

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

ATP-BAĞIMLI PROTEAZ HsIVU GENLERİNİN
***Geobacillus kaustophilus*'TAN KLONLANMASI,**
DNA DİZİSİNİN BELİRLENMESİ VE
EKSPRESYONU

Kemal AVİCAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GEBZE

2009

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

ATP-BAĞIMLI PROTEAZ HsIVU GENLERİNİN
***Geobacillus kaustophilus*'TAN KLONLANMASI,**
DNA DİZİSİNİN BELİRLENMESİ VE
EKSPRESYONU

Kemal AVİCAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Fatma İnci Özdemir

GEBZE

2009



GEBZE YÜKSEK
TEKNOLOJİ
ENSTİTÜSÜ

MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
JÜRİ ONAY FORMU

JÜRİ

ÜYE (BAŞKAN) : Prof. Dr. Füsun Gümüşel

ÜYE (Danışman) : Yard. Doç. Dr. F. İnci Özdemir

ÜYE : Yard. Doç. Dr. Melek Özkan

Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı ile yukarıdaki öğretim elemanlarından oluşmuş jüri tarafından düzenlenen/...../..... tarihli Tez Savunma Tutanağı neticesinde Yüksek Lisans / Doktora öğrencisi'ın çalışması GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Yönetim Kurulu/...../..... tarih ve/..../..... sayılı kararıyla Anabilim Dalında Yüksek Lisans / Doktora tezi olarak onaylanmıştır.

İMZA/MÜHÜR

Sevgili dostum Mesut'a...

ÖZET

TEZ BAŞLIĞI : ATP-bağımlı proteaz HslVU genlerinin *Geobacillus kaustophilus*'tan klonlanması, DNA dizisinin belirlenmesi ve ekspresyonu

YAZAR ADI : Kemal AVİCAN

Hem ökaryotik hem de prokaryotik hücrede, bir çok hücre içi protein yıkımı ATP bağımlı proteazlar ile başlatılmaktadır. En büyük ATP-bağımlı proteaz olarak bilinen ökaryotik proteazomlar 'ubiquitin ile konjuge olmuş' ya da olmamış proteinlerin yıkımını katalize eden multikatalitik proteaz kompleksleridir. Ökaryotik organizmaların yanı sıra Archea'larda da bulunan proteazomlar, hücre içinde stres yanıtı, hücre farklılaşması ve metabolik adaptasyon gibi önemli fizyolojik rollere sahiptir ve bu nedenle medikal uygulamalar için önemli bir potansiyele sahiptirler.

Son yıllarda tanımlanan ve izole edilen 'heat-shock locus VU' (HslVU) bir ATP-bağımlı proteolitik sistem olup, ökaryotik ve arkeal proteazomun prokaryotik homologudur. İki bileşenli ATP-bağımlı proteaz olan HslVU, proteazom-bağımlı peptidaz aktivitesi gösteren HslV (β -altbirimi) ve ATPaz ve şaperon aktivitesi gösteren HslU'dan oluşmuştur. Genomik ve kristal yapı çalışmaları sonunda HslVU proteazlar hakkında oldukça geniş bilgi sağlamakla birlikte, sahip oldukları katalitik aktivite ve fonksiyonları hakkındaki bilgiler sınırlıdır.

Bu tez çalışmasında, termofilik bir bakteri olan *Geobacillus kaustophilus*'un HslVU proteazı ilk defa *Escherichia coli* 'de klonlanmış ve eksprese edilmiştir. *hslV* ve *hslU* altbirim genleri önce bir klonlama vektörü olan pGEM-T vektöre klonlama ve daha sonra pGEX 6P-1 vektörüne alt-klonlama yapılarak *E. coli*'ye aktarılmıştır. Yaklaşık 19 kDa büyüklüğündeki HslV ve 50 kDa büyüklüğündeki HslU altbirimleri glutatyon S-transferaz (GST 26 kDa) proteinleri ile füzyon halinde *E.coli* BL21 (DE3)'de eksprese edilmişlerdir. Yüksek düzeyde eksprese olan rekombinant proteinlerin enzimatik aktivitelerinin değerlendirilmesi için yapılan çalışmalar, kültür hücre özütleri kullanılarak yapılmıştır. Buna göre, HslVU proteazın kazein hidrolizi için optimum sıcaklık aralığı 55-70 °C ve optimum pH aralığı 5.0-7.0 olarak saptanmıştır.

SUMMARY

THESIS TITLE : Cloning, sequencing and expression of genes encoding ATP-dependent protease HslVU from *Geobacillus kaustophilus*

AUTHOR : Kemal AVİCAN

Degradations of many cellular proteins are initiated by ATP-dependent proteases in both eukaryotic and prokaryotic cells. Eukaryotic proteasomes, major ATP-dependent proteases, are the multicatalytic complexes which catalyze degradation of ubiquitin conjugated or non-conjugated proteins. Proteasomes, exist in eukaryotic organisms and Archeabacteria have important roles in cellular metabolism such as stress respons, cell differentiation and metabolic adaptation. Therefore, proteasomes have important potential for medical applications.

Recently isolated and identified heat-shock locus VU (HslVU) is an ATP-dependent proteolytic system which is the prokaryotic homolog of eukaryotic and archeal proteasomes. HslVU consists of two different subunits HslV which has proteasom related peptidase activity (β -subunits) and HslU having ATPase and chaperone activities. Genomic and crystal structure studies provided a lot of information, however the knowledge about catalytic activity and functions of HslVU proteases is still limited.

In this study, *Geobacillus kaustophilus* ATP dependent HslVU protease first time cloned and expressed in *E. coli*. *hslV* and *hslU* subunits genes cloned into pGEM-T cloning vector then subcloned into pGEX 6P-1 in *E. coli*. HslV (19 kDa) and HslU (50 kDa) were expressed with glutathione S-transferaz (GST 26 kDa) as a fusion protein. Preliminary characterization studies were achieved by using cell free extracts containing overexpressed recombinant proteins. Optimal temperature for HslVU protease activity was observed at 55-70 °C range by using casein as a protein substrate and optimal pH determined at 5.0-7.0 range.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bana danışmanlık yapan, destekleri ile sürekli yanımda olan Yrd. Doç. Dr. F. İnci Özdemir'e, yüksek lisans eğitimim boyunca manevi desteği ile her zaman yanımda olduğunu hissettiğim Prof. Dr. Füsün Gümüşel'e ve çalışmalarımın bir kısmını gerçekleştirmek üzere bana laboratuvarını açan ve rehberlik eden Prof. Dr. Maria Fällman'a teşekkürlerimi sunarım.

Başta sevgili arkadaşım Gonca Altın olmak üzere deneylerimde bana yardımcı olan, yardımsever, paylaşımcı ve eğlenceli laboratuvar arkadaşlarım Ümmühan Savaş'a, Tuğrul Doruk'a, İrem Yalım'a, Haluk Camcı'ya ve Irmak Şah'a teşekkürlerimi sunmaktan mutluluk duyarım.

Son olarak, beni yetiştiren, eğitimimin her döneminde destekleyen, sürekli uzak olan ve beni bıkmadan sürekli özleyen sevgili anneme ve kalabalık aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xv
1.GİRİŞ	1
1.1. ATP Bağımlı Proteazlar	4
1.1.1. Proteaz La (Lon)	5
1.1.2. Proteaz Ti (Clp, Caseinolytic Proteaz)	5
1.1.3. FtsH	9
1.1.4. HslVU (ClpQY, Prokaryotik Proteazom)	9
1.1.4.1. HslV Peptidaz	13
1.1.4.2. HslU ATPaz	14
1.1.5. 26S Proteazom	16
1.2. <i>Geobacillus kaustophilus</i> Hücresel Yapı ve Metabolizması	20
1.3. Tez Çalışmasının Amacı	21
2.GEREÇ VE YÖNTEMLER	22
2.1. Gereçler	22
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar	22
2.1.2. Kullanılan Enzimler ve Tamponları	22
2.1.3. Kullanılan Nükleotidler	23
2.1.4. Kullanılan Kitler	23
2.1.5. Kullanılan DNA ve Protein Moleküler Belirteçleri	23
2.1.6. Kullanılan Plazmid Vektörler	24
2.1.7. <i>G. kaustophilus hslV</i> ve <i>hslU</i> Genlerinin Restriksiyon Enzim Haritalarının Çıkartılması	26
2.1.8. Kullanılan Bakteri Soyları	28
2.1.9. Kullanılan Çözelti ve Besiyerleri	29
2.1.10. Kullanılan Cihazlar	32
2.2. Yöntemler	33
2.2.1. <i>Geobacillus kaustophilus</i> 'tan Kromozomal DNA İzolasyonu	33

2.2.2.	<i>hslV</i> , <i>hslU</i> Genlerinin PCR ile Çoğaltılması	33
2.2.3.	PCR Ürünlerinin Agaroz Jelden Saflaştırılması	35
2.2.4.	PCR Ürünlerinin Klonlanması	35
2.2.5.	Transformasyon ve Rekombinant Seçimi	35
2.2.6.	Klonlanan <i>hslV</i> ve <i>hslU</i> DNA'larının Dizilenmesi	36
2.2.7.	<i>hslV</i> ve <i>hslU</i> Genlerinin Ekspresyon Vektörü pGEX-6P-1'e Klonlanması	37
2.2.8.	Transformasyon ve Rekombinant Seçimi	38
2.3.	Hücre Özütlerinin Hazırlanması	40
2.4.	Poliakrilamid Jel Elektroforezi	40
2.5.	Enzimatik Aktivite Ölçümü	41
2.5.1.	Sıcaklığın HslVU Proteaz Aktivitesine Etkisi	42
2.5.2.	pH'nın HslVU Proteaz Aktivitesine Etkisi	42
2.5.3.	MgCl ₂ ' ün HslVU Proteaz Aktivitesine Etkisi	42
2.5.4.	Metal İyonlarının HslVU Proteaz Aktivitesine Etkisi	43
3.	BULGULAR	43
3.1.	<i>hslV</i> ve <i>hslU</i> Genlerinin PCR İle Çoğaltılması	43
3.2.	<i>hslV</i> ve <i>hslU</i> Genlerinin Klonlanması	44
3.2.1.	<i>hslV</i> ve <i>hslU</i> Genlerinin pGEM-T Vektör Sistemine Klonlanması	44
3.2.2.	Klonlanan <i>hslV</i> ve <i>hslU</i> DNA'larının Nükleotit Dizilimi ve Potansiyel Amino Asit Diziliminin Belirlenmesi	47
3.2.3.	<i>G. kaustophilus hslV</i> ve <i>hslU</i> Genlerinin Restriksiyon Haritalarının Çıkarılması	51
3.2.4.	<i>hslU</i> ve <i>hslV</i> Genlerinin Ekspresyon Vektörü pGEX-6P-1'e Klonlanması	51
3.3.	HslV Proteaz ve HslU ATPaz'ın Ekspresyonu	55
3.4.	HslVU Proteaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi	56
4.	TARTIŞMA ve SONUÇ	58
5.	KAYNAKLAR	65
	ÖZGEÇMİŞ	75

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

~	Yaklaşık
Å	Amströng
AAA ⁺	Çeşitli hücresel aktivitelere sahip ATPazlar
ADP	Adenozin difosfat
APS	Amonyum persulfat
Arg	Arjinin
ATP	Adenozin trifosfat
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H endonükleaz
Bç	Baz Çifti
ClpA	Kazeinolitik Proteaz A
ClpB	Kazeinolitik Proteaz B
ClpC	Kazeinolitik Proteaz C
ClpP	Kazeinolitik Proteaz P
ClpQ	Kazeinolitik Proteaz Q
ClpR	Kazeinolitik Proteaz R
ClpX	Kazeinolitik Proteaz X
CtrA	Hücre döngüsü transkripsiyonel düzenleyicisi A
CtsR	Sınıf III stres genleri transkripsiyonel baskılayıcısı
DksA	DnaK süpresor protein A
Dps	DNA besin açlığı/durağan faz koruyucu protein
DTT	Ditiyotreitol
EDTA	N,N,N',N'-Tetrametiletilediamin
endA	Endonukleaz A
EtBr	Etidyum Bromid
FlhC	Flagellar transkripsiyonel aktivator C
FlhD	Flagellar transkripsiyonel aktivator D
FtsH	Flament oluşturuucu sıcaklık-hassas A
GST	Glutatyon-S-Transferaz
HCl	Hidroklorik asit
HflC	Yüksek sıklıkta lizojeni C
HflK	Yüksek sıklıkta lizojeni K

hslTS	Isı şoku bölgesi TS
HslU	Isı şoku bölgesi U
HslV	Isı şoku bölgesi V
Hsp100	Isı şoku proteini 100
Hsp104	Isı şoku proteini 104
IPTG	İzopropil-beta-D-tiyo galaktopiranozid
i-AAA	Mitokondrial iç membran içsel-AAA proteaz kompleksi
K	Potasyum
KCl	Potasyum Klorid
kDA	Kilodalton
L	Litre
Lon	Proteaz La
M	Molar
m-AAA	Mitochondrial iç membran matriks-AAA proteaz kompleksi
MBP	Maltoz Bağlama Proteini
MgCl₂	Magnezyum Klorür
MgSO₄	Magnezyum Sülfat
mL	Mililitre
mM	Milimolar
Mops	3-(n-Morfolino) Propan Sülfonik Asit
Na₂OAc	Sodium Asetat
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NBD	Nükleotit Bağlama Domaini
NSF	N-ethylmaleimid hassas füzyon proteini
p97	Protein 97
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEG	Polietilen Glikol
RepA	Replikatif helikaz A
Rpm	Dakika başına dönüş
RcsA	Kolanik asit kapsüler biyosentez aktivasyon proteini A
Sall	<i>Streptomyces albus</i> I endonükleaz
SDS	Sodyum Dodesil Fosfat
Ser	Serin

SNARE	Küçük ILF3/NF90-ilişkili RNA E
SOB	Süper-optimal Brot
SOC	Süper-optimal Brot (Katabolik Baskılama)
SSD	Sensör ve substrat tanıma domaini
SulA	SOS hücre bölünmesi inhibitörü
TEMED	Tetrametiletildiamin
Thr	Treonin
Tolz	Hücre bölünmesi proteazı ftsH
TSS	Toplam katı solüsyonu
UmuD	DNA polimeraz V, altbirim D
VCP	Valosin içeren protein
X-Gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- beta-D-galaktopranozid
XhoI	<i>Xanthomonas vasicola</i> endonükleaz I
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μ	Mikron
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
σ	Sigma
σ^{32}	RNA polimeraz faktör sigma-32

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>		<u>Sayfa</u>
1.1	AAA ⁺ ATPazların hücresel fonksiyonları	2
1.2	ClpP proteazın işleyiş mekanizması	7
1.3	<i>E. coli</i> HslV ve <i>T. Acidophilum</i> proteazomun karşılaştırılması	13
1.4	HslU'nun domain yapılanması	16
1.5	Ubikitin-proteazom yolağının hücresel fonksiyonları	18
1.6	Proteazom işleyiş mekanizması	19
1.7	<i>Bacillus</i> ve akraba genoslara ait filogenetik ağaç	21
2.1	DNA ve Protein moleküler belirteçleri	23
2.2	pGEM-T vektör haritası	24
2.3	GST füzyon vektörü pGEX-6p-1'in açık okuma çerçevesi	26
2.4	<i>hslV</i> genine ait restriksiyon enzim haritası	27
2.5	<i>hslU</i> genine ait restriksiyon enzim haritası	27
2.6	pGEM-T vektöre ait çoklu klonlama bölgesi	37
3.1	<i>hslV</i> ve <i>hslU</i> 'ya ait PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görünüşleri	44
3.2	pGEM-T/ <i>hslV</i> ve pGEM-T/ <i>hslU</i> plazmidlerinin restriksiyon enzim kesim sonuçlarının agaroz jeldeki görünüşleri	46
3.3	<i>G. kaustophilus</i> 'a ait <i>hslV</i> geni anlamlı DNA zinciri	48
3.4	<i>G. kaustophilus</i> 'a ait <i>hslU</i> geni anlamlı DNA zinciri	49
3.5	<i>G. kaustophilus</i> HslV ve HslU proteinlerine ait amino asit dizisi	50
3.6	pGEX-6P-1 (<i>Bam</i> HI- <i>Sal</i> I) ve pGEX-6P-1 (<i>Bam</i> HI- <i>Xho</i> I) DNA fragmanlarının agaroz jeldeki görünüşü	52
3.7	Koloni PCR sonuçlarının agaroz jeldeki görüntüsü	53
3.8	pGEX-6P-1/ <i>hslV</i> ve pGEX-6P-1/ <i>hslU</i> DNA'larının restriksiyon enzim kesimi sonuçları	54
3.9	Yüksek seviyede eksprese edilen GST-HslV füzyon proteinin SDS-PAGE görüntüsü	55
3.10	Yaban tip ve rekombinant <i>E. coli</i> BL21(DE3) hücre özütlerindeki HslVU aktivitelerinin karşılaştırılması	56

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>		<u>Sayfa</u>
1.1	ATP-bağımlı proteazların genel özellikleri	4
1.2	Clp proteazların <i>in vivo</i> ve <i>in vitro</i> substratları	8
2.1	<i>hslV</i> ve <i>hslU</i> genlerinin çoğaltımı için ileri ve geri primerler	34

1. GİRİŞ

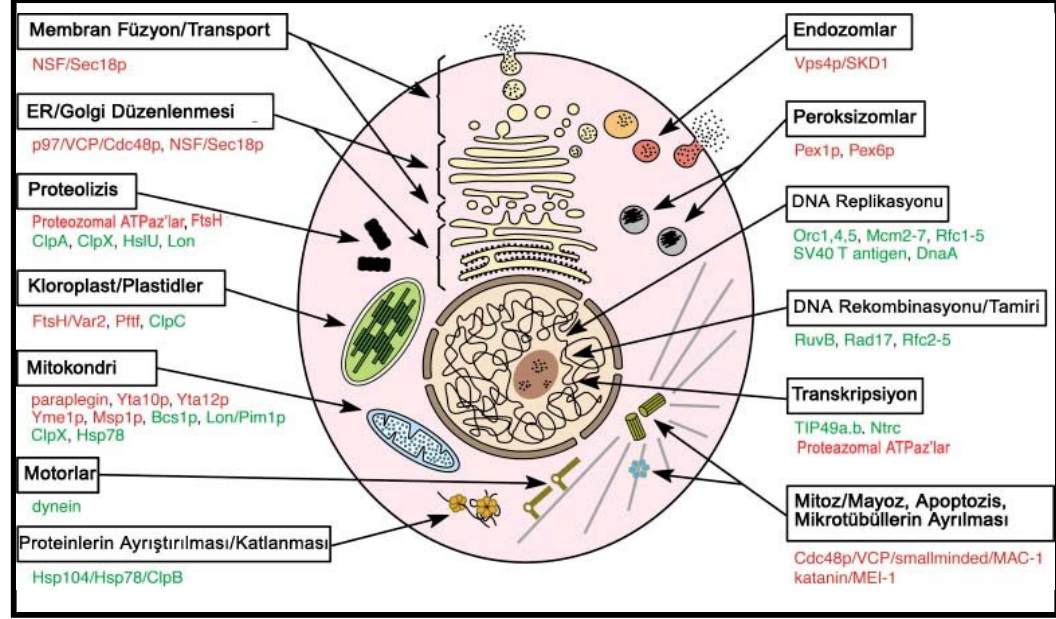
Proteazlar, proteinlerdeki peptit bağlarının yıkımını katalizleyen enzimlerdir ve tüm canlı formlarında bulunurlar. Evrimsel gelişim sürecinde proteazlar, ilk başta sadece yıkım aktivitesine sahipken daha sonraları fizyolojik yollarda farklı özgül ve kompleks görevlere adapte olmuşlardır.

Peptit bağlarının hidrolizi ekzergonik bir tepkimedir ve proteinlerin geleneksel proteazlarla yıkımı yüksek enerjili kofaktörlere ihtiyaç duymamaktadır (Goldberg ve St.Jhon, 1976). Ancak, fonksiyonel olabilmeleri için nükleotit trifosfat (NTP, tipik olarak ATP ve GTP) bağlanmasına ya da hidrolizine ihtiyaç duyan önemli bir proteaz grubu daha bulunmaktadır. ATP-bağımlı proteazlar, proteolitik aktiviteden sorumlu bir peptidaz ve ATP bağlanması ya da hidrolizinden sorumlu olan ATPaz domaini ya da altbiriminden oluşan çok altbirimli kompleks proteinlerdir (Goldberg, 1992).

NTPazların en bilinen sınıfında, NTP bağlanmasında ve hidrolizinde çok önemli roller oynayan iki korunmuş protein motifi bulunmaktadır; Walker A motifi (P-loop) ve Walker B (Magnezyum bağlama) motifi. Walker motifleri içeren ATPazlardaki ATP hidrolizi, bağlanan ATP molekülünün γ -fosfatına saldıran aktif su molekülü tarafından başlatılmaktadır. Bu motif, Gly-(X)₄-Gly-Lys-Thr (X=herhangi bir amino asit) dizisi şeklinde tanımlanmıştır. Walker B motifi ise (ϕ)₄-Asp-Glu-(X)₂ (ϕ =hidrofobik amino asit, X=herhangi bir amino asit) dizisi şeklinde tanımlanmıştır. Bu motifteki aspartat residüsü magnezyum iyonunun yerleşimine yardımcı olurken glutamat residüsü, atak için bir su molekülünü aktive etmektedir (Guenther ve ark., 1997, Walker ve ark., 1982).

AAA alt-ailesi (ATPases associated with various cellular activities, Çeşitli hücresel aktiviteler ile ilişkili ATPaz'lar), 200-250 amino asitlik ATPaz domaini ve Walker B motifin C-terminalinde yer alan second region of homology (İkinci homolog bölge, SRH) ile de tanımlanmaktadır (Confalonieri ve Douget, 1995). Son yıllarda yapılan karşılaştırmalı dizi analizleri, SRH'ya sahip olmayan ve AAA⁺ olarak sınıflandırılan bir ATPaz alt-ailesi ortaya çıkarmıştır (Neuwald ve ark., 1999). AAA⁺ alt-ailesi üyeleri; membran füzyon, transport, proteinlerin birbirinden ayrıştırılması,

transkripsiyon, proteolizis, DNA replikasyonu ve DNA rekombinasyonunu içeren geniş hücresel faaliyetlerde görev almaktadırlar (Şekil-1.1) (Neuwald ve ark., 1999).



Şekil-1.1. AAA⁺ ATPaz'ların farklı hücresel fonksiyonları. AAA⁺ proteinlerin hücresel konumları ve fonksiyonları. Kırmızı ile yazılanlar AAA ATPaz ailesi üyesi ve geri kalanlar AAA⁺ ATPaz alt-ailesi üyesidirler (Ogura ve Wilkinson, 2001).

ATP-bağımlı proteazlar, çeşitli fizyolojik fonksiyonlar için gerekli olan proteolitik aktiviteye sahiptirler ve belirli bir süre içinde yıkıma uğrayacak özgül proteinlerin yıkımını sağlamak üzere dikkatlice düzenlenirler. İstenmeyen ya da zararlı proteinlerin hücreden uzaklaştırılmasını içeren hedefli protein yıkımının birçok yararı bulunmaktadır. Özgül proteinlerin hücresel seviyeleri, çevresel şartlara bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Örneğin stres koşulları (ısı şoku, besin yokluğu, asit ya da oksidatif stres) altında hücre içinde varolan proteinler; katlanmalarının açılması, agregasyon, kimyasal modifikasyon ya da tamamlanmayan biyosentez sırasında çoğunlukla zarar görürler. İşlevsel olmayan bu proteinler, onarılmadıkları takdirde potansiyel zararlı proteinler olarak yıkıma uğratılırlar. Bununla beraber stres koşulları altında oluşan transkripsiyonel yanıtlar, hücrenin stres koşullarıyla başa çıkacak, yıkımı azaltacak yeni ve farklı protein tiplerinin sentezlenmesiyle sonuçlanır. Çevresel stres oluştuğunda proteomun, proteolizisi hücresel işlev ve fizyolojiyi

normal duruma döndürmek için transkripsiyonel değişiklikler ile yeniden düzenlemesi gerekmektedir. Normal büyüme sırasında proteolizis, belirli proteinlerin hücrel konsantrasyonlarını belirli bir seviyede tutmak ya da kısmi proteolizis öncesinde etkin olmayan aktivitelerin serbest bırakılması için kullanılmaktadır. Bu nedenle, proteolizis; çeşitli yollardaki aktivitenin ve post-translasyonel protein seviyesinin düzenlenmesi için olanak sağlar.

Bütün AAA^+ proteazlar genel olarak benzer yapısal özelliklere sahiptirler. Birbiriyle bitişik 6 veya 7 altbirimden oluşan, 4 veya 6 halkanın bir araya gelmesiyle oluşturulan içi boş fiçi benzeri yapılara sahiptirler. Proteolitik aktif bölgeler, hatalı yıkımı engellemek için iç çember içinde gizlenmiş olarak bulunmaktadır. Hekzamerik AAA^+ ATPaz'lar, proteaz silindirlerinin bir ya da her iki ucuna bağlanır ve substratları tanıyarak doğal substrat katlanmalarını açıp, yıkım için proteaz çemberinin iç kısmına transfer ederler (Wenzel ve Baumeister., 1995, Van Melderen ve ark., 1996). Korunmuş AAA^+ domainleri bu ortak aktivitelerden sorumluyken özgül domainler sıklıkla adaptör ya da substrat tanınmasında görev almaktadırlar (Mogk ve ark., 2004).

Her bir ATPaz altbiriminin AAA^+ modülü, büyük $\alpha\beta$ domain ve küçük α -helikal domainden oluşmaktadır. Nükleotit bağlanması, komşu altbirimlerin birbirine bakan bölgelerinde gerçekleşmektedir. Birkaç korunmuş amino asit rezidüsü, nükleotit hidrolizinde rol oynamaktadır. Walker B motifinde oldukça korunmuş olan glutamik asit rezidüsünün mutasyonu, AAA^+ proteinin ATP hidrolizini bozmak için yeterlidir. Buna ilave olarak, korunmuş arjinin rezidüleri, ATP bağlanması ve hidrolizine eşlik eden konformasyonel değişikliklerin yaratılmasında kritik rol oynamaktadırlar (Ogura ve Wilkinson, 2001, Ogura ve ark., 2004).

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

1.1. ATP Bağımlı Proteazlar

Ökaryotlardaki en büyük ATP-bağımlı proteaz; ubiquitinasyon ile hedeflenmiş proteolizisten sorumlu olan 26S (20S proteazom ve 19S düzenleyici partikül) proteazomdur. Öbakteriler, 26S proteazom ve ubiquitinlerden yoksun olmalarına rağmen ClpAP, ClpXP, HslVU, Lon ve membrana bağlı FtsH olmak üzere beş farklı ATP-bağımlı proteaza sahiptirler (Tablo-1.1). Benzer proteazlar aynı zamanda mitokondri ve kloroplastlarda da mevcuttur. ClpAP/ClpXP ve HslVU'da peptidaz ve ATPaz aktiviteleri farklı altbirimlerde görülmektedir, bu yapılanmaları nedeniyle 26S proteazoma yapısal ve fonksiyonel anlamda benzerlik göstermektedirler. Lon ve FtsH'da peptidaz ve ATPaz aktiviteleri tek bir polipeptit zincirinin farklı domainlerinde görülmektedir. Tüm bu ATP-bağımlı proteaz komplekslerindeki ATPaz altbirimlerinin çoğu (ClpX, HslU, Lon, FtsH, 19S), tek bir ATP bağlama domainine sahip olmakla birlikte ClpA altbirimi iki ATP bağlama domainine sahiptir ve yine de bir AAA⁺ ATPaz alt-ailesi üyesidir (Gottesman, 2003).

Tablo-1.1. ATP-bağımlı proteazların genel özellikleri.

	Aile	Peptidaz	Aktif Bölge	Peptidaz Kompleksi Oligomerik Yapı	ATPaz	AAA domain sayısı	ATPaz Kompleksi Oligomerik Yapı
Hetero-oligomerler	ClpAP	ClpP	Ser Proteaz,	Tetradekamer (2 heptamerik halka)	ClpA	2	Hekzamer
	ClpXP	ClpP	Ser Proteaz	Tetradekamer (2 heptamerik halka)	ClpX	1	Hekzamer
	26S Proteazom	20S Proteazom	Thr Proteaz		19S	1	Hekzamer
	HslVU	HslV	Thr Proteaz	Dodekamer (2 heptamerik halka)	HslU	1	Hekzamer
Homo-oligomerler	Lon	C-terminal bölgesi	Ser Proteaz	Hekzamer	Merkezi bölge	1	Hekzamer
	FtsH	C-terminal bölgesi	Zn ⁺ Metalloproteaz:	Hekzamer	Merkezi bölge	1	Hekzamer

1.1.1. Proteaz La (Lon)

Proteaz La (Lon), *lon* geni tarafından kodlanan bir ısı şoku proteinidir (Goldberg, 1992; Maurizi, 1992; Chung, 1993, Chung ve ark., 1996). *E. coli* Lon proteaz, ilk tanımlanan ATP-bağımlı proteazdır. 784 amino asitten oluşan tek polipeptitin çoklu domainler oluşturduğu oligomerik bir enzimdir. Bu enzim, her biri 87 kDa moleküler ağırlığındaki altbirimlerden oluşan bir hekzamer (400-450 kDa) olarak karakterize edilmiştir. Lon proteaz, hetero-oligomer oluşturan diğer ATP-bağımlı proteazlardan ve Clp/Hsp100 ailesi proteinlerinden farklı olarak homo-oligomer yapıdadır (Goldberg ve ark., 1994).

Her bir altbirim N-terminal domain, merkezde konumlanan ATP-bağlama (ATPaz) domaini ve aktif Ser rezidüsünün konumlandığı C-terminal domainden oluşmaktadır. *E. coli*'de bu enzimler DNA hasarı ile uyarılan hücre bölünmesi inhibitörü olan SulA proteini, kapsül sentezinin pozitif düzenleyicisi olan RscA proteini ve λ N proteini gibi kısa ömürlü proteinlerin ve anormal proteinlerin yıkımını kataliz etmektedir (Torres-Cassaba ve Gottesman, 1987).

1.1.2. Proteaz Ti (Clp, Caseinolytic Proteaz)

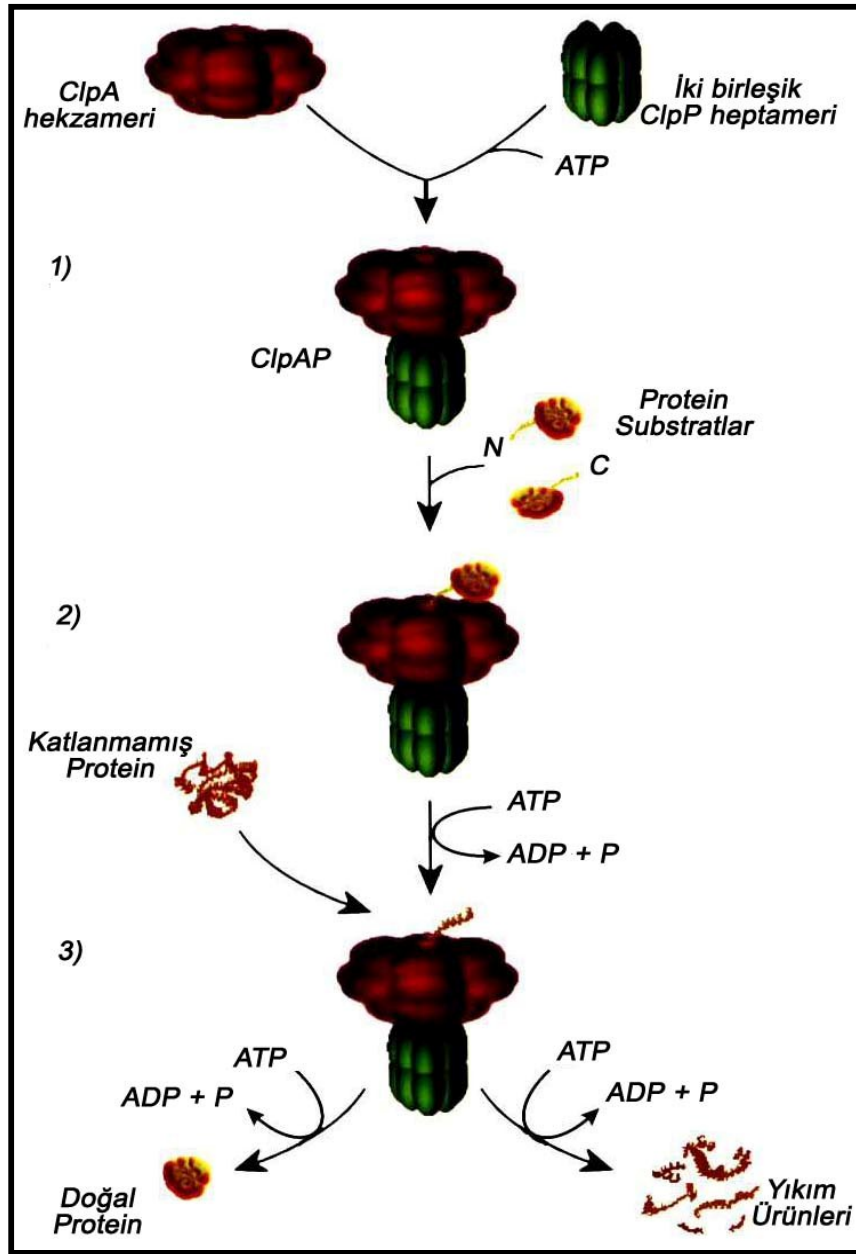
Fizyolojileri ve çalışma mekanizmaları bakımından en iyi karakterize edilen ATP-bağımlı proteazlar; *E. coli*'deki ClpAP ve ClpXP kompleksleridir. ClpP, katalitik üçlüye (Ser⁹⁷, His¹²² ve Asp¹⁷¹) sahip bir Ser proteazdır. ClpP, toplamda 14 aktif bölgeye sahip iki heptamerik halkadan meydana gelen içi boş silindirik bir yapıya sahiptir (Şekil-1.2) (Wang ve ark., 1997).

ClpP tek başına, küçük peptitleri (en fazla 6 amino asit büyüklüğündeki) yıkabilme yeteneğine sahipken, büyük peptit veya proteinleri tek başına yıkamamaktadır. Zira bu moleküllerin silindirik yapının iç bölgesindeki proteolitik merkezi oyuğa geçmesi için öncelikle küçük aksial porlardan geçmesi gerekmektedir. Büyük polipeptitlerin yıkımı, birer AAA⁺ ATP alt-ailesi üyesi olan hekzamerik ClpA ve ClpX halkalarının ClpP'ye bağlanıp kompleks oluşturmasıyla, ATP-bağımlı bir

şekilde gerçekleştirilmektedir (Hwang ve ark., 1988, Woo ve ark., 1989, Thompson ve ark., 1994) (Şekil-1.2). Bu ATPazlar, substrat tanınması, substrat katlanmalarının açılması ve katlanmaları açılan substratların proteolitik bölgeye transferinden sorumludurlar (Singh ve ark., 2000). Gerçekte ClpA ve ClpX; ClpP'nin farklı uçlarına bağlanarak daha fazla hücrel substrat bağlayabilen karmaşık ClpAPX kompleksleri oluşturabilme potansiyeline sahiptir (Ortega ve ark., 2004).

ClpA, ClpB, ClpX ve ClpY (HslU) olarak isimlendirilen yapısal ve fonksiyonel açıdan birbirinden farklı olan Clp düzenleyicileri, AAA⁺ alt-ailesi üyesi ATPazlardır. Dizi karşılaştırmaları, mutasyon analizleri ve biyokimyasal çalışmalar sonucu tanımlanan (LIVMP)-G-(FL) tripeptit motifin varlığının Clp ATPazların ClpP'ye bağlanması için indikatör rolü oynadığını açığa çıkarmıştır. Bu motif ClpA ve ClpX'de bulunurken ClpB ve ClpY'de bulunmamaktadır. Bu bulgular, ClpA ve ClpX, ClpP'ye bağlanabilirken ClpB ve ClpY'nin neden bağlanamadığını açıkça ortaya koymaktadır (Kim ve ark., 2001).

ClpAP ve ClpXP proteazlar, birkaç hücrel aktiviteden sorumludurlar ve farklı substrat özgüllüklerine sahiptirler (Dogan ve ark, 2002). Genel olarak ClpAP birbirinden oldukça farklı substratları yakalayabilirken ClpXP, hedefleme motifi olan proteinleri yakalamada daha yeteneklidir. ClpP proteazın *in vitro* ve *in vivo*'da yıkıma uğrattığı substratlar Tablo-1.2'de gösterilmiştir. ClpP, *E. coli*'nin besin açlığı sırasında hayatta kalması ve bazı hücrel protein miktarlarının düzenlenmesinde işlevşeldir. Farklı canlılarda ClpP'nin, hücre döngüsünün G1 fazından S fazına geçiş gibi çeşitli fizyolojik süreçlere katıldığı bilinmektedir (Weichart ve ark., 2003). ClpP'den yoksun *Bacillus subtilis* 'te yüksek sıcaklıkta büyüyememe, gelişememe ve sporulasyona girememe gibi bozukluklar görülmüştür (Kang ve ark., 2001).



Şekil-1.2 Clp proteazın işleyiş mekanizması. 1-) ATPaz altbirimlerinden oluşan bir halka, proteolitik kompleks (ClpP heptamerleri) ile birleşerek (ATPaz halkaları, proteolitik çekideğin bir ya da her iki ucuna bağlanabilir) aktif proteaz kompleksi oluşturur. Bu birleşme ATP ile katalizlenir. 2-) ATPaz domainleri uygun substratın C- ve N-terminallerine yakın konumlanan tanıma motiflerine bağlanırlar. 3-) Substrat katlanmaları açılır, proteolitik bölgelerin bulunduğu merkezi oyuğa taşınarak burada yıkıma uğratılır. Bazı koşullarda substrat bu bölgeden ayrılıp tekrar katlanabilmektedir (Hlavacek ve Vachova, 2002).

Tablo-1.2 ClpP proteazın *in vitro* ve *in vivo* substratları

Enzim	EC Num.	<i>in vitro</i> Substratlar	<i>in vivo</i> Substratlar
ClpP	3.4.21.92	-Bakteriofaj λ protein O - β -galaktosidoz füzyon protein -Kasein -Glukagon -SsrA-işaretli proteinler -Okside insulin B zinciri -Suc-LY-AMC gibi fluorogenik peptidler	-Karbon-azlığı ile uyarılan proteinler -Anormal proteinler -Kavanillenmiş proteinler -Isı şoku ile hasar gören proteinler - σ^S , SsrA-işaretli proteinler, λ protein -ClpA, RepA, Phage P1 PhD -N-kuralı proteinleri -UmuD/UmuD', hataya eğilimli DNA polimeraz dimeri -MazE, <i>E. coli</i> hücre ölümü düzenleyicisi -Dps, besin açlığı sırasında uyarılan DNA protein -DksA, DnaK süpresör protein - <i>C. crescentus</i> CtrA, transkripsiyonel regülatör -CtsR, ısı şoku regulon repressör, MurA - <i>Salmonella</i> FlhD ve FlhC, flagellum biyosentezi regülatörleri -Faj Mu transpozaz ve mutant vir repressör

1.1.3. FtsH

ftsH geni, yaklaşık 70 kDa moleküler büyüklüğe sahip, aktif merkezinde Zn^{2+} içeren ATP bağımlı bir metalloproteazı kodlamaktadır. İlk olarak *E. coli*'de birbirinden bağımsız dört grup tarafından tanımlanmış, bu nedenle dört farklı şekilde isimlendirilmiştir: *hfl* (high frequency of lysogenization) (Belford ve Wulf, 1973), *ftsH* (filamentation temperature sensitive) (Santos ve Almeida, 1975), *tolZ* (colicin-tolerant mutant) (Matsuzawa ve ark., 1984) ve *mrsC* (mRNA stability) (Granger ve ark., 1998). Clp ATPazlar gibi FtsH da bir AAA⁺ alt-ailesi üyesidir (Neuwald, 1999, Langer, 2000). Prokaryotlarda ve ökaryotların mitokondri ve kloroplast ile ilişkili bölgelerinde yaygın olarak bulunmaktadır.

FtsH proteini diğer ATP-bağımlı proteazlardan farklı olarak stoplazmik membrana demirlemiştir. N-terminale yakın iki bölge membrana dolanmıştır, N-terminalin çok kısa bir bölümü ve C-terminal sitoplazmaya dönüktür (Shumann, 1999). FtsH, *E. coli*'de HflK ve HflC membran proteinlerine bağlı ve YccA ile geçiçi olarak birleşen bir membran proteini olarak rapor edilmiştir (Kihara ve ark., 1998). FtsH'nin en önemli fonksiyonu ısı şoku ile uyarılan *E. coli* transkripsiyon faktörü σ^{32} 'nin yıkımıdır ve ayrıca şaperona benzeri aktivite de göstermektedir (Bukau, 1993, Schumann, 1999).

1.1.4. HslVU (ClpQY, Prokaryotik Proteazom)

HslVU proteaz, öbakterilerin % 60'ında ve birçok ökaryotik türde bulunmaktadır (Gille ve ark., 2003, Ruiz-Gonzales ve Marin, 2006). Varlığına dair ilk kanıt, *E. coli*'deki iki operonun (*hslTS/ibpAB* ve *hslVU*) oluşturduğu dört ısı şoku geninin belirlenmesi çalışmasından elde edilmiştir. HslVU proteaz altbirimlerinin *E. coli*'de ilk olarak, *hslVU* promotorunun σ^{32} tarafından tanınan konsensus diziye mükemmel bir şekilde uygunluk gösterdiği ve bu operonun transkripsiyonunun ısı şoku sırasında oldukça arttığının belirlenmesi ile HslVU'nin ısı şoku sırasında zarar görmüş proteinlerin yıkımında işlev gördüğü şeklinde yorumlanmıştır (Chuang ve ark., 1993).

Daha sonra yapılan çalışmalar, enzim substratları, proteaz ve ATPaz altbirimlerinin ATP'ye olan gereksinimleri ve ayrıca proteaz altbiriminin aktif bölge analizleri üzerinde yoğunlaşmıştır. *E. coli* HslVU proteazı, *hslVU* (*heat shock locus VU*) operonu tarafından kodlanan, moleküler büyüklükleri 19 kDa olan HslV ve 50 kDa olan HslU ısı şoku proteinlerinden oluşmaktadır (Chung ve ark., 1993)

1996'da HslVU'nun proteolitik aktivitesi ile yapılan ilk çalışmalar, ³H- ya da ¹⁴C-etiketli kazein ya da insülin β-zincirinin yıkımını ortaya koymuştur. Üç boyutlu yapısı kararlı olmayan ve birçok proteaz tarafından yıkıma uğratılan bu substratlar, HslVU'ya zayıf olarak bağlanabilmekte ve çok yavaş bir şekilde yıkıma uğratılmaktadırlar (Rohrwild ve ark., 1996).

HslVU başlangıçta saflaştırıldığında, potansiyel substratları olan çeşitli florogenik substratlar ile taranmıştır (Rohrwild ve ark., 1996). Daha önceleri proteazomun kimotripsin-benzeri aktivite deneylerinde kullanılan N-α-benziloksikarbonil-Gly-Gly-Leu-7-amido-4-metilkoumarin'in (Z-GGL-AMC) (Chu-Ping ve ark., 1992), HslVU tarafından etkili bir şekilde kesildiği saptanmıştır (Rohrwild ve ark., 1996). HslV, tek başına zayıf peptidaz aktivitesine sahipken ATP ve HslU varlığında bu aktivitenin 500 kat arttığı bulunmuştur (Huang ve Goldberg, 1997).

HslVU proteazın, proteazom gibi kimotripsin-benzeri aktivite göstermesine rağmen Benzoil-Arg-Gly-Phe-Phe-Leu-4-methoksi-β-naftilamid (Bz-RGFFL-MNA), Glutaril-Ala-Ala-Ala-4-methoxy-β-naftilamid (Glt-AAA-MNA), Suksinil-Phe-Leu-Phe-β-naftilamid (Suc-FLF-βNA) gibi tripsin-benzeri ve peptidil-glutamil-peptidaz aktivitesi ile yıkılan proteazom substratlarını yıkamadığı açığa çıkarılmıştır (Rohrwild ve ark., 1996)

Aynı çalışmalarda, HslV proteaz N-terminal Thr rezidüsünün ökaryotik proteazomdaki N-terminal Thr gibi aktif nükleofil olarak davranabileceği öngürülerek çeşitli Thr, Ser, Cys ve metalloproteaz inhibitörleri varlığında inhibisyon deneyleri yapılmıştır. Buna göre HslV proteaz aktivitesinin ökaryotik proteazom ve aynı zamanda Ser ve Cys proteaz inhibitörleri olan Z-Leu-Leu-norlösinal (MG132), asetil-Leu-Leu-norlösinal (Kalpain inhibitör 1) ayrıca Thr proteaz inhibitörü olan

Laktasistin ve 3,4-dikloroizokoumarin tarafından inhibe edildiği açığa çıkarılmıştır. Bundan farklı olarak, bir Ser proteaz inhibitörü olan fenilmetilsulfonil florid, Cys proteaz inhibitörü olan E64 ve birer metalloproteaz inhibitörü olan *O*-fenantrolin ve Bestatin'nin HslV aktivitesi üzerinde etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Tüm bu sonuçlar ile birlikte HslV'nin ökaryotik proteazom gibi bir N-terminal proteaz olduğu sonucuna varılmış, bu sonuç 1996'da Yoo ve arkadaşları tarafından HslVU proteazın karakterizasyonuna yönelik yapılan çalışmalar ve 1997'de yine Yoo ve arkadaşları tarafından yapılan aktif bölge mutasyon çalışmaları ile de desteklenmiştir.

HslV'nin en belirgin ve dikkat çekici özelliği; ökaryotlar, öbakteri ve arkealardaki 20S proteazomun β -altbirimlerine homoloji göstermesidir. HslV altbirimleri, *Thermoplasma acidophilum* 20S proteazomunun β -altbirimleriyle aynı katlanmalara sahip olup % 18 dizi benzerliği göstermektedir (Bochtler ve ark., 1997).

ATP varlığında HslU ATPaz hem heksamerik hem de heptamerik halka yapısı oluşturabilmektedir. Bu HslU halkaları, HslV halkalarının her iki ucuna bağlanarak $U_6V_6V_6U_6$ ya da $U_7V_6V_6U_7$ konfigrasyonlarındaki HslVU kompleksini oluşturmaktadır (Rohrwild ve ark., 1997; Bochtler ve ark., 2000).

HslVU ve komponentlerinin yapısal ve fizyolojik özellikleri hakkındaki bilgilerin çoğu *E. coli* ile yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Bununla birlikte, HslVU'ye benzeyen bir proteaz *Bacillus subtilis*'te bulunmuştur. Bu proteinler (CodW peptidaz ve CodX ATPaz), *cod* operonu tarafından kodlanmakta ve *E. coli*'deki HslV-HslU'ya % 52 oranında amino asit benzerliği göstermektedir. İlginç bir şekilde CodW, HslV ve 20S proteazomun β -altbirimlerinden farklı olarak aktif bölge residüzü gibi işlev gören N-terminal Thr yerine N-terminal Ser rezidüsünün hidroksil grubunu aktif nükleofil olarak kullanmaktadır. CodWX, N-terminalinde aktif bölge olarak davranan Ser residüüsüne sahip ilk ATP-bağımlı proteazdır (Kang ve ark., 2001).

HslVU'nun fizyolojik rolü ile ilgili *E. coli*'de yapılan ilk çalışmalarda, *hsUV* genlerinin delesyonu sonucunda 45 °C altındaki sıcaklıkta belirli fenotipik bir etki görülmemiştir ancak 45 °C'ın üstündeki sıcaklıklarda hücrelerde yavaş büyüme ya da ölüm gözlenmiştir (Katayama ve ark., 1996; Kanemori ve ark., 1997).

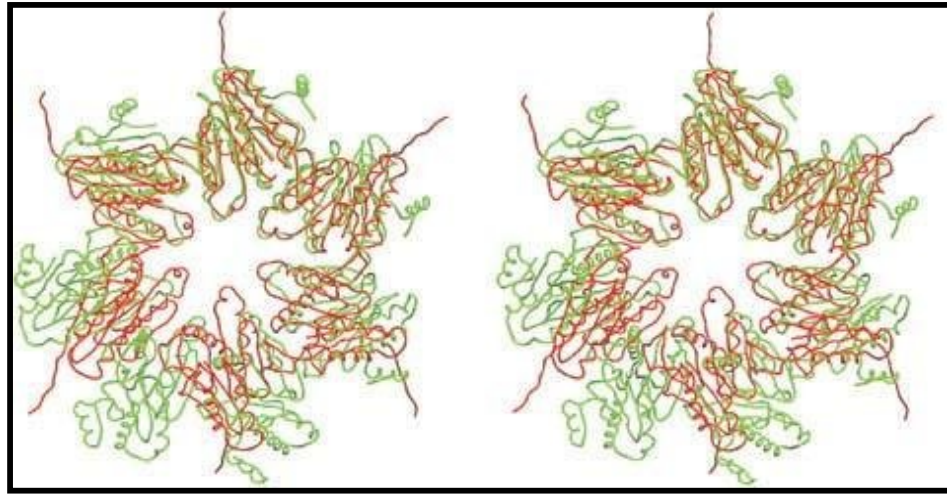
ClpXP gibi bazı ATP-bağımlı proteazların yıkıma uğradığı ve aktivitesini kaybettiği 50-60 °C sıcaklık aralığında en yüksek aktiviteyi, *E. coli*'den saflaştırılan HslVU proteaz göstermiştir (Burton ve ark., 2005). Bunun sonucu olarak, yüksek sıcaklıklarda yıkıma uğrayan veya katlanmaları açılmış hücresel proteinlerin yıkımında HslVU'nun özel bir rol oynadığı görülmüştür (Missiakas ve ark., 1996).

Huang ve Goldberg tarafından 1997'de yapılan çalışmalarda, reaksiyon tamponu içindeki peptidaz aktivitesinin, karmaşık yollar üzerinden başta K^+ olmak üzere çeşitli katyonların varlığına da bağımlı olduğu gösterilmiştir. Buna göre ATP ve ATP analogları ve farklı katyonların kullanıldığı reaksiyonlarda AMP-PNP varlığında aktivitenin başta K^+ olmak üzere NH_4^+ ve Cs^+ 'ya bağımlı olduğu ancak bu etkinin ATP kullanıldığında görülmeyeceği açığa çıkarılmıştır. Aynı çalışmada ATP varlığında en yüksek proteolitik ve kaseinolitik aktivitenin $MgCl_2$ varlığında olduğu gözlenmiştir.

1996 ve 1997'de birbirinden bağımsız bir şekilde yapılan taramalardan HslVU ATP-bağımlı proteazın, ısı şoku proteinlerini düzenleyen ve *E. coli*'de hücre bölünmesinin SOS aracılı inhibisyonunu baskılayan proteinler (Missiakas ve ark., 1996, Khattar, 1997) olduğu ortaya çıkarılmıştır. HslVU'yu yüksek seviyede ifade eden veya bu proteinden yoksun olan suşlarda gözlenen biyolojik cevap, HslVU substratlarının durağan seviyelerinde artma veya azalma şeklinde olmuştur (Kanemori ve ark., 1997). Bir ısı şoku proteini olarak HslVU, ısı şoku faktörü olan σ^{32} 'nin yıkımı ile ısı şoku cevabını, hücre bölünmesi inhibitörü SulA yıkımı ile de SOS cevabını etkilemektedir (Kanemori ve ark., 1999, Cordell ve ark., 2003). Missiakas ve arkadaşları (1996) HslVU proteazın puromisin varlığında üretilen hatalı sonlanmış peptitlerin yıkımında rol aldığını ortaya çıkarmışlardır. Yakın bir zamanda, *Helicobacter pylori* hücre yüzeyinde HslV'nin belirlenmesi bu enzimin bakteri-konak etkileşiminde rol alabileceğine bir kanıt olarak değerlendirilmiştir (Du ve Ho, 2003).

1.1.4.1. HslV Peptidaz

HslV'nin arkeabakteriyal ve ökaryotik proteozomların β -altbirimleri ile dizi benzerliği gösterdiği *E.coli* HslV geni dizilendikten hemen sonra fark edilmiş ve daha sonra diğer ilişkili öbakterilerin dizileri ile de karşılaştırılarak bu benzerlik desteklenmiştir. Dizi benzerliğinin anlaşılmasından sonra yapılan çalışmalar, olası yapısal benzerlikler üzerinde yoğunlaşmıştır. Rekombinant HslV'nin elektron mikroskop görüntüleri, partikülün proteozomlarda olduğu gibi hekzamerlerden kurulan bir dimer oluşturarak giriş kısmı olmayan merkezi bir boşluğu çevrelediğini ortaya çıkarmıştır (Rohrwild ve ark., 1997). Bunu takiben, HslV'nin bu beklenmeyen hekzamerik simetrik yapısı ve altbirim katlanmalarının ökaryotik proteozomlar ile benzerliği X-ışını kristalografisi ile de doğrulanmıştır. Ayrıca kristallografik veriler, hareket eden halkanın ökaryotik proteozomlar ile karşılaştırıldığında altbirim-altbirim arayüzünde küçük değişiklikler ile sonuçlandığını ve proteazomun yapılımasıyla benzer olduğunu açığa çıkarmıştır (Şekil-1.3) (Bochtler ve ark., 1997).



Şekil-1.3 *E.coli* HslV ve *T. acidophilum* proteozomunun karşılaştırılması. *E.coli* HslV'nin bir hekzamerik halkası (kırmızı) ile *T. acidophilum* proteozomunun bir heptamerik halkasının β altbiriminin (yeşil) üst-üste konulmuş halinin üç boyutlu gösterimi. Halkanın 'üst' kısmındaki altbirimler en uygun şekilde yerleştirilmiştir. HslV alt ünitelerinin merkezden dışa doğru uzanan 'kuyruk'ları klonlama sonucu oluşan histidin kuyruklarıdır (Bochtler ve ark., 1997).

HslV'nin 12 aktif bölgesinin tamamı, merkezi oyuğun iç duvarına konumlanmıştır. *E. coli*'de her bir aktif bölge, aynı halka üzerinde bir sonraki aktif bölgeye 28 Å uzaklıktayken farklı halkalar üzerindeki iki komşu aktif bölge arasındaki uzaklık, 26 Å'dür (Azim ve Noor, 2007)

HslV kendi başına, normal hidrofobik substratlar üzerinde zayıf bir petidaz aktivitesi göstermektedir ancak HslU ATPaz, bu aktiviteyi 20 kat güçlendirecek şekilde uyarmaktadır (Yoo ve ark., 1996). HslU, HslV tarafından 2-3 kat arttırılabilecek içsel ATPaz aktivitesine sahiptir. Bu yüzden HslV ve HslU, birbirlerinin konformasyonlarında değişiklik yapabilme yeteneğine sahiptirler. 20S proteazomun β -altbirimlerinde olduğu gibi, HslV'nin N-terminalinde de korunmuş 2 Thr residüsü bulunmaktadır.

Özgün olarak, HslV'nin N-terminal Thr'iyile olduğu kadar 20S proteazomun altbirimleriyle de etkileşen *laktasistin*'nin, HslVU'nin proeolitik aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Seol ve ark., 1997, Fenteany ve ark., 1995). Ayrıca, Thr'in Val ile yerdeğiştirmesi ya da delesyonunun, enzimin aktivitesini ortadan kaldırdığı bulunmuştur. Bu nedenle N-terminal Thr, 20S proteazomda olduğu gibi aktif nükleofil bölge olarak davranmaktadır. Ancak N-terminal Thr içermeyen inaktif HslV, HslU ile yaban tip HslV'den daha sıkı etkileşim halindedir ve HslU'nun ATPaz aktivitesini 10 kat arttırdığı açığa çıkarılmıştır. Buna karşın N-terminalindeki her iki Thr residüsünden yoksun olan HslV, ne HslU ile etkileşime girebilir ne de HslU'nun ATPaz aktivitesini arttırabilir. Bu nedenle, HslV N-terminal Thr'in, ikinci Thr katalitik aktivitesinin yanında HslU ile etkileşimde yardımcı rol oynadığı düşünülmektedir (Yoo ve ark., 1997).

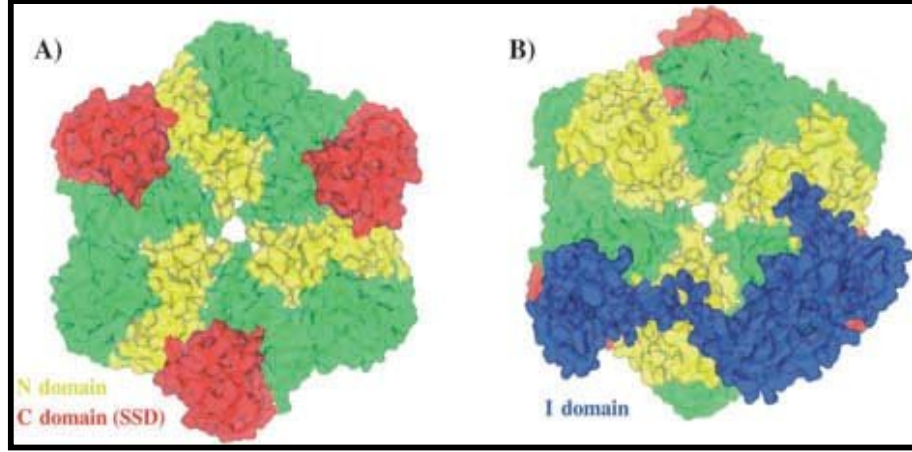
1.1.4.2. HslU ATPaz

Dizi temel alındığında HslU, Walker A (fosfat-bağlama ilmeği ya da P-loop) ve Walker B (magnezyum-bağlama motifi) motiflerini bulundurması nedeniyle kolaylıkla bir ATPaz olarak sınıflandırılmıştır. HslU için iki farklı sınıflandırma modeli önerilmiş olup HslU, PDZ-domain içeren ATPaz (Levchenko ve ark., 1997) ya da alternatif olarak AAA⁺ ATPaz olarak sınıflandırılmıştır (Neuwald ve ark.,

1999). Kristallografik çalışmaların sonuçları, AAA⁺ ATPaz modelinin daha doğru olduğunu açığa çıkarmıştır (Bochtler ve ark., 2000). AAA⁺ ATPaz'lar, kısa bir linker ile birbirine bağlanan iki temel domainden oluşmaktadırlar. Nükleotid, bu iki domainin arayüzüne bağlanmaktadır. HslU'da ilk olarak gözlemlendiği gibi, nükleotid varlığı ya da yokluğu bu iki domainin birbirlerine göre konumlanmalarını değiştirmektedir (Bochtler ve ark., 2000). HslU'da çok farklı nükleotid bölgelerinin bulunması üzerine daha sonraları model, nükleotid hidrolizinin gerçekleştiği bölgeye göre değiştirilmiştir (Wang ve ark., 2001). Nükleotid, bir altbirimin hem N- hem C-domainine hem de komşu altbirimin ara yüzeyine temas edecek şekilde konumlanmıştır. İki altbirimin nükleotid bağlama bölgelerindeki korunmuş residüleri, oldukça polar bir ortam oluşturmaktadır (Bochtler ve ark., 2000).

C-terminalin substrat tanınmasındaki rolü üzerine yapılan araştırmalar önceleri biyokimyasal olarak tanımlanan ve diğer AAA⁺ ATPaz'larda da bulunan SSD (Sensör ve substrat-tanım domaini) domainin belirlenmesiyle başlamıştır. Buna göre bu domainin, substratların yakalanmasında bir çengel görevi gördüğü düşünülmüştür. Ancak HslU'nun kristal yapısı anlaşıldığında C-domainin, altbirimlerin oligomerizasyonunu yönettiği açığa çıkarılmıştır. Çözücülerin ulaşabildiği bölgeler HslU'nun periferisinde yer almaktadır. Merkezi oyuğun oldukça uzak bir bölgesinde, dışa doğru uzanan ve 'I domain' olarak adlandırılan ek bir domain bulunmuştur (Şekil-1.4). Kristal yapıdan hareketle, dışa doğru uzanan I domainlerinin bir çengel gibi hareket ettiği açığa çıkarılmıştır. Daha sonraları bu modele uygun bir şekilde I domainin, katlanmış substrat MBP-SulA'nın yıkımında gerekli olduğu açığa çıkarılmıştır (Groll ve ark., 2005).

HslU, SulA'nın agregasyonunu önlemede moleküler şaperon olarak davranır, aynı zamanda HslV güdümlü yıkımda düzenleyici elemandır (Seong ve ark., 2000). Mekanik ayrıntıları henüz tam olarak bilinmeyen ATP-bağımlı işlemlerde; HslU hekzameri, substrat proteini tanır, katlanmalarını açar ve substrat proteininin yıkılmak üzere HslV dodekamerinin merkezi proteolitik oyuğuna taşınmasını sağlar (Huang ve Goldberg 1997, Kwon ve ark., 2003).



Şekil-1.4. HslU'nun domain yapılanması. A) Altıgen eksenli HslU'nun I domainlerinin zıttı yönünden görünümü. B) Altıgen eksenli HslU'nun I domainleri üzerinden görünümü. Her iki altbirimden biri, domaine göre boyanmışken (N domain=sarı, I domain=mavi, C ya da SSD domain=kırmızı) diğer altbirimler yeşile boyanmıştır (Groll ve ark., 2005).

1.1.5. 26S Proteazom

Genellikle *proteazom* olarak bilinen 26S proteazom, ökaryotik hücrelerin nükleus ve sitoplazmasında eksprese edilen çoklu katalitik etkiye sahip bir enzim kompleksidir. İlk zamanlarda proteazomun sadece hasarlı veya yanlış katlanmış proteinlerin geri dönüşümünde rol oynadığı düşünülse de son on yılda yapılan çalışmalar, hücre döngüsündeki etkin rolüne işaret etmiş ve dolayısıyla hücrenin hayatta kalmasında kritik öneme sahip olduğunu açığa çıkarmıştır. Bugüne kadar proteazomun birçok hücresel süreçte merkezi ve vazgeçilmez bir öneme sahip olduğu ispatlanmıştır (Şekil-1.5).

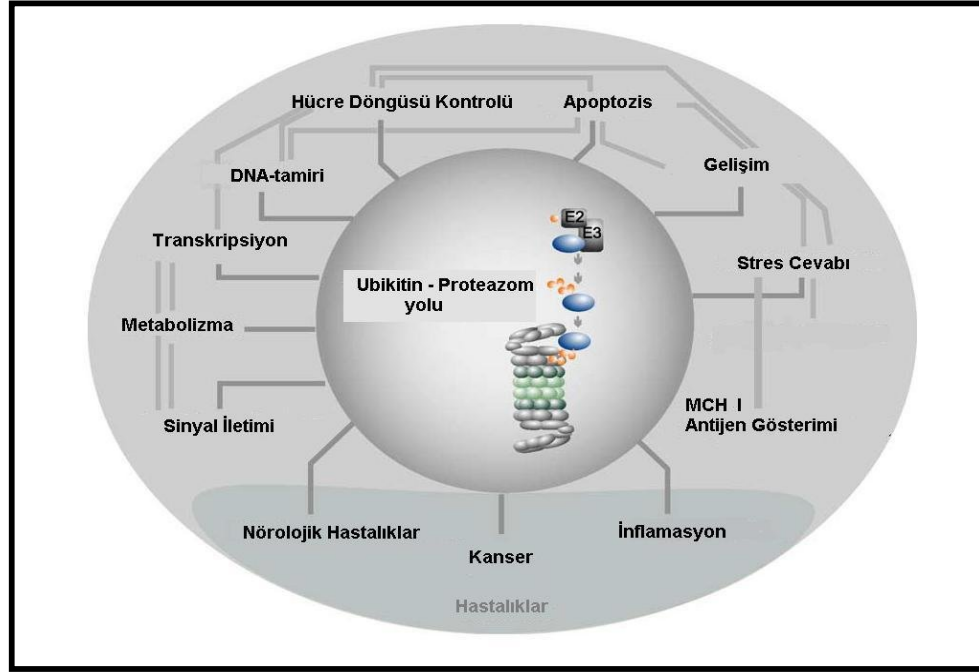
Yaklaşık 2600 kDa büyüklüğünde olan 26S proteazom, silindirik şekilli proteolitik çekirdeği oluşturan 20S proteazom (700 kDa) ve poliubikitine bağlanmayı sağlayan enerji bağımlı 19S düzenleyici kompleksten (900 kDa) oluşur (Ciechonover, 1994; Coux ve ark., 1996; Baumeister ve ark., 1998) (Şekil-1.6). 20S kompleksin daha basit yapısal organizasyonu birçok Arkeal bakterilerde (*Thermoplasma acidophilum*, *Methanosarcina thermophila*, *Methanococcus jannaschii*, *Pyrococcus furiosus*, *Haloferax volcanii*, *Thermoplasma volcanium* gibi) ve Gram (+)

Actinomyces'lerde görülmektedir (Dahlmann ve ark., 1989, Bauer ve ark., 1997, Wilson ve ark., 1999, Barber ve Ferry, 2001, Özdemir, 2003).

α ve β olmak üzere iki tip altbirimden oluşan *T. acidophilum* 20S proteazomu, birbirine bitişik yedi üyeli dört halkadan meydana gelir. İçteki halkalar proteolitik olarak aktif β -altbirimlerinden oluşurken dıştaki halkalar α -altbirimlerinden meydana gelmektedir (Zwickl ve ark., 1992, Löwe ve ark., 1995, Groll ve ark., 1997). 26S proteazomun 19S kompleksi, moleküler ağırlıkları 25 kDa ila 110 kDa arasında değişen 20 farklı altbirimden oluşmuştur. 19S kompleksinin ATPaz altbirimleri, birer AAA⁺ alt-ailesi üyesi olup, proteazomun substrat proteinlere kovalent bağlanan poliubikitin zincirlerinin tanınması yoluyla substratın belirlenmesi, katlanmaların açılması ve substratın proteolitik bölgeye taşınmasından sorumludur (Groll ve ark., 2005).

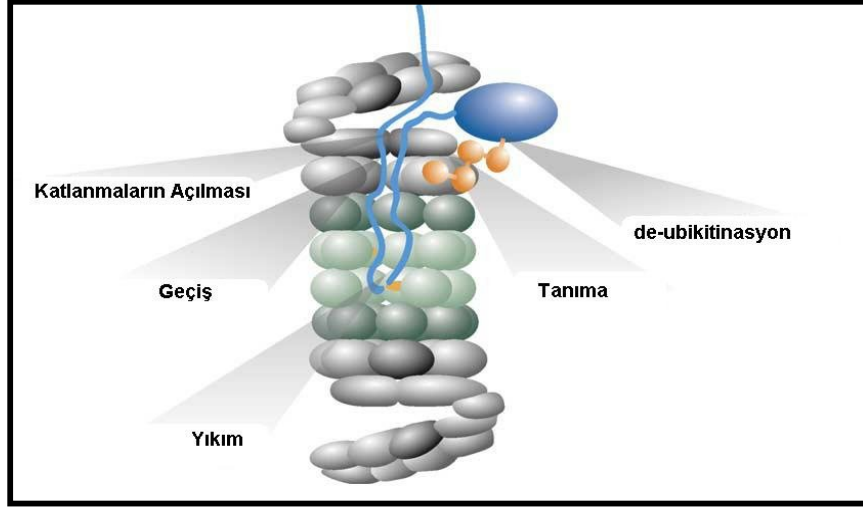
Katalitik oyuğun aktif bölgeleri substrat özgüllüğü ve aktivitelerine göre birbirinden farklı olup benzer proteolitik aktivite ve özgüllüğe sahip enzimler gibi isimlendirilirler. Bu nedenle, kimotripsin-benzeri, tripsin-benzeri ve post glutamil peptid hidrolaz-benzer olarak isimlendirilirler (Groll ve ark., 2001). Proteinler 20S proteazom tarafından 3-25 amino asitlik peptidler oluşacak şekilde sürekli parçalanır (Nussbaum, 1998).

Proteazomun öncelikli görevi protein yıkımıdır. Proteazom substratları arasında sinyal molekülleri, tümör baskılayıcıları, hücre döngüsü düzenleyicileri, transkripsiyon faktörleri, yıkımları diğer proteinleri aktive edecek inhibitör moleküller ve anti apoptotik proteinler bulunmaktadır (Kisselev ve Goldberg, 2001)



Şekil-1.5 Ubikitin-proteazom yolağının hücresel fonksiyonları. Ubikitin-proteazom yolu ile düzenleyici protein yıkımı, çeşitli hücresel yollarda kritik öneme sahiptir. Ubikitin-proteazom sistemindeki hatalar bazı hastalıklara neden olur (Wolf ve Hilt, 2004)

Bir proteinin proteazom tarafından tanınabilmesi için *ubikitin* adı verilen küçük bir peptidin bu proteine bağlanması gerekmektedir. Bu süreç, serbest ubikitini aktive edip, hedef proteine yönlendiren birkaç enzim tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu enzimler E1, E2 ve E3 olarak adlandırılır. E1, ubikitini aktive edip taşıyıcı protein E2'ye yönlendirir. E2, ubikitini E3'e taşır. E3, ubikitinin kovalent bağla hedef proteine eklenmesi için hedef protein ve E2'ye bağlanır. Bu süreç birkaç defa tekrarlanarak proteinin proteazom tarafından yıkılması için işaret görevi gören poliubikitin zinciri oluşturulur (Wilkinson, 1999, Pickart, 2001). Proteinlerin ubikitinlendiği ve proteazom tarafından yıkıldığı yolağa *ubikitin-proteazom yolağı* adı verilir ve sadece hücre döngüsü için değil aynı zamanda inflamasyon yanıtı ve antijen tanınmasında da önemlidir (Pickart, 2001).



Şekil-1.6. Proteazomun işleyiş mekanizması. Substratlar genellikle poliubikitin modifikasyonu ile tanınır, ardından 26S proteazomdaki 19S düzenleyici partiküllere bağlanır. Substrat daha sonra 19S bölgesinde konumlanan altıgen halkalı ATPaz'ın ATP kullanmasıyla yıkılır. Katlanmaları açılan peptit zinciri, 20S çekirdek partikülün proteolitik oyuğuna nakledilir. Nakil işlemi sürerken poliubikitin işaretli de-ubikitinasyon enzimleri tarafından kesilir (Wolf ve Hilt, 2004).

20S proteazomun atası, bakteriyel proteazom (HslV) ve arkeobakteriyel proteazomdur. Bu partikülün karakteristik özelliği, α altbirimleri içeren iki dış halka ve β altbirimleri içeren iki merkezi halkadan oluşan dört adet yedi altbirimli yapıya sahip olmasıdır (Pühler ve ark., 1992, Grziwa ve ark., 1991, Löwe ve ark., 1995, Baumister ve ark., 1998). Aktif bölgeler, sadece β altbirimlerinde bulunur ve bakterilerde her bir β altbirimi aktif iken ökaryotik proteazomlarda sadece üç β altbirimi aktiftir (Wolf ve Hilt, 2004). α altbirimleri, β altbirimlerinden evrilmişlerdir (Missiakas ve ark., 1996). İki dış halkayı oluşturan 2×7 α altbirimleri de prokaryotlardakilere benzerdirler (Löwe ve ark., 1995, Baumister ve ark., 1998). Ökaryotların evriminin ilk zamanlarında 20S proteazomun α ve β altbirimlerinin her ikisine ait DNA dizileri her biri için yedi farklı protein altbirimi oluşturmak üzere farklılaşmıştır. İlginç bir şekilde bu süreç boyunca ökaryotik proteazomdaki β altbirimlerinin aktif bölge sayısı üç β altbiriminde toplam altı aktif bölgeye düşmüştür. Buna paralel olarak arkeal β altbirimlerinin amino asit özgüllüğü daha dar olan üç farklı özgüllüğe düşmüştür. Bunlar; kimotripsin-benzer, tripsin-benzer ve

peptidil-glutamil-peptit hidrolize edici aktivite olarak karakterize edilir (Wolf ve Hilt, 2004).

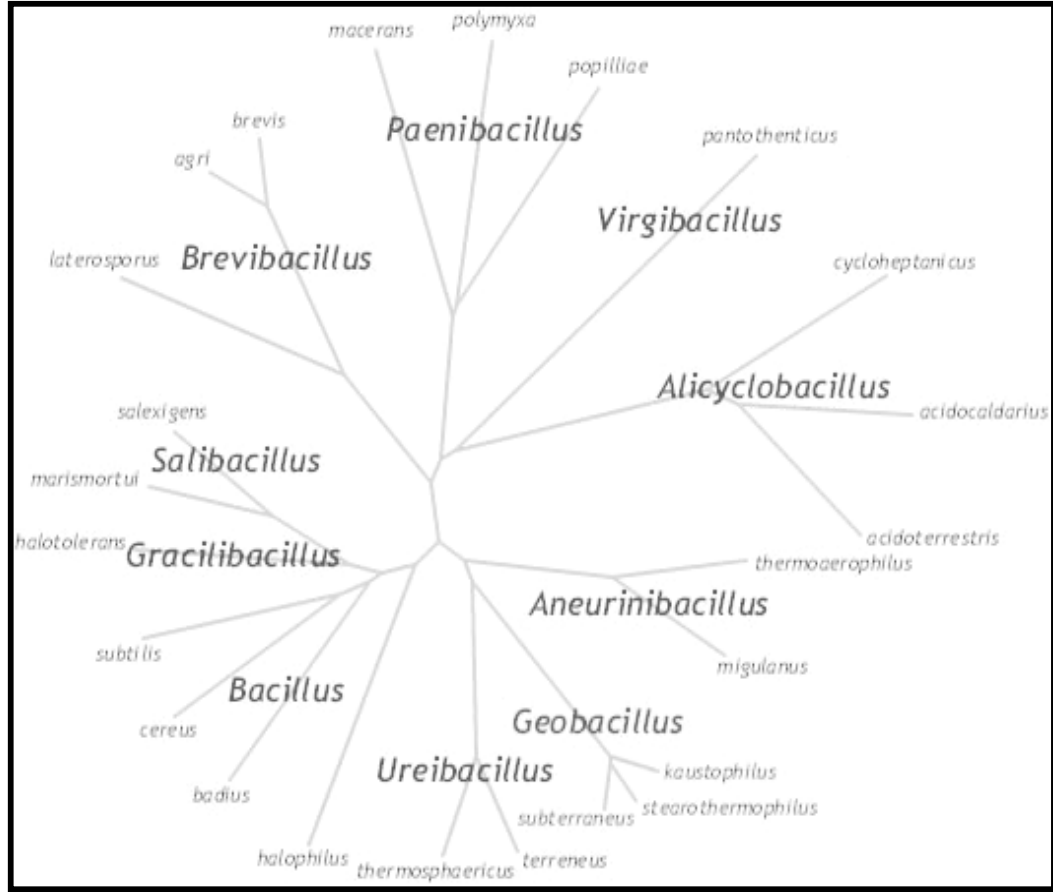
1.2. *Geobacillus kaustophilus* Hücresel Yapı ve Metabolizması

Bacillus genusunun yeniden sınıflandırılma başlanmasından bu yana, daha önce *Bacillus* üyesi olarak bilinen birçok türden yola çıkılarak yeni genuslar oluşturulmuştur. 1990'lerden 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-1.7). *Geobacillus* genusuna ait türlerin tayini de yine bu yöntem ile yapılmıştır.

Geobacillus kaustophilus, Maria Çukuru'nun derin deniz sedimentlerinden izole edilmiştir (Takami ve ark., 2004). Optimal büyüme sıcaklığı 60 °C olmakla beraber, 70 °C'ta da büyüeyebilen termofilik bir bakteridir. *G. kaustophilus*'ın 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 ve ark., 2004).



Şekil-1.7. *Bacillus* ve akraba genuslara ait filogenetik ağaç. Ağaç, 16S rRNA gen dizisi karşılaştırmaları dikkate alınarak çizilmiştir (*Geobacillus* Stock Centre Catalog Seventh Edition).

1.3. Tez Çalışmasının Amacı

Genomik ve kristal yapı çalışmaları sonucunda HslVU proteazlar hakkında oldukça geniş bilgi sağlanmıştır. HslVU dizisi; bir çok patojenik olan ve olmayan bakteri ve termofilik bakteri genomunda bulunmuştur. Ancak prokaryotlarda ‘self compartmentalizing’ ATP-bağımlı proteazom analogu olarak tanımlanan HslVU proteazların sahip oldukları aktivite ve fonksiyonlar hakkındaki bilgi yeterli değildir. Farklı organizmalardan yeni HslVU proteazların izolasyonu, biyokimyasal ve genetik karakterizasyonlarından elde edilecek veriler bu özgün proteaz sisteminin moleküler biyolojisinin aydınlatılması çabalarına katkıda bulunacaktır. Bununla birlikte HslVU proteazların etki şeklinin açığa çıkarılması, 26S proteazomun fonksiyonunda ATP’nin rolünün anlaşılmasına da yardımcı olacaktır. Bu çalışmada termofilik bir bakteri olan *G. kaustophilus* tarafından üretilen ATP-bağımlı proteaz HslVU ilk defa çalışılmıştır.

Bu çalışmanın amacı; *G. kaustophilus* tarafından üretilen ATP-bağımlı HslVU proteaz enzimini kodlayan genlerin *E. coli* 'ye klonlanması, gen dizisinin belirlenmesi ve eksprese edilmesidir.

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

2-propanol, Asetik asit, % 99,5 Etanol, Fenol, Kloroform, İzomilalkol, β -Merkaptoetanol, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl, NaOH, HCl (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA), Tris Base, Ampisilin (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland), Agaroza (Prona, Madrid, Spain), EDTA (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Germany), Etidyum Bromid, Sodyum Asetat, Glisin, $MgCl_2$, Kazein, SDS, MOPS, PEG (6000 g/mol) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), IPTG, X-Gal, (MBI Fermentas AB, Vilnius, Lithuania), KCl (Riedel-de Haen, Hanover, Germany), Bacto Agar, Trypton, Maya Özü, Nutrient Broth (Difco, Detroit, USA) % 40 Akrilamid Solüyonu (AppliChem).

2.1.2. Kullanılan Enzimler ve Tamponları

Lizozim (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland), Proteinaz K, RNase A, *Taq* DNA Polimeraz, 10X PCR Buffer, T4 DNA Ligaz, 1X Ligasyon Tamponu, *Bam*HI Restriksiyon Endonükleaz, Tampon O, *Sal*I Restriksiyon Endonükleaz, Tampon R, *Xho*I Restriksiyon Endonükleaz, Tango Evrensel Tampon (MBI Fermentas AB, Vilnius, Lithuania).

2.1.3. Kullanılan Nükleotidler

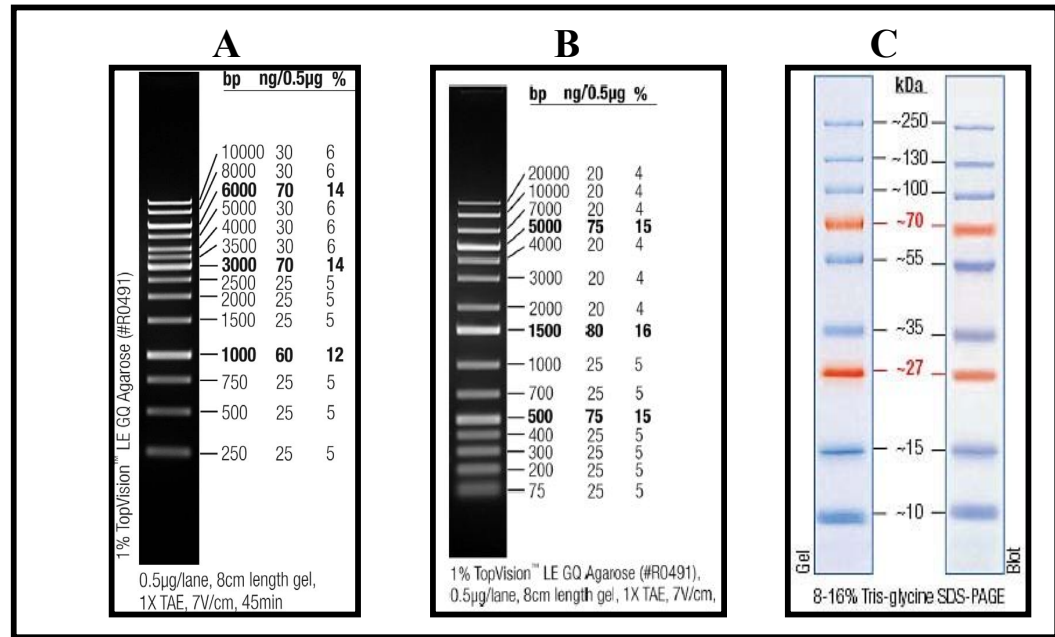
dNTP (MBI Fermentas AB, Vilnius, Lithuania), Adenosine-5'-triphosphate disodium (ATP) (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Germany).

2.1.4. Kullanılan Kitler

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

2.1.5. Kullanılan DNA ve Protein Moleküler Belirteçleri

Moleküler DNA belirteçleri (MBI Fermentas, 1 kb DNA marker, O'GeneRuler™ 1 kb, SM1163 ve SM1334), Protein Moleküler Belirteci (MBI Fermentas, PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, SM1812) (Şekil-2.1).



Şekil-2.1 Moleküler DNA ve protein belirteçleri . A: 1 kb Moleküler DNA belirteci (Fermentas, SM1334, A) B: 1 kb Moleküler DNA belirteci (Fermentas, SM1163, B) C: Moleküler Protein Belirteci (Fermentas, SM1812).

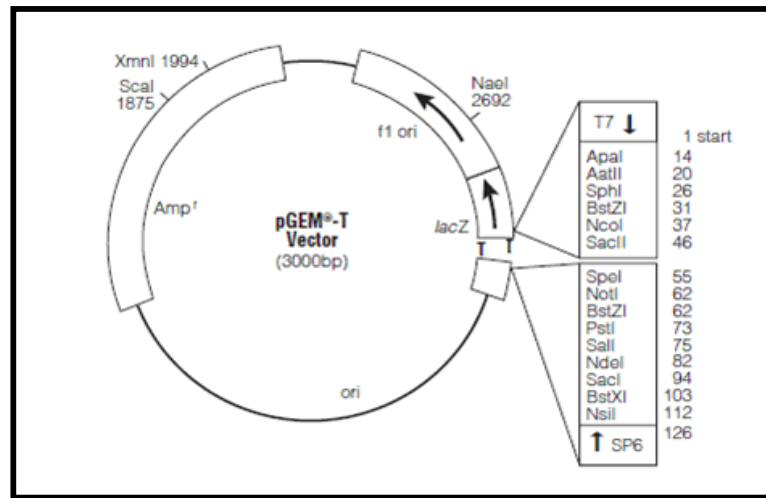
2.1.6. Kullanılan Plazmid Vektörler

2.1.6.1. pGEM-T Vektör Sistemi

Bu tez çalışmasında pGEM-T Vektör Sistemi (Promega, Madison USA), *Geobacillus kaustophilus*'tan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile elde edilen *hslv* ve *hslu* genlerini klonlamak için kullanılmıştır.

pGEM-T vektörü, pGEM-5Zf(+)'nın *EcoRV* ile kesilip her iki 3' ucuna Timin eklenmesiyle hazırlanmıştır. Eklenme bölgesindeki bu 3'-T çıkıntıları, doğrusal haldeki plazmidin tekrar halkasal hale gelmesini engellerken, plazmide entegre olacak PCR ürünün ligasyonunu kolaylaştırmaktadır. Yüksek ısılarda bile kararlı yapısını koruyan DNA polimerazlar çoğaltılan gen ürünlerinin 3' uçlarına, kalıp bağımsız bir şekilde birer deoksiadenozin eklemektedir (Robles ve Doers, 1994).

Çoklu kopya sayılı pGEM-T plazmidi, β -galaktozidaz enziminin α -peptidini kodlayan gen ile kısmen örtüşen çoklu klonlama bölgesinin üst ve alt tarafında T7 ve SP6 RNA Polimeraz promotorları içermektedir (Şekil-2.2). Çoklu klonlama bölgesine yerleştirilen PCR ürünü, α -peptidinin inaktivasyonuna neden olarak, rekombinant klonların seçici besiyerinde mavi-beyaz koloni seçimi üzerinden tayin edilmesine olanak vermektedir.



Şekil-2.2. pGEM-T vektör haritası. Çoklu klonlama bölgesi ve genel özelliklerini gösteren şekil.

2.1.6.2. pGEX Vektör ve GST Füzyon Sistem

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

GST füzyon proteinleri, immobilize glutasyon kullanılarak bakteriyel hücre özütlerinden afinite kromatografisi ile saflaştırılmaktadır. GST füzyon proteinleri, kromatografi ortamında tutulur ve bağlanmayan proteinler, yıkama ile uzaklaştırılır. GST füzyon proteinin antijenik özellikleri ve fonksiyonları, saflaştırma süresince korunur. Füzyon proteinlerindeki GST uzantısı, tanıma dizileri pGEX plazmidlerinin çoklu klonlama bölgelerinin hemen üst tarafında bulunan ve bölgeye özgü kesim yapan proteaz kullanılarak uzaklaştırılabilir (Şekil-2.3). Füzyon proteinler, kolorimetrik ya da immünolojik yöntemler kullanılarak belirlenebilir.

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

Bu tez çalışmasında pGEX-6P-1 plazmidi, öncelikle pGEM-T plazmidine klonlanan *hslv* ve *hslu* genlerinin ekspresyon vektörü olarak kullanılmıştır. pGEX-6P-1 plazmidi, Şekil-2'de görüldüğü gibi çoklu klonlama bölgesinde ilgili genlere uygun restriksiyon kesim bölgeleri içermektedir. Ayrıca, çoklu klonlama bölgesinin hemen üzerinde GST füzyon proteinin saflaştırılması aşamasında kullanılacak olan PreScission Proteaz'ın tanıma bölgesini içermektedir.

2.1.8. Kullanılan Bakteri Soyları

Genom projesi yakın bir zamanda tamamlanan ve ATP-bağımlı proteaz HslVU (ClpQY)'yu kodlayan genleri içerdiği, gen bankasındaki bilgilerle doğrulanan *G. kaustophilus* türü, The Bacillus Genetic Stock Center, Department of Biochemistry, The Ohio State University'den temin edilmiştir. *G. kaustophilus* hücreleri, nutrient agar besiyerinde gece boyunca 60 °C'ta büyütülmüş ve hücreler ayda bir pasajlanarak +4 °C'ta saklanmıştır. Ayrıca hücre stokları, % 20 gliserol içeren Nutrient Broth besiyerinde -80 °C'ta saklanmıştır.

Genlerin pGEM-T plazmidine klonlanmasında konak hücre olarak *E. coli* JM109 soyu kullanılmıştır. JM109 soyu, Endonükleaz A (*endA*)'dan yoksun olması nedeniyle transformasyondan sonra yapılacak plazmid izolasyonunda verimin artmasını sağlarken Recombinaz A (*RecA*)'dan yoksun olması ile de klonlanan genin plazmid içerisinde kararlı kalmasını sağlar. Ayrıca, konak restriksiyon endonükleaz R (*hsdR*) genindeki mutasyon nedeniyle de klonlanan DNA'nın *EcoK* endonükleaz tarafından kesilmesini engeller. JM109, F' epizomda *lacI^fZΔM15* genini içermesi nedeniyle alfa komplementasyonuna ve mavi-beyaz koloni seçimine olanak verir. *E. coli* JM109 soyu, GYTE Biyoloji Bölümü, Enzim Moleküler Genetiği Laboratuvarından temin edilmiştir. Hücre kültürü, Luria broth besiyerinde gece boyunca 37 °C'ta büyütülmüştür, büyüyen hücreler ayda bir pasajlanarak saklanmıştır. % 20 gliserol içeren Nutrient Broth besiyerindeki hücre stokları ayrıca -80 °C'ta saklanmıştır.

pGEX-6P-1'e klonlanan *hslV* ve *hslU* genlerinin ekspresyonu için *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) (Stratagene) kompetan hücreleri kullanılmıştır. 200 µl'lik hacimdeki ependorf tüplere alınan kompetan hücreler ve transformasyonda pozitif kontrol olarak kullanılacak pUC18 plazmidi, -80 °C'ta saklanmıştır.

2.1.9. Kullanılan Çözelti ve Besiyerleri

Tüm sterilizasyon işlemleri otoklavda 121 °C'ta 20 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir.

24:1 Kloroform/İzoamilalkol Çözeltisi (1 L, v/v)

- 960 ml Kloroform,
- 40 ml İzoamilalkol

Lizis Tamponu (1 L)

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

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.

Tris Tamponu (pH:7, 7.5 ,8, 9) (100 ml)

- 25 mM Tris
- 5 mM MgCl₂
- 1 mM DTT

dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

MOPS Tamponu (pH:6, 6.5 ,7) (100 ml)

- 25 mM Mops
- 5 mM MgCl₂
- 1 mM DTT

dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

Glisin Tamponu (pH:9.5, 10, 11) (100 ml)

- 25 mM Glisin
- 5 mM MgCl₂
- 1 mM DTT

dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

Sodyum Asetat Tamponu (pH:4, 5, 6) (100 ml)

- 25 mM Sodyum Asetat
- 5 mM MgCl₂
- 1 mM DTT

dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

TE Tamponu (1 L)

- 10 mM Tris
- 1 mM EDTA

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.

2X Sample Buffer (50 ml)

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

SDS-PAGE Yürütme Tamponu (1L)

- 2,02 g Tris
- 14,4 g Glisin
- 0,5 g SDS

dH₂O ile 1L'ye tamamlanır.

Coomassie Blue Boyama Çözeltisi (1L)

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

Boyadan Arıtma Çözeltisi (1L)

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

% 1'lik Agaroz Jel (40 ml)

- 0,4 g Agaroz,
- 2 µl EtBr (10 mg/ml stoktan)

1XTAE Buffer ile 1 L'ye tamamlanır.

2M Glukoz (1 L)

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

1 M MgSO₄ (1 L)

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

1 M MgCl₂ (1 L)

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

1 M KCl (1 L)

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

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

- 10 g Tripton
- 5 g Yeast Extret
- 10 g NaCl

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır

Nutrient Broth (1 L)

- 8 g Nutrient Broth

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.

TSS (1 L, pH:6,5)

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

LB ile 1L'ye tamamlanır.

SOB Medyum (1 L)

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

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.

SOC Medyum (1 L)

SOB medyuma 1/100 hacminde 2 M Glukoz eklenir.

Ampisilin (5 ml, 10 mg/ml)

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

IPTG (5 ml, 200 mg/ml)

1 g IPTG, dH₂O içinde çözülerek 5 ml'ye tamamlanır.

LB-Agar/IPTG/X-GAL/Amp Besiyeri (1 L)

- 50,4 µg/ml X-GAL
- 200 µg/ml IPTG
- 50 µg/ml Ampicillin

LB-Agar ile 1 L'ye tamamlanır.

2.1.10. Kullanılan Cihazlar

+ 4 °C Soğutucu (Arçelik), - 20 °C derin dondurucu (Arçelik), - 86 °C derin dondurucu (Thermo, Forma -86C ULT Freezer), Buz Makinesi (BAR-LINE BF85), Yatay Elektrophorez Sistemi (BIO-RAD, MINI-SAB CELL CT), Güç kaynağı (BIO-RAD, PowerPac Basic), Masa Üstü Santrifüj (Heraeus, Labofuge 400R), Masa Üstü Santrifüj (BACKMAN COULTER, Microfuge 22R), Otoklav (HIRAYAMA, HICLAVE HVE-50), pH Metre (Hana Instruments, pH 211 Microprocessor pH

Meter), Steril Kabin (Heraeus, HP48), Etüv (BINDER, 9010-0078), İnkübatör (Heraeus, D-63450 Herau), Çalkalamalı İnkübatör (Edmund Bühler, KS-15), Su Banyosu (TECHNE, TE-10A Tempette), UV Görüntüleme Cihazı (Vilmer Lourmart), Mikrodalga Fırın (Kumtel), Sonikatör (BRANSON, Digital Sonifier), Spektrofotometre (BIO-RAD, Smartspec 3000).

2.2. Yöntemler

2.2.1. *Geobacillus kaustophilus*'tan 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 özütlemeye yapıldıktan daha sonra 1/10 hacminde 3 M sodyum asetat (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).

2.2.2. *hslV*, *hslU* Genlerinin PCR ile Çoğaltılması

Klonlama ve ekspresyon çalışmalarında kullanılacak *hslV*, *hslU* genlerine ait DNA fragmanları, *G. kaustophilus*'dan elde edilen kromozomal DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır. *G. kaustophilus* genom dizisi dikkate alınarak (NCBI Gene Databank, NC_006510) *hslV* (*clpQ*, GeneID: 3185308) ve *hslU* (*clpY*, GeneID: 3183550) genlerini içeren bölgeyi çoğaltmak üzere primerler tasarlanmıştır. İleri ve geri primerlerin 5' uçlarına, kullanılan ekspresyon vektörünün çoklu klonlama bölgelerine uygun şekilde

yerleşmesini sağlayacak *Bam*HI, *Sal*I ve *Xho*I tanıma bölgeleri eklenmiştir (Tablo-2.1).

Tablo-2.1. *hslV*, *hslU* genleri için tasarlanmış ileri ve geri primerler.

Gen	Primer		Restriksiyon Endonükleaz	PCR Ürünü (bp)
<i>hslV</i>	İleri	5'-AGG <u>GGATCC</u> ATGGGAGCCTTTCATGCGA-3'	<i>Bam</i> HI	543
	Geri	5'-CTCC <u>GTCGAC</u> TTACAGCTCTTCGACAATA-3'	<i>Sal</i> I	
<i>hslU</i>	İleri	5'-GAGG <u>GGATCC</u> ATGATGCGGAAACGTTGA-3'	<i>Bam</i> HI	1398
	Geri	5'-CATC <u>CTCCAG</u> TCATAAAATAAACTCGCTT-3'	<i>Xho</i> I	

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); 100 pmol 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 (MT Research INC, PTC-200 USA) cihazında toplam 32 döngü olarak yürütülmüştür. 30 kez tekrarlanan bir PCR döngüsündeki aşamalar şöyledir; denatürasyon için 95 °C'ta 1 dakika, primer bağlanması için 54 °C'ta 1 dakika ve polimerizasyon için 72 °C'ta 2 dakika. Reaksiyon, başlangıçta 94 °C'ta 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. Jel fotoğrafları, Jel Dokümentasyon Sistemi (Vilber Lourmat, Germany) kullanılarak çekilmiştir. DNA fragmanlarının büyüklüklerini belirlemek için 1 kb moleküler DNA belirteci (MBI Fermentas), standart olarak kullanılmıştır.

2.2.3. PCR Ürünlerinin Agaroza Jelden Saflaştırılması

PCR ile çoğaltılan *hslV* ve *hslU*'ya ait DNA fragmanları, % 1'lik Agaroza Jele yüklenmiş ve jeldeki fragmanlar yaklaşık bir saat elektroforez ile yürütülmüştür. Elektroforezden sonra, jel görüntüleme cihazı (UV ışık altında) ile görüntülenen uygun bantlar steril bistüriler ile kesilerek ependorf tüplere aktarılmıştır. Kesilen jel parçacıklarında bulunan DNA fragmanlarını jelden saflaştırmak için Jelden DNA Saflaştırma Kiti kullanılmıştır (QIA Quick Gel Extraction Kit, QIAGEN). Kite belirtilen prosedüre uygun olarak saflaştırılan DNA'lar, konsantrasyonları ölçüldükten sonra -20 °C'ta saklanmıştır.

2.2.4. PCR Ürünlerinin Klonlanması

hslV ve *hslU* genlerini içeren fragmanlar, pGEM-T vektörüne (pGEM-T Vector System I, Promega) aktarılmıştır. Bunun için hazırlanan reaksiyon karışımı 2X ligasyon tamponu içerisinde 50 ng pGEM-T DNA'sı, 60 ng PCR fragmanı ve 3 U T4 DNA Ligaz içermektedir. Her bir gene ait PCR fragmanlarının ayrı ayrı kullanıldığı ligasyon karışımları +4 °C'ta gece boyunca inkübe edilmiştir.

2.2.5. Transformasyon ve Rekombinant Seçimi

Klonlama çalışmalarında konakçı olarak kullanılan *E. coli* JM109 hücrelerinin kompetan hale getirilmesi ve transformasyonu için Chung ve arkadaşları (1989) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır.

Bu prosedüre göre, daha önce buzda tutulup soğutulan tüplere ligasyon reaksiyonundan 5 µl konulduktan sonra yeni hazırlanan kompetan *E. coli* JM109 hücrelerinden 50 µl eklenmiştir. Tüpler yavaşça karıştırıldıktan sonra buzda 20 dakika bekletilmiş ve hemen ardından hücrelere 42 °C'ta 45 saniyelik ısı şoku uygulandıktan sonra, buzda 2 dakika daha bekletilmiştir. Her bir tüpe 950 µl SOC medyum (SOB + 20 mM Glukoz) eklenip 37 °C'ta, 200 rpm'de 1,5 saat inkübe edilmiştir. Transformasyonun ardından seyreltilen hücreler, uygun seyreltmeden sonra,

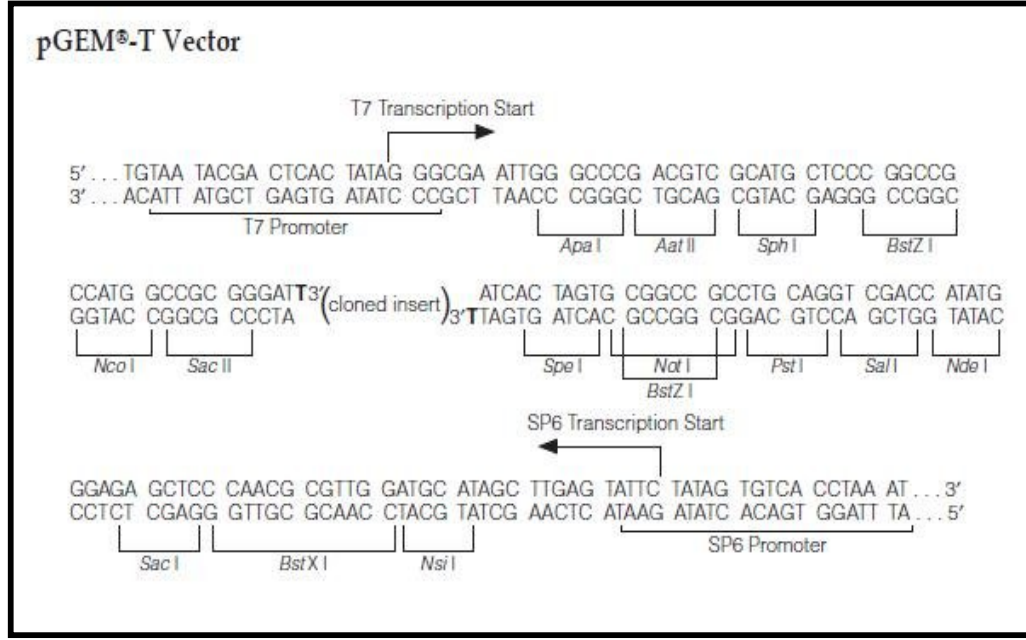
ampisilin, IPTG ve X-GAL içeren seçici besiyerine tek koloniler elde etmek üzere ekilmişlerdir.

37 °C'ta gece boyunca inkübasyondan sonra beyaz renkli olası rekombinant hücreler toplanmış ve yeni ortama çizilerek saf kültür hazırlanmıştır. Rekombinant koloniler, ampisilinli besiyerinde gece boyu büyütüldükten sonra her birisinden Mini Plazmit İzolasyon Kiti (Promega Corporation, Madison, USA) kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen rekombinant plazmitler, uygun restriksiyon endonükleazlar (*hslV* için *Bam*HI-*Sal*I ve *hslU* için *Bam*HI-*Xho*I) ile kesilerek irdelenmiştir.

Agaroz jel elektroforezi ile doğrulanan, *hslV* genini taşıyan pGEM-T/*hslV* ve *hslU* genini taşıyan pGEM-T/*hslU* plazmitleri, ekspresyon vektörüne (pGEX-6P-1) aktarılacak *hslV* ve *hslU* fragmanları için kaynak olarak kullanılmıştır.

2.2.6. Klonelanan *hslV* ve *hslU* DNA'larının Dizilenmesi

Sırasıyla *hslV* ve *hslU* genlerini içeren pGEM-T/*hslV* ve pGEM-T/*hslU* DNA'ları, jelden DNA izolasyon kiti ile izole edildikten sonra uygun konsantrasyonlardaki örnekler, dizilerinin okunması için İontek Ltd.'ye (İstanbul, Türkiye) gönderilmiştir. DNA dizilemeleri, pGEM-T plazmitinde bulunan SP6 promotoruna uygun primer ve her iki gene ait ileri ve geri primerler kullanılarak yapılmıştır. pGEM-T vektörüne ait çoklu klonlama bölgesinde bulunan SP6 promotoru, T7 promotoru ve klonlama bölgesi Şekil-2.6'da gösterilmiştir.



Şekil-2.6. pGEM-T vektöre ait çoklu klonlama bölgesi.

2.2.7. *hslV* ve *hslU* Genlerinin Ekspresyon Vektörü pGEX-6P-1'e Klonlanması

pGEX-6P-1, Prof. Dr. Maria Fallman (Umea University, Department of Molecular Biology, Umea/SWEDEN) tarafından temin edilmiş olup çoklu klonlama bölgesinde (*Bam*HI-*Sal*I arasında) yaklaşık 1000 bç büyüklüğündeki ökaryotik LR1 geni içermektedir. Bu genin varlığı, sonraki enzim kesimi ve koloni PCR çalışmalarında pozitif kontrol amaçlı kullanılmıştır. Rekombinant pGEM-T/*hslV* ve pGEM-T/*hslU* plazmitlerinden, uygun ikili restriksiyon endonükleazlarla kesilip agaroz jelden izole edilen *hslV* ve *hslU* gen fragmanları, pGEX-6P-1 ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. Bu amaçla pGEX-6P-1, *hslU* için *Bam*HI ve *Xho*I restriksiyon endonükleazlar ile *hslV* için ise *Bam*HI ve *Sal*I restriksiyon endonükleazlar ile ayrı ayrı kesilmiştir. Örnekler daha sonra agaroz jele yüklenmiş ve büyüklükler 1 kb moleküler DNA belirteci (MBI Fermentas) ile karşılaştırılarak doğrulanmıştır. Jelden QIA Quick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) ile izole edilen doğrusal plazmit DNA'ları, klonlama çalışmalarında kullanılmıştır.

Uygun ikili restriksiyon enzimleri ile kesilen pGEX-6P-1 doğrusal DNA'ları *hslV* ve *hslU* fragmanlarını içeren ligasyon reaksiyon karışımı; 10X Ligasyon Tamponu içinde 100 ng vektör DNA'sı, 80 ng DNA fragmanı ve 20 U T4 DNA Ligaz içermektedir. *hslU* ve *hslV* için ayrı ayrı hazırlanan ligasyon karışımları gece boyunca 16 °C'ta inkübe edilmiştir.

2.2.8. Transformasyon ve Rekombinant Seçimi

Altıklonlama çalışmalarında konakçı olarak *E. coli* BL21 (DE3) ekspresyon hücreleri kullanılmıştır. -86 °C'tan alınan kompetan BL21 (DE3) *E. coli* hücreleri çözöldükten sonra, daha önce buzda tutularak soğutulan 15 ml'lik falkon tüplere 50 µl hacimlerde dağıtılmış, her bir ligasyon reaksiyonu 10 µl'lik hacimler halinde ayrı ayrı falkon tüplere aktarılmıştır. Pozitif kontrol için 3 µl pUC19 (10 ng/µl) ve negatif kontrol için 5 µl *Bam*HI-*Xho*I restriksiyon enzimleri ile kesilmiş doğrusal pGEX-6P-1 eklenmiştir. Tüpler, buzda 30 dakika inkübe edildikten sonra 42 °C'ta 30 saniye ısı şoku uygulanmış, ısı şokundan sonra buzda 2 dakika bekletilen her bir tüpe 950 µl sıvı LB besi yeri eklenmiş, ardından 37 °C'ta, 225 rpm'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresinin sonunda tüpler, 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş, üst sıvıdan 700 µl uzaklaştırılmış ve hücre pelleti geriye kalan 300 µl besi yeri içinde çözülerek daha yoğun bir süspansiyon elde edilmiştir. Çözölmüş her bir örnekteki hücrelerin tamamı, petrilere ampisilin içeren LB-agar besi yerine yayılmış ve 37 °C'ta gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Ayrı ayrı *hslV* ve *hslU* genlerini içeren pGEX-6P-1 plazmitlerine sahip rekombinant *E. coli* BL21 (DE3) hücre kolonileri ampisilin içeren besiyerinden alınarak koloni PCR yöntemi ile saptanmıştır. Koloni PCR yönteminde ampisilinli besiyerinden steril kürdan ile alınan her bir koloni, PCR için gerekli bileşenleri içeren tüplere kalıp DNA görevi görmesi için eklenir. PCR koşullarının ilk döngüsünde kolonilerden alınan hücrelere ait plazmit DNA'sının ulaşılabilir olması için hücre duvarı 94 °C'ta 2,5 dakika bekletilerek parçalanır.

PCR'da, primer olarak pGEX 5' (5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3') ve olarak pGEX 3' (5'-CCGGGAGCTGCATGTGTTCAGAGG-3') primerleri

kullanılmıştır. PCR koşulları, GST Fusion System'de (GE Healthcare) belirtildiği üzere: Ön denatürasyon için 94 °C'da 2,5 dakika (1 döngü), denatürasyon için 94 °C'da 1 dakika, primer bağlanması için 55 °C'da 1 dakika ve polimerizasyon için 72 °C'da 2 dakika (30 döngü) şeklinde gerçekleştirilmiştir. 25 µl'lik reaksiyon karışımı her bir koloni için: 10X PCR Buffer (15 mM MgCl₂), 1,25 mM pGEX 5' primer, 1,25 mM pGEX 3' primer, 0,5 mM dNTP, 2,5 U *Taq* DNA polimeraz (Roche) içermektedir.

PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde görüntülenmesiyle gen aktarımının başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği ispatlanan koloniler ampisilinli besiyerinde gece boyunca 37 °C'da büyütülmüş ve plazmit izolasyon kiti ile plazmit izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen plazmit DNA'larından alınan 25 ng DNA, yukarıda belirtilen reaksiyon karışımı içinde aynı PCR koşulları altında yürütülen PCR reaksiyonu ile tekrar analiz edilmiş ve gen aktarımının başarılı bir şekilde gerçekleştiği ispatlanmıştır.

Gen aktarımlarının doğruluğunun restriksiyon endonükleaz kesimleri ile de doğrulanması için bu kolonilerden plazmit izolasyon kiti ile elde edilen plazmit DNA'ları ile tek (pGEX-6P-1/*hslV* için *SalI* ve pGEX-6P-1/*hslU* için *XhoI*) ve çift (pGEX-6P-1/*hslV* için *BamHI-SalI* ve pGEX-6P-1/*hslU* için *BamHI-XhoI*) enzim kesim reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Buna göre 200 ng pGEX-6P-1/*hslV* DNA'sı, 1X Tampon O, 10 U endonükleaz *SalI* içeren 10 µl'lik reaksiyon karışımında 37 °C'ta 3,5 saat boyunca kesilirken 200 ng pGEX-6P-1/*hslU* DNA'sı, 1X Tampon R, 10 U endonükleaz *XhoI* içeren 10 µl'lik reaksiyon karışımında 37 °C'ta 3,5 saat boyunca kesilmiştir.

Çift enzim kesimlerinde ise 800 ng pGEX-6P-1/*hslV* DNA'sı, 1X Evrensel Tampon, 30 U endonükleaz *BamHI* varlığında (toplam hacim 30 µl) 37 °C'ta 3,5 saat boyunca kesildikten sonra reaksiyon karışımına Evrensel Tampon, 2X olacak şekilde eklenmiş ve ikinci kesim için 30 U *SalI* eklenerek (toplam hacim 40 µl) 37 °C'ta 3,5 saat boyunca kesilmiştir. 800 ng pGEX-6P-1/*hslV* DNA'sı ise, 1X Evrensel Tampon, 30 U endonükleaz *BamHI* varlığında (toplam hacim 40 µl) 37 °C'ta 3,5 saat boyunca kesildikten sonra reaksiyon karışımına Evrensel Tampon, 2X olacak şekilde

eklenmiş ve ikinci kesim için 30 U *Xho*I eklenerek (toplam hacim 50 µl) 37 °C'ta 3,5 saat boyunca kesilmiştir.

Kesim reaksiyonları bittikten sonra, reaksiyon karışımı % 1'lik agaroz jele, moleküler DNA belirteçleri varlığında yüklenmiş ve gen aktarımlarının başarılı bir şekilde gerçekleştiği enzim kesimleri ile de ispatlanmıştır.

2.3. Hücre Özütlerinin Hazırlanması

pGEX-6P-1 üzerinde *hslV* ve *hslU* genlerini içeren rekombinant *E. coli* BL21 (DE3) kolonileri gece boyunca ampicilinli (100 µg/ml) besiyerinde büyütüldükten sonra, hücre kültürü ikinci besiyerine 1/10 oranında eklenerek ikincil kültürler elde edilmiştir. İkincil kültürler, optik yoğunluğu 600 nm'de 0,6'ya ulaşınca dek büyütüldükten sonra HslV ve HslU'nun ekspresyonu 0,1 mM IPTG ile uyarılmış ve kültür 2 saat boyunca 37 °C'ta, 200 rpm'de inkübe edilmiştir.

HslV ve HslU'nun yüksek derecede eksprese edildiği hücre kültürleri, 8.000 g'de 15 dakika süre ile +4 °C'ta santrifüjlenerek toplanmıştır. Hücre pelletleri, 1X PBS içerisinde çözülüp buz üzerinde 30 dakika inkübe edilmiştir. Hücre özütleri, her birisi toplamda 2 dakika sürdürülen % 30 şiddetinde 15 saniye vuruş, 15 saniye duruş şeklindeki sonikasyon prosedürü ile parçalanmıştır. Homojenat, 10.000 g'de 15 dakika süre ile +4 °C'ta santrifüj edilerek hücre kalıntıları çöktürülmüş, HslV proteaz ve HslU ATPaz proteinlerini içeren üst sıvılar, kullanılıncaya dek -20 °C'ta saklanmıştır. Yaban tip *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri için hücre özütleri aynı şartlarda hazırlanmış ve enzim aktive deneylerinde karşılaştırma amaçlı kullanılmıştır.

2.4. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Poliakrilamid jel elektroforezi, % 0,1 anyonik deterjan SDS varlığında, Laemmli (1970) tarafından tanımlanan % 10'luk ayırma jeli ve % 5'lik yükleme jeli üzerinde gerçekleştirilmiştir. PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, moleküler ağırlık belirteci olarak kullanılmıştır.

10 µl hücre özütü örnekleri, % 1 SDS içeren 2X örnek tamponu ile karıştırılarak kaynar suda 5 dakika bekletilmişlerdir. Daha sonra protein örnekleri ve moleküler ağırlık standartları jele yüklenmiştir. Jel, 100 V'da yürütülmüştür. Elektroforez tamamlandıktan sonra Coomassie Brilliant Blue-R20 ile boyanmış ve daha sonra boyadan arıtma çözeltisi ile birkaç kez yıkanarak boyadan arındırılmıştır.

Her bir proteinin göreceli hareketliliği, jelin baş kısmından protein bandının merkeze kadar olan göç mesafesi ölçülerek hesaplanmıştır. Göreceli hareketlilik, bilinen moleküler ağırlıklara dayalı olarak çizilmiştir. Standart eğri çizilmiş ve eğim proteinlerin moleküler hesaplanmalarında kullanılmıştır.

2.5. Enzimatik Aktivite Ölçümü

G. kaustophilus rekombinant HslVU proteaza ilişkin proteolitik aktivite deneyleri Anson'un (1938) modifiye edilmiş metoduna göre yapılmıştır. Enzim aktivite deneylerinde substrat olarak kazein kullanılmıştır ve %1'lik (w/v) stok çözelti taze olarak hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı (toplam hacim 1.4 ml) 15 µl GST-HslV'nin yüksek seviyede eksprese olduğu rekombinant *E. coli* BL21 (DE3) ve 15 µl GST-HslU'nun yüksek seviyede eksprese olduğu rekombinant *E. coli* BL21 (DE3) hücre özütleri, 25 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT (pH 7.4) içeren deney tamponu içinde 700 µl kazein solüsyonu ve 1 mM ATP içermektedir. Rekombinant HslVU proteaz enziminin en çok aktif olduğu zaman aralığını tespit edebilmek için hazırlanan reaksiyon karışımları, 55 °C' ta her 10 dakikada bir örnek alınmak koşulu ile 120 dakikaya kadar inkübe edilmiştir. Reaksiyonlar 900 µl % 15 trikloro asetik asit (w/v) (TCA) ilavesi ile durdurulmuş ve karışımlar oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmişlerdir. Oluşan beyaz tortu 13.000 rpm'de 15 dakika süre ile oda sıcaklığında santrifüj edilerek uzaklaştırılmış ve üst sıvı Whatmann No.1 filtre kağıdından geçirilerek filtrelenmiştir. Süzülen örneklerin optik yoğunluğu 275 nm'de spektrofotometre ile ölçülmüştür. Aynı zamanda enzim aktivitesinin sıfırcı zamanı ve enzim içermeyen kontrol reaksiyonu ilave edilmiştir. Bir ünite enzim aktivitesi 55 °C'ta 60 dakikada 0,01 artan abzorban (A₂₇₅) olarak tanımlanmıştır.

Rekombinant ve yaban tip hücre özütlerinin, ATP varlığında ve yokluğundaki enzim aktivitesinin karşılaştırılması amacıyla gerçekleştirilen deneyler, 55 °C'ta 20 dakika inkübe edilerek yapılmıştır. Reaksiyon koşulları ve uygulanan prosedür yukarıda belirtilen şekilde düzenlenmiş ve uygulanmıştır.

2.5.1. Sıcaklığın HsIVU Proteaz Aktivitesine Etkisi

Enzimin aktivitesi için optimum sıcaklık, substrat olarak kazeinin kullanıldığı koşullarda belirlenmiştir. Enzim-substrat karışımı daha önce belirtilen standart koşullar altında 20 °C ile 110 °C arasındaki çeşitli sıcaklık aralıklarında 20 dakika inkübe edilmiştir.

2.5.2. pH'nın HsIVU Proteaz Aktivitesine Etkisi

HsIVU proteaz aktivitesinin optimum pH'sı farklı pH değerlerinde, kazeinin kullanıldığı ve daha önce belirtilen standart deney şartlarında ölçülmüştür. Kullanılan tamponlar pH 4.0-5.0 aralığında 25 mM Sodyum asetat, pH 6.0-7.0 aralığında 25 mM MOPS, pH 7.5-9.0 aralığında 25 mM Tris HCl, pH 9.5-11.0 aralığında 25 mM Glisin tamponlarıdır ve her birisi 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT içermektedir. Kalan aktivite, ölçülen pH sistemleri arasında en yüksek enzimatif aktivitenin elde edildiği örneğin değerinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Belirtilen reaksiyon tamponları dışında, diğer tüm reaksiyon bileşenleri yukarıda belirtildiği gibi hazırlanmış ve tüm örnekler 55 °C'ta 20 dakika inkübe edilmiştir. Kontrol amaçlı olarak kullanılan reaksiyon karışımları aynı şartlarda hazırlanmış olmakla birlikte enzim içermemektedir.

2.5.3. MgCl₂'ün HsIVU Proteaz Aktivitesine Etkisi

Mg⁺² iyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için reaksiyon karışımına farklı konsantrasyonlardaki (0-30 mM) MgCl₂ ilave edilmiştir. Enzim aktivitesi, daha önce belirtildiği gibi 55 °C'ta 20 dakika inkübasyondan sonra standart reaksiyon koşulları altında ölçülmüştür.

2.5.4. Metal İyonlarının HslVU Proteaz Aktivitesine Etkisi

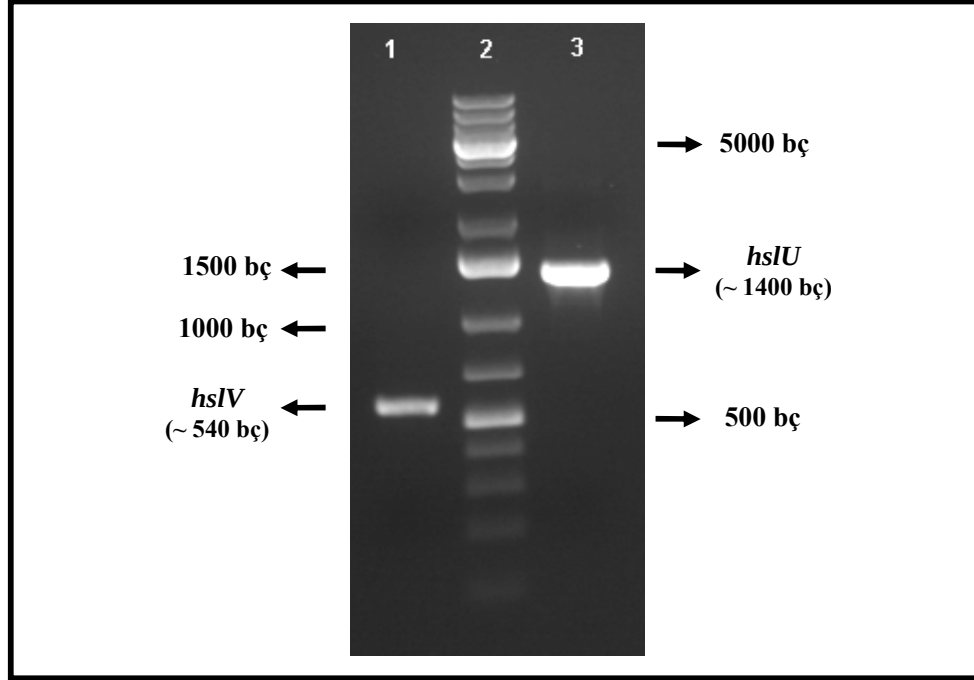
Çeşitli metal iyonlarının proteaz aktivitesine etkisi çeşitli iyonların (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} klorid tuzları içinde) varlığında belirlenmiştir. Enzim, farklı yoğunluklardaki metal tuzları (5-15 mM) ile 20 dakika inkübe edilmiş ve kalan aktivite daha önce belirtildiği gibi ölçülmüştür.

3. BULGULAR

3.1. *hslV* ve *hslU* Genlerinin PCR İle Çoğaltılması

G. kaustophilus genom dizisi dikkate alınarak tasarlanan ileri (*hslVF1* ve *hslUF1*) ve geri (*hslVR1* ve *hslUR1*) primerleri kullanarak ATP-bağımlı HslVU (ClpYQ) proteazın HslV ve HslU altbirimleri PCR ile özgül tek bir bant verecek şekilde çoğaltılmıştır. Yapılan PCR optimizasyon çalışmalarında (50-58 °C tutunma sıcaklığı çalışmaları, 1-5 ng kalıp DNA konsantrasyonları), HslV ve HslU altbirim genlerine ilişkin fragmanların, 54 °C bağlanma sıcaklığında ve 1 ng kalıp DNA varlığında özgül amplikonlar verdiği anlaşılmıştır.

PCR ile elde edilen *hslV* ve *hslU*'ya ait DNA fragmanları, büyüklüklerinin tayin edilmesi için 1 kb moleküler DNA belirteci varlığında (Moleküler DNA Belirteci B) % 1'lik agaroz jele yüklenmiştir (Şekil-3.1). Moleküler DNA belirteçleri ile karşılaştırılarak büyüklükleri doğrulanan DNA fragmanları, daha sonraki klonlama çalışmalarında kullanılmıştır.



Şekil-3.1. Agaroz jelden saflaştırılan *hslV* ve *hslU*'ya ait PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görünümleri. 1) *hslV* (~540bç), 2) 1 kb'lık moleküler DNA belirteci B 3) *hslU* (~1400 bç).

3.2. *hslV* ve *hslU* Genlerinin Klonlanması

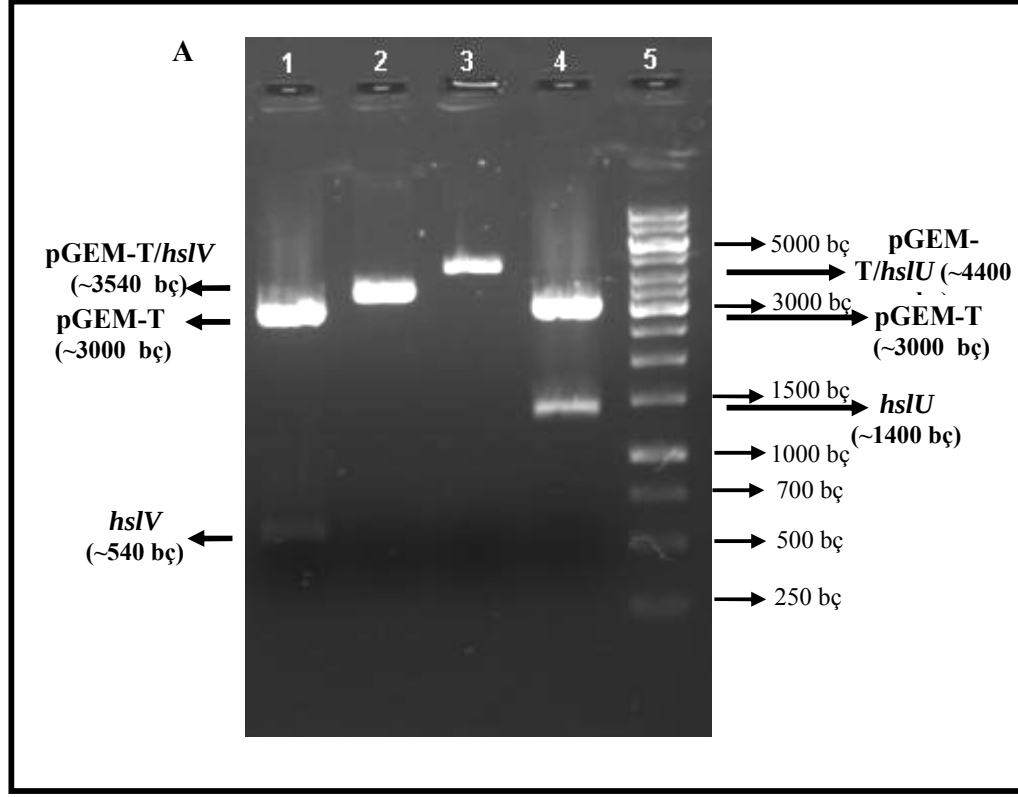
3.2.1. *hslV* ve *hslU* Genlerinin pGEM-T Vektör Sistemine Klonlanması

PCR ile çoğaltılan, 5' ve 3' uçlarında sırasıyla *hslU* için *Bam*HI ve *Xho*I kesim bölgeleri içeren ~1400 bç uzunluğundaki ve *hslV* için *Bam*HI ve *Sal*I kesim bölgeleri içeren ~540 bç uzunluğundaki fragmanlar, klonlama vektörü pGEM-T vektöre ligasyon ile bağlanmıştır. Bu restriksiyon enzimlerinin tercih edilmesinin nedeni, kesim bölgelerinin söz konusu genlerde bulunmaması ancak klonlama ve ekspresyon vektörlerinde bulunmasıdır. Ligasyon reaksiyonunda, PCR ile çoğaltılan genler, pGEM-T vektörün klonlama bölgesinde yer alan eklenme bölgesindeki 3'T çıkıntılı ucuna eklenmiştir. Bu yöntemde, DNA polimerazın oluşturulan ürünlerin 3' ucuna bir adenosin trifosfat ekleme özelliğinden yararlanılmaktadır.

Rekombinant plazmitler *E. coli* JM109 hücrelerine transformasyon ile aktararak çoğaltılmıştır. Transformasyonun ardından mavi-beyaz koloni seçimi sonunda beyaz renkte görülen olası rekombinant kolonilerden izole edilen plazmit DNA'larının hedef genleri içerip içermediği yapılan bir dizi restriksiyon endonükleaz kesimleri ile anlaşılmıştır. Kesim reaksiyonları % 1'lik agaroz jelde DNA moleküler belirteçleri ile karşılaştırılmıştır.

Rekombinant plazmitlerin (pGEM-T/*hslV* ve pGEM-T/*hslU*) restriksiyon enzim analizleri Şekil-3.2'de görülmektedir. *hslU* genini içeren pGEM-T (pGEM-T/*hslU*) rekombinant plazmit DNA'sı sadece *Bam*HI ile kesildiğinde agaroz jeldeki DNA fragmanı yaklaşık 4400 bp büyüklüğünde tek bir fragman oluştururken, *Bam*HI ve *Xho*I ile birlikte kesildiğinde klonlanan *hslU* geni (~1400 bp) ve kesilmiş pGEM-T vektöre (~3000 bp) karşılık gelen fragmanlar oluşturmuştur.

Aynı kesim stratejileri *hslV*'yi içerdikleri düşünülen, rekombinant kolonilerden elde edilen pGEM-T/*hslV* plazmit DNA'ları için de uygulanmıştır. *hslV* genini içeren pGEM-T (pGEM-T/*hslV*) rekombinant plazmiti sadece *Bam*HI ile kesildiğinde yaklaşık 3540 bp büyüklüğünde tek fragman oluştururken, *Bam*HI ve *Sal*I enzimleri ile birlikte kesildiğinde doğrusal pGEM-T DNA'sı (~3000 bp) ve *hslV* geni (~540 bp) büyüklüklerine karşılık gelen iki ayrı fragman oluşturmuştur.

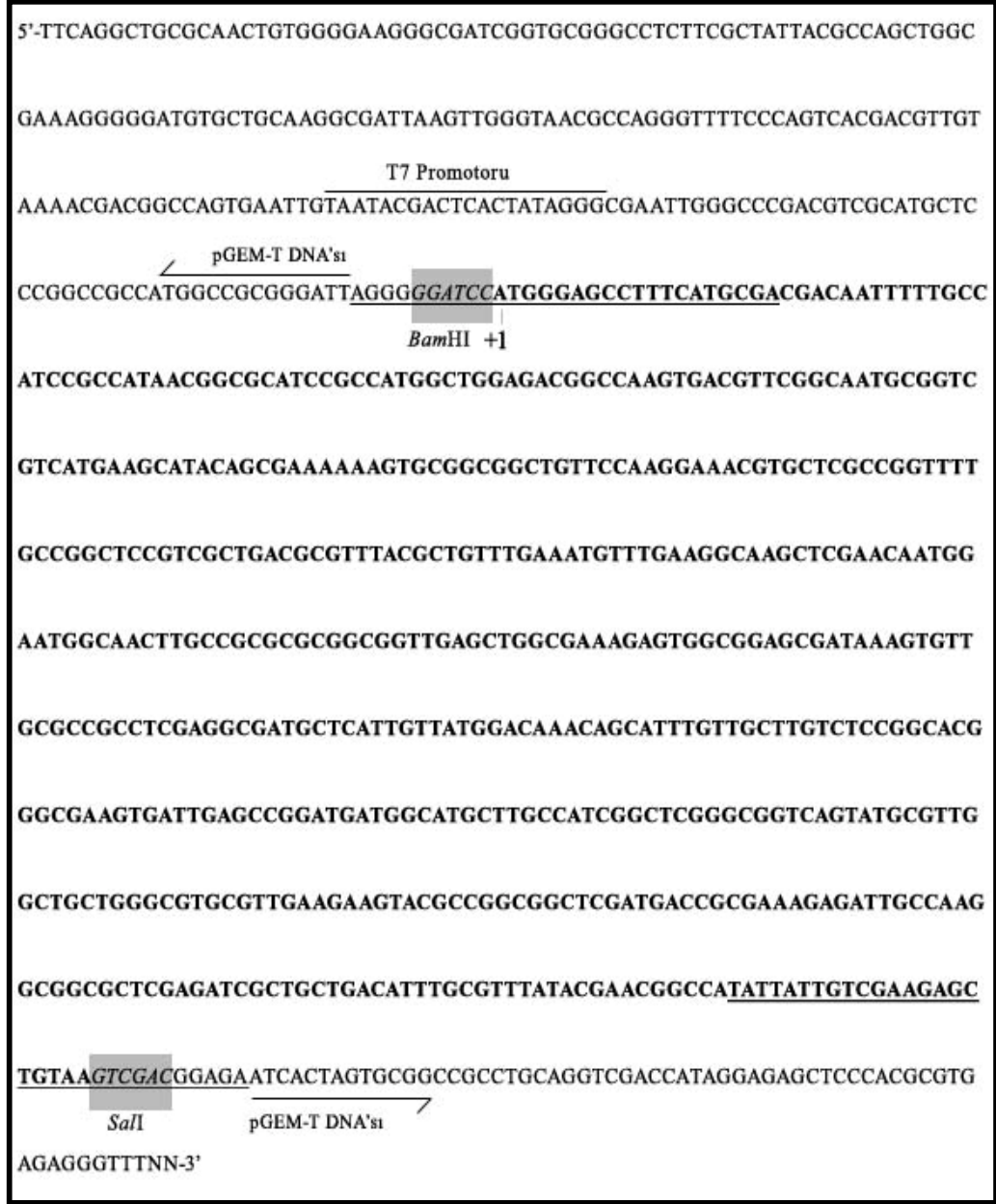


Şekil-3.2. pGEM-T/*hslV* ve pGEM-T/*hslU* plazmidlerinin restriksiyon enzim kesimleri sonucu oluşan DNA fragmanlarının agaroz jelde görünüşleri. 1) Halkasal pGEM-T/*hslV* plazmidinin *Bam*HI ve *Sal*I ile kesimi sonucu oluşan (yukarıdan aşağıya sırasıyla) doğrusal pGEM-T (~3000 bç) ve *hslV* (~540 bç) fragmanları, 2) pGEM-T/*hslV* plazmidinin *Bam*HI ile kesimi sonucu oluşan doğrusal pGEM-T/*hslV* (~3540 bç) plazmidi, 3) pGEM-T/*hslU* plazmidinin *Xho*I ile kesimi sonucu oluşan doğrusal pGEM-T/*hslU* plazmidi (~4400 bç), 4) pGEM-T/*hslU* plazmidinin *Bam*HI ve *Xho*I ile kesimi sonucu oluşan (yukarıdan aşağıya sırasıyla) doğrusal pGEM-T (~3000 bç) ve *hslU* (~1400 bç) fragmanları, 5. kuyucuk; 1 kb'lık moleküler DNA belirteci A.

3.2.2. Klonlanan *hslV* ve *hslU* DNA'larının Nükleotit Dizilimi ve Potansiyel Amino Asit Diziliminin Belirlenmesi

Sırasıyla *hslU* ve *hslV* DNA'larını içeren pGEM-T/*hslU* ve pGEM-T/*hslV* plazmit DNA'larının SP6 promotoruna uygun primer ve her gene ait ileri ve geri primerler ile elde edilen dizileri BLAST yapılarak NCBI'daki DNA dizileri ile karşılaştırılmıştır. pGEM-T/*hslV* için SP6 promotoruna ait primer kullanılarak yapılan dizileme reaksiyonu sonucu elde edilen anlamlı DNA dizisi Şekil-3.3'te görülmektedir. pGEM-T/*hslU* için SP6 promotoruna ait primer ve *hslU*'nun PCR'ı için daha önceden tasarlanan ileri primerler kullanılarak yapılan dizileme sonucu elde edilen anlamlı DNA dizisi ise Şekil-3.4'te gösterilmiştir. Analizler sonucu klonlanan her iki gene ait DNA'ların daha önce Takami ve arkadaşları tarafından rapor edilen *G. kaustophilus* genomundaki (NCBI Gene Databank, NC_006510) *hslV* (*clpQ*, GeneID: 3185308) ve *hslU* (*clpY*, GeneID: 3183550) gen dizilerine bire bir uygunluk gösterdiği açığa çıkarılmıştır.

Bu DNA dizilerinden kodlanan amino asit dizileri Şekil-3.5'te gösterilmiştir.



Şekil-3.3. *G. kaustophilus*'a ait *hsIV* geni anlamlı DNA zinciri. Dizi, pGEM-T/*hsIV* vektörü üzerindeki SP6 promotoruna uygun primer kullanılarak elde edilmiştir. Altı çizili DNA dizileri, 5'→3' yönüne doğru sırasıyla *hsIV*'ye ait ileri ve geri primerleri, gri renkte gösterilen diziler sırasıyla *Bam*HI (ileri primer dizisine dahil) ve *Sal*I (geri primer dizisine dahil) kesim bölgelerini göstermektedir. *hsIV* genine ait diziler kalın harfler ile gösterilirken, pGEM-T DNA'sına ait diziler normal şekilde yazılmıştır.



Şekil-3.4 *G. kaustophilus hslU* genine ait anlamlı DNA zinciri. Dizi, SP6 primeri ve *hslU* ileri primeri kullanılarak elde edilmiştir. Her iki primer ile elde edilen diziler daha sonra birleştirilerek *hslU* genine ait dizi elde edilmiştir. Altı çizili DNA dizileri, 5'→3' yönüne doğru sırasıyla *hslU*'ya ait ileri ve geri primerleri, gri renkte gösterilen diziler sırasıyla *Bam*HI (ileri primer dizisine dahil) ve *Xho*I (geri primer dizisine dahil) kesim bölgelerini göstermektedir. *hslU* genine ait diziler kalın harfler ile gösterilirken, pGEM-T DNA'sına ait diziler normal şekilde yazılmıştır.

HslV Amino asit dizisi (180 aa)

MGAFHATTIFAIRHNGASAMAGDGQVTFGNAVVMKHTAKKVRRLFQGNVL
N-terminal Thr
AGFAGSVADAFTLFEMFEGKLEQWNGNLPRAAVELAKEWRSDKVLRRLEAM
LIVMDKQHLLLVSGTGEVIEPDDGMLAIGSGGQYALAAGRALKKYAGGSMT
AKEIAKAALeiaADICVYTNGHIIVEEL

HslU Amino asit dizisi (465 aa)

MMAETLTPRQIVEKLDQFIVGQKEAKKAVAIALRNRYRRSLLDEKLRDEVMP
KNILMIGPTGVGKTEIARRLAKLVGAPFIKVEATKFTVEVGYVGRDVESMVRD
Walker A Motifi
LVETSVRLVKERKMNEVKDRAEQQANKRLVELLVPGKPKQTIKNPLELLFGG
QGAQADNSYSHEDEQVEQKRRQVAWQLANGQLENEMVTIEIEEQTPLWFDF
LQGAGIEQMGMNMQDALSSLMPKRRKKRRLKVSEARKVLINEEAQKLIDMD
EVTQEAVRLAEQSGIIFIDEIDKIARSGAVSGSADVSREGVQRDILPIVEGSTV
Walker B Motifi
MTKYGPVKTDHILFIAAGAFHMAKPSDLIPELQGRFPIRVELAKLSVDDFVRI
LVEPNNALIKQYQALLATEGISLEFSDDAIRKIAEVAFEVNQTTDNIGARRLH
TILEKLLEDLLFEAPDIGIDKVVITPQYVEQKLGSIVKNKDLSEFIL

Şekil-3.5. *G. kaustophilus* HslV ve HslU proteinlerine ait amino asit dizileri. HslV'ye ait N-terminal Thr aktif residüsü ve HslU'ya ait AAA⁺ ATPazlara özgü Walker A ve Walker B motifler gri renkte gösterilmiştir.

3.2.3. *G. kaustophilus hslV* ve *hslU* Genlerinin Restriksiyon Haritalarının Çıkarılması

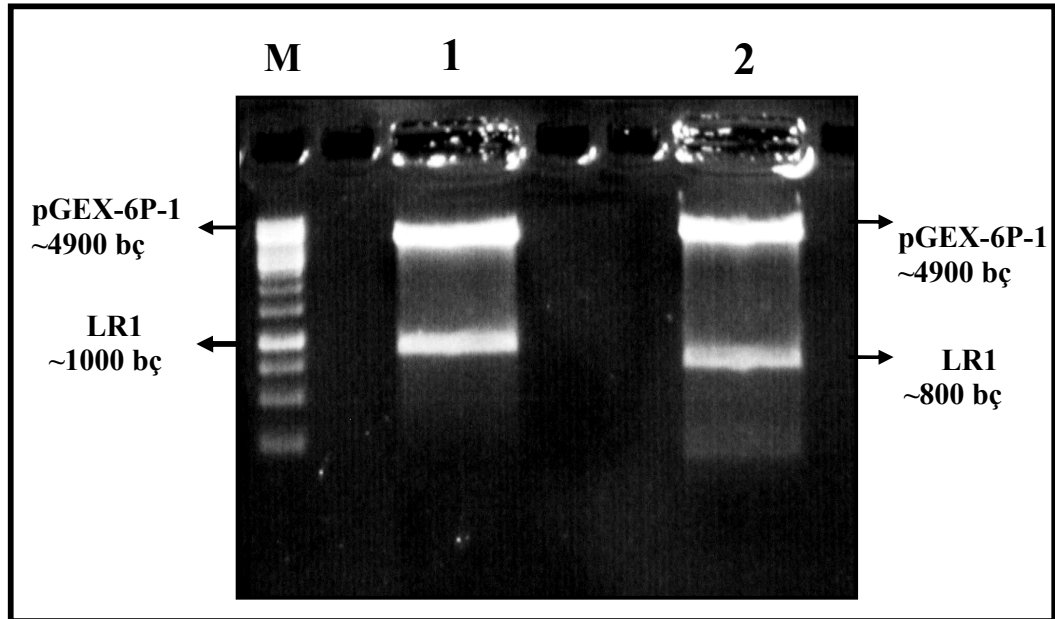
hslV ve *hslU* genlerine ait DNA dizilerinin belirlenmesinden sonra bu genlere ait restriksiyon haritaları NEBcutter programı ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, beklendiği üzere daha önce NCBI'dan alınan diziler üzerinde belirlenen kesim haritaları ile aynıdır.

3.2.4. *hslU* ve *hslV* Genlerinin Ekspresyon Vektörü pGEX-6P-1'e Klonlanması

pGEM-T klonlama vektörüne klonlanan 543 bp ve 1398 bp uzunluğundaki fragmanlar sırasıyla uçlarındaki *Bam*HI/*Sal*I ve *Bam*HI/*Xho*I enzimleri ile kesildikten sonra aynı kesim bölgelerinden pGEX-6P-1 ekspresyon vektörüne bağlanmıştır. Elde edilen rekombinant vektörler *E. coli* BL21 (DE3)'e aktarılmıştır. Transformasyondan sonra rekombinant kolonilerden plazmitler izole edilmiş ve rekombinant pGEX-6P-1/*hslV* ve pGEX-6P-1/*hslU* plazmitlerinin analizleri, daha önce belirtilen şekilde koloni PCR yöntemi ve restriksiyon enzim kesimleri ile yapılmıştır.

hslU'nun klonlanması için *Bam*HI ve *Xho*I ile kesilen ayrıca *hslV*'nin klonlanması için *Bam*HI ve *Sal*I ile kesilen pGEX-6P-1-LR1 plazmit DNA'ları % 1'lik Agaroz jele yüklenip görüntülendiğinde yaklaşık 1000 bp'lik DNA (LR1) fragmanları ve boş pGEX-6P-1'e ait DNA fragmanları gözlenmiştir. Böylece uygun yapışkan uçlara sahip doğrusal pGEX-6P-1 plazmit DNA'larının varlığı ispatlanarak sonraki ligasyon reaksiyonlarında kullanılmak üzere jelden kit ile saflaştırılmıştır (Şekil-3.6). Her iki LR1 fragmanlarına ait bantların birbirinden farklı büyüklükte olmaları, LR1 geni içerisinde bir *Xho*I kesim bölgesi (180. nükleotid ile başlayan) bulunmasından kaynaklanmaktadır. *Bam*HI ve *Xho*I ile kesilen pGEX-6P-1/LR1 DNA'sı, yaklaşık 4900 bp büyüklüğünde doğrusal pGEX-6P-1 ve LR1 için yaklaşık 180 bp (jelde görülmemektedir) ve yaklaşık 800 bp büyüklüğünde DNA fragmanlarını vermiştir.

Ayrıca sırasıyla pGEM-T/*hslU* ve pGEM-T/*hslV* plazmitlerinde bulunan *hslU* ve *hslV* DNA'ları, ligasyon reaksiyonlarında kullanılmak üzere uygun restriksiyon endonükleazlar ile kesilip jelden saflaştırılmıştır. Aynı anda *Bam*HI ve *Xho*I ile kesilen pGEM-T/*hslU* DNA'sı ve *Bam*HI ve *Sal*I ile kesilen pGEM-T/*hslV* DNA'sı agaroz jele yüklendiğinde *hslU*, *hslV* ve boş pGEM-T vektöre ait DNA fragmanları gözlenmiştir. Böylece rekombinant *E. coli* JM109 soylarındaki pGEM-T/*hslU* ve pGEM-T/*hslV* plazmitlerinden elde edilen yapışkan uçlu *hslU* ve *hslV* DNA fragmanları sonraki ekspresyon vektörüne klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere jelden kit ile saflaştırılmıştır.

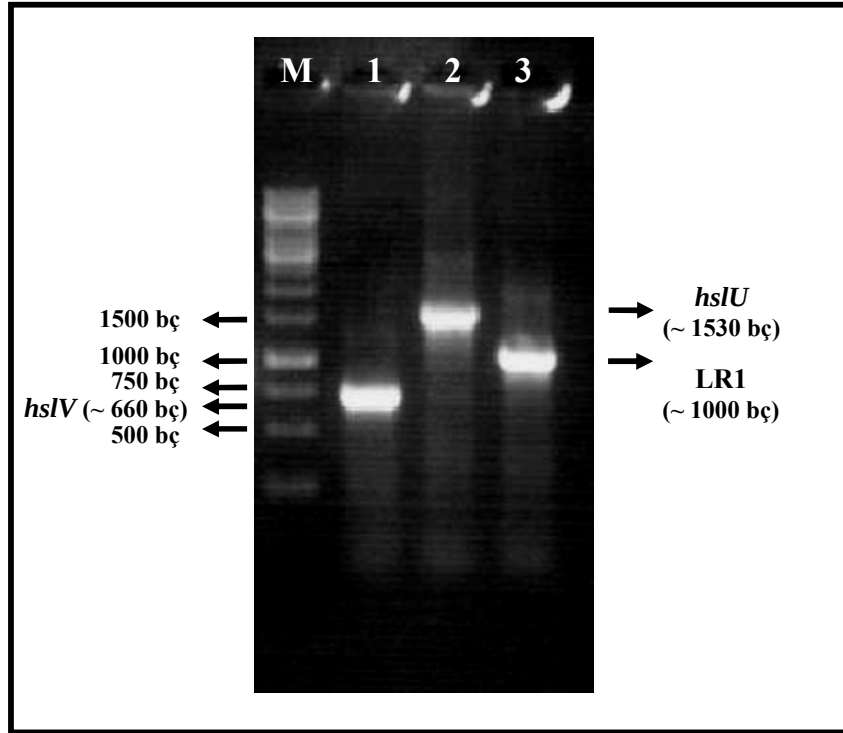


Şekil-3.6. Yapışkan uçlu doğrusal pGEX-6P-1 (*Bam*HI-*Sal*I) ve pGEX-6P-1 (*Bam*HI-*Xho*I) DNA fragmanlarının agaroz jelde görünümü. M) 1 kb moleküler DNA belirteci A. 1) *Bam*HI ve *Sal*I ile kesilen pGEX-6P-1-LR1, yukarıdan aşağıya boş doğrusal pGEX-6P-1 DNA'sı ve LR1 DNA'sı, 2) *Bam*HI ve *Xho*I ile kesilen pGEX-6P-1-LR1, yukarıdan aşağıya doğru boş doğrusal pGEX-6P-1 DNA'sı ve LR1 DNA'sı.

Transformasyon sonrasında antibiyotikli besiyerinde büyüeyebilen *E. coli* BL21(DE3) hücre kolonilerinin rekombinant plazmit içerip içermediklerinin saptanması için koloni PCR yöntemi uygulanmıştır. PCR ürünleri % 1'lik Agaroz Jel Elektroforezi ile görüntülenmiştir. Rekombinant plazmiti taşıyan kolonilerden

plazmit izolasyonu yapılmış ve elde edilen plazmit DNA'ları sonraki PCR reaksiyonu için kalıp DNA olarak kullanılmıştır.

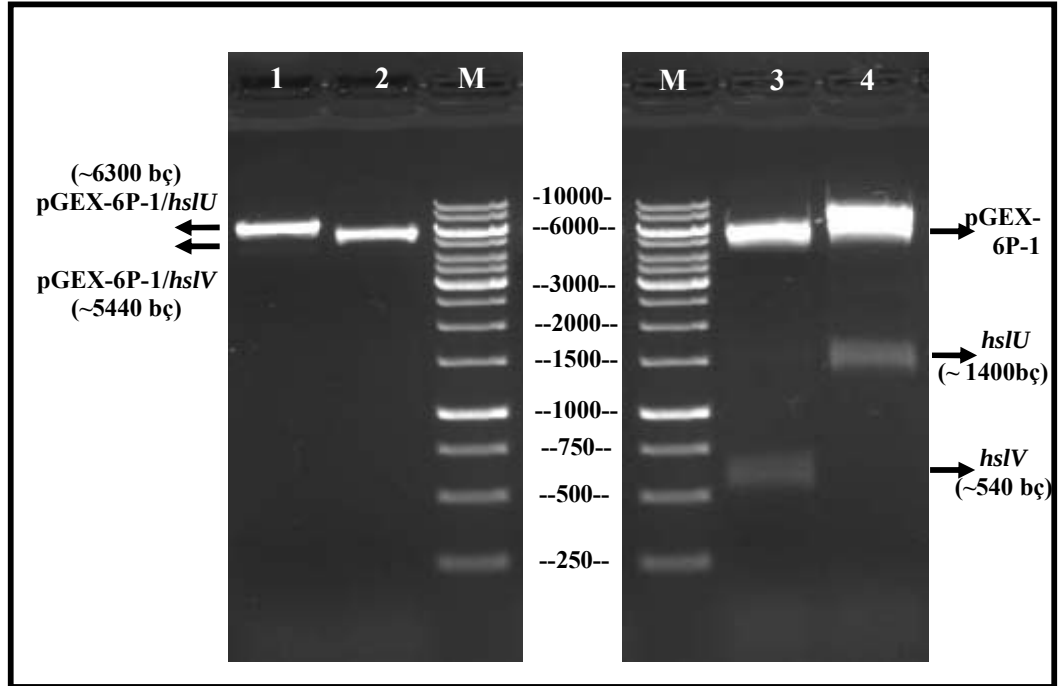
Şekil-3.7'de rekombinant pGEX-6P-1/*hslV*, pGEX-6P-1/*hslU* ve pGEX-6P-1/LR1 plazmit DNA'larının pGEX primerleri ile elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri gösterilmiştir. Buna göre, *hslV*'ye ait DNA fragmanının büyüklüğü iki pGEX primeri arasındaki mesafe göz önüne alındığında yaklaşık 660 bç büyüklüğünde olması beklenirken *hslU*'ya ait bandın yaklaşık 1530 bç büyüklüğünde olması ve LR1 genine ait fragmanın ise yaklaşık 1000 bç büyüklüğünde olması beklenmektedir. Görüldüğü üzere jelde *hslV*, *hslU* ve pozitif kontrol olarak kullanılan LR1 genlerinin beklenen büyüklüklerine eşdeğer bantların görülmesi, klonlamanın başarıyla gerçekleştiğini kanıtlamaktadır.



Şekil-3.7. Koloni PCR sonuçlarının jelde görünümü. M) 1 kb moleküler DNA belirteci A. 1) *hslV* DNA fragmanı, iki primer arasındaki uzaklık hesaplandığında yaklaşık 660 bç uzunluğundadır, 2) *hslU* DNA fragmanı, iki primer arasındaki uzaklık hesaplandığında yaklaşık 1530 bç uzunluğundadır, 3) Pozitif kontrol, yaklaşık 1000 bç uzunluğundaki LR1 DNA fragmanı.

Bu sonuçlar, rekombinant pGEX-6P-1/*hslV* ve pGEX-6P-1/*hslU* plazmit DNA'larının restriksiyon endonükleaz kesimleri ile de doğrulanmıştır. Buna göre sadece *SalI* ile kesilen pGEX-6P-1/*hslV* DNA'sının agaroz jelde yürütüldüğünde yaklaşık 5340 bç uzunluğunda tek bir bant şeklinde ve sadece *XhoI* ile kesilen pGEX-6P-1/*hslU* DNA'sının ise 6300 bç uzunluğunda tek bir bant şeklinde görülmesi gerekmektedir. Ayrıca pGEX-6P-1/*hslV* DNA'sı, *BamHI* ve *SalI* ile kesildiğinde kesim sonrası agaroz jelde, yaklaşık 4900 bç ve 543 bç uzunluğunda iki bant şeklinde görülmesi gerekirken pGEX-6P-1/*hslU* DNA'sı *BamHI* ve *XhoI* ile kesildiğinde yaklaşık 4900 bç ve 1398 bç uzunluğunda iki bant şeklinde görülmesi gerekmektedir. Şekil-3.8'de rekombinant pGEX-6P-1/*hslV* ve pGEX-6P-1/*hslU* plazmit DNA'larının restriksiyon endonükleaz kesimlerinin agaroz jeldeki profili görülmektedir.

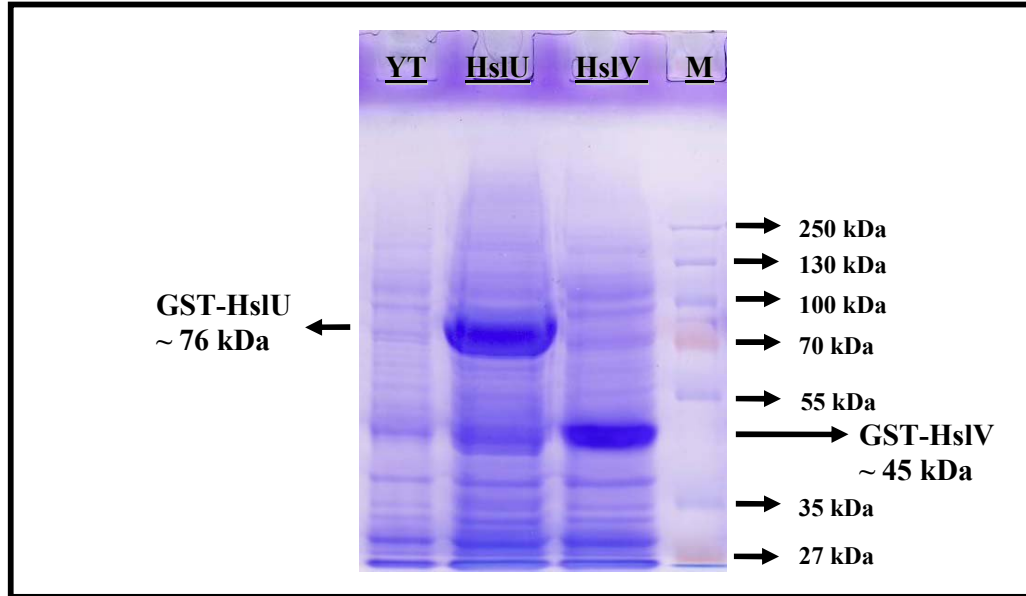
Böylece pGEX-6P-1 üzerinde *hslV* ve *hslU* genlerini ayrı ayrı taşıyan rekombinant *E. coli* BL21(DE3) hücre kolonileri tanımlanmış ve sonraki ekspresyon çalışmalarında kullanılmak üzere ampisilinli besiyerinde kültüre alınmışlardır.



Şekil-3.8. pGEX-6P-1/*hslV* ve pGEX-6P-1/*hslU* DNA'larının restriksiyon enzim kesimi sonuçları. 1) pGEX-6P-1/*hslU* DNA'sının *XhoI* ile kesimi, 2) pGEX-6P-1/*hslV* DNA'sının *SalI* ile kesimi, M) 1 kb Moleküler DNA belirteci B, 3) pGEX-6P-1/*hslV* DNA'sının *BamHI* ve *SalI* ile kesimi, 4) pGEX-6P-1/*hslU* DNA'sının *BamHI* ve *XhoI* ile kesimi.

3.3. HslV Proteaz ve HslU ATPaz'ın Ekspresyonu

Ayrı ayrı pGEX-6P-1 ekspresyon vektörlerine aktarılan *hslV* ve *hslU* genleri *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinde plazmit üzerindeki güçlü *tac* promotorunun kontrolü altında IPTG ile uyarılarak eksprese edilmişlerdir. Yüksek seviyede üretilen HslV ve HslU proteinleri glutathion-S-transferase (GST) ile füzyon halinde eksprese edilmişlerdir. Rekombinant proteinlerin üretimi sağlandıktan sonra toplanan hücreler sonikasyon ile parçalanmış, elde edilen hücre özütleri poliakrilamid jele yüklenip proteinlerin ekspresyon düzeyine bakılmıştır. Jel analizi sonucu GST ile füzyon halinde bulunan HslV ve HslU (GST-HslV) proteinlerinin yüksek seviyede eksprese edildiği açığa çıkarılmıştır. GST (26 kDa) ve HslV'nin toplam moleküler ağırlığı yaklaşık 45 kDa'dur. GST ile füzyon halinde olan HslU füzyon proteininin moleküler ağırlığı ise yaklaşık 76 kDa'dur (Şekil-3.9).



Şekil-3.9. Yüksek seviyede eksprese edilen GST-HslV ve GST-HslU füzyon proteinlerinin SDS-PAGE'deki görüntüsü. YT kuyusu: Yaban tip *E. coli* BL21 (DE3) hücre özütü, HslU kuyusu: GST-HslU füzyon proteininin yüksek seviyede eksprese edildiği rekombinant *E. coli* BL21 (DE3) hücre özütü, HslV kuyusu: GST-HslV füzyon proteininin yüksek seviyede eksprese edildiği rekombinant *E. coli* BL21 (DE3) hücre özütü, M: Moleküler Protein Belirteci (Fermentas). Protein belirtecindeki ve hücre özütlerinde yüksek derecede eksprese edilen GST-HslU ve GST-HslV füzyon proteinlerine ait bantlar ok ile gösterilmiştir.

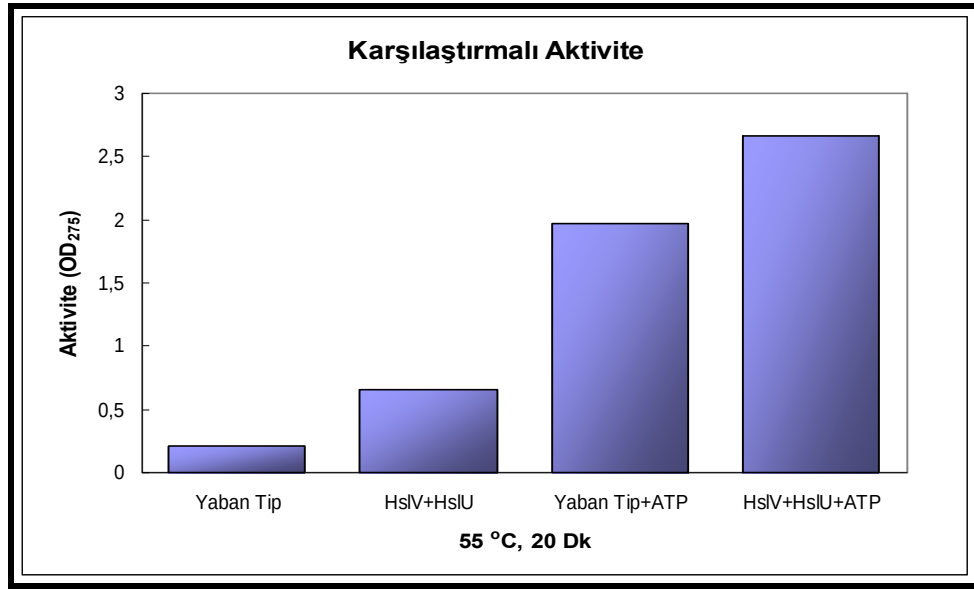
3.4. HslVU Proteaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Rekombinant HslVU proteaz aktivite deneyleri, doğal bir protein substrat olan kazein kullanılarak yapılmıştır. 55 °C'ta yüksek seviyede eksprese olan GST-HslV ve GST-HslU füzyon proteinlerinin yüksek seviyede eksprese edildiği *E. coli* BL21 (DE3) hücre özütleri, HslVU proteaz aktivitesinin değerlendirilmesi için kullanılmıştır.

Zamana bağlı olarak 55 °C'ta, pH 7.4'de gerçekleştirilen kazein hidrolizine yönelik çalışmalar, Gereç ve Yöntemlerde açıklanan koşullar altında gerçekleştirilmiştir. *G. kaustophilus* HslVU'nun 1 mM ATP varlığındaki en yüksek proteaz aktivitesi 20. dakikada gözlenmiştir.

Enzim aktivitesinin hem yaban tip hem de rekombinant hücre özütlerinde, ATP varlığında ve yokluğundaki değişimlerine bakılmıştır. Yapılan karşılaştırmalarda GST-HslV ve GST-HslU füzyon proteinlerinin yüksek seviyede eksprese edildiği rekombinant *E.coli* BL21 (DE3) hücre özütlerindeki kazeinolitik aktivitenin hem ATP varlığında hem de yokluğunda yaban tip hücre özütlerindeki aktiviteden daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. Hem yaban tip hem de rekombinant hücre özütleri için ATP varlığında gerçekleştirilen aktivitenin, ATP yokluğundaki aktiviteye oranla oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil-3.10). ATP yokluğunda rekombinant hücre özütlerindeki enzim aktivitesi yaban tipteki aktivitenin yaklaşık 3 katı iken ATP varlığında 0,75 katıdır. Rekombinant hücre özütlerinde enzimatik aktivite ATP'nin varlığında (ATP'nin yokluğuna oranla) 4,5 kat artmıştır.

Rohrwild ve arkadaşları tarafından 1996'da *E. coli*'ye ait ATP bağımlı HslVU proteaz için yapılan aktivite deneylerinde, kazein yıkımı için ATP'ye ihtiyaç olmadığının rapor edilmesi bu anlamda şarşıtııcıdır. *G. kaustophilus*'a ait HslVU proteazın kazein yıkımı için gerçekten ATP'ye ihtiyaç duyup duymadığı, daha sonra saflaştırılmış HslV ve HslU proteinlerinin kullanıldığı kazeinolitik deneyler ile daha iyi anlaşılacaktır.



Şekil-3.10. Yaban tip ve rekombinant *E. coli* BL21 (DE3) hücre özütlerindeki HslVU aktivitelerinin karşılaştırılması.

HslVU proteaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklığı belirlemek için 20 dakika boyunca 20 °C ile 110 °C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleşen reaksiyonlarda kazein yıkımı, Gereç ve Yöntemlerde belirtilen koşullar altında ölçülmüştür. En yüksek aktivitenin 55-70 °C aralığında gerçekleştiği gözlenmiştir.

Substrat olarak kazein kullanıldığında enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH aralığı, standart deney koşulları altında ölçülmüştür. Farklı pH (4-11) seviyelerindeki deney tamponlarında, ATP varlığında 55 °C'ta 20 dakika sürdürülen deneylerde en yüksek aktivite, pH 7.0'da tespit edilmiştir.

Çeşitli metal iyonlarının HslVU proteaz üzerindeki etkisinin anlaşılması için standart reaksiyon tamponlarına farklı konsantrasyonlarda (5-15 mM) metal tuzları (MgCl₂, CaCl₂ ve KCl) eklenmiştir. Enzimin kazein yıkım aktivitesi, pH 7.0'da, 55 °C'ta daha önce belirtilen standart reaksiyon koşullarında ölçülmüştür. Ölçümler sonucunda en yüksek aktivitenin (% 100) 15 mM MgCl₂ varlığında gerçekleştiği görülürken, 5 mM CaCl₂ varlığındaki enzim aktivitesi % 80, olarak ölçülmüştür. 5 mM, 10 mM ve 15 mM KCl varlığındaki enzim aktiviteleri hemen hemen birbirine eşit olmakla (% 30-32) beraber MgCl₂ ve CaCl₂ varlığında gerçekleşen enzim aktivitelerinden oldukça düşük oldukları gözlenmiştir.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hücrenin normal metabolik işleyişinde önemli role sahip olduğu bilinen, ayrıca son yıllarda kanser, apoptozis ve yaşlanma ile ilişkileri ortaya çıktığı için moleküler biyolojide yoğun ilgi odağı haline gelen proteazomlar son yılların önemli çalışma konularından birisini oluşturmaktadır. 26S proteazoma sahip olmayan prokaryotlarda bu kompleks yapıya benzeyen ve yeni bir proteaz sistemi olan ATP-bağımlı HslVU proteaz bulunmuştur. Daha önce de belirtildiği gibi, genom ve kristal yapı çalışmaları sonucunda HslVU hakkında önemli ölçüde bilgi sağlanmıştır ancak, ATP-bağımlı proteolizis mekanizması hakkındaki bilgiler halen oldukça sınırlıdır.

G. kaustophilus'un genom dizisi yakın bir zamanda rapor edilmiş ve *E. coli* *hslV* ve *hslU* genlerine % 57 homoloji gösteren gen dizileri tanımlanarak ATP bağımlı proteaz HslV ve HslU ATPaz şeklinde adlandırılmıştır (Takami ve ark., 2004). *G. kaustophilus*'un yüksek sıcaklıklarda yaşayabilen bir organizma olması ATP-bağımlı proteaz HslVU genlerini de ilgi çekici kılmaktadır. İlk olarak *E. coli*'de bulunan ATP-bağımlı proteaz HslVU, ökaryotik 26S proteazoma homoloji göstermesi nedeniyle bu proteazomun analogu olarak kabul edilmiştir (Seemuller ve ark., 1995, Missiakas ve ark., 1996, Rohwild ve ark., 1996, Yoo ve ark., 1996) Bu çalışmada *G. kaustophilus*'a ait *hslV* ve *hslU* genleri ilk defa klonlanmış ve bu genler tarafından kodlanan proteinler GST ile füzyon halinde çalışılmıştır

G. kaustophilus DNA'sından klonlama çalışmalarında kullanılacak restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerini de taşıyan ileri ve geri primerlerin kullanıldığı PCR ile elde edilen *hslV* ve *hslU* genleri, öncelikle pGEM-T vektöre klonlanmıştır. Uygun restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri, ilgili genlerin NCBI veri tabanındaki DNA dizilerinden yola çıkılarak elde edilen restriksiyon haritalarına göre seçilmiştir. Klonlanmadan sonra elde edilen pGEM-T/*hslV* ve pGEM-T/*hslU* plazmitlerindeki *G. kaustophilus*'a ait yaklaşık 540 bp uzunluğundaki *hslV* ve 1400 bp uzunluğundaki *hslU* gen dizileri, SP6 promotoruna uygun primer ve her iki gene ait ileri ve geri primerler ile saptanmıştır.

Yapılan gen dizisi analizleri sonucu (BLAST), *G. kaustophilus*'tan alınarak pGEM-T vektöre klonlanan *hslV* ve *hslU* gen dizileri, daha önce Takami ve arkadaşları (2004) tarafından belirlenen diziler ile bire bir uygunluk göstermiştir.

Her iki gene ait gen dizilerinin belirlenmesinden sonra, restriksiyon haritaları çıkartılmıştır. Yapılan analizler sonucunda, her iki gene ait açık okuma çerçevelerinin herhangi bir bölgesinde, daha önce tasarlanan ileri ve geri primerlerde kullanılan restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerinin bulunmadığı doğrulanmıştır. Ayrıca klonlama çalışmalarından önce NCBI veritabanındaki gen dizilerinden elde edilen restriksiyon kesim haritaları ile aynı oldukları belirlenmiştir.

G. kaustophilus hslV ve *hslU* genlerine ait nükleotit diziliminden hareketle öngörülen amino asit dizileri incelendiğinde 20S proteazom β -tipi altünitelerdeki gibi, N-terminalinde iki korunmuş treonin rezidüsü belirlenmiştir (Seemüller ve ark., 1996). *G. kaustophilus hslV*'de de varolduğu gözlenen N-terminal treonin rezidüsü, daha önce Yoo ve arkadaşları tarafından yapılan *E. coli hslV* aktif bölge mutasyon çalışmalarında aktif bölge rezidüsü olarak tanımlanmıştır. Aynı çalışmada ayrıca *E. coli hslV* N-terminal treonin rezidüsünün valin ile değiştirildiği mutasyon çalışmalarında N-terminal serin rezidüsünün aktif bölge olarak görev görebileceği hipotezi ortaya atılmıştır. Bu hipotez, 2001 yılında Kang ve arkadaşlarının rapor ettiği, *E. coli* HslVU proteaza % 52 homoloji gösteren, *Bacillus subtilis* tarafından kodlanan ATP-bağımlı CodWX proteazının bir N-terminal serin proteaz olması gerçeği ile de desteklenmiştir. *G. kaustophilus* tarafından kodlanan HslV proteazda bu hipotez ile uygunluk gösteren bir de N-terminal serin rezidüsünün varolduğu gözlenmiştir.

G. kaustophilus tarafından kodlanan HslVU proteazın gerçekte bir N-terminal treonin proteaz mı yoksa serin proteaz mı olduğu, daha sonra saflaştırılmış HslV ve HslU proteinlerinin bir N-terminal treonin proteaz inhibitörü olan laktasistin ve Ser proteaz inhibitörü olan fenilmetilsülfonil florid ile yapılacak inhibisyon deneyleri ile ortaya çıkarılacaktır.

G. kaustophilus hslU genine ait amino asit dizisi incelendiğinde, tüm AAA⁺ ATPazlara özgü olan Walker A ve Walker B motiflere sahip olduğu gözlenmiştir.

Buna göre, Gly-(X)₄-Gly-Lys-Thr (X=herhangi bir amino asit) şeklinde tanımlanan Walker A motifinin *G. kaustophilus hslU* geninde GPTGVGKT şeklinde olduğu, (φ)₄-Asp-Glu-(X)₂ (φ =hidrofobik amino asit, X=herhangi bir amino asit) şeklinde tanımlanan Walker B motifinin ise IIFIDEID şeklinde olduğu doğrulanmıştır.

Chuang ve arkadaşlarının 1993 yılında yaptıkları çalışmada *E. coli hslV* ve *hslU* genlerinin aynı operon (*hslVU*) üzerinde kodlandıkları ve ekspresyonlarının ısı şoku faktörü σ^{32} tarafından uyarıldığı açığa çıkarılmıştır. Bu genler *G. kaustophilus* 'ta da aynı operon üzerinde bulunmaktadır. Bu operonun ekspresyon mekanizması bilinmese de *hslV* ve *hslU* genlerinin amino asit dizileri, bu genler tarafından kodlanan proteinlerin sırasıyla birer N-terminal Thr proteaz ve AAA⁺ ATPaz olabileceklerini göstermektedir. Bu nedenle gen dizileri temel alındığında, *G. kaustophilus hslV* ve *hslU* gen ürünlerinin aktif bir ATP-bağımlı HslVU proteaz kompleksi oluşturmak için gerekli olan dizilere sahip oldukları söylenebilir.

G. kaustophilus hslV ve *hslU* genlerinin eksprese edilmesi için *E. coli* BL21 (DE3) soyu kullanılırken ekspresyon vektörü olarak *Bam*HI ve *Sal*I restriksiyon kesim bölgeleriyle klonlama bölgesine yerleştirilmiş yaklaşık 1000 bç büyüklüğündeki ökaryotik LR1 genini içeren pGEX-6P-1/LR1 plazmiti kullanılmıştır. Plazmitin klonlama bölgesinde böylesine bir gene sahip olması, *hslV* ve *hslU* genlerinin ligasyonu için yapılacak ikili enzim kesimlerinin doğruluklarından emin olunması açısından avantaj sağlamaktadır.

pGEX-6P-1/LR1 plazmit DNA'sı, *hslV* DNA'sının ligasyonu için *Bam*HI ve *Sal*I ile kesilip agaroz jele yüklendiğinde beklenildiği gibi yaklaşık 4900 bç büyüklüğündeki doğrusal pGEX-6P-1 fragmanı ve yaklaşık 1000 bç büyüklüğündeki LR1 fragmanı gözlenmiştir. pGEX-6P-1/LR1 plazmit DNA'sı *hslU* DNA'sının ligasyonu için *Bam*HI ve *Xho*I ile kesilip agaroz jele yüklendiğinde ise yaklaşık 4900 bç büyüklüğündeki doğrusal pGEX-6P-1 fragmanı ve yaklaşık 800 bç büyüklüğünde beklenmedik bir DNA fragmanı gözlenmiştir. Bu beklenmedik DNA fragmanının LR1 geninin içerisindeki olası bir *Xho*I kesim bölgesinden kaynaklanabileceği öngörülerek LR1 genin restriksiyon haritası çıkartılmıştır. Elde edilen restriksiyon haritasına göre LR1 geni içerisinde genin 180. nükleotidi ile başlayan bir *Xho*I kesim bölgesinin bulunduğu belirlenmiştir. Böylece kesim reaksiyonu ile elde edilen

yaklaşık 800 bp büyüklüğündeki beklenmedik DNA fragmanının *XhoI* kesimi ile yaklaşık 180 bp kısalan LR1 genine ait olduğu anlaşılmıştır.

Rekombinant *E.coli* JM109 hücre soylarından plazmit izolasyon kiti ile izole edilen pGEM-T/*hslV* ve pGEM-T/*hslU* plazmitlerindeki *G. kaustophilus hslV* ve *hslU* genleri, uygun restriksiyon enzimlerle kesilip alınarak daha önce uygun restriksiyon endonükleazlar ile kesilen pGEX-6P-1 vektöre ligasyonla eklendikten sonra elde edilen ligasyon ürünleri transformasyon ile *E.coli* BL21 (DE3) hücrelerine aktarılmıştır.

Rekombinant plazmitleri (pGEX-6P-1/*hslV* ve pGEX-6P-1/*hslU*) içeren koloniler, yapılan koloni PCR çalışmaları ile belirlenmiştir. pGEX ileri ve geri primerleri ile elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görünüşleri incelendiğinde, primer bölgelerinin klonlama bölgesine olan uzaklıkları da hesaba katıldığında yaklaşık 660 bp uzunluğundaki *hslV* fragmanı ve yaklaşık 1530 bp uzunluğundaki *hslU* fragmanı gözlenmiştir. İstenilen genleri içerdikleri belirlenen bu kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldıktan sonra gen aktarımının başarılı bir şekilde gerçekleştiği, yapılan restriksiyon kesimleri ile de doğrulanmıştır.

IPTG ile uyarılarak GST-HslV ve GST-HslU füzyon proteinlerinin yüksek derecede eksprese edildiği rekombinant *E. coli* BL21 (DE3) hücre özütleri SDS poliakrilamid jele yüklendiğinde GST-HslV için yüksek derecede eksprese olan bandın 45 kDa büyüklüğünde olduğu gözlenmiştir. GST ile füzyon halinde olan HslV'ye ait bu bant, HslV'nin eksprese olduğunu göstermekle beraber GST'nin 26 kDa büyüklüğünde olduğu düşünüldüğünde HslV'nin 19 kDa büyüklüğünde olduğu gözlenmiştir. Ayrıca GST-HslU'nun yüksek derecede eksprese edildiği hücre özütlerinin SDS jeldeki görüntüsünde görülen kalın bandın 76 kDa büyüklüğünde olduğu ve HslU'nun bu durumda GST ile füzyon halinde olduğu düşünüldüğünde HslU'nun kendi başına 50 kDa büyüklüğünde olduğu gözlenmiştir.

Bu sonuçlar 1993'te Chung ve arkadaşları, 1996'da Rohrwild ve arkadaşları ve 1999'da Seong ve arkadaşları tarafından yapılan *E. coli* HslV ve HslU'nun moleküler büyüklüklerinin tayini çalışmalarıyla uygunluk göstermektedir. Bununla beraber Kang ve arkadaşlarının 2001'de HslVU'nun *B. subtilis*'teki homologu olan

ATP-bağımlı CodWX proteazın altbirimleri olan CodW proteazın benzer şekilde 19 kDa büyüklüğünde olduğu rapor edilirken CodX ATPaz'ın ise 52 kDa büyüklüğünde olduğu rapor edilmiştir.

Enzim aktivite tayini için substrat olarak kazeinin kullanıldığı aktivite deneylerinde GST-HslV ve GST-HslU füzyon proteinlerinin ayrı ayrı eksprese edildiği rekombinant *E. coli* BL21 (DE3) hücre özütləri kullanılmıştır. 26 kDa büyüklüğündeki GST ile füzyon halinde ayrı ayrı eksprese edilen HslV ve HslU proteinlerinin, böylesine büyük bir proteine bağlı halde aktif bir ATP bağımlı HslVU proteaz kompleksini oluşturması zor görünmektedir. Zira enzim kompleksinin oluşturulması için gereken konformasyonel değişimler ya da uygun katlanmaların meydana gelmesi, bağlı bulunan GST proteinin büyüklüğünden dolayı engellenebilir.

GST ile bağlı bulunan HslV ve HslU proteinlerin reaksiyon tüpünde aktif bir ATP bağımlı HslVU proteaz kompleksi oluşturması güç görünse de daha sonra yapılacak olan GST proteinden uzaklaştırılmış ve saflaştırılmış HslV ve HslU proteinlerinin aktivasyon çalışmalarına ön bilgi olması açısından konakçının proteaz aktivitesinin değerlendirilmesi için kazeinin substrat olarak kullanıldığı bir dizi enzimatik aktivite çalışmaları yapılmıştır.

Enzim aktivitesi için optimum koşulların bulunması amacıyla farklı zaman, sıcaklık ve pH aralıklarında, ATP varlığında yapılan enzim aktivasyon çalışmalarında (kazeinolitik deneyler) ilk olarak enzim aktivitesinin en iyi görüldüğü zaman aralığı araştırılmıştır.

G. kaustophilus'un termofilik bir bakteri olduğu düşünülerek 55 °C'ta yapılan deneyde enzim aktivitesi için en uygun zaman aralığının 0-20 dakika olduğu belirlenmiştir. Enzim aktivitesinin hem yaban tip hem de rekombinant hücre özütlərində, ATP varlığında ve yokluğundaki değişimlerine bakıldığında, ATP yokluğunda rekombinant hücre özütlərindəki enzim aktivitesinin yaban tipteki aktivitenin yaklaşık 3 katı iken ATP varlığında 0,75 katı olduğu, rekombinant hücre özütlərində enzimatik aktivitenin ATP'nin varlığında (ATP'nin yokluğuna oranla) ise 4,5 kat arttığı gözlenmiştir.

Rohrwild ve arkadaşları tarafından 1996'da *E. coli*'ye ait ATP bağımlı HslVU proteaz için yapılan aktivite deneylerinde, kazein yıkımı için ATP'ye ihtiyaç olmadığının rapor edilmesi bu anlamda farklılık göstermektedir. *G. kaustophilus*'a ait HslVU proteazın kazein yıkımı için gerçekten ATP'ye ihtiyaç duyup duymadığı, daha sonra saflaştırılmış HslV ve HslU proteinlerinin kullanıldığı kazeinolitik deneyler ile daha iyi anlaşılacaktır.

Enzim aktivitesi için en uygun sıcaklık aralığının 55-60 °C olduğu tespit edilmiştir. Termofilik *G. kaustophilus*'un normal büyüme sıcaklığının 60 °C olduğu düşünüldüğünde, enzim aktivitesinin bu sıcaklığa uygun değerlerde optimum düzeye ulaşması, enzim kompleksinin *G. kaustophilus*'ta aktif olarak çalışabileceğini desteklemektedir. *G. kaustophilus* HslVU'nun ATP varlığındaki kazeinolitik enzim aktivitesi için en uygun pH aralığının hafif asidik ve nötral pH aralığında (pH:5-7) olduğu gözlenmiştir.

Huang ve arkadaşları tarafından 1997'de *E. coli* HslVU proteazın kazeinolitik aktivitesi üzerinde yapılan çalışmalarda, enzimin ATPaz altbiriminin ATP varlığında $MgCl_2$ 'e bağımlı olduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle $MgCl_2$ yokluğunda ve farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında yapılan aktivite çalışmalarında en yüksek enzim aktivitesinin 15 mM $MgCl_2$ varlığında gerçekleştiği gösterilmiştir.

Bu proteazın karakterize edilmesi için sonraki çalışmalarda saflaştırılacak enzimin optimal sıcaklık, pH değerleri ve kararlılığının yanı sıra fluorogenik substratlar ve hücre bölünmesi inhibitörü SulA'nın yıkımı üzerindeki etkilerin yanı sıra Thr proteaz inhibitörü olan Laktasistin'in enzim aktivitesi üzerindeki etkisi değerlendirilecektir.

Bu çalışma sonucunda *G. kaustophilus*'a ait HslVU proteazın sırasıyla peptidaz ve ATPaz altbirimlerini kodlayan *hslV* ve *hslU* genleri, öncelikle pGEM-T vektöre klonlanmış ve elde edilen rekombinant vektörler (pGEM-T/*hslV* ve pGEM-T/*hslU*) *E. coli* JM109'a transformasyon ile başarılı bir şekilde aktarılmıştır. pGEM-T/*hslV* ve pGEM-T/*hslU* plazmitlerinden elde edilen *G. kaustophilus*'a ait *hslV* ve *hslU* genleri daha sonra ligasyon ile bir ekspresyon vektörü olan pGEX-6P-1

altklonlama ile aktarıldıktan sonra rekombinant plazmitler (pGEX-6P-1/*hslV* ve pGEX-6P-1/*hslU*), transformasyon ile *E. coli* BL21 (DE3)'e aktarılmıştır. Böylece Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Protein Moleküler Biyolojisi Laboratuvarına daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere *E. coli* soyunda *G. kaustophilus*'a ait *hslV* ve *hslU* DNA'larına sahip dört farklı plazmit kazandırılmıştır.

5. KAYNAKLAR

1. **Azim M.K., Noor S.** 2007. Characterization of protomer interfaces in HslV protease; the bacterial homologue of 20S proteasome. *Protein J*, (4):213-9.
2. **Barber R.D., Ferry J.G.** 2001. Archaeal proteasomes. *Methods Enzymol*, 330:413-24.
3. **Bauer, M. W., S. H. Bauer, and R. M. Kelly.** 1997. Purification and characterization of a proteasome from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:1160-1164.
4. **Baumeister, W., J. Walz, F. Zühl, and E. Seemüller.** 1998. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92:367-380
5. **Belfort M., Wulff DL.** 1973. An analysis of the processes of infection and induction of *E. coli* mutant hfl-1 by bacteriophage lambda. *Virology*, 55(1):183-92.
6. **Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Huber, R.** 1997. Crystal structure of heat shock locus V (HslV) from *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad. Sci.* 94: 6070–6074.
7. **Bochtler, M., Hartmann, C., Song, HK., Bourenkov, GP., Bartunik, HD., Huber, R.** 2000. The structures of HslU and the ATPdependent protease HslU–HslV. *Nature*, 403, 800–805.
8. **Bukau B.** 1993. Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Mol Microbiol*, (4):671-80.
9. **Burton R.E., Baker T.A., Sauer R.T.** 2005. Nucleotide-dependent substrate recognition by the AAA+ HslVU protease. *Nat Struct Mol Biol*, (3):245-51.

10. **Burton, B.M. and Baker, T.A.** 2005. Remodeling protein complexes: insights from the AAA⁺ unfoldase ClpX and Mu transposase. *Protein Sci.*, 14, 1945–1954.
11. **Chuang, S.E., Burland, V., Plunkett III, G., Daniels, D.L., and Blattner, F.R.** 1993. Sequence analysis of four new heat-shock genes constituting the hslTS/ibpAB and HslVU operons in *Escherichia coli*. *Gene* 134: 1–6.
12. **Chung C.T., Niemela S.L., Miller R.H.** 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(7):2172-5.
13. **Chung, C.H.** 1993. Proteases in *Escherichia coli*. *Science*, 262: 372–374.
14. **Chung C.H., Seol J.H., Kang M.S.** 1996. Protease Ti (Clp), a multi-component ATP-dependent protease in *Escherichia coli*. *Biol Chem*, 377(9):549-54.
15. **Chu-Ping M., Slaughter C.A, DeMartino G.N.** 1992. Purification and characterization of a protein inhibitor of the 20S proteasome (macropain). *Biochim Biophys Acta*, 1119(3):303-11.
16. **Ciechanover, A** .1994. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, 79: 13-21.
17. **Confalonieri F. and Duguet M.** 1995. A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function. *Bioessays*.(7):639-50.
18. **Cordell, S.C., Robinson, E.J.H., and Lowe, J.** 2003. Crystal structure of the SOS cell division inhibitor SulA and in complex with FtsZ. *Proceedings of the National Academy of Science*, 100: 7889–7894.
19. **Coux, O., Tanaka K., Goldberg A.L.** 1996. Structure and Functions of the 20S and 26S Proteasomes. *Annual Review of Biochemistry*, 65: 801-847.
20. **Dahlmann, B., Kopp, F., Kuehn, L., Nidel, B., Pfeifer, G., Hegerl, R. & Baumeister W.** 1989. The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous

from eukaryotes to archaebacteria. *Federation of European Biochemical Societies* . 251: 125–131.

21. **Dougan, D.A., Mogk, A, Bukau, B.** 2002. Protein folding and degradation in bacteria: to degrade or not to. degrade? That is the question. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 59: 1607 –1616.
22. **Du R.J., Ho B.** 2003. Surface localized Heat Shock Protein 20 (HslV) of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*,(4):257-67.
23. **Fenteany G., Standaert R.F., Lane W.S., Choi S., Corey E.J., Schreiber S.L.** 1995. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science*, (5211):726-31.
24. **Gille C., Goede A., Schlöetelburg C., Preissner R., Kloetzel P.M., Göbel U.B., Frömmel C.** 2003. A comprehensive view on proteasomal sequences: implications for the evolution of the proteasome. *J Mol Biol*, 326(5):1437-48.
25. **Goldberg A.L. and St. John A.C.** 1976. Intracellular Protein Degradation in Mammalian and Bacterial Cells, *Annual Review of Biochemistry*, 45: 747-804.
26. **Goldberg, A.L.** 1992. The mechanism and function of ATP-dependent protease in bacterial and animal cells. *European Journal of Biochemistry*, 203: 9–23.
27. **Goldberg, A.L., Moerschell, R.P., Chung, C.H., Maurizi, M.R.** 1994. ATP-dependent protease La (lon) from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol*. 244:350–375.
28. **Goloubinoff P, Mogk A, Zvi AP, Tomoyasu T, Bukau B.** 1999. Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(24):13732-7.
29. **Gottesman S.** 2003. Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 19:565-87.

30. **Granger L.L., O'Hara E.B., Wang R.F., Meffen F.V., Armstrong K., Yancey S.D., Babitzke P., Kushner S.R.** 1998. The *Escherichia coli mrsC* gene is required for cell growth and mRNA decay. *J Bacteriol*, 180(7):1920-8.
31. **Groll M, Ditzel L, Löwe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, Huber R.** 1997. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, 386(6624):463-71.
32. **Groll M., Bochtler M., Brandstetter H., Clausen T., Huber R.** 2005. Molecular machines for protein degradation. *Chembiochem*, 6(2):222-56.
33. **Groll M., Koguchi Y., Huber R., Kohno J.** 2001. Crystal structure of the 20 S proteasome: TMC-95A complex: a non-covalent proteasome inhibitor. *J Mol Biol*, 311(3):543-8.
34. **Grziwa A., Baumeister W., Dahlmann B., Kopp F.** 1991. Localization of subunits in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum* by immunoelectron microscopy. *FEBS Lett*, 290(1-2):186-90.
35. **Guenther B., Onrust R., Sali A., O'Donnell M., Kuriyan J.** 1997. Crystal structure of the delta subunit of the clamp-loader complex of *E. coli* DNA polymerase III, *Cell*, 91(3):335-45.
36. **Hlavacek O., Vachova L.** 2002. ATP-dependent proteinases in bacteria. *Folia Microbiol (Praha)*, 47(3):203-12.
37. **Huang H., Goldberg A.L.** 1997. Proteolytic activity of the ATP-dependent protease HslVU can be uncoupled from ATP hydrolysis. *J Biol Chem*, 272(34):21364-72.
38. **Hwang B.J., Woo K.M., Goldberg A.L., Chung C.H.** 1988. Protease Ti, a new ATP-dependent protease in *Escherichia coli*, contains protein-activated ATPase and proteolytic functions in distinct subunits. *J Biol Chem*. 263(18):8727-34.
39. **Kanemori M., Yanagi H., Yura T.** 1999. Marked instability of the sigma(32) heat shock transcription factor at high temperature. Implications for heat shock regulation. *J Biol Chem*, 274(31):22002-7.

40. **Kanemori, M., Nishihara, K., Yanagi, H., and Yura, T.** 1997. Synergistic roles of HslVU and other ATP-dependent proteases in controlling in vivo turnover of σ^{32} and abnormal proteins in *Escherichia coli*. *The Journal of Bacteriology*, 179: 7219–7225.
41. **Kang, M.S., Lim, B.K., Seong, I.S., Seol, J.H., Tanahashi, N., Tanaka, K., and Chung, C.H.** 2001. The ATP-dependent CodWX (HslVU) protease in *Bacillus subtilis* is an N-terminal Ser protease. *The EMBO Journal*, 20:734–742.
42. **Katayama T., Kubota T., Takata M., Akimitsu N., Sekimizu K.** 1996. Disruption of the hslU gene, which encodes an ATPase subunit of the eukaryotic 26S proteasome homolog in *Escherichia coli*, suppresses the temperature-sensitive dnaA46 mutation. *Biochem Biophys Res Commun*,
43. **Khattar M.M.** 1997. Overexpression of the hslVU operon suppresses SOS-mediated inhibition of cell division in *E. coli*. *FEBS Lett*, 414(2):402-4.
44. **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. *J Mol Biol*, 279(1):175-88.
45. **Kim, Y.I.** 2000. Dynamics of substrate denaturation and translocation by the ClpXP degradation machine. *Mol. Cell*, 5, 639–648.
46. **Kisselev A.F., Goldberg A.L.** 2001. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol*, (8):739-58.
47. **Kwon A.R., Kessler B.M., Overkleeft H.S., McKay D.B.** 2003. Structure and reactivity of an asymmetric complex between HslV and I-domain deleted HslU, a prokaryotic homolog of the eukaryotic proteasome. *J Mol Biol*, 330(2):185-95.
48. **Laemmli U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680-5.
49. **Langer T.** 2000. AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins. *Trends Biochem Sci*, 25(5):247-51.

50. **Levchenko I., Smith C.K., Walsh N.P., Sauer R.T., Baker T.A.** 1997. PDZ-like domains mediate binding specificity in the Clp/Hsp100 family of chaperones and protease regulatory subunits. *Cell*, 91(7):939-47.
51. **Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. and Huber, R.** 1995. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science*, 268: 533-539.
52. **Matsuzawa H., Ushiyama S., Koyama Y., Ohta T.** 1984. *Escherichia coli* K-12 tolZ mutants tolerant to colicins E2, E3, D, Ia, and Ib: defect in generation of the electrochemical proton gradient. *J Bacteriol*, 160(2):733-9.
53. **Maurizi M.R.** 1992. Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*. *Experientia*, 48(2):178-201.
54. **Missiakas, D., Schwager, F., Betton, J.M., Georgopoulos, C., and Raina, S.** 1996. Identification and characterization of HslV HslU (ClpQ ClpY) proteins involved in overall proteolysis of misfolded proteins in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 15: 6899–6909.
55. **Mogk A., Bukau B.** 2004. Molecular chaperones: structure of a protein disaggregase. *Curr Biol*, 14(2):R78-80.
56. **Mogk A., Tomoyasu, T., Goloubinoff, P., Rüdiger, S., Röder, D., Langen, H., Bukau, B.** 1999. Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J.*, 18(24):6934-49.
57. **Neuwald, A., Aravind, L., Spouge, J., Koonin, E.** 1999. AAA⁺: A Class of Chaperone-Like ATPases Associated with the Assembly, Operation, and Disassembly of Protein Complexes. *Genome Research*, 9, 27-43.
58. **Nussbaum A.K., Dick T.P., Keilholz W., Schirle M., Stevanović S., Dietz K., Heinemeyer W., Groll M., Wolf D.H., Huber R., Rammensee H.G., Schild H.** 1998. Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1 *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(21):12504-9.

59. **Ogura, T. and Wilkinson, A. J.** 2001. AAA⁺ superfamily ATPases: common structure-diverse function, *Genes Cells* 6: 575-597.
60. **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. *J Struct Biol*, 146(1-2):106-12.
61. **Ortega J., Lee H.S., Maurizi M.R., Steven A.C.** 2004. ClpA and ClpX ATPases bind simultaneously to opposite ends of ClpP peptidase to form active hybrid complexes. *J Struct Biol*. 146(1-2):217-26.
62. **Özdemir F.İ.** 2003. Purification and characterization of cytoplasmic and proteasome associated cymotrypsin-like proteases from *Thermoplasma volcanium*. PhD thesis, METU.
63. **Pickart C.M.** 2001. Back to the future with ubiquitin. *Cell*, 116(2):181-90.
64. **Pühler G., Weinkauff S., Bachmann L., Müller S., Engel A., Hegerl R., Baumeister W.** 1992. Subunit stoichiometry and three-dimensional arrangement in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum*. *EMBO J*, (4):1607-16.
65. **Robles J., Doers M.** 1994. pGEM-T vector systems troubleshooting guide. *Promega Notes Magazine*, 45;19.
66. **Rohrwild M., Pfeifer G., Santarius U., Müller S.A., Huang H.C., Engel A., Baumeister W., Goldberg A.L.** 1997. The ATP-dependent HslVU protease from *Escherichia coli* is a four-ring structure resembling the proteasome. *Nat Struct Biol*, (2):133-9.
67. **Rohrwild, M., Coux, O., Huang, H.-C., Moerschell, R.P., Yoo, S.J., Seol, J.H., Chung, C.H., and Goldberg, A.L.** 1996. HslV–HslU: A novel ATP-dependent protease complex in *Escherichia coli* related to the eukaryotic proteasome. *Proceedings of the National Academy of Science*, 93: 5808–5813.

68. **Ronimus R.S., Parker L.E., Morgan H.W. 1997.** The utilization of RAPD-PCR for identifying thermophilic and mesophilic *Bacillus* species. *FEMS Microbiol Lett*, 147(1):75-9.
69. **Ruiz-González M.X., Marín I. 2006.** Proteasome-related HslU and HslV genes typical of eubacteria are widespread in eukaryotes. *J Mol Evol*, 63(4):504-12.
70. **Sambrook J., Gething M.J. 1989.** Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature*, 342(6247):224-5.
71. **Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989.** Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. N.Y., *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1659 p. ISBN 0-87969-309-6
72. **Santos D., De Almeida D. F. 1975.** Isolation and characterization of a new temperature-sensitive cell division mutant of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 124(3):1502-7.
73. **Schumann W. 1999.** FtsH--a single-chain charonin? *FEMS Microbiol Rev*, 23(1):1-11.
74. **Seol J.H., Woo K.M., Kang M.S., Ha D.B., Chung C.H. 1995.** Requirement of ATP hydrolysis for assembly of ClpA/ClpP complex, the ATP-dependent protease Ti in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*. 217(1):41-51.
75. **Seol, J.H., Yoo, S.J., Shin, D.H., Shim, Y.K., Kang, M.S., Goldberg, A.L., and Chung, C.H. 1997.** The heat-shock protein HslVU from *Escherichia coli* is a protein-activated ATPase as well as an ATP-dependent proteinase. *European Journal of Biochemistry*. 247: 1143–1150.
76. **Seol, J.H., Yoo, S.J., Shin, D.H., Shim, Y.K., Kang, M.S., Goldberg, A.L., and Chung, C.H. 1997.** The heat-shock protein HslVU from *Escherichia coli* is a protein-activated ATPase as well as an ATP-dependent proteinase. *European Journal of Biochemistry*. 247: 1143–1150.

77. **Seong, I.S., Oh, J.Y., Lee, J.W., Tanaka, K., and Chung, C.H.** 2000. The HslU ATPase acts as a molecular chaperone in prevention of aggregation of SulA, an inhibitor of cell division in *Escherichia coli*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 477: 224–229.
78. **Singh S.K., Grimaud R., Hoskins J.R., Wickner S., Maurizi M.R.** 2000. Unfolding and internalization of proteins by the ATP-dependent proteases ClpXP and ClpAP. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97(16):8898-903.
79. **Takami H., Takaki Y., Chee G.J., Nishi S., Shimamura S., Suzuki H., Matsui S., Uchiyama I.** 2004. Thermoadaptation trait revealed by the genome sequence of thermophilic *Geobacillus kaustophilus*. *Nucleic Acids Res*, (21):6292-303.
80. **Thompson M.W., Singh S.K., Maurizi M.R.** 1994. Processive degradation of proteins by the ATP-dependent Clp protease from *Escherichia coli*. Requirement for the multiple array of active sites in ClpP but not ATP hydrolysis. *J Biol Chem*. 269(27):18209-15.
81. **Torres-Cabassa, A.S., Gottesman, S.** 1987. Capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12 is regulated by proteolysis. *Journal of Bacteriology*. 169:981-989.
82. **Van Melderen L, Thi MH, Lecchi P, Gottesman S, Couturier M, Maurizi MR.** 1996. ATP-dependent degradation of CcdA by Lon protease. Effects of secondary structure and heterologous subunit interactions. *J Biol Chem*, 271(44):27730-8.
83. **Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., and Gay, N. J.** 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J*. 1:945-951.
84. **Wang J., Song J.J., Franklin M.C., Kamtekar S., Im Y.J., Rho S.H., Seong I.S., Lee C.S., Chung C.H., Eom S.H.** 2001. Crystal structures of the HslVU

peptidase-ATPase complex reveal an ATP-dependent proteolysis mechanism. *Structure*, 9(2):177-84.

85. **Wang, J., Hartling, J. A. and Flanagan, J. M.** 1997. The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. *Cell* 91, 447-456.
86. **Weichert D., Querfurth N., Dreger M., Hengge-Aronis R.** 2003. Global role for ClpP-containing proteases in stationary-phase adaptation of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 185(1):115-25.
87. **Wenzel T. and Baumeister W.** 1995. Conformational constraints in protein degradation by the 20S proteasome. *Nat Struct Biol*, (3):199-204.
88. **Wilkinson K.D.** 1999. Ubiquitin-dependent signaling: the role of ubiquitination in the response of cells to their environment. *J Nutr*, (11):1933-6.
89. **Wilson, H.L., Aldrich, H.C. and Maupin-Furlow J.** 1999. Halophilic 20S Proteasomes of the Archaeon *Haloferax volcanii*: Purification, Characterization, and Gene Sequence Analysis. *Journal of Bacteriology*. 181(18): 5814-5824
90. **Wolf D.H., Hilt W.** 2004. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta*, 1695(1-3):19-31.
91. **Woo K.M., Chung W.J., Ha D.B., Goldberg A.L., Chung C.H.** 1989. Protease Ti from *E. coli* requires ATP hydrolysis for protein breakdown but not for hydrolysis of small peptides. *J Biol Chem*, 264(4):2088-91.
92. **Yoo S.J., Seol, J.H., Shin, D.H., Rohrwild, M., Kang, M.S., Tanaka, K., Goldberg, A.L. and Chung, C.H.** 1996. Purification and characterization of the heat shock proteins HslV and HslU that form a new ATP-dependent protease in *E. coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 14035–14040.
93. **Zwickl P., Grziwa A., Pühler G., Dahlmann B., Lottspeich F., Baumeister W.** 1992. Primary structure of the *Thermoplasma* proteasome and its implications for the structure, function, and evolution of the multicatalytic proteinase. *Biochemistry*, 31(4):964-72.

ÖZGEÇMİŞ

Kemal Avican, 12 Eylül 1980’de Mardin’nin Nusaybin ilçesinde doğdu. 2000 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde lisans eğitime başladı. Lisans eğitimini 2005 yılında tamamladıktan sonra aynı yıl, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitime başladı. Halen yüksek lisans eğitime devam etmektedir.