

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

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

Haluk CAMCI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

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

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

Haluk CAMCI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Fatma İnci Özdemir

ÖZET

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

YAZAR ADI : Haluk CAMCI

La olarak da adlandırılan lon proteaz, ilk olarak *Escherichia coli* den saflaştırılmış ilk ATP-bağımlı proteazdır. Lon proteaz, diğer ATP-bağımlı proteazlarda (FtsH, ClpAP, ClpXP, HslVU ve 26S proteazom) olduğu gibi AAA⁺ protein süper ailesine (ATPase associated with diverse cellular activities) aittir. Lon proteazlar hücre içi proteolizisten sorumlu anahtar enzimlerdir. Mutant ve anormal proteinleri elimine ederek hücre içinde protein kalite kontrolüne ve kısa-sürelili düzenleyici proteinlerin yıkımına katılarak hücre normal şartların devamlılığının sağlanmasına katkıda bulunurlar. Lon proteaz homologları sadece bakterilerde değil, insan, maya ve bitkilerde de bulunmuştur. Bu bilgiler Lon'un çok önemli bir biyolojik rol oynadığını göstermektedir. Bununla beraber Lon proteazın proteolitik aktivitesi ve ATP-bağımlı durumda çeşitli substratları nasıl tanıyabildiği hala tam olarak açık değildir.

Bu tez çalışmasında, termofilik bir bakteri olan *Geobacillus kaustophilus*'un Lon proteazı ilk defa *Escherichia coli* 'de klonlanmış ve eksprese edilmiştir. Yaklaşık 2500 bp uzunluğundaki lon geni önce bir klonlama vektörü olan pGEM-T vektöre ve daha sonra *E. coli*'de pGEX 6P-1 vektörüne alt-klonlama yapıldıktan sonra aktarılmıştır. Yaklaşık 87 kDa büyüklüğündeki Lon proteaz glutathione S-transferaz (GST 26 kDa) füzyon proteini ile DH5α *E.coli*'de eksprese edilmiştir.

SUMMARY

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

AUTHOR : Haluk CAMCI

Lon protease (also called La) is the first isolated ATP-dependent protease in *E. coli*. Lon is a member of the AAA⁺ super family (ATPase associated with diverse cellular activities) like all other ATP-dependent proteases (FtsH, ClpAP, ClpXP, HslVU ve 26S proteazom). Lon proteases are key enzymes responsible for intracellular proteolysis, contributing to protein control and cellular homeostasis by eliminating mutant and abnormal proteins and participation in rapid turnover of short-lives regulatory proteins. Homologs of the lon protease are found not only in bacteria also in human, yeast and plants. These observations indicate that Lon may play crucial biological roles in various organisms. However how Lon protease recognises a variety of substrates in ATP dependent manner is still unclear.

In this study, *Geobacillus kaustophilus* ATP dependent Lon protease first time cloned and expressed in *E. coli*. About 2500 bp lon gene first cloned into pGEM-T cloning vector then subcloned into pGEX 6P-1 in *E. coli*. Lon, 87 kDa molecular weight, were expressed with glutathione S-transferaz (GST 26 kDa) as a fusion protein.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bana yardımlarını hiç esirgemeyen ve her zaman yol gösteren değerli hocam Yard. Doç. Dr. F.İnci Özdemir'e çok teşekkür ederim

Laboratuarda kaldığım süre boyunca her konuda bana yardımcı olan, tüm çalışmalarım boyunca desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım; Gonca ALTIN, Tuğrul Doruk, İrem Yalım, Kemal AVİCAN, Ümmühan SAVAŞ, Davut ERDOĞAN, Hüseyin BALCI, Irmak ŞAH ve Serda Kayman'a hep yanımda oldukları için çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans yaptığım süre boyunca karşılaştığım her türlü zorlukta yardımını esirgemeyen saygı değer hocam Prof. Dr. Füsun Gümüşel'e çok teşekkür ederim

Eğitim hayatım boyunca maddi manevi bir çok zorlukla beni okutan ancak yılmayan Ailem'e de sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET	İv
SUMMARY	V
TEŞEKKÜR	Vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	Vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	X
DİZİNİ	
ŞEKİLLER DİZİNİ	Xiii
TABLolar DİZİNİ	XV
1. Giriş	1
1.1. AAA Süper Ailesi	2
1.2. ATP bağımlı Proteazlar	4
1.2.1. 26S proteozom	5
1.2.2. ClpTi	7
1.2.3. FtsH	8
1.2.4. HsıUV	9
1.2.5. Lon	10
1.2.5.1. Lon Yapısı	11
1.2.5.2. Lon'un Fizyolojik işlevleri	15
1.3. <i>Geobacillus kaustophilus</i> Hücresel Yapı ve Metabolizması	21
1.4. Tezin Amacı	23
2. Gereç ve Yöntemleri	24
2.1. Gereçler	
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar	24
2.1.2. Kullanılan enzimler ve tamponları	24
2.1.3. Kullanılan nükleotidler	24
2.1.4. Kullanılan Kitler	25
2.1.5. Kullanılan DNA moleküler Belirteci	25
2.1.6. Kullanılan vektör sistemleri	26

2.1.6.1 pGEM-T vektör sistem	26
2.1.6.2 pGEX-6P-1 vektör sistem	27
2.1.7 <i>G. kaustophilus lon</i> Geninin Restriksiyon Enzim Haritalarının Çıkartılması	29
2.1.8 Kullanılan Bakteri Soyları	30
2.1.8. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler	31
2.1.9 Kullanılan Cihazlar	34
2.2. Yöntemler	35
2.2.1 <i>Geobacillus kaustophilus</i> 'tan Kromozomal DNA İzolasyonu	35
2.2.2 <i>Geobacillus kaustophilus</i> Lon geninin PCR ile çoğaltılması.	35
2.2.3. PCR Ürününün Agaroz Jelden Saflaştırılması	36
2.2.4. PCR Ürünlerinin Klonlanması	37
2.2.5. Transformasyon	37
2.2.6. Klonlanan DNA dizisinin dizilenmesi	38
2.2.7. Lon geninin ekspresyon plazmidi pGEX6p1'e klonlanması	39
2.2.8. Transformasyon ve Rekombinant Seçimi	40
2.2.9. Hücre Özütlerinin Hazırlanması	41
2.2.10. Rekombinant GST-Lon Füzyon Proteinin Saflaştırılması	42
2.2.11. Lon Tarafından Kazein Yıkımı	43
2.2.12 Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi	43
2.2.13 BCA Yöntemi ile Protein Miktarı Tayini	44
3. Bulgular	45
3.1. <i>G. kaustophilus</i> Lon Geninin PCR ile Çoğaltılması	45
3.2. <i>G. kaustophilus</i> Lon Geninin pGEM-T'ye Klonlanması	46
3.3. Klonlanan <i>lon</i> DNA'sının Nükleotid Dizisinin Belirlenmesi	47
3.4. <i>G. kaustophilus lon</i> Geninin Restriksiyon Enzim	

Haritasının Çıkarılması	50
3.5. <i>lon</i> Geninin Ekspresyon Vektörü pGEX-6P-1'e	
Klonlanması	50
3.6. Lon Proteazın Ekspresyonu	53
3.7. Lon Proteazın Saflaştırılması	54
3.8. Lon Tarafından Kazein Yıkımı	56
4.Tartışmave Sonuç	57
5.Kaynaklar	61

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

~	Yaklaşık
Å	Amströng
AAA ⁺	Çeşitli hücresele aktivitelere sahip ATPazlar
ADP	Adenozin difosfat
APS	Amonyum persulfat
Arg	Arjinin
ATP	Adenozin trifosfat
<i>Bam</i> HI	<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 oluşturucu sıcaklık-hassas A
GST	Glutasyon-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
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

Şekil		Sayfa
1.1.	26S Proteazom	6
1.2.	Farklı türlerdeki Lon proteazlar	11
1.3.	Lon A ve Lon B ailelerinin temel özelliklerini gösteren şematik diyagram	13
1.4.	Korunmuş Serin-Lizin Katalitik ikilisinin farklı türlerdeki yerleşimi	14
1.5.	Lon proteaz'ın hücredeki görevleri	21
1.6.	<i>Geobacillus kaustophilus</i> 'un <i>Geobacillus</i> cinsinin diğer türlere göre filogenetik yeri	22
2.1.	Moleküler DNA belirteçleri	25
2.2.	pGEM-T vektör haritası. Çoklu klonlama bölgesi ve genel özelliklerini gösteren şekli.	27
2.3.	GST füzyon vektörü pGEX-6P-12'in açık okuma çerçevesi ve genel özelliklerini gösteren haritası.	28
2.4.	<i>lon</i> geninin restriksiyon haritası.	29
2.5.	pGEM-T vektöre ait çoklu klonlama bölgesi	39
3.1.	Agaroz jelden saflaştırılan <i>lon</i> 'a ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü.	45
3.2.	PGEMT-Lonrekombinant plazmidinin restriksiyon enzim kesimleri sonucu oluşan DNA fragmanlarının agaroz jelde görünümü	47
3.3.	<i>G. kaustophilus</i> 'a ait <i>lon</i> geni anlamlı DNA zinciri	50

3.4.	Koloni PCR sonuçlarının jelde görünümü.	51
3.5.	pGEX-6P-1/ <i>lon</i> DNA'sının restriksiyon enzim kesimi sonuçları.	52
3.6.	<i>E. coli</i> DH5 α 'da eksprese edilen GST-Lon füzyon proteininin SDS-PAGE'de görünümü	53
3.7.	Lon Proteazın Saflaştırılması	55
3.8.	Lon proteaz tarafından ATP varlığında ve yokluğunda kazein yıkımı.	56

TABLolar DİZİNİ

Tablo		Sayfa
1.1.	ATP Bağımlı Proteazlar	5
2.1.	PCR için tasarlanan primerler	36

1. GİRİŞ

Proteolizis yakın zamana kadar hücrede yalnızca protein yıkımı ile ilgili çalışan bir süreç olarak kabul edilmesine rağmen bugün yaşam ile ölüm arasındaki süreçte birçok biyolojik sistemi kontrol ettiği bilinmektedir. Hücreler proteolizisi, düzenleyici proteinlerin seviyesini belirlemek ve yanlış katlanmış ve zarar görmüş proteinlerin ortamdan uzaklaştırmak için kullanmaktadırlar (Gottesman, 2003).

Hücre içinde proteinlerin çoğu göreceli olarak kararludur. Birçok önemli düzenleyici protein kısa yarı ömürlüdür ve görevlerini yaptıktan sonra yıkılmalıdır. Sitoplazmik protein yıkımı hücre içindeki en önemli düzenleme mekanizmalarından biri olup hücre döngüsü, programlanmış hücre ölümü, antijen tanınması, döngü ritmi, iltihaplanma, uzun zamanlı hafıza gibi birçok fenomenin yürümesini sağlamaktadır. Proteolizisin enerji bağımlı bir süreç olduğu bilinmektedir.

Hem ökaryotik hem de prokaryotik hücrelerde, bir çok hücre içi protein yıkımı ATP-bağımlı proteazlar ile başlatılmaktadır (Kessel ve ark., 1995, De Mot ve ark., 1999). ATP bağımlı proteazlar katalitik aktiviteden sorumlu çekirdek domain ve ATPaz aktivitesine sahip düzenleyici domainden oluşur. Aynı yapı, protein katlanmasında fonksiyonel olan şaperonlerde de, halka yapılı moleküler şaperonlar GroES, GroEL, arkeobakteriel termozom, ökaryotik CCT bulunur, ancak aralarında hiçbir dizi benzerliği bulunmamaktadır (Kusmierczyk ve Martin, 2001). ATP-bağımlı proteazların düzenleyici bölgeleri AAA+ protein ailesi üyesi olup fonksiyonlarını aynı yoldan yürütmektedirler. ATP hidrolizi, proteinlerin ikincil yapısını bozmak yani katlanmaları açmak için gereklidir, çünkü ancak katlanmaları açılmış ve hacmi küçülmüş proteinlerin nanometrik çaplardaki kanallardan proteolitik bölgelere

girişine izin verilir. Polipeptitlerin yıkımının 5-16 amino asitlik oligopeptitler haline gelinceye kadar sürdüğü, yapılan *in vitro* çalışmalarda desteklenmektedir (Neuwald ve ark. 1999, Gottesman, 1999).

1.1. AAA+ Süper-ailesi

AAA alt-ailesi (ATPases associated with various cellular activities, Çeşitli hücrel aktivite 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 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 hücrel faaliyetlerde görev almaktadırlar (Neuwald ve ark., 1999).

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

Her bir ATPaz altbiriminin AAA⁺ modülü, büyük α/β domain ve küçük α -helikal domain oluşturmaktadır. Nükleotid bağlanması komşu altbirimlerin birbirine bakan bölgelerinde gerçekleşmektedir. Birkaç korunmuş amino asit rezidüsü, nükleotid hidrolizinde rol oynamaktadır (Ogura ve ark., 2001; Ogura ve Wilkinson, 2003). 200-250 aminoasitten oluşan AAA+ domaini birçok farklı tanımlayıcı bölge taşımaktadır (Neuwald ve ark, 1999, Ogura ve Wilkinson, 2001).

İlk tanımlayıcı bölge Box II dir. Bu motif adenin rezidüsünün tanınmasında önemli bir rol oynamasına karşın devamlı olarak korunmuş bir bölge değildir (Martin ve Gruber, 2004, Neuwald ve ark, 1999). Diğer bir korunmuş bölge, Walker A olarak adlandırılmış ve Gly-(X)₄-Gly-Lys-Thr (X=herhangi bir amino asit) dizisi şeklinde tanımlanmıştır. Lizin ve treonin/serin rezidülerinin özelleşmiş Walker A motifinin bu rezidülerinin ATP'nin β - ve γ -fosfatlarının, ve ayrıca Mg⁺² iyonlarının sırası ile bağlanmasında önemli oldukları önerilmektedir. Buna ek olarak lizin rezidüsünün nihai konformasyon için P-halkasının oluşmasında önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir (Neuwald ve ark, 1999).

Walker B motifi, (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). Bu rezidünün karboksi grubu su molekülünden bir proton kopararak bağlı olan ATP'nin γ - fosfatına nükleofilik bir atağın başlamasına neden olur. Motifin bu özelliği ile katalitik aktivitede temel rolü oynadığı düşünülmektedir (Leipe ve ark., 2003, Gorbalenya ve Konin, 1989)

Walker-B motifinden hemen sonra polar rezidüler içeren ve Sensör 1 olarak adlandırılan korunmuş bir bölge yer almaktadır. Bu

rezidülerin, ATP'nin γ - fosfatının tanınması esnasında bir algılayıcı olarak doğrudan ya da nükleofilik atak sırasında su molekülünün doğru yönlendirilmesine yardımcı olarak dolaylı yoldan, katalitik aktivitede etkili bir rolü olduğuna inanılmaktadır.

Sensör 1'i takiben yer alan ve kutu 7 olarak adlandırılan korunmuş bir arjinin rezidüsü bulunmaktadır. Bu rezidü bağlı ATP'nin γ -fosfatı ile ilişki halindedir ve ATP bağlanması, altüniteler arası ilişki ve hidrolizi de içeren bir çok farklı olayda rolü olduğu düşünülmektedir (Karata ve ark. 1999, Rombel ve ark., 1999).

AAA⁺ modülünün fonksiyonu ile ilgili olarak günümüzde yapılan modellemeler α -domaini'nin α/β -doamini ile birilmek vasıtası ile kurduğu ilişkinin bu bölgeyi nükleotid bağlanmasına duyarlı hale getirdiğini önermektedir (Rouiller ve ark. 2002, Wang 2004, DeLaBarre ve Brunger 2005). Birbiri ile ilişkide olan halkalar arasındaki alt ünitelerin kararlılığı, bir altünitenin α -domaininin bir sonraki alt ünitenin α/β -doamini ile kurduğu ilişki ile açıklanmaktadır (Lenzen ve ark. 1998, Bochtler ve ark. 2000, Zhang ve ark. 2000). Nükleotidin bağlanması ve serbest bırakılması α -domaini ile α/β -doamini'nin ayrılmasına ve konformasyonel bir dönüşe neden olmaktadır (Wang 2004). Bu dönüş alt ünitelerden birine, bir polipeptit zincirine bağlanabilme gücü vermektedir. Bağlantı gerçekleşmez ise alt birimler kısmi olarak ayrılmaktadır. Halka şeklinde düzenlemiş proteinlerde α - ve α/β -domaini'nin eksen boyunca yaptığı bu hareket substrat proteinin aksiyal kanala girişi için gerekli olan gücü sağlamaktadır. Eğer α/β -domaini'nin hareketi sınırlı ise; bu hareket α -domaini'nin eksen üzerinde dışa bir dönüş yapmasına neden olmaktadır. Bu durum Lon proteazda meydana geldiğinde, ilişki halindeki P-domain ile AAA⁺ modülünün ikincil yapısal elementleri üzerine etki etmektedir. Bu yolla nükleotid bağlanması ve salınması, P-domainin yapısal elementleri ve hatta aktif katalitik bölgedeki rezidülerin konfigürasyonunun bile allosterik olarak etkilenmesine yol açmaktadır.

AAA+ süper ailesi üzerinde yapılan dizileme ve yapısal analiz çalışmaları sonucu, ailenin çok eski kökenli ve korunmuş olduğu gösterilmiştir. Yapılan filogenetik çalışmalar AAA+ süper ailenin çok sayıda, farklı, küçük aileye ayrıldığını göstermektedir. Bu aileler birçok hücresel yolağın yürütülmesinde önemli ve etkin bir rol oynamaktadır. Bu yolakların en önemlilerinden biri de protein döngüsüdür ve ATP bağımlı proteazlar tarafından yönetilmektedir.

1.2. ATP-Bağımlı Proteazlar

ATP-bağımlı proteazların en büyük ortak özellikleri evrensel olmalarıdır. Buna karşın evrimsel köken ve homoloji olarak birbirlerinden oldukça farklıdırlar. Proteolitik aktif çekirdek domainleri farklı ailelere üyedirler. Proteozom ve HsIV N-terminal nükleofil hidrolazlardır, ClpP serin proteaz ailesine aittir ve FtsH çinko-metalloproteazdır. Farklı tip canlılarda ve hücre içinde farklı bölgelerde bulunan tüm bu proteazların ATPaz domaini ise AAA+ ATPaz ailesine aittirler (Tablo 1).

Tablo 1.1. ATP Bağımlı Proteazlar (Schmidt ve ark. 1999)

FtsH Proteaz i-AAA (Yme1)	Bakteriyel iç zar Organizma/Yerleşim Bakteriyel iç zar	1 Gen 1 Sayısı
Proteozom m-AAA	Ökaryotik sitoplazma ve nukleus Bakteriyel iç zar	> 32 2
HsIV (Yta10- ClpAP Yta12)	Bakteriyel Sitoplazma	2
ClpXP	Bakteriyel Sitoplazma	2
ClpCP	Bakteriyel Sitoplazma, Kloroplast Stroması	2
Lon (La)	Bakteriyel Sitoplazma	1
PimI (Lon)	Mitokondriyel Matriks	1

S Prot

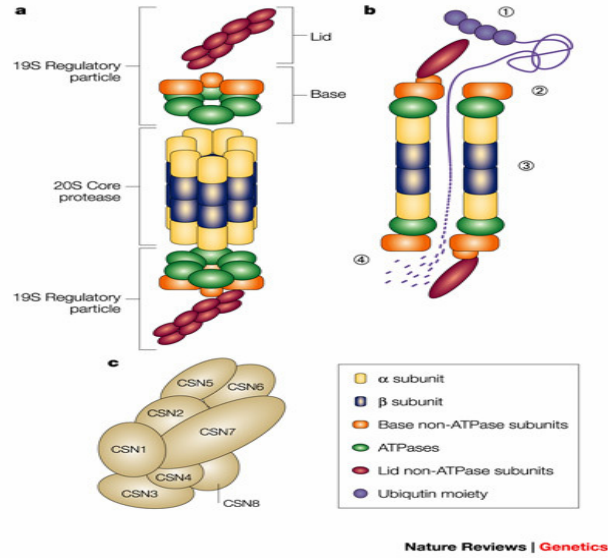
1.2.1. 26 S Proteozom

Ökaryotlarda bulunan 26S proteozom, bilinen en büyük ATP-bağımlı proteazdır. Sitoplazmada ve nükleusta bulunan ökaryotik proteazomlar “ubikuitin ile konjuge olmuş” ya da olmamış proteinlerin yıkımını katalize eden multikatalitik proteaz kompleksleridir. İlk zamanlarda proteozomun 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 proteozomun birçok hücresel süreçte merkezi ve vazgeçilmez bir öneme sahip olduğu ispatlanmıştır.

Yaklaşık 2600 kDa büyüklüğünde olan 26S proteozom, silindirik şekilli proteolitik çekirdeği oluşturan 20S proteozom (700 kDa) ve poliubikitine bağlanmayı sağlayan enerji bağımlı 19S düzenleyici kompleksten (900 kDa) oluşur (Ciechonover, 1994; Coux ve ark., 1996; Baumeister ve ark., 1998) (Şekil1.2.). 20S kompleksin daha basit yapısal organizasyonu birçok Arkeal bakterilerde ve Gram (+) *Actinomycetes*'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 *Thermoplasma acidophilum* 20S proteozomu, birbirine bitişik yedi üyeli dört halkadan meydana gelmektedir. 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 proteozomun 19S kompleksinin ATPaz altbirimleri, birer AAA⁺ alt-ailesi üyesi olup, proteozomun, substrat

proteinlere kovalent bağlanan poliubikitin zincirlerini tanıması yoluyla substratın belirlenmesi, katlanmaların açılması ve substratın proteolitik bölgeye taşınmasından sorumludur (Groll ve ark.,2005).



Şekil 1. 1. 26S Proteazom (Sullivan ve ark. 2003)

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

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)

1. 2. 2. Clp (Ti) Proteaz

E. coli ClpAP ve ClpXP kompleksleri, fizyolojileri ve çalışma mekanizmaları en iyi karakterize edilen ATP-bağımlı proteazlardır. Lon proteazdan farklı olarak proteaz aktif bölgesi ve ATPaz rezidüsü farklı alt birimlerde bulunmaktadır (Gottesman S., 1996). ClpA, Hsp100/Clp ailesine ait 84 kDa büyüklüğünde iki korunmuş ATP bağlanma motifine sahip bir ATPaz iken, ClpP 21 kDa'luk alt biriminde proteolizis aktif bölgesi taşıyan, katalitik üçlüye (Ser⁹⁷, His¹²² ve Asp¹⁷¹) sahip bir Serin proteazdır (Wang ve ark., 1997). ClpP, her biri 7 alt-üniteli iki halkadan oluşmaktadır. ClpA, ATP yokluğunda trimer iken, ATP varlığında ise 6 alt birimden oluşan tek bir halka oluşturmaktadır. Mutasyonel analizler ilk ATP bağlanma bölgesinin ClpA'nın hegzamer oluşumuyla ilişkili olduğunu, ikinci ATP bağlanma bölgesinin ise ATPaz aktivitesi için gerekli olduğunu göstermiştir. ClpA'da ki iki ATP bağlanma bölgesi de ClpA/ClpP kompleksinin oluşumunda gerekli görünmektedir (Chung ve ark., 1997).

ClpAP ve ClpXP proteazlar, birkaç hücrel aktiviteden sorumludurlar ve farklı substrat özgülüklerine sahiptirler (Dougan ve ark, 2002). ClpP, *E. coli*'nin sporulasyon safhasında hayatta kalması ve bazı hücrel protein miktarlarının düzenlenmesinde işlevşeldir. Farklı canlılarda ClpP'nin hücre döngüsünün G1 fazından S fazına geçişi gibi çeşitli fizyolojik süreçlere katıldığı bilinmektedir (Weichart ve ark., 2003).

ClpP proteaz geni insan genomunda 19. kromozomda yerleşmiştir ve mitokondriyal matrikste görev yapmaktadır. Olgun insan ClpP proteazında enzim mitokondriye ulaşınca N-terminal bölgesinden mitokondriye yönlenmesini sağlayan 59 rezidülük sinyal dizisi kesilir. İnsan olgun ClpP'si *E.coli* 'deki homoloğu ile yüksek oranda (% 56) dizi benzerliği göstermektedir.

Bitkiler ClpP'nin birçok kopyasını taşırlar. Yalnızca *Arobidopshis thaliana* on farklı ClpP benzeri proteaz taşımaktadır. Bu enzimlerin birçoğu kloroplast stromasında yerleşmiştir.

1.2.3. FtsH

FtsH, aktif merkezinde Zn^{2+} içeren ATP-bağımlı bir metalloproteazdır (Akiyoma ve ark., 1995). FtsH proteazlar diğer ATP-bağımlı proteazlardan farklı olarak membrana demirlemiştir ve 6 üyeli tek bir halkasal formdan oluşmaktadır. *ftsh* geni tarafından kodlanan ve yaklaşık 70 kDa ağırlığında olan bu proteazlar özgül olarak membran içersinde yer alan proteinlerin ve sitoplazmik proteinlerin yıkımında yer almaktadır (Herman ve ark. 1993, Tomoyosu ve ark., 1995, Herman ve ark., 1997).

FtsH, *E. coli* 'de HflK ve HflC membran proteinlerine bağlı ve YccA ile geçici olarak birleşen bir membran proteini olarak rapor edilmiştir (Kiara ve ark. 1998). FtsH proteazlar faj enfeksiyonu sırasında faj λ CII proteinlerinin seviyesinin düzenlenmesinde yer almaktadır ve en önemli fonksiyonları ısı şoku ile uyarılan *E. coli* transkripsiyon faktörü σ^{32} 'nin yıkımıdır (Herman ve ark. 1993, Shotlan ve ark., 1997, Tomosoyu ve ark. 1995). FtsH aynı zamanda *E. coli*'de temel translokasyon altünitesi olan SecY'ın kompleks olmayan formlarının yıkımında yer almaktadır (Akuyama ve ark. 1996).

Prokaryotlarda ve ökaryotların mitokondri ve kloroplast ile ilişkili bölgelerinde yaygın olarak bulunmaktadır. *A. thaliana* 12 farklı FtsH proteaz homologu taşımaktadır. Bunlardan 3'ü mitokondride bulunurken, 9 tanesi kloroplastta bulunmaktadır. FtsH proteaz solmuş fidelerde birikmemesine rağmen, bir çok FtsH

geninin ekspresyonu yüksek ışık yoğunluğuna maruz kalınmasını takiben artmıştır (Synvani ve ark. 2004, Nakabayashi ve ark 1999).

FtsH mutantları birçok değişik fenotip yansıtmıştır. FtsH2 mutantları en farklı fenotipik değişiklikleri gösteren mutantlardır (Takechi ve ark. 2000, Jhen ve ark. 2000). Ayrıca bu mutantlar foto inhibisyona aşırı hassasiyet gösterirler. FtsH 5 mutantları aynı arızaları daha hafif olarak gösterirken FtsH1 ve FtsH8 mutantları ise yaban tip bitkilerden farklı bir fenotip göstermemektedir. (Sakamoto ve ark. 2002, 2003)

In-vitro çalışmalar tilakoid FtsH'ın birleşmemiş proteinlerin yıkımında rol oynadığını önermiştir (Osterzetser ve Adam 1997). Ayrıca foto sistem II reaksiyon merkezinde yer alan D1 proteininin foto inhibisyon sonrası onarılmasında rol aldığı gösterilmiştir (Lindhal ve ark 2000). Farklı FtsH mutantları ile yapılan *in vivo* çalışmalar bu önerileri destekler sonuçlar vermiştir. Tam olarak açık olmamak ile birlikte FtsH proteazlarının doğrudan ya da dolaylı olarak tlakoid yapısının oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir (Sakamoto ve ark. 2002, S. Bailey ve ark. 2002).

1.2.4. HsIVU

İlk olarak *E. coli*'de bulunan ATP-bağımlı proteaz HsIVU, ökaryotik 26S proteazoma homoloji göstermesi nedeniyle proteazomun analogu olarak kabul edilmektedir (Seemuller ve ark., 1995, Missiaka ve ark., 1996, Rohwild ve ark., 1996, Yoo ve ark., 1996). HsIVU, peptidaz aktivitesine sahip HsIV ve ATPaz ve şaperon aktivitesine sahip HsIU bileşenlerinden oluşan ATP-bağımlı bir proteazdır (Chung ve ark., 1993). ClpQY yada CodWX olarak da isimlendirilen ATP-bağımlı proteaz çok ilginç olarak ökaryotik proteazoma benzerlik göstermektedir ve bu sebeple 26S proteazomun analogu olarak kabul edilmektedir (Gille ve ark. 2003).

HslV temel gen dizisi, arkeal ve ökaryotik 20S proteazomun proteolitik core β -tipi altünitesine oldukça benzerlik göstermektedir (Chuang ve ark., 1993, Seemüller ve ark., 1996, de Mot ve ark., 1999). Bununla beraber HslV, 20S proteazom β -tipi altünitelere gibi, N-terminalinde iki korunmuş treonin rezidüsüne sahiptir (Seemüller ve ark., 1996). dır (Yoo ve ark., 1997). HslU, Clp/Hsp100 protein ailesinin üyesi olan bir ATPazdır ve şaperon aktivitesi göstermektedir (Seol ve ark., 1997, Nuewald ve ark., 1999, Seong ve ark.,2000). Diğer taraftan HslU'nun, AAA-ATPaz ailesinin bir üyesi olduğu tespit edilmiştir. Bu sebeple HslU, AAA-ATPaz ailesine ait 6 bileşen içeren proteasomal 19S düzenleyici kapağın taban kısmı için kullanışlı bir model sistem oluşturmaktadır (Glickman ve ark., 1998).

Yapılan çalışmalar HslU tek başına ATPaz aktivitesine sahipken, HslV'nin tek başına zayıf bir proteaz olduğunu, N-Carbobenzoxy (CBZ)-Gly-Gly-Leu-7-amido-4-methyl-coumarin (AMC) gibi belirgin florogenik hidrofobik peptitleri ve aynı zamanda insulin β -zinciri ve kazein gibi polipeptitleri yavaşça yıkıma uğrattığını göstermiştir, ancak ATP varlığında HslU ATPaz, HslV'yi, proteolitik aktivitesini 20 kat güçlendirecek şekilde uyarmaktadır (Yoo ve ark., 1996, Rohrwild ve ark., 1996, Seol ve ark., 1997). HslVU proteazın, hücre bölünmesi inhibitörü olan SulA (Cordell ve ark., 2003), sıcaklık şoku faktörü σ^{32} (Kanemori ve ark.1997) ve transkripsiyon aktivatörü ResA (Torres-Cabassa ve Gottesman, 1987) gibi kısa yaşam süreli proteinlerin proteolizinde yer aldığı bilinmektedir.

1.2.5. Lon

La olarak da adlandırılan ve ilk olarak *E. coli* de tanımlanan Lon proteazlar arkeadan insana kadar bütün organizmalarda bulunmuş yegâne ATP-bağımlı proteazlardır. (Swamy ve ark., 1981, Goldberg ve ark., 1981, Charette ve ark. 1981). Lon adı lon genini

kaybeden *E. coli* hücrelerinin hücre bölünme bozukluğu gösteren ve yabani tip emsallerinden daha uzun olan mutant fenotipinden almıştır (Howerd-Flanders ve ark. 1964). Keşfedildiğinden günümüze kadar geçen zamanda süresince yapılan çalışmalar Lon'un hem bakterilerde hem de mitokondride, normal şartların devamlılığı, protein kalite kontrolü ve metabolik düzenlemeler için temel olan bir proteaz olduğunu göstermiştir (Suzuki ve ark., 1997, Dyck ve Langer, 1999).

1.2.5.1 Lon Yapısı

Lon proteaz ile *E. coli*'de tanımlanmasını takiben yapılan çalışmalar sonucu proteazın yıkımın enerji bağımlı bir süreç olduğu ve ATP'ye ihtiyaç duyduğu ortaya konulmuştur (Waxman Ve Goldberg 1982). Dizi analizi homolojilerine göre Lon proteazlar, diğer ATP-bağımlı proteazlarda olduğu gibi AAA+ protein süperailisine (ATPase associated with diverse cellular activities) aittir ve bu ailenin üyeleri DNA replikasyonunda, transkripsiyonda, membran füzyonunda ve proteolizisde yer almaktadır (Neuwald ve ark. 1999, Ogura ve Wilkinson 2001, Lupas ve Martin ve ark., 2002).

Ec	Hs	Mm	At	Ce	Dm	Sc	Ta	Ss	Bs	Li	Mt	Ml	Mge	Mpe	Mpn	Mpu
Lon (8e-04)	sms (e-139)	pLon (e-140)	Lon (e-144)	nLonm (e-136)	mLon (e-148)	LD30525 (e-133)	PIM1 (6e-20)	Lon (0.0)	LonA				Lon (e-157)	Lon (e-169)	Lon (e-161)	Lon (e-147)
b0955 (0.005)	Lonlike (e-138)	mLon (e-137)	Lonl (e-137)	Lon (e-115)	CD8798 (e-127)											
	mLon (e-138)	mLonl (2e-95)	mLon (e-136)													
	mLonl (e-136)		Lon (e-120)													
	Lon- plantlike (e-134)		Lonlike (6e-89)													

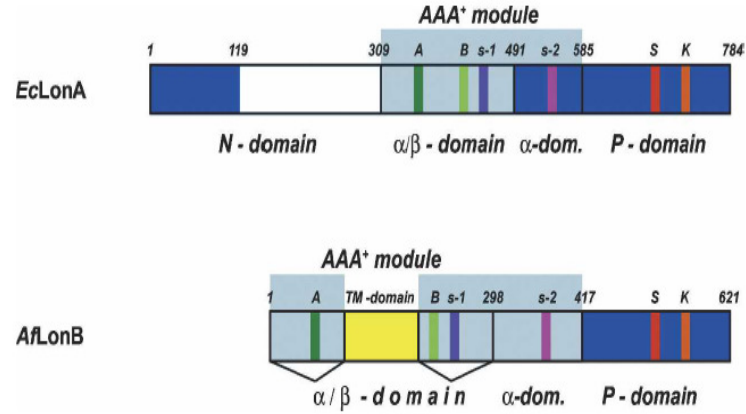
Şekil 1.2. Farklı türlerdeki Lon proteazlar ; Ec, *Escherichia coli*; Hs, *Homo sapiens*; Mm, *Mus musculus*; At, *Arabidopsis thaliana*; Ce, *Caenorahditis elegans*; Dm *Drosophila melanogaster*; Sc, *Saccharomyces*

cerevisiae; Ta, *Thermoplasma acidophilum*; Ss, *Sulfolobus solfataricus*; Bs, *Bacillus subtilis*; Ll, *Lactococcus lactis*; Mt, *Mycobacterium tuberculosis*; Ml, *Mycobacterium leprae*; Mge, *Mycoplasma genitalium*; Mpe, *Mycoplasma penetrans*; Mpn, *Mycoplasma pneumoniae*; Mpu, *Mycoplasma pulmonis* (Chandu ve Nandi, 2004).

Lon proteaz, hetero-oligomer oluşturan diğer ATP-bağımlı proteazlardan farklı olarak her bir polipeptidi hem ATPaz hem de proteaz domaini içeren homo-oligomer yapısındadır. Lon proteazın oligomerik durumu kesin olmamakla beraber *E. coli* 'de 4'lü ya da 8'li (Goldberg ve ark. 1994), *Mycobacterium* ' da 4 ile 6 arasında (Roudiak ve Shrader, 1998, Rudyak ve ark. 2001), maya mitokondrisinde 6'lı ya da 7'li (Rudyak ve ark. 2001), *Brevibacillus thermoruber*'de 6'lı alt birimden (Lee ve ark., 2004) oluştuğu belirtilmiştir.

Lon proteazda, her alt birim temel olarak üç “domain” içerir; N- terminal “domain” (N domain), ATPaz “domain” (A Domain), proteolitik “domain” (P Domain) Lon proteazlar, “domain” sayısındaki farklılık ve “domain”lerdeki karakteristik diziler temel alınarak iki yan-aileye ayrılmaktadırlar, Lon A ve Lon B. Lon A enzimler büyük bir N-terminal “domain” içerirken (örn. *Esherichia coli*, *Thermus thermophilus* Lon protease), Lon B enzimler N “domain”e sahip değildirler fakat proteini membranın sitoplazmik yüzeyine demirleyen, membrana köprü ayağı vazifesi gören bir “domain”e sahiptir (*Thermoplasma acidophilum* Lon proteaz) (Amerik ve ark. 1991, Goldberg ve ark. 1994, Roudiak ve ark. 1998, Maupin-Furlow ve ark. 2000, Rotanova ve ark. 2004, Maehara ve ark. 2008) (Şekil 1.2) . *E. coli* Lon N “domainin” protein bağlama yeteneğine sahip olduğu görülmektedir. 107 N-terminal rezidüsünü kaybeden *E. coli* Lon proteazın *in vitro* protein yıkım aktivitesi kesin olarak azalmıştır (Rosulova ve ark. 1998). Benzer şekilde 90, 225 ya da 277 N-terminal rezidüsünü kaybetmiş *Mycobacterium smegmatis*

Lon proteaz tamamı ile proteolitik aktivitesini kaybederken, oligomerik durumda değişme gözlenmiştir (Lee ve ark. 2004). Ebel ve arkadaşlarının (1999) N-terminal domainin substrat ile ilişkisinin belirlenmesini sağlayan *E. coli* Lon mutant çalışmasında proteazın substrat özgülüğünün değiştiğini belirtmişlerdir.



Şekil 1.3. Lon A ve Lon B ailelerinin temel özelliklerini gösteren şematik diyagram. Lon A *E.coli*, Lon B *A.fulgidus*. Walker A ve B motifleri yeşil ile gösterilmiştir. Katalitik aktif bölgeyi gösteren Serin (S) ve Lizin (K) rezidüleri kırmızı ve turuncu ile gösterilmiştir. Sensör 1 (s-1) ve sensör 2 (s-2) mavi ve mor ile gösterilmiştir. Lon B ye ait membran bağlanma bölgesi sarı ile gösterilmiştir (Rotanova ve ark. 2006).

Her iki yan-aile, tipik AAA+ modülünü içeren ATPase (A) “domain”e sahiptir. Karakteristik AAA+ “domain”i, bu “domain”i karakterize eden Walker A ve B motifleri ve diğer oldukça korunmuş dizilere sahip bölgeleri içeren 220-250 amino asitten oluşmuştur (Neuwald ve ark. 1999). Sensör 1, nükleotid bağlanmasında yer alan korunmuş polar rezüsüdür. Bununla beraber sensör 1 mutasyonunun ATPaz aktivitesini etkili bir şekilde bozduğu gösterilmiştir ve katalitik rolü olduğu önerilmiştir (Saraste ve ark., 1990, Besche ve ark., 2004). ATPaz (A) “domain”in C-terminali, sensör 2 ya da

“sensör ve substrat ayırt eden domain” (SSD)” olarak gösterilmiştir (Neuwald ve ark. 1999, Smith ve ark., 1999). ATPaz hidrolizine yanıt olarak bu “domain” ler konformasyonel ve oryantasyonel değişikliğe gitmektedir.

E.coli_Lon	PDFYEKRDIHVHVEGATPKDGP	SAGIAMCTALVSLCTGNPVRADVAMTGEITLRGQVLP	PIGGLKEKLL-----AAHRGGI	731	
B.subtilis_LonA	PDFHEKYDINHVEGAVPKDGP	SAGITMTALVSLTGRAVSRVEMTGEITLRGRVLP	PIGGLKEKAL-----GAHRAGL	729	
M.pneumoniae_Lon	PNLFKKVDINHVPGGGIPKDG	PSAGAALVTAIISLSTGKKVDPKIAMTGEITLRGKVT	PIGGVKEKTI-----SAYRGGV	754	
M.genitalium_Lon	PSLFKKIDINHVPGGGIPKDG	PSAGAALVTAIISLSTGKKVDPTVAMTGEITLRGKVL	PIGGVKEKTI-----SAYRGGV	754	
M.penetrans_Lon	PKIFGEIDLHVHVPSSGIPKDG	PSAGIALTTAILSALKNVKIPSNVAMTGEITLRGRVLI	IGGVKEKTI-----SAYRGGV	740	
M.pulmonis_Lon	DFDNENNSIHVEGATPKDGP	SAGVTFTTAAIISALTKKKVSPLVGMTGEITLRGKVL	PIGGLKEKSI-----AANKFGI	799	
M.musculus_Lon	FDLLDNTDIHLHVPAGAVTKDG	PSAGVTIVTCLASLPSGRLVRS	SDVAMTGEITLRGLVLPVGGIKDKVL-----AAHRAGL	795	
M.musculus_mLon1	FDLLDNTDIHLHVPAGAVTKDG	PSAGVTIVTCLASLPSGRLVRS	SDVAMTGEITLRGLVLPVGGIKDKVL-----AAHRAGL	375	
H.sapiens_pLon	FDLLDNTDIHLHVPAGAVTKDG	PSAGVTIVTCLASLPSGRLVRS	SDVAMTGEITLRGLVLPVGGIKDKVL-----AAHRAGL	795	
H.sapiens_Lon-plant1	FDLLDNTDIHLHVPAGAVTKDG	PSAGVTIVTCLASLPSGRLVRS	SDVAMTGEITLRGLVLPVGGIKDKVL-----AAHRAGL	658	
H.sapiens_mLon1	FDLLDNTDIHLHVPAGAVTKDG	PSAGVTIVTCLASLPSGRLVRS	SDVAMTGEITLRGLVLPVGGIKDKVL-----AAHRAGL	524	
A.thaliana_Lon1	MNVLDGRDIHVEGAVPKDGP	SAGVTLVTALVSLFSQKRV	RADTAMTGEMTLRGLVLPVGGIKDKIL-----AAHRYGI	504	
H.sapiens_Lonlike	NDYLVTSIHHLHVEGATPKDGP	SAGCTIVTALLSLAMGRPVRQNLAMTGEVSL	TGKILPVGGIKEKTI-----AAKRAGV	793	
H.sapiens_mLon	NDYLVTSIHHLHVEGATPKDGP	SAGCAIVTALLSLAMGRPVRQNLAMTGEVSL	TGKILPVGGIKEKTI-----AAKRAGV	910	
M.musculus_mLon	NDYLVTSIHHLHVEGATPKDGP	SAGCTIVTALLSLALGQVPLQNLAMTGEVSL	TGKILPVGGIKEKTI-----AAKRAGV	896	
D.melanogaster_LD30525	NLFLEQEHHLHVEGATPKDGP	SAGITITITALLVSLATGKPVQRDIAMTGEVSL	KGKVLVPGGIKEKTI-----AARRSGV	758	
D.melanogaster_CD8798	NLFLEQEHHLHVEGATPKDGP	SAGITITITALLVSLATGKPVQRDIAMTGEVSL	KGKVLVPGGIKEKTI-----AARRSGV	932	
C.elegans_mLon	NKFFDKAHIHVEGATPKDGP	SAGVTLVSLLSLALDRPVVQDMAMTGEISL	TGKVLVPGGIKEKVI-----AARRVGA	930	
A.thaliana_nLonm	NQFFANSKLHLHVPAGATPKDGP	SAGCTMITSLLSLATKPKVRKDLAMTGEVTL	TGRILPIGGVKEKTI-----AARRSQI	894	
A.thaliana_mLon	NQFFANSKLHLHVPAGATPKDGP	SAGCTMITSLLSLATKPKVRKDLAMTGEVTL	TGRILPIGGVKEKTI-----AARRSQI	384	
A.thaliana_Lon	NLFFANSKLHLHVPAGATPKDGP	SAGCTMITSLLSLATKPKVRKDLAMTGEVTL	TGRILPIGGVKEKTI-----AARRSQI	880	
A.thaliana_LonLike	NKLFANSKLHLHVPAGATPKDGP	SAGCTMITSLLSLALKPKVRKDLAMTGEVTL	TGRILAIGGVKEKTI-----AARRSQV	898	
S.cerevisiae_PIM1	NRFFEKASIHLCPEGATPKDGP	SAGVTMTSFLSLANKSIDPTVAMTGEITL	TGKVLRIIGGLREKAV-----AAKRSQA	1067	
C.elegans_Lon	--TLEDQDIHVHVPAGAVNKDGP	SAGTGLACALVSLATNIPLRSDAVTGEISL	TGHVLPVGGVKEKVL-----AAQREGL	724	
B.subtilis_LonB	GMPKPSYDIHINFPGG-IPIDG	PSAGIAMAAGIFS	AIHKIPIDNTVAMTGEISLNLVLPVGGVTA	KVE-----AAKQSGA	497
T.acidophilum_Lon	-----MDIHIQVFGTYEGVEG	PSASVS	IATAVISAIENIPVDQSVAMTGSLSVRGDVLPVGGVTA	KVE-----AAIEAGL	577
E.coli_sms	GLQMDQDVFNVVGKVTET-SADL	LALLAMVSSLRDRPLPQDLVVPGEVGLAGEIR	VPVSGQERIS-----EAAKHGF	424	
E.coli_b0955	-----FSASLTPEQSYSEVDG	DSASMAELCALISALADVPVNVQ	SIATGSVDQFGRAPVGGVLEKIEGFFAICQQREL	TGK	497

Şekil 1. 4. Korunmuş Serin-Lizin Katalitik ikilisinin farklı türlerdeki yerleşimi (Chandu ve Nandi, 2004)

Bu değişikliğin, “domain”in hedef proteine bağlanması, katlanmalarının açılması, bağlantılı fonksiyonel proteolitik “domain”e yönlendirme ve bu bölge ile eşgüdümlü aktivasyon gibi fonksiyonları yapacak hareket gücünü sağladığı düşünülmektedir (Wickner ve ark. 1999, Zwickle ve ark. 2000, Lupas ve Martin, 2002).

Lon proteazlar serin proteaz olmakla birlikte ne Lon A ne de Lon B, P-“domain”lerinin amino asit dizileri klasik katalitik Ser-His-Asp üçlüsü içeren serin proteazlar ile ya da diğer proteazlar ile homoloji gösterirler (Amerik ve ark., 1988, Goldberg ve ark., 1994,

Rotanova ve ark., 2004). Rotanova ve arkadaşlarının *E. coli* 'de yaptığı kapsamlı mutagenез çalışmaları (2004) ve onları destekleyen Botos ve arkadaşlarının *E. coli* Lon proteazı P-“domain”i üzerine yaptıkları yüksek çözünürlüklü kristal yapı çalışmaları (2004) sonucunda Lon proteazların aktif bölgelerinde Serin-Lisin katalitik ikiliye sahip oldukları belirlenmiştir (*E. coli* Lon Ser679 ve Lys722). *E. coli* Lon proteaz aktif serin rezidü 679'un bilinen serin proteazlarda bulunmayan, ‘KDGPSAG’ korunmuş bir fragmanda yer aldığı bulunmuştur.

1.2.5.2. Lon'nun Fizyolojik İşlevleri

Stres proteinleri olarak bilinen Lon, ısı şoku ve diğer stres durumları gibi olumsuz koşullara yanıt olarak uyarılmaktadır. *E. coli* Lon proteaz, yüksek ısı şoku şaperon sistemi DnaK/DnaJ/GrpE ile beraber anormal proteinlerin hızlı yıkımına katkıda bulunmaktadır (Grossman ve ark. 1983). Rapor edilen bir çok çalışmada (örneğin, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* ve *Streptomyces lividans* gibi türlerde) *lon* geninin ısı şoku regulonuna ait olduğu rapor edilmiştir (Philips ve VanBogelen, 1984, Riethdorf ve Volker, 1994). Bununla birlikte, *lon* genin sıcaklıkla uyarımı genel bir özellik değildir; *Myxococcus xanthus*'un (LonV) iki *lon* geninden birisi ve *Bacillus brevis* ve *Brevibacillus thermoruber* WR-249' da olduğu gibi, ısı şoku ile uyarılmayan *lon* genlerine örnektir (Ito ve ark. 1992, Tojo ve ark. 1993).

Bakteriyel türlerde ısı şoku genlerinin düzenlenmesi hem pozitif hem de negatif kontrol mekanizmaları altındadır. *E.coli*' de ısı şoku genlerinin aktivasyonu δ^{32} adlı faktör ile sağlanmaktadır. Normal koşullarda δ^{32} DnaK şaperon sistemi ve başta FtsH olmak üzere proteazlar ile kararlı olmayan bir formda tutulur. Isı şoku ile birlikte hücredeki kararlı olmayan protein miktarının artması ile faktör kararlı hale gelir ve genler anlatım yapmaya başlar. Bu tür bir pozitif kontrol, genel olarak prokaryotlar da bulunan bir özellik

değildir. Prokaryotlardaki ısı şoku genleri çoğunlukla gen üstündeki özelleşmiş baskılayıcılar ile negatif olarak kontrol edilir. *S. lividans lon* geni HspR (Heat shock protein regülör) / HAIR (HspR-associated-inverted-repeat) regülonuna aittir. Normal koşullar altında bu regülon DnaK ve HspR baskılayıcı tarafından oluşturulan kompleks tarafından negatif olarak kontrol edilir. Isı şokunu takiben DnaK kararlı olmayan proteinleri hedef alarak yapıdan ayrılır ve kompleks bozulur. Bunun sonucu olarak HspR'ın iplikten düşmesi üzerine regülon anlatım yapmaya başlar.

Lon aktivitesinin bir diğer düzenlenme mekanizması ise özgül- inhibitörler ile onun proteolitik aktivitesini etkilemekten geçmektedir. Örneğin, *E. coli* nin T4 fajı ile enfektesini izleyen ilk bir kaç dakikada bakteri hücresinde anormal proteini yıkımı durur. Bu olayın sebebi faj tarafından kodlanan bir protein olan PinA nın Lon aktivitesini inhibe etmesidir. (Simon ve Randolph, 1983) PinA infekte özelliğini direkt olarak Lon üzerinden yürütür ve enzimin ATPaz bölgesine bağlanarak onu inhibe etmektedir (Hillard ve ark., 1998).

Bununla beraber Lon proteazların, gen ekspresyonunu kontrol eden kritik düzenleyici proteinlerin mevcudiyetini kontrol ederek, önemli düzenleyici fonksiyonlara sahip olduğu gösterilmiştir. Örneğin, hücre bölünme inhibitörü olan SulaA'yi yıkıma uğratarak *E.coli* 'de SOS yanıtının düzenlenmesinde rol alırlar. SulaA, DNA yıkımı sırasında sentezlenen hücre bölünmesi sırasında sentezlenen hücre bölünme inhibitörüdür. Lon mutantlar UV ışınlarına karşı hassastırlar. UV ışınlarına maruz kalınmasını takiben SulaA indüklenip temel hücre bölünme proteini olan FtsZ ile etkileşerek hücre bölünmesini bloke eder. (Scoemaker ve ark. 1984, Huisman ve ark., 1984). Lon proteazlar kapsüler polisakkaritlerin biyosentetik genlerinin transkripsiyonal aktivatörü olan RcsA'nın yıkımı ile de kapsüler polisakkarit üretimine katılırlar (Torres-Cabassa ve Gottesman, 1987). Son yıllarda *E. coli* Lon proteazın inorganik

polifosfat (polyP) varlığında yeni bir substrat olarak ribozomal S2 proteini yıkıma uğrattığı belirlenmiştir (Kuroda ve ark. 2001, Nishii ve ark. 2005).

Lon aynı zamanda DNA–bağlanma proteini olarak davranmaktadır (Chung ve Goldberg, 1982, Charette ve ark. 1984, Fu ve ark. 1996). ATPaz (A) domainin C-terminali, sensör 2 ya da “sensör ve substrat ayırt eden domain (SSD)” olarak gösterilmiştir (Neuwald ve ark. 1999, Smith ve ark., 1999). Lee ve arkadaşlarının (2004) *Brewibacillus thermoruber* Lon proteaz ile yaptığı çalışmada ATPaz domainin SSD yan-bölgesinin DNA bağlanması için yeterli olduğu gösterilmiştir. Bakteriyel Lon proteazın enzimatik aktivitesi ve DNA bağlanması arasındaki ilişkisi ile ilgili çeşitli gözlemler rapor edilmiştir. Bu çalışmalardan bir tanesinde, plazmit ve bakteriofaj gibi büyük DNA moleküllerinin varlığının, Lon proteazın ATPaz aktivitesini artırdığı gösterilmiştir (Chung ve Goldberg, 1982). Buna karşın farklı bir çalışmada DNA, ATP hidrolizini uyarmış ancak proteoliz aktivitesini inhibe etmiştir (Charette ve ark., 1984). Bu çalışmalar göz önüne alındığında prokaryotik Lon proteazın DNA’ya bağlanması, ATP hidrolizi, proteolizis arasındaki ilişki henüz net değildir. Bundan başka, bakterilerde ve mayada yapılan *in vivo* çalışmalar, Lon proteazın ya transkripsiyon faktörlerini uyararak ya da mRNA transkriptinin stabilitesini etkileyerek gen ekspresyonunun kontrolünde yer aldığı öne sürmektedir (Gill ve ark. 1993, Schmidt ve ark., 1994).

1985’de florojenik peptidler ile ATP ve Mg^{+2} varlığında yapılan çalışmalar, ATP hidrolizi sonucu substrat protein ve enzim üzerinde bir fosfatlanma olmadığı, hidroliz sonucu ortaya çıkan enerjinin enzimin üç boyutlu yapısını değiştirdiği bulunmuştur. Ayrıca 10 kDa’dan küçük proteinlerin ATP varlığına ihtiyaç duyulmaksızın yıkılabildiği ortaya konulmuştur (Waxman ve Goldberg, 1985).

1986 yılında *E. coli* dışında Lon proteaz ilk olarak *Salmonella typhimurium*'da çalışılmıştır. Yapılan mutasyon çalışmaları sonucunda *E. coli* Lon proteaza benzer sonuçlar alınmıştır (Downs ve ark., 1986).

lon geni diğer bir bakteri *Bacillus brevis*'den klonlanmış ve karakterize edilmiştir. 773 amino asitten oluşan ve 87.4 kDa olan *B. brevis* Lon proteazın, *E. coli* Lon proteaz ile % 54 dizi benzerliği gösterdiği bulunmuştur. *B. brevis lon* geni *B. subtilis*'in temel RNA polimerazı tarafından tanınmaktadır ancak *E. coli* 'deki ısı şoku promotoruna benzerlik gösteren diziler göstermemektedir (Ito ve ark. 1992).

lon geni diğer bir *Bacillus* türü olan *B. subtilis*'den klonlanmıştır. *lon* geni 774 amino asitten oluşan 87 kDa protein kodlamaktadır ve ATP-bağımlı Lon proteaz, *E. coli* , *B. brevis* ve *M. xanthus lon* geni ürünleri ile karşılaştırıldığında güçlü bir homoloji göstermektedir (Riethdorf ve ark., 1994).

Lon proteaz geni 1993'de bir gram-negatif toprak bakterisi olan ve kompleks yaşam döngüsü olan *Myxococcus xanthus*'den klonlanmış ve dizi analizi yapılmıştır. *M. xanthus lon* geni, *E. coli* ve *B. brevis lon* genlerine sırası ile % 60 ve 56 dizi benzerliği gösterdiği tespit edilmiştir (Tojo ve ark., 1993). *M. xanthus lon* geni *bsgA*'nın spor oluşumu ve sporulasyon sırasında gen anlatımının düzenlenmesinde önemli rol oynadığı tespit edilmiştir (Gill ve ark. 1993)

Watanebe ve arkadaşlarının 1999 yılında yapmış oldukları çalışmada termofilik bir bakteri olan *Thermus thermophilus* HB8 *lon* proteaz geni klonlanmış, dizilenmiş ve nitelendirilme çalışmaları yapılmıştır. Yapılan dizileme çalışmaları *Thermus thermophilus Lon* geninin (TT-*lon*), *E.coli lon* geni ile %56 homoloji gösteren 2385 bç'lik protein kodlayan bir diziye sahip olduğu ortaya konulmuştur.

T. thermophilus Lon proteaz aminoasit dizisi incelendiğinde, diğer birçok Lon proteazda olduğu gibi bazı korunmuş diziler taşıdığı bulunmuştur. Bunlardan bazıları varsayılan ATP bağlanma bölgesinden hemen önce yer alan bir sistein rezidüsü ve katalitik aktif bölgede yer alan serin rezidüsüdür. TT-*lon* geni yaklaşık 89 kDa'luk bir protein kodlamaktadır. Proteinin saflaştırılmasının ardından ATP, Casein ve flourojenik peptidler ile yapılan aktivite deneyleri sonucunda, proteazın *E.coli*' den farklı olarak optimum çalışma sıcaklığı 70 °C olarak belirlenmiştir. Ayrıca TT-Lon proteaz ile *E.coli* Lon proteaz arasında substrat özgüllüğünde farklılıklar görülmüştür. Tüm bu çalışmalar sonucunda TT-*lon* geninin sıcaklığa dayanıklı bir Lon proteaz kodladığı ortaya konulmuştur (Watanebe ve ark. 1999).

Lon proteaz hipertermofilik bir bakteri olan arkeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1'den klonlanmıştır. 70 kDa ATP-bağımlı arkeal Lon proteaz AAA (ARTI) ailesine ait N-terminal ATPaz domain ve varsayılan katalitik ikiliyi içeren C-terminal proteaz domain'e sahiptir.

Daha sonra yapılan çalışmalar ökaryotik Lon homologlarını belirlemeye yönelik olmuştur. Goldberg ve arkadaşları Lon benzeri ATP-bağımlı proteazların ökaryotlardaki varlığını ilk olarak sıçan karaciğer mitokondrilerinde göstermişlerdir (Goldberg 1992). Maurizi ve arkadaşları ise insan Lon proteaz genini klonlamış ve 106 kDa'luk mitokondriyal bir protein olduğunu ve *E. coli* ve insan Lon proteazları arasında % 58 oranında bir benzerlik olduğunu göstermiştir (Maurizi M. 1994.). *E. coli*'de eksprese edilen mitokondriyal *lon* geni *in vitro*'da bir Lon proteaz substratı olan alfa-kazein'i etkin bir şekilde yıkıma uğratmıştır (Wang ve ark. 1993).

Diğer bir ökaryotik Lon proteaz, *Saccharomyces cerevisiae*'de tespit edilmiştir. Hücre çekirdeğinde *pim1* geni tarafından kodlanan ATP-bağımlı proteazın bakteriyel Lon proteaz ile benzerliği ortaya konulmuştur. 1133 amino asitten oluşan *Pim1* geninin N-terminal

ucunda bir mitokondriyal hedeflenme dizisi taşıdığı tespit edilmiştir *Saccharomyces cerevisiae* de ise 120 kDa Lon proteaz normal mitokondriyal aktivite için zorunlu bir proteindir ve *E. coli*'deki benzeri ile % 60 oranında benzerlik göstermektedir (Van Dyck Al ve ark. 1994).

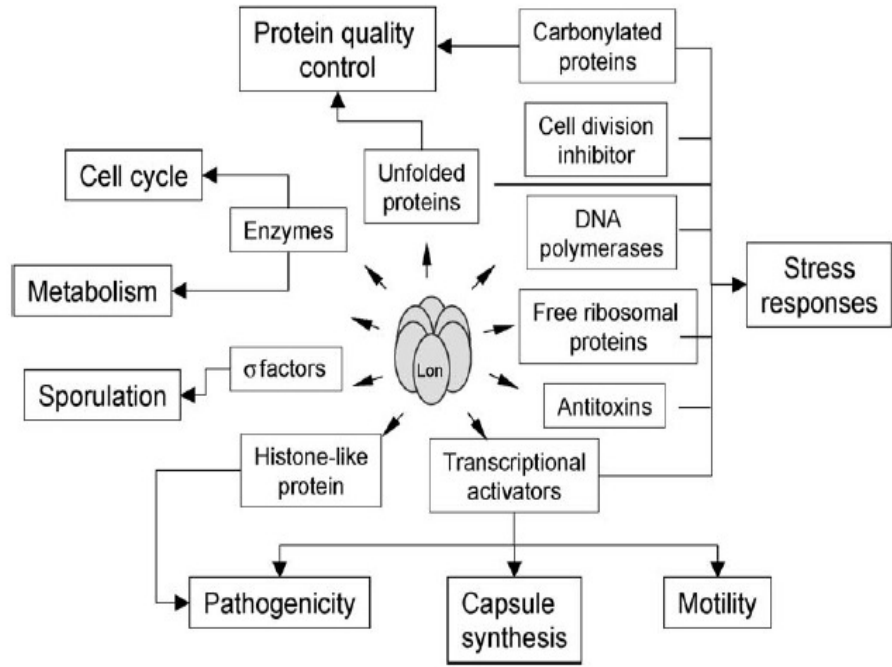
Protein oksidasyonu yaşla bağlı olarak hücrede gerçekleşen oksidatif hasarın en büyük nedenlerinden biridir. Normal yaşlanmanın bir parçası olarak proteinlerin % 30-40'ı oksidasyona uğramaktadır (Davies,1995, Sohal). Mitokondri serbest radikaller ve ilişkili oksidanların hücre içindeki ana kaynağıdır. Hücrede duyarlı oksijen ve nitrojen çeşitleri yaşla beraber mitokondriyal üretimin bir sonucu olarak artmaktadır. Mitokondride yer alan antioksidasyon sistemi, artan oksidasyonun verdiği zararın azalmasında ve tolere edilebilir düzeylere çekilmesinde önemli bir rol oynar. Lon proteaz mitokondriyal matrikste yer alan oksitlenmiş proteinlerin yıkılmasından sorumlu enzim olarak bu sistemin bir parçasını oluşturmaktadır. Lon proteaz ekspresyonunun ve aktivitesinin yaşla beraber azalması, yaşlı ve hastalıklı hücrelerde oksidasyona uğramış proteinlerin birikimi ve agregasyonunun artmasına yol açmaktadır. Tüm bu özelliklerinden dolayı Lon proteaz'ın yaşlılık kaynaklı ya da dejeneratif hastalıkların neden olduğu protein birikmesinden kaynaklanan, zararların onarılmasında anahtar rol oynadığı düşünülmektedir (Ngo ve. Davies, 2007).

Bazı bakteri türlerinde Lon proteazın mutant olduğu durumlarda hücresel kusurlara yol açtığı bilinmektedir. Örneğin, *E. coli* Lon mutant hücrelerde, anormal proteinlerin birikimi, Lon proteazın katları açılmamış protein yıkımında yer alan temel protein olduğunu göstermiştir (Maurizi ve ark. 1985). Bununla beraber UV ışığına karşı aşırı duyarlılık, mukoidi, ipliksi büyüme ve bazı bakteriofajların lizojenitesinde hasar yaratmaktadır (Gottesman ve Mauriz, 1992).

Lon genleri genel olarak yaşayabilirlik için gerekli genler değildir. Yoklukların da hücre içinde yanlış katlanmış protein birikimi meydana gelir bu da onların katlanmamış protein yıkımında ana rollerden birini oynadığını gösterir. Buna rağmen Lon genlerinin yaşam için ana etken olduğu durumlarda vardır. *M. xanthus* ta Lon V geni yaşayabilirlik için gereklidir. Lon V geni delesyona uğramış bakteriler ölür. *M. xanthus* daki diğer bir Lon geni kopyası olan Lon D ise Lon V ye oranla aynı öneme sahip değildir. Lon D mutantları yaşamlarını sürdürseler de sporulasyon yeteneklerini kaybetmişlerdir. Buda iki genin farklı görevleri olduğunun önerilmesine neden olmuştur. Bu tarz diğer bir örnek *B.subtilis* in Lon A ve B genleri içinde geçerlidir.

Ökaryotlarda Lon mutant hücrelerde birçok hücresel kusur ortaya çıktığı gözlenmiştir. Maya Lon mutantları, solunum kusurları ve fermente olamayan karbon kaynakları bulunan ortamlarda büyüme yeteneklerini kaybetmişlerdir. Bu mutantların mitokondri matrikslerinde inklizyon cisimleri birikir. Memeli hücrelerinde Lon proteazlar oksidatif sonucu hasar görmüş proteinlerin geri kazanılmasında rol oynamaktadır. Mitokondriyel Lon yaşanırılık için gereklidir. Mitokondriyel Lon proteaz aktivitesinin azalması hücre bölünmesine zarar vermiş ve doku ölümüne neden olmuştur. Lon proteaz aktivitesinin tamamen kaybedilmesi ise hücre ölümüne neden olduğu gözlenmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda Lon proteazların yalnızca protein kalitesini değil birçok farklı hücresel yolağı etkilediği ve kontrol ettiği bulunmuştur. Enzimler aracılığı ile hücre döngüsünü ve metabolizmayı, δ faktörleri aracılığı ile sporulasyonu, DNA polimerazlar, transkripsiyonel aktivatörler, özgül ribozomal proteinler ve antioksinler aracılığı ile stres yanıtını, histon benzeri proteinler aracılığı ile patojeniteyi kontrol ederler.

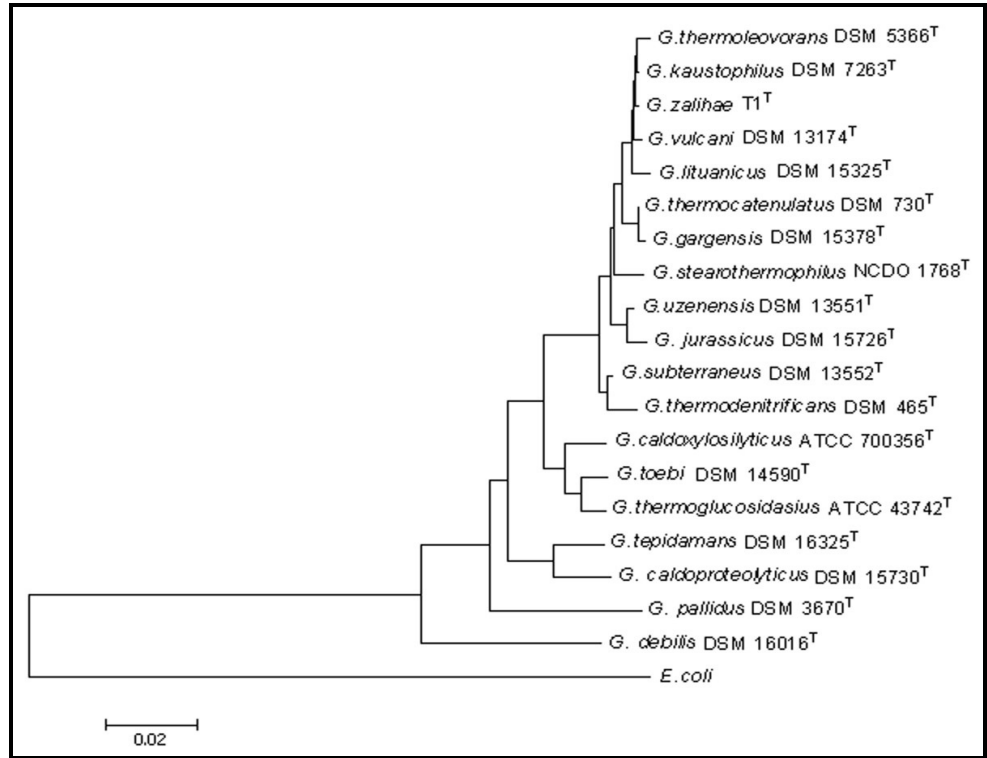


Şekil. 1.5. Lon proteaz'ın hücredeki görevleri.

Geobacillus kaustophilus Hücresel Yapı ve Metabolizması

Bacillus genusunun yeniden sınıflandırılmaya başlanmasından bu yana, daha önce *Bacillus* üyesi olarak bilinen birçok türden yola çıkılarak yeni genuslar oluşturulmuştur. 1990'lardan sonra ekstrem ortamlarda keşfedilen, endospor oluşturan halofil, asidofil ve termofiller giderek büyüyen bir grup olarak ortaya çıkmıştır. 16S rRNA gen dizisi karşılaştırmaları sonucu bu ekstremofillerin çoğunun *Bacillus* ile yakın akraba olduğu anlaşılmıştır (Şekil-1. 7).

Geobacillus genusuna ait türlerin tayini de yine bu yöntem ile yapılmıştır.



Şekil 1.6. *Geobacillus kaustophilus*'un *Geobacillus* cinsinin diğer türlere göre filogenetik yeri (Rahman ve ark., 2007).

Geobacillus kaustophilus (HTA 426), Pasifik okyanusundaki Maria Çukuru'nun derin deniz sedimentlerinden izole edilmiştir (Takami ve ark., 2004). Optimal büyüme sıcaklığı 60 °C olmakla beraber, 70 °C'ta da büyüebilen 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).

Tez Çalışmasının Amacı

Lon ailesi proteazları görece yakın zamanda keşfedilen bir proteaz ailesidir ve çalışma prensipleri birçok organizmada araştırılmaya devam edilmektedir. Özellikle Lon proteazların hücre içindeki protein kalite kontrol mekanizmasının dışında diğer kontrol döngülerinde oynadığı önemli rolün keşfedilmesi ile birlikte bu ailenin üzerinde yapılan bilimsel çalışmalar daha da artmıştır. Bu bağlamda farklı organizmalardan yeni Lon proteazların izolasyonu, biyokimyasal ve genetik nitelendirilmesinden elde edilecek veriler, bu özgün proteaz sisteminin hücre içinde oynadığı biyolojik rolü ve çalışma prensiplerini anlamakta yarar sağlayacaktır. Tüm bu bilgilerin ışığında bu projede termofilik bir bakteri türü olan *Geobacillus kaustophilus*'a ait ATP-bağımlı Lon proteaz'ın geni ilk defa çalışılmıştır. Bu tez çalışmasında *G. kaustophilus* tarafından üretilen ATP-bağımlı Lon proteaz enzimini kodlayan *lon* geni *E. coli* hücresine klonlanması, gen dizisinin belirlenmesi ve eksprese edilmesi hedeflenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

2-propanol, Asetik asit, % 99,5 Etanol, Fenol, Kloroform, İzoamilalkol, 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), Agaroz (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, Tripton, Maya Özüü, Nutrient Broth (Difco, Detroit, USA) % 40 Akrilamid Solüyonu (AppliChem).

2.1.2. Kullanılan Enzimler ve Tamponları

Taq DNA Polimeraz (Bioron GmbH Ludwigshafen Germany) 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

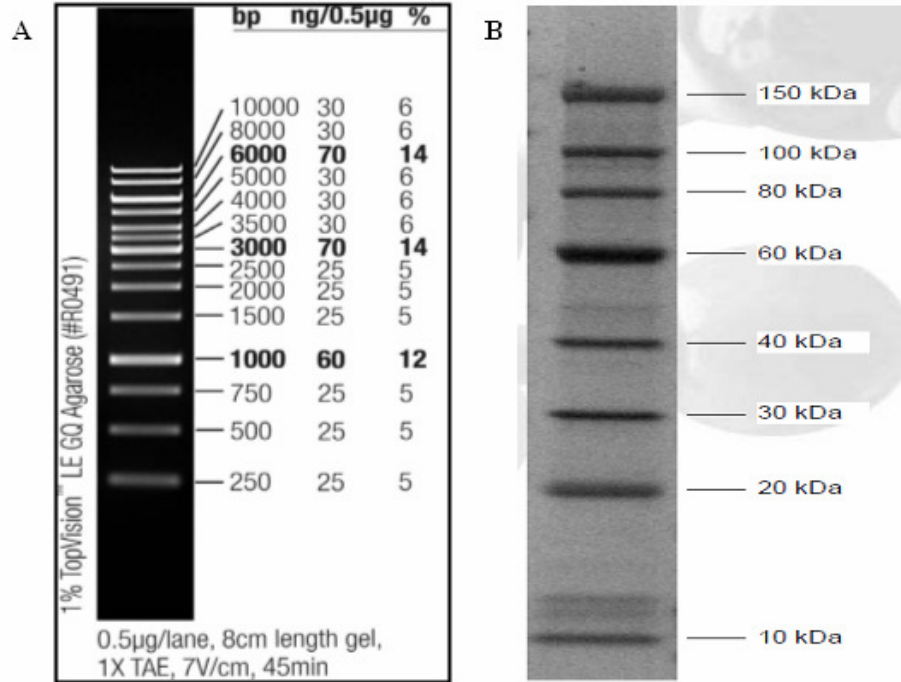
dNTP (MBI Fermentas AB, Vilnius, Lithuania), Adenosine-5'-triphosphate disodium (ATP) (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Germany).

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 Moleküler Belirteçi

Moleküler DNA belirteçleri (MBI Fermentas, 1 kb DNA marker, O'GeneRuler™ 1 kb, SM1163) Moleküler Protein Belirteci (Applichem GmbH, Protein Marker IV A3993)



Şekil-2.1. Moleküler DNA belirteçleri A) 1 kb Moleküler DNA belirteci (Fermentas, SM1334) B) 10-150 kDa Protein belirteci (Applichem GmbH)

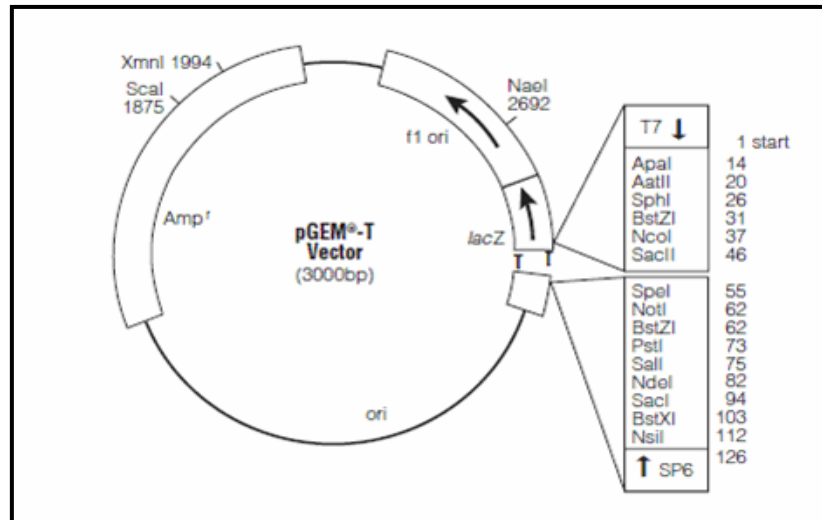
2.1.6 Kullanılan Plazmid Vektörler

2.1.6.1 pGEM-T Vektör Sistemi

Bu tez çalışmasında pGEM-T Vector System (Promega, Madison USA), *Geobacillus kaustophilus*'tan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile elde edilen Lon genini klonlamak için kullanılmıştır. pGEM-T T-A klonlama adı verilen yöntem için hazırlanmış bir vektördür. Vektör, pGEM-5Zf(+)'nın *EcoRV* ile

kesilip her iki 3' ucuna Timin eklenmesiyle hazırlanmıştır. Bu çıkıntılar hem plazmidin kendi üstüne kapanmasını engeller hem de PCR aşamasında kullanılan Taq DNA polimerazın bir özelliği olarak genin her iki 3' ucuna da bıraktığı deoksiadenozin'lerin klonlama için kullanılmasına imkan verir. (Robles ve Doers, 1994).

Plazmid klonların seçilimi için iki farklı seçenek sunar. İlk olarak Ampisilin direnç geni taşır ve bu sayede transformasyon esnasında plazmidi başarılı olarak alan hücrelerin seçilimi sağlanır. İkinci özellik ise klonlamanın varlığını anlamak adına yapılmıştır. Plazmid β -Galktosidaz enziminin bir bileşeni olan α peptidinin genini taşır. Plazmidin çoklu klonlama bölgesi bu genin içine yerleştirilmiştir. Eğer klonlanmak istenen parça plazmidi girerse α peptidi oluşamaz ve β -Galktosidaz enzimi aktif hale gelemez. Bu sayede klon taşıyan ve taşımayan bakteriler X-Gal içeren besiyerlerin de mavi-beyaz koloni seçimi yöntemi ile ayırt edilebilir. Ayrıca plazmid gerektiğinde her iki yöne de okuma yapmayı sağlayacak T7 ve SP6 promotorlarını taşır.



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

2.1.6.2. pGEX Vektör ve GST Füzyon Sistem

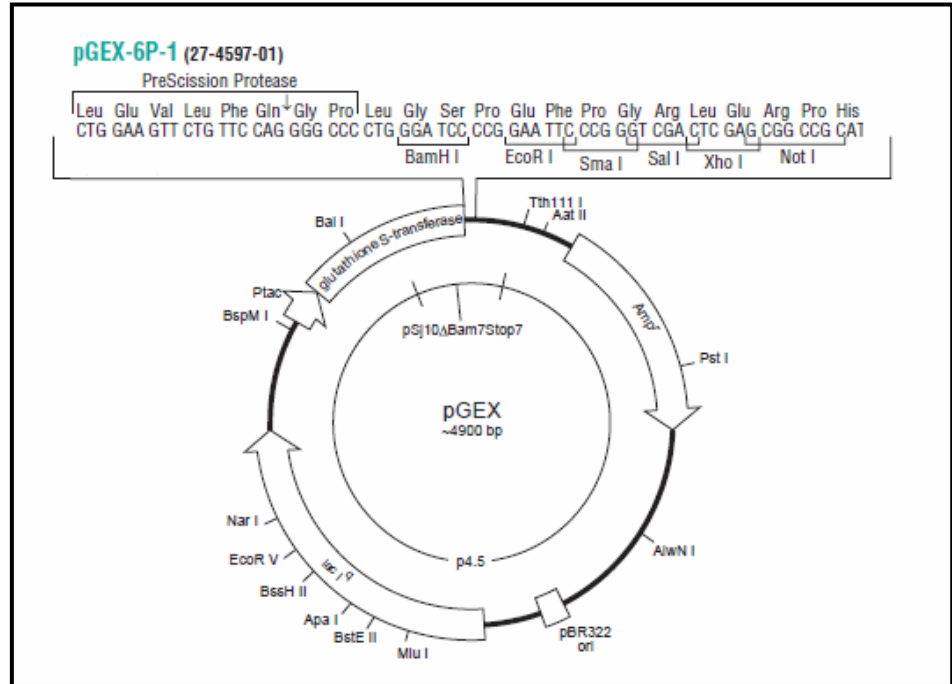
Glutasyon S-transferaz (GST) Gen Füzyon Sistemi, *Eschericia coli*'de üretilen proteinlerin ekspresyonu, saflaştırılması ve belirlenmesinde kullanılan çok yönlü bir sistemdir. Bu sistem, *Schistosoma japonicum* GST'ı ile füzyon halindeki gen ya da gen fragmanlarının yüksek derecede uyarılabilir ekspresyonunu 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 fragmanınının 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-6P1 plazmidi, öncelikle pGEM-T plazmidine klonlanan *lon* genlerinin ekspresyon vektörü olarak kullanılmıştır. pGEX-6P-1 plazmidi, Şekil-2.3'de görüldüğü gibi

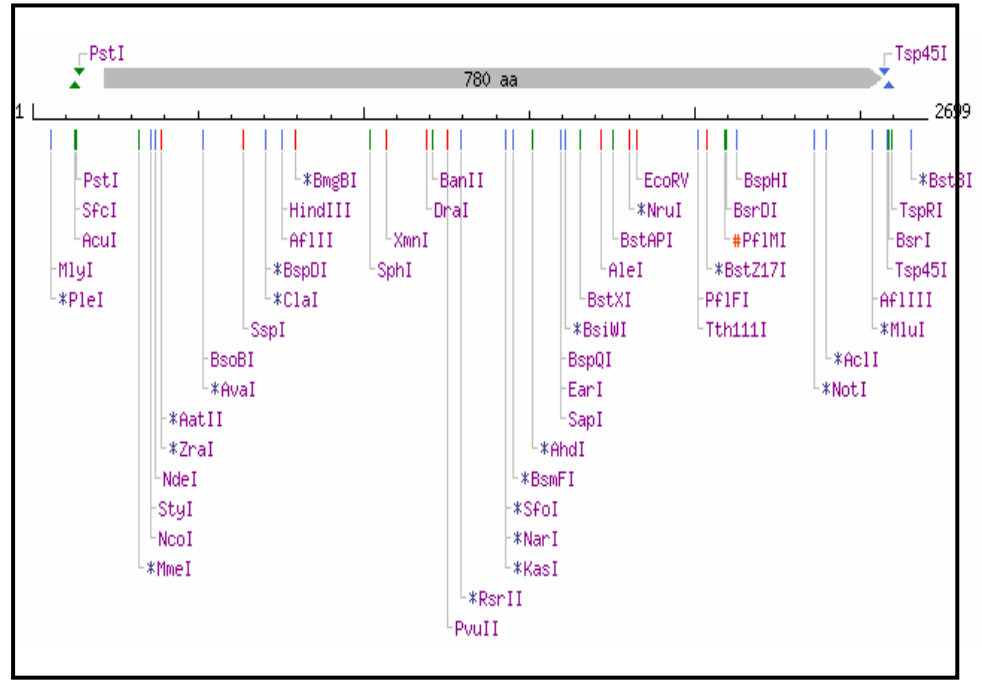
çoklu klonlama bölgesinde ilgili genlere uygun restriksiyon kesim bölgeleri içermektedir. Ayrıca, çoklu klonlama bölgesinin hemen üzerinde GST füzyon proteinin saflaştırılması aşamasında kullanılacak olan PreScission Proteaz'ın tanıma bölgesini içermektedir.



Şekil 2.3. GST füzyon vektörü pGEX-6P-12'in açık okuma çerçevesi ve genel özelliklerini gösteren haritası.

2.1.7 *G. kaustophilus lon* Geninin Restriksiyon Enzim Haritalarının Çıkartılması

G. kaustophilus genomundaki (NCBI Gene Databank, NC_006510) Lon geninin (*lon*, GeneID: 3185575) restriksiyon enzim haritası NEBcutter programı ile yapılmıştır (Şekil 2.4). Gen dizilerindeki restriksiyon enzim kesim bölgeleri belirlendikten sonra uygun klonlama ve ekspresyon vektörleri seçilmiş ve gen için bu vektörlerin çoklu klonlama bölgelerine eklenmesini sağlayacak ileri ve geri primerler tasarlanmıştır.



Şekil 2.4. *lon* geninin restriksiyon haritası. Mor ile yazılanlar ticari olarak ulaşılabilir restriksiyon endonükleazlar, sarı ile yazılanlar ticari olarak ulaşılabilen restriksiyon endonükleazlar ve ‘*’ ile işaretlenenler CpG metilasyonundan etkilenen restriksiyon endonükleazları göstermektedir.

2.1.8 Kullanılan Bakteri Soyları

Genom projesi yakın bir zamanda tamamlanan ve ATP-bağımlı proteaz Lon’u 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 besiyerine ekilerek 60 °C’ta gece boyu büyütülmüş ve hücrelerin bulunduğu plateler ayda bir pasajlanarak +4 °C’ta saklanmıştır.

Ayrıca hücre stokları, % 20 gliserol içeren Nutrient Broth besiyerinde -80 °C'ta saklanmıştır.

Çalışmada klonlama hücresi olarak *E.coli* DH5 α soyu kullanılmıştır. Taşıdığı birçok özellik sayesinde soy rekombinant DNA çalışmaları için oldukça kullanışlıdır. DH5 α soyu bir hücre içi endonükleaz olan A1 mutantıdır. Bu özelliği sayesinde hücre içi plazmid kararlılığını arttırmaktadır. Taşıdığı *hsdR17* mutasyonu EcoKI restriksiyon modifikasyon sistemini elemine ederek DNA'nın metilasyonunu ve dolaylı olarak yıkımını engeller. Taşıdığı $\Delta(lacZ)M15$ alfa akseptör alleli sayesinde lacZ temelli vektörler ile yapılan mavi-beyaz koloni seçilimi, çalışmalarına uygundur. Hücreler RecA mutant olmaları sebebiyle homolog rekombinasyonu önleyerek, plazmit multimerizasyonunu ve yapısal bir delesyon oluşmasını engeller. DH5 α *E. coli* soyu GYTE Biyoloji Bölümü Protein Moleküler Biyolojisi Laboratuvarı, Doç. Dr. Sedef Tunca Gedik'ten temin edilmiştir. Hücre kültürü, Luria Broth besiyerinde gece boyunca 37 °C'ta büyütülmüştür, büyüyen hücreler ayda bir pasajlanarak saklanmıştır. % 20 gliserol içeren Luria Broth besiyerindeki hücre stokları ayrıca -80 °C'ta saklanmıştır.

pGEX-6P-1'e klonlanan *lon* geninin ekspresyonu için *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) (Stratagene) kompetan hücreleri kullanılmıştır. BL21-CodonPlus (DE3) hücreleri T7 promotörü taşıyan plazmitlerin uyarımı sonucu yüksek miktarda protein anlatımını sağlar ve bu özelliğinden dolayı protein anlatım çalışmalarında kullanılmak için ideal bir soydur. *E. coli*'deki heterolog proteinlerin ekspresyonu yalnızca kaynak hücrede bulunan nadir tRNA'ların, konakçı *E. coli* soylarında bulunmamasından dolayı sınırlanmaktadır. Heterolog proteinlerin aşırı anlatımı nadir tRNA'ların tükenmesine yol açarak anlatımın durmasına neden olur. BL21-CodonPlus (DE3) hücreleri bu nadir bulunan tRNA genlerinin fazladan kopyalarını taşımaktadır ve bu sayede hücrede oluşabilecek

tRNA eksikliği giderilmiştir. 200 µl'lik hacimdeki ependorf tüplere alınan kompetan hücreler -80 °C'ta saklanmıştır.

2.1.9. Kullanılan Çözelti ve Besiyerleri

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

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

10 gr Triptone

5 gr Yeast extract

10 gr NaCl

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.

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

10 gr triptone

5 gr Yeast Extract

10 gr NaCl

15 gr Agar

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.

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

50,4 µg/ml X-GAL 1 ml

200 µg/ml IPTG

50 µg/ml Ampisilin

LB-Agar ile 1 L'ye tamamlanır.

TSS (pH:6,5)

% 10 (w/v) PEG (6000 g/mol),

% 5 (v/v) DMSO

50 mM MgCl₂

SOB Medyum

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

SOC Medyum (1 L)

SOB medyuma 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 ile 5 ml'ye tamamlanır..

Sodyum Asetat Tamponu (pH 4.8)

25 mM Sodyum Asetat
5 mM
1 mM MgCl₂

TE (Tris-EDTA), pH7.5

10 mM Tris
1 mM EDTA

% 1'lik Agaroz Jel (40 ml)

0,4 g Agaroz,
3 µl EtBr (10 µg/µl stoktan)
1XTAE Buffer ile 40 ml'ye tamamlanır.

Fosfat Tuz Çözeltisi (PBS) Tamponu

1,4 M NaCl

27 mM KCl

101 mM Na₂HPO₄

18 mM KH₂PO₄

SDS-PAGE Yürütme Tamponu (1L)

2,02 g Tris

14,4 g Glisin

0,5 g SDS

dH₂O ile 1L'ye tamamlanır

Coomassie Blue Boyama Solüsyonu (1L)

1 g Coomassie Blue R-250

450 ml Metanol

100 ml Glasiyal asetik asit

450 ml dH₂O

Boyadan Arıtma Solüsyonu (1L)

400 ml Metanol

100 ml Glasiyal asetik asit

500 ml dH₂O

Solüsyon A (BCA için 100ml)

1 gr Sodyum Bicinchoninate (BCA)

2 gr Sodyum Karbonat

0.16 gr Sodyum Tartarat

0.4 gr NaOH

0.95 gr Sodyum Bikarbonat (pH: 11.25)

dH₂O ile 100 mL'ye tamamlanır.

Solüsyon B (BCA için 10ml)

0.4 gr Bakır sülfat. 5H₂O

dH₂O ile 10 ml'ye tamamlanır

2.1.10 Kullanılan Cihazlar

+ 4 °C Soğutucu (Arçelik), - 20 °C derin dondurucu (Arçelik), - 86 °C derin dondurucu (Thermo, Forma -86C ULT Freezer), Buz Makinesi (BAR-LINE BF85), Yatay Elektroforez 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), Spektrofotometre (BIO-RAD, Smartspec 3000) Spektrofotometre (Shimadzu).

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 özütleme 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. *Geobacillus kaustophilus lon* geninin PCR ile çoğaltılması.

Klonlama ve ekspresyon çalışmalarında kullanılacak *lon* genine ait DNA fragmanları, *G. kaustophilus*'dan elde edilen kromozomal DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır. Geni çoğaltmak için *Geobacillus kaustophilus* genom dizisi dikkate alınarak (NCBI Gene Databank NC_006510) *lon* (Gene ID: 3185575) içeren bölgeyi çoğaltmak üzere primerler tasarlanmıştır. İleri ve geri primerlerin 5' uçlarına, kullanılan ekspresyon vektörünün çoklu klonlama bölgelerine uygun şekilde yerleşmesini sağlayacak *Bam*HI ve *Xho*I kesimi için tanıma bölgeleri eklenmiştir.

Tablo 2. 1. PCR için tasarlanan primerler

Primer	Restriksiyon Endonukleaz
5'-ATGGATCCGTGAACGGAAAGAAAAGGAG3'	<i>Bam</i> HI
5'- TTGGCTCGAGCCGATTGATCATTTTGTG-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 (MJ Research INC, PTC-200 USA) cihazında toplam 32 döngü olarak yürütülmüştür. 30 kez tekrarlanan bir PCR döngüsündeki aşamalar şöyledir; denatürasyon için 94 °C'ta 1 dakika, primer bağlanması için 58 °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. DNA fragmanlarının büyüklüğü 1 kb moleküler DNA belirteci (MBI Fermentas, 1 kb DNA marker, O'GeneRuler™ 1 kb, SM1163) standart olarak kullanılarak belirlenmiştir. Jel fotoğrafları, Jel Dökümasyon Sistemi (Vilber Lourmat, Germany) kullanılarak görüntülenmiştir.

2.2.3 PCR Ürününün Agaroz Jelden Saflaştırılması

PCR ile çoğaltılan *lon*'a ait DNA fragmanı, % 1'lik Agaroz Jele yüklenmiş ve jeldeki fragman yaklaşık bir saat elektroforez ile yürütülmüştür. Elektroforezden sonra, jel görüntüleme cihazı (UV ışık altında) ile görüntülenene uygun bantlar steril bistiiri ile kesilerek ependorf tüplere aktarılmıştır. Kesilen jel parçacıklarında bulunan DNA fragmanını jelden saflaştırmak için Jelden DNA Saflaştırma

Kiti kullanılmıştır (QIA Quick Gel Extraction Kit, QIAGEN). Kitte belirtilen prosedüre uygun olarak saflaştırılan DNA, konsantrasyonu ölçüldükten sonra -20 °C'ta saklanmıştır.

2.2.4. PCR Ürünlerinin Klonlanması

Lon genini içeren fragman 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, 65 ng PCR fragmanı ve 3 U T4 DNA Ligaz içeren reaksiyon karışımları +4 °C'ta gece boyunca inkübe edilmiştir.

2.2.5 Transformasyon ve Rekombinant Hücre Seçimi

Klonlama çalışmalarında konakçı olarak kullanılan *E. coli* DH5 α hücrelerinin kompetan hale getirilmesi ve transformasyonu için Chung ve arkadaşları (1989) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Bu prosedüre göre, kompetan hale getirilecek hücreler 5 ml sıvı LB'ye ekilmiş ve gece boyu inkübe edilmiştir. Ertesi gün bu kültürden alınan 100 μ l'lik hücreler 10 ml'lik taze sıvı LB'ye ekilmiştir. Hücrelerin büyüme miktarları spektrofotometre ile 600 nm'de ölçülerek, istenilen OD değerine (0.4-0.5) gelmesi beklenmiştir. Kültür istenilen OD'ye gelince +4 °C'ta 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. OD ölçümlerinden sonra kalan kültür hacminin % 10'u kadar TSS eklenmiş ve pellet buz içinde çözüldükten sonra hücreler transformasyon için kullanılmıştır.

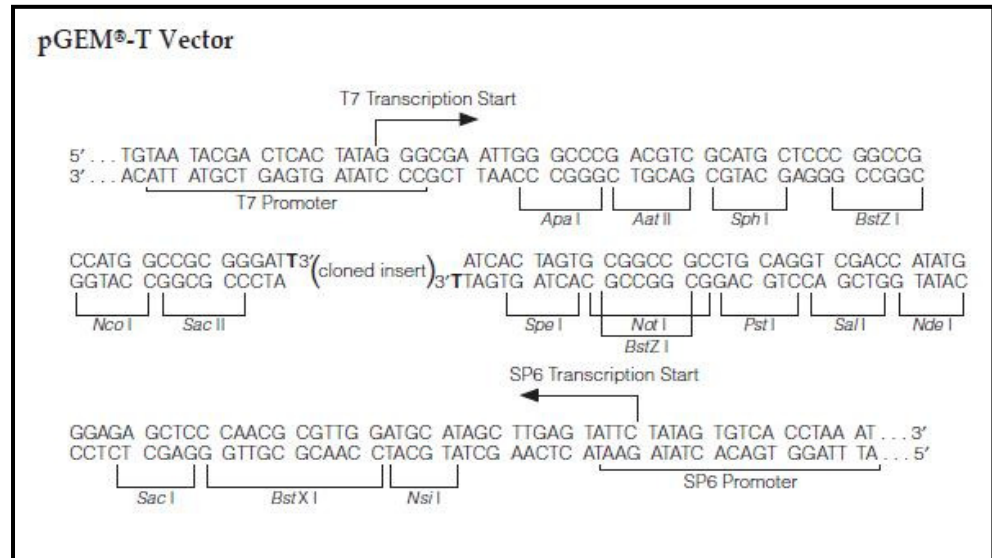
Daha önce buzda tutulup soğutulan tüplere ligasyon reaksiyonundan 5 μ l konulduktan sonra yeni hazırlanan kompetan *E. coli* DH5 α hücrelerinden 50 μ l eklenmiştir. Tüpler yavaşça karıştırıldıktan sonra buz da 20 dakika bekletilmiş ve hemen ardından hücrelere 42 °C'ta 45 saniyelik ısı şoku uygulanmış ve buzda 2 dakika daha bekletilmiştir. Her bir tüpe 950 μ l SOC medyum eklenip

37 °C'ta, 200 rpm'de 1,5 saat inkübe edilmiştir. Transformasyonun ardından seyreltilen hücreler ampisilin, IPTG ve X-GAL içeren seçici besiyerine tek koloniler elde etmek üzere ekilmişlerdir.

37 °C'ta gece boyu inkübasyondan sonra beyaz renkli olası rekombinant hücreler toplanmış ve yeni ortama çizilerek saf kültür hazırlanmıştır. Rekombinant koloniler, besi yerinde 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 ile (*lon* *Bam*HI-*Xho*I) ile kesilerek irdelenmiştir. Agaroz jel elektroforezi ile doğrulanan, Lon genini taşıyan pGEM-T/*lon* plazmiti, ekspresyon vektörüne (pGEX-6P-1) aktarılacak *lon* fragmanı için kaynak olarak kullanılmıştır.

2.2.6. Klonlanan *lon* DNA'sının Dizilenmesi

Lon genini içeren rekombinant pGEM-T/*lon* plazmiti jelden DNA izolasyon kiti ile izole edildikten sonra uygun konsantrasyonlardaki örnekler, dizilerinin okunması için İontek Ltd.'ye (İstanbul, Türkiye) gönderilmiştir. DNA dizilemesi, 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 2.5'de gösterilmiştir.



Şekil 2.5. pGEM-T vektöre ait çoklu klonlama bölgesi

2.2.7. *lon* Geninin Ekspresyon Vektörü pGEX-6P-1'e Klonlanması

Rekombinant pGEM-T/Lon plazmitinden, uygun ikili restriksiyon endonükleazlarla kesilip agaroz jelden izole edilen *lon* geni fragmanı, pGEX-6P-1 ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. Bu amaçla pGEX-6P-1, *lon* için *Bam*HI ve *Xho*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'sı *lon* fragmanını içeren ligasyon reaksiyon karışımı; 10X Ligasyon Tamponu içinde 100 ng vektör DNA'sı, 170 ng DNA fragmanı ve 20 U T4 DNA Ligaz içermektedir. Hazırlanan ligasyon karışımı gece boyunca 16 °C'ta inkübe edilmiştir.

2.2.8. Transformasyon ve Rekombinant Seçimi

Altklonlama çalışmalarında konakçı olarak BL21 (DE3) ve DH5 α *E. coli* ekspresyon hücreleri kullanılmıştır. -80 °C'tan alınan kompetan hücreler çözüldükten sonra, daha önce buzda tutularak soğutulan 1.5 ml'lik ependorf tüplere 50 μ l hacimlerde dağıtılmış, her bir ligasyon reaksiyonu 10 μ l'lik hacimler halinde ayrı ayrı ependorf tüplere aktarılmıştır. Pozitif kontrol için 3 μ l halkasal pGEX-6P-1 ve negatif kontrol için 5 μ l *Bam*HI-*Xho*I restriksiyon enzimleri ile kesilmiş doğrusal pGEX-6P-1 eklenmiştir. Tüpler, buzda 30 dakika inkübe edildikten sonra 42 °C'ta 45 saniye ısı şoku uygulanmış, ısı şokundan sonra buzda 2 dakika bekletilen her bir tüpe 950 μ l sıvı LB besi yeri eklenmiş, ardından 37 °C'ta, 200 rpm'de 1,5 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda tüpler, 10,000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş, üst sıvıdan 700 μ l uzaklaştırılmış ve hücre pelleti geriye kalan 300 μ l 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.

Lon genini içeren pGEX-6P-1 plazmitlerine sahip rekombinant hücre kolonileri koloni PCR yöntemi ile saptanmıştır. Koloni PCR yönteminde 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 *G. kaustophilus* Lon geni için hazırlanan ileri ve geri primerler 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 58 °C'da 1 dakika ve polimerizasyon için 72 °C'da 2 dakika (30 döngü) şeklinde, son polimerizasyon aşaması ise 72 °C'da 8 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. 25 μ l'lik

reaksiyon karışımı her bir koloni için: 10X PCR Buffer 100 pmol Lon geni ileri ve geri primerleri, 0.2 mM dNTP, 1,25 U *Taq* DNA polimeraz içermektedir.

PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde görüntülenmesiyle gen aktarımının başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği ispatlanan koloniler belirlendikten sonra seçici besiyerinde gece boyunca 37 °C'da büyütülmüş ve plazmit izolasyon kiti ile plazmit izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen plazmit DNA'larından alınan 70 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 aktarımının doğruluğunun restriksiyon endonükleaz kesimleri ile de doğrulanması için bu kolonilerden elde edilen plazmit DNA'ları ile tek (pGEX-6P-1/*lon*, *Bam*HI yada *Xho*I) ve çift (pGEX-6P-1/*lon* *Bam*HI-*Xho*I) enzim kesim reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Buna göre 70 ng pGEX-6P-1/*lon* DNA'sı, 1X Tampon (*Bam*HI), 10U endonükleaz *Bam*HI içeren 10 µl'lik reaksiyon karışımında 37 °C'ta 2 saat boyunca kesilmiştir. Çift enzim kesimlerinde ise 100 ng pGEX-6P-1/*lon* DNA'sı, 2X Evrensel Tampon (Tango Buffer), 10 U endonükleaz *Bam*HI varlığında 37 °C'ta 2 saat boyunca kesildikten sonra reaksiyon karışımına Evrensel Tampon, 2X olacak şekilde eklenmiş ve ikinci kesim için 10 U *Xho*I eklenerek 37 °C'ta 2 saat boyunca kesilmiştir.

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

2.2.9. Hücre Özütlerinin Hazırlanması

pGEX-6P-1 üzerinde Lon genini içeren rekombinant BL21 (DE3) ve DH5 α *E. coli* kolonileri gece boyunca ampicilinli (100 μ g/ml) besiyerinde büyütüldükten sonra, hücre kültürleri ikinci besiyerine 1/10 oranında eklenerek ikincil kültürler elde edilmiştir. İkincil kültürler, optik yoğunluğu 600 nm'de 0,6'ya ulaşınca kadar büyütüldükten sonra Lon ekspresyonu 0,1 mM IPTG ile 2 saat boyunca 37 °C'ta, 200 rpm'de inkübe edilerek uyarılmıştır.

Lon'un yüksek derecede eksprese edildiği hücre kültürleri, 8.000 g'de 15 dakika süre ile +4 °C'ta santrifüjlenerek toplanmıştır. Hücre pelletleri, PBS içerisinde çözülüp buz üzerinde 30 dakika inkübe edilmiştir. Hücre özütleri, her biri toplamda 2 dakika sürdürülen 64 mikronda 15 saniye sonikasyon, 15 saniye buzda bekleme şeklindeki sonikasyon prosedürü ile parçalanmıştır. Homojenat, 10.000 g'de 15 dakika süre ile +4 °C'da santrifüj edilerek hücre kalıntıları çöktürülmüş, Lon proteaz proteinini içeren üst sıvı, kullanılıncaya dek -20 °C'ta saklanmıştır. GST-Lon proteinlerini içeren hücre özütleri % 10'luk SDS-PAGE'de görüntülenmiştir.

2.2.10 Rekombinant GST-Lon Füzyon Proteinin Saflaştırılması

GST-füzyon proteinleri GST-Trap FF 5 ml (Amersham, pharmaceutical) afinite kolonu kullanılarak saflaştırılmıştır. Hücre özütleri 0.45 μ m filtreden geçirildikten sonra fosfat tuz tamponu (PBS) ile dengelenmiş kolona yüklenmiştir. Kolona bağlanmayan proteinler, GST-bağlanma tamponu (PBS tamponu) ile uzaklaştırıldıktan sonra kolona bağlı GST proteinleri 10 mM indirgenmiş glutatyon içeren elusyon tamponu ile kolondan uzaklaştırılmıştır. GST-Trap FF 5 ml kolon, 2 kolon hacminde 6 M Guanidin-HCl ile ve hemen onu takiben 5 kolon hacminde fosfat tuz tamponu ile yıkanmıştır. Fraksiyonlardaki protein miktarı 280 nm dalga boyunda ölçülerek belirlenmiştir. Elde edilen fraksiyonlar % 12'lik SDS-PAGE'de görüntülenmek ve aktivite deneylerinde kullanılmak üzere -20 °C'ta saklanmıştır.

2.2.11. Lon Tarafından Kazein Yıkımı

G. kaustophilus rekombinant Lon proteazın kazein yıkım deneyi Anson (1938)'dan modifiye edilen metoda göre yapılmıştır. Enzim aktivite deneylerinde substrat olarak kazein kullanılmıştır ve %1'lik (w/v) stok çözeltisi taze hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı 300µg Lon, 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, içeren deney tamponu içinde 700 µl kazein solüsyonu ve/veya 1 mM ATP içermektedir. Reaksiyon karışımları, 55 °C'ta 30 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyonlar 900 µl % 15 trikloro asetik asit (w/v) (TCA) ilavesi ile durdurulmuş ve karışımlar oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmişlerdir. Oluşan beyaz tortu 13.000 rpm'de 15 dakika süre ile oda sıcaklığında santrifüj edilerek uzaklaştırılmış ve üst sıvı Whatmann No.1 filtre kağıdından geçirilerek filtrelenmiştir. Süzülen örneklerin optik yoğunluğu 275 nm'de spektrofotometre ile ölçülmüştür. Bir ünite enzim aktivitesi 55°C'ta 60 dakikada 0,01 artan absorbans (A₂₇₅) olarak tanımlanmıştır.

2.2.12. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Poliakrilamid jel elektroforezi, % 0,1 anyonik deterjan SDS varlığında, Laemmli (1970) tarafından tanımlanan % 10 ayırma jeli ve % 5'lik yükleme jeli üzerinde gerçekleştirilmiştir. 10-150 kDa Protein belirteci (Applichem GmbH), moleküler ağırlık belirteci olarak kullanılmıştır. 10 µl enzim örnekleri, % 1 SDS içeren 2X örnek tamponu ile karıştırılarak kaynar suda 5 dakika bekletilmişlerdir. Daha sonra protein örnekleri ve moleküler ağırlık standartları jele yüklenmiştir. Jel, 100 V'da yürütülmüştür. Elektroforez tamamlandıktan sonra Coomassie Brilliant Blue-R250 ile boyanmış ve daha sonra boyadan arıtma çözeltisi ile birkaç kez yıkanarak boyadan arındırılmıştır. Her bir proteinin göreceli hareketliliği, jelin baş kısmından protein bandının merkeze kadar olan göç mesafesi ölçülerek hesaplanmıştır. Göreceli hareketlilik, bilinen moleküler ağırlıklara dayalı olarak çizilmiştir. Standart eğri

Çizilmiř ve eğim, proteinlerin moleküler ağırlık hesaplamalarında kullanılmıştır.

2.2.13. BCA Yöntemi ile Protein Miktarı Tayini

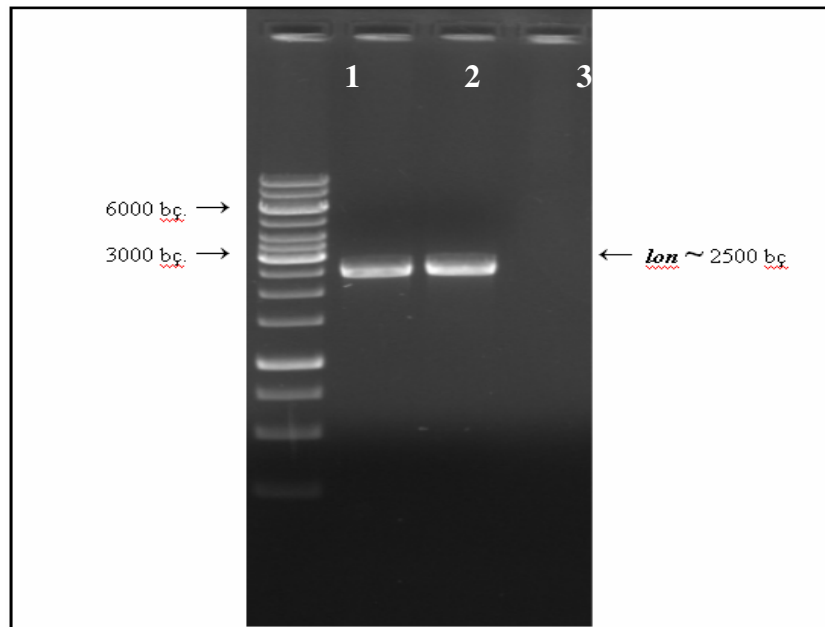
Aktivite deneylerinde kullanılacak saflaştırma fraksiyonlarında bulunan protein miktarı tayini BCA (Bicinchoninic asit) yöntemi ile tespit edilmiştir. Yeni hazırlanan 50 hacim solüsyon A + 1 hacim Solüsyon B karışımından 200 µl alınarak mikropilaka kuyularına konulmuş protein örneklerinin (5-10 µl) ve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

3. BULGULAR

3.1. *G. kaustophilus* Lon Geninin PCR ile oğaltılması

G. kaustophilus genom dizisi (NCBI Gene Databank NC_006510) dikkate alınarak tasarlanan ileri *lon*F1 ve geri *lon*R1 primerleri kullanılarak ATP-bağımlı Lon proteaz geni (Gene ID: 3185575) PCR ile özgül amplicon verecek şekilde çoğaltılmıştır. 58 °C tutunma sıcaklığında ve 20 ng Kalıp DNA yoğunluğu ile denenen PCR çalışması sonucu yaklaşık 2500 bç özgül bir *lon* fragmanı elde edilmiştir.

PCR ile elde *lon*'a ait DNA fragmanları, büyüklüklerinin tayin edilmesi için 1 kç moleküler DNA belirteci varlığında % 1'lik agaroz jele yüklenmiştir (Şekil 3.1). Moleküler DNA belirteçleri ile karşılaştırılarak büyüklükleri doğrulanan DNA fragmanları, daha sonraki klonlama çalışmalarında kullanılmıştır.

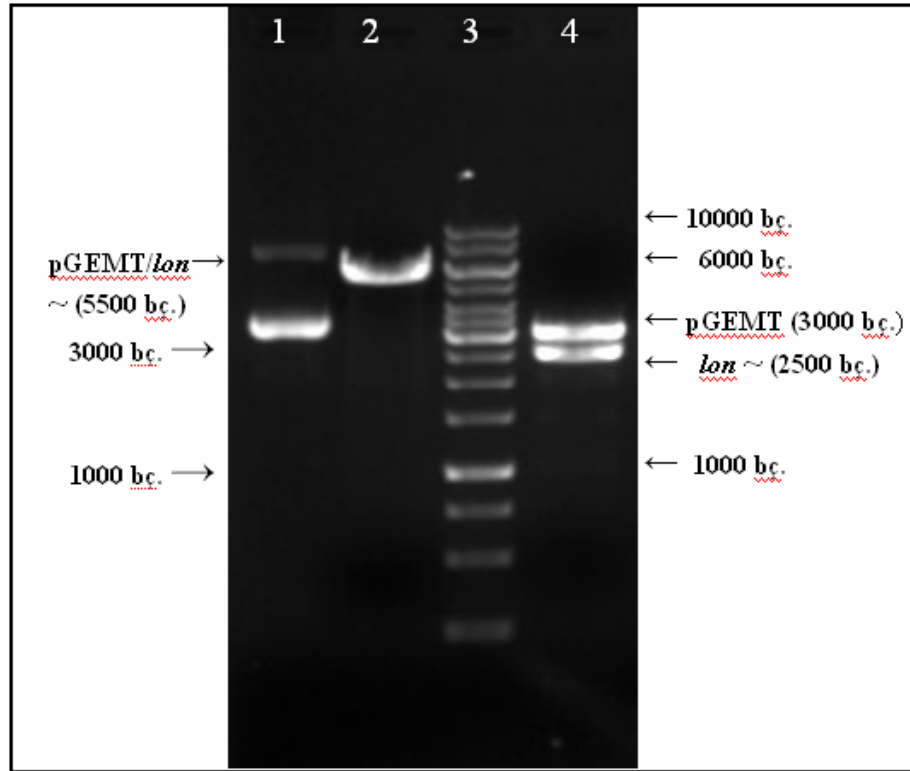


Şekil 3.1. Agaroz jelden saflaştırılan *lon*'a ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü. 1) 1 kç'lık moleküler DNA belirteci 2-3) *lon* (~2500 bç).

3.2. *G. kaustophilus lon* Geninin pGEM-T Vektör Sistemine Klonlanması

PCR ile çoğaltılan ve 5' ve 3' uçlarında *Bam*HI ve *Xho*I kesim bölgeleri içeren ~2500 bç uzunluğundaki fragman, klonlama vektörü pGEM-T vektörüne 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 oluşturduğu ürünlerin 3' ucuna bir adenozin trifosfat ekleme özelliğinden yararlanılmaktadır. Rekombinant plazmitler *E. coli* DH5 α hücrelerine transformasyon ile aktararak çoğaltılmıştır. Transformasyonun ardından mavi-beyaz koloni seçimi sonunda beyza renkte görünen olası kolonilerden izole edilen plazmit DNA'larının hedef genleri içerip içermediği yapılan bir dizi restriksiyon endonükleaz kesimleri ile anlaşılmıştır. Kesim sonuçları % 1'lik agaroz jelde DNA moleküler belirteçleri ile karşılaştırılmıştır.

Rekombinant pGEM-T/*lon* plazmitlerin restriksiyon enzim analizleri Şekil 3.2.'de görülmektedir. Lon genini içeren pGEM-T (pGEM-T/*lon*) rekombinant plazmit DNA'sı sadece *Bam*HI ile kesildiğinde agaroz jeldeki DNA fragmanı yaklaşık 5500 bç büyüklüğünde tek bir fragman oluştururken, *Bam*HI ve *Xho*I ile birlikte kesildiğinde klonlanan Lon geni yaklaşık 2500 bç ve kesilmiş pGEM-T vektöre yaklaşık 3000 bç karşılık gelen fragmanlar oluşturmuştur.



Şekil 3.2. PGEMT-Lon rekombinant plazmidinin restriksiyon enzim kesimleri sonucu oluşan DNA fragmanlarının agaroz jelde görünümü 1) Halkasal pGEM-T/lon vektörü, 2) pGEM-T/lon plazmidinin *Bam*HI ile kesimi sonucu oluşan doğrusal plazmidi (~5500 bç), 3) 1 kb'lik moleküler DNA belirteci 4) pGEM-T/lon plazmidinin *Bam*HI ve *Xho*I ile kesimi sonucu oluşan (yukarıdan aşağıya sırasıyla) doğrusal pGEMT (3000 bç) ve *lon* (2500 bç) fragmanları.

3.3. Klonlanan *lon* DNA'sının Nükleotit Dizisinin Belirlenmesi

lon DNA'sını içeren pGEM-T/lon plazmit DNA'sının SP6 promotoruna uygun primer ve gene ait ileri ve geri primerler ile elde edilen diziler BLAST yapılarak NCBI'daki DNA dizileri ile karşılaştırılmıştır. pGEM-T/lon için SP6 promotoruna ait primer kullanılarak yapılan dizileme reaksiyonu sonucu elde edilen anlamlı DNA dizisi Şekil 3.3'de görülmektedir. Analizler sonucu klonlanan *lon* genine ait DNA'nın daha önce Takami ve arkadaşları tarafından rapor edilen *G. kaustophilus* genomundaki (NCBI Gene Databank

NC_006510) *lon* (Gene ID: 3185575) gen dizisine bire bir uygunluk gösterdiği açığa çıkarılmıştır.

T 7 Promotoru

AAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGC
 pGEM-T DNA'sı Başlangıç kodonu
 CCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCGCATGGCCGCGGGATTATGGATCCGTA
 BamHI
ACGAAAAGAAAAAGGAGACGGTCGTTCCGCTTTGCCGCTGCGTGGGCTGC
 TCGTGTTCGACGATGGTGTCCATTGGATGTCGGGCGCGAGAAATCGG
 TCAAAGCGCTCGAACAAGCCATGGTTGAGGATCATATGATTTTGTGACGT
 CGCAAAAAGACGTTGCCATCGACGAACCGGACATGGATGACTTATATAAAA
 TGGGAACGATCGCGCGGTCAAGCAACTTCTAAAACCTCCCGAACGGCACGT
 FCCGCGTGCTTGTCGAAGGCGTCGCTCGGGCGCTCATTACGGAAGTGATCA
 GCGAGGAGCCGTACTTTCTCGTCAAAGTCGAAAAGTTTGCTGATCGGGCGG
 CGAAAGATTTAGAAGATGAGGCGCTCAAGCGGACGATGCTTGAATATTTCCG
 AGCAGTACATAAACTTGTCGAAGCGGCTGTCGGTCGACATTTACGCCTCGA
 TCGTCGACATCGATGAGCCGGGGCGAATGGCGGACATCATCGCCTCGCACT
 TGCCGCTTAAGCTTGAGGAAAAGCAGCGCATTTTAGAAACGATCGACGTGA
 AAGAGCGCCTCAATAAAATCATCAAATTTTGCAACGAAAAAGAAAGTGC
 FCCAGCTTGAGAAAAAGATCAGCGCCCGTCAAGCAGTCGATGGAGCGG
 ACGCAAAAAGAGTATTATTTGCGGAGCAAATGAAGGCGATTCAAAAAGAG
 CTTGGCGAAAAAGAAGGAAAAACGAGCGAAGTCGAGGAGCTGAAAGAAAA
 AATCGAGGCGGCCGCGCATGCCGGAGCATGTGAAACAAACGGCATTGAAGG
ACCTTCACCCCTATCAAAAAATTCCGCGCACCTCAGCCGAAAAGCCCACTCA
 TTCGCAACTACCTCGATTGGCTCATCGCCTTGCCGTGGTCGAAAGAAACAG

AAGACATCCACGACATTAAGCGGGCGGAAGCGATTTTAAAGAGGAGCATT
 CGGGCTCGATAAAGTGAAAGAACGGGTGCTTGAATTTTATCTGTCAAGCA
Walker A
 GCTGACGAAATCGTTAAAAGGTCCGATTCTTGCCTCGCCGGACCGCCGGG
GGTCGGCAAACGTCGCTCGCCCGCTCGATCGCCAAAGCGCTCGGCCGCC
 GCTTCGTCCGCGTTTCGCTCGGGCGCGTCCGCGACGAATCGGAAATTCGCG
Walker B
 GCCATCGCCGCACGTATGTCCGGCGCCATGCCGGGACGCATTATCCAGGGG
 ATGAAA**AAAGCAGGCACGATCAACCCCGTCTTCTTGCTTGATGAAA**TCGAC
 AAAATGTCGAGCGATTTCCGTGGCGATCCATCGGCGGCCATGCTGGAGGTG
 CTTGACCCGGAGCAAATCATACTCAGCGACCATTACATTGAAGAGCCG
Sensör I
 TACGATCTATCGAAAGTCATGTTTATCGCCACGGCCAACCATTGCGCGCG
 ATTCCGCAGCCG**CTCTTGACCGGATGGAAGTGATCCACATA**CCAGGCTAC
 ACAGAAGTGGAAGCTGCATATCGCCAAGCGGCATTTGCTGCCGAAACAA
Sensör II
 ATCACCGAGCACGGGCTGAAAAAGGCGGCGTTGCAAATTCGCGATGACGC
 GATGCTCGATATCATCCGCCAT**TATACGCGGAAGCCGGGGTGCGGG**GAGCT
 TGAGCGGCAGCTCGCCGCTATCTGCCGAAAAGCGGCCCGCCTCATCGTTTC
 CGGCGAGAAAAAGCGGGTTGTGATCACAGAAAACAATCTTGAGGAATTTTT
 AGGGAAGCGAAAATACCGCTACGGCCGAGCGGAGGCGGAAGACCAAGTCG
 GCGTGGCGACCGGGCTGGCGTATACGGCGTTTGGCGGCGATACGCTCGCC
 ATCGAAGTGTCGCTCGCGCCAGGCAATGGGAACTCGTGCTGACCGGCAA
 GCTCGGTGATGTCATGAAAGAATCAGCGCAAGCGGCGTTCAGCTACGTGCG
 GTCGCGCGCTGAGGAGCTTGACATTGATCCGAAGTTCCATGAGAAATATGA
 TATCACATCCACGTTCCGGAAGGAGCGGTGCCGAAAGACGGGCCATCGGC
 CGGCATTACGATTGCGACCGCACTCATTTCGCTTTGACGGGCAAGCCGGT

GAGCCGCTTTGTCGGCATGACCGGGGAAATTACGCTGCGCGGCCGCGTTCT
 TCGATCGGGGGGCTGAAAGAGAAAACGTTAAGCGCCCATCGTGCCGGAT
 TGAAAACCGTCATTTTGCCGAAAGACAATGAAAAAGATTTGGCTGACATTC

CGGAAACGGTGAAGCGCGACTTGCCTTTGTGCTCGTCTCTCATCTCGATG
 AGGTGCTGCCGCACGCGTTGGTGGGGTGGAAGCGATGAATGTGAAGAAAG
Bitiş kodonu
 CAGAGCTTGTGACCAGTGCCGTCAAGCCGGAACAATATCCGGACGGCGGA
 CGGCCGGAGGTGGCGCTCGCCGGCCGTTTCAACGTCGGCAAATCATCATT
 ATCAACAAAATGATCAATCGGCTCGAGCCAAATCACTAGTGCGGCCGCCTG
XhoI
 CAGGTCGACCATAGGAGAGCT
 pGEM-T DNA'sı

Şekil 3.3. *G. kaustophilus*'a ait *lon* geni anlamlı DNA zinciri. Dizi, pGEM-T/*lon* vektörü üzerindeki SP6 promotoruna ve Lon genine uygun primerler kullanılarak elde edilmiştir. Altı çizili DNA dizisi, 5'→3' yönüne doğru sırasıyla *lon*'a ait ileri ve geri primerleri, mavi renkte gösterilen diziler sırasıyla *Bam*HI (ileri primer dizisine dahil) ve *Xho*I (geri primer dizisine dahil) kesim bölgelerini göstermektedir. Lon genine ait önemli bölgeler ve korunmuş bazı diziler kırmızı renk ile gösterilmiştir.

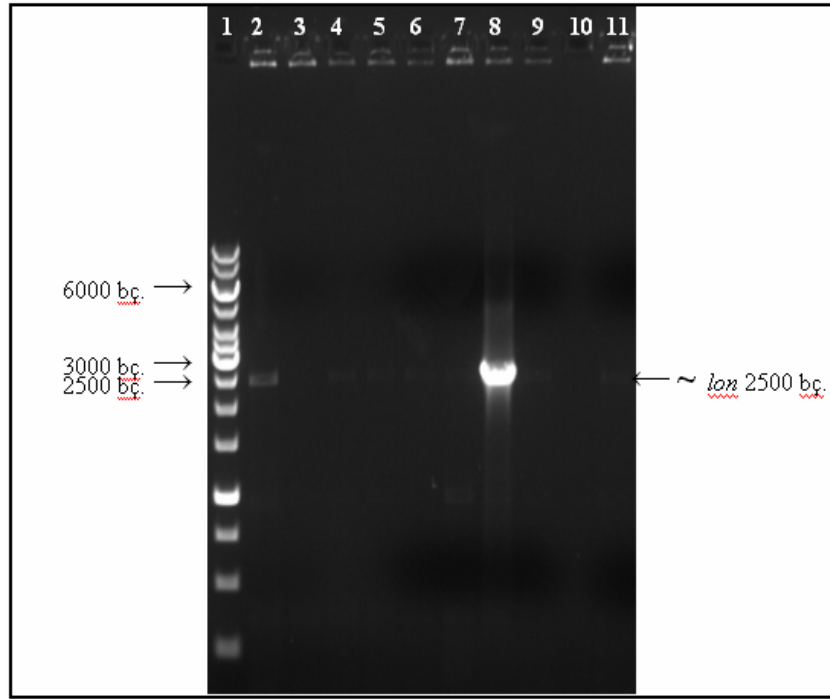
3.4. *G. kaustophilus lon* Geninin Restriksiyon Enzim Haritasının Çıkarılması

Lon genine ait DNA dizilerinin belirlenmesinden sonra bu genlere ait restriksiyon enzim haritaları NEBcutter programı ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar beklenildiği üzere daha önce NCBI'dan alınan diziler üzerinde belirlenen kesim haritaları ile aynıdır.

3.5. *lon* Geninin Ekspresyon Vektörü pGEX-6P-1'e Klonlanması

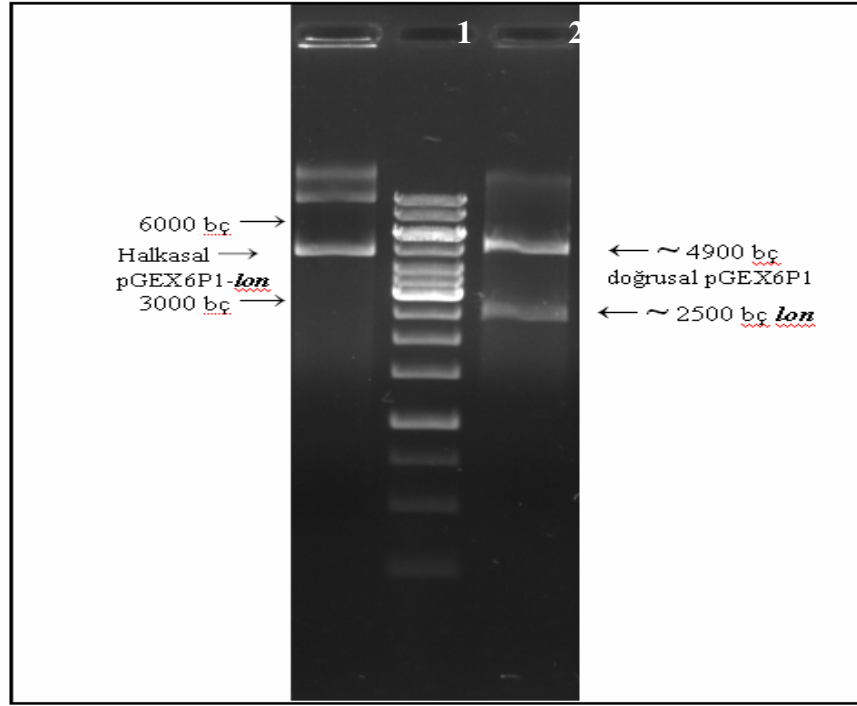
pGEM-T/*lon* plazmitinde bulunan *lon* DNA'sı, ligasyon reaksiyonlarında kullanılmak üzere uygun restriksiyon endonükleazlar ile kesilip jelden saflaştırılmıştır. Aynı anda *Bam*HI ve *Xho*I ile kesilen pGEM-T/*lon* DNA'sı agaroz jele yüklendiğinde *lon* ve boş pGEM-T vektöre ait DNA fragmanları gözlenmiştir. Böylece rekombinant *E. coli* DH5 α soylarındaki pGEM-T/*lon* plazmitinden elde edilen yapışkan uçlu *lon* DNA fragmanı sonraki ekspresyon vektörüne klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere jelden kit ile saflaştırılmıştır. pGEX-6P-1 ekspresyon vektörü de *Bam*HI/*Xho*I enzimleri ile kesildikten sonra parçalar aynı kesim bölgelerinden bağlanmıştır.

Elde edilen rekombinant vektörler *E. coli* BL21 (DE3)'e aktarılmıştır. 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.



Şekil 3.4. Koloni PCR sonuçlarının jelde görünümü. 2-7,9-11) pGEX-6p-1/lon plazmidini taşımayan koloniler 8) Olası pGEX-6p-1/lon plazmidini taşıyan rekombinant koloni.

pGEX-6P-1/lon plazmit DNA'sını taşıdığı öngörülen 11 koloni ile yapılan PCR sonucu sadece 1 koloniden ATP-bağımlı Lon proteaz geni yaklaşık 2500 bç uzunluğunda ampikon verecek şekilde çoğaltılmıştır. Bu koloniden elde edilen rekombinant pGEX-6P-1/lon plazmit varlığı restriksiyon endonükleaz kesimleri ile de doğrulanmıştır. Buna göre pGEX-6P-1/lon DNA'sı, *Bam*HI ve *Xho*I ile kesildiğinde kesim sonrası agaroz jelde, yaklaşık 4900 bç ve 2500 bç uzunluğunda görülmesi beklenen iki bant Şekil 3.5'de görülmektedir.



Şekil 3.5. pGEX-6P-1/*lon* DNA'sının restriksiyon enzim kesimi sonuçları. 1) Halkasal pGEX-6P1/*lon* DNA'sı, 2) 1 bç Moleküler DNA belirteci, 3) pGEX-6P1/*lon* plazmidinin *Bam*HI ve *Xho*I ile kesimi sonucu oluşan (yukarıdan aşağıya sırasıyla) doğrusal pGEMT (4900 bç) ve *lon* (2500 bç) fragmanları.

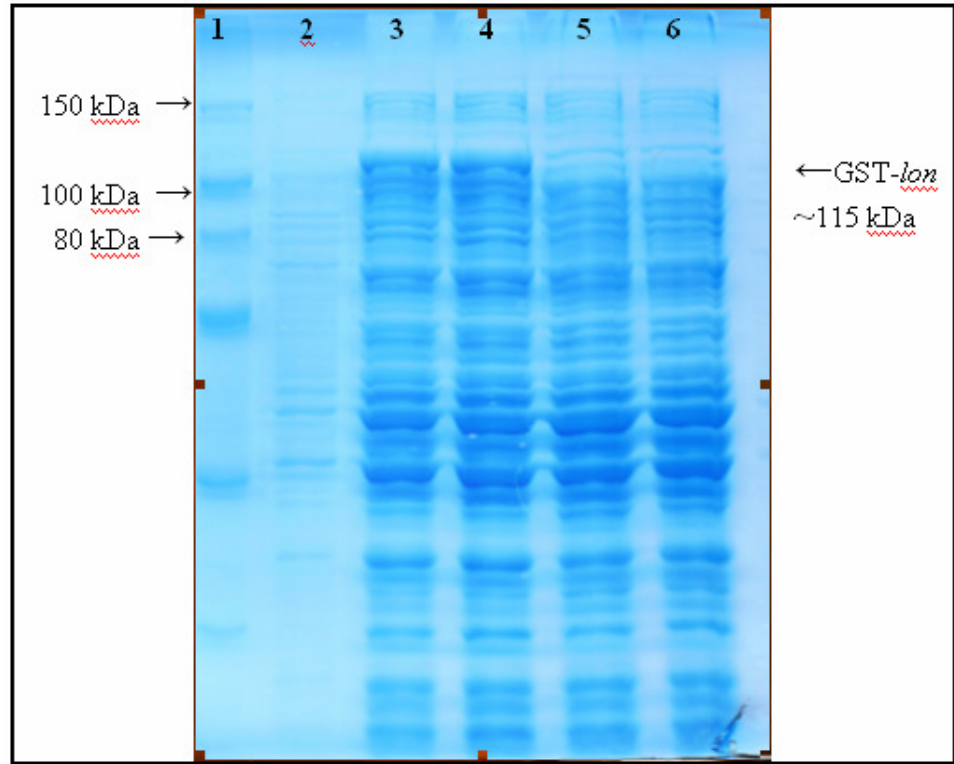
Böylece pGEX-6P-1 üzerinde *lon* genini taşıyan rekombinant *E. coli* BL21(DE3) hücre kolonileri tanımlanmış ve sonraki ekspresyon çalışmalarında kullanılmak üzere ampisilinli besiyerinde kültüre alınmışlardır.

3.6. Lon Proteazın Ekspresyonu

pGEX-6P-1 ekspresyon vektörlerine aktarılan *lon* geni *E. coli* BL21 (DE3) hücresinde güçlü *tac* promotorunun kontrolü altında IPTG ile uyarılmıştır. Rekombinant proteinin üretimi sağlandıktan sonra toplanan hücreler sonikasyon ile parçalanmış, elde edilen hücre

özütleri poliakrilamid jele yüklenip proteinlerin ekspresyon düzeyine bakılmıştır. Ancak hazırlanan rekombinant *E. coli* BL21 (DE3) hücre özütleri SDS jele yüklendiğinde, GST-Lon füzyon proteininin ekspresyonunu gösteren herhangi bir bant gözlenmemiştir.

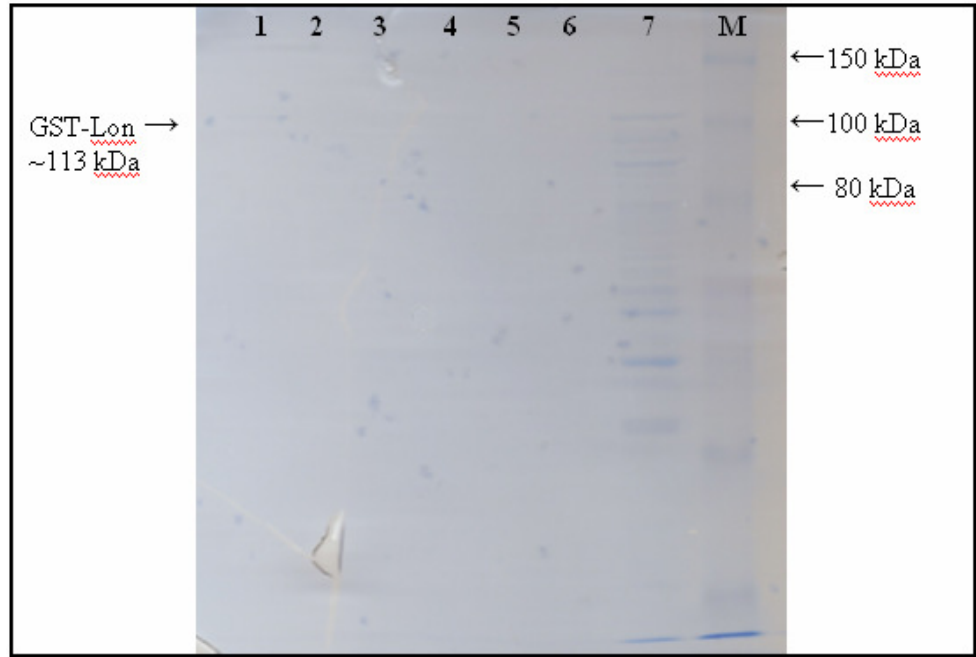
pGEX-6P1/lon plazmiti transformasyon ile farklı bir konakçı olan *E. coli* DH5 α hücrelerine aktarılmıştır. IPTG ile uyarılan ve uyarılmayan hücrelerden elde edilen Lon proteini glutathion-S-transferase (GST) ile füzyon halinde eksprese edilmiştir. Rekombinant proteinin üretimi sağlandıktan sonra toplanan hücreler sonikasyon ile parçalanmış, elde edilen hücre özütleri poliakrilamid jele yüklenip proteinlerin ekspresyon düzeyine bakılmıştır. Jel analizi sonucu IPTG ile uyarılan hücrelerden elde edilen hücre özütlerinde GST ile füzyon halinde bulunan Lon (GST-Lon) proteininin yüksek seviyede eksprese edildiği açığa çıkarılmıştır. İki proteinin moleküler ağırlıkları GST 26 kDa ve Lon ~87 kDa'dur. GST ile füzyon halinde olan Lon proteininin moleküler ağırlığı ise yaklaşık 113 kDa'dur (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. *E. coli* DH5 α 'da eksprese edilen GST-Lon füzyon proteininin SDS-PAGE'de görünümü 1) Moleküler protein belirteçi (10-150 kDa), 2) IPTG ile uyarımdan önce hücre özütü (0. dk.) 3) 0.1 mM IPTG ile uyarılan 90.dk hücre özütü, 4) 0.1 mM IPTG ile uyarılan 120.dk hücre özütü, 5) IPTG ile uyarılmayan 90.dk hücre özütü, 6) IPTG ile uyarılmayan 120.dk hücre özütü

3.7. Lon Proteazın Saflaştırılması

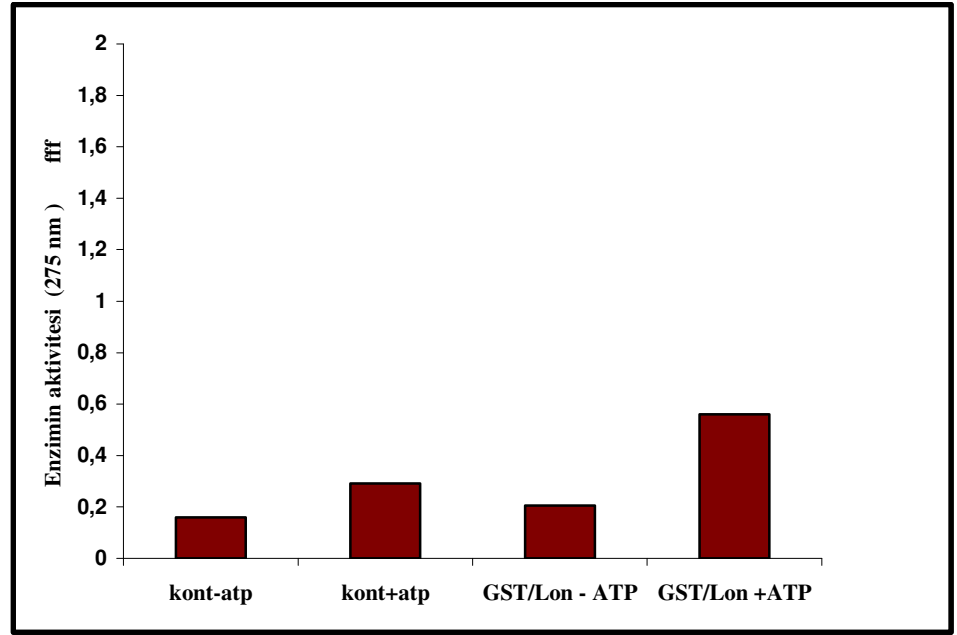
E. coli DH5 α soyunda eksprese edilen GST-Lon füzyon proteini GSTTrap FF kolonu kullanılarak tek basamakta hücre özütünden saflaştırılmıştır. Füzyon proteini içeren 4 ml hücre özütü kolona yüklendikten sonra kolona bağlanmayan proteinler kolondan uzaklaştırılmıştır. Saflaştırmadan sonra toplanan tüm fraksiyonlar 280 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Lon'nun görünen homojenlikte saflaştırıldığı SDS-PAGE ile görüntülenmiştir. Şekil 3.7'de görüldüğü gibi GST-Lon'nun yaklaşık 113 kDa olduğu görüntülenmiştir.



Şekil 3.7. Lon Proteazın Saflaştırılması. Kuyu 1, Saf GST-Lon Örnekleri, Kuyu 7 bağlanmayan proteinlerin yıkama örnekleri. M Protein Belirteci.

3.8. Lon Tarafından Kazein Yıkımı

GST ile birlikte eksprese edilen Lon proteaz aktivitesi doğal bir substrat olan kazein kullanılarak Gereç ve Yöntemlerde açıklanan koşullar altında ölçülmüştür. *G. kaustophilus* GST-Lon proteaz kazeini ATP yokluğunda ~%90 oranında hidrolize ederken 1 mM ATP varlığında ~%180 oranında hidrolize etmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. GST-Lon proteaz tarafından ATP varlığında ve yokluğunda kazein yıkımı. (Kazein yıkımı 3 µg Lon, 1mM ATP varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilmiştir).

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Proteolizis hücredeki birçok temel mekanizmanın düzenlenmesinde birinci derecede öneme sahiptir. Kanser, programlanmış hücre ölümü ve yaşlılık gibi birçok önemli konuda oynadıkları önemli rol nedeni ile ATP-bağımlı proteazlar son yıllarda çok fazla ilgi çekmektedir. Bu anlamda bakteriyel hücredeki ana proteaz olan Lon'un yapısı ve çalışma mekanizması hakkında halen yeterli bilgi bulunmamaktadır.

G. kaustophilus'un genom dizisi yakın bir zamanda açıklanmış ve ATP-bağımlı Lon proteaz geni tanımlanmıştır (Takami ve ark., 2004). *G. kaustophilus*'un yüksek sıcaklıklarda yaşayabilen bir organizma olması ATP-bağımlı Lon proteazı ilgi çekici kılmaktadır. Bu çalışmada *G. kaustophilus*'a ait Lon geni ilk defa klonlanmış ve bu gen tarafından kodlanan protein 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 ~2500 bp uzunluğundaki Lon geni öncelikle pGEM-T vektöre klonlanmıştır. Uygun restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri, ilgili genlerin NCBI veri tabanındaki DNA dizisinden yola çıkılarak elde edilen restriksiyon kesim haritasına göre seçilmiştir. Klonlanmadan sonra elde edilen pGEM-T/lon plazmitindeki *G. kaustophilus lon*'a ait gen dizisi, 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 Lon gen dizisi daha önce Takami ve arkadaşları (2004) tarafından belirlenen diziler ile karşılaştırılmıştır.

Gene ait primerler ile yapılan dizileme sonuçları sonucu, genin 5' ucunda bulunan yaklaşık 200 baz çiftlik bölgede başarılı bir

dizileme yapılamamıştır. Bunun üzerine olası bir primer problemi düşünülerek aynı bölge plazmit DNA'sına ait SP6 promotörü kullanılarak tekrar dizilenmiştir. Böylece dizilemenin doğruluğu, dizisi belli olan plazmit DNA'sının dizileme sonuçları ile karşılaştırılması sayesinde sağlanmıştır. Yapılan dizileme sonucu plazmit DNA'sını içeren bölge de dahil olmak üzere dizi, hiçbir şekilde bilinen dizi ile benzerlik göstermemiştir. Klonlanan bölge ile birlikte dizisi önceden bilinen plazmit DNA'sının da doğru bir şekilde dizilenememiş olması dizilemenin doğruluğunu tartışmalı hale getirmiştir. Gene ait farklı bölgelere özgü diğer üç primer ile yapılan dizileme sonuçları gen dizisinin 5' ucundaki 200 baz çiftlik bir bölge dışında, birkaç baz farkı taşımak kaydı ile Takami ve arkadaşları (2004) tarafından belirlenen diziler ile uyum gösterdiği bulunmuştur. Bu birkaç bazlık örtüşme problemi dizilemede meydana gelmiş okuma hatalarının sonucu olabileceği gibi, klonlama esnasında kullanılan taq DNA polimerazın neden olduğu bir hatada olabilir. Tüm bunlara rağmen, gen üzerinde bulunan ve protein düzeyinde işlevsel bir görevi olan korunmuş dizilerin bu değişimlerden etkilenmemiş olması, meydana gelen değişimlerin enzimin aktivitesi üzerinde herhangi bir etki göstermeyeceği düşünülmektedir.

Lon genine ait gen dizisinin belirlenmesinden sonra, restriksiyon endonükleaz enzim haritaları çıkartılmıştır. Yapılan analizler sonucunda, gene ait açık okuma çerçevesinde daha önce tasarlanan ileri ve geri primerlerde kullanılan restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerinin bulunmadığı doğrulanmıştır. Bekleneceği üzere elde edilen restriksiyon haritası NCBI veritabanındaki gen dizisinden elde edilen restriksiyon haritası ile aynıdır.

Rekombinant *E. coli* DH5a hücre soyunda bulunan pGEM-T/lon plazmitindeki *G. kaustophilus* Lon geni, uygun restriksiyon enzimlerle kesilip alınarak ligasyonla pGEX-6P-1 vektöre

eklendikten sonra transformasyon ile *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine aktarılmıştır. Rekombinant plazmiti (pGEX-6P-1/*lon*) içeren koloniler, yapılan koloni PCR çalışmaları ile belirlenmiştir ve bu kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldıktan sonra gen aktarımının başarılı bir şekilde gerçekleştiği, yapılan restriksiyon kesimleri ile doğrulanmıştır.

GST füzyon protein T7 polimeraz ile kontrol edilmektedir. pGEX-6P1/*lon* geni ile transforme edilen ve T7 polimerazı kodlayan *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin IPTG uyarılarak yüksek derecede eksprese edilmesi beklenmektedir. Ancak hazırlanan rekombinant *E. coli* BL21 (DE3) hücre özütleri SDS jele yüklendiğinde, GST-Lon füzyon proteininin ekspresyonunun gösteren herhangi bir bant gözlenmemiştir.

Giriş bölümünde bahsedildiği gibi Lon hücrede yer alan rekombinant proteinlerin yıkımından sorumlu bir ATP-bağımlı proteazdır. Çalışmamızda ekspresyon hücresi olarak kullanılan BL21 (DE3) Codon Plus (Stratagene) hücreleri *E. coli* B soyundan türetilmiş hücrelerdir. Doğal olarak *lon* mutant olup, bu özellikleri sayesinde rekombinant proteinlerin ekspresyonu için ideal bir konakçısıdır. *E. coli* B soyunda *lon* eksikliği-mutasyonunun nedeni *sul* geninin varlığıdır. BL21 (DE3) Codon Plus hücreleri de aynı fenotipi gösterirler. Bundan dolayı rekombinant *G. kaustophilus* Lon proteazın ekspresyonu BL21(DE3) hücrelerinde gen seviyesinde engellenmiş olabileceği düşünülmektedir. Bununla beraber rapor edilen bazı çalışmalarda rekombinant Lon proteazın BL21(DE3) hücrelerinde eksprese edildiği gösterilmiştir (Riethdorf ve ark., 1994, Maehara ve ark., 2007). Ancak bu çalışmalarda pBluescriptII, pUC19 ve pET21a gibi vektörler kullanılmıştır.

pGEX-6P1/*lon* plazmiti transformasyon ile farklı bir konakçı olan *E. coli* DH5 α hücrelerine aktarılmıştır. IPTG ile uyarılan rekombinant hücrelerden elde edilen hücre özütleri SDS jele

yüklendiğinde GST-Lon füzyon proteinin ekspresyonunu gösteren 113 kDa büyüklüğündeki bantın varlığı gözlenmiştir. GST proteininin büyüklüğü 26 kDa olduğu göz önüne alındığında onunla beraber eksprese olan Lon proteaz ~87 kDa büyüklüğünde olduğu düşünülmektedir. *G. kaustophilus* Lon proteaz moleküler ağırlığı diğer prokaryotik organizmalarla karşılaştırıldığında 87 kDa olan *B. subtilis* ile bire bir uygunluk gösterirken moleküler ağırlığı 87 kDa olan *T. temophilus*, 94 kDa olan *E. coli* ve 92 kDa olan *M. xanthus* Lon proteazlarla uyum göstermektedir.

Bununla beraber IPTG ile uyarılmayan hücrelerde aynı bant gözlenmemiştir. Normal şartlarda DH5 α hücreleri lacIq baskılayıcısı içermezler bu yüzden IPTG ile uyarılmalarına gerek yoktur. Bununla beraber yaptığımız çalışmada IPTG ile uyarılmış hücrelerde rekombinat protein üretimi ile uyarılmayan hücelere oranla oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir.

G. kaustophilus Lon proteaz geni GTG başlangıç kodonu ile başlamaktadır. Başlangıç kodonu tipik olarak *E. coli* 'de % 83 oranında ATG ile başlamaktadır. Alternatif olarak % 14 oranında GTG ve % 3 oranında TTG kodonlarını kullandığı bilinmektedir. *E. coli*'ye transforme edilen pGEX-6P1/lon plazmitin translasyonel etkinliğinin düşük olmasının sebeplerinden biri de bu olabileceği düşünülmektedir.

Lon proteazlar son yıllarda üzerlerinde birçok çalışmanın yapıldığı güncel bir konudur. Yapılan çalışmalar özellikle ökaryotik mitokondriyel Lon proteazlar üzerinde yoğunlaşmıştır. Lon proteazlar yaşlanma sonucu hücredeki miktarları artmakta olan, oksidatif proteinlerin birikiminin neden olduğu hastalıkların tedavisi için öncelikli bir araştırma konusudur. Ayrıca Lon proteazlar son birkaç yıl içinde kanser çalışmaları ve araştırmalarında da ilgi gösterilen önemli bir enzimdir. Özellikle hücre döngüsü ile ilgili düzenleyici rolü enzimi önemli bir çalışma konusu haline getirmiştir.

5. KAYNAKLAR

1. **Adam Z., Rudella A and Wijk K.C., 2006.** Recent advances in the study of Clp, FtsH and other proteases located in chloroplasts. *Current Opinion in Plant Biology*, 9:234–240
2. **Baker T.A. and Sauer R.T.** 2006. ATP-dependent proteases of bacteria: recognition logic and operating principles. *TRENDS in Biochemical Sciences* Vol.31 No.12
3. **Chandu D, Nandi D.** 2004 Comparative genomics and functional roles of the ATP-dependent proteases Lon and Clp during cytosolic protein degradation. *Research in Microbiology* 155, 710–719
4. **Chin D.T., Goff S.A., Webstern T, Smith T, and Goldberg A.L.** Sequence of the *lon* Gene in *Escherichia coli* The Journal of Biological Chemistry Vol. 263, No. 24. Issue of August 25, pp. 11718-11728,1988
5. **Confalonieri F, Duguet M.** 1995 A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function. [Bioessays](#). Jul;17(7):639-50. 1995
6. **Dervyn E, Canceill D and Huisman O, 1990** Saturation and Specificity of the Lon Protease of *Escherichia coli* Journal Of Bacteriology, Dec., p.7098-7103 1990

7. **Friguet B, Bulteau A.L. and Petropoulos I** 2008 Mitochondrial protein quality control: Implications in ageing *Biotechnol. J.*, 3, 757–764 2008
8. **[Gottesman S](#), [Wickner S](#), [Jubete Y](#), [Singh SK](#), [Kessel M](#), [Maurizi M](#).** Selective, energy-dependent proteolysis in *Escherichia coli*. [Cold Spring Harb Symp Quant Biol.](#);60:533-48 1995
9. **Gottesman S.** 1999 Regulation by proteolysis: developmental switches. [Curr Opin Microbiol.](#) Apr;2(2):142-7. 1999
10. **Gottesman S.** 2003 Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* Vol. 19: 565-587 2003.
11. **Gottesman S. And Maurizi M.** 1992. Regulation by Proteolysis: Energy-Dependent Proteases and Their Targets *Microbiological Reviews*, Dec., p. 592-621
12. **Inobe T. and Matouschek A.** 2008 Protein targeting to ATP-dependent proteases *Curr Opin Struct Biol.* February ; 18(1): 43–51. 2008
13. **Ishii Y. and Amano F.** 2001 *Regulation of Sula cleavage by Lon protease by the C-terminal amino acid of Sula, histidine* *Biochem. J.* 358, 473–480 (2001)
14. **J. A. Eastgate, N. Taylor, M. J. Coleman, B. Healy, L. Hompson, And I. S. Roberts** 1994 Cloning, Expression, and Characterization of the *lon* Gene of *Erwinia amylovora*: Evidence for a Heat Shock Response *Journal of Bacteriology*, Feb. 1995, p. 932–937 1994

15. **J. A. Eastgate, N. Taylor, M. J. Coleman, B. Healy, L. Thompson, And I. S. Roberts** Cloning, Expression, and Characterization of the *lon* Gene of *Erwinia amylovora*: Evidence for a Heat Shock Response *Journal Of Bacteriology*, Feb., p. 932–937 1995
16. **J.A. Littlechild¹, J. Guy, S. Connelly, L. Mallett, S. Waddell, C.A. Rye, K. Line and M. Isupov** 2007. Natural methods of protein stabilization: thermostable biocatalysts *Biochemical Society Transactions* Volume 35, part 6
17. **Koppen M, Langer T**, 2009 Protein Degradation within Mitochondria: Versatile Activities of AAA Proteases and Other Peptidases *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 42:221–242, 2007
18. **Kusmierczyk AR, Martin J**. 2001 Assembly of chaperonin complexes. [Mol Biotechnol](#). Oct;19(2):141-52. 2001
19. **Lee I. and Suzuki C.K.** 2008. Functional mechanics of the ATP-dependent Lon protease lessons from endogenous protein and synthetic peptide substrates. *Biochim Biophys Acta*. 1784(5): 727–735.
20. **Lu B, Yadav S, Shah P.G., Liu T., Tian B, Puksza B**, 2007. Roles for the Human ATP-dependent Lon Protease in Mitochondrial DNA Maintenance *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 282, NO. 24, pp. 17363–17374, 2007
21. **Martin J, Gruber M, Lupas AN**. 2004 Coiled coils meet the chaperone world. [Trends Biochem Sci](#). Sep;29(9):455-8 2004
22. **Maupin-Furlow J., Gil M.A., Humbard M.A., Kirkland P.A., Li W., Reuter C.J. and Wright A.J.** 2005. Archaeal proteasomes and

other regulatory proteases *Current Opinion in Microbiology*, 8:720–728

23. **Maurizi M., Trisler P and Gottesman S.** 1985 Insertional Mutagenesis of the lon Gene in *Escherichia coli*: lon Is Dispensable *Journal Of Bacteriology*, Dec., p. 1124-1135 1985
24. **Mogk A, Dougan D, Weibezahn J, Schlieker C, Turgay K, Bukau B** 2004 Broad yet high substrate specificity: the challenge of AAA+ proteins. *J Struct Biol.* Apr-May;146(1-2):90-8. 2004
25. **Mogk A., Haslberger T, Tessarz P and Bukau B** 2008 Common and specific mechanisms of AAA+ proteins involved in protein quality control. *Biochemical Society Transactions Volume 36*, part
26. **Mori E, Fulchieri M, Indorato C, Fani R, And Bazzicalupo M.** 1996. Cloning, Nucleotide Sequencing, And Expression Of The *Azospirillum Brasilense Lon* Gene: Involvement In Iron Uptake *Journal Of Bacteriology*, June 1996, P. 3440–3446 1996.
27. **Neuwald AF.** 1999 The hexamerization domain of N-ethylmaleimide-sensitive factor: structural clues to chaperone function. [Structure](#). Feb 15;7(2):R19-23 1999
28. **Ngo J.K. And Davies J.A.** 2007 Importance of the Lon Protease in Mitochondrial Maintenance and the Significance of Declining Lon in Aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1119: 78–87.
29. **Numata¹ N., Kon T., Shima T., Imamula K., Mogami T., Ohkura R., Sutoh K. and Sutoh K.** 2008. Molecular mechanism of force generation by dynein, a molecular motor belonging to the AAA+ family *Biochem. Soc. Trans.* 36, 131–135; doi:10.1042/BST0360131

30. **Ogura T.** Diseases and developmental disorders caused by mutations in genes encoding AAA and AAA+ proteins, [Seikagaku](#). Sep;73(9):1159-62. 2001
31. **Oxana V. Vasilyeva, Kristina B. Kolygo, Yulia F. Leonova, Natalia A. Potapenko, Tatyana V. Ovchinnikova** 2002 Domain structure and ATP-induced conformational changes in Escherichia coli protease Lon revealed by limited proteolysis and autolysis FEBS Letters 526 66^70 2002
32. **Park S.C., Jia B., Yang J.K., Van D.L., Shao Y.G., Han S.W., Jeon Y.J., Chung J.H., and Cheong G.W.** 2005. Oligomeric Structure of the ATP-dependent Protease La (Lon) of *Escherichia coli*. Mol. Cells, Vol. 21, No. 1, pp. 129-134 2005
33. **Riethdorf S., Volker U, Gerth U, Winkler A., Engelmann S., and Hecker M.** 1994 Cloning, Nucleotide Sequence, And Expression Of The *Bacillus Subtilis Lon* Gene. Journal of Bacteriology, Nov. 1994, P. 6518-6527 1994
34. **Schmidt M., Lupas A.N. and Finley D.** 1999 Structure and mechanism of ATP-dependent proteases Current Opinion in Chemical Biology, 3:584–591 1999
35. **Snider J and Houry W.A.** 2008. AAA+ proteins: diversity in function, similarity in structure Biochemical Society Transactions Volume 36, part 1
36. **Takami H, Nishi S, Shimamura J.L., Takaki Y.,** 2004 Genomic characterization of thermophilic Geobacillus species isolated from the deepest sea mud of the Mariana Trench Extremophiles (2004) 8:351–356
37. **Takami H, Takaki Y, Chee G.J. , Nishi S, Shimamura S, Suzuki S., Matsui S. and Uchiyama I.** 2004 Thermoadaptation trait

revealed by the genome sequence of thermophilic *Geobacillus kaustophilus* *Nucleic Acids Research*, , Vol. 32, No. 21 6292–6303 2004

38. **Tislibaris V, Maenhaut-Michel G., Melderer L.**, 2006. Biological roles of the Lon ATP-dependent protease *Research in Microbiology* 157 (2006) 701–713
39. **Tojo N., Inouye S. and Komano T.**, 1993 Cloning and Nucleotide Sequence of the *Myxococcus xanthus lon* Gene: Indispensability of *lon* for Vegetative Growth *Journal Of Bacteriology*, Apr. 1993, p. 2271-2277 1993
40. **Van Dinten LC, Rensen S, Gorbalenya AE, Snijder EJ.** 1999 Proteolytic processing of the open reading frame 1b-encoded part of arterivirus replicase is mediated by nsp4 serine protease and is essential for virus replication. [J Virol](#). Mar;73(3):2027-37. 1999
41. **Vineyard D, Patterson-Ward J, and Lee I** 2006 Single Turnover Kinetic Experiments Confirm the Existence of High and Low Affinity ATPase Sites in *Escherichia coli* Lon Protease *Biochemistry*. April 11; 45(14): 4602–4610. 2006
42. **Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ** 1982 Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. [EMBO J](#).;1(8):945-51. 1982
43. **Wang N., Gottesman S., Willingham M.C., Gottesman M.M., and Maurizi M.** 1993 A human mitochondrial ATP-dependent protease that is highly homologous to bacterial Lon protease *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 90, pp. 11247-11251, December 1993

44. **Watanabe S., Muramatsu T., Ao H., Hirayama Y., Takahashi K., Tanokura M. and Kuchino Y.** 1999. Molecular cloning of the Lon protease gene from *Thermus thermophilus* HB8 and characterization of its gene product *Eur. J. Biochem.* 266 811-819 FEBS 1999

45. **Wenzel T, Baumeister W.** 1995 Conformational constraints in protein degradation by the 20S proteasome. [Nat Struct Biol.](#) Mar;2(3):199-204. 1995

ÖZGEÇMİŞ

Haluk CAMCI 21 Mart 1982 günü Kartal / İstanbul'da dünyaya geldi. İlk ve Orta öğretimini Nihat Erim İlköğretim Okulunda tamamladı. Lise Eğitimini Kartal Süleyman Demirel Lisesinde tamamladı. 1999 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2005 yılında mezun oldu.

2005 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı. Halen ortağı olduğu özel bir firmada iş hayatına devam etmektedir.