

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

ATP-BAĞIMLI *FTSH* GENİNİN *GEOBACILLUS*
***KAUSTOPHILUS*'DAN KLONLANMASI VE EKSPRESYONU**

AHMET TÜLEK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE

2014

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

ATP-BAĞIMLI *FTSH* GENİNİN
***GEOBACILLUS KAUSTOPHILUS*'DAN**
KLONLANMASI VE EKSPRESYONU

AHMET TÜLEK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. F. İNCİ ÖZDEMİR

GEBZE
2014



**GEBZE YÜKSEK
TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 27/01/2014 tarih ve 2014/06 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 19/02/2014 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Ahmet TÜLEK'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

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

ÜYE

: Doç. Dr. Melek ÖZKAN

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Can Murathan ERİŞTİ

ONAY

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerde protein yıkımı büyük oranda ATP-bağımlı proteazlar tarafından gerçekleştirilmektedir. FtsH proteaz, bütün canlı organizmalarda bulunan bir ATP-bağımlı proteaz olup birçok hücre içi kontrol noktasında önemli rol oynamaktadır. Bununla beraber FtsH proteazın proteolitik aktivitesi ve çeşitli substratları nasıl tanıyabildiği hala tam olarak açık değildir. Farklı organizmalardan yeni FtsH proteazların izole edilmesi ve bu enzimlerin biyokimyasal ve genetik nitelendirilmelerinin yapılması, hem bu özgün proteaz sisteminin hücre içinde oynadığı biyolojik rolün, hem de protein hidroliz mekanizmasının anlaşılmasına yarar sağlayacaktır.

Bu çalışmada, *G. kaustophilus*'a ait transmembran segmenti içermeyen yaklaşık 1530 bç uzunluğunda *ftsH* geni pET-14b vektörüne aktarılmıştır. Gk-FtsH proteaz, N-terminal bölgesinde 6xHis kuyruk ile birlikte *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinde eksprese edilmeye çalışılmış ancak SDS-PAGE'de belirgin ekspresyon gözlemlenmemiştir. *Gk-ftsH* geninin transkripsiyonel olarak ifade edildiğini göstermek amacıyla total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılmış ve vektöre aktarımı yapılan genin transkribe olduğu gösterilmiştir. *E. coli* BL21 (DE3) hücresinde transkribe olan ancak protein ekspresyonu gözlenmeyen bu genin hücrede inklüzyon yapısı oluşturacağı düşüncesiyle inklüzyon yapılarından protein elde edilmiştir. Ayrıca olası 6xHis-FtsH füzyon proteini için Ni^{2+} -NTA IMAC yöntemi kullanılarak saflaştırılma işlemi yapılmıştır. Her iki çalışmada elde edilen örnekler Western Blot ile analiz edilmiş ve His-tag antikoru ile bağlanan ~70 kDa moleküler büyüklüğünde olası bant gözlemlenmiştir. Ancak elde edilen Gk-FtsH proteaz flourojenik bir substratı olan N-Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-AMC ve bir protein substrat olan α -kazein ile enzimatik aktivite göstermemiştir.

Anahtar kelimeler: FtsH, proteaz, *Geobacillus kaustophilus*, ATP-bağımlı proteaz, termofilik bakteri.

SUMMARY

In both eukaryotic and prokaryotic cells, protein degradation is largely conducted by ATP-dependent proteases. FtsH protease, an ATP-dependent protease found in all living organisms and plays a crucial role in many intracellular control points. However, the proteolytic activity of FtsH protease and how it can recognize various substrates are still not exactly clear. The isolation of new FtsH proteases from different organisms and biochemically and genetically classification of these enzymes would help understanding the biologic role of this peculiar protease system in cell and the protein hydrolysis mechanism.

In this study, ~1530 bp *ftsH* gene which do not include transmembran segment of *G. kaustophilus* was transferred into pET-14b vector. Gk-FtsH protease with 6xHis-tag at its N-terminus was tried to be expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells however no protein band was observed by SDS-PAGE analysis. In order to show the transcriptional expression of *Gk-ftsH* gene, total RNA isolation and cDNA synthesis were done and the transformed gene was shown to be transcribed. Since *Gk-ftsH* gene was transcribed but protein expression was not observed in *E. coli* BL21 (DE3) cells, it indicated an inclusion structure. Therefore we obtained protein from inclusion bodies. We also purified the fusion protein using Ni²⁺-NTA IMAC method. The samples obtained from both studies were analyzed with Western Blot and a ~70 kDa molecular weight contingent band was detected against His-tag antibody. However, no enzymatic activity was detected with flourogenic substrate N-Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-AMC and protein substrate α -casein.

Key words: FtsH, protease, *Geobacillus kaustophilus*, ATP-dependent protease, thermophilic bacteria.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, yardım ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. F. İnci ÖZDEMİR'e;

Yüksek lisans eğitimim sırasında laboratuvar imkanlarından yararlandığım ve laboratuvar çalışmalarım sırasında desteğini esirgememiş olan değerli hocam Doç. Dr. Sedef Tunca Gedik'e;

Yardımlarını ve dostluklarını hiçbir zaman esirgemeyen çalışma arkadaşlarım; Dr. Mine GÜL ŞEKER, Dr. Güler TOPRAK, Dr. Tuğrul DORUK, Uzman Hüseyin BALCI, Arş. Gör. Merve TUZLAKOĞLU ÖZTÜRK, Arş. Gör. Zeynep GİRGİN ERSOY, Arş. Gör. Onur ÇALIŞKANER, Arş. Gör. Görkem ODABAŞ, Bahadır AYDIN, Enis GÜNEY ve Şerif YILMAZ'a;

Son olarak, maddi ve manevi hiçbir desteklerini esirgemeyen ve her türlü kararımda yanımda olan mesai arkadaşlarım Sabri ÖZÇAKIR ve Caner DÜZELTEN'e tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLOLAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Çalışmasının Amacı	2
1.2. AAA ⁺ Protein Ailesi	2
1.3. ATP-Bağımlı Proteazlar	4
2. ATP-BAĞIMLI FTSH PROTEAZ	6
2.1. FtsH Proteazın Yapısı	7
2.2. FtsH Proteazın Fizyolojik Fonksiyonları ve Substratları	11
2.2.1. FtsH Proteazın Sitoplazmik Substratları	11
2.2.1.1. Faj λ proteinleri	12
2.2.1.2. SoxS ve MarA	14
2.2.1.3. Flavodoksin (Fld)	15
2.2.1.4. FtsZ	15
2.2.1.5. SsrA-işaretli Substratlar	16
2.2.1.6. GlnK Proteinini	16
2.2.1.7. Sporulasyon Faktörü SpoVM	17
2.2.1.8. LpxC	17
2.2.1.9. RpoH (σ^{32})	18
2.2.2. Membran Proteinlerin Kalite Kontrolü	21
2.3. <i>Geobacillus kaustophilus</i> Hücresel Yapı ve Metabolizması	23
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	25
3.1. Gereçler	25
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar	25

3.1.2. Kullanılan Enzimler ve Tamponları	25
3.1.3. Kullanılan Kitler	26
3.1.4. Kullanılan DNA ve Protein Moleküler Belirteçleri	26
3.1.5. Kullanılan Peptit ve İnhibitörler	27
3.1.6. Kullanılan Nükleotitler	27
3.1.7. Kullanılan Antikorlar	27
3.1.8. Kullanılan Membranlar	28
3.1.9. Kullanılan Plazmit Vektörler	28
3.1.10. Kullanılan Saflaştırma Materyali	30
3.1.11. Kullanılan Bakteri Soyları	30
3.1.12. Kullanılan Besiyeri ve Çözeltiler	31
3.1.13. Kullanılan Cihazlar	37
3.2. Yöntemler	38
3.2.1. <i>Geobacillus kaustaphilus</i> 'dan Kromozomal DNA İzolasyonu	38
3.2.2. <i>Geobacillus kaustaphilus ftsH</i> Geninin Restriksiyon Enzim Haritasının Çıkartılması	38
3.2.3. <i>Geobacillus kaustaphilus ftsH</i> Geninin PCR ile Çoğaltılması	39
3.2.4. PCR Ürününün Agaroza Jelden Saflaştırılması	41
3.2.5. PCR ile Çoğaltılan <i>G. kaustaphilus ftsH</i> Geninin Klonlanması	41
3.2.5.1. PCR Ürününün ve Klonlama Vektörünün Ligasyona Hazırlanması	41
3.2.5.2. Ligasyon Protokolü	42
3.2.5.3. Transformasyon	43
3.2.5.4. Rekombinant Kolonilerden Plazmit İzolasyonu	44
3.2.6. <i>ftsH</i> Geninin pET-14b/ <i>ftsH</i> Plazmitindeki Varlığının İspatlanması	44
3.2.6.1. Rekombinant pET-14b/ <i>ftsH</i> Plazmitinin Restriksiyon Endonükleaz ile Kesimi	44
3.2.6.2. <i>ftsH</i> Geninin Rekombinant pET-14b/ <i>ftsH</i> plazmitinden PCR ile Çoğaltılması	45
3.2.6.3. Klonlanan <i>ftsH</i> Geninin Nükleotit Dizininin Belirlenmesi	45
3.2.7. pET-14b/ <i>ftsH</i> Rekombinant Plazmitin <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Hücrelerine Transforme Edilmesi	46
3.2.8. FtsH Proteaz Enziminin Ekspresyonu ve Saflaştırılması	46

3.2.9. mRNA analizi	47
3.2.10. İnklüzyon Yapılarının İzolasyonu ve Protein Eldesi	48
3.2.11. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi	49
3.2.12. Western Blot Analizi	50
3.2.13. Gk-FtsH Peptidaz Aktivitesinin Tayini	50
4. BULGULAR	52
4.1. <i>G. kaustophilus ftsH</i> Geninin PCR ile Çoğaltılması ve PCR Fragmanının Klonlanması	52
4.1.1. <i>ftsH</i> Geninin <i>G. kaustophilus</i> 'dan PCR ile Çoğaltılması	52
4.1.2. PCR Ürününün ve Vektörün Ligasyona Hazırlanması	52
4.1.3. <i>G.kaustophilus ftsH</i> Geninin pET-14b Vektörüne Ligasyonu ve Transformasyonu	54
4.1.4. <i>E. coli</i> 'ye Aktarılan pET-14b/ <i>ftsH</i> Rekombinantının Doğruluğunun Belirlenmesi	54
4.1.4.1. Enzim Kesimi	54
4.1.4.2. pET-14b/ <i>ftsH</i> Rekombinant Plazmitinden <i>ftsH</i> geninin PCR Reaksiyonu ile Çoğaltılması	55
4.1.4.3. Klonlanan <i>ftsH</i> Geninin Nükleotit Dizininin Belirlenmesi	56
4.1.5. Rekombinant pET-14b/ <i>ftsH</i> Plazmitinin Ekspresyon Hücrelerine Transformasyonu	59
4.1.6. FtsH Proteazın <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Hücrelerinde Ekspresyonu ve Ni-NTA Kolon Kullanılarak Saflaştırılması	60
4.1.7. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	61
4.1.8. Western Blot Analizi	62
4.1.9. Gk-FtsH Peptidaz Aktivitesi	63
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	65
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	81

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Açıklamalar</u>
<u>Kısaltmalar</u>	
~	: Yaklaşık
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
σ	: Sigma
σ^{32}	: RNA polimeraz faktör sigma 32
μ	: Mikron
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
pmol	: pikomol
Mg^{2+}	: Magnezyum katyonu
MgCl_2	: Magnezyum klorür
MgSO_4	: Magnezyum sülfat
Zn^{2+}	: Çinko
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: nanogram
nm	: nanometre
AAA^+	: ATPase associated with various cellular activities
ADP	: Adenozin difosfat
<i>adh</i>	: Alkol dehidrojenaz geni
<i>Ala</i>	: Alanin
<i>Amp</i>	: Ampisilin
<i>APS</i>	: Amonyum persülfat
<i>Arg</i>	: Arjinin
<i>Asp</i>	: Aspartat
<i>ATP</i>	: Adenozin trifosfat
<i>BamHI</i>	: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H endonükleaz
<i>Bç</i>	: Baz çifti

ClpA	: Kazeinolitik Proteaz A
ClpP	: Kazeinolitik Proteaz P
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DTT	: Ditiyotreitöl
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: N,N,N',N',-Tetrametiletildienamin
EtBr	: Etidyum Bromür
FtsH	: Filamentation temperature sensitive H protein
Gk	: <i>Geobacillus kaustophilus</i>
Glt	: Glutaril
Gly	: Glisin
HCl	: Hidroklorik asit
HflB	: High frequency of lysogenization B
His	: Histidin
HslU	: Isı şoku bölgesi U
HslV	: Isı şoku bölgesi V
IPTG	: İzopropil-beta-D-tiyo-galaktopiranozid
K	: Potasyum
Kan	: Kanamisin
kDa	: Kilodalton
L	: Litre
LB	: Luria Broth
Lon	: Proteaz La
Lys	: Lizin
M	: Molar
MarA	: Multipler antibiotics rezistance A
MNA	: Metoksi-β-naftilamit
NaCl	: Sodyum Klorür
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
<i>NdeI</i>	: <i>Neisseria denitrificans I</i> endonükleaz
NaOH	: Sodyum Hidroksit
Ni	: Nikel
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
Phe	: Fenilalanin

PMSF	: Fenilmetansülfanilflorit
RecA	: Rekombinaz A
Rpm	: Dakika başı dönüş
Ser	: Serin
SDS	: Sodyum dodesilsülfat salt
SOB	: Süperoptimal Brot
SOC	: Süperoptimal Brot (Katabolik Baskılama)
SoxS	: Superoxide Stress
SoxRS	: Superoxide Response Stress
SRH	: Second Region of Homology
SSD	: Substat ayırıcı ve algılayıcı domain
Suc	: Süksinil
TCA	: Triklor asetik asit
TEMED	: Tetrametiletilendiamin
Thr	: Treonin
TSS	: Toplam katı solüsyonu
UDP-GlcN	: Uridine diphosphate-N-asetilglukozamine
U	: Unit
V	: Volt

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
1.1: AAA ⁺ proteazların çeşitli hücrese fonksiyonları.	4
2.1: FtsH proteaz enziminin fonksiyonel ve lokalizasyon bölgeleri.	8
2.2: FtsH proteaz enziminin yapısı.	9
2.3: Mitokondrial AAA proteaz.	10
2.4: FtsH proteaz enziminin fonksiyonlarının şematik gösterimi.	11
2.5: FtsH proteazın litik-lizogenik yola karar vermedeki fonksiyonu.	13
2.6: FtsH proteaz enziminin NH ₄ ⁺ ün hücreye alımındaki kontrol mekanizması.	17
2.7: Gram (-) bakterilerde Lipit A biyosentezi yolu ve FtsH proteaz enziminin metabolik yoldaki düzenleyici mekanizması.	18
2.8: σ ³² 'nin proteolitik yolunun şematik gösterimi.	19
2.9: Isı şokuna cevabın kontrolünde FtsH proteazın görevi.	20
2.10: FtsH proteaz ve etkileşime girdiği proteinlerin topolojisi.	22
2.11: <i>Geobacillus kaustophilus</i> 'un <i>Geobacillus</i> cinsinin diğer türlere göre filogenetik yeri.	24
3.1: Moleküler DNA belirteçleri.	26
3.2: pET-14b ekspresyon vektörünün haritası ve açık okuma çerçevesi.	27
3.3: pET-14b vektörünün klonlama ve ekspresyon bölgeleri.	29
3.4: <i>ftsH</i> geninin restriksiyon enzim haritası.	39
3.5: FtsH Proteazın transmembran ve sitoplazmik bölgeleri.	39
4.1: PCR ile çoğaltılan <i>ftsH</i> geninin % 1'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.	52
4.2: <i>NdeI</i> ve <i>BamHI-HF</i> restriksiyon enzimleri ile çift kesimi yapılan <i>ftsH</i> geninin saflaştırma sonrası görüntüsü.	53
4.3: pET-14b/ <i>adh</i> ekspresyon vektörünün <i>NdeI</i> ve <i>BamHI-HF</i> restriksiyon enzimleriyle kesimleri sonucu oluşan DNA fragmanının % 1'lik agaroz jelde görüntüsü.	54
4.4: Miniprep yöntemi ile izole edilen vektörlerin <i>NdeI</i> ve <i>BamHI-HF</i> enzimleri ile çift kesimi sonucu oluşan DNA fragmanının % 1'lik agaroz jelde görüntüsü.	55

4.5:	pET-14b/ <i>ftsH</i> ve pET-14b/ <i>adh</i> rekombinant plazmitlerinin kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyon ürünlerinin % 1'lik agaroz jeldeki görüntüleri.	56
4.6:	<i>Gk-ftsH</i> DSM 7263T ve <i>Gk-ftsH</i> HTA 426 nükleotid dizilerinin karşılaştırılması.	57
4.7:	<i>NdeI</i> ve <i>BamHI-HF</i> restriksiyon enzimleri ile kesilen pET14b- <i>ftsH</i> vektörünün % 1'lik agaroz jeldeki görüntüsü.	59
4.8:	Rekombinant ve kontrol BL21 (DE3) hücrelerinin <i>ftsH</i> ekspresyonu.	60
4.9:	6xHis-FtsH proteinlerinin saflaştırılması.	61
4.10:	cDNA sentezi sonrasında yapılan PCR görüntüsü.	62
4.11:	Rekombinat ve rekombinat olmayan BL21 (DE3) hücrelerinden izole edilen inklüzyon yapılarının Western Blot yöntemi sonucu edilen görüntüsü.	63

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
1.1: ATP-bağımlı proteazlar, bulunduğı organizma, konumu ve üretildiğı gen sayısı.	5
2.1: FtsH proteazın sitoplazmik substratları.	12
2.2: FtsH proteazın membran substratları.	21
3.1: PCR için tasarlanan primerler.	40
3.2: <i>Gk-ftsH</i> PCR fragmanı için hazırlanan restriksiyon endonükleaz reaksiyonu.	41
3.3: pET14b/ <i>adh</i> vektörü için hazırlanan restriksiyon endonükleaz.	42
3.4: Rekombinant plazmitler için hazırlanan PCR reaksiyonu.	45
3.5: Total RNA'dan cDNA sentezi için hazırlanan PCR reaksiyonu	48

1. GİRİŞ

Bakterilerin yaşam alanları oldukça farklılık göstermekte olup ekstrem sıcaklık, pH ve yüksek ozmolarite gibi ortam şartlarında yaşamalarına olanak sağlayacak mekanizmalar ile evrimleşmişlerdir. Ekstremofil olmayan bakteri türleri de belli ölçüde bu zorlu ortam koşullarına dayanabilmektedir. Bu sebeple her 2 grup bakteri de ani çevresel değişikliklere hızlı cevap vermek zorundadır. Bakterilerin gösterdiği stres cevapları farklılık göstermekte olup mekanizmaları buna göre evrimleşmiştir. Habitattaki değişiklikler, besin kıtlığı ve kullanılabilirliği ya da potansiyel konak ile etkileşim adaptasyonun sağlanmasında dolayısıyla hücrel proteom üzerine oldukça etkili olmaktadır. Hücrelerde önemli metabolik kontrol basamaklarında görevli proteinlerin seviyesi o proteinlerin yıkımı ile düzenlenmekte, böylece hücrelerin değişen çevre koşullarına ve metabolik ihtiyaçlara karşı hızlı cevap verebilmeleri sağlanmaktadır. Hücreye özgü bu gereksinimler için gen ekspresyonu, proteom düzenlemesi için farklı seviyelerde düzenlenmektedir. Bu durum alternatif sigma faktörlerinin ve spesifik transkripsiyonel regülatörlerin kullanımı sonucu transkripsiyonun adaptasyonu ile sağlanmaktadır. Ayrıca translasyonel mRNA'ların stabilitesi ya da yapısı ile de düzenlenmektedir. Proteolizin bu şekilde düzenlenmesi, protein miktarındaki doğrudan kontrol açısından oldukça önemlidir.

Protein kalite kontrolünde, bazı durumlar altında, tolere edilebilir ya da edilemez toksik proteinler hızlı bir biçimde parçalanmaktadır. Bunun yanında regülatör proteinler ve anahtar enzimler, acil ihtiyaç durumuna göre stabilize edilebilmektedir. Bu nedenle proteoliz, eksternal etkilere karşı verilen hızlı cevapta regülatör döngünün kontrolünün değişken olarak ayarlanmasıdır. Ayrıca proteoliz ile amino asitlerin yeniden döngüye girmesinin sağlanması ve bazı bozuk, fonksiyonel olmayan enzimlerin parçalanmasının sağlanması ile hücrel protein kalite kontrolü sağlanmaktadır. Hayati önem taşıyan proteoliz, proteaz adı verilen proteinler ile gerçekleşmekte olup bu enzimler peptid bağlarının yıkımını katalizleyerek substrat proteinleri hidrolize etmektedirler.

Bakterilerde enerji bağımlı proteoliz AAA^+ proteazlar bağımlı olup ATP-bağımlı bu proteazlar yıkım sürecinde protein katlarının açılmasını sağlayarak, açılan polipeptidi proteolitik alana aktarmaktadır. Enerji bağımlı bu proteaz enzimleri

biyolojik olaylarda kimyasal enerjinin dönüşümünde oldukça önemlidir. Gram (-) model organizma olan *E.coli*'de ClpAP, ClpXP, HslUV, Lon ve FtsH olmak üzere 5 AAA⁺ proteaz tanımlanmıştır. Bu proteazlardan ClpAP, ClpXP ve HslUV'de proteolitik bölge ve ATPaz bölgesi ayrı genlerde kodlanırken Lon ve FtsH proteaz aynı gen üzerinde kodlanmıştır. Bu AAA⁺ proteazlar hücrede birçok önemli fonksiyonlarda görev alırken sadece FtsH proteaz *E.coli* canlılığı için gerekli olup membrana bağlı olmasıyla diğerlerinden ayrılmaktadır [Ogura et al., 1999], [Tomoyasu et al., 1995]. Birçok organizmada korunmuş bu proteaz hücrede protein kalite kontrolü yanında global bir düzenleyici olarak görev yapmaktadır.

1.1. Tez Çalışmasının Amacı

Prokaryotlarda, arkealarda ve ökaryotlarda olmak üzere birçok farklı organizmada keşfedilmiş olan FtsH proteazların yapıları ve çalışma prensipleri devamlı olarak aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Özellikle FtsH proteazların hem hücre içindeki hem de hücre membranındaki proteinlerin kalite kontrol mekanizmasının dışında, diğer kontrol döngülerinde de oynadığı önemli rollerin keşfedilmesi ile birlikte bu ailenin üzerinde yapılan bilimsel çalışmalar daha da artmıştır. Farklı organizmalardan yeni FtsH proteazların izolasyonu, biyokimyasal ve genetik nitelendirilmesinden elde edilecek veriler, bu özgün proteaz sisteminin hücre içinde oynadığı biyolojik rolü ve çalışma prensiplerini anlamakta yarar sağlayacaktır. Bu tez çalışmasında *Geobacillus kaustophilus* DSM 7263^T FtsH proteaz enzimini kodlayan transmembran segmenti içermeyen yaklaşık 1530 bç uzunluğundaki *ftsH* geninin ilk defa *E. coli* bakterisine klonlanması planlanmış ve yapılan çalışmalarda *G. kaustophilus ftsH* geninin pET-14b vektörüne aktarılması, *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinde eksprese edilmesi ve oluşan 6xHis-FtsH füzyon proteininin saflaştırılması hedeflenmiştir.

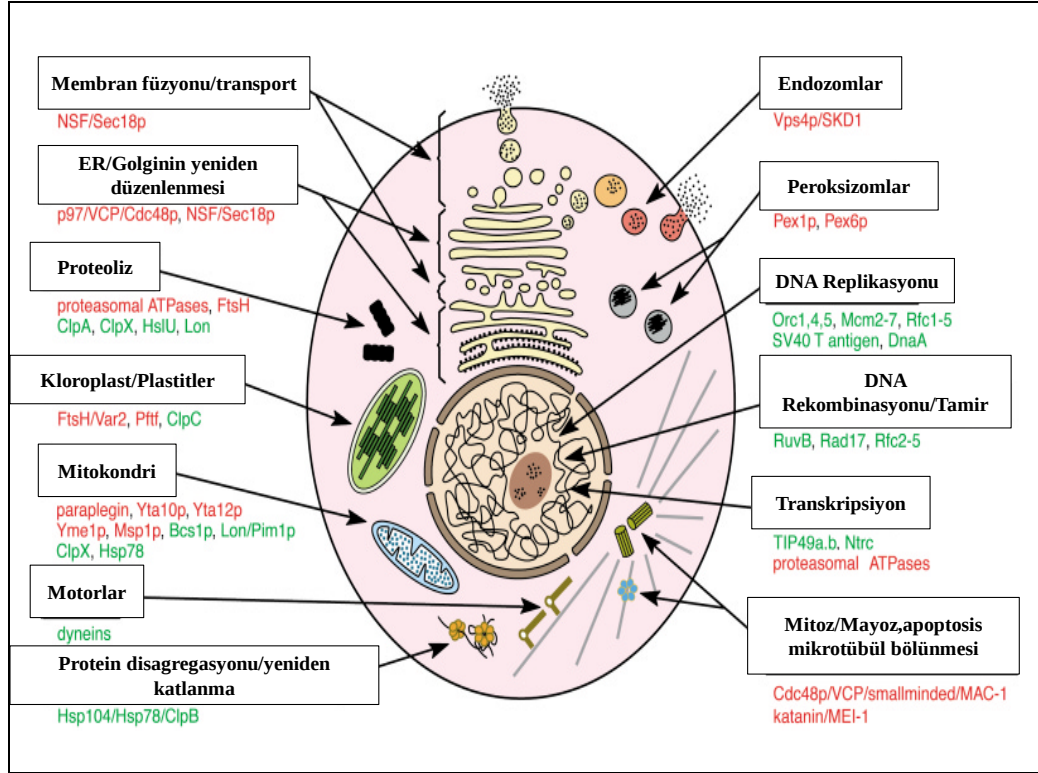
1.2. AAA⁺ Protein Ailesi

AAA⁺ süper ailesi homolog ATPaz modülü içeren, yüzük şeklinde oligomerlerden meydana gelen ATPazlar (NTPaz) olup tüm organizmalarda bulunmaktadır [Confalonieri and Duguet 1995].

AAA⁺ süper ailesi üzerinde yapılan dizileme ve yapısal analiz çalışmaları sonucu bu ailenin çok eski kökenli ve korunmuş olduğu, yapılan filogenetik çalışmalar ise bu süper ailenin çok sayıda farklı küçük aileye ayrıldığını göstermektedir. Bütün AAA⁺ proteazlar genel olarak benzer yapısal özelliklere sahiptirler. Yapısal olarak her biri birbiriyle bitişik 6 veya 7 alt-birimden oluşan, 4 ya da 6 halkanın bir araya gelmesiyle oluşturulan içi boş fiçı benzeri yapılara sahiptirler. Yapılarında bulunan proteolitik aktif bölgeler, hatalı yıkımı engellemek için proteazın silindirin iç kısmında yer almaktadır. Bu proteazlarda, substratlar bu proteolitik silindirin tek ya da her iki ucuna bağlanmaktadır. Bu bağlanmanın ardından substrat katları açılır ve yıkım için substrat proteaz çemberinin iç kısmına katları açılmış lineer polipeptit zinciri şeklinde transfer edilir [Tomoyasu et al., 2001]. Bu protein ailesinin bir üyesi olan AAA protein ailesi (ATPases associated with various cellular activities; çeşitli hücrel aktiviteler ile ilişkili ATPaz'lar), 200-250 amino asitlik ATPaz domaini ve Walker B motifinin C-terminalinde yer alan SRH motifi ile de tanımlanmaktadır [Confalonieri and Duguet, 1995].

Bu süper ailede bulunan proteinler; membran füzyonu, transportu, proteinlerin birbirinden ayrıştırılması, transkripsiyonel regülasyon, proteolizis, DNA replikasyonu, DNA rekombinasyonu ve protein kalite kontrolünü içeren geniş hücrel faaliyetlerde görev almaktadırlar (Şekil 1.1), [Neuwald et al., 1999].

Bu aileler birçok hücrel yolağın yürütülmesinde önemli ve etkin rol oynamaktadır. Bu yolakların en önemlilerinden biri de protein döngüsüdür ve bu ailenin bir üyesi olan ATP-bağımlı proteazlar tarafından yönetilmektedir.



Şekil 1.1: AAA⁺ proteazların çeşitli hücresel fonksiyonları.

1.3. ATP-Bağımlı Proteazlar

ATP-bağımlı proteazlar hücrede birçok farklı aktivite ile ilişkili olan “AAA Protein Ailesi” grubundan olup, farklı fonksiyonlar gösteren NTPaz süper familyası olarak da ifade edilmektedirler. Bu proteazların yapılarında korunmuş nükleotit bağlanma modülü ve katalitik modül ile karakterize edilen AAA modülü bulunmaktadır. Prokaryotlarda bulunan Lon, HslVU (ClpYQ), FtsH, ClpAP/ClpXP, gibi ATP-bağımlı proteazlar hem arkealar hem de ökaryotlar arasında oldukça yaygın olup hücre sitoplazması, mitokondri ve kloroplastlarda bulunmaktadır [Goldberg, 1990]. Bu proteazlar da kendi içerisinde 2 gruba ayrılabilir. ClpAP, ClpXP ve HslUV ilk grubu oluştururken bu proteazlardaki AAA bölgesi ve proteolitik bölge ayrı polipeptit zincirleri olarak kodlanmaktadır. ClpX, ClpA ve HslU, AAA⁺ modülünü temsil ederken, ClpP ve HslV proteaz alt ünitesini temsil etmektedir. 2. Grubu ise Lon ve FtsH proteaz oluşturmaktadır. Bu 2 proteazda AAA modülü ve proteolitik bölge aynı polipeptit zincirinden kodlanmaktadır (Tablo 1.1), [Führer et al., 2005]. Her 2 grupta da AAA modülü doğru katlanmamış proteinlerin doğru bir şekilde katlanması için şaperon olarak görev yapmaktadır. AAA modülü,

proteolitik bölge ile heksamerik ya da heptamerik yüzük şeklinde silindir bir yapı oluşturmaktadır. [Gottesman, 2003], [Sauer et al., 2004].

Tablo 1.1: ATP-bağımlı proteazlar, bulunduğu organizma, konumu ve üretildiği gen sayısı.

ATP Bağımlı Proteazlar	Organizma/Konumu	Üretildiği gen sayısı
Proteozom	Ökaryotik sitoplazma ve nükleus	>32
Proteozom	Arkebakteriyel sitoplazma	Tanımlanmamış
HslUV	Bakteriyel sitoplazma	2
ClpAP	Bakteriyel sitoplazma	2
ClpXP	Bakteriyel sitoplazma	2
ClpCP	Bakteriyel sitoplazma, kloroplast stroma	2
Lon (La)	Bakteriyel sitoplazma	1
Pim1 (Lon)	Mitokondrial matriks	1
FtsH	Bakteriyel iç membran	1
i-AAA (Yme1)	Mitokondriyal iç membran	1
m-AAA (Yta10/Yta12)	Mitokondriyal iç membran	2

ATP-bağımlı proteazlar benzer (homomerik) ya da farklı (heteromerik) alt birimlerden meydana gelebilmektedir. Bu proteazlarda ATPaz aktivitesi ile konformasyonel değişiklikler oluşmakta ve protein yıkımı tekrarlanan ATP bağlanması ve hidrolizleri ile gerçekleşmektedir. Tekrarlanan ATP hidroliz döngüleri ile oluşan konformasyonel değişiklikler; protein substratlarının katlarının açılmasını, substratların proteolitik alana nakledilmesini ve proteolitik bölgenin aktifleşmesini sağlamaktadır. Yapılarındaki yüzük şeklindeki oligomerik kompleksler hareket için esnek bir yapı oluşturmaktadır. Bu yapı ile katlanmamış proteinler, yanlış katlanmış proteinler, DNA-protein komplekslerinin gevşemesi, paketlenmesi gibi değişim durumları makromoleküler yapı ya da moleküler yıkımın oluşmasını sağlamaktadır. Sahip oldukları AAA⁺ modülündeki modifikasyonlar ve yapısal motiflerle, farklı hücresel süreçlerde görev almaktadırlar [Snider and Houry 2008]. Bunlar içerisinde katlanmamış proteinlerin ayırımı, yıkımı, peroksizom biyosentezi, bakteriyoklorofil biyosentezi, DNA replikasyonu, rekombinasyonu ve tamiri yer almaktadır [Lyer et al., 2004], [Erzberger et al., 2006].

2. ATP-BAĞIMLI FTSH PROTEAZ

FtsH proteaz, membrana bağlı ATP-bağımlı bir Zn^{2+} -metalloprotease'dir [Tomoyasu et al., 1995]. İlk olarak *E. coli*'de tanımlanmıştır [Ogura et al., 1991], [Tomoyasu et al., 1993]. Bu proteazı kodlayan *ftsH* geni farklı özellikleri 4 farklı grup tarafından keşfedilmiştir. İlk olarak 1974 yılında Belford ve Wulff tarafından bakteriyofaj λ 'nın *E. coli*'de litik-lizogenik döngüye karar vermesinde bulunmuş olup bu geni *hflB* olarak ifade etmişlerdir. Santos ve arkadaşları ise 1975 yılında hücre bölünmesinde görevli genlerle ilgilenmiş ve yaptıkları mutasyon çalışmalarında (sıcaklığa hassas mutantlarda) hücre bölünmesinde görevli geni *ftsH* olarak ifade etmişlerdir. Matsuzawa ve arkadaşları ise 1984'de kolşisine (gut hastalığında kullanılan bir ilaç) karşı toleranslı *E. coli* mutantlarını izole etmişler ve bu kolşisin-tolerantlı mutantları *tolZ* olarak ifade etmişlerdir. Kushner ve çalışma arkadaşları 1998 yılında mRNA stabilitesinde görevli degradasyondan sorumlu *mrsC* genini bulmuşlardır ve bu genin klonlanması ve sekanslanması sonucu genin *ftsH* olduğunu ortaya çıkarmışlardır [Wang et al., 1998]. Sonuçta *ftsH* geni farklı zamanlarda 4 farklı aktivitesi keşfedilen tek bir gen olup, *hflB*, *tolZ* ve *mrsC* olarak da isimlendirilmektedir.

FtsH proteaz birçok bakteride çalışılmış ve *ftsH* geni tanımlanmıştır. *Bacillus subtilis*'de *ftsH* geni 3 farklı bağımsız grup tarafından tanımlanmıştır [Geisler and Schumann, 1993], [Herman et al., 1995], [Nakano et al., 1997]. *Lactococcus lactis*'de *ftsH* geninin keşfi hipoksantin guanin fosforibozil transferaz proteinini kodlayan ve *ftsH* genine komşu olan gen olan *hpt* geninin sekanslanması ve klonlanması esnasında tesadüfen bulunmuştur [Nilsson et al., 1994]. *E.coli*'de yapılan çalışmalarda *ftsH* geni, ilk geni *ftsJ* olan ve hücre bölünmesini etkileyen bisitronik ikinci gen olarak tespit edilmiştir [Ogura et al., 1991].

Helicobacter pylori'de *ftsH* geninin tespiti protein sekresyonu ve membran translokasyonu genel süreçlerine ulaşmak amacıyla klonlanmış ve gen dizisi belirlenmiştir [Ge and Taylor, 1996]. Bunun dışında *ftsH* geninin *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi* ve *Aquifex aeolicus*, *Helicobacter felis* ve daha çok sayıda bakteride dizi analizi ve tanımlaması yapılmıştır [Schumann, 1999].

Çeşitli bakterilerde *ftsH* geni üzerinde yapılan çalışmalarda bu genin mono, bi ya da polisistronik yapıda olabildiği ve bu genin hücre canlılığındaki rolünün türe göre değişebildiği rapor edilmiştir. Örneğin *E. coli*, *Helicobacter pylori*, *Lactococcus lactis* bakterileri için *ftsH* geni hücre canlılığı için gerekli iken *Bacillus subtilis*' de ise gerekli olmadığı tespit edilmiştir [Tomoyasu et al., 1993], [Nilsson et al., 1994], [Ge and Taylor, 1996], [Deuerling et al., 1997].

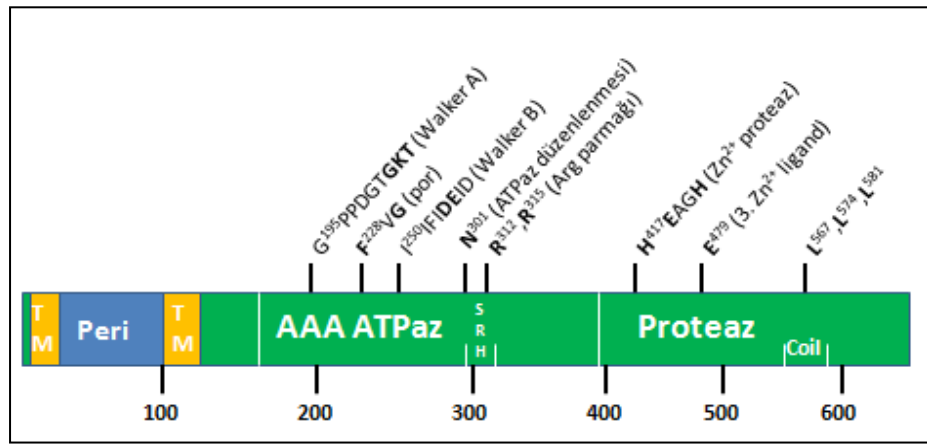
Bitkilerde model organizma olan *Arabidopsis thaliana*'da plastidlerde 12 farklı FtsH proteaz izoformu bulunmuştur. Bunlar hetero ya da homo kompleks yapılar şeklinde ve FtsH 1-12 olarak ifade edilmektedir. Bu proteazlar plastidlerde önemli rol oynamakta birlikte bunlardan bazı FtsH proteaz izoformlarının pleiotropik etkiye neden oldukları tespit edilmiştir [Sakamoto, 2006]. Örneğin FtsH2 ve FtsH5 mutantları tilakoid gelişiminde defektlere yol açarak yaprakların alacalı bir fenotip oluşturmaya neden olmaktadır. Ayrıca bir FtsH proteazın *A. thaliana*'da fotoinhibisyon sonrası hasarlı D1 proteininin yıkımı için gerekli olduğu bulunmuştur [Lindahl et al., 2000]. D1 proteini fotosistem II' nin (PS II) reaksiyon merkezinin bir parçasıdır. *A. thaliana*'da PS II ışık toplama kompleksi (LHC II) FtsH6'nın bir substratı olarak tanımlanmıştır [Zelisko et al., 2005].

FtsH proteazın bazı homologları diğer ökaryotik hücrelerde de bulunmuştur. Maya mitokondrisinde *m*-AAA-proteaz ve *i*-AAA proteaz olmak üzere 2 homoloğu vardır. İnsan paraplegi (felç) maya *i*-AAA ve *m*-AAA proteazlarla homolog olup bu genlerdeki meydana gelen delesyon sonucunda oluşmaktadır. Paraplegin mutasyonları taşıyan hastaların mitokondrisinde solunum defekti gözlemlenmiş ve benzer fenotip *m*-AAA proteaz eksik maya hücrelerinde de gözlemlenmiştir [Casari, De Fusco et al. 1998].

2.1. FtsH Proteazın Yapısı

FtsH proteaz, *E. coli*'de ATP-bağımlı proteazlar arasında membrana bağlı tek proteazdır. Bu proteazın moleküler ağırlığı 70 kDa ve 647 aminoasitten meydana gelmektedir. Yapısal olarak diğer AAA protein ailesi üyeleri gibi yüzük şeklinde homo-hekzamer bir yapıya sahip olup, 2 kısa transmembran segment içeren N-terminal bölge ile AAA⁺ bölgesi ve proteaz bölgesi içeren büyük sitozolik C-terminal bölgeye sahiptir (Şekil 2.1), [Ito and Akiyama, 2005].

E. coli'de FtsH proteazının 71 aminoasitlik rezidüsü uzun ilmek şeklinde periplazmanın içinde yer almaktadır ve bu hekzamerik proteaz monomer uzantısıyla sitoplazma içerisine çıkıntı yapacak şekilde 2 transmembran heliks tarafından iç membrana demirlemiştir. N-terminal bölge, proteinin homo-oligomerizasyonunda rol almakta ve bu bölgenin 7 aminoasitlik kısmı sitoplazma içerisine uzanmaktadır. [Tomoyasu et al., 1993]. Transmembran segmentleri arasında bulunan kısa periplazmik bölge, HflK ve HflC proteinleri ile etkileşiminde önemlidir. Membrana bağlanmış 2 transmembran bölgeyi ise uzun bir C terminal bölgesi izlemektedir [Akiyama et al., 1998].

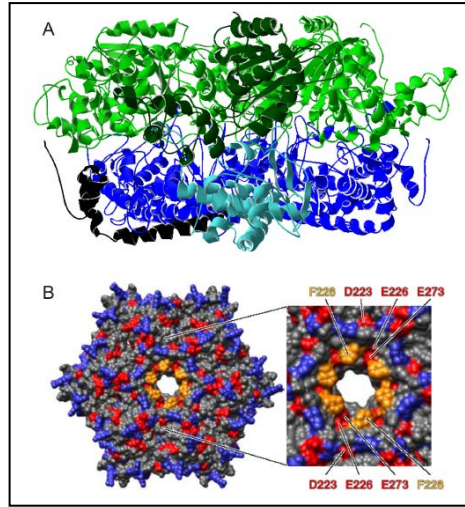


Şekil 2.1: FtsH proteaz enziminin fonksiyonel ve lokalizasyon bölgeleri.

FtsH proteazın sitoplazmaya doğru uzanmış olan uzun C-terminal bölgesi proteaz aktivitesinin gerçekleştiği bölgedir ve yaklaşık 520 rezidülik kısmı sitoplazmada bulunmaktadır [Tomoyasu et al., 1993], [Kihara et al., 1998]. C-terminal bölgesi iki alt bölgeden oluşmaktadır. Bunlar, AAA-ATPaz bölgesi ve çinko bağlanma motifi (HEXXH) içeren proteaz bölgesi olup her iki bölge de proteolitik aktivite için önemlidir [Tomoyasu, et al. 1993], [Akiyama et al., 1996], [Karata et al., 1999]. Sitoplazmada 144-398 rezidü içeren bölgeden oluşan AAA⁺ domaini ATPaz aktivitesinden sorumlu bölgedir. Bu bölge tipik AAA bölgesi özelliği göstermektedir. Bu ATPaz bölgesinde korunmuş Walker A (G¹⁹⁵PPGTGKT²⁰²) ve Walker B (I²⁵⁰IFIDEID²⁵⁷) motiflerinin yanında SRH (299-317 rezidüleri) bölgesi bulunmaktadır. Bu bölgeler AAA⁺ ailesi proteinlerinde AAA alt-sınıfında karakteristik olup ATP bağlanması ve hidrolizi için gereklidir [Neuwald et al., 1999],

[Nijtmans et al., 2000]. SRH motifinin C-terminusdaki arjinin rezidüsü “arjinin parmağı” olarak ifade edilir ve ATP hidrolizi için çok önemlidir [Ogura et al., 2004].

ATPaz bölgesi, FtsH proteazın merkezi por girişini oluşturmaktadır ve çapı yaklaşık 15 Å kadardır. Por 228. pozisyonunda fenilalanin aminoasidi korunmuştur. Bu bölge substrat bağlanmasında oldukça önemlidir (Şekil 2.2), [Okuno et al., 2006a]. Substratların katlarının açılması ve proteolitik bölgeye nakledilmesi için ATP kullanılmaktadır. ATP enerjisi ayrıca translokasyon için de gereklidir [Yamada-Inagawa et al., 2003], [Bieniossek et al., 2006], [Okuno et al., 2006].

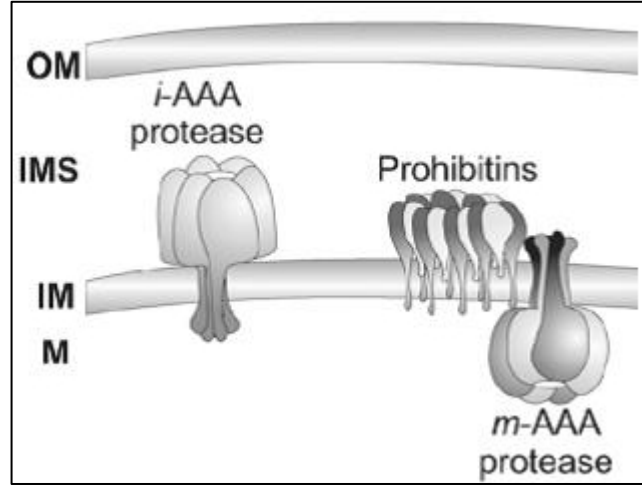


Şekil 2.2: FtsH proteaz enziminin yapısı.

FtsH proteazın C-terminal bölgesinin proteolitik bölgesinde 3 heliks yapısı ve 567., 574., 584. pozisyonunda 3 korunmuş lösin rezidüsü bulunmaktadır. İlk 2 heliks lösin fermuarını oluştururken RpoH ve λ CII proteinlerinin yıkımında oldukça önemlidir [Shotland et al., 2000]. C-terminal bölgede bulunan diğer önemli yapılar ise Zn^{2+} -metaloproteaz aktif bölge motifi (H417EAGH421), Zn^{2+} ligand rezidü E479 [Saikawa et al., 2002] ve coiled-coil (kırılmış kangal) lösin fermuarı yapılarıdır. Bu rezidüer de FtsH proteazın hem ATPaz hem de proteaz aktivitesinde önemli rol oynamaktadır [Tomoyasu et al., 1995].

Maya mitokondrisinde FtsH proteazın *m*-AAA-proteaz ve *i*-AAA proteaz olmak üzere 2 homologu vardır (Şekil 2.3), [Nolden et al., 2005], [Koppen and Langer, 2007]. Bunlardan *m*-AAA proteaz, 2 transmembran segmenti ile iç membrana demirlemiştir. Mitokondri matriks bölgesinin iç yüzeyinde bulunan Yta10p ve Yta12p ise aktif bölgeyi oluşturmaktadır [Arlt et al., 1996]. Buna karşı *i*-

AAA proteaz Yme1p intermembran boşlukta lokalize olmakta olup aktif bölgesi bu intermembran bölgede bulunmaktadır.

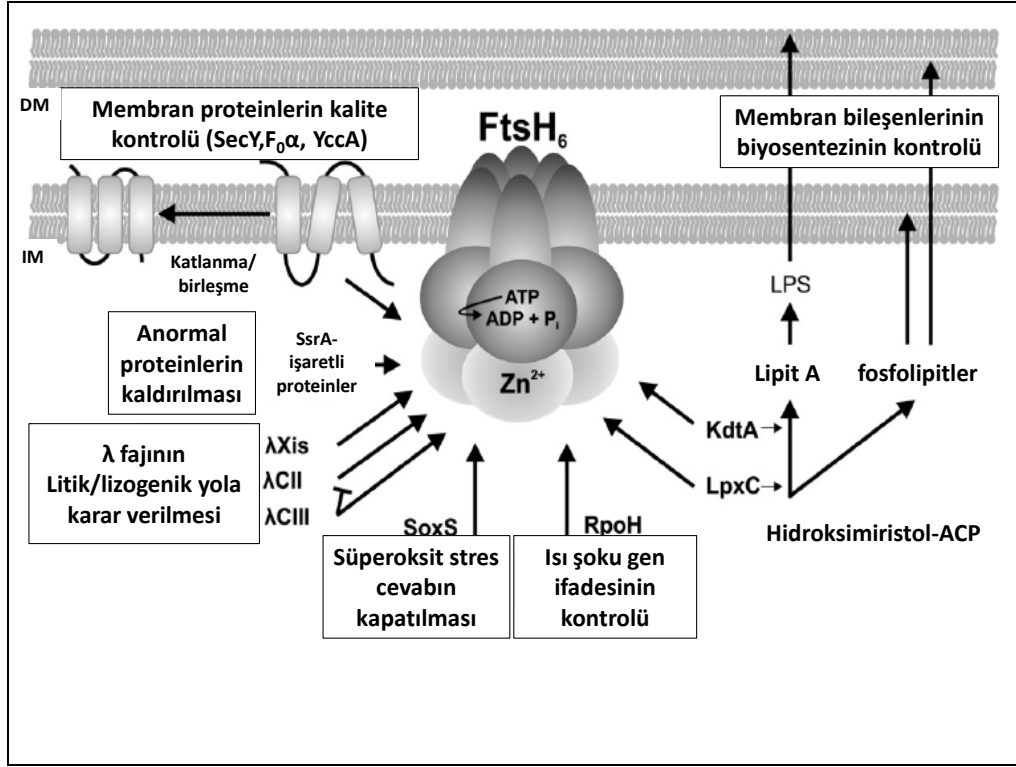


Şekil 2.3: Mitokondrial AAA proteaz.

m-AAA proteazın protein kalite kontrol aktivitesinin Phb1p ve Phb2p prohibitin kompleksleri ile düzenlendiği ve *m*-AAA proteazın mitokondriyel ribozomal protein MrpL32'nin olgunlaşmasında görev aldığı tespit edilmiştir [Arlt et al., 1996]. Ayrıca maya hücrelerinde yapılan çalışmada, *m*-AAA proteaz delesyonlarının solunum eksikliğine neden olduğu görülmüştür [Arlt et al., 1996]. Bu durumun MrpL32'nin olgunlaşmasında meydana gelen eksiklikten dolayı meydana geldiği tespit edilmiştir [Nolden et al., 2005]. Ayrıca mitokondriyel iç membran boyunca çıkan ve bir arada olgunlaşan Ccp1, sitokrom c, peroksidazın *m*-AAA bağımlı olduğu bulunmuştur. Ayrıca Ccp1 ön sekansı içerisindeki 9 alanin rezidüsünün *m*-AAA ile ayrılma için gerekli olduğu tespit edilmiştir [Tatsuta et al., 2007]. *i*-AAA proteaz içindeki FtsH korunmuş por rezidüleri de benzer şekilde substrat ile interaksiyonda önemlidir [Graef and Langer, 2006]. *i*-AAA proteazda yapılan mutagenез çalışmalarında 2 helikal bağlanma bölgesi bulunmuştur. Proteolitik bölgedeki C-terminal heliksler proteolitik silindirin yüzeyinde kafes benzeri bir yapı oluşturur ve özel substrat proteinlere karşı bağlanmayı sağlar. AAA bölgesindeki N-terminal heliksler membran yüzeyine yakın lokalize olmuştur ve negatif yüklüdürler. Bu yapı genel substrat bağlanmasını sağlamaktadır [Graef et al., 2007].

2.2. FtsH Proteazın Fizyolojik Fonksiyonları ve Substratları

FtsH proteaz enzimi hücre içerisinde ve membranda bulunan birçok proteini yıkıma uğratarak çeşitli hücresel süreçlerde düzenleyici rol oynamaktadır (Şekil 2.4), [Krzywda et al., 2002].



Şekil 2.4: FtsH proteaz enziminin fonksiyonlarının şematik gösterimi.

2.2.1. FtsH Proteazın Sitoplazmik Substratları

FtsH proteazın *E.coli*'de birçok düzenleyici fonksiyonu bulunmakta olup, sitoplazmik substratları ve yıkım sinyalleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir [Führer et al., 2005]. FtsH proteaz bu substratlarını 2 farklı yıkım prensibi ile tanımaktadır. Bunlar LpxC'de olduğu gibi serbest uç diğeri ise RpoH'da olduğu gibi yapısal özelliklerle olmaktadır. Genellikle bu sınıflandırmaların çeşitli varyasyonları bulunmaktadır.

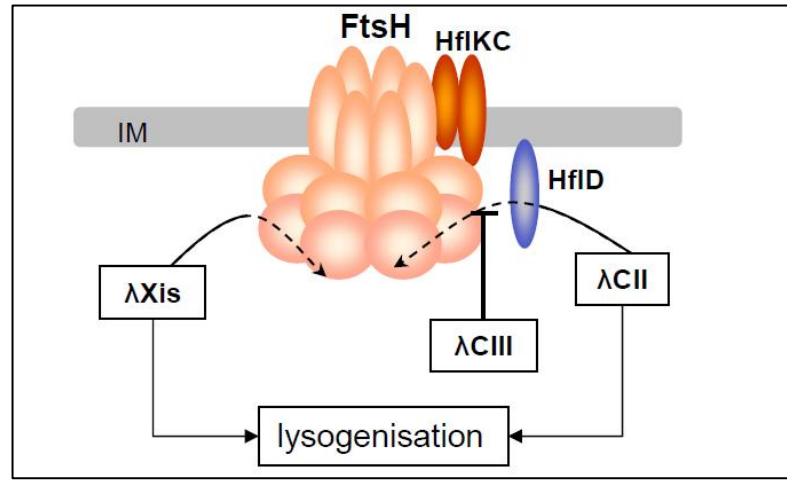
Tablo 2.1: FtsH proteazın sitoplazmik substratları.

Substrat	Organizma	Adaptör Protein	Degradasyon Sinyallerinin Lokalizasyonu	Referans
GgpS	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803		Tanımlanmamış	Stirnberg et al., 2007
λ CII	Faj λ <i>E. coli</i>	HflK/C, HflD	C-Terminal	Kihara et al., 1997, 2001; Shotland et al., 1997
λ CIII	Faj λ <i>E. coli</i>		Protein içinden	Herman et al., 1997
λ Xis	Faj λ <i>E. coli</i>		Tanımlanmamış	Leffers and Gottesman, 1998
MarA	<i>E. coli</i>		N-Terminal	Griffith et al., 2004
SoxS	<i>E. coli</i>		N-Terminal	Griffith et al., 2005
σ^{32} (RpoH)	<i>E. coli</i>	DnaK/J, GroEL/ES	2.1 bölgesi ve C bölgesi	Horikoshi et al., 2004; Obrist, 2006
σ^{32} (RpoH)	<i>C. Crescentus</i>		Tanımlanmamış	Fischer et al., 2002
σ^F	<i>C. Crescentus</i>		Tanımlanmamış	Alvarez-Martinez et al., 2006
σ^W	<i>B. Subtilis</i>		Tanımlanmamış	Zellmeier et al., 2003
SpoVM	<i>B. Subtilis</i>		Protein içinden	Cutting et al., 1997
GlnK	<i>C. Glutamicum</i>		Tanımlanmamış	Ströscher et al., 2004
Flavodoksin	<i>E. coli</i>		Protein içinden	Okuno et al., 2006b
SsrA işaretli proteinler	<i>E. coli</i>		C-Terminal	Herman et al., 1998
LpxC	<i>E. coli</i>		C-Terminal	Ogura et al., 1999; Führer et al., 2006
FtsZ	<i>E. coli</i>		İnternal	Srinivasan et al., 2008

2.2.1.1. Faj λ proteinleri

FtsH proteazın fonksiyonlarından biri de viral enfeksiyonda rol oynamasıdır [Banuett et al., 1986]. *E.coli*'de faj λ , 2 ayrı fizyolojik yol ile konağa girmektedir. Bunlardan biri litik yol olup, bu yolda faj replikasyonu olur ve konak hücrede lizis gerçekleşir. Lizogenik yola girildiğinde ise faj genomu konak genomuna entegre olur ve faj üretimi represyonu gözlenir. Litik ve lizogenik yola karar vermede, hücre büyüme şartları, tek hücreyi enfekte eden faj sayısı gibi stokastik ve deterministik komponentleri içeren çeşitli kompleks mekanizmalar etkilidir [Kourilsky, 1973], [Kourilsky and Knapp, 1974], [Obuchowski et al., 1997], [St-Pierre and Endy, 2008]. Faj λ proteinlerinin proteolizi ile FtsH proteaz litik ya da lizogenik yola karar

vermede rol oynamaktadır (Şekil 2.5), [Herman et al., 1997]. λ fajının döngüsünde CI, CII, CIII ve Xis proteinleri önemlidir ve λ CII proteininin FtsH proteaz tarafından yıkımı, λ fajını litik yola yönlendirmektedir [Shotland et al., 1997]. λ CII proteini lizogenizasyonda ise λ CI represörünün ekspresyonunu indüklemektedir. LpxC ve SsrA işaretinde olduğu gibi λ CII proteininin C-terminalinde non-polar rezidülerce zengin yapısal olarak esnek yıkım sinyali bulunmaktadır. Bu sinyal FtsH proteaz tarafından yıkımın gerçekleşmesinde etkindir [Kobiler et al., 2002], [Datta et al., 2005]. Ayrıca FtsH proteaz birincil olarak Lon proteaz ile kontrol edilen konak genomuna entegre olan faj DNA'sının kaldırılmasını sağlayan λ Xis excisionaz yıkımını sağlamaktadır [Leffers and Gottesman, 1998].



Şekil 2.5: FtsH proteazın litik-lizogenik yola karar vermedeki fonksiyonu.

FtsH proteaz bazı substratlarını adaptör proteinler aracılığıyla yıkıma uğratmaktadır. Bunlardan HflD proteini, λ CII proteininin yıkımı için adaptör protein olarak rol almaktadır. Bunun yanında HflK/C kompleksi ise lizis/lizogeni değişiminde düzenleyici bir faktör olarak rol almaktadır [Kihara et al., 1997], [Kihara et al., 2001], [Bandyopadhyay et al., 2010]. FtsH proteaz enziminin λ CII proteininin yıkımında, 54 amino asitlik bir protein olan λ CIII proteini FtsH proteazın yarışmalı inhibitörü olarak görev yapmaktadır [Herman et al., 1997]. FtsH proteaz enziminin inhibisyonunda protein oligomerizasyonu ve λ CIII proteininin internal amfipatik α -heliks rezidüsü önemli fonksiyon göstermektedir [Kornitzer et al., 1991], [Kobiler et al., 2007]. λ CIII proteininin kesilmiş 14-41 arası rezidüleri inhibitör olarak etki göstermektedir ancak proteolizi önleyemediği gözlenmiştir [Halder et al., 2007].

2.2.1.2. SoxS ve MarA

E.coli'de SoxS ve MarA regülatör yanıtı oksidatif stres ya da salisilat gibi sinyallerle tetiklenmekte ve eksprese olmaktadır. SoxRS ve Mar regülonları yan yana olup SoxS ve MarA etkilerini doğrudan transkripsiyon aktivasyonu ile göstermektedirler [Martin et al., 2000]. SoxRS/Mar regülonu indüksiyonu oksidatif strese karşı savunma sağlarken çeşitli antibiyotiklere, ağır metallere ve organik çözücülere karşı yüksek toleransı güçlendirmektedir. Her 2 proteinin de amino asit dizisi % 45 oranda benzerdir ve yarı ömürleri 2 dk. (SoxS) ve 1 dk. (MarA)'dır. Proteolizin düzenlenmesi süperoksit ya da nitrik oksit stresi gibi çeşitli stres cevapların oluşmasında ya da bu cevabın kapatılmasında rol oynamaktadır [Greenberg et al., 1990], [Nunoshiba and Demple, 1993], [White et al., 1997]. Bu süreçte FtsH proteaz oksidatif strese cevabın kapatılmasında da görev almaktadır. Stres cevabının kapatılmasında transkripsiyonel aktivatörlerin içsel düzensizlikleri önemli olup bu düzensizlik neticesinde FtsH ve Lon proteaz enzimleri protein yıkımını gerçekleştirirler. Oksidatif stres altında düzenleyici SoxS cevap eksprese olurken bu proteazlar tarafından hızlı bir şekilde yıkıma uğratılarak yarı ömrü 1 dakikada tutulmaktadır. Böylece süperoksit konsantrasyonu bazal düzeye çekilmektedir [Griffith et al. 2004]. SoxR'nin oksidasyonu tek gen olan *soxS*'nin transkripsiyonunu sağlarken SoxS'de, süperoksit regülonunun transkripsiyonunu aktive etmektedir. [Nunoshiba et al., 1992], [Wu and Weiss, 1992], [Gaudu and Weiss, 1996], [Gaudu et al., 1997]. SoxS proteininin yarı ömrü 2 dakikadan az olup hücresel seviyesi Lon proteaz ve minör olarak FtsH proteaz ile kontrol edilmektedir [Griffith et al., 2004]. Bu proteinin DNA ve RNAP'ye bağlanması Lon proteaz ile proteolize karşı korumaktadır [Shah and Wolf, 2006]. Ayrıca SoxS ve MarA proteinlerinin N-terminaline etiketlerin eklenmesi, bu proteinlerin FtsH ve Lon proteaz tarafından yıkımında stabilizasyon açısından önemli bir faktördür. Örneğin SoxS proteinin N-terminaline etiketlerin ilavesi stabilizasyonunu sağlarken N-terminalin kesilmesi, protein stabilizasyonunu olumsuz etkileyerek FtsH ve Lon proteaz tarafından yıkıma uğramasına neden olmaktadır [Shah and Wolf, 2006].

2.2.1.3. Flavodoksin (Fld)

E.coli'de FtsH proteazın bir başka substratı flavodoksin (Fld) olarak tanımlanmıştır. Flavodoksinin yapısında flavin mononükleotit (FMN) bulunmaktadır. Bu protein küçük elektron transfer proteinleri olarak görev almasının yanında siklik ve lineer elektron akışını sağlamaktadır. Ayrıca fotosistem I'deki (PSI) terminal elektron akseptörü tarafından redüklenen çözünür proteinlerdir. Flavodoksin elektron transferindeki fonksiyonunu bir protein ve küçük organik bir kofaktör arasındaki non kovalent interaksiyon ile gerçekleştirir [Setif, 2001]. Bu proteinler küçük bakteriyel flavoproteinler olup özellikle de düşük potansiyelli elektron transferinde görev alırlar ve çoklu redoks reaksiyonları oluştururlar. Bütün flavodoksinler non kovalent bir biçimde flavin mononükleotide bağlanırlar [Watenpaugh et al., 1972]. İn-vitro yapılan çalışmalarda FMN içermeyen apo-flavodoksinin FtsH proteaz tarafından yıkıma uğratıldığı bulunmuştur [Okuno et al., 2006]. Buna karşın FMN içeren holo-flavodoksin kompleksi proteolize karşı dirençlidir. Flavodoksinin proteolizi proteinin katlanma fazı ile ilişkili olup FMN bağlanması flavodoksinin yapısını stabilize etmektedir [Ayuso-Tejedor et al., 2010]. Flavodoksin yapısında spesifik yıkım sinyali içermezken, FtsH proteaz apo-Fld proteinini C-terminal içinden N-terminal yönünde yıkıma uğratmaktadır [Okuno et al., 2006]. Apo-flavodoksinin yıkımı proteinin internal bölgesinden başlayabilmektedir ve yıkım için terminal bölgeye gerek duymaz [Okuno et al., 2006].

2.2.1.4. FtsZ

E.coli'de FtsH proteazın in vitro substratlarından biri, hücre bölünme proteini olan FtsZ proteindir. GTPaz FtsZ proteini, prokaryotik tübülün homologu olup bölünme bölgesinde Z-yüzüğü (veya halkası) yapısı oluşturur [Bi and Lutkenhaus 1991]. FtsZ proteininin in vitro proteolizi terminal sekanslardan bağımsızdır ve GTP bağlanma durumu ile düzenlenir [Srinivasan et al., 2007], [Srinivasan et al., 2008]. FtsH proteaz ile FtsZ'nin in-vivoda yıkımının ölçümü başarısız olmuştur [Srinivasan and Ajitkumar, 2007]. Buna karşın in vivo da FtsZ, ClpXP sisteminin substratı olarak gözlemlenmiştir. [Kelly et al., 1998], [Weart et al., 2005].

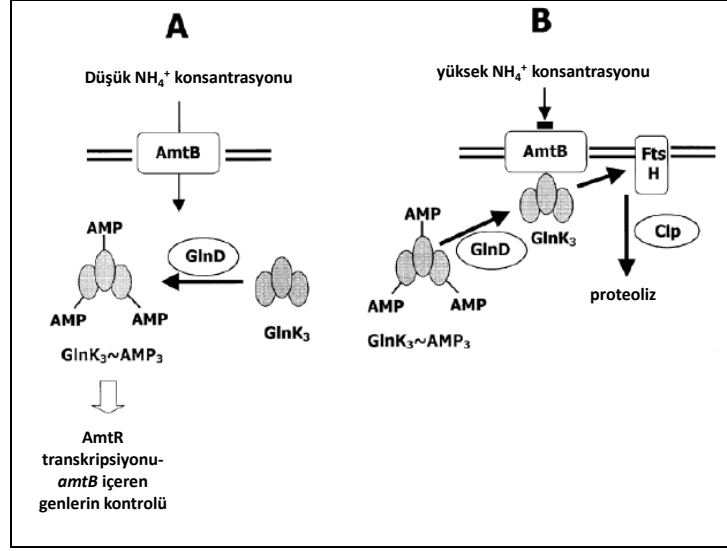
2.2.1.5. SsrA-işaretli Substratlar

E.coli'de zamansız sonlanan mRNA translasyonu sonucu oluşan kesilmiş proteinlerin C-terminaline "Ssr-A işaretleme" olarak ifade edilen 11 rezidü (AANDENYALAA) eklenir. Bu işaretleme yoluyla hatalı proteinler ClpAP/XP proteazlar yoluyla hızlı bir biçimde yıkıma uğratılmaktadır [Keiler et al., 1996], [Gottesman et al., 1998]. Bir ribozomla ilişkili protein olan SspB proteini Ssr-A işaretli bölgeye bağlanarak substratın ClpXP tarafından tanınma ilgisini artırır [Levchenko et al., 2000]. SspB dışında ClpA ya da ClpX' de Ssr-A işaretli spesifik tanıma bölgesine bağlanır [Flynn et al., 2001].

FtsH proteaz enzimi de λ CI-SsrA model substratında olduğu gibi Ssr-A işaretli substratları tanır ve etkili biçimde yıkıma uğratır. Represör bir protein olan λ CI proteininin C-terminal bölgesine eklenen non polar aminoasitlerce zengin rezidü proteinin kararsızlığını artırır ve FtsH proteazın substratını tanınmasında önemli işlev görmektedir [Herman et al., 1998].

2.2.1.6. GlnK Proteinini

FtsH proteaz *Corynebacterium glutamicum*' da GlnK proteinini yıkıma uğratarak nitrojen metabolizmasında görev almaktadır. Nitrojen açlığı esnasında GlnK adenillenir ve global represör protein AmtR ile interaksiyona girerek nitrojen açlığı genlerinin eksprese olmasına olanak sağlar. Yüksek nitrojen konsantrasyonunda GlnK sitozolik membrana doğru yaklaşır ve AmtB transporter ile interaksiyona girerek amonyum alımını bloke eder. GlnK, FtsH proteaz yanında Clp proteazlar tarafından da yıkıma uğratılmaktadır (Şekil 2.6), [Strosser et al., 2004].



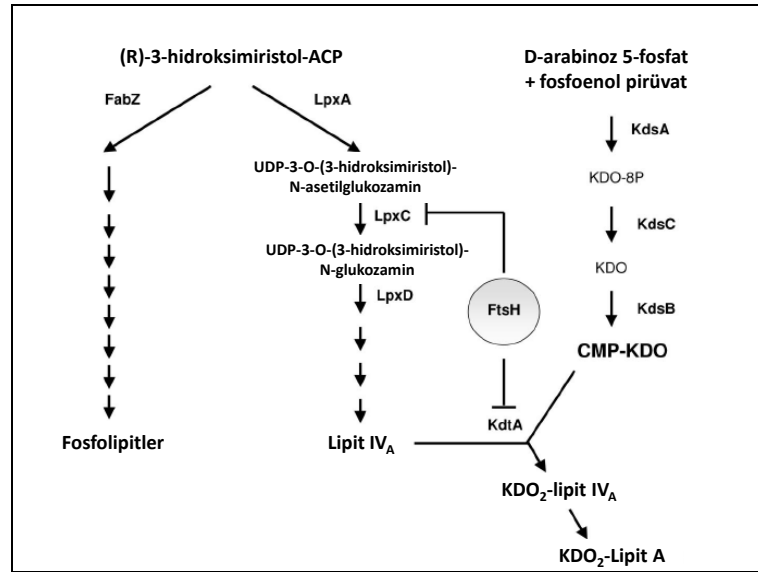
Şekil 2.6: FtsH proteaz enziminin NH_4^+ 'ün hücreye alımındaki kontrol mekanizması.

2.2.1.7. Sporulasyon Faktörü SpoVM

FtsH proteaz, sitoplazmik substratı olan alternatif sigma faktörlerinin proteolitik düzenlemesinde görev almaktadır. *Caulobacter crescentus*'da durağan fazda oksidatif strese cevapta görevli ekstra sitoplazmik fonksiyon (ECF) sigma faktörü SigF (σ^F)'nin hücresel seviyesi FtsH proteaz ile ayarlanmaktadır [Alvarez-Martinez ve ark., 2006]. Zellmeier ve arkadaşları *B. subtilis*' de ise ECF sigma faktör σ^w 'nin FtsH proteazın substratı olduğunu öne sürmüşlerdir (2003). FtsH proteaz ayrıca *B. subtilis*' de 6 sigma faktörü ve kompleks protein ağının görev aldığı endospor gelişiminde görev almaktadır [Kroos and Yu 2000]. Endospor gelişiminde Spo0E bir fosfataz olup Spo0A'nın düzenlenmesinde görev alırken, SpoVM bir FtsH inhibitörü olup yavaş bir şekilde yıkıma uğratılmaktadır [Cutting et al., 1997]. FtsH proteaz her 2 proteinin yıkımı ile sporulasyonun erken ve geç fazlarında görev almaktadır [Cutting et al., 1997], [Le and Schumann, 2009].

2.2.1.8. LpxC

FtsH proteaz, *E. coli*' de ve diğer Gram (-) bakterilerde lipit A biyosentezinde anahtar enzim olan LpxC proteininin yıkımında görev almaktadır (Şekil 2.7), [Chen and Elia, 2008].



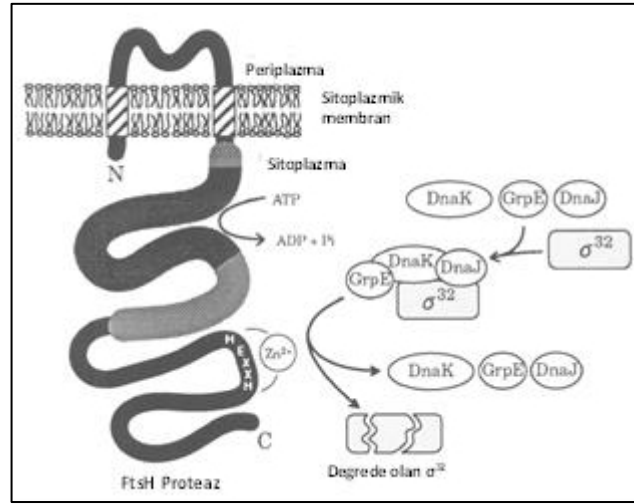
Şekil 2.7: Gram (-) bakterilerde Lipit A biyosentezi yolu ve FtsH proteaz enziminin metabolik yoldaki düzenleyici mekanizması.

LPS biyosentezi Lipit A oluşumu ile başlamaktadır. Lipit A' nın çok fazla ya da çok az miktarı *E. coli*' de toksik etkiye sebep olmaktadır. Bu sebeple hücre canlılığı için LpxC seviyesinin düzenlenmesi oldukça önemlidir. FtsH proteaz AAA proteazlar içerisinde membran lipidlerin biyosentezinin düzenlenmesinde görev almaktadır. *E. coli*'de *ftsH* mutant hücrelerde yapılan çalışmada lipit A biyosentezinde ilk basamağı katalizleyen enzim olan UDP-3-O-açıl-N-asetilglukozamin deasetilaz (LpxC) birikimi olduğu gözlenmiştir. LpxC'nin bu akümüasyonu Lipit A oranında düzensizliğe sebep olmaktadır [Ogura et al., 1999]. Lipit A biyosentezinde ilk basamak (R)-3-hidroksimiristol-ACP'nin açıl grubunun UDP-GlcN'e, LpxA aracılığıyla transferidir. UDP-GlcN peptidoglikan biyosentezi için gerekli olup, (R)-3-hidroksimiristol-ACP fosfolipit (PL) biyosentezi için prekürsör moleküldür. Lipit A biyosentezinde işlenmiş ilk reaksiyon ikinci enzim olan LpxC tarafından katalizlenir [Young et al., 1995]. Bu reaksiyon LPS biyosentezinde hız sınırlayıcı ya da ürün sınırlayıcı basamak olup bu reaksiyonu katalizleyen enzim olan LpxC, FtsH proteaz ile yıkıma uğratılmaktadır.

2.2.1.9. RpoH (σ^{32})

E.coli 'de FtsH proteaz sitoplazmik substratlarından biri olan sigma faktörlerinin yıkımı ile ısı şoku gen ekspresyonunu kontrol etmektedir. Isı şoku

esnasında hücrede katlanmamış proteinler bir araya gelerek kümeleşme meydana getirmektedir. İnaktif proteinlerin birikimini önlemek için RpoH (σ^{32}) alternatif sigma faktörünün indüklemesiyle ısı şoku proteinleri eksprese olmaktadır. RpoH regülasyonunun ekspresyonu sadece sıcaklığın artmasıyla olmamaktadır. Bunun yanında etanol ilavesi gibi çeşitli stres durumları yanlış protein katlanmalarına ve RpoH ekspresyonuna neden olmaktadır [VanBogelen et al., 1987], [Gross et al., 1996]. RpoH bağımlı promotorlar DnaK/J, GroEL/ES, küçük HSPs benzeri IbpA/B, gibi şaperon benzeri moleküllerin transkripsiyonu yanında ClpXP, HslUV, Lon ve FtsH gibi proteazların transkripsiyonunu da sağlamaktadır [Cowing et al., 1985], [Chin et al., 1988], [Chuang et al., 1993], [Herman et al., 1995], Herman et al., 1995], [Li et al., 2000], [Nonaka et al., 2006]. Küçük HSPs benzeri IbpA/B, katlanmaya elverişli durumda denatüre olmuş proteinleri korur ve agregasyonu engeller. Şaperon benzeri DnaK/J ve GroEL/ES ise katlanmamış proteinlerin ya da yanlış katlanmış proteinleri yeniden doğru katlanmalarına olanak sağlamaktadır. Olgunlaşmamış proteinlerin yeniden katlanması degradasyon yerine tercih edilen bir durumdur (Richmond, Glasner et al. 1999).

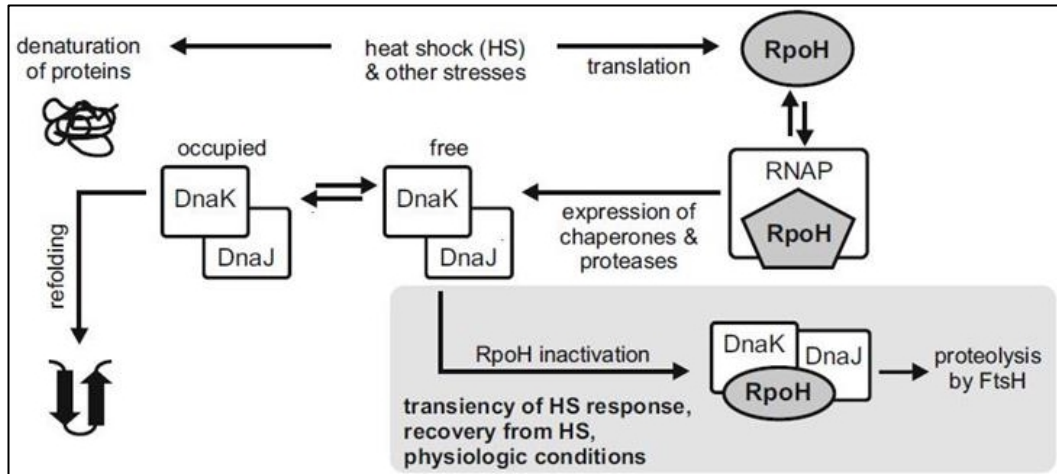


Şekil 2.8: σ^{32} 'nin proteolitik yolunun şematik gösterimi.

RpoH düzeyi fizyolojik şartlara göre kompleks transkripsiyonel, translasyonel, post-translasyonel mekanizmalarla ve FtsH proteaz tarafından sigma faktörlerinin yıkımı ile ayarlanmaktadır [Fischer et al., 2002], [da Silva et al., 2003]. FtsH proteazın sitoplazmik substratı olan ısı şoku sigma faktörü σ^{32} 'nin yarı ömrü kısadır ve ısı şoku ya da diğer stres şartları yokluğunda hızlı bir şekilde yıkıma

uğratılmaktadır (Şekil 2.8), [Herman et al., 1995], [Tomoyasu et al., 1995]. Bu substratın yarı ömrü FtsH proteaz yanında diğer ATP bağımlı proteazlar tarafından da etkilenmektedir [Kanemori et al., 1997]. Saflaştırılmış reaksiyon sisteminde FtsH proteaz, Zn^{2+} ve ATP bağımlı bir şekilde σ^{32} 'yi yıkıma uğrattığı tespit edilmiştir [Tomoyasu et al., 1995], [Okuno et al., 2004].

Sıcaklığın artmasıyla birlikte denatüre olmuş protein miktarıyla duyarlılık artar. Böylece sigma faktörün stabilitesi artar ve RNAP bağı RpoH, HS genlerinin transkripsiyonunu sağlar. HS sonrası translasyonun ve stabilitenin artmasıyla RpoH miktarı 4 dakika içinde 17 kat artar fakat 15 dakika sonra yeni durağan fazda seviyede 5 kat düşüş olur [Straus et al., 1987]. Yani HS cevap geçicidir ve HSPs sentezi, hücresel protein katlanma fazı üzerinde negatif bir feedback ile koordinelidir. Şaperon sistemin kullanılmayan molekülleri RpoH'ya bağlanır. Şaperon bağlanması muhtemelen RpoH inaktivasyonuna neden olur ve RpoH proteolizi için hedeflendirilir. Bu şekilde HS genlerinin ekspresyonu için hassas bir ayarlama yapılmaktadır [Yura et al., 2007]. DnaJ molekülü RpoH proteininin 2.1 bölgesine bağlandığında molekülde meydana gelen konformasyonel değişiklikler DnaK'nın bağlanmasına olanak sağlar. DnaK molekülünün RpoH'nın 3.2 bölgesine bağlanması molekülün yapısal olarak destabilize olmasına neden olur ve FtsH proteaza taşınmasına yol açar (Şekil 2.9), [Obrist, 2006].



Şekil 2.9: Isı şokuna cevabın kontrolünde FtsH proteazın görevi.

2.2.2. Membran Proteinlerin Kalite Kontrolü

E.coli'de kodlanan proteinlerin yaklaşık % 21'i membranda lokalize olmaktadır. Bu nedenle membranda lokalize olan FtsH proteaz, sitoplazmik membran proteinlerin kalite kontrolünde önemli rol oynar [Akiyama, 2009], (Tablo 1.3), [Führer et al., 2005] .

Tablo 2.2: FtsH proteazın membran substratları.

Substrat	Organizma	Referans
SecY	<i>E. coli</i>	Kihara et al., 1995
AtpA	<i>E. coli</i>	Akiyama et al., 1996
YccA	<i>E. coli</i>	Kihara et al., 1998
FtsZ	<i>E. coli</i>	Anilkumar et al., 2001
D1	<i>Synechocystis sp.</i> PCC 6803	Silva et al., 2003
D2	<i>Synechocystis sp.</i> PCC 6803	Komenda et al., 2006
CP47	<i>Synechocystis sp.</i> PCC 6803	Komenda et al., 2007

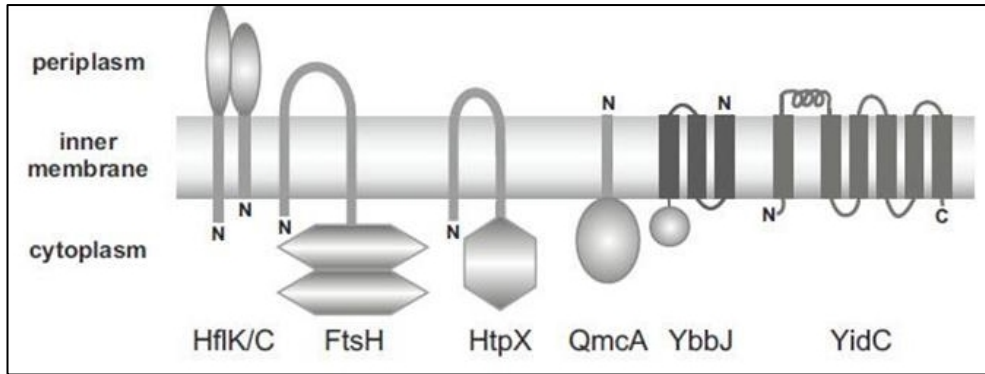
FtsH proteazın membran bağlı substratları arasında SecEGY translokaz ile kompleks oluşturmamış Sec Y [Kihara et al., 1995], ATP sintaz ile kompleks oluşturmamış ATPaz proton α ($F_0\alpha$) alt ünitesi [Akiyama et al., 1995] ve fonksiyonu tam bilinmeyen 7 transmembran segmente sahip YccA proteini bulunmaktadır [Kihara et al., 1998]. Sec Y alt ünitesi ve $F_0\alpha$ alt ünitesi yardımcı proteinlerle bulunmadığı zaman hızlı bir şekilde yıkıma uğrarken hücrel fonksiyonu bilinmeyen YccA proteini daha yavaş yıkıma uğramaktadır [Akiyama and Ito, 2000].

SecY proteini yapısal olarak pseudosimetrik yapıda ve membran integral proteini olup SecE ile ilişkilidir [Van den Berg et al., 2004]. SecY, SecE ve SecG ile birlikte stabil translokon kompleksini oluşturmaktadır ve bu kompleks dinamik bir yapıdadır. Bu yapı, öncü proteinlerin transbilayer hareketine olanak sağlarken bunun yanında yeni sentezlenmiş membran proteinlerin lipid bilayer tabakasına bütünleşmesine olanak sağlamaktadır. Translokon kompleksinin ayrı olması hücre için zararlı bir durum oluşturur ve SecE olmadan SecY alt ünitesi $FtsH^+$ hücrelerde yıkıma uğratılır. Bunun sonucunda translokaz bloke olur ve protein translokasyonu engellenir [Akiyama et al., 1994], [van Stelten et al., 2009]. Ayrıca ayrı durumda iken yapısının stabil olmadığı, yarı ömrünün ~2 dakika olduğu ve *ftsH* mutant

hücrelerde SecY akümüasyonu olduğu gözlemlenmiştir [Kihara et al., 1995]. *In vitro* çalışmalarda deterjanla çözme, enzim saflaştırılması ve substrat kullanılarak FtsH proteazın SecY proteinini Zn^{2+} ve ATP hidrolizi ile yıkıma uğrattığı gözlemlenmiştir [Akiyama et al., 1996].

Proton ATPazda ise Fo partikülünün alt ünitesi α proteinini (yarı ömrü ~2 dk.) hızlı bir biçimde FtsH proteaz tarafından yıkıma uğratılmaktadır. Yıkım olayı diğer alt ünite olan Fo yokluğunda gerçekleştirilirken bu durum hem *in vivo* hem de *in vitro*'da gözlemlenmiştir [Akiyama et al., 1996]. Böylece FtsH proteaz kompleks oluşturmamış hücre için zararlı proteinleri yıkıma uğratarak hücre canlılığında görev yapmaktadır [Ito and Akiyama, 2005].

ATP-bağımsız ve çinko bağımlı endopeptidaz HtpX'in FtsH proteazın komplementeri olarak görev yaptığı *in vitro*'da SecY proteininin ayrılması ve FtsH proteazın kaybında esensiyel olarak görev yapmasında tespit edilmiştir [Shimohata et al., 2002], [Sakoh et al., 2005]. Böylece HtpX'in bir rolünün FtsH proteaz tarafından terminal bölgenin açığa çıkması ve tanınması sonucu membran proteinlerin ön ayrılmasıyla protein kalite kontrolüne katkı sağladığı ön görülmektedir (Şekil 2.10), [Sakoh et al., 2005], [Akiyama, 2009].



Şekil 2.10: FtsH proteaz ve etkileşime girdiği proteinlerin topolojisi.

Mitokondri iç membranında FtsH benzeri 2 proteaz bulunmaktadır. Bunlardan *m*-AAA matriks içerisine doğru aktif iken *i*-AAA bu yapının karşısında intermembran içerisine doğru çıkıntı yapacak şekilde bulunmaktadır. HtpX homoloğu Oma1, *m*-AAA ile birlikte fonksiyon göstermektedir ve Oxa1 substratın ayrılmasında bilinmeyen bir mekanizma ile rol oynamaktadır [Kaser et al., 2003]. Prohibitin benzeri proteinler ile FtsH proteazın interaksiyonu korunmuştur. Mitokondrideki prohibitinlerin kesin fonksiyonu çoğunlukla bilinmemektedir. Ancak

bu proteinler *m*-AAA proteaz ile proteolitik aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır [Steglich et al., 1999],[Tatsuta et al., 2005]. *E.coli*'de bulunan 2 prohibitin benzeri protein olan HflC ve QmcA, FtsH proteaz ile interaksyona girmektedir. HflC ve QmcA iç membranda karşı oryantasyona sahiptir. Bu proteinler sırasıyla HflC ve YbbJ ile bir operonda kodlanmaktadır [Kihara et al., 1996], [Chiba et al., 2006]. Protein kompleksi HflK/C, FtsH proteazın SecY karşı düzenlenmesinde görev alır fakat QmcA için bir rolünün olduğu rapor edilmemiştir [Kihara et al., 1996]. İlginç bir şekilde FtsH₆(HflK/C)₆'dan oluşan FtsH holoenzimi olgunlaşmamış membran proteinlerin lokasyonları ve membran proteinlerin bir araya gelmesinde rol alan YidC proteini ile etkileşime girmektedir. Bu durum membran proteinlerin eklenmesi ve katlanmasındaki çok önceki basamaklarda kalite kontroldeki rolüne işaret etmektedir [van Bloois et al., 2008]. HflK/C ve QmcA/YbbJ'nin her ikisi de FtsH ve HtpX eksik *E.coli* hücrelerinde çok kopyalı supresör olarak görev alır. Bu nedenle bu proteinler mitokondrial prohibitin olarak bilinen membran şaperonu olarak fonksiyon göstermektedirler [Nijtmans et al., 2000], [Chiba et al., 2006]. Mitokondrial *i*-AAA ve FtsH şaperon fonksiyonlarına sahiptir [Akiyama et al., 1994], [Shirai et al., 1996], [Leonhard et al., 1999], [Herman et al., 2003], [Rainey et al., 2006], [Inwood et al., 2009].

2.3. *Geobacillus kaustophilus* Hücresel Yapı ve Metabolizması

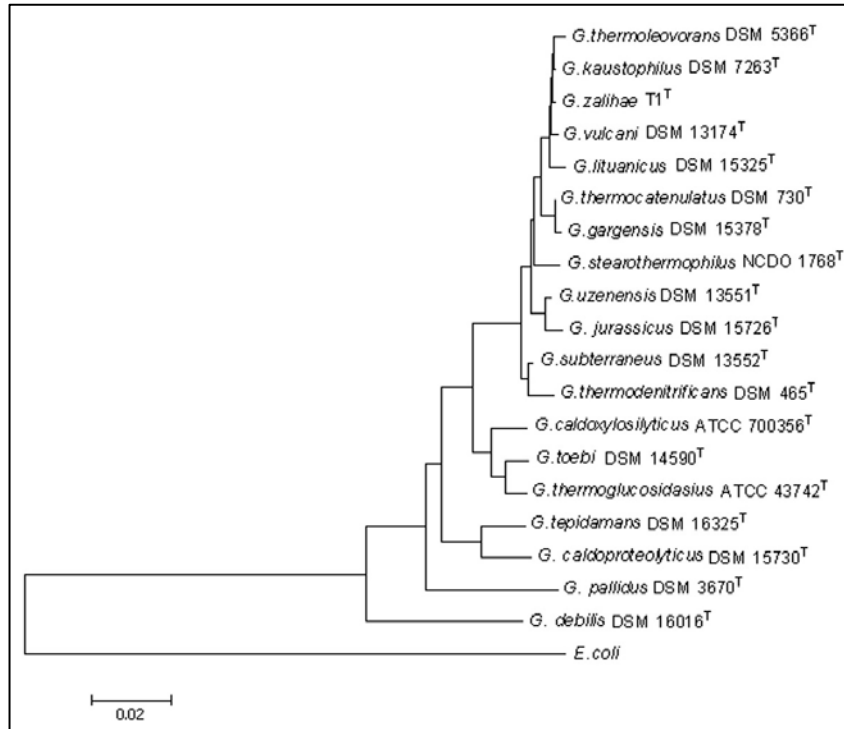
Bacillus genusunun yeniden sınıflandırılmaya başlanmasından bu yana, daha önce *Bacillus* üyesi olarak bilinen birçok türden yola çıkılarak yeni genuslar oluşturulmuştur. 1990'lardan sonra ekstrem ortamlarda keşfedilen, endospor oluşturan halofil, asidofil ve termofiller giderek büyüyen bir grup olarak ortaya çıkmıştır. 16S rRNA gen dizisi karşılaştırmaları sonucu bu ekstremofillerin çoğunun *Bacillus* ile yakın akraba olduğu anlaşılmıştır (Şekil 2.11), [Leow et al., 2007]. *Geobacillus* genusuna ait türlerin tayini de yine bu yöntem ile yapılmıştır.

Geobacillus kaustophilus (HTA 426), Pasifik okyanusundaki Maria Çukuru'nun derin deniz sedimentlerinden izole edilmiştir [Takami et al., 2004]. Optimal büyüme sıcaklığı 60 °C olmakla beraber, 70 °C'de da büyüeyebilen termofilik bir bakteridir. *G. kaustophilus*'un yaşam alanı akuatik ortamlardır. Bu

genusa ait diğer türler aynı zamanda petrol rezervlerinin bulunduğu ortamlarda da görülmektedirler. Büyüme için uygun pH aralığı 6.2-7.5'dir.

G. kaustophilus, bir membran ve flagellaya sahip olmakla beraber çubuk şekilli yapı gösterir. Hücreler koloni halinde büyüdüğünde dışbükey ve şeffaf bir görüntüye sahiptirler. Bu tür, aynı zamanda endospor oluşturan, aerobik, Gram (+) bir bakteridir. 1,5 µM x 3,5 µM büyüklüğünde hareket etmeyen, oval ya da silindirik sporları rüzgarla taşınabilir (*Bacillus* Stock Center Catalog of Strains).

G. kaustophilus, 3,54 Mb büyüklüğünde halkasal bir kromozom ve 47.9 kb büyüklüğünde halkasal plazmit DNA'sına sahiptir. Genom dizisi açığa çıkarıldıktan sonra, *G. kaustophilus*'ta 3498 adet protein kodlayan dizi bulunmuştur. Bu kodlayıcı dizilerin, genomun % 86'sına denk geldiği belirlenmiştir [Takami et al., 2004].



Şekil 2.11: *Geobacillus kaustophilus*'un *Geobacillus* cinsinin diğer türlere göre filogenetik yeri.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

2-propanol (C_3H_8O), Asetik Asit ($AcOH$), Etanol ($EtOH$), β -Merkaptoetanol (C_2H_6OS), Sodyum Klorür ($NaCl$), Sodyum Hidroksit ($NaOH$), Hidroklorik Asit (HCl), Fenol (C_6H_5OH), Kloroform ($CHCl_3$), İzamilalkol ($C_5H_{12}O$), Sükroz ($C_{12}H_{22}O_{11}$), Metanol (CH_4O), Sodyum Dodesil Sülfat (SDS), Coomassie Brilliant Blue R250, Magnezyum Fosfat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), Lityum Klorür ($LiCl$), Agaroza, Sodyum Asetat ($C_2H_3NaO_2$), PEG (6000), Magnezyum Klorür ($MgCl_2$) kimyasalları Merck (Germany) firmasından; Ampisilin, Kanamisin, Etidyum Bromid ($EtBr$), Ditiotreitol (DTT), TEMED ($C_6H_{16}N_2$), Akrilamid (C_3H_5NO), Triklor Asetik Asit (TCA), İmidazol ($C_3H_4N_2$), Metoksi- β -naftilamit (MNA), PMSF ($C_7H_7FO_2S$), Üre (CH_4N_2O), Glikoz ($C_6H_{12}O_6$) kimyasalları Sigma-Aldrich (USA) firmasından; Tritron X-100 ($C_{34}H_{62}O_{11}$), Bisakrilamid ($C_7H_{10}N_2O_2$), Amonyum Persülfat ($(NH_4)_2S_2O_8$), Glisin ($C_2H_5NO_2$) Applichem (Germany) firmasından; DMSO (C_2H_6OS), Sodyum fosfat (NaH_2PO_4), Potasyum Klorür (KCl) Riedel de Haen (Germany) firmasından; Bakto Tripton (BD), Bakto Maya özütü (BD) BD (France) firmasından; Agar ($(C_{12}H_{18}O_9)_x$), Magnezyum Sülfat ($MgSO_4$) Fluka (Switzerland) firmasından; IPTG ($C_9H_{18}O_5S$) MBI Fermentas (USA) firmasından; Ni-NTA agaroz Qiagen (USA) firmasından; EDTA ($C_{10}H_{16}N_2O_8$) Alfa aesar (Germany) firmasından; Tris ($C_4H_{11}NO_3$) Roche (Germany) firmasından temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Enzimler ve Tamponları

Lizozim Roche (Germany) firmasından, RNaz A Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) firmasından, *Bam*HI Restriksiyon Endonükleaz, 10X Tampon 4, *Nde*I Restriksiyon Endonükleaz NEBbiolabs (USA) firmasından, T4 DNA Ligaz, 1X Ligasyon Tamponu ve DNazI, MBI Fermentas AB (Vilnius, Lithuania USA)

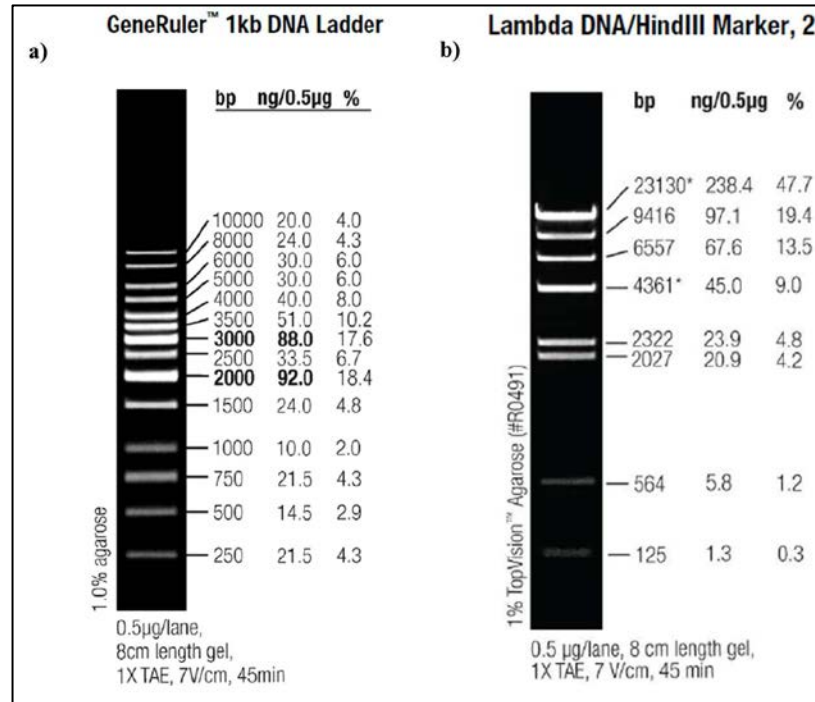
firmasının, Reverse Transkriptaz ve 10X Accuscript RT Tamponu Agilent Technology (USA) firmasından temin edilmiştir.

3.1.3. Kullanılan Kitler

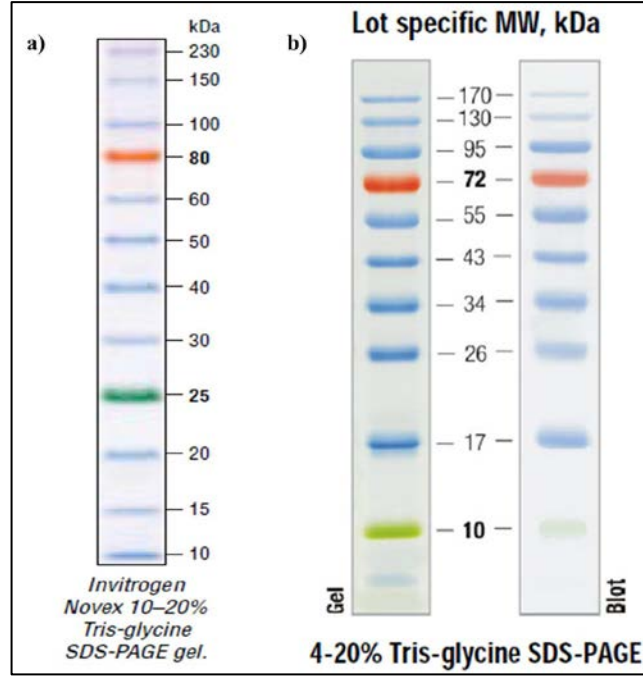
Mini Plazmit İzolasyon Kiti (High Pure Plasmid Isolation Kit), Roche (Germany) firmasından, Jelden DNA Saflaştırma Kiti (GeneJET™ PCR Purification Kit), Fermentas (USA) firmasından, Total RNA İzolasyon Kiti (innuPREP RNA Mini Kit), Analytikjena Biometra (Germany) firmasından, cDNA Sentez Kiti (Accuscript™ High Fidelity 1st Strand cDNA Synthesis Kit), Agilent Technology (USA) firmasından temin edilmiştir.

3.1.4. Kullanılan DNA ve Protein Moleküler Belirteçleri

Moleküler DNA Belirteci (MBI Fermentas, O'GeneRuler™ 1 kb DNA Marker, SM0311 ve SM0101) (Şekil 3.1), Moleküler Protein Belirteci (İnvitrogen P7710S ve Fermentas SM0671), (Şekil 3.2).



Şekil 3.1: Moleküler DNA Belirteçleri.
a) Fermentas SM0311, b) Fermentas SM0101



Şekil 3.2: Moleküler Protein Belirteçleri.
a) İnvitrogen P7710S b) Fermentas SM0671

3.1.5. Kullanılan Peptit ve İnhibitörler

N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-Methylcoumarin (N-Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-AMC) Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) firmasından temin edilmiştir.

3.1.6. Kullanılan Nükleotitler

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

3.1.7. Kullanılan Antikorlar

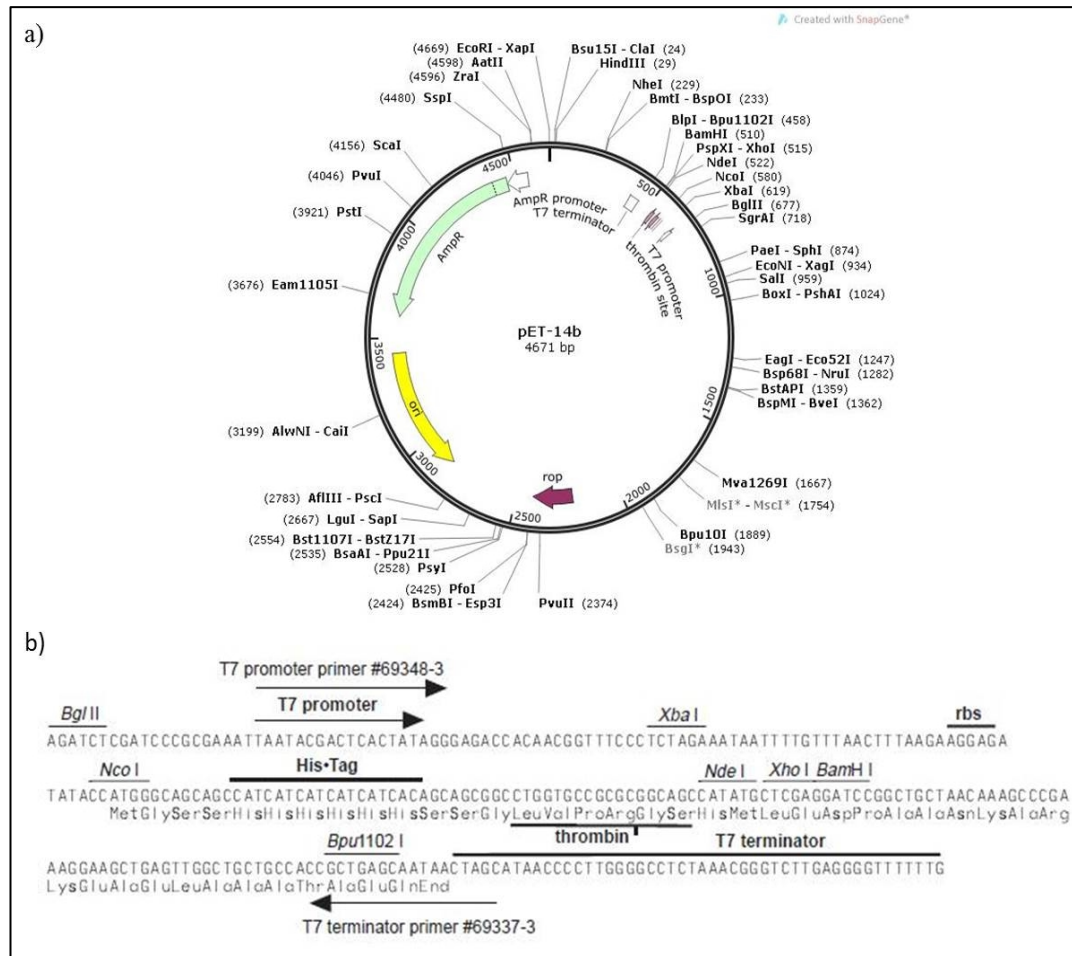
Primer Sigma-aldrich Anti-His Anti-mouse monoclonal antibody, sekonder cell signaling Anti Mouse IgG HRP-linked Antibody Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) firmasından temin edilmiştir.

3.1.8. Kullanılan Membranlar

Western Blot için İmmobilon-P Transfer Membran 26.5x3.75 m Roll PVDF 0.45 µm (EMD milipore) ve inklüzyon yapıları için Spectrum Spectra/por membran (Tubing Molecularporous Spectra/por Membrane MVCO:12-14.000) firmasından temin edilmiştir.

3.1.9. Kullanılan Plazmit Vektörler

pET vektörleri rekombinant proteinlerin *E. coli*'ye klonlanması, ekspresyonu ve saflaştırılması için geliştirilmiş çok etkili sistemlerdir (Studier ve ark., 1990). Bu vektörlerde klonlanan genlerin transkripsiyonu güçlü bakteriyofaj promotörü T7 kontrolü altında gerçekleşmektedir. pET-14b ekspresyon vektörü N-terminal His-Tag/thrombin/T7-Tag bölgesi içermektedir ve rekombinant proteinler N-terminal histidin kuyruk uzantısı ile eksprese olmaktadır (Şekil 3.3). Rekombinant proteine eklenmiş histidin kuyruk (6xHis) Ni-NTA agaroz kullanılarak gerçekleştirilen afinite kromatografisi ile rekombinant proteinin yüksek oranda saflaştırılabilmesine olanak sağlamaktadır. pET-14b vektörü Doç. Dr. Ferruh ÖZCAN'ın laboratuvarından temin edilmiştir. pET-14b vektörü *NdeI* ve *BamHI* kesim bölgelerinden bağlı *adh* (alkol dehidrojenaz) geni içeren durumda temin edilmiş olup pET-14b vektörünün bu şekilde kullanılması klonlama çalışmasında kolaylık sağlamıştır. *ftsH* geni pET-14b vektörü dışında pET-28a(+), pET-22b vektörlerinde çeşitli insert/vektör konsantrasyonlarında klonlamaya çalışılmış fakat sonuç alınamamıştır. pET-14b vektörüne klonlanmış olan *adh* geni aynı kesim bölgelerine sahip *ftsH* genini bu vektöre klonlamada kolaylık sağlamıştır.



pET-14b vektöründe T7 ve *lac* promotorlarının yanı sıra; çoklu klonlama bölgesi, N-terminal His-Tag, trombin, ampicilin direnç, pBR322 ve f1 orijin bölgeleri de bulunmaktadır.

3.1.10. Kullanılan Saflaştırma Materyali

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

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

3.1.11. Kullanılan Bakteri Soyları

Tez çalışmasında *Geobacillus kaustophilus ftsH* geninin pET-14b vektörüne klonlanması sırasında *E. coli* JM109 hücre soyu kullanılmıştır. *E. coli* JM109 rekombinant DNA çalışmaları için oldukça kullanışlı bir soy olup bu bakteriler hücre içi endonükleaz A1 mutantıdır ve bu sayede hücrelerdeki plazmit kararlılığı oldukça yüksektir. Ayrıca *E. coli* JM109 hücrelerinde *hsdR17* mutasyonu ile *Eco*KI restriksiyon-modifikasyon sistemi ortadan kaldırılmıştır; böylece DNA'nın metilasyona bağlı yıkımı engellenmektedir. Bu hücrelerin diğer bir özelliği ise RecA mutantı olmalarıdır ve bu sayede homolog rekombinasyon, plazmit multimerizasyonu ve yapısal delesyonların oluşması engellenmektedir. *E. coli*

JM109 hücre kültür stokları % 20 gliserol içeren Luria Broth besiyerindeki -80 °C’de saklanmışlardır.

Tez çalışmasının daha sonraki basamağında *G. kaustophilus* FtsH proteazın yüksek oranda ekspresyonunun sağlanması amacıyla pET-14b/*ftsH* DNA’sı kompetan *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine aktarılmıştır. Laboratuvarımızda daha önceden de kullanılmış olan *E. coli* BL21 CodonPlus (DE3) hücreleri National Bio-Research Project, National Institute of Genetics (NIG) (Japan)’dan temin edilmiştir. Bu hücreler pET-14b gibi T7 promotörü kontrolü altında olan plazmitlerden yüksek oranda protein ekspresyonuna olanak sağlar. Ayrıca *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri bir dış membran proteaz kodlayan *ompT* geninde mutasyon taşırlar ve böylece eksprese olan rekombinant protein hücrede uzun süre istikrarlı kalır. Bu nedenle *E. coli* BL21 (DE3) protein ekspresyon çalışmalarında yüksek oranda tercih edilen bir hücre soyudur. Konakçı *E. coli* soylarında kaynak hücrelerde bulunan bazı tRNA’ların az miktarda bulunması heterolog proteinlerin ekspresyonunu sınırlamaktadır. BL21-CodonPlus (DE3) hücreleri bu nadir bulunan tRNA genlerinin fazladan kopyalarını taşırlar ve bu sayede hücrelerde oluşabilecek tRNA eksikliği engellenmiş olur. BL21-Codon Plus (DE3) hücreleri -80 °C’de bulunan gliserol stoklardan alınarak çoğaltılmışlardır. Bu bakteri soyu dışında ekspresyon çalışmalarında *E. coli* BL21 (DE3) Gold, *E. coli* XL-1 Blue, *E. coli* DH5α suşları da kullanılmıştır.

3.1.12. Kullanılan Besiyeri ve Çözeltiler

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

- Luria Broth (1 L, pH: 7.5)
 - Trypton: 10 g
 - Maya Özütü: 5 g
 - NaCl: 10 g

dH₂O ile 1 L’ye tamamlanır ve otoklavlanır.

- SOB Medyum (1 L)
 - Tripton: % 2
 - Maya Özütü: % 0.5
 - NaCl: 10 mM
 - KCl: 2.5 mM
 - MgCl₂: 10 mM
 - MgSO₄: 10 mM

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır ve otoklavlanır.

- SOC Medyum (1 L)
 - SOB medyuma son konsantrasyon 20 mM olacak şekilde Glikoz eklenir ve otoklavlanır.
- Ampisilin (5 ml, 100 mg/ml)
 - 0.5 g Ampisilin dH₂O ile 5 ml'ye tamamlanır. Filtreden geçirilerek sterilize edilir.
- Kanamisin (5 ml, 30 mg/ml)
 - 0.15 g Kanamisin dH₂O ile 5 ml'ye tamamlanır. Filtreden geçirilerek sterilize edilir.
- IPTG (100 mM, 10 ml)
 - 0.238 g IPTG 10 ml dH₂O ile çözülür. Filtreden geçirilerek sterilize edilir.
- Plazmit İzolasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar:
 - STET Tamponu (pH: 8.0)
 - Sükroz: % 8
 - Tritron X-100: % 5
 - EDTA: 50 mM
 - Tris: 50 mM

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır ve otoklavlanır.

- Lizozim (5 ml, 10 mg/ml)
 - 5 mg Lizozim 10 mM Tris-EDTA (pH: 8.0) içinde çözülür.
- Alkali Lizis- Solüsyon I (pH: 8.0)
 - Tris: 25 mM
 - Glikoz: 50 mM
 - EDTA: 10 mM

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır ve otoklavlanır.

- Alkali Lizis- Solüsyon II (1 L)
 - NaOH: 0.2 N
 - SDS: % 1

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır ve otoklavlanır.

- Solüsyon III (100 mL)
 - 5 M Potasyum Asetat: 60 ml
 - 43.5 M Glasiyal Asetik Asit: 11.5 ml
 - dH₂O: 28.5 ml

Solüsyon otoklavlanır.

- Kloroform-İzoamilalkol (50 ml)
 - Kloroform: 48 ml
 - İzoamilalkol: 12 ml
- Transformasyon İçin Kullanılan Solüsyon:
 - TSS Tamponu (pH: 6.5)
 - PEG (6000 g/mol): % 10
 - DMSO: % 5
 - MgCl₂: 50 mM

Solüsyon otoklavlanır.

- Ni-NTA Saflaştırma İçin Kullanılan Solüsyonlar:

- Lizis Tamponu (pH: 8.0)
 - NaH_2PO_4 : 50 mM
 - NaCl: 300 mM
 - İmidazol: 5 mM

Solüsyon otoklavlanır.

- Yıkama Tamponu (pH: 8.0)
 - NaH_2PO_4 : 50 mM
 - NaCl: 300 mM
 - İmidazol: 20 mM

Solüsyon otoklavlanır.

- Elüsyon Tamponu (pH: 8.0)
 - NaH_2PO_4 : 50 mM
 - NaCl: 300 mM
 - İmidazol: 250 mM

Solüsyon otoklavlanır.

- 200 mM MgCl_2 (50 ml)
 - 2.03 g MgCl_2 , dH_2O ile 50 ml'ye tamamlanır.

- İnküzyon Yapıları için Kullanılan Solüsyonlar:

- Buffer A Solüsyonu
 - DTT (taze): 1 mM
 - PMSF (taze): 1 mM
 - EDTA: 0.2 mM
 - NaCl: 1 M

- Tris, pH: 8.0, 50 mM
- Buffer B Solüsyonu
 - DTT: 1 mM
 - NaCl: 100 mM
 - EDTA: 0.2 mM
 - Üre: (X) M
 - Gliserol (v/v): % 10
 - PMSF: 1 mM
 - Tris, pH: 8.0, 50 mM
- AgaroZ Jel Elektforezi İçin Kullanılan Solüsyonlar:
 - 50X TAE Tamponu (1L)
 - Tris: 242 g
 - Glasiyal Asetik Asit: 57.1 ml
 - 0.5 M EDTA (pH: 8.0): 100 ml
 - % 0.8'lik AgaroZ Jel (40 ml)
 - AgaroZ: 0.32 g
 - EtBr (10µg/µl stoktan): 3 µl
 - 1X TAE Tamponu: 40 ml
- SDS-PAGE İçin Kullanılan Solüsyonlar:
 - 4X Örnek Tamponu (Laemmli Tamponu, pH: 6.8)
 - SDS: % 4
 - Gliserol: % 20
 - 2-merkaptoetanol: % 10
 - Bromofenol Mavisi: % 0.004
 - Tris HCl: 0.125 M

- 10X SDS Yürütme Tamponu (1 L)

- Tris: 151.5 g
- Glisin: 720 g
- SDS: 50 g

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.

- %30 Akrilamid-Bisakrilamid Solüsyonu (pH: 7.0)

- Akrilamid: 290 g
- N.N'-Metilbisakrilamid: 10 g

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır, +4 °C'de saklanır.

- Coomassie Blue Boyama Solüsyonu (1 L)

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

- Boyadan Arındırma Solüsyonu (1L)

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

- Western Blot için Kullanılan Solüsyonlar:

- Islak Transfer Tamponu

- Tris: 3.03 gr
- Glisin: 144 gr
- SDS: 1ml %10
- Metanol: % 10

Son hacim dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır ve otoklavlanır.

- 10X SDS-jel Elektroforez Tamponu

- Tris: 30.3 gr
- Glisin: 144 gr
- SDS: 10 gr

Son hacim dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır ve otoklavlanır. Kullanılırken 1X olarak seyreltilir.

- 10X TBS Tamponu

- Tris: 30 gr
- NaCl: 80 gr
- KCl: 2 gr

Son hacim 1 L'ye dH₂O ile tamamlanır pH: 8.0 olarak ayarlanır. Kullanılırken 1X olarak pH: 7.6 olarak ayarlanır.

- TBS-Tween Solüsyonu

- % 0.1'lik Tween-20, 1X TBS solüsyonuna eklenir.

- Bloklama Solüsyonu

- % 5 (w/v) yağsız süt tozu, % 0.1 Tween-20, 1X TBS içerisinde çözülerek taze hazırlandı.

3.1.13. Kullanılan Cihazlar

+4 °C ve -20 °C Buzdolabı (Arçelik), -80 °C derin dondurucu (Thermo, Forma - 86 °C ULT Freezer), Steril Kabin (Heraeus, HP48), Masa Üstü Santrifüj (Heraeus, Labofuge 400R), Ultrasantrifüj (Beckman Coulter™ Avanti™ J-30I Centrifuge), Masa Üstü Santrifüj (BECKMAN COULTER, Microfuge 22R), Spektrofotmetre (BIO-RAD, Smartspec 3000), Yatay Elektroforez Sistemi (BIO-RAD, Mini-Sab Cell CT), Güç kaynağı (BIO-RAD, PowerPac Basic), Otoklav (HIRAYAMA, HİCLA HVE-50), UV Görüntüleme Cihazı (Vilmer Loumart), Dikey Elektroforez Sistemi (Bio-Rad Mini-Sab Cell CT), UV Görüntüleme Cihazı (Vilmer Loumart),

Spektrofotometre (BIO-RAD, Smartspec 3000), BioSpec-nano (Shimadzu/biotech), pH Metre (Hana Instruments, pH 211 Microprocessor pH Meter), Su banyosu (TECHNE, TE-10A Tempette), Buz makinesi (BAR-LİNE BF85), Floresans Spektrofotometre (VARIAN, EClipse), UV Spektrofotometre (Beckman Coulter DU 530), Mikrodalga Fırın (Kumtel), Western Blot Transfer Tankı (Hoefer TE22), Western Blot Yürütme Tankı (Hoefer SE260), Western Blot Güç Kaynağı (Hoefer RS300 B), Jel Görüntüleme Cihazı (Biorad).

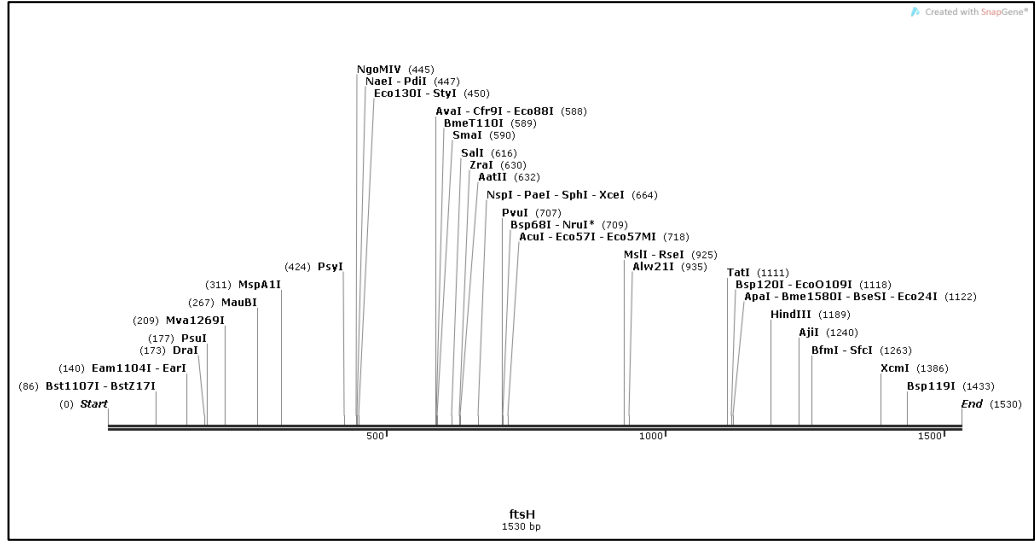
3.2. Yöntemler

3.2.1. *Geobacillus kaustophilus*'dan Kromozomal DNA İzolasyonu

Geobacillus kaustophilus kromozomal DNA'sı, Ronimus ve arkadaşlarının (1997) geliştirdiği yöntem kullanılarak izole edilmiştir. İzolasyondan sonra DNA örnekleri, TE tamponu (pH: 6-7) ile doyurulmuş fenol ile 1 kez, fenol:kloroform (1:1, v/v) karışımı ile 2 kez özütleme yapıldıktan sonra 1/10 hacminde 3 M sodyumasetat (pH: 5.2) ve % 99,9'luk etanol ile çöktürülmüş ve % 70'lik alkol ile yıkanmıştır. DNA konsantrasyonu, spektrofotometrik olarak 260 nm'de absorbans ölçümü yapılarak belirlenmiştir. DNA konsantrasyonu 1 A260 ünitesinin 50 µg/ml eşit olduğu kabul edilerek hesaplanmıştır. Protein içeriği ise OD260/OD280 oranı dikkate alınarak saptanmıştır [Sambrook ve ark., 1989].

3.2.2. *Geobacillus kaustophilus ftsH* Geninin Restriksiyon Enzim Haritasının Çıkartılması

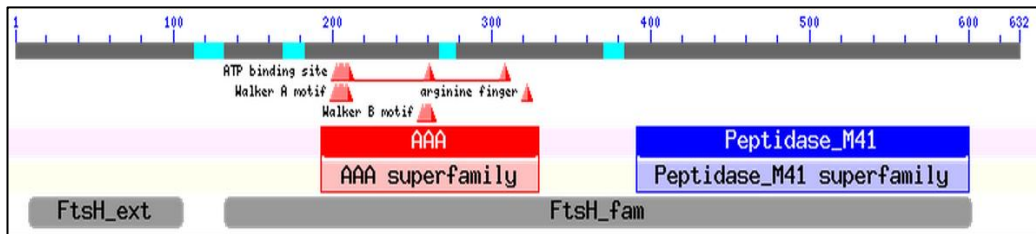
Geobacillus kaustophilus genomundaki (NCBI Gene Databank, NC_006510) *ftsH* geninin (*ftsH*, GeneID: 3183828) restriksiyon enzim haritası Snapgene programı ile hazırlanmıştır. Gen dizisindeki restriksiyon enzim kesim bölgeleri belirlendikten (Şekil 3.4) sonra klonlama ve ekspresyon çalışmaları için uygun vektör seçilmiş ve klonlanacak gen için bu vektörlerin çoklu klonlama bölgelerine eklenmesini sağlayacak ileri ve geri primerler tasarlanmıştır.



Şekil 3.4: *Gk-ftsH* geninin restriksiyon enzim haritası.

3.2.3. *Geobacillus kaustophilus ftsH* Geninin PCR ile Çoğaltılması

Klonlama ve ekspresyon çalışmalarında kullanılacak *ftsH* genine ait DNA fragmanları, *G. kaustophilus* DSM 7263^T’den elde edilen kromozomal DNA’nın kalıp olarak kullanıldığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır. *G. kaustophilus* HTA 426 genom dizisi (NCBI Gene Databank NC_006510) dikkate alınarak *ftsH* gen dizisini (Gene ID: 3183828) içeren bölgeyi çoğaltmak üzere primerler tasarlanmıştır (Tablo 3.1). *G. kaustophilus* HTA 426 *ftsH* geni 1898 bç uzunluğunda olup ilk 396 bç transmembran bölgeyi oluşturmaktadır (Şekil 3.5). Bu tez çalışmasında primerler *Gk-ftsH* geninin transmembran kısmı dışındaki proteaz aktivitesi gösteren sitoplazmik bölgeyi yani 393-1898 bç arasında yer alan bölgeyi çoğaltacak şekilde tasarlanmıştır.



Şekil 3.5: FtsH Proteazın transmembran ve sitoplazmik bölgeleri.

Oluşacak PCR ürününün vektör ile ligasyonu sağlaması için ileri ve geri primerlerin 5' ucuna, kullanılan ekspresyon vektörünün çoklu klonlama bölgesine uygun şekilde yerleştirmesini sağlayacak *NdeI* ve *BamHI* restriksiyon endonükleazlarına ait tanıma dizileri (*NdeI*-5'-CATATG-3' ve *BamHI*-5'-CCTAGG-3') eklenmiştir. Restriksiyon endonükleazların seçiminde, kullanılacak enzimlerin *ftsH* geninde kesim yapmamasına ve vektörün çoklu klonlama bölgesinde kesim bölgesinin olmasına dikkat edilmiştir. Ayrıca primer tasarımı primerlerin 5' ucuna enzimlerin kesim aktivitesini arttırmak için eklenecek bazlar NEBbiolabs firmasının (Cleavage Close to the End of DNA Fragments) kataloğundan bakılarak seçilmiştir.

Tablo 3.1: PCR için tasarlanan primerler.

PRİMERLER	RESTRİKSİYON ENDONÜKLEAZ
5'-CGCGGATCCTTACTCCTCTTTCTTTTGGATGTT-3'	<i>BamHI</i> -HF (geri primer)
5'-GGGAATTCATATGTTTATTTTGTCTTCTTCCTT-3'	<i>NdeI</i> (ileri primer)

PCR reaksiyon karışımı 50 µl 1X PCR tamponunda (750 mM Tris-HCl, pH: 8.8; 200 mM (NH₄)₂SO₄; % 0,1 Tween 20), 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, (her birisi için) 10 µmol ileri ve geri primerler, 2.5 U *Taq* DNA Polimeraz (MBI Fermentas AB, Vilnius Lithuania) ve 20 ng kalıp DNA içermektedir. Reaksiyon, bir termal döngü (MJ Research INC, PTC-200 USA) cihazında toplam 35 döngü olarak yürütülmüştür. 35 kez tekrarlanan bir PCR döngüsündeki aşamalar şöyledir; denatürasyon için 94 °C'de 1 dakika, primer bağlanması için 60 °C'de 1 dakika ve polimerizasyon için 72 °C'de 2 dakika. Reaksiyon, başlangıçta 94 °C'de 2.5 dakikalık denatürasyon döngüsü başlatılmış ve 72 °C'da 10 dakikalık ek bir polimerizasyon döngüsü ile tamamlanmıştır.

PCR ürünleri % 1'lik agaroz jel elektroforezi ile gözlenmiştir. DNA fragmanlarının büyüklüğü 1 kb moleküler DNA belirteci (MBI Fermentas, 1 kb DNA marker, O'GeneRuler™ 1 kb, SM0311) standart olarak kullanılarak belirlenmiştir. Jel fotoğrafları, jel dökümasyon sistemi kullanılarak görüntülenmiştir.

3.2.4. PCR Ürününün Agaroz Jelden Saflaştırılması

PCR ile çoğaltılan *ftsH* genine ait DNA fragmanı, % 1'lik agaroz jelle yüklenmiş ve jeldeki fragman yaklaşık bir saat 85 V'da elektroforez ile yürütülmüştür. Elektroforezden sonra, jel görüntüleme cihazı (UV ışık altında) ile görüntülenen uygun bantlar steril bistüri ile kesilerek ependorf tüplere aktarılmıştır. Kesilen jel parçacıklarında bulunan DNA fragmanını saflaştırmak için Jelden DNA Saflaştırma Kiti kullanılmıştır (GeneJET™ PCR Purification Kit, Fermentas). Üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde saflaştırılan DNA, konsantrasyonu ölçüldükten sonra -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.5. PCR ile Çoğaltılan *G. kaustophilus ftsH* Geninin Klonlanması

3.2.5.1. PCR Ürününün ve Klonlama Vektörünün Ligasyona Hazırlanması

Jelden izole edilen *Geobacillus kaustophilus ftsH* geninin, pET-14b ekspresyon vektörüne ligasyonunu sağlamak amacıyla PCR fragmanları primere eklenen restriksiyon kesim bölgelerinden *NdeI* ve *BamHI* restriksiyon enzimleriyle kesilmiştir. Bu sayede PCR fragmentlerinde yapışkan uçlar oluşturulmuştur (Tablo 3.2).

Tablo 3.2: *Gk-ftsH* PCR fragmanı için hazırlanan restriksiyon endonükleaz reaksiyonu.

Restriksiyon Bileşenleri	Son Konsantrasyon
<i>Gk-ftsH</i> PCR ürünü	6500ng
<i>NdeI</i> (NEBbiolabs)	20 ünite
<i>BamHI</i> (NEBbiolabs)	20 ünite
Tampon 4 (NEBbiolabs)	1X
dH ₂ O	1.5 µl
TOPLAM	75 µl

NdeI ve *BamHI* enzimleri için tek reaksiyonda ortak tampon olan Tampon 4 (NEBbiolabs, Buffer4) kullanılmıştır. Kesim işlemi 37 °C’de su banyosunda 2.5 saat inkübe edildikten sonra reaksiyon karışımı % 1’lik agaroz jele yüklenmiştir. Elde edilen DNA fragmanlarının büyüklüğü, 1 Kb moleküler DNA belirteci ile karşılaştırılarak doğrulanmıştır. Jelden izole edilen DNA fragmanları klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere -20 °C’de saklanmıştır.

PCR ürününün klonlanacağı pET-14b/*adh* vektörü *BamHI* ve *NdeI* restriksiyon endonükleazlar ile tek reaksiyonda kesilmiştir (Tablo 3.3).

Tablo 3.3: pET14b/*adh* vektörü için hazırlanan restriksiyon endonükleaz reaksiyonu.

Restriksiyon Bileşenleri	Son Konsantrasyon
pET14b/ <i>adh</i> plazmit DNA	6300 ng
<i>NdeI</i> (NEBbiolabs)	100 ünite
<i>BamHI</i> (NEBbiolabs)	100 ünite
Tampon 4 (NEBbiolabs)	1X
dH ₂ O	2.5 µl
TOPLAM	75 µl

Reaksiyon ürünü % 0.8’lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiş ve moleküler büyüklükleri 1Kb moleküler DNA belirteci ile karşılaştırılarak doğrulanmıştır. Restriksiyon endonükleazlarla doğrusal hale getirilmiş pET-14b plazmiti jelden DNA saflaştırma kiti kullanılarak saflaştırılmıştır. Ayrıca yaklaşık 1500 bp uzunluğundaki *adh* geni jelde görülmüştür. Saf olarak elde edilen doğrusal pET-14b plazmit DNA’sı ligasyon reaksiyonunda kullanılmak üzere -20 °C’de saklanmıştır.

3.2.5.2. Ligasyon Protokolü

NdeI ve *BamHI-HF* restriksiyon endonükleazları ile kesilen *Gk-ftsH* geni aynı restriksiyon enzimleri ile kesilip doğrusal hale getirilen pET-14b vektörüne aktarılmıştır. Bunun için hazırlanan reaksiyon karışımı 2X ligasyon tamponu içerisinde 100 ng pET-14b plazmit DNA’sı, 300 ng PCR fragmanı ve 3 U T4 DNA Ligaz içeren reaksiyon karışımları +16 °C’de gece boyunca inkübe edilmiştir.

Ligasyon reaksiyonu hazırlanırken insert ve vektör oranları 1:3, 1:5 ve 1:8 olacak şekilde kurulmuş ve hesaplamaları aşağıdaki verilen formül baz alınarak yapılmıştır (Denklem 3.1).

$$\text{ng (insert)} = \frac{\text{ng (vektör)} \times \text{insert bç}}{\text{vektör bç}} \quad (3.1)$$

3.2.5.3. Transformasyon

Klonlama çalışmalarında konakçı olarak *E. coli* JM109 hücreleri kullanılmıştır. Hücrelerinin kompetan hale getirilmesi ve transformasyonu için Chung ve arkadaşları (1989) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Bu prosedüre göre, kompetan hale getirilecek hücreler 5 ml sıvı LB'ye ekilmiş ve gece boyu inkübe edilmiştir. Ertesi gün 100 µl'lik önkültür, 10 ml'lik taze sıvı LB'ye ekilmiştir. Hücrelerin büyüme miktarları spektrofotometre ile 600 nm'de ölçülerek, istenilen OD değerine (0.4-0.5) gelmesi beklenmiştir. Kültür istenilen OD'ye gelince +4 °C'de 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. OD ölçümlerinden sonra kalan kültür hacminin % 10'u kadar TSS eklenmiş ve pellet buz içinde çözüldükten sonra hücreler transformasyon için kullanılmıştır.

Daha önce buzda tutulup soğutulan eppendorf tüplere ligasyon reaksiyonundan 10 µl konulduktan sonra yeni hazırlanan kompetan *E.coli* JM109 hücrelerinden 50 µl eklenmiştir. Tüpler yavaşça karıştırıldıktan sonra buz da 30 dakika bekletilmiş ve hemen ardından hücrelere 42 °C'de 45 saniyelik ısı soku uygulanmış ve buzda 2 dakika bekletilmiştir. Her bir tüpe 950 µl SOC medyum eklenip 37 °C'de, 150 rpm'de 80 dakika inkübe edilmiştir. Transformasyonun ardından seyreltilen hücreler LB/Ampisilin (50 µg/ml amp) içeren besiyerine tek koloniler elde etmek üzere ekilmişlerdir. 37 °C'de gece boyu inkübasyondan sonra LB/Ampisilin (50 µg/ml amp) içeren besiyerinde üreyen olası rekombinant hücreler toplanmış ve yeni ortama çizilerek saf kültür hazırlanmıştır. Bu kültürlerden miniprep yöntemi ile plazmit izolasyonu yapılmış [Sambrook et. al., 1989] ve elde edilen plazmitler *NdeI* ve *BamHI-HF* restriksiyon endonükleazları ile kesilerek rekombinant plazmiti içeren koloni tespit edilmiştir.

3.2.5.4. Rekombinant Kolonilerden Plazmit İzolasyonu

pET-14b/*ftsH* plazmitini taşıyan rekombinant koloniden Mini Plazmit İzolasyon Kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen rekombinant plazmitler uygun restriksiyon endonükleazlar (*BamHI-NdeI*) ile kesilerek irdelenmiştir. Agaroze jel elektroforezi ile doğrulanan, *ftsH* genini taşıyan pET-14b/*ftsH* plazmiti, ekspresyon ve saflaştırma çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2.6. *ftsH* Geninin pET-14b/*ftsH* Plazmitindeki Varlığının İspatlanması

pET14b ekspresyon vektörüne klonlanan *ftsH* geninin vektör üzerindeki varlığı; enzim kesim reaksiyonu, plazmit üzerinden *ftsH* geninin PCR ile çoğaltılması ve dizi analizi yöntemleri ile doğrulanmıştır.

3.2.6.1. Rekombinant pET-14b/*ftsH* Plazmitinin Restriksiyon Endonükleaz ile Kesimi

Olası rekombinant plazmit (pET14b/*ftsH*) *E. coli* JM109 hücrelerinden Mini Plazmit İzolasyon Kiti (High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche) kullanılarak izole edilmiştir. Seçilen *E. coli* JM109 hücrelerinin *ftsH* genini taşıdıkları tek (pET-14b/*ftsH* *BamHI-HF* ya da *NdeI*) ve çift (pET14b/*ftsH* *BamHI-HF* ve *NdeI*) restriksiyon endonükleaz kesimleri ile belirlenmiştir. Tek enzim kesimleri için 100 ng pET-14b/*ftsH* DNA'sı, 1X tampon (Buffer 4), 20 U endonükleaz *NdeI* içeren 10 µl'lik reaksiyon karışımı 37 °C'de 2 saat boyunca kesilmiştir. Çift kesim reaksiyonu için ise 100 ng pET-14b/*ftsH* DNA'sı, 1X tampon (Buffer 4), 20 U endonükleaz *NdeI* ve 20 U endonükleaz *BamHI-HF* içeren 10 µl'lik reaksiyon karışımı 37 °C'de 2 saat boyunca kesilmiştir. Kesim reaksiyonu bittikten sonra reaksiyon karışımı % 0.8'lik agaroz jele, moleküler DNA belirteci varlığında yüklenmiş ve 85 V'da 1 saat yürütülerek genin varlığı UV altında görüntülenmiştir.

3.2.6.2. *ftsH* Geninin Rekombinant pET-14b/*ftsH* plazmitinden PCR ile oğaltılması

Rekombinant pET-14b/*ftsH* plazmiti kalıp olarak kullanılarak *ftsH* geni PCR reaksiyonu ile çoğaltılmıştır. PCR’da primer olarak *G. haustophilus ftsH* geni için hazırlanan ileri ve geri primerler kullanılmıştır (Tablo 3.4).

Tablo 3.4: Rekombinant plazmitler için hazırlanan PCR reaksiyonu.

PCR Bileşenleri	Son Konsantrasyon
pET14b/ <i>ftsH</i> , pET14b/ <i>adh</i>	100 ng
İleri Primer	2 µM
Geri Primer	2 µM
dNTP Karışımı	0.2 mM
MgCl ₂	2.5 mM
Taq DNA Polimeraz Tamponu	1X
Taq DNA Polimeraz	2.5 Ünite
Deiyonize Su	10.5 µl
TOPLAM	20 µl

35 kez tekrarlanan PCR döngüsündeki aşamalar şöyledir; denatürasyon için 94 °C’de 1 dakika, primer bağlanması için 60 °C’de 1 dakika ve polimerizasyon için 72 °C’de 2 dakika. Reaksiyon, başlangıçta 94 °C’de 2.5 dakikalık denatürasyon döngüsü başlatılmış ve 72 °C’de 10 dakikalık ek bir polimerizasyon döngüsü ile tamamlanmıştır.

3.2.6.3. Klonlanan *ftsH* Geninin Nükleotid Dizisinin Belirlenmesi

E. coli JM109 hücrelerine transforme edilen pET-14b/*ftsH* rekombinat plazmitindeki *ftsH* geninin nükleotid dizisi Sagem Hayat Teknolojileri Ltd. Şti. firmasına yaptırılan dizi analizi ile belirlenmiştir.

3.2.7. pET-14b/*ftsH* Rekombinant Plazmitin *E. coli* BL21 (DE3) Hücrelerine Transforme Edilmesi

E. coli JM109 hücrelerinden izole edilen pET-14b/*ftsH* DNA'sı *ftsH* geninin ekspresyonu için uygun konakçı olan *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine aktarılmıştır. Transformasyon için yukarıda anlatıldığı şekilde Chung ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem (1989) kullanılarak *E. coli*, BL21 (DE3) hücreleri kompetan hale getirilmiştir. Kompetan hücrelere pET-14b/*ftsH* DNA'sının aktarımı ısı şoku transformasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Gece boyu büyütülen transformant BL21 (DE3) hücrelerinden olası klonlar seçilmiştir.

Seçilen BL21 hücrelerinin *ftsH* genini taşıdıkları tek (pET-14b/*ftsH* *Bam*HI-*HF* ya da *Nde*I) ve çift (pET-14b/*ftsH* *Bam*HI-*HF* ve *Nde*I) restriksiyon endonükleaz kesimleri ile belirlenmiştir. Tek enzim kesimleri için 60 ng pET-14b/*ftsH* DNA'sı, 2X tampon (Buffer4), 20 U endonükleaz *Bam*HI-*HF* içeren 10 µl'lik reaksiyon karışımı 37 °C'de 2 saat boyunca kesilmiştir. Çift enzim kesimlerinde ise 90 ng pET-14b/*ftsH* DNA'sı 2X Buffer 4, 20 U endonükleaz *Bam*HI-*HF*, 20 U endonükleaz *Nde*I içeren 10 µl'lik reaksiyon karışımı 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Kesim reaksiyonları sona erdikten sonra reaksiyon karışımı % 0.8'lik agaroz jele 1 kb moleküler DNA belirteci varlığında yüklenmiş ve klonlamanın doğruluğu enzim kesimleri ile de kesinleştirilmiştir.

3.2.8. FtsH Proteaz Enziminin Ekspresyonu ve Saflaştırılması

pET-14b plazmiti üzerinde *Gk-ftsH* genini içeren rekombinant BL21 (DE3) *E.coli* hücreleri ampisilin (50 µg/ml amp) içeren sıvı LB'de gece boyu büyütüldükten sonra 1/20 oranında taze LB besiyerine ekilmişlerdir. İkincil kültürler 37 °C'de, 200 rpm'de, optik yoğunlukları 600 nm'de 0.6'ya gelene kadar büyümeye bırakılmışlardır. Kültürler istenen OD değerine ulaştığı zaman kültür son konsantrasyonu 0.4 mM olacak şekilde IPTG ile uyarılmıştır. Kültürlerden her saat başı 1'er ml örnek alınarak 37 °C'de, 200 rpm'de 4 saat büyütülmüştür. Kontrol grubu olarak *ftsH* geni içermeyen *E. coli* hücreleri benzer şekilde 0.4 mM IPTG ile uyarılarak 4 saat büyütülmüştür. Kültürlerin IPTG ile uyarılmasından önceki ve sonraki protein ekspresyon profilleri % 12'lik SDS-PAGE'de gözlenmiştir.

Rekombinant 6xHis-FtsH proteinini bulunduran hücre özütleri Ni^{2+} -Nitrilotriasetik asit (Ni-NTA) kolonunda immobilize metal afinite kromatografisi ile tek basamakta üreticinin önerdiği şekilde saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Hücre özütleri 0.45 μm filtreden geçirildikten sonra her 4 ml hücre özütü için 1 ml olacak şekilde Ni-NTA agaroz rezin ile karıştırılmış ve +4 °C'de 200 rpm'de 1 saat çalkalanmıştır. Ni-NTA ile karışmış hücre özütü kolona yüklenmiştir ve kolon 20 mM imidazol içeren 4 ml yıkama tamponu ile 2 kez yıkanarak bağlanmayan proteinlerin tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ni-NTA'ya bağlanmış 6xHis-FtsH proteinlerinin elde edilmesi için kolondan 250 mM imidazol içeren elüsyon tamponu geçirilmiştir. Saflaştırmadan sonra toplanan fraksiyonlar 280 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülmüştür. FtsH proteazın saflaştırma profili SDS-PAGE ile görüntülenmiştir.

3.2.9. mRNA analizi

pET-14b plazmiti üzerinde bulunan *ftsH* geninin transkribe olup olmadığını belirlemek amacıyla total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılmıştır. Bunun için pET-14b plazmiti üzerinde *Gk-ftsH* genini içeren rekombinant *E.coli* BL21 (DE3) hücreleri ampicilin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ amp) içeren 3 ml sıvı LB'de 225 rpm'de 30 °C gece boyu büyütüldükten sonra 1/20 oranında taze 50 ml LB (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amp) besiyerine ekilmiştir. Aynı şekilde kontrol olarak pET-14b plazmiti üzerinde *Gk-ftsH* genini içermeyen *E.coli* BL21 (DE3) hücreleri kullanılmıştır. İkincil kültürler 37 °C'de, 225 rpm'de, optik yoğunlukları 600 nm'de 0.6'ya gelene kadar büyümeye bırakılmışlardır. Kültürler istenen OD değerine ulaştığı zaman son konsantrasyonu 0.4 mM olacak şekilde IPTG ile uyarılmıştır. Örnekler 3 saat 37 °C'de 225 rpm'de inkübasyona bırakılmış, inkübasyon sonunda her 2 kültürden 1 ml örnek alınarak innuPREP RNA Mini Kit kullanılarak total RNA izolasyonu yapılmış, bu izolasyon neticesinde rekombinat BL21 (DE3) hücrelerinden elde edilen total RNA miktarı nanodrop cihazında ölçülmüştür.

Elde edilen total RNA'lardan daha sonra cDNA Sentez Kiti kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. cDNA sentezlerinin ardından her 2 örnek için *Gk-ftsH* genini çoğaltmak için kullandığımız PCR reaksiyonu kullanılmıştır (Tablo 3.5). PCR

reaksiyonu sonucunda örnekler % 1'lik agaroz jelde 1,5 saat yürütülerek görüntülenmiştir.

Tablo 3.5: Total RNA'dan cDNA sentezi için hazırlanan PCR reaksiyonu.

PCR Bileşenleri	Son Konsantrasyon
cDNA (2 örnek)	~ 90 ng
İleri Primer	2 µM
Geri Primer	2 µM
dNTP Karışımı	0.2 mM
MgCl ₂	2.5 mM
Taq DNA Polimeraz Tamponu	1X
Taq DNA Polimeraz	2.5 ünite
Deiyonize Su	-
TOPLAM	20 µl

3.2.10. İnküzyon Yapılarının İzolasyonu ve Protein Eldesi

SDS-PAGE'de protein ekspresyonu gözlenmeyen ancak transkripsiyonu tespit edilen rekombinant FtsH proteininin hücrede inküzyon yapısı oluşturabileceği düşüncesiyle BL21 (DE3) hücrelerinden inküzyon yapılarının izolasyonu ve protein elde edilmesi yoluna gidilmiştir. Bu amaçla 2 ml LB olacak şekilde hazırlanan BL21 hücreleri ve 2 ml LB (50µg/mlamp) rekombinant BL21 (DE3) pET-14b/*ftsH* hücreleri bir gece öncesinden 220 rpm'de 30 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün hücreler 500 ml LB ve 500 ml LB (50 µg/ml Amp) olacak şekilde büyük ölçeğe geçilmiştir. Bu aşamada önkültür taze besiyerlerine inoküle edilmiştir. Hücreler 220 rpm'de 37 °C'de büyütülmüş OD_{600nm} 0.55 değeri spektrofotometrede ölçüldüğünde ortama son konsantrasyonu 0.4 mM olacak şekilde IPTG eklenmiştir ve 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonunun sonucunda her 2 kültürde 7000 rpm'de 10 dakika +4 °C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak her 500 ml kültürden elde edilen pelet için üzerine 15 ml soğuk Buffer A ve 100 µl (10 µg/ml) lizozim eklenip pelet pipetleme yapılmak suretiyle çözündürülmüş, 15 dakika buzda inkübe edilmiştir. Elde edilen her 2 örnekte 5 saniyede 8 kez % 30 altitute olacak şekilde sonikasyona maruz bırakılmıştır.

Sonikasyondan sonra hücreler 90000 X g'de +4 °C'de 30 dakika santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırılmıştır. Elde edilen hücre peletlerine son konsantrasyonu 1 M olacak şekilde üre içeren Buffer A eklenip peletler pipetleme yapmak suretiyle çözülmüş ve 5 saniye süreyle sonikasyon yapılmıştır. Örneklerin içerisinde pelet bulunmasını önlemek amacıyla örnekler 18 gauge şırıngalar kullanılarak pipetleme yapmak suretiyle muamele edilerek +4 °C'de 100 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası örnekler 90000 X g'de +4 °C'de 30 dakika santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırılmıştır. Elde edilen peletlere son konsantrasyonu 6 M üre olacak şekilde Buffer A eklenip peletler pipetleme yapmak suretiyle çözülmüş ve +4 °C'de 100 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyona sonrasında örnekler 90000 X g'de +4 °C'de 30 dakika santrifüj edilip süpernatantlar toplanmıştır. Süpernatantlar sırasıyla son konsantrasyonları 4 M, 2 M, 1 M olacak şekilde Buffer B çözeltilerinde ve sonrasında üre içermeyen Buffer B çözeltisinde 50:1 oranında olmak üzere 2.5 saat süreyle diyaliz edilmiştir. Bu süreç sonrasında elde edilen örnekler % 12'lik SDS-PAGE'de yürütülmüştür.

3.2.11. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

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

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

grafik ile yerleştirilmiştir ve bir standart eğri oluşturulmuştur. Proteinlerin moleküler büyüklüklerinin hesaplanması için bu eğri kullanılmıştır.

3.2.12. Western Blot Analizi

pET-14b/*ftsH* plazmitini taşıyan ve taşımayan BL21 (DE3) hücrelerinden inklüzyon yapılarının izolasyonu sonucunda inklüzyon oluşturan protein yapıları açılmış, sonrasında Western Blot analizi için kullanılmıştır. Bu amaçla eşit hacimde 20 µl olarak alınan örnekler aynı hacimde % 5 β-merkaptoetanol içeren 5X SDS jel elektroforez tamponunda 100 °C’de 5 dk maruz bırakılmış ve 2 dk buzda inkübasyona yapılarak 5 dk santrifüj yapılmıştır. Her 2 örnekte SDS jel elektroforezinde 30 dk. 90 V ve sonrasında 120 dk 120 V’da yürütülmüştür. Elde edilen jel Immobilon-P PVDF transfer membranına 70 dk 400 mA’de transfer edilmiştir. Transfer edilen membran % 0.01 TSB-Tween içeren % 5 yağsız süt tozunda +4 °C’de gece boyu inkübasyona bırakılarak bloklama yapılmıştır. Ertesi gün membrana birincil antikor olan Anti-his anti-mouse monoklonal antikor eklenerek 2 saat boyunca 100 rpm’de oda sıcaklığında inkübasyon yapılmış, bu sürenin sonunda % 1’lik TSB-Tween solüsyonunda 4x10 dk (5dk, 15dk, 5dk, 5 dk) yıkama yapılmıştır. İlk yıkamanın ardından ikincil antikor olan anti-mouse IgG HRP-linked antibody eklenerek +4 °C’de 2 saat 100 rpm’de inkübasyona bırakılmış, bu sürenin sonunda 3x10 dk (5dk, 5dk, 5dk) olacak şekilde % 1’lik TSB-Tween solüsyonunda yıkama yapılmıştır. Örnekler Signal Fire™ ECL Reagent çözeltisinden 1:1 eklenerek görüntülenmiştir.

3.2.13. Gk-FtsH Peptidaz Aktivitesinin Tayini

Saflaştırılmış 6xHis ekli *G. kaustophilus* FtsH proteinin *in vitro* ortamda peptidaz aktivitesinin belirlenmesi için bir florojenik peptit olan Suc-leu-leu-val-tyr-AMC (succinyl-leu-leu-val-tyr-7-amino-4-methylcoumarin) kullanılmıştır. 5 µg FtsH proteaz, toplam hacim 100 µl olacak şekilde 50 mM Tris-HCl içeren deney tamponunda, 5 mM MgCl₂, 25 µM Zn(C₂H₃O₂).2H₂O, 50 mM KCl ile birlikte, 5 mM ATP varlığında ve yokluğunda, 10 dakika oda sıcaklığında ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Peptidaz aktivitesi, son yoğunluğu 0.3 mM olacak şekilde substrat

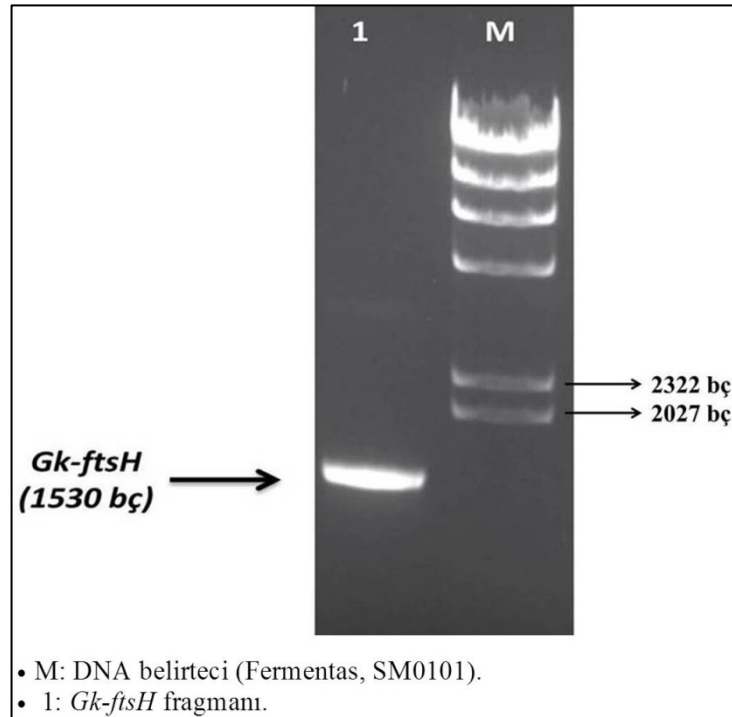
ilavesi ile başlatılmıştır. 55 °C’de 20 dakika süre ile gerçekleştirilen reaksiyon, 900 µl % 1 SDS eklenmesi ile durdurulmuştur. Serbest kalan MNA miktarı 335 nm eksitasyon ve 415 nm emisyon dalga boyunda floresans spektrofotometrede ölçülmüştür.

4. BULGULAR

4.1. *G. kaustophilus ftsH* Geninin PCR ile Çoğaltılması ve PCR Fragmanının Klonlanması

4.1.1. *ftsH* Geninin *G. kaustophilus*'dan PCR ile Çoğaltılması

Transmembran segmenti içermeyen *ftsH* geni, *Geobacillus kaustophilus* DSM 7263^T genom dizisine göre hazırlanan ileri ve geri primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. 110 ng/μl kalıp DNA kullanılarak yapılan PCR çalışması sonucunda 55 °C tutunma sıcaklığında ~1530 bç uzunluğunda özgül bir *ftsH* fragmanı gözlemlenmiştir (Şekil 4.1).

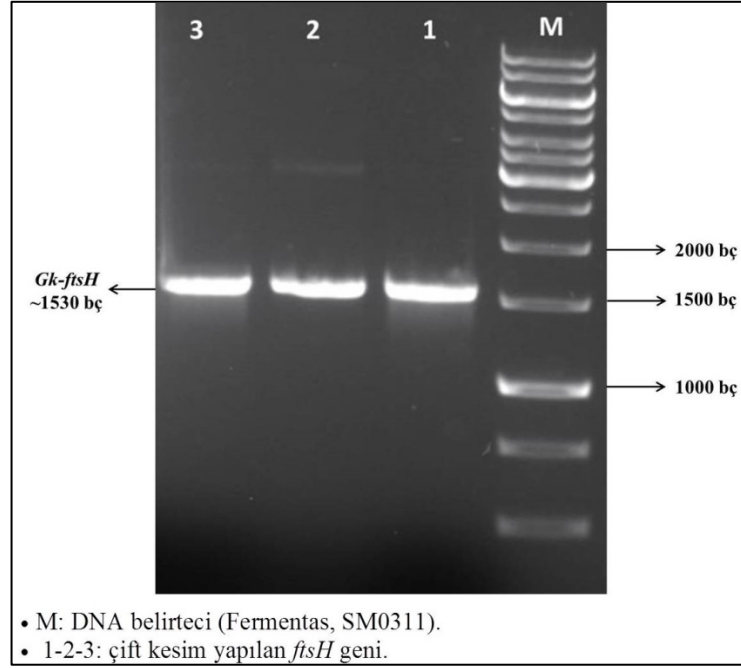


Şekil 4.1: PCR ile çoğaltılan *ftsH* geninin % 1'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.

4.1.2. PCR Ürününün ve Vektörün Ligasyona Hazırlanması

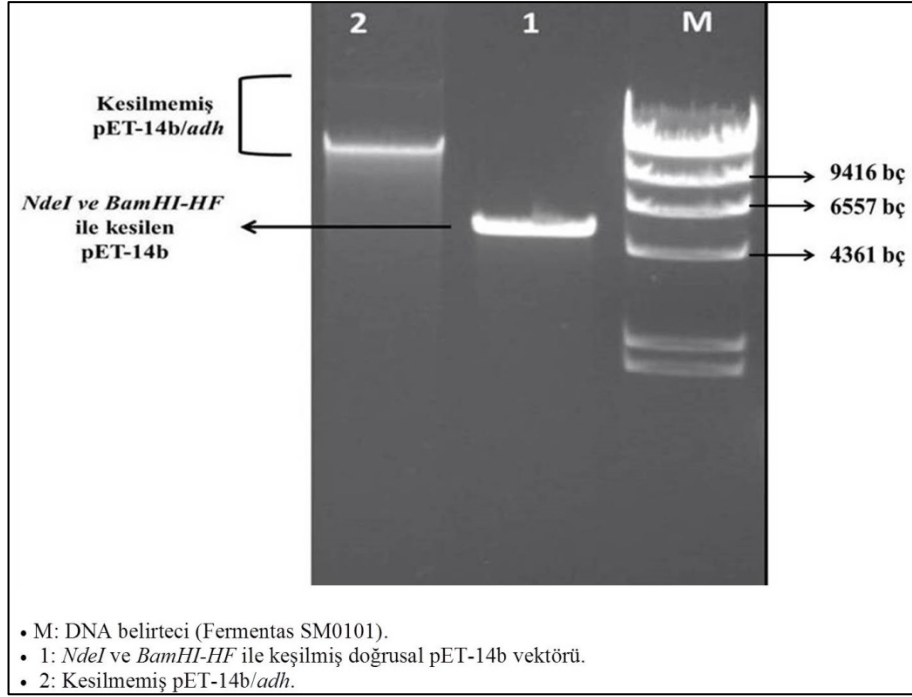
PCR ile çoğaltılan *Gk-ftsH* geni klonlama amacıyla sırasıyla 5' ve 3' uçlarından *NdeI* ve *BamHI* için kesim bölgelerinden yapışkan uçlar oluşturmak üzere *NdeI* ve *BamHI-HF* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmiş ve yapışkan

uçlara sahip ~1530 bç uzunluğundaki PCR ürünü jelden saflaştırma kiti ile saflaştırılmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: *NdeI* ve *BamHI-HF* restriksiyon enzimleri ile çift kesimi yapılan *Gk-ftsH* geninin saflaştırma sonrası görüntüsü.

Klonlama, ekspresyon ve saflaştırma basamaklarında sağladığı kolaylık dolayısıyla seçilen pET-14b vektörü, *NdeI* ve *BamHI* enzim kesim bölgelerinden klonlanmış *adh* geni taşımaktadır. *ftsH* gen fragmanının klonlanması için kullanılan pET-14b/*adh* vektörü (~6171 bç), *NdeI* ve *BamHI-HF* enzimleri ile kesilerek yapışkan uçlar içeren doğrusal DNA haline getirilmiş böylece yaklaşık 1500 bç içeren *adh* (alkol dehidrojenaz) geni ve 4671 bç içeren pET14b vektörü birbirinden ayrılmıştır. Daha sonra restriksiyon enzimleri ile yapılan kesimlerden elde edilen yapışkan uçlara sahip doğrusal pET-14b DNA'sı jelden kit ile saflaştırılmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: pET-14b/*adh* ekspresyon vektörünün *NdeI* ve *BamHI-HF* restriksiyon enzimleriyle kesimleri sonucu oluşan DNA fragmanının % 1'lik agaroz jelde görüntüsü.

4.1.3. *G.kaustophilus ftsH* Geninin pET-14b Vektörüne Ligasyonu ve Transformasyonu

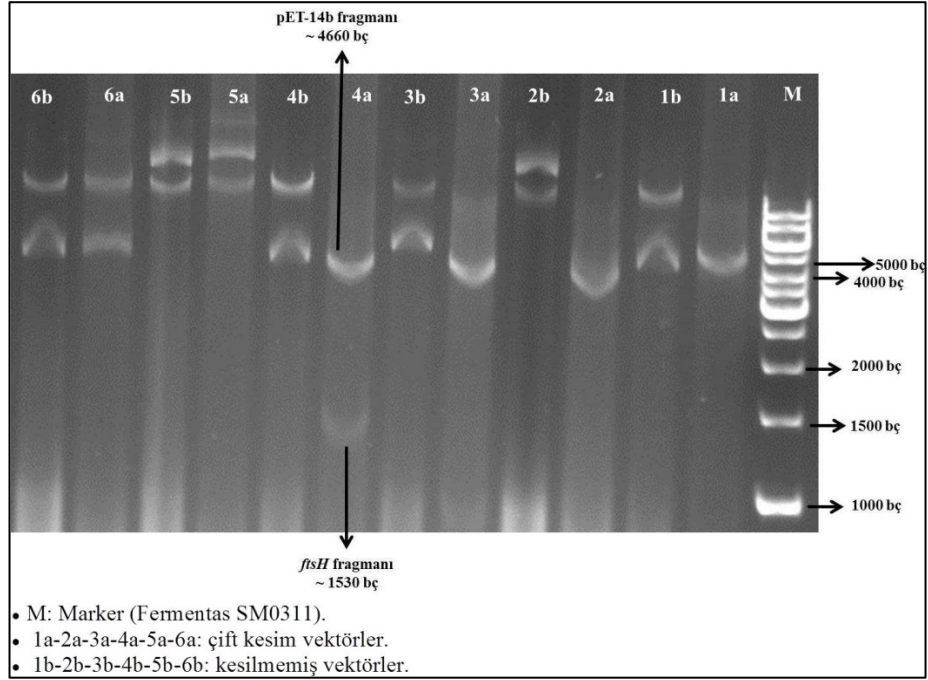
PCR ile çoğaltılan, 5' ve 3' uçları sırasıyla *NdeI* ve *BamHI-HF* restriksiyon enzimleri için kesim bölgeleri içeren ~ 1530 bç uzunluğundaki, transmembran segmenti içermeyen *ftsH* gen fragmanı, aynı kesim bölgelerinden kesilmiş, yaklaşık 4671 bç uzunluğundaki pET-14b ekspresyon vektörüne ligasyon ile bağlanmıştır. Elde edilen rekombinant pET-14b/*ftsH* vektörü kompetan *E.coli* JM109 hücrelerine aktarılmıştır.

4.1.4. *E. coli*'ye Aktarılan pET-14b/*ftsH* Rekombinantının Doğruluğunun Belirlenmesi

4.1.4.1. Enzim Kesimi

Ligasyon reaksiyonları sonucunda 1:5 oranında (insert/vektör) olacak şekilde ligasyon reaksiyonu hazırlanan ve *E. coli* JM109 hücrelerine transformasyonu yapılan petride yaklaşık 150 koloni elde edilmiştir. Bu kolonilerden rasgele seçilen

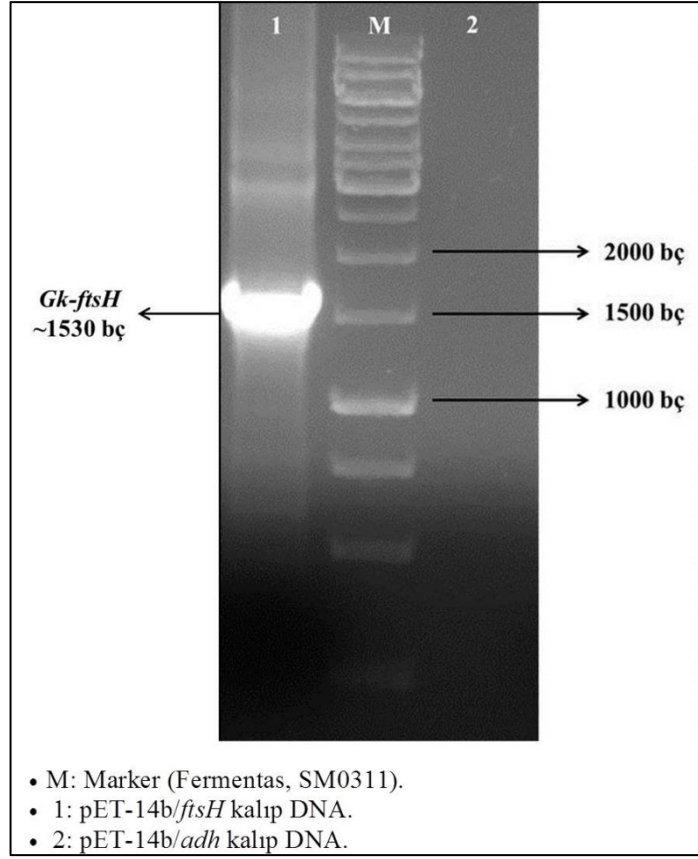
örneklerden yapılan miniprep sonucunda (Şekil 4.4) elde edilen DNA örnekleri *NdeI* ve *BamHI-HF* restriksiyon endonükleazlar ile çift kesim reaksiyonları ile kesilmiş *ftsH* fragmanını taşıyan kolonide ~1500 bç uzunluğunda *ftsH* fragmanı ve ~4660 bç uzunluğunda pET-14b fragmanı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.4: Miniprep yöntemi ile izole edilen vektörlerin *NdeI* ve *BamHI-HF* enzimleri ile çift kesimi sonucu oluşan DNA fragmanının % 1'lik agaroz jelde görüntüsü.

4.1.4.2. pET-14b/*ftsH* Rekombinant Plazmitinden *ftsH* geninin PCR Reaksiyonu ile Çoğaltılması

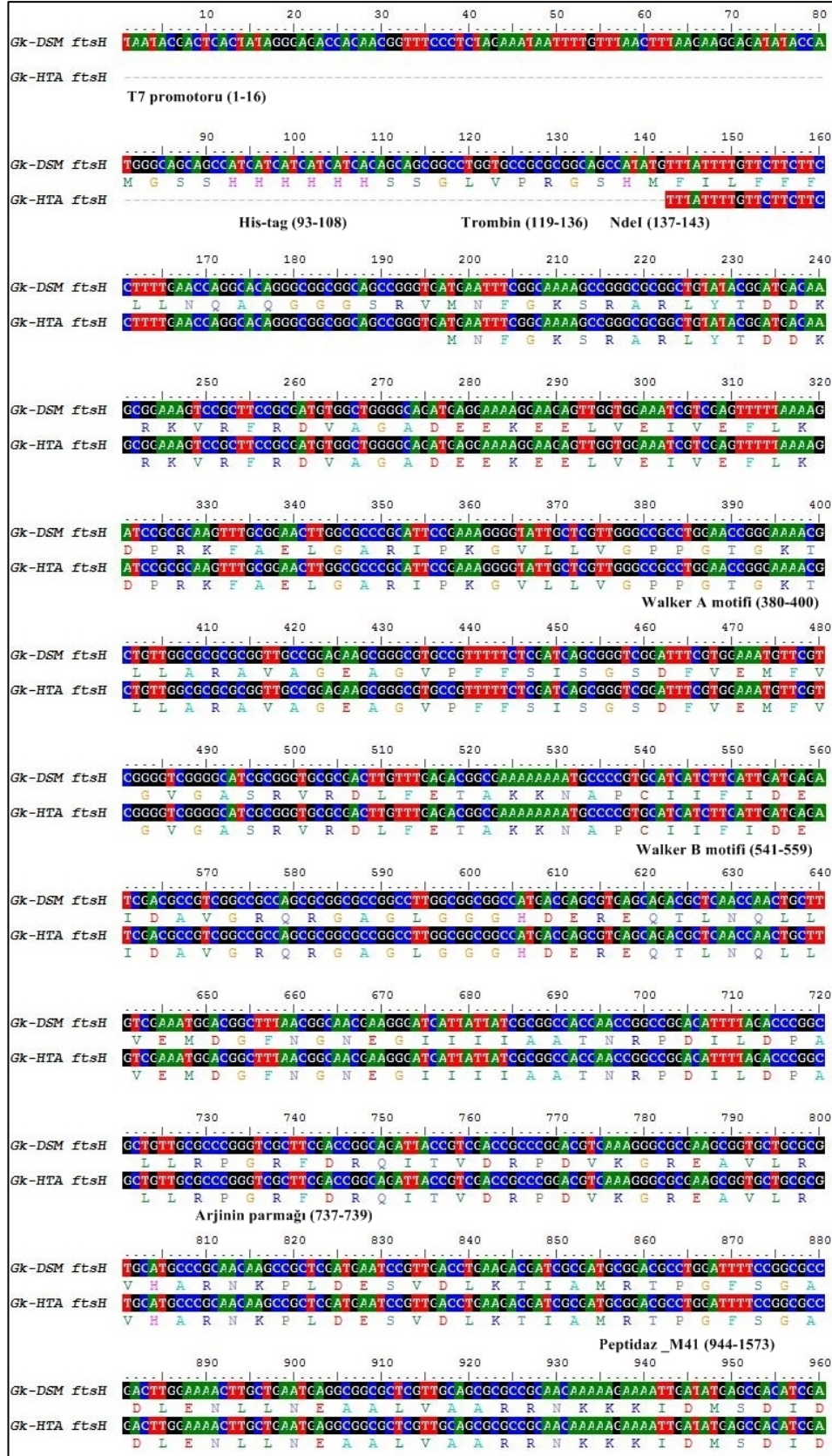
ftsH geninin pET-14b/*ftsH* vektörü üzerindeki varlığı çift kesim restriksiyon endonükleaz kesimleri ile doğrulandıktan sonra pET-14b/*ftsH* rekombinant plazmiti Mini Plazmit İzolasyon Kiti (High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche) kullanılarak izole edilmiştir. Daha sonra *ftsH* geni, pET-14b/*ftsH* (100 ng/μl) kalıp olarak kullanılarak PCR reaksiyonu ile çoğaltılmıştır. Kontrol olarak *ftsH* geni içermeyen pET-14b/*adh* rekombinat plazmiti kullanılmıştır. pET-14b/*ftsH* plazmitinin kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonları sonucunda ~1500 bç büyüklüğünde DNA fragmenti gözlemlenirken pET-14b/*adh* plazmitinin kalıp olarak kullanıldığı reaksiyonda herhangi bir bant gözlemlenmemiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: pET-14b/*ftsH* ve pET-14b/*adh* rekombinant plazmitlerinin kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyon ürünlerinin % 1'lik agaroz jeldeki görüntüleri.

4.1.4.3. Klonlanan *ftsH* Geninin Nükleotit Dizininin Belirlenmesi

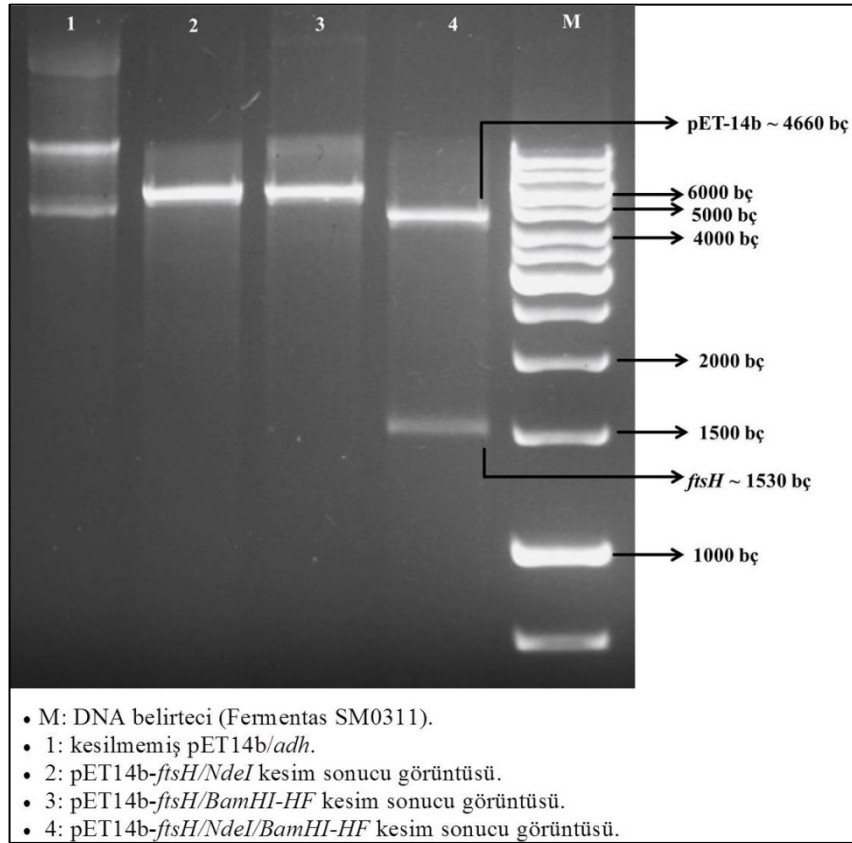
Dizi analizi sonucunda *Gk-ftsH* geninin pET-14b vektörüne doğru bir biçimde (in frame) yerleştiği gösterilmiştir. Nükleotit dizisi tespit edilen *G. kaupstophilus* DSM 7263^T *ftsH* gen dizisinin Takami ve arkadaşları tarafından rapor edilen *G. kaupstophilus* genomundaki (NCBI Gene Databank NC_006510) gen dizisi ile % 99 uygunluk göstermiştir. 2 dizi arasındaki benzerlik Bioedit Sequence Alignment Editor programı kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: *Gk-ftsH* DSM 7263T ve *Gk-ftsH* HTA 426 nükleotid dizilerinin karşılaştırılması.

4.1.5. Rekombinant pET-14b/*ftsH* Plazmitinin Ekspresyon Hücrelerine Transformasyonu

Elde edilen rekombinant pET-14b/*ftsH* plazmiti, gen ekspresyonu için daha uygun olan *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine aktarılmıştır. *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine aktarılan pET14b/*ftsH*, Mini Plazmit İzolasyon Kiti (High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche) kullanılarak izole edilmiş ve elde edilen rekombinat plazmit (100 ng/μl) *NdeI* ve *BamHI-HF* enzimleriyle tek kesim ve çift kesim yapılarak % 1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir. pET14b/*ftsH* plazmitinin *NdeI* ve *BamHI-HF* enzimleriyle tek kesim reaksiyonları neticesinde yaklaşık 6200 bç uzunluğunda bir fragment gözlenirken aynı vektörün *NdeI* ve *BamHI-HF* enzimleriyle çift kesim reaksiyonu neticesinde yaklaşık 1500 bç uzunluğundaki *ftsH* geni ve yaklaşık 4600 bç uzunluğundaki pET14b agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.7).

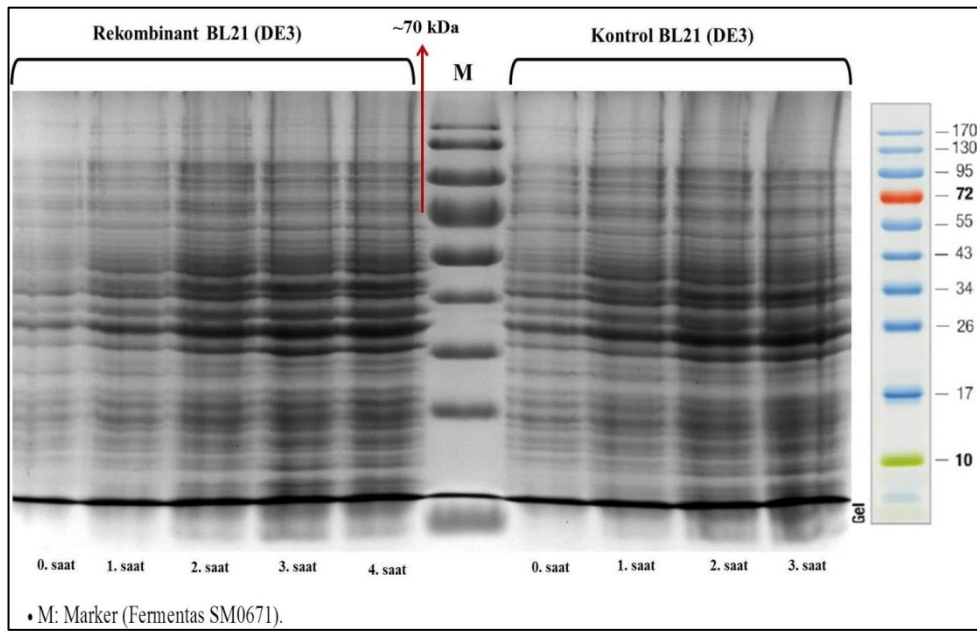


Şekil 4.7: *NdeI* ve *BamHI-HF* restriksiyon enzimleri ile kesilen pET14b-*ftsH* vektörünün % 1'lik agaroz jeldeki görüntüsü.

4.1.6. FtsH Proteazın *E. coli* BL21 (DE3) Hücrelerinde Ekspresyonu ve Ni-NTA Kolon Kullanılarak Saflaştırılması

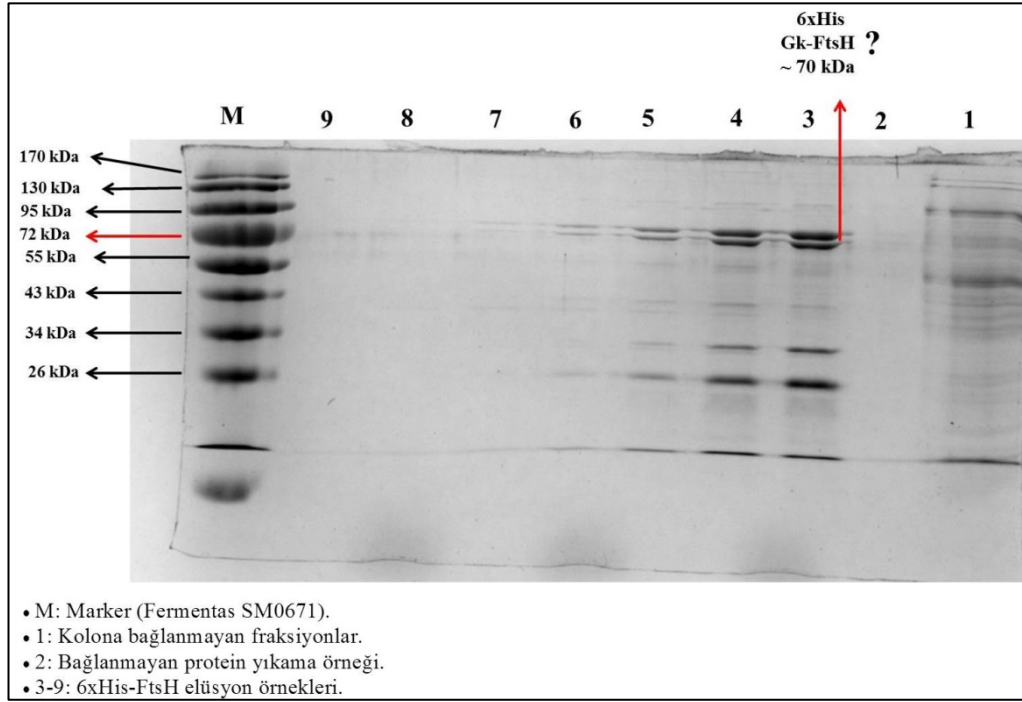
pET-14b ekspresyon vektörüne klonlanan çinko metalloproteaz FtsH geninin *E. coli* BL21(DE3) konakçı hücresinde ekspresyon deneyi gerçekleştirilmiş ancak N-terminalinde 6xHistidin içeren yaklaşık 70 kDa büyüklüğünde olması beklenen FtsH proteini SDS-PAGE jel görüntüsünde gözlenmemiştir (Şekil 4.8).

pET-14b/*ftsH* plazmiti içeren rekombinant BL21(DE3) hücreleri ile yaptığımız ekspresyon çalışmalarında sıcaklık, IPTG ve Zn^{2+} gibi çeşitli parametrelerinin değiştirilmesine rağmen SDS-PAGE analizlerinde olumlu bir sonuç elde edilmemiştir. Ayrıca pET14b/*ftsH* rekombinant plazmiti *E. coli* BL21 Gold, XL-1 Blue, DH5 α , JM109 hücrelerine transforme edilmiş ancak ekspresyon çalışmaları sonuç vermemiştir.



Şekil 4.8: Rekombinant ve kontrol BL21(DE3) hücrelerinin *ftsH* ekspresyonu.

ftsH geninin, pET-14b/*ftsH* plazmiti içeren rekombinant BL21(DE3) hücrelerinde SDS-PAGE’de gözlenmeyecek ölçüde eksprese olabileceği düşünülerek afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Bu amaçla, amino terminalinde 6xHis rezidü içeren *G. kaustophilus* FtsH proteini bir immobilize metal afinite kromatografi yöntemi (IMAC) olan Ni-NTA kullanılarak saflaştırma işlemi yapılmıştır. Saflaştırmadan sonra toplanan fraksiyonlar SDS-PAGE’de yüklenmiştir.



Şekil 4.9: 6xHis-FtsH proteinlerinin saflaştırılması.

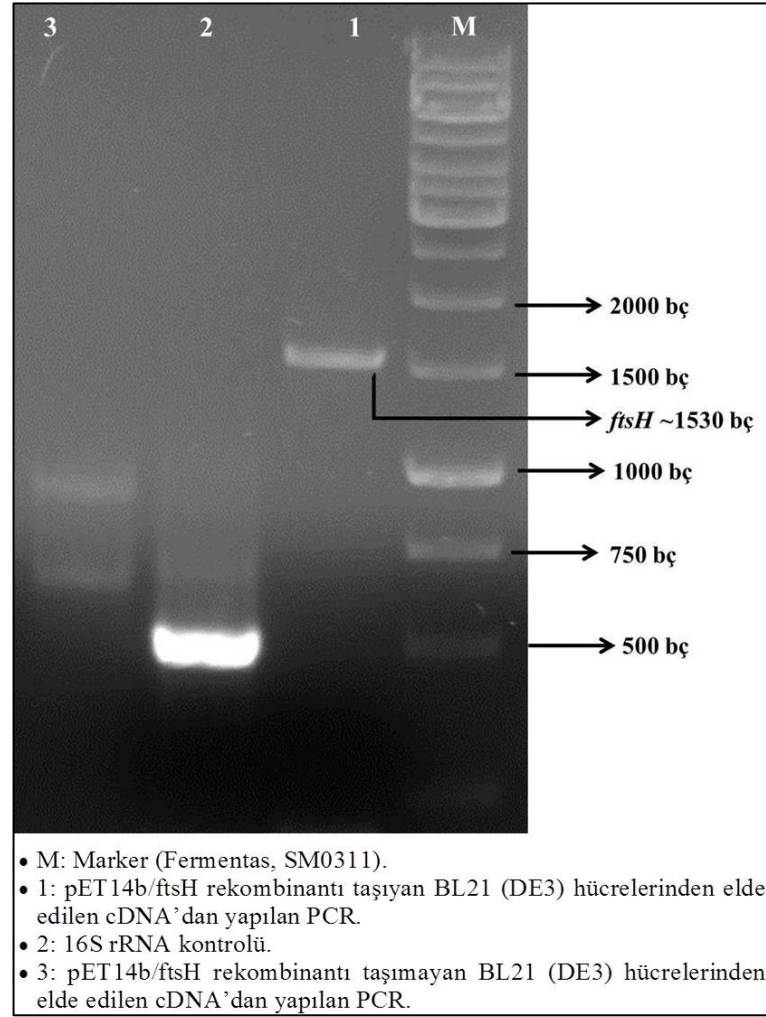
Saflaştırma işlemi sonunda N-terminalinde 6xHistidin içeren yaklaşık 70 kDa büyüklüğünde FtsH proteini SDS-PAGE jel görüntüsünde gözlenmiştir (Şekil 4.9). Bu örnekler daha sonra enzim aktivite deneyinde ve Western Blot analizinde kullanılmak üzere -20 °C'ye kaldırılmıştır.

4.1.7. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Rekombiant *ftsH* geninin ekspresyon çalışmalarında SDS-PAGE'de belirgin bir sonuç alamadığımız için pET-14b plazmiti üzerinde bulunan *ftsH* geninin transkribe olup olmadığını belirlemek amacıyla total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılmıştır.

pET-14b/*ftsH* plazmitini içeren BL21 (DE3) ve bu plazmiti taşımayan kontrol grubu olan BL21 (DE3) hücrelerinden innuPREP RNA Mini Kit kullanılarak total RNA izolasyonu ve cDNA Sentez Kiti kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. Elde edilen cDNA'lar kullanılarak Gk-*ftsH* genini çoğaltmak için kullanılan PCR reaksiyonu hazırlanmış ve elde edilen sonuçlar % 1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.10). pET-14b/*ftsH* taşıyan BL21 (DE3) hücrelerinden elde edilen cDNA'nın

kullanıldığı PCR reaksiyonunda ~ 1500 bp uzunluğunda *ftsH* fragmanı gözlenirken, *Gk-ftsH* geni taşımayan *E. coli* BL21 (DE3) kontrol grubu ile yapılan PCR reaksiyonunda *ftsH* fragmanı gözlemlenmemiştir. Ayrıca 16S rRNA primerleri kullanılarak total cDNA'dan PCR yapılarak RNA izolasyonu ve PCR reaksiyonlarının doğruluğu gösterilmiştir.

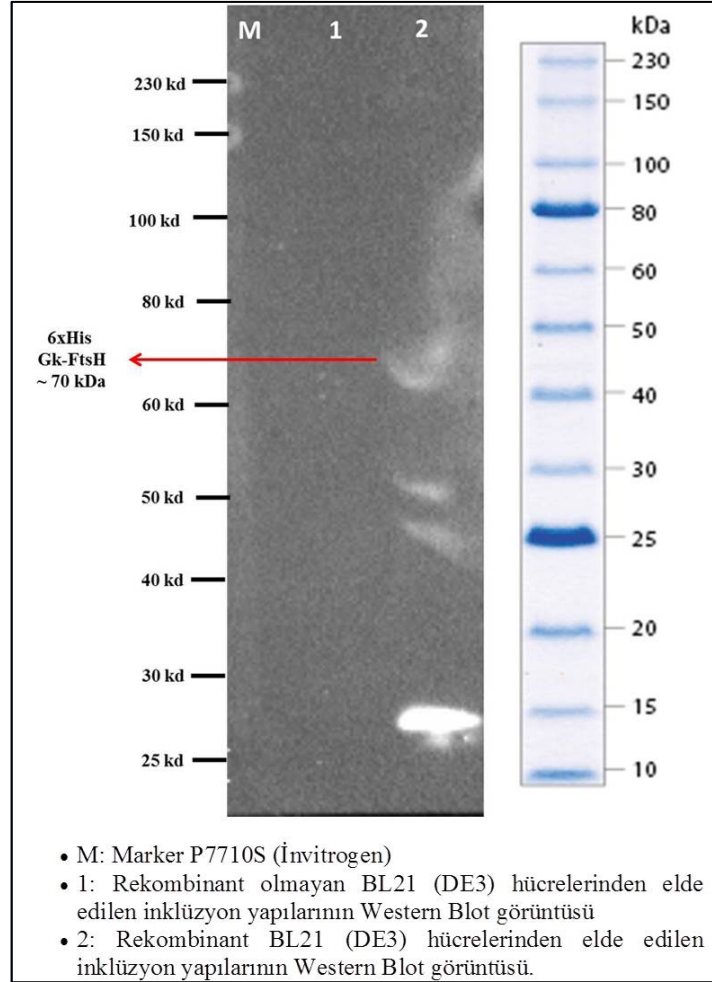


Şekil 4.10: cDNA sentezi sonrasında yapılan PCR görüntüsü.

4.1.8. Western Blot Analizi

Gk-ftsH geninin hem ekspresyon hem de inklüzyon deneylerinin SDS-PAGE analizlerinde belirgin olarak FtsH bandı görülmemiştir. Bunun üzerine transkripsiyonel düzeyde N-terminalindeki 6xHistidin ile birlikte ifade edilen *ftsH* geninin düşük düzeyde eksprese olabileceği düşüncesiyle Westen Blot analizi yapılmıştır. Bu çalışmada hem saflaştırma hem de inklüzyon çalışmalarından elde

ettiğimiz örnekler kullanılmış ve örneklerin His-tag antikoru ile hibridizasyonuna bakılmıştır. Elde ettiğimiz Western Blot analizi sonuçlarına göre FtsH proteini olabileceğini düşündüğümüz yaklaşık 70 kDa büyüklüğünde bant ile birlikte farklı büyüklüklerde 3 bant gözlemlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: Rekombinant ve rekombinant olmayan BL21 (DE3) hücrelerinden izole edilen inklüzyon yapılarının Western Blot yöntemi sonucu elde edilen görüntüsü.

4.1.9. Gk-FtsH Peptidaz Aktivitesi

Saflaştırılan 6xHis-FtsH proteinin in vitro’da aktif peptidaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla daha önceki çalışmalarda FtsH tarafından etkin olarak yıkıma uğratıldığı belirlenen florojenik bir substrat olan Suc-leu-leu-val-tyr-AMC (succinyl-leu-leu-leu-val-tyr-7-amino-4-methylcoumarin) kullanılmıştır. Reaksiyonlar gereç ve yöntemlerde belirlenen koşullarda oluşturulmuş ve FtsH proteazın, ATP varlığı ve

yokluğunda peptit yıkım aktivitesi incelenmiştir. Aynı zamanda bir protein substrat olan α -kazein kullanılarak peptidaz aktivitesi incelenmiştir. Ancak her iki substratla da enzimatik aktivite gözlenmemiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

ATP-bağımlı proteazlar yanlış katlanmış proteinlerin ya da kısa ömürlü düzenleyici proteinlerin yıkımını katalizleyerek gen ekspresyonunun düzenlenmesi, protein kalite kontrolü ve çevresel koşullara göre hücre içi protein seviyelerinin düzenlenmesi gibi birçok hücrel süreçte rol oynamaktadırlar. ATP-bağımlı FtsH proteaz enziminin birçok organizmada bulunması ve hücrede homeostaside görev alan önemli bir regülatör olması, bu enzimin yapı ve fonksiyonlarının çalışılmasını cazip hale getirmektedir. Bu enzim hücrede kloroplastta, hücre membranında ve mitokondride membrana bağlı halde bulunan bir çinko metaloproteaz olup substratları sitoplazmik ve membran proteinleridir [Tomoyasu et al., 1993]. FtsH proteazın kısa olan N-terminal bölgesi membrana demirlenmiş olarak bulunurken uzun olan C-terminal bölgesi sitoplazmaya doğru uzanmış konumdadır. Bu proteazın sitoplazmik bölgede yer alan C-terminalinde ATPaz ve proteolitik bölgelerini içeren yaklaşık 520 rezidülük kısım bulunmaktadır [Tomoyasu et al., 1993].

FtsH proteazın çeşitli fonksiyonları ve yapısal özellikleri şimdiye kadar farklı birçok organizmada çalışılmış olmakla beraber bu tez çalışmasında FtsH proteaz ilk kez *Geobacillus kaustophilus* DSM 7263^T suşunda çalışılmıştır. Bu çalışmada, FtsH proteazın proteolitik ve ATPaz aktivitesinin detaylı olarak çalışılması amaçlanmıştır. Bu amaçla hücre membranının sitoplazmik kısmında yer alması, eksprese edilen proteinin tekrar membrana bağlanmasının engellemesi ve proteinin saflaştırılmasında kolaylık sağlaması amacıyla *ftsH* geninden transmembran bölge çıkarılmıştır. Öncelikle *Geobacillus kaustophilus* HTA 426 genom dizisi (NCBI Gene Databank NC_006510) dikkate alınarak 1899 bp uzunluğunda olan *ftsH* geninin transmembran bölgeyi oluşturan ilk 369 baz çifti içeren bölgesi çıkarılmıştır. Bu doğrultuda transmembran bölgeyi içermeyen 1530 bp'lik gen bölgesini çoğaltacak ileri ve geri primerler tasarlanmıştır.

PCR ile çoğaltılan ve 5' ve 3' ucunda sırasıyla *NdeI* ve *BamHI* enzim kesim bölgeleri içeren *Geobacillus kaustophilus* DSM 7263^T *ftsH* DNA fragmanı ilk olarak pET-28a vektörüne klonlanmak istenmiştir. Ancak aynı enzimlerle çeşitli sürelerde kesilmiş olan *Gk-ftsH* ve pET-28a fragmanı farklı oranlarda insert/vektör oranı içeren ligasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiş ancak başarılı ligasyon elde edilmemiştir. Yine aynı işlemler aynı enzim kesim bölgelerine sahip pET-22b

vektörü ile denenmiş ancak ligasyon gözlemlenmemiştir. Son olarak, klonlama çalışması için yine bir pET vektörü olan ancak *BamHI* ve *NdeI* enzim kesim bölgelerinden bağlanmış yaklaşık 1500 bp uzunluğunda *adh* geni içeren pET-14b vektörü kullanılmıştır. Bu vektör üzerindeki *BamHI* ve *NdeI* kesim bölgelerine sahip *adh* geni çıkarılarak *Gk-ftsH* geni başarıyla *E. coli* JM109 hücrelerine klonlanmıştır. pET-28a vektöründe *BamHI* (198) ve *NdeI* (238) enzim kesim bölgeleri arasında 40 baz bulunurken pET-22b vektöründe ise *NdeI* (288) ve *BamHI* (198) enzim kesim bölgeleri arasında 90 baz bulunmaktadır. Yaptığımız ligasyon deneylerinde vektör üzerinde çift enzim kesim bölgelerinin arasındaki baz sayısının az olmasının enzim kesimi üzerinde olumsuz bir etki olduğu düşünülmüştür. Yaptığımız literatür çalışmasında Shang ve ark. tarafından 2014 yılında yapılan bir çalışma bu düşüncemizi destekler niteliktedir. Bu çalışmada, en yaygın olarak kullanılan 13 restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılmış ve enzim kesim bölgeleri arasındaki mesafenin 500 bp'den az olduğu durumda enzim kesiminin DNA konsantrasyonuna bağlı olarak azaldığı görülmüşken, 500 bp'den fazla mesafede DNA konsantrasyonunun etkisi olmaksızın enzim kesiminin arttığı görülmüştür [Shang et al., 2014].

pET14b ekspresyon vektörüne klonlanan *Gk-ftsH* geninin vektör üzerindeki varlığı; enzim kesim reaksiyonu, plazmit üzerinden *ftsH* geninin PCR ile çoğaltılması ve dizi analizi yöntemleri ile doğrulanmıştır. *BamHI* ve *NdeI* enzimleri ile yapılan kesim reaksiyonları sonucunda yaklaşık 4660 bp uzunluğundaki pET-14b vektörü ve yaklaşık 1530 bp uzunluğundaki *ftsH* fragmanları gözlemlenmiştir. Ayrıca rekombinant plazmit üzerinden yapılan PCR sonucunda yaklaşık 1530 bp uzunluğundaki *ftsH* geninin varlığı gösterilmiştir. pET-14b vektörüne aktardığımızı düşündüğümüz *Gk-ftsH* geninin doğru bir biçimde (in frame) yerleştiğini belirlemek amacıyla yapılan dizi analizi sonucunda, klonlanan *Gk-ftsH* geninin Takami ve arkadaşları tarafından rapor edilen *G. kaustophilus* genomundaki (NCBI Gene Databank NC_006510) FtsH gen dizisi (Gene ID: 3183828) ile % 99 uygunluk gösterdiği tespit edilmiştir.

pET-14b vektörü üzerinde varlığı tespit edilen *Gk-ftsH* geni ekspresyon çalışmaları için *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine transforme edilmiştir. *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine aktarılan ve *ftsH* genini içeren pET-14b vektörü ekspresyonu T7 promotoru kontrolü altındadır. T7 promotorunun ardında bulunan T7 RNA polimeraz ekspresyonu IPTG ile uyarılmıştır ve böylece ortaya çıkan T7 RNA polimerazın *Gk-*

ftsH genini eksprese etmesi beklenmiştir. Rekombinant *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri IPTG ile uyarıldıktan sonra farklı zamanlarda örnekler alınmış ve *Gk-ftsH* geni taşımayan kontrol grubu ile birlikte SDS-PAGE jelde görüntülenmiş ancak ekspresyon düzeyinde belirgin bir farklılık görülmemiştir. Aynı çalışma IPTG konsantrasyonunun, inkübasyon sıcaklığının ve konak hücrenin değiştirilmesi ile tekrar edilmiştir fakat sonuç değişmemiştir.

pET-14b/*ftsH* vektörünü içeren rekombinant *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinde *Gk-ftsH* geninin ekspresyon çalışmalarından bir sonuç alamadığımız için *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinde pET-14b plazmiti üzerinde bulunan *ftsH* geninin transkribe olup olmadığını belirlemek amacıyla total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılmıştır. Kalıp olarak cDNA örneklerinin kullanıldığı PCR’da kromozomal *Gk-ftsH* genini çoğaltmak için ileri ve geri primerler kullanılmıştır. PCR reaksiyonları sonucunda rekombinant olmayan kontrolü ile karşılaştırıldığında yaklaşık 1530 bp uzunluğundaki *ftsH* geninin transkripsiyonel olarak ifade edildiği gösterilmiştir.

Aktif olarak transkribe edilen *ftsH* geninin translasyonu sonucunda oluşan polipeptit zincirinden aktif proteinin oluşabilmesi için doğru bir biçimde katlanması gerekmektedir. Çeşitli stres şartları altında bozulan proteinler inklüzyon yapısı adı verilen “amorf protein granülü” olarak adlandırılan yapıları oluşturma eğilimindedirler [Villaverde and Carrio, 2003]. Inklüzyon cisimciklerinin yapısı ve oluşum mekanizması ile ilgili bilgiler kısıtlıdır. Inklüzyon cisimcikleri genellikle strese karşı bir cevap oluşturulurken yüksek oranda rekombinant proteinlerin eksprese olduğu durumlarda oluşan kompleks yapıli agregatlardır. Özellikle *E. coli*’de sitoplazma içerisinde 200-300 mg/ml konsantrasyonda oluşan yüksek düzeyde rekombinant protein ekspresyonu, istenmeyen protein katlanmalarına sebep olabilmektedir (Van den Berg et al. 2004). *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine klonladığımız *Gk-ftsH* geninin ekspresyon sonrası hücrede inklüzyon yapısı oluşturabileceğinden dolayı rekombinant *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinden kontrol grubu ile birlikte inklüzyon izolasyonu yapılmış ve bu yapılarda protein eldesi sağlanmıştır. Ancak elde ettiğimiz proteinlerin SDS-PAGE jel analizinde beklenen düzeyde bant görülmemiştir.

E. coli BL21 (DE3) hücrelerine aktarılan pET14-b/*ftsH* vektörünün üzerinde bulunan *ftsH* geninin transkripsiyonel olarak ifade edildiği görülmüştür ancak ekspresyon çalışmalarında SDS-PAGE jel üzerinde istenilen düzeyde bant görülmemesi üzerine Nikel-Nitrilotriasetik Asit (NTA) agaroz IMAC ile *Gk-ftsH*

proteininin saflaştırılması yoluna gidilmiştir. Ni-NTA polihistidin kuyruk taşıyan proteinlerin bakteriyel lizatlardan saflaştırılması için kullanılan bir metal afinite kromatografi matriksi olup bu matrikste bulunan Ni^{2+} iyonları saflaştırılacak hedef proteinlere ekli halde bulunan histidin aminoasitlerine kovalent olarak bağlanmakta ve 6xHis kuyruğu bağlı proteinlerin kolonda bağlı kalmasını sağlamaktadır. Kolonda tutunmuş proteinler histidin rezidülerine karşı daha yüksek afinite gösteren imidazol içeren elüsyon tamponları ile kolondan indirilmektedir. pET-14b vektörü üzerine aktarılan *ftsH* geni önünde bulunan 6xHis yapısı nedeniyle eksprese olan füzyon proteinde histidin etiketli olacağından Ni^{2+} -NTA İMAC yöntemi ile *Gk-6xHis-ftsH* füzyon proteininin saflaştırılması işlemi kontrol grubu ile birlikte yapılmış, elde edilen örnekler SDS-PAGE analizinde görüntülenmiştir. Yapılan analizde yaklaşık 70 kDa ağırlığında Gk-FtsH ile aynı büyüklükte bant gözlemlenmiştir.

pET-14b vektörü üzerine aktarılan *ftsH* geni önünde bulunan 6xHis yapısı nedeniyle eksprese olan proteinde histidin etiketli olacağından histidin antikoru kullanılarak inklüzyon yapılarından elde edilen proteinler ve Ni^{2+} -NTA İMAC ile saflaştırılan örnekler Western analizinde kullanılmıştır. Kontrol grubu ile birlikte yapılan Western analizinde inklüzyon yapılarından elde edilen proteinlerin kullanıldığı negatif kontrolde herhangi bir bant gözlemlenmezken rekombinant hücrelerden yapılan analizde istediğimiz ve FtsH proteaz olduğunu düşündüğümüz ~70 kd ağırlığında bant görüntülenmiştir. Aynı analiz Ni^{2+} -NTA İMAC ile saflaştırılan örneklerde de yapılmıştır ancak hem rekombinant hem de kontrol grubunda bant gözlemlenmemiştir.

Inklüzyon izolasyonundan elde edilen ve Ni^{2+} -NTA İMAC ile saflaştırılan proteinler için, flourojenik bir substrat olan N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-Methylcoumarin kullanılarak FtsH proteazın peptidaz aktivitesine bakılmış ancak aktivite gözlemlenmemiştir. Makino ve ark. tarafından 1999 yılında yapılan bir çalışmada, *E. coli* K-12 suşundaki transmembran bölgesi çıkarılmış FtsH proteazda proteolitik aktivitenin çok az ya da olmadığını göstermişlerdir [Makino, 1999]. Buna karşın Bieniossek ve arkadaşları tarafından 2006 yılında *Thermotoga maritima*'da yapılan çalışmada 2 transmembran heliks çıkarılarak yapılan çalışmada *Gk-FtsH* proteaz aktivitesi gözlemlenmiştir. Bu durum *in vitro*'da FtsH proteaz enziminin transmembran segmentinin enzimin aktivitesi üzerindeki etkisinin türlere göre değişebileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

Akiyama Y., (2009), "Quality control of cytoplasmic membrane proteins in *Escherichia coli*", *The Journal of Biochemistry*, 146 (4), 449-454.

Akiyama Y., Ito K., (2000), "Roles of multimerization and membrane association in the proteolytic functions of FtsH (HflB)", *European Molecular Biology Organization Journal*, 19 (15), 3888-3895.

Akiyama Y., Kihara A., Ito K., (1996), "Subunit a of proton ATPase F₀ sector is a substrate of the FtsH protease in *Escherichia coli*", *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 399 (1-2), 26-28.

Akiyama Y., Kihara A., Mori H., Ogura T., Ito K., (1998), "Roles of the periplasmic domain of *Escherichia coli* FtsH (HflB) in protein interactions and activity modulation", *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (35), 22326-22333.

Akiyama Y., Kihara A., Tokuda H., Ito K., (1996), "FtsH (HflB) is an ATP-dependent protease selectively acting on SecY and some other membrane proteins", *The Journal of Biological Chemistry*, 271 (49), 31196-31201.

Akiyama Y., Shirai Y., Ito K., (1994), "Involvement of FtsH in protein assembly into and through the membrane. II. Dominant mutations affecting FtsH functions", *The Journal of Biological Chemistry*, 269 (7), 5225-5229.

Akiyama Y., Yoshihisa T., Ito K., (1995), "FtsH, a membrane-bound ATPase, forms a complex in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*", *The Journal of Biological Chemistry*, 270 (40), 23485-23490.

Arlt H., Tauer R., Feldmann H., Neupert W., Langer T., (1996), "The YTA10-12 complex, an AAA protease with chaperone-like activity in the inner membrane of mitochondria", *Cell*, 85 (6), 875-885.

Ayuso-Tejedor S., Nishikori S., Okuno T., Ogura T., Sancho J., (2010), "FtsH cleavage of non-native conformations of proteins", *Journal of Structural Biology*, 171 (2), 117-124.

Bandyopadhyay K., Parua P. K., Datta A. B., Parrack P., (2010), "*Escherichia coli* HflK and HflC can individually inhibit the HflB (FtsH)-mediated proteolysis of lambdaCII in vitro", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501 (2), 239-243.

Banuet F., Hoyt M. A., McFarlane L., Echols H., Herskowitz I., (1986), "hflB, a new *Escherichia coli* locus regulating lysogeny and the level of bacteriophage lambda cII protein", *Journal of Molecular Biology*, 187 (2), 213-224.

Bi E. F., Lutkenhaus J., (1991), "FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*", *Nature*, 354 (6349), 161-164.

Bieniossek C., Schalch T., Bumann M., Meister M., Meier R., Baumann U., (2006), "The molecular architecture of the metalloprotease FtsH", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (9), 3066-3071.

Casari G., De Fusco M., Ciarmatori S., Zeviani M., Mora M., Fernandez P., De Michele G., Filla A., Coccozza S., Marconi R., Durr A., Fontaine B., Ballabio A., (1998), "Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease", *Cell*, 93 (6), 973-983.

Chen K., Elora Z.R., (2008), "Dual Role of FtsH in Regulating Lipopolysaccharide Biosynthesis in *Escherichia coli*", *Society for General Microbiology*, 190 (21), 7117-7122.

Chiba S., Ito K., Akiyama Y., (2006), "The *Escherichia coli* plasma membrane contains two PHB (prohibitin homology) domain protein complexes of opposite orientations", *Molecular Microbiology*, 60 (2), 448-457.

Chin D. T., Goff S. A., Webster T., Smith T., Goldberg A. L., (1988), "Sequence of the lon gene in *Escherichia coli*. A heat-shock gene which encodes the ATP-dependent protease La", *The Journal of Biological Chemistry*, 263 (24), 11718-11728.

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

Chung C.T., Niemela S.L., Miller R.H., (1989), "One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86 (7), 2172-5.

Confalonieri F., Duguet M., (1995), "A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function", *Bioessays*, 17 (7), 639-650.

Cowing D. W., Bardwell J. C., Craig E. A., Woolford C., Hendrix R. W., Gross C. A., (1985), "Consensus sequence for *Escherichia coli* heat shock gene promoters", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82 (9), 2679-2683.

Cutting S., Anderson M., Lysenko E., Page A., Tomoyasu T., Tatematsu K., Tatsuta T., Kroos L., Ogura T., (1997), "SpoVM, a small protein essential to development in *Bacillus subtilis*, interacts with the ATP-dependent protease FtsH", *Journal of Bacteriology*, 179 (17), 5534-5542.

da Silva A. C., Simao R. C., Susin M. F., Baldini R. L., Avedissian M., Gomes S. L., (2003), "Downregulation of the heat shock response is independent of DnaK and sigma32 levels in *Caulobacter crescentus*", *Molecular Microbiology*, 49 (2), 541-553.

Datta A. B., Roy S., Parrack P., (2005), "Role of C-terminal residues in oligomerization and stability of lambda CII: implications for lysis-lysogeny decision of the phage", *Journal of Molecular Biology*, 345 (2), 315-324.

- Deuerling E., Mogk A., Richter C., Purucker M., Schumann W., (1997), "The *ftsH* gene of *Bacillus subtilis* is involved in major cellular processes such as sporulation, stress adaptation and secretion", *Molecular Microbiology*, 23 (5), 921-933.
- Fischer B., Rummel G., Aldridge P., Jenal U., (2002), "The FtsH protease is involved in development, stress response and heat shock control in *Caulobacter crescentus*", *Molecular Microbiology*, 44 (2), 461-478.
- Flynn J. M., Levchenko I., Seidel M., Wickner S. H., Sauer R. T., Baker T. A., (2001), "Overlapping recognition determinants within the *ssrA* degradation tag allow modulation of proteolysis", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (19), 10584-10589.
- Fujita N., Ishihama A., (1987), "Heat-shock induction of RNA polymerase sigma-32 synthesis in *Escherichia coli*: transcriptional control and a multiple promoter system", *Molecular Genetics and Genomics*, 210 (1), 10-15.
- Führer F., Langklotz S., Narberhaus F., (2005), "Control of LPS biosynthesis by the FtsH protease in *Escherichia coli*", 2. gemeinsamer Kongress der DGHM und VAAM, 181-182, Göttingen, Germany, 25-26 September.
- Gaudu P., Moon N., Weiss B., (1997), "Regulation of the *soxRS* oxidative stress regulon. Reversible oxidation of the Fe-S centers of SoxR in vivo", *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (8), 5082-5086.
- Gaudu P., Weiss B., (1996), "SoxR, a [2Fe-2S] transcription factor, is active only in its oxidized form", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93 (19), 10094-10098.
- Ge Z., Taylor D. E., (1996), "Sequencing, expression, and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* *ftsH* gene encoding a protein homologous to members of a novel putative ATPase family", *Journal of Bacteriology*, 178 (21), 6151-6157.
- Geisler U., Schumann W., (1993), "Isolation of stress mutants of *Bacillus subtilis* by a novel genetic method", *Federation of European Microbiological Societies Letters*, 108 (3), 251-254.
- Goldberg A. L., (1990), "ATP-dependent proteases in prokaryotic and eukaryotic cells", *Seminars in Cell Biology*, 1 (6), 423-432.
- Gottesman S., (2003), "Proteolysis in bacterial regulatory circuits." *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19, 565-587.
- Gottesman S., Roche E., Zhou Y., Sauer R. T., (1998), "The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system", *Genes & Development*, 12 (9), 1338-1347.

Graef M., Langer T., (2006), "Substrate specific consequences of central pore mutations in the i-AAA protease Yme1 on substrate engagement", *Journal of Structural Biology*, 156 (1), 101-108.

Graef M., Seewald G., Langer T., (2007), "Substrate recognition by AAA+ ATPases: distinct substrate binding modes in ATP-dependent protease Yme1 of the mitochondrial intermembrane space", *Molecular Cell Biology*, 27 (7), 2476-2485.

Greenberg J. T., Monach P., Chou J. H., Josephy P. D., Demple B., (1990), "Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87 (16), 6181-6185.

Griffith K. L., Shah I. M., Jr. Wolf R. E., (2004), "Proteolytic degradation of *Escherichia coli* transcription activators SoxS and MarA as the mechanism for reversing the induction of the superoxide (SoxRS) and multiple antibiotic resistance (Mar) regulons", *Molecular Microbiology*, 51 (6), 1801-1816.

Gross C. A., Chan C. L., Lonetto M. A., (1996), "A structure/function analysis of *Escherichia coli* RNA polymerase", *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B Biological sciences*, 351 (1339), 475-482.

Halder S., Datta A. B., Parrack P., (2007), "Probing the antiprotease activity of lambdaCIII, an inhibitor of the *Escherichia coli* metalloprotease HflB (FtsH)", *Journal of Bacteriology*, 189 (22), 8130-8138.

Herman C., Lecat S., D'Ari R., Boulloc P., (1995), "Regulation of the heat-shock response depends on divalent metal ions in an hflB mutant of *Escherichia coli*", *Molecular Microbiology*, 18 (2), 247-255.

Herman C., Prakash S., Lu C. Z., Matouschek A., Gross C. A., (2003), "Lack of a robust unfoldase activity confers a unique level of substrate specificity to the universal AAA protease FtsH", *Molecular Cell*, 11 (3), 659-669.

Herman, C., Thevenet D., D'Ari R., Boulloc P., (1997), "The HflB protease of *Escherichia coli* degrades its inhibitor lambda cIII", *Journal of Bacteriology*, 179, 358-363.

Herman C., Thevenet D., Boulloc P., Walker G. C., D'Ari R., (1998), "Degradation of carboxy-terminal-tagged cytoplasmic proteins by the *Escherichia coli* protease HflB (FtsH)", *Genes & Development*, 12 (9), 1348-1355.

Herman C., Thevenet D., D'Ari R., Boulloc P., (1995), "Degradation of sigma 32, the heat shock regulator in *Escherichia coli*, is governed by HflB", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92 (8), 3516-3520.

Horikoshi M., Yura T., Tsuchimoto S., Fukumori Y., Kanemori M., (2004), "Conserved region 2.1 of *Escherichia coli* heat shock transcription factor sigma32 is required for modulating both metabolic stability and transcriptional activity", *Journal of Bacteriology*, 186 (22), 7474-7480.

Inwood W. B., Hall J. A., Kim K. S., Demirkhanyan L., Wemmer D., Zgurskaya H., Kustu S., (2009), "Epistatic effects of the protease/chaperone HflB on some damaged forms of the *Escherichia coli* ammonium channel AmtB", *Genetics*, 183 (4), 1327-1340.

Ito K., Akiyama Y., (2005), "Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease", *Annual Review of Microbiology*, 59, 211-231.

Kanemori M., Nishihara K., Yanagi H., Yura T., (1997), "Synergistic roles of HslVU and other ATP-dependent proteases in controlling in vivo turnover of sigma32 and abnormal proteins in *Escherichia coli*", *Journal of Bacteriology*, 179 (23), 7219-7225.

Karata K., Inagawa T., Wilkinson A. J., Tatsuta T., Ogura T., (1999), "Dissecting the role of a conserved motif (the second region of homology) in the AAA family of ATPases. Site-directed mutagenesis of the ATP-dependent protease FtsH", *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (37), 26225-26232.

Kaser M., Kambacheld M., Kisters-Woike B., Langer T., (2003), "Oma1, a novel membrane-bound metallopeptidase in mitochondria with activities overlapping with the m-AAA protease", *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (47), 46414-46423.

Keiler K. C., Waller P. R., Sauer R. T., (1996) "Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA", *Science*, 271 (5251), 990-993.

Kelly A. J., Sackett M. J., Din N., Quardokus E., Brun Y. V., (1998) "Cell cycle-dependent transcriptional and proteolytic regulation of FtsZ in *Caulobacter*", *Genes & Development*, 12 (6), 880-893.

Kihara A., Akiyama Y., Ito K., (1995), "FtsH is required for proteolytic elimination of uncomplexed forms of SecY, an essential protein translocase subunit", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92 (10), 4532-4536.

Kihara A., Akiyama Y., Ito K., (1996), "A protease complex in the *Escherichia coli* plasma membrane: HflKC (HflA) forms a complex with FtsH (HflB), regulating its proteolytic activity against SecY", *European Molecular Biology Organization Journal*, 15 (22), 6122-6131.

Kihara A., Akiyama Y., Ito K., (1997), "Host regulation of lysogenic decision in bacteriophage lambda: transmembrane modulation of FtsH (HflB), the cII degrading protease, by HflKC (HflA)", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94 (11), 5544-5549.

Kihara A., Akiyama Y., Ito K., (1998), "Different pathways for protein degradation by the FtsH/HflKC membrane-embedded protease complex: an implication from the interference by a mutant form of a new substrate protein, YccA", *Journal of Molecular Biology*, 279 (1), 175-188.

Kihara A., Akiyama Y., Ito K., (2001), "Revisiting the lysogenization control of bacteriophage lambda. Identification and characterization of a new host component, HflD", The Journal of Biological Chemistry, 276 (17), 13695-13700.

Kobiler O., Koby S., Teff D., Court D., Oppenheim A. B., (2002), "The phage lambda CII transcriptional activator carries a C-terminal domain signaling for rapid proteolysis", Proceedings of the National Academy of Sciences, 99 (23), 14964-14969.

Kobiler O., Rokney A., Oppenheim A. B., (2007), "Phage lambda CIII: a protease inhibitor regulating the lysis-lysogeny decision", PLoS One, 2 (4), 363.

Koppen M., Langer T., (2007), "Protein degradation within mitochondria: versatile activities of AAA proteases and other peptidases", Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 42 (3), 221-242.

Kornitzer D., Altuvia S., Oppenheim A. B., (1991), "The activity of the CIII regulator of lambdoid bacteriophages resides within a 24-amino acid protein domain", Proceedings of the National Academy of Sciences, 88 (12), 5217-5221.

Kourilsky P., (1973), "Lysogenization by bacteriophage lambda. I. Multiple infection and the lysogenic response", Molecular Genetics and Genomics, 122 (2), 183-195.

Kourilsky P., Knapp A., (1974), "Lysogenization by bacteriophage lambda. III. Multiplicity dependent phenomena occurring upon infection by lambda", Biochimie, 56 (11-12), 1517-1523.

Kroos L., Yu Y. T., (2000), "Regulation of sigma factor activity during *Bacillus subtilis* development", Current Opinion in Microbiology, 3 (6), 553-560.

Krzywda S., Brzozowski A.M., Verma C., Karata K., Ogura T., Wilkinson A.J., (2002), "The crystal structure of the AAA domain of the ATP-dependent protease FtsH of *Escherichia coli* at 1.5 Å resolution", Structure, 10, 1073-1083.

Laemmli U.K., (1970), "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", Nature, 227 (5259), 680-5.

Le A. T., Schumann W., (2009), "The Spo0E phosphatase of *Bacillus subtilis* is a substrate of the FtsH metalloprotease", Microbiology, 155 (4), 1122-1132.

Leffers G. G., Jr., Gottesman S., (1998), "Lambda Xis degradation in vivo by Lon and FtsH" Journal of Bacteriology, 180 (6), 1573-1577.

Leonhard K., Stiegler A., Neupert W., Langer T., (1999), "Chaperone-like activity of the AAA domain of the yeast Yme1 AAA protease", Nature, 398 (6725), 348-351.

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

Levchenko I., Seidel M., Sauer R. T., Baker T. A., (2000), "A specificity-enhancing factor for the ClpXP degradation machine", *Science*, 289 (5488), 2354-2356.

Li C., Tao Y. P., Simon L. D., (2000), "Expression of different-size transcripts from the *clpP-clpX* operon of *Escherichia coli* during carbon deprivation", *Journal of Bacteriology*, 182 (23), 6630-6637.

Lindahl M., Spetea C., Hundal T., Oppenheim A. B., Adam Z., Andersson B., (2000), "The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein", *Plant Cell*, 12 (3), 419-431.

Makino S., Makino T., Abe K., Hashimoto J., Tatsuta T., Kitagawa M., Mori H., Ogura T., Fujii T., Fushinobu S., Wakagi T., Matsuzawa H., (1999), "Second transmembrane segment of FtsH plays a role in its proteolytic activity and homooligomerization", *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 460, 554-558.

Martin R. G., Gillette W. K., Rosner J. L., (2000), "Promoter discrimination by the related transcriptional activators MarA and SoxS: differential regulation by differential binding", *Molecular Microbiology*, 35 (3), 623-634.

Nakano M. M., Dailly Y. P., Zuber P., Clark D. P., (1997), "Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth", *Journal Bacteriology*, 179 (21), 6749-6755.

Neuwald A. F., Aravind L., Spouge J. L., Koonin E. V., (1999), "AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes", *Genome Research*, 9 (1), 27-43.

Nijtmans L. G., de Jong L., Artal Sanz M., Coates P. J., Berden J. A., Back J. W., Muijsers A. O., van der Spek H., Grivell L. A., (2000), "Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins", *European Molecular Biology Organization Journal*, 19 (11), 2444-2451.

Nilsson D., Lauridsen A. A., Tomoyasu T., Ogura T., (1994), "A *Lactococcus lactis* gene encodes a membrane protein with putative ATPase activity that is homologous to the essential *Escherichia coli* *ftsH* gene product", *Microbiology*, 140 (10), 2601-2610.

Nolden M., Ehses S., Koppen M., Bernacchia A., Rugarli E. I., Langer T., (2005), "The m-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria", *Cell*, 123 (2), 277-289.

Nonaka G., Blankschien M., Herman C., Gross C. A., Rhodius V. A., (2006), "Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor, sigma32, reveals a multifaceted cellular response to heat stress", *Genes & Development*, 20 (13), 1776-1789.

Nunoshiba T., Demple B., (1993), "Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4-nitroquinoline-N-oxide", *Cancer Research*, 53 (14), 3250-3252.

Nunoshiba T., Hidalgo E., Amabile Cuevas C. F., Demple B., (1992), "Two-stage control of an oxidative stress regulon: the *Escherichia coli* SoxR protein triggers redox-inducible expression of the soxS regulatory gene", *Journal of Bacteriology*, 174 (19), 6054-6060.

Obrist M., (2006), "Controlled degradation of the transcription factor RpoH by the FtsH protease in *Escherichia coli*", PhD. thesis, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich.

Obrist M., Milek S., Klauck E., Hengge R., Narberhaus F., (2007), "Region 2.1 of the *Escherichia coli* heat-shock sigma factor RpoH (sigma32) is necessary but not sufficient for degradation by the FtsH protease", *Microbiology*, 153 (8), 2560-2571.

Obrist M., Narberhaus F., (2005), "Identification of a turnover element in region 2.1 of *Escherichia coli* sigma32 by a bacterial one-hybrid approach", *Journal of Bacteriology*, 187 (11), 3807-3813.

Obuchowski M., Shotland Y., Koby S., Giladi H., Gabig M., Wegrzyn G., Oppenheim A. B., (1997), "Stability of CII is a key element in the cold stress response of bacteriophage lambda infection", *Journal of Bacteriology*, 179 (19), 5987-5991.

Ogura T., Inoue K., Tatsuta T., Suzaki T., Karata K., Young K., Su L. H., Fierke C. A., Jackman J. E., Raetz C. R., Coleman J., Tomoyasu T., Matsuzawa H., (1999), "Balanced biosynthesis of major membrane components through regulated degradation of the committed enzyme of lipid A biosynthesis by the AAA protease FtsH (HflB) in *Escherichia coli*", *Molecular Microbiology*, 31 (3), 833-844.

Ogura T., Tomoyasu T., Yuki T., Morimura S., Begg K. J., Donachie W. D., Mori H., Niki H., Hiraga S., (1991), "Structure and function of the ftsH gene in *Escherichia coli*", *Research in Microbiology*, 142 (2-3), 279-282.

Ogura T., Whiteheart S. W., Wilkinson A. J., (2004), "Conserved arginine residues implicated in ATP hydrolysis, nucleotide-sensing, and inter-subunit interactions in AAA and AAA+ ATPases", *Journal of Structural Biology*, 146 (1-2), 106-112.

Ogura T., Wilkinson A. J., (2001), "AAA+ superfamily ATPases: common structure-diverse function", *Genes Cells*, 6 (7), 575-597.

Okuno T., Yamada-Inagawa T., Karata K., Yamanaka K., Ogura T., (2004), "Spectrometric analysis of degradation of a physiological substrate sigma32 by *Escherichia coli* AAA protease FtsH", *Journal of Structural Biology*, 146 (1-2), 148-154.

Okuno T., Yamanaka K., Ogura T., (2006a), "Characterization of mutants of the *Escherichia coli* AAA protease, FtsH, carrying a mutation in the central pore region", *Journal of Structural Biology*, 156, 109-114.

Okuno T., Yamanaka K., Ogura T., (2006b), "An AAA protease FtsH can initiate proteolysis from internal sites of a model substrate, apo-flavodoxin", *Genes Cells*, 11 (3), 261-268.

Okuno T., Yamanaka K., Ogura T., (2006), "Flavodoxin, a new fluorescent substrate for monitoring proteolytic activity of FtsH lacking a robust unfolding activity", *Journal of Structural Biology*, 156 (1), 115-119.

Rainey R. N., Glavin J. D., Chen H. W., French S. W., Teitell M. A., Koehler C. M., (2006), "A new function in translocation for the mitochondrial i-AAA protease Yme1: import of polynucleotide phosphorylase into the intermembrane space", *Molecular Cell Biology*, 26 (22), 8488-8497.

Richmond C. S., Glasner J. D., Mau R., Jin H., Blattner F. R., (1999), "Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12", *Nucleic Acids Research*, 27 (19), 3821-3835.

Ronimus R.S., Parker L.E., Morgan H.W., (1997), "The utilization of RAPD-PCR for identifying thermophilic and mesophilic *Bacillus* species", *Federation of European Microbiological Societies Letters*, 147 (1), 75-9.

Sakoh M., Ito K., Akiyama Y., (2005), "Proteolytic activity of HtpX, a membrane-bound and stress-controlled protease from *Escherichia coli*", *The Journal of Biological Chemistry*, 280 (39), 33305-33310.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., (1989), "Molecular Cloning: a laboratory manual", 2nd edition, Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schumann W., (1999), "FtsH--a single-chain charonin? ", *Federation of European Microbiological Societies Reviews*, 23 (1), 1-11.

Setif P., (2001), "Ferredoxin and flavodoxin reduction by photosystem I", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1507 (1-3), 161-179.

Shah I. M., Wolf R. E., (2006), "Sequence requirements for Lon-dependent degradation of the *Escherichia coli* transcription activator SoxS: identification of the SoxS residues critical to proteolysis and specific inhibition of in vitro degradation by a peptide comprised of the N-terminal 21 amino acid residues", *Journal of Molecular Biology*, 357 (3), 718-731.

Shang Y., Zhang N., Zhu P., Luo Y., Huang K., Tian W., Xu W., (2014), "Restriction enzyme cutting site distribution regularity for DNA looping technology", *Gene*, 534 (2), 222-228.

Shimohata N., Chiba S., Saikawa N., Ito K. and Akiyama Y., (2002), "The Cpx stress response system of *Escherichia coli* senses plasma membrane proteins and controls HtpX, a membrane protease with a cytosolic active site", *Genes Cells*, 7 (7), 653-662.

Shirai Y., Akiyama Y., Ito K., (1996), "Suppression of ftsH mutant phenotypes by overproduction of molecular chaperones", *Journal of Bacteriology*, 178 (4), 1141-1145.

Shotland Y., Koby S., Teff D., Mansur N., Oren D. A., Tatematsu K., Tomoyasu T., Kessel M., Bukau B., Ogura T., Oppenheim A. B., (1997), "Proteolysis of the phage lambda CII regulatory protein by FtsH (HflB) of *Escherichia coli*", *Molecular Microbiology*, 24 (6), 1303-1310.

Shotland Y., Teff D., Koby S., Kobiler O., Oppenheim A. B., (2000), "Characterization of a conserved alpha-helical, coiled-coil motif at the C-terminal domain of the ATP-dependent FtsH (HflB) protease of *Escherichia coli*", *Journal of Molecular Biology*, 299 (4), 953-964.

Snider J., Houry W. A., (2008), "AAA+ proteins: diversity in function, similarity in structure", *Biochemical Society Transactions*, 36 (1), 72-77.

Srinivasan R., Ajitkumar P., (2007), "Bacterial cell division protein FtsZ is stable against degradation by AAA family protease FtsH in *Escherichia coli* cells", *Journal of Basic Microbiology*, 47 (3), 251-259.

Srinivasan R., Rajeswari H., Ajitkumar P., (2008), "Analysis of degradation of bacterial cell division protein FtsZ by the ATP-dependent zinc-metalloprotease FtsH in vitro", *Microbiological Research*, 163 (1), 21-30.

Srinivasan R., Rajeswari H., Bhatt B. N., Indi S., Ajitkumar P., (2007), "GTP/GDP binding stabilizes bacterial cell division protein FtsZ against degradation by FtsH protease in vitro", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357 (1), 38-43.

St-Pierre F., Endy D., (2008), "Determination of cell fate selection during phage lambda infection", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (52), 20705-20710.

Steglich G., Neupert W., Langer T., (1999), "Prohibitins regulate membrane protein degradation by the m-AAA protease in mitochondria", *Molecular Cell Biology*, 19 (5), 3435-3442.

Straus D. B., Walter W. A., Gross C. A., (1987), "The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of sigma 32", *Nature*, 329 (6137), 348-351.

Strosser J., A. Ludke, Schaffer S., Kramer R., Burkovski A., (2004), "Regulation of GlnK activity: modification, membrane sequestration and proteolysis as regulatory principles in the network of nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*", *Molecular Microbiology*, 54 (1), 132-147.

Takami H., Nishi S., Lu J., Shimamura S., Takaki Y., (2004), "Genomic characterization of thermophilic *Geobacillus* species isolated from the deepest sea mud of the Mariana Trench", *Extremophiles*, 8 (5), 351-356.

Tatsuta T., Augustin S., Nolden M., Friedrichs B., Langer T., (2007), "m-AAA protease-driven membrane dislocation allows intramembrane cleavage by rhomboid in mitochondria", *European Molecular Biology Organization Journal*, 26 (2), 325-335.

Tatsuta T., Model K., Langer T., (2005), "Formation of membrane-bound ring complexes by prohibitins in mitochondria", *Molecular Biology of the Cell*, 16 (1), 248-259.

Tomoyasu T., Arsene F., Ogura T., Bukau B., (2001), "The C terminus of sigma(32) is not essential for degradation by FtsH", *Journal of Bacteriology*, 183 (20), 5911-5917.

Tomoyasu T., Gamer J., Bukau B., Kanemori M., Mori H., Rutman A. J., Oppenheim A. B., Yura T., Yamanaka K., Niki H., (1995), "Escherichia coli FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor sigma 32", *European Molecular Biology Organization Journal*, 14 (11), 2551-2560.

Tomoyasu T., Yamanaka K., Murata K., Suzuki T., Boulloc P., Kato A., Niki H., Hiraga S., Ogura T., (1993), "Topology and subcellular localization of FtsH protein in Escherichia coli", *Journal of Bacteriology*, 175 (5), 1352-1357.

Tomoyasu T., Yuki T., Morimura S., Mori H., Yamanaka K., Niki H., Hiraga S., 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", *Journal of Bacteriology*, 175 (5), 1344-1351.

van Bloois E., Dekker H. L., Froderberg L., Houben E. N., Urbanus M. L., de Koster C. G., de Gier J. W., Lührink J., (2008), "Detection of cross-links between FtsH, YidC, HflK/C suggests a linked role for these proteins in quality control upon insertion of bacterial inner membrane proteins", *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 582 (10), 1419-1424.

Van den Berg B., Jr. Clemons W. M., Collinson I., Modis Y., Hartmann E., Harrison S. C., Rapoport T. A., (2004), "X-ray structure of a protein-conducting channel", *Nature*, 427 (6969), 36-44.

van Stelten J., Silva F., Belin D., Silhavy T. J., (2009), "Effects of antibiotics and a proto-oncogene homolog on destruction of protein translocator SecY", *Science*, 325 (5941), 753-756.

VanBogelen R. A., Kelley P. M., Neidhardt F. C., (1987), "Differential induction of heat shock, SOS, and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in Escherichia coli", *Journal of Bacteriology*, 169 (1), 26-32.

Villaverde A., Carrio M. M., (2003), "Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies", *Biotechnology Letters*, 25 (17), 1385-1395.

Watenpaugh K. D., Sieker L. C., Jensen L. H., Legall J., Dubourdieu M., (1972), "Structure of the oxidized form of a flavodoxin at 2.5-Angstrom resolution: resolution of the phase ambiguity by anomalous scattering", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69 (11), 3185-3188.

Weart R. B., Nakano S., Lane B. E., Zuber P., Levin P. A., (2005), "The ClpX chaperone modulates assembly of the tubulin-like protein FtsZ", *Molecular Microbiology*, 57 (1), 238-249.

White D. G., Goldman J. D., Demple B., Levy S. B., (1997), "Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*", *Journal of Bacteriology*, 179 (19), 6122-6126.

Wu J., Weiss B., (1992), "Two-stage induction of the *soxRS* (superoxide response) regulon of *Escherichia coli*", *Journal of Bacteriology*, 174 (12), 3915-3920.

Yamada-Inagawa T., Okuno T., Karata K., Yamanaka K., Ogura T., (2003), "Conserved pore residues in the AAA protease FtsH are important for proteolysis and its coupling to ATP hydrolysis", *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (50), 50182-50187.

Young K., Silver L. L., Bramhill D., Cameron P., Eveland S. S., Raetz C. R., Hyland S. A., Anderson M. S., (1995), "The *envA* permeability/cell division gene of *Escherichia coli* encodes the second enzyme of lipid A biosynthesis. UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine deacetylase", *The Journal of Biological Chemistry*, 270 (51), 30384-30391.

Yura T., Guisbert E., Poritz M., Lu C. Z., Campbell E., Gross C. A., (2007), "Analysis of *sigma32* mutants defective in chaperone-mediated feedback control reveals unexpected complexity of the heat shock response", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (45), 17638-17643.

Zelisko A., Garcia-Lorenzo M., Jackowski G., Jansson S., Funk C., (2005), "AtFtsH6 is involved in the degradation of the light-harvesting complex II during high-light acclimation and senescence", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102 (38), 13699-13704.

ÖZGEÇMİŞ

Ahmet TÜLEK 15 Mayıs 1983’de Tokat’da doğdu. 2004 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde lisans eğitime başladı. 2008 yılında lisans eğitimini tamamladıktan sonra Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisansa başlayarak 2010 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2010 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü (GYTE) Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitime başladı. Yüksek lisans eğitimi halen devam etmektedir.