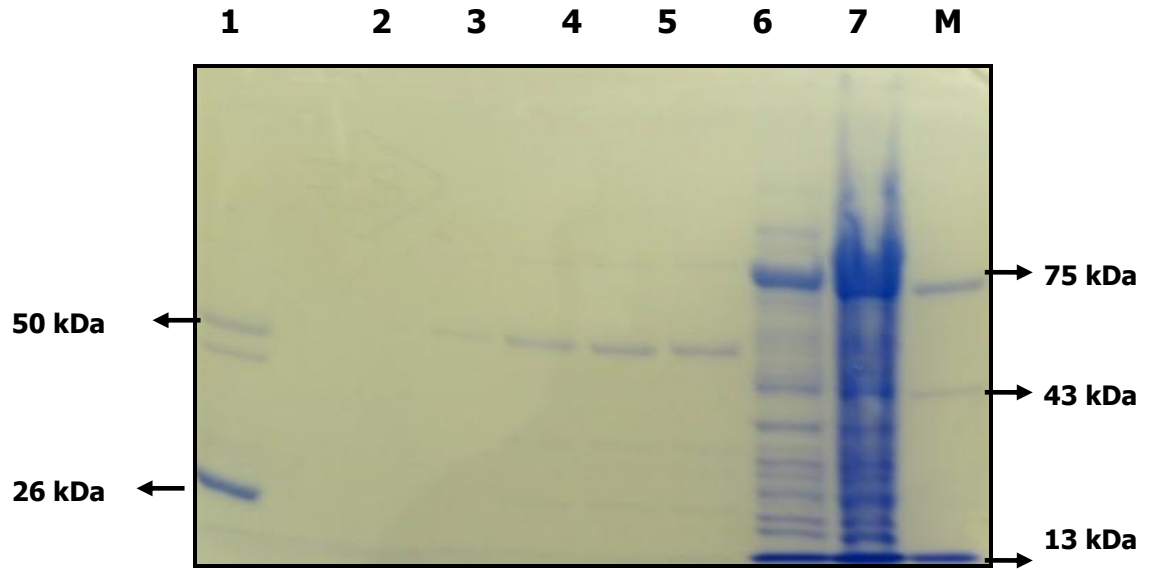
E. coli BL21 soyunda eksprese edilen GST-HslV ve GST-HslU füzyon proteinleri GSTTrap FF kolonu kullanılarak tek basamakta hücre özütünden saflaştırılmıştır. Füzyon proteini içeren 6 ml hücre özütü kolona yüklendikten sonra kolona bağlanmayan proteinler kolondan uzaklaştırılmıştır. Kolona bağlı GST-füzyon proteinleri kolon içinde bölge özgül Prescission proteaz ile kesilmesi sağlandıktan sonra proteinler saf olarak kolondan toplanmıştır. Saflaştırmadan sonra toplanan tüm fraksiyonlar 280 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Şekil 3.2, Şekil 3.3). HslV ve HslU'nun görünen homojenlikte saflaştırıldığı SDS-PAGE ile görüntülenmiştir. Şekil 3.4'de görüldüğü gibi HslU'nun yaklaşık 50 kDa olduğu gözlenmiştir. HslV'nin de Şekil 3.5'de görüldüğü üzere 19 kDa büyüklüğünde olduğu görüntülenmiştir.



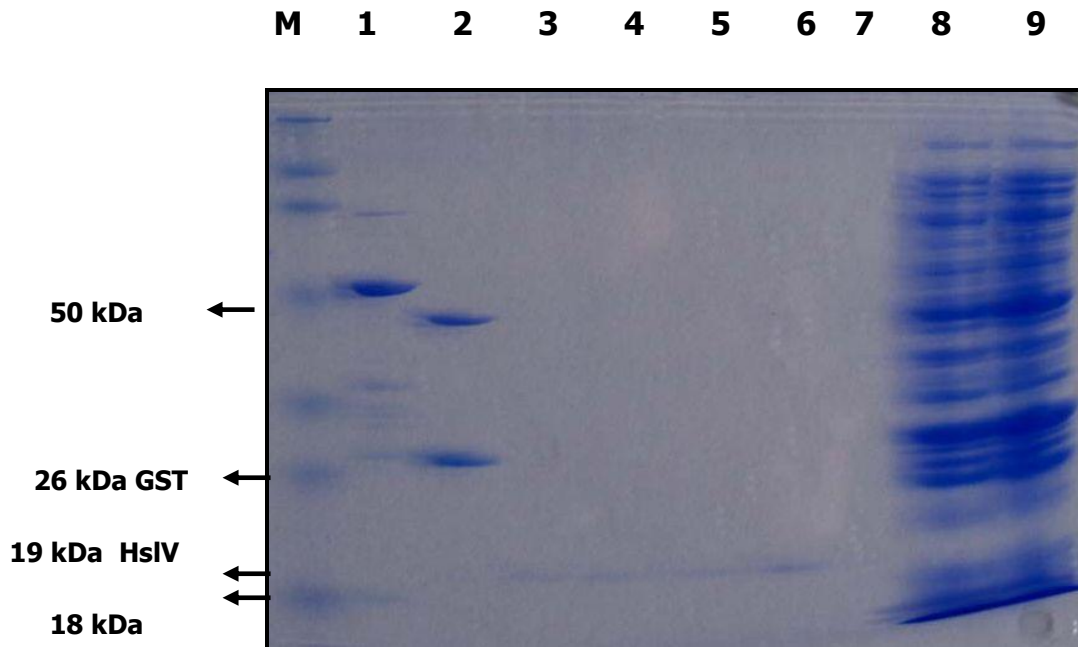
Şekil 3.2 HslU peptidaz proteininin GST-Trap FF kolon ile saflaştırılması. 1-2 PBS tamponu ile bağlanmayan proteinlerin yıkanması, 2-3 Ayırıcı tampon ile saf HslU elüsyonu 3. 10 mM glutatyon içeren elüsyon tamponu ile yıkama.



Şekil 3.3 HslV ATPaz proteininin GST-Trap FF kolon ile saflaştırılması. 1-2 PBS tamponu ile bağlanmayan proteinlerin yıkanması, 2-3 Ayırıcı tampon ile saf HslV elüsyonu 3. 10 mM glutatyon içeren elüsyon tamponu ile yıkama.



Şekil-3.4 GST-HslU Proteinin saflaştırması. Kuyu 1. GST yıkaması; Kuyu 2.-5. Saf HslU örnekleri, Kuyu 6. Bağlanmayan proteinlerin yıkama örnekleri; Kuyu 7. GST-HslU içeren hücre özütü, M. Protein belirteci (75kDa, 43kDa, 13kDa).

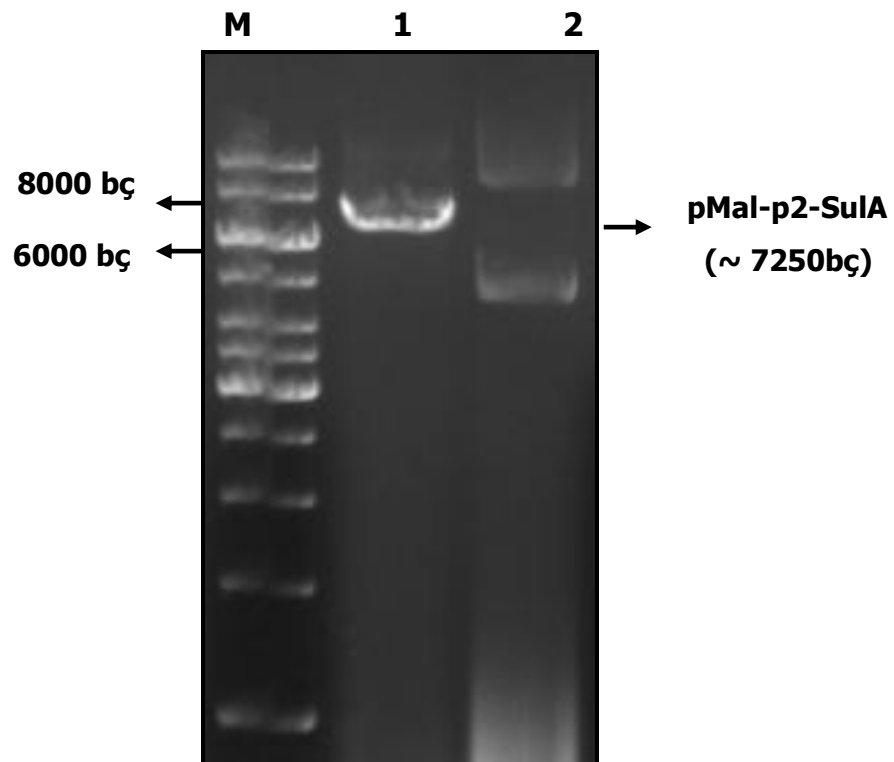


Şekil-3.5 GST-HslV proteininin saflaştırması. Kuyu 1. HslU saflaştırması örneği, Kuyu 2. GST yıkaması, 3.- 6. Saf HslV örnekleri, Kuyu 8. Bağlanmayan proteinlerin yıkama örnekleri, Kuyu 9. GST-HslV içeren hücre özütü, M. Protein belirteci.

3.3. *E. coli* BL21(DE3) Hücrelerinin pMal-p2-SulA ile Transformasyonu

SulA genini taşıyan pMal-p2-SulA plazmiti, *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin transformasyonunda kullanılmıştır. Antibiyotikli besi ortamında büyüyen olası rekombinant kolonilerden plazmit izolasyonu yapılmış ve izole edilen plazmitler *EcoRI* endonükleaz ile kesilerek yaklaşık 7250 baz çifti büyüklüğünde olması beklenen pMal-p2-SulA plazmit DNA'ları tek bant olarak agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 3.6).

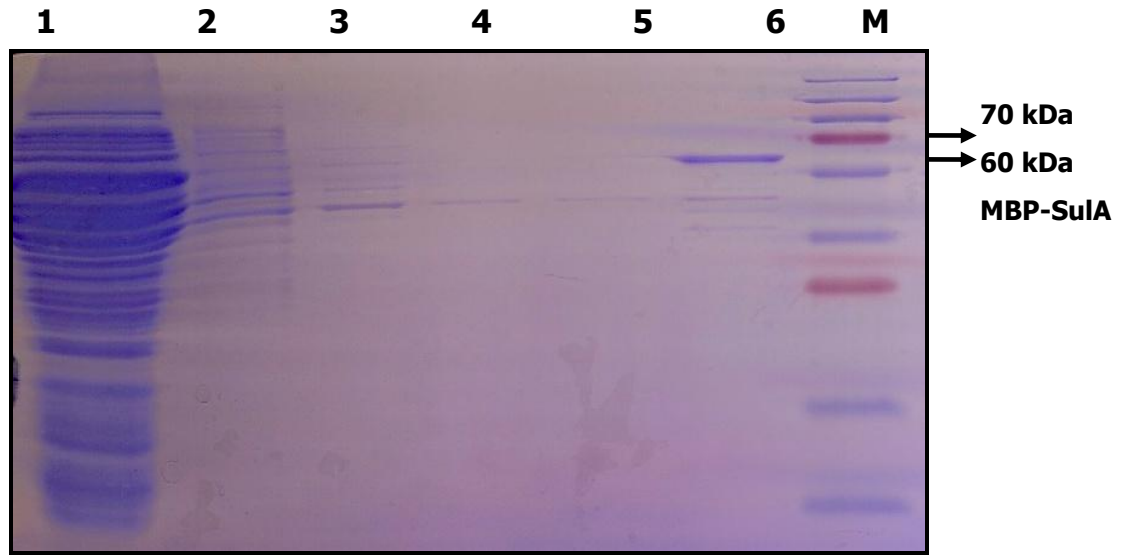
Böylece pMal-p2-SulA plazmitini taşıyan rekombinant *E. coli* DH5α hücre kolonileri tanımlanmış ve sonraki ekspresyon çalışmalarında kullanılmak üzere ampicilinli besiyerinde kültüre alınmışlardır.



Şekil-3.6 *EcoRI* ile kesilmiş pMal-p2-SulA plazmit DNA'sının agaroz jelde görüntüsü. M. 1 kb'lık moleküler DNA belirteci. Kuyu 1. Halkasal pMal-p2-SulA plazmitinin *EcoRI* enzimi ile kesimi, Kuyu 2. Halkasal pMal-p2-SulA plazmiti.

3.4 MBP-SulA'nın Ekspresyonu ve Saflaştırılması

E. coli BL21(DE3) soyunda eksprese edilen pMal-p2-SulA füzyon proteinini hücre özütünden, amiloz rezin kolon kromatografi ile tek basamakta saflaştırılmıştır. Kolona bağlı proteinler 10 mM maltoz içeren elüsyon tamponu ile toplanmıştır. Saflaştırmadan elde edilen fraksiyonlar SDS-PAGE'de görüntülenmiştir. Şekil 3.7'te görüldüğü gibi saflaştırılan MBP-SulA füzyon proteinini beklenildiği üzere 60 kDa olarak görüntülenmiştir.



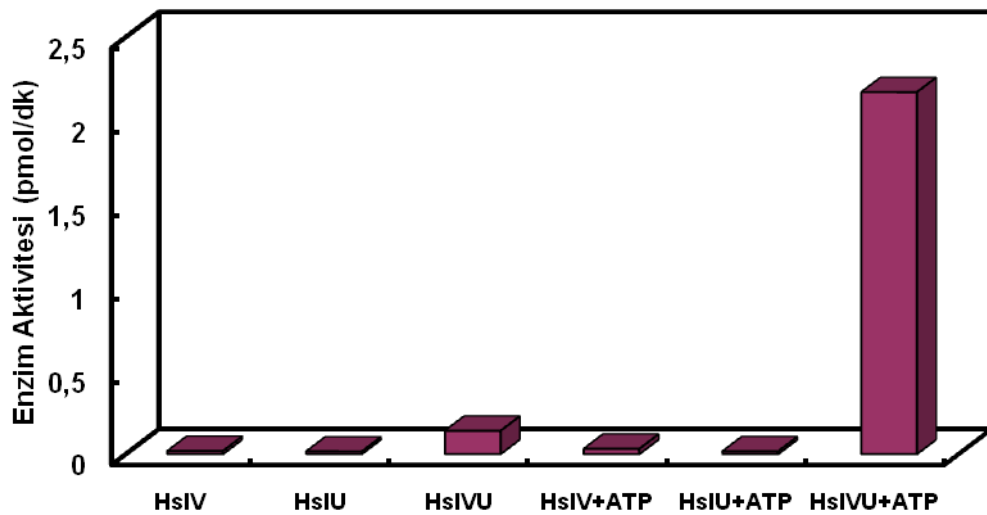
Şekil-3.7 MBP-SulA protein saflaştırması. Kuyu 1. Hücre özütü; Kuyu 2.-5. Bağlanmayan pronteinlerin yıkama örnekleri; Kuyu 6. Saflaştırılan MBP-SulA örneği. M. Moleküler Protein Belirteci.

3.5 HslVU'nun Biyokimyasal Nitelendirilmesi

3.5.1 HslVU Proteazın Kompleks Oluşumu ve Peptidaz

Aktivitesinin Tespiti

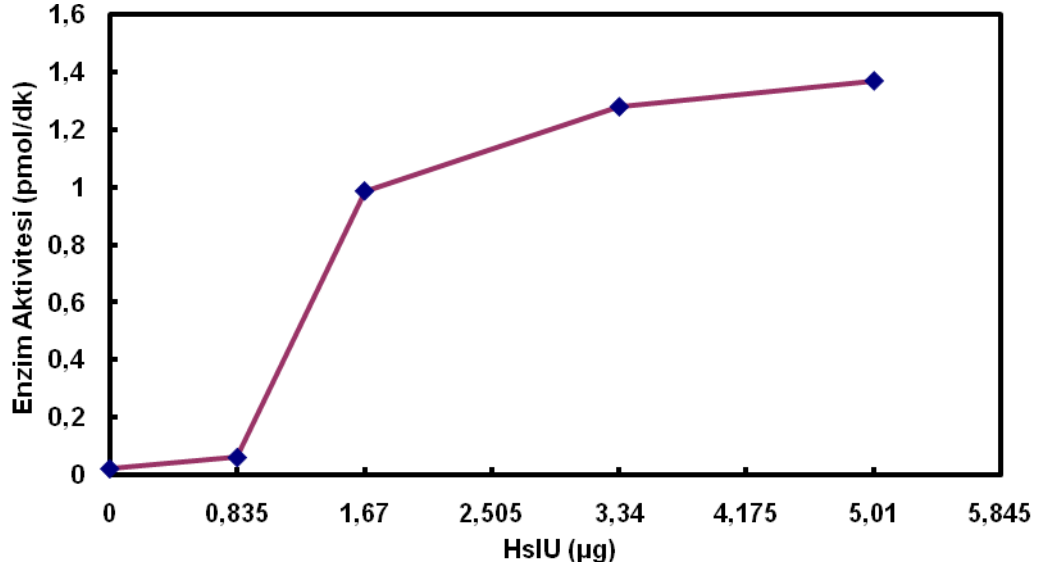
Saflaştırılan HslV ve HslU proteinlerinin *in vitro*'da aktif proteaz formu oluşturup oluşturmadıklarını belirlemek amacıyla ATP varlığında ve yokluğunda 55 °C'ta birlikte ve ayrı ayrı 20 dakika inkübe edilmişlerdir. Şekil 3.8'de görüldüğü gibi HslV ve HslU proteinleri (HslV:HslU= 1:3 molar oranında) kompleks oluşturarak mükemmel florojenik bir substrat olan Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC'yi ATP varlığında hidrolize etmiştir.



Şekil-3.8 HslV ve HslU'nun ATP varlığında ve yokluğunda aktif kompleks oluşumu ve peptidaz aktivitesi. (Peptit hidrolizi, 200 mM Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC, 0,56 µg HslV ve/veya 1,64 µg HslU, 1 mM ATP varlığında veya yokluğunda gerçekleştirilmiştir).

ATP yokluğunda, Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC HslVU tarafından 0,14 pmol/dk oranında yıkıma uğrattırken ATP varlığında enzim aktivitesinde 15 kat artış gözlenmiştir. HslVU ATP varlığında substratı 2,17 pmol/dk oranında yıkıma uğratmış ve bu değer % 100 kabul edilmiştir. HslV, ATP olmaksızın tek başına %

0.9 gibi düşük bir aktivite gösterirken HslU, ATP varlığında dahi tek başına aktivite göstermemiştir. HslV, ATP varlığında % 1.5 oranında aktivite gösterirken HslU'nun artan yoğunluğuna bağlı olarak peptit hidrolizinde artış gözlenmiştir.(Şekil 3.9). 1:1,5 HslV:HslU molar oranında peptit aktivitesi 16 kat artış göstermiştir.



Şekil 3.9 HslU'nun miktar artışının HslV peptidaz aktivitesine etkisi. (Peptit hidrolizi, 200 mM Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC, 0,56 µg HslV ve değişen oranlarda HslU, 1 mM ATP varlığında gerçekleştirilmiştir).

3.5.2 HslVU Tarafından Çeşitli Florojenik Peptitlerin Yıkımı

Geobacillus kaustophilus'a ait HslVU proteazın çeşitli substratlara karşı özgülüğü standart deney koşulları altında florometrik olarak incelenmiştir (Tablo 3.1). Bir florojenik substrat olan Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC, diğer HslVU proteazlar ve 26S proteazom için genel olarak kimotripsin benzeri aktivite deneylerinde kullanılan bir substrattır ve *Geobacillus kaustophilus* HslVU tarafından yüksek oranda hidrolize edilmiştir. Bununla beraber HslVU proteaz, memeli kimotripsini ve benzer serin proteazlar için mükemmel bir substrat olan Suc-Ala-Ala-Phe-AMC'yi % 25 oranında hidrolize etmiştir. Ancak bir kimotripsin substratı olan ve aynı zamanda Lon proteaz tarafından etkin olarak hidrolize edilen Glt- Ala-Ala-Phe-MNA, saflaştırılan HslVU proteaz tarafından hidrolize edilmemiştir.

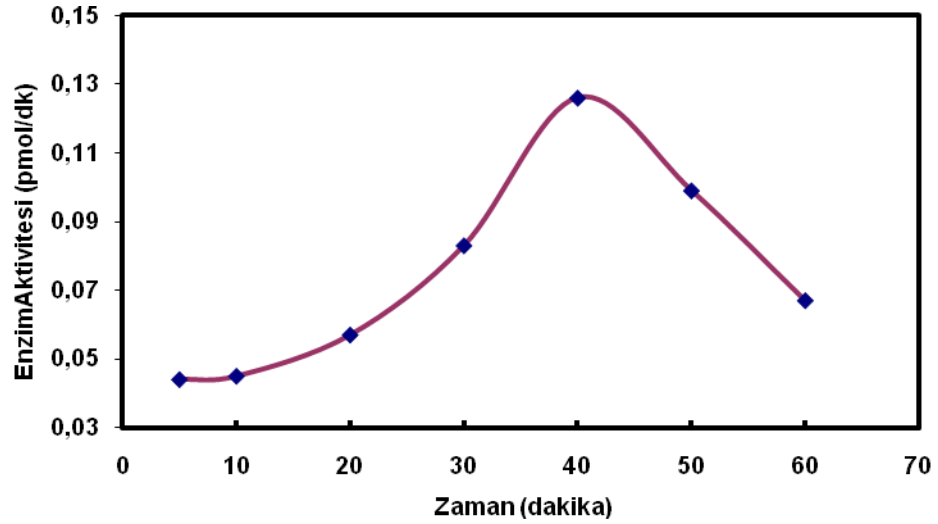
Tablo 3.1 HslVU peptidaz tarafından çeşitli florojenik peptitlerin hidrolizi. Enzim aktiviteleri her bir substrat varlığında (200 μ M) daha önce açıklanan şartlarda belirlenmiş ve Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC'ye göreceli olarak ifade edilmiştir.

Florojenik Substratlar (200 μ M)	Göreceli Aktivite (%)
Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC	100
Suc-Ala-Ala-Phe-AMC	24,5
Glt- Ala-Ala-Phe-MNA	0

3.5.3 HslVU Peptidaz Aktivitesi İçin Optimum İnkübasyon Süresi Tespiti

HslVU proteazın en aktif olduğu inkübasyon süresini belirlemek için HslVU proteazın florojenik peptit Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC'yi yıkım aktivitesi 55 °C'ta 5-60 dakika arasında değişen zaman aralıklarında inkübe edilerek, Gereç ve Yöntemlerde belirtilen koşullar altında ölçülmüştür.

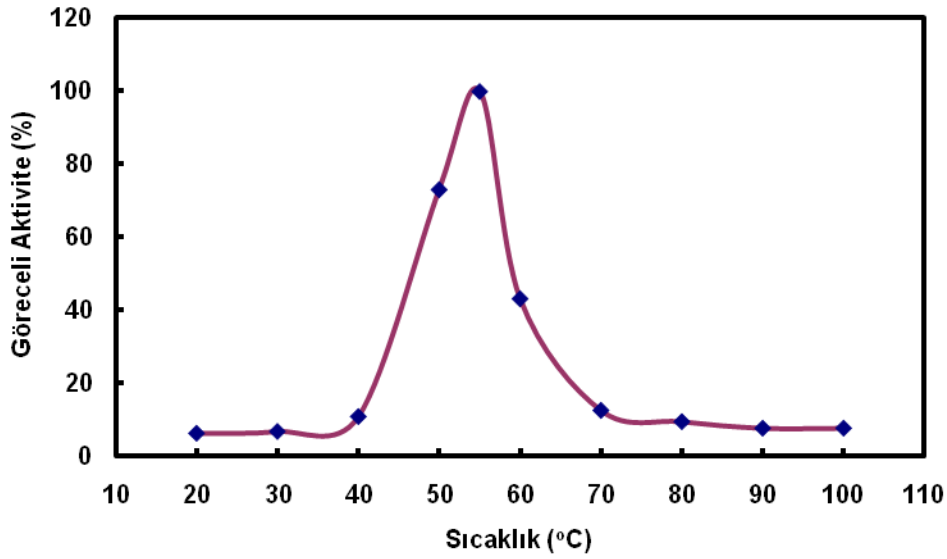
1 mM ATP varlığında rekombinant *G. kaustophilus* HslVU peptidazın yıkım aktivitesi ilk 20 dakikada artmıştır. Enzimin en yüksek aktiviteyi gösterdiği 40. dakikadan sonra aktivitede azalma gözlenmiştir (Şekil-3.10). Bundan sonraki enzim aktivite deneyleri için optimum inkübasyon süresi, 40 dakika olarak kabul edilmiştir.



Şekil 3.10 HslVU peptidaz için optimum inkübasyon süresi.

3.5.4 Sıcaklığın HslVU Peptidaz Aktivitesine Etkisi

HslVU proteazın en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklığı belirlemek için enzimin alt birimleri reaksiyon tamponunda 15 dakika ön inkübasyona tabi tutulduktan sonra 40 dakika boyunca 20 - 100 °C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleşen reaksiyonlarda Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC yıkımı, Gereç ve Yöntemlerde belirtilen koşullar altında ölçülmüştür. HslVU proteaz termofilik bir enzimdir. Peptit yıkım aktivitesi 40 °C'ta artış göstermeye başlayarak, 70 °C'ta düşmüştür. En yüksek enzim aktivitesi ise 55 °C'ta saptanmıştır (Şekil 3.11).

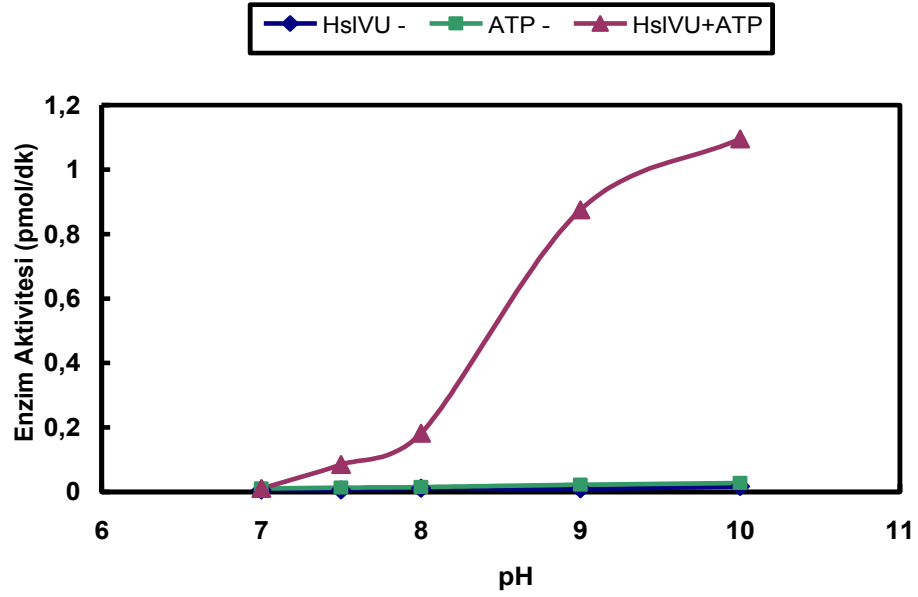


Şekil 3.11 Sıcaklığın HsIVU peptidaz aktivitesine etkisi.

3.5.5 pH'nın HsIVU Peptidaz Aktivitesine Etkisi

ATP bağımlı HsIVU proteazın optimal pH'sını tespit etmek için 4 - 11 arasında değişen pH'larda tampon çözeltiler hazırlanmıştır. Kullanılan tampon çözeltiler 25 mM sodyum asetat (pH 4.0-6.0), 25 mM MOPS (pH 6.0-7.0), 25 mM Tris-HCl (pH 7.0-9.0) ve 25 mM Glisin (pH 9.5-11.0) dir. HsIVU'nun proteolitik aktivitesi farklı pH'larda Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC'nin substrat olarak kullanıldığı standart reaksiyon koşullarında ölçülmüştür.

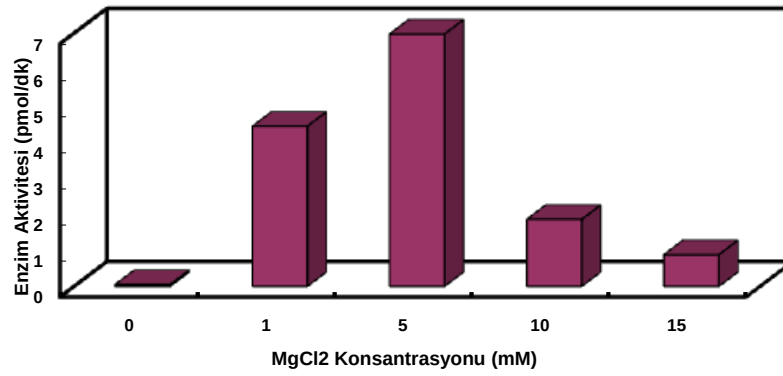
HsIVU proteaz pH 4.0-6.0 aralığında peptidaz aktivitesi göstermemekle birlikte pH 7,5 ile pH 11 aralığında artan miktarlarda aktivite göstermiştir (Şekil 3.12). Enzim bir alkali proteazdır. Florojenik substratların yüksek pH'larda daha iyi yıkıma uğradığı bilinmektedir. Bu sebeple optimum pH deneyi aynı şartlar altında ayrı ayrı enzim ve ATP yokluğunda tekrarlanmıştır. HsIVU proteaz enzimi sadece ATP varlığında pH 7,5-11.0 aralığında artan miktarda yüksek aktivite göstermiştir. pH 8.0 ile 9.0 arasında peptidaz aktivitesinde % 80'e varan artış gözlenmiştir. Bu verilerin elde edilmesinden sonraki deneyler pH 9.0'da yapılmıştır.



Şekil 3.12 pH'ın HslVU peptidaz aktivitesine etkisi.

3.5.6 Mg^{+2} 'un HslVU Peptidaz Aktivitesine Etkisi

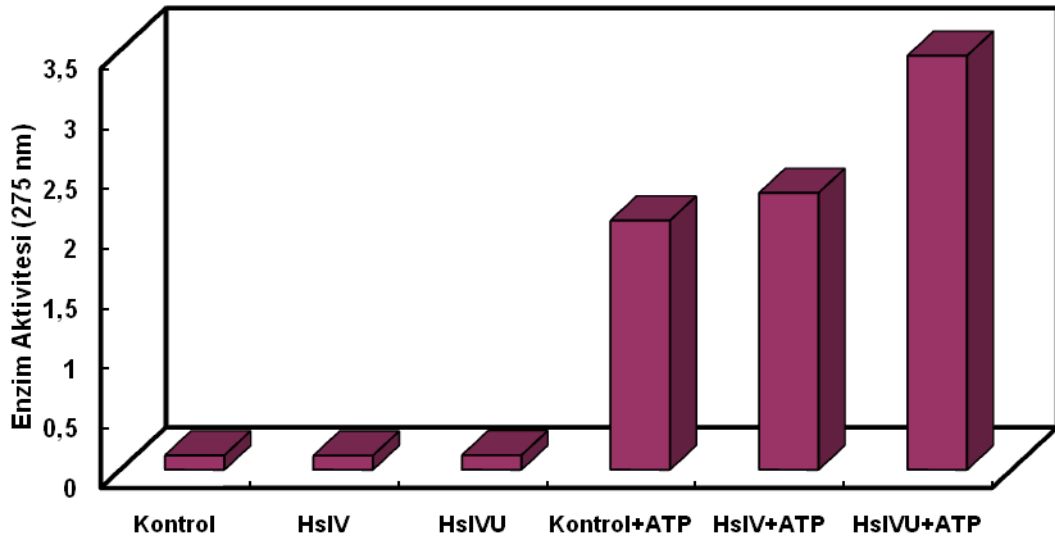
Mg^{2+} kationunun HslVU proteaz üzerine etkisi standart deney koşulları altında saflaştırılmış HslVU enziminin 0-15 mM $MgCl_2$ konsantrasyonlarında Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC hidroliz aktivitesi ölçülerek belirlenmiştir. Şekil 3.17'de görüldüğü gibi Mg^{2+} kasyonu varlığında enzim aktivitesi artmıştır. 1 mM $MgCl_2$ varlığında HslVU proteolitik aktivitesi 36,8 kat artarken, 5 mM $MgCl_2$ varlığında HslVU proteolitik aktivitesi 58 kat artmış ve enzim aktivitesi 6,97 pmol/dk olarak belirlenmiştir (Şekil 3.13).



Şekil 3.13 MgCl₂ konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi

3.5.7 HslVU Tarafından Kazein Yıkımı

Rekombinant HslVU proteaz aktivitesi aynı zamanda doğal bir substrat olan kazein kullanılarak Gereç ve Yöntemlerde açıklanan koşullar altında ölçülmüştür. *G. kaustophilus* HslVU proteaz kazeini sadece 1mM ATP varlığında hidrolize edebilmiştir (Şekil 3.14).



Şekil 3.14 HslVU proteaz tarafından ATP varlığında ve yokluğunda kazein yıkımı. (Kazein yıkımı 0,56 µg HslV ve/veya 1,64 µg HslU, 1 mM ATP varlığında veya yokluğunda gerçekleştirilmiştir).

3.5.8 HslVU Tarafından MBP-SulA Yıkımı

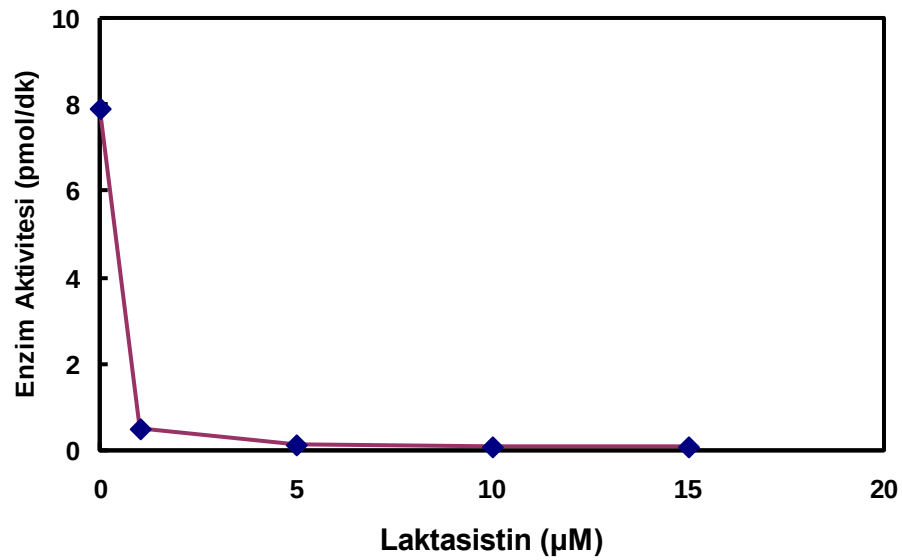
G. kaustophilus rekombinant HslVU proteaza ilişkin MBP-SulA yıkım deneyi Gereç ve Yöntemlerde belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. MBP-SulA yıkımı %12'lik SDS jele yüklenerek görüntülenmiştir. HslVU'nun SulA'yı ATP varlığında veya yokluğunda hidrolize edemediği gözlenmiştir.

3.5.9 Çeşitli Proteaz İnhibitörlerinin HslVU Peptidaz Aktivitesine Etkisi

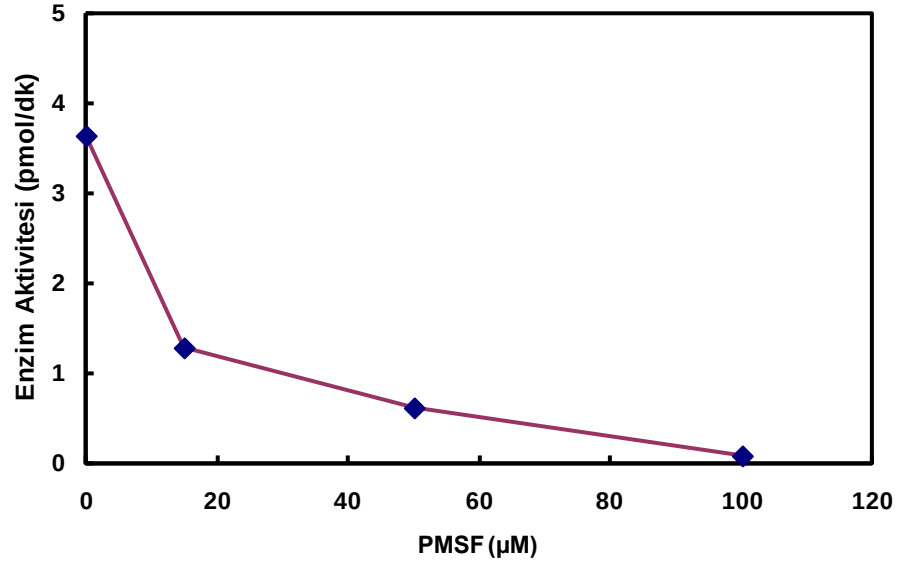
HslVU proteazın katalitik mekanizmasını daha fazla karakterize edebilmek için çeşitli proteaz inhibitörlerinin Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC'yi hidroliz aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. Bir serin proteaz inhibitörü olan PMSF'in 15 mM derişiminde kullanılması halinde, enzim aktivitesinde % 65 oranında azalma gözlenmiştir. Şekil 3.16' da gösterildiği gibi PMSF peptit yıkım aktivitesini doz bağımlı bir biçimde yaklaşık % 65-% 95 inhibe etmiştir. Bununla beraber memeli ya da arkea

proteazomlarının N-terminal treonininini modifiye eden 1 mM laktasistin varlığında aynı deneysel koşullarda HslVU peptidaz aktivitesi % 80 oranında inhibe olmuştur. 15 mM laktasistin varlığında ise inhibisyon % 98'lere varmıştır. Bu sonuçlar HslV'nin N terminal treonininin HslVU katalitik işlevinde temel rol aldığını ortaya koymakta, ancak bir Ser rezidüsünün katalitik aktivitede bir şekilde rol oynadığına da işaret etmektedir.

Ayrıca, 10mM EDTA ilavesinin enzim aktivitesini yaklaşık % 82 oranında düşürdüğü gözlenmiştir.



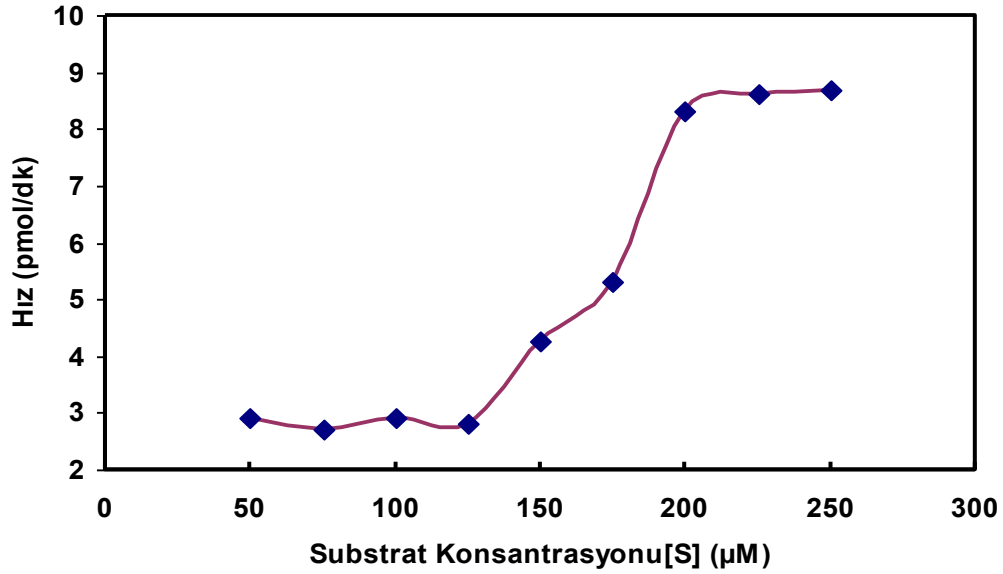
Şekil 3.15 Laktasistin inhibitörünün enzim aktivitesine etkisi.



Şekil 3.16 PMSF inhibitörünün enzim aktivitesine etkisi.

3.5.10 Substrat Konsantrasyonunun HslVU Peptidaz Aktivitesine Etkisi

Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC substratı kullanılarak elde edilen substrat artışına karşılık enzim hız grafiğinde sigmoidal bir eğri elde edilmiştir (Şekil 3.17). Sigmoidal eğri çok alt birimli enzimlerin kinetiğinde görülen bir eğridir.

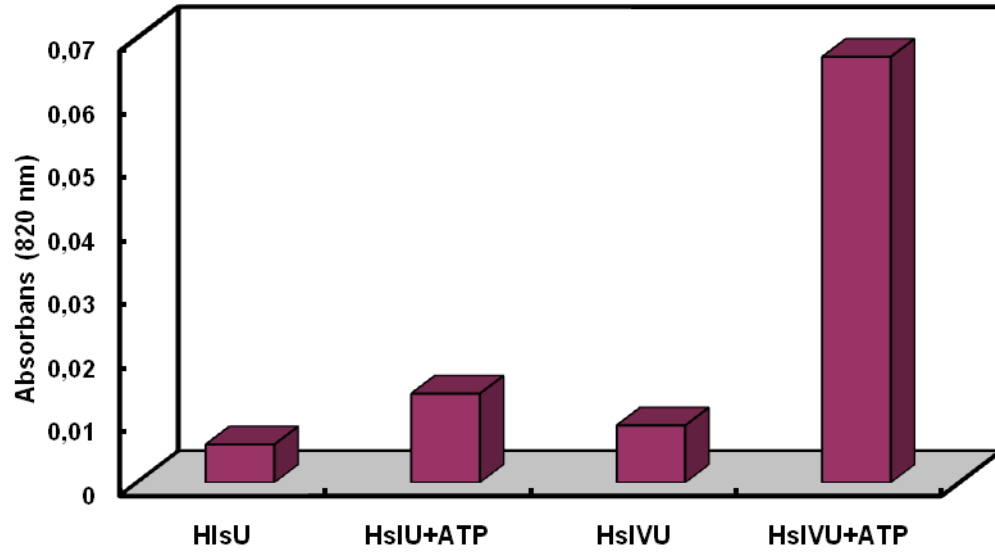


Şekil 3.17 Substrat artışına karşılık HslVU enzimi için hız grafiği

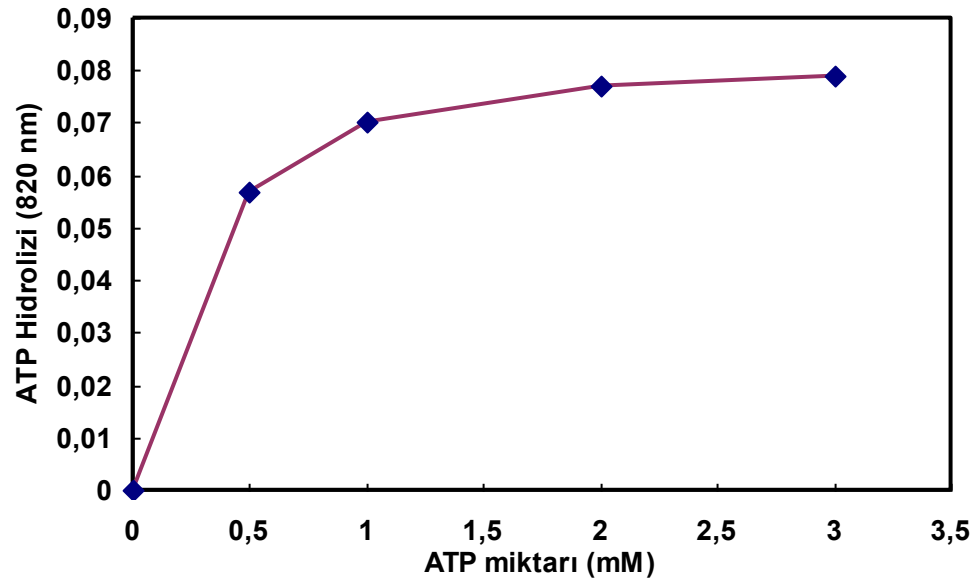
3.5.11 HslVU ATPaz Aktivitesinin Tespiti

Geobacillus kaustophilus HslU proteini *E. coli* HslU ClpA ailesi üyeleri ve *Bacillus subtilis* CodX gibi Walker A tipi ATP bağlanma motifine sahiptir (Walker ve ark., 1982, Avican, 2009). Bu sebeple *G. kaustophilus* rekombinant HslU ATPaz aktivitesi test edilmiştir. Şekil 3.18'de görüldüğü gibi HslU tek başına düşük bir aktivite göstermiştir. Bununla beraber 1:3 oranında HslV varlığı, HslU ATPaz aktivitesini 4,8 kat artırmıştır.

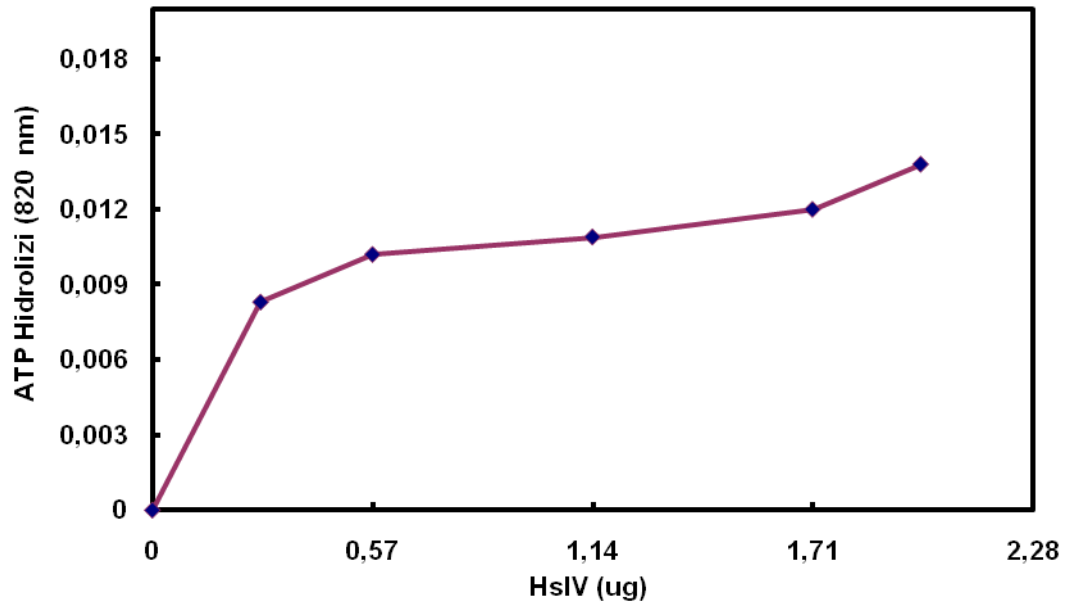
ATP'nin farklı derişimlerinin HslVU ATPaz aktivitesi üzerine etkisine bakıldığında artan ATP miktarının ATP hidrolizini artırdığı saptanmıştır (Şekil 3.19). HslV'nin, HslVU'nun ATPaz aktivitesine etkisi incelendiğinde, 1:6 molar oranında HslV:HslU kompleksinin ATP'yi hidrolizi daha düşük oranda görülürken artan HslV miktarına paralel olarak ATP hidrolizinde de artış gözlenmiştir ve 1.5:1 molar oranında HslV:HslU kompleksinin 1:6 molar oranındaki HslV:HslU kompleksine göre ATP hidroliz aktivitesinde 2,04 kat artış görülmüştür (Şekil 3. 20).



Şekil 3.18 ATP varlığında ve yokluğunda HslU ve HslIVU'nun ATP hidrolizi (ATP hidrolizi, 0,56 μ g HslV ve/veya 1,64 μ g HslU, 1 mM ATP varlığında veya yokluğunda gerçekleştirilmiştir).



Şekil 3.19 ATP miktarındaki artışın HslIVU ATP hidrolizine etkisi. (ATP hidrolizi, 0,56 μ g HslV, 1,64 μ g HslU ve değişen oranlarda ATP varlığında gerçekleştirilmiştir).



Şekil 3.20 HslV'nin miktarındaki artışın HslVU ATP hidrolizine etkisi. (ATP hidrolizi, 200 mM Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC, 1 mM ATP, 1,64 µg HslU ve değişen oranlarda HslV varlığında gerçekleştirilmiştir).

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

ATP-bağımlı proteolizis, yanlış katlanmış proteinlerin ve kısa ömürlü düzenleyici protein faktörlerin ortadan kaldırılmasıyla gen düzenlenmesinde, hücrel protein seviyelerinin düzenlenmesinde ve protein kalite kontrolünde rol oynamaktadır. Ökaryotlarda ATP-bağımlı proteolizis 26S proteazomlar tarafından gerçekleştirilirken arkea ve öbakterilerde ClpAP, ClpXP, HslVU (ClpQY), Lon ve FtsH proteazlar gibi yapısal olarak birbirine benzeyen ATP-bağımlı çeşitli proteazlar tarafından gerçekleştirilmektedir.

İlk defa 1993'te Blattner ve arkadaşları tarafından *Escherichia coli*' de tanımlanan HslVU ATP-bağımlı proteaz, çok ilginç olarak ökaryotik proteazoma benzerlik göstermektedir ve bu sebeple 26S proteazomun analogu olarak kabul edilmektedir (Gille ve ark. 2003). *G. kaustophilus*'un genom dizisi yakın bir zamanda rapor edilmiş ve *E. coli* *hslV* ve *hslU* genlerine % 57 homoloji gösteren gen dizileri tanımlanarak, sırasıyla ATP bağımlı proteaz HslV ve HslU ATPaz şeklinde adlandırılmıştır (Takami ve ark., 2004). *G. kaustophilus*'un yüksek sıcaklıklarda yaşayabilen bir organizma olması ATP-bağımlı proteaz HslVU genleri ve ürünlerini de ilgi çekici kılmaktadır.

Bu çalışmada labratuvarımızda daha önce bir yüksek lisans öğrencisi tarafından PGEX 6P-1 ekspresyon vektörüne klonlanan *G. kaustophilus*'a ait *hslV* ve *hslU* genleri (Avican, 2009) Glutasyon S-Transferaz ile füzyon protein olarak ilk defa eksprese edilmiş, saflaştırılmış ve biyokimyasal nitelendirilmesi gerçekleştirilmiştir.

pGEX-6P-1 vektörüne klonlanan *hslV* ve *hslU* genleri *tac* promotoru altında oldukları için IPTG ile uyarılmıştır. Eksprese edilen rekombinant proteinler hücre dışına salınmadığı, sitoplazmada biriktiği için hücreler sonikasyonla parçalanmıştır.

Elde edilen hücre özütleri GSTrap Fast Flow afinite kolonu kullanılarak tek basamakta saflaştırılmıştır. SDS-PAGE görüntülerinden hareketle proteinlerin homojen olarak saflaştırıldıklarına karar verilmiştir. Buna göre HslU yaklaşık 50 kDa, HslV ise yaklaşık 19 kDa olarak görüntülenmiştir. İndirgenmiş glutatyon ile yıkama sonucunda Prescission proteaz ile füzyon proteinin kesiminden sonra kolona bağlı kalan GST proteinleri beklendiği gibi 26 kDa olarak elde edilmiştir.

Bu sonuçlar, 1993'te Chung ve arkadaşları, 1996'da Rohrwild ve arkadaşları ve 1999'da Seong ve arkadaşları tarafından yapılan *E. coli* HslV ve HslU'nun moleküler büyüklüğünü tayin etmek üzere yapılan çalışmaların verileri ile uyumludur. Bununla beraber Kang ve arkadaşları 2001'de, HslVU'nun *B. subtilis*'teki homoloğu olan ATP-bağımlı CodWX proteazın alt birimi olan CodW proteazın benzer şekilde 19 kDa büyüklüğünde olduğunu buna karşın CodX ATPaz'ın 52 kDa büyüklüğünde olduğunu belirlemişlerdir.

Enzim aktivite tayini için substrat olarak florojenik peptit Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC kullanılmıştır. Saflaştırılan enzimler, 0,57 µg HslV ve 1,64 µg HslU kullanıldığında yüksek aktivite vermiştir. HslVU ile yapılan önceki bazı çalışmalarda, HslV:HslU molar oranının 1:4 olmasına (Rohrwild ve ark., 1996; Burton ve ark., 2005) rağmen, Yoo ve arkadaşlarının 1997 yılında yaptığı çalışmada 1:3 molar oranın daha iyi aktivite verdiği tespit edilmiştir. Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz enzim için de yaklaşık 1:3 oranının yeterli olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, HslU oranı artıkça aktivitenin arttığı da saptanmıştır.

HslVU proteazın diğer bir ATP-bağımlı proteaz olan Ti (ClpAP)'nin aksine peptit hidrolizi için ATP'ye ihtiyaç duyduğu bilinmektedir (Goldberg, 1984). *E. coli* ve *B. subtilis* başta olmak üzere HslVU proteaz ile daha önce yapılan birçok çalışmada HslVU proteazın ATP-bağımlı olduğu gösterilmiştir. Yoo ve arkadaşlarının 1996'da yaptığı çalışmada HslVU'nun ATP olmadığında hiç aktivite göstermediği tespit edilmiştir. Ancak Rohrwild ve arkadaşlarının 1996 yılında yaptığı çalışmada hem HslU'nun kendiliğinden oluşumu hem de HslVU'nun oluşumu için nükleotide ihtiyaç duymalarına rağmen HslVU aktif formunun herhangi bir nükleotid olmaksızın (ATP, ADP vs) indüklendiği gösterilmiştir. Yaptığımız çalışmada da HslV, ATP olmaksızın oldukça düşük peptidaz aktivitesi göstermiştir.

ATP olmaksızın HslV ve HslU alt birimleri HslVU aktif formunu oluşturmuştur. ATP varlığında oluşan HslVU aktif kompleksinin aktivitesi 100 kabul edildiğinde, ATP olmaksızın oluşan aktif HslVU kompleksi % 6.7 oranında aktivite vermiştir. Beklenildiği gibi ATP varlığında, HslVU kompleks oluşumu ve peptidaz aktivitesinde 15 kat artış gözlenmiştir.

Önceki çalışmalarda ATP hidrolizinin HslVU'nun proteolitik aktivitesiyle güçlü bir biçimde ilişkili olduğu düşünülmesine karşın (Rohrwild ve ark. 1996, Yoo ve ark. 1996) Huand ve Goldberg'in 1997 yılında yaptıkları çalışmaya göre hidroliz olmaksızın nükleotit bağlanması peptit yıkımı için yeterli görülmüştür. Hidrolize olmayan ATP analoglarında ise KCl varlığında hem protein hem peptit yıkımı en yüksek seviyeye ulaşmıştır (Huang ve Goldberg, 1997). Bu açıdan bakıldığında, her ne kadar HslVU ve benzeri proteazlar ATP bağımlı olarak tanımlansa da ATP bağımlılıklarıyla beraber nükleotit bağımlılıkları tartışılmalı ve nitelendirilmelidir. *G. kaustophilus* HslVU ile ileride farklı nükleotitler ve K^+ , Cs^+ , NH_4^+ gibi katyonlar ile yapılması planlanan çalışmalar bu nitelendirmeyi daha doğru tarif edecektir.

HslVU proteaz ile yapılan literatürde yer alan saflaştırma çalışmalarında, elde edilen HslVU proteazın potansiyel substratlar olan çeşitli florogenik substratlar kullanılarak substrat özgüllükleri belirlenmiştir (Rohrwild ve ark., 1996). Daha önceleri proteazomun kimotripsin-benzeri aktivite deneylerinde kullanılan CBZ-Gly-Gly-Leu-AMC (Chu-Ping ve ark., 1992)'nin, *E. coli*'de HslVU tarafından etkili bir şekilde kesildiği saptanmıştır (Rohrwild ve ark., 1996; Yoo ve ark., 1996 ve 1997; Kang ve ark., 2001, Seong ve ark., 2002; Azim ve ark., 2006). Benzer şekilde yaptığımız çalışmalarda *G. kaustophilus* HslVU proteaz, CBZ-Gly-Gly-Leu-AMC'yi etkin bir şekilde hidrolize ederek kimotripsin-benzeri aktivite göstermiştir. Aynı zamanda kimotripsin ve *Thermoplasma acidophilum* proteazom tarafından hidrolize edilen hidrofobik bir substrat olan Suc-Ala-Ala-Phe-AMC, *E.coli* HslVU tarafından çok az hidroliz edilirken ya da hiç hidroliz edilemezken *G. kaustophilus* HslVU tarafından % 25 oranında hidrolize edilmiştir (Yoo ve ark., 1996, Rohrwild ve ark., 1996). Diğer taraftan bir kimotripsin substratı olan ve Lon proteaz tarafından hidrolize edilen Glt-Ala-Ala-Phe-MNA saflaştırdığımız HslVU proteaz tarafından hidroliz edilememiştir.(Waxman and Goldberg, 1985).

HslVU peptidazın CBZ-Gly-Gly-Leu-AMC'yi hidroliz ettiği optimum zamanı belirlemek için yaptığımız deneylerde 40 dakikaya kadar enzim aktivitesinde artış görülmüştür. 40. dakikadan sonra ise enzim aktivitesinde düşüş saptanmıştır. Enzim aktivitesinin zamana bağlı 7-amino-4 metil koumarin (AMC) oluşumu grafiğinde 40. dakikadan sonra görülen bu düşüş, floresan ışıması yapan AMC'nin yüksek sıcaklıkta uzun inkübasyon süresinde ışımasını kaybettiğini düşündürmektedir. Grafiğe göre (Şekil 3.10) enzimin ürün oluşturma hızı 55°C' da ürünün bozulma hızından daha düşük olduğu gözlenmektedir.

HslVU peptidazın CBZ-Gly-Gly-Leu-AMC'yi hidroliz ettiği optimum sıcaklığı belirlemek için yaptığımız deneylerde 40°C'da aktivitenin arttığı ve 60 °C'ta aktivitede azalma başladığı görülmüştür. Enzim aktivitesi için optimum sıcaklık 55°C olarak belirlenmiştir. Termofilik *G. kaustophilus*'un normal büyüme sıcaklığının 60°C olduğu düşünüldüğünde, enzim aktivitesinin bu sıcaklığa uygun değerlerde optimum düzeye ulaşması sonucu mantıklı bulunmuştur.

Termofilik bir bakteri olan *G. kaustophilus*'un büyüebilmesi için gerekli pH aralığı 6.2 ile 7.5 arasındadır (Zeigler, 2001). *G. kaustophilus* HslVU proteaz enzimin en iyi aktivite gösterdiği pH değerini belirlemek için yapılan deneylerde, asidik ve nötr pH değerlerinde çok düşük bir aktivite gözlenmiş ya da hiç aktivite alınamamıştır. Enzim aktivitesi pH 7,5'da artmaya başlayarak artan pH değerlerine paralel şekilde yükselmiştir. pH 10'da enzim aktivitesi pH 7,5'a göre yaklaşık 10 kat artmıştır. Saflaştırdığımız HslVU protein bir alkali proteazdır. Literatürde yer alan diğer HslVU proteazların, pH 7,5 ile pH 8.5 arasında yüksek aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Yoo ve ark., 1996 ve 1997; Seong ve ark., 2002; Azim ve ark., 2006). Diğer taraftan termofilik bir Bacillus olan *G. kaustophilus* proteazı, *B. subtilis*'den saflaştırılan alkali CodWX proteaza benzerlik göstermiştir. CodXW, ATP varlığında Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC hidrolizinde en yüksek aktiviteyi pH 9.5 'de göstermektedir (Kang, 2001).

Mg²⁺ iyonunun HslVU proteaz aktivitesine etkisinin belirlenmesi için farklı derişimlerde Mg²⁺ varlığında ve yokluğunda yapılan deneylerde en yüksek aktivite 5 mM MgCl₂ varlığında görülmüştür. Literatürde daha önce yapılan çalışmalarda da en iyi aktivitenin 5 mM ve 10 mM MgCl₂ derişimlerinde görüldüğü belirlenmiştir

(Rohrwild ve ark., 1996; Yoo ve ark., 1996; Yoo ve ark., 1997, Seong ve ark., 2002, Burton ve ark., 2005). *G. kaustophilus* HslVU, diğer ATP-bağımlı reaksiyonlarda saptandığı üzere Mg^{2+} yokluğunda aktivite göstermezken 5 mM $MgCl_2$ varlığında enzim aktivitesi 58 kat artmıştır. Bu bulgular, Mg^{2+} 'un nükleotid bağlanmasında ve hidrolizinde kofaktör olarak işlev gördüğünü düşündürmektedir.

HslVU proteaz, 10 mM EDTA varlığında peptidaz aktivitesini % 82 oranında yitirmiştir. EDTA, iki değerli katyonları tutuklayıcı bir ajandır. Daha önce yapılan çalışmalarda, 5-10 mM EDTA varlığının ATP-bağımlı HslVU peptidaz aktivitesini tamamıyla bozduğu rapor edilmiştir (Rohrwild ve ark., 1996, Huan ve Goldberg, 1997). Bu sonuçlar, *G. kaustophilus* ATP-bağımlı HslVU peptidaz aktivitesinin diğer HslVU'lar da olduğu gibi kofaktör olarak Mg^{2+} 'a ihtiyaç duyduğunu desteklemektedir.

G. kaustophilus HslVU proteazın katalitik mekanizmasını anlayabilmek için geri dönüşümsüz serin proteaz inhibitörü olan PMSF ve memeli proteazom inhibitörü olan laktasistin ile inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. PMSF, aktif bölgede yer alan Ser rezidüsünü güçlü bir şekilde inhibe ederek aktivitenin tamamıyla kaybolmasına neden olmaktadır (Beynon ve Salvasen, 2001). Laktasistin ise özgül ve kovalent olarak proteazomun β -alt üniresinin N-terminalindeki Thr katalitik rezidüsüne bağlanmaktadır (Fenteany ve Scriver, 1998). *G. kaustophilus* HslVU peptidaz aktivitesine bağlı hidrolizin inhibisyonuna yönelik çalışmalarda 15 μ M PMSF'in peptit yıkım aktivitesini % 65 inhibe ettiği buna karşın 1 μ M laktasistin HslVU enzim aktivitesinde % 80 azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. 15 μ M laktasistin varlığında ise enzim aktivitesi % 98 oranında inhibe olmuştur. Bu nedenle, PMSF'in de inhibisyona yol açmasına karşın aktif bölgede Ser yerine Thr bulunduğu düşünülmektedir.

Benzer şekilde Rohrwild ve arkadaşlarının 1996 yılında yaptıkları çalışmalarda da, HslV'nin ökaryotik proteazom gibi bir N-terminal proteaz olduğu sonucuna varılmış, bu sonuç 1996'da Yoo ve arkadaşları tarafından HslVU proteazın nitelendirmesine yönelik çalışmalar ve 1997'de yine Yoo ve arkadaşları tarafından yapılan aktif bölge mutasyon çalışmaları ile de desteklenmiştir.

Bacillus subtilis'ta HslVU'ya benzeyen ve CodWX olarak adlandırılan proteaza bakıldığında N-terminal Thr yerine N-terminal Ser rezidüsünün hidroksil grubunun aktif nükleofil olarak kullanıldığı belirlenmiştir. CodWX, N-terminalinde aktif bölge olarak davranan Ser rezidüsüne sahip ilk ATP-bağımlı proteaz olarak tespit edilmiştir (Kang ve ark., 2001). Çalışmamızda saflaştırdığımız HslVU proteaz *G. kaustophilus*'un *Bacillus* cinsine ait olmasına rağmen CodWX'in aksine diğer ATP- bağımlı HslVU proteazlar gibi Thr inhibitörleriyle inhibe olduğundan N-terminal Thr aktivitesine sahip olduğu düşünülmektedir.

HslVU proteazın laktasistin kadar olmasa da PMSF ile de inhibisyona uğraması içerdiği bazı Ser rezidülerinin katalitik aktiviteye yardımcı olabileceğini düşündürmektedir. Yoo ve arkadaşlarının 1997 yılında *Thermoplasma* proteazomunun N-terminal Thr katalitik aktivitesine sahip β alt birimlerinde bulunan Ser rezidülerini mutasyona uğratarak yaptıkları çalışmada da Ser¹²⁴, Ser¹⁰³ ve Ser¹⁷² rezidülerinin HslV'nin katalitik işlevinde yer almasını olası görmüşlerdir.

G. kaustophilus HslVU proteaz ile daha sonra yapılacak katalitik bölgeye yönelik mutasyon çalışmaları, bu proteazın aktif bölgesinde Thr ya da Ser amino asitlerden hangisinin yer aldığını daha belirgin olarak gösterecektir.

HslVU proteaz aktivitesine bir protein substratı olan kazein varlığında da bakılmıştır. Yapılan deneylerde HslVU'nun kazeinolitik aktiviteye sahip olduğu fakat bu aktiviteyi ATP varlığında gerçekleştirdiği görülmüştür. Rohrwild ve arkadaşları tarafından 1996'da *E. coli*'ye ait ATP-bağımlı HslVU proteaz ile yapılan aktivite deneylerinde, kazein yıkımı için ATP'ye ihtiyaç olmadığının rapor edilmesi bu anlamda farklılık göstermektedir.

Yaptığımız çalışmada doğal protein substratı olarak kullandığımız Sula proteini Dr. A. Higashitani' den temin edilen pMal-p2-Sula rekombinant plazmiti kullanılarak eksprese edilmiş ve tek basamakta amiloz resin afinite kolon kullanılarak örnekler maltoz bağlama proteini ile füzyon halinde saflaştırılmıştır. Sula proteini SDS-PAGE'de homojen olarak (60 kDa) görüntülenmiştir. Yıkım reaksiyonunda, MBP-Sula füzyon halinde kullanılmıştır. MBP, Sula'nın agregasyonunu önleyerek yıkımını kolaylaştırmaktadır (Higashitani ve ark., 1997).

MBP-SulA'nın substrat olarak kullanıldığı çalışmada HslVU'nun hidrolizi ATP varlığında ya da yokluğunda gerçekleştirilemediği saptanmıştır. Literatürde, Medhat Khatrar'ın 1997'de yaptığı çalışmada aşırı miktarda eksprese olan HslVU SOS-uyarımli hücre bölünmesi inhibitörü SulA'yı yıktığı tespit edilmiştir. Seong ve arkadaşlarının 2002'de ve Azim ve arkadaşlarının 2006'da yaptıkları çalışmalarda da elde edilen *E. coli* HslVU enzimlerinin SulA'yı yıktığı rapor edilmiştir. Fakat, *Bacillus subtilis*'e ait HslVU benzeri CodWX proteazın, *Geobacillus kaustophilus* HslVU ile elde edilen sonuçlara benzer şekilde SulA'yı yıkamadığı görülmüştür (Kang ve ark., 2001).

Substrat konsantrasyonunun HslV proteaz aktivitesine etkisinin belirlenmesi için farklı substrat konsantrasyonlarında yapılan deneylerde, en yüksek aktivite 250 μ M'de görülürken, 250 μ M'dan sonraki konsantrasyonlarda substrat doygunluğu gözlenmiştir. Bu deneyde elde edilen veriler ile, substrat artışına karşılık enzim hızı grafiğı çizilmiş, bu grafikte sigmoidal bir eğri elde edilmiştir. Bu sonuç HslVU enziminin allosterik mekanizmayı kullandığını göstermiştir. İki bileşenli ATP-bağımlı proteazlarda görülen bu mekanizmanın nasıl düzenlendiğı henüz kesinlik kazanmamıştır.

ATP-bağımlı proteazlar, Walker A tipi ATP bağlanma motifine sahiptir.(Walker ve ark., 1982). Bu sebeple *G. kaustophilus* HslVU peptidaz aktivitesinden sonra ATPaz aktivitesi de incelenmiştir. HslU tek başına düşük bir aktivite göstermiştir ve HslV varlığının, HslU ATP hidroliz miktarını 4.8 kat arttırdığı görülmüştür. ATP ve HslV'nin ayrı ayrı oransal artırımı, HslVU ATPaz aktivitesini de arttırmıştır. Seong ve arkadaşlarının 1996 yılında yaptığı çalışmada da ATP hidroliziyle ilgili benzer sonuçlar elde edilmiştir. ATP ve HslV miktarındaki artış HslVU'nun ATP hidroliz aktivitesini artırmıştır. Böylece, peptit yokluğunda HslV artışının ATP hidrolizini düzenlediğı ve arttırdığı sonucuna varılmıştır. Bu durum, bir Clp ATP-bağımlı proteaz olan Ti (ClpAP)'de gözlenenden farklıdır. Peptit substrat yokluğunda Proteaz Ti'nin proteolitik bileşeni olan ClpP'nin ilavesi, ATPaz bileşeni olan ClpA'nın ATP hidrolizini azalttığı gözlenmiştir (Seong ve ark., 1996).

SONUÇLAR

Bu çalışmada, *Geobacillus kaustophilus*'a ait HslV proteaz ve HslU ATPaz proteinleri ayrı ayrı saflaştırılmış ve biyokimyasal nitelendirilmesi yapılmıştır.

1. Bu çalışma sonucunda *G. kaustophilus*'a ait HslV peptidaz ve HslU ATPaz proteinleri saflaştırılarak moleküler ağırlıkları SDS-PAGE'de sırasıyla 19 kDa ve 50 kDa olarak görüntülenmiştir.
2. Enzim aktivite tayininde substrat olarak florojenik peptit Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC kullanılmıştır. Saflaştırılan enzimlerin iyi aktivite verdikleri belirlenmiştir.
3. HslVU ATP-bağımlı bir proteazdır. HslV, ATP varlığında HslV:HslU'nun 1:3 oranında bulunduğu koşullarda çok düşük aktivite gösterirken, HslU varlığında oluşan aktif HslVU kompleksinin peptidaz aktivitesi 15 kat artış göstermiştir. Bununla beraber ATP olmaksızın HslV oldukça düşük bir peptidaz aktivitesi göstermiş ve HslVU aktif formunu oluşturmakla birlikte ancak % 6.7 oranında aktivite gözlenmiştir.
4. HslVU proteaz, proteazomun kimotripsin-benzeri aktivite deneylerinde kullanılan CBZ-Gly-Gly-Leu-AMC'yi etkili bir şekilde hidrolize etmiştir.
5. HslVU proteaz enziminin CBZ-Gly-Gly-Leu-AMC hidroliz aktivitesinde optimum sıcaklık 55 °C ve optimum pH 9.0 olarak belirlenmiştir.
6. HslVU, proteaz aktivitesi için kofaktör olarak Mg^{2+} 'a ihtiyaç duymaktadır. Enzimin 10 mM EDTA varlığında peptidaz aktivitesini % 82 oranında yitirmesi, Mg^{2+} 'un kofaktör olarak gereksinildiğini desteklemiştir.
7. *G. kaustophilus* HslVU peptidaz, laktasistin ile güçlü bir şekilde inhibe olmuştur. Bu sebeple, N-teminal Thr aktivitesine sahip olduğu düşünülmektedir.

8. HslVU proteaz, protein substrat olan kazeini ATP varlığında düşük oranda hidrolize ederken, doğal bir protein substratı olan MBP-SulA'yı hidrolize etmemiştir.
9. HslU'nun tek başına düşük bir aktivite gösterdiği ve HslV varlığının, HslVU ATP hidroliz miktarını 4.8 kat arttırdığı görülmüştür. Ayrıca, ATP ve HslV miktarındaki artış HslVU ATP hidrolizini artırmıştır.

5. KAYNAKLAR

1. **Ames B. N.** (1966) Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatase, *Methods Enzymol.*, 8:115-118
2. **Avican K.**, (2009) ATP-bağımlı proteaz HslVU genlerinin *Geobacillus kaustophilus*'tan klonlanması, DNA dizisinin belirlenmesi ve ekspresyonu. Yüksek lisans tezi, GYTE
3. **Azim M. K., Goehring W., Song H. K., Ramachandran R., Bochtler M., Goettig P.** (2005) Characterization of the HslU chaperone affinity for HslV protease. *Protein Sci.* 14(5):1357-62
4. **Baumeister, W., J. Walz, F. Zühl, and E. Seemüller.** (1998) The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* . 92: 367-380
5. **Bochtler M., Hartmann C., Song H., Bourenkov G. P., Bartunik H. D. and Huber R.** (2000) The structures of HslU and the ATPdependent protease HslU–HslV. *Nature* , 403: 800-805
6. **Bogyo M., Mc Master J. S., Gaczynska M., Tortorella D., Goldberg A.L., Ploegh H.** (1997) Covalent modification of the active site threonine of proteasomal beta subunits and the *Escherichia coli* homolog HslV by a new class of inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(13):6629-34
7. **Burton R. E., Baker T. A., Sauer R. T.** (2005) Nucleotide-dependent substrate recognition by the AAA+ HslUV protease. *Nat Struct Mol Biol* 12(3):245-51
8. **Charette 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. USA* 78: 4728-4732

9. **Chuang S. E., Blattner F. R. (1993) Characterization of twenty-six new heat shock genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175 5242-5252**
10. **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* 78:4931-4935**
11. **Chung C. H., Goldberg A. L. (1982) DNA stimulates ATP-dependent proteolysis and protein- dependent ATPase activity of protease La from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:795-99**
12. **Ciechanover A., Schwartz A. L. (1998) The ubiquitin–proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 2727–2730.**
13. **Cordell S. C., Robinson E. J. H., and Löwe J. (2003) Crystal structure of the SOS cell division inhibitor Sula and in complex with FtsZ. *PNAS* vol. 100, no. 13, 7889-7894**
14. **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**
15. **Gille C., Goedel A., Schloetelburg C., Preißner R., Kloetzell P.M., Gobel U.B., Frommell C. (2003) A Comprehensive view on proteasomal sequences: implications for the evolution of the proteasome. *J Mol Biol* 326: 1437–1448**
16. **Glickman M. H., Rubin D. M., Coux O., Wefes I., Pfeifer G., Cjeka Z., Baumeister W., Fried V.A., Finley D. (1998) A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell*. 94(5):615–623**
17. **Goldberg A.L. (1992) The mechanism and function of ATP-dependent protease in bacterial and animal cells. *European Journal of Biochem.*, 203: 9–23**

18. **Gottesman S.** (1996) Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annual Review of Genet.*, 30: 465–506
19. **Gottesman S.** (1999) Regulation by proteolysis: developmental switches. *Current Opinion in Microbiology*, 2:142-147
20. **Grimaud R., Kesel M., Beuron F., Stevens A.C., Maurizi M.R.** (1998) Enzymatic and structural similarities between the *Escherichia coli* ATP-dependent proteases, ClpXP and ClpAP. *J.Biol. Chem.* 273:12476-81
21. **Higashitani A., Ishii Y., Kato Y., and Horiuchi K.** (1997) Functional dissection of a cell-division inhibitor, SulA, of *Escherichia coli* and its negative regulation by Lon. *Mol Gen Genet.*, 254:351-357
22. **Hoskins J. R., Kim S. Y., Wickner S.** (2000) Substrate recognition by the ClpA chaperone component of ClpAP protease. *J.Biol. Chem.* 275:35361-67
23. **Huang C. H. and Goldberg A. L.** (1997) Proteolytic activity of the ATP-dependent protease HslVU can be uncoupled from ATP hydrolysis. *J.Biol. Chem.* 272:21364-21372
24. **Hwang B. J., Park W. J., Chung C. H., and Goldberg A. L.** (1987) *Escherichia coli* contains a soluble ATP-dependent protease (Ti) distinct from protease La. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 5550-5554
25. **Hwang B. J., Woo K. M., Chung C. H., and Goldberg A. L.** (1988) Protease Ti, a new ATP-dependent protease in *Escherichia coli* , contains protein activated ATPase and proteolytic functions in distinct subunits. *J. Biol. Chem.* 263, 8727-8734
26. **Maupin-Furlow J. A., Wilson H. L., Kaczowka S. J., Ou M. S.** (2000) Proteasomes in the archaea: from structure to function. *Frontiers in Bioscience* 5, 837-865

27. **Katayama Y., Gottesman A., Pumphrey J., Rudikoff S., Clark W. P. and Maurizi M.R.** (1988) The two component, ATP- dependent Clp protease of *Escherichia coli* . Purification, cloning and mutational analysis of the ATP-binding component. *J. Biol. Chem.* 263, 15226-15236

28. **Kessel, M., Maurizi, M. R., Kim, B., Kocsis, E., Trus, B. L., Singh, S. K., Steven, A. C.** (1995) Homology in structural organization between *E. coli* ClpAP protease and the eukaryotic 26S proteasome. *J Mol Biol* 250: 587-594

29. **Laemmli, U. K., (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685

30. **Lee A. V., Gooch J. L, Oesterreich S., Guler R. L., Yee D. (2000)** Insulin-like growth factor I-induced degradation of insulin receptor substrate 1 is mediated by the 26S Proteasome and blocked by phosphatidylinositol 3'-kinase inhibition. *Molecular and Cellular Biology*. 20 (5):1489-1496

31. **Kang M, Lim B. L., 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. *The EMBO Journal* , 20(4)734±742

32. **Khattar M. M., (1997)** Overexpression of the *hslVU* operon suppresses SOS-mediated inhibition of cell division in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 414 , 402-404

33. **Missiakas D., Schwager F., Betton J.M., Georgopoulos C., Raina S.** (1996) Identification and characterization of HslV HslU (ClpQ ClpY) proteins involved in overall proteolysis of misfolded proteins in *Escherichia coli*. *The EMBO J.* 15, 6899-6909

34. **Nazina T.N., Tourova T.P., Poltarau A.B., Novikova E.V., Grigoryan A.A., Ivanova A.E., Lysenko A. M., Petrunka V.V., Osipov G.A., Belyaev1 S. S.,**

- Ivanov M. V.** (2001) Taxonomic study of aerobic thermophilic Bacilli. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 433-446
- 35. Neuwald A., Aravind L., Spouge J., Konin E.** (1999) AAA⁺ : A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation and disassembly of protein complexes. *Genome Research*, 9, 27-43
- 36. Nishii W., Takahashi K.** (2003) Determination of the cleavage sites in SulaA, a cell division inhibitor, by the ATP-dependent HslVU protease from *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 553, 351-354
- 37. Özdemir F.İ.** (2003) Purification and characterization of cytoplasmic and proteasome associated cymotrypsin-like proteases from *Thermoplasma volcanium*. PhD thesis, METU.
- 38. Park E., Rho Y.M., Koh O.J., Ahn S.W., Seong I.S., Song J.J., Bang O, Seol J.H., Wang J., Eom S.H., Chung C.H.** (2005) Role of the GYVG pore motif of HslU ATPase in protein unfolding and translocation for degradation by HslV peptidase. *J Biol Chem* 280(24):22892-8
- 39. Priest F.G.** (1993) Systematics and ecology of Bacillus., *Bacillus subtilis* and Other Gram-positive Bacteria. *American Society for Microbiology*, 27:3–16
- 40. Rahman R., Noor Zaliha A., Selangor S., Abu Bakar B., Mahiran C., Selangor T.** (2006). Lipase from *Geobacillus* sp. Strain T1. *Crystal Growth & Design*, 7:406–410
- 41. Ramachandran R., Hartmann C., Song H.K., Huber R., Bochtler M.** (2002) Functional interactions of HslV (ClpQ) with the ATPase HslU (ClpY). *Proc Natl Acad Sci USA*. 99(11):7396-401.
- 42. Rohrwild M., Coux O., Huang H.C., Moerschell R.P., Yoo S.J., Seol J.H., Chung C.H., Goldberg A.L.** (1996) HslV-HslU: A novel ATP-dependent

protease complex in *Escherichia coli* related to the eukaryotic proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(12): 5808–5813

43. **Ruiz-Gonzalez M.X., Marin I.** (2006) Proteasome-related HslU and HslV genes typical of eubacteria are widespread in eukaryotes. *J Mol Evol* 63(4):504-12
44. **Schmidt, P.H., Dransfield, D.T., Claudio, J.O., Hawley, R.G., Trotter, K. W., Milgram, S. L. and Goldenring, J.R.** (1999). AKAP350: a multiply spliced A-kinase anchoring protein associated with centrosomes. *J Biol Chem*, 274, 3055-3066
45. **Schumann W.** (1999). FtsH a single-chain charonin? *FEMS Microbiol Rev*, 23(1):1-11
46. **Seemüller E., Lupas A., Stock D., Löwe J., Huber R. and Baumeister W.** (1995) Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science*, 268, 579–582
47. **Seemüller E., Lupas A. and Baumeister W.** (1996) Autocatalytic processing of the 20S proteasome. *Nature*, 382, 468–470
48. **Seong I.S., Kang M.S, Choi M.K., Lee J.W., Koh O.J., Wang J., Eom S.H., Chung C.H.** (2002). The C-terminal tails of HslU ATPase act as a molecular switch for activation of HslV peptidase. *J Biol Chem* 277(29):25976-82
49. **Song H. K., Hartmann C., Ramachandran R., Bochtler M., Behrendt R., Moroder L., and Huber R.** (2000). Mutational studies on HslU and its docking mode with HslV. *PNAS* vol. 97:14103-14108
50. **Sousa M.C., Kessler B.M., Overkleeft H.S., McKay D.B.** (2002) Crystal structure of HslUV complexed with a vinyl sulfone inhibitor: corroboration of a proposed mechanism of allosteric activation of HslV by HslU. *J Mol Biol* 318 (3):779-85

51. **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

52. **Tomoyasu T., Ogura T.** (1993) 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

53. **Tomoyasu T., Gamer J., Bukau B., Kanemori M., Mori H.** (1995) *Escherichia coli* FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat shock transcription factor σ^{32} . *EMBO J.* 14:2551-60

54. **Usón S., Tomas R., Perez D.,** (2006) “Method of Detecting Antibiotic Residues and other Microbial Compounds.” *World Intellectual Property Organization.* (058936)

55. **Wang D. A., Hartling J. A., Flanagan J. M.,** (1997) The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. *Cell* 91:447-56

56. **Wang J., Song J. J., Seong I. S., Franklin M. C., Kamtekar S., Eom S. H., and Chung C. H.** (2001) Nucleotide-dependent conformational changes in a protease-associated ATPase HslU structure, *Elsevier Science* Vol. 9, 1107–1116

57. **Valas R. E., Bourne P. E.** (2008) Rethinking proteasome evolution: two novel bacterial proteasomes. *J Mol Evol* 66:494–504

58. **Vandeputte-Rutten L., Gros P.** (2002) Novel proteases: common themes and surprising features. *Current Opinion in Structural Biology*, 12:704–708

59. **Wickner S., Michael R., Maurizi, Gottesman S.** (1999) Posttranslational quality control: folding, refolding and degrading proteins. *Science* 286, 1888-1893.
60. **Yoo S. J., Seol J. H., Shin D. H., Rohrwild M., Kang M., Tanaka K., Goldberg A. L., and Chung C. H.** (1996) Purification and characterization of the heat shock proteins HslV and HslU that form a new ATP-dependent protease in *Escherichia col.* *The Journal of Biological Chemistry.* 271 (24): 14035–14040.
61. **Yoo S. J., Shim Y., Seong I. S., Seol J. H., Kang M., Chung C. H.** (1997) Mutagenesis of two N-terminal Thr and Ser residues in HslV, the proteolytic component of the ATP-dependent HslVU protease *FEBS Letters* 412 , 57-60
62. **Zwickl P., Grziwa A., Pühler G., Dahlmann B., Lottspeich F., Baumeister W.** 1992. Primary structure of the *Thermoplasma* proteasome and its implications for the structure, function, and evolution of the multicatalytic proteinase. *Biochemistry*, 31(4):964-72

ÖZGEÇMİŞ

Gonca Altın, 22 Kasım 1984'te Eskişehir'de doğdu. 2002 yılında İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 2006 yılında tamamladıktan sonra aynı yıl, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.