

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

PROTEİN KALİTE KONTROLÜNDE GÖREV ALAN
FtsH-HflKC PROTEİN KOMPLEKSİNİN YAPISAL BİYOLOJİSİ

GÜNCE GÖÇ

KOCAELİ 2023

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**PROTEİN KALİTE KONTROLÜNDE GÖREV ALAN FtsH-HflKC
PROTEİN KOMPLEKSİNİN YAPISAL BİYOLOJİSİ**

GÜNCE GÖÇ

Doç. Dr. Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ

Danışman, Kocaeli Üniversitesi

.....

Dr. Öğr. Üyesi Gülsüm Ebru ÖZER UYAR

Jüri Üyesi, Kocaeli Üniversitesi

.....

Prof. Dr. Tunca DOĞAN

Jüri Üyesi, Hacettepe Üniversitesi

.....

Doç. Dr. Gökhan DURUKSU

Jüri Üyesi, Kocaeli Üniversitesi

.....

Doç. Dr. Burcu KAPLAN TÜRKÖZ

Jüri Üyesi, Ege Üniversitesi

.....

Dr. Burak Veli KABASAKAL

Eş Danışman, Türk Hızlandırıcı ve Işınlama Lab.

Enstitü Yönetim Kurulunun
02/01/2020 tarih ve 2020/01 nolu
toplantısında II. tez danışmanı
olarak atanmıştır.

Tezin Savunulduğu Tarih: 21.12.2023

ETİK BEYAN VE ARAŞTIRMA FONU DESTEĞİ

Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez/proje çalışmada,

- Bu tezin/projenin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu,
- Çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı,
- Bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi,
- Bu çalışmanın Kocaeli Üniversitesi'nin abone olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun olduğunu,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Tezin/Projenin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez/proje çalışması olarak sunmadığımı,

beyan ederim.

Bu tez/proje çalışması kapsamında üretilen veri ve bilgiler TÜBİTAK, Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü ve Türk Hızlandırıcı ve Işınım Laboratuvarı (TARLA) tarafından sırası ile 118C225, FDK-2021-2613 no'lu projeler kapsamında maddi/alt yapı desteği alınarak gerçekleştirilmiştir.

Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

.....
Günce Göç

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI

Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/projemin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda belirtilen koşullarla kullanıma açma izninin Kocaeli Üniversitesi'ne verdiğimi beyan ederim. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet hakları bende kalacak, tezimin/projemin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki makale, kitap, tebliğ, lisans, patent gibi çalışmalarda kullanımı, danışmanımın isim hakkı saklı kalmak koşuluyla ve her iki tarafın bilgisi dâhilinde bana ait olacaktır. Tezin/projenin kendi özgün çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin/projenin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricinde YÖK Ulusal Tez Merkezi/ Kocaeli Üniversitesi Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- ☐ Enstitü yönetim kurulu kararı ile tezimin/projemin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- ☒ Enstitü yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin/projemin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 6 ay ertelenmiştir.
- ☐ Tezim/projem ile ilgili gizlilik kararı verilmemiştir.

.....
Günce Göç

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, *Escherichia coli* FtsH-HflKC membran protein kompleksinin, günümüz antibiyotik direncine karşı yeni antibiyotiklerin elde edilebilmesi amacıyla biyokimyasal karakterizasyonu ve yapısal analizi üzerine gerçekleştirilmiştir.

Doktora sürecimde tüm imkanlarıyla Yapısal Biyoloji'nin her alanında bulunmamı sağlayan eş danışmanım Sayın Dr. Burak V. KABASAKAL'a ve beni her koşulda destekleyen danışmanım Sayın Doç. Dr. Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ'a teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmalarımın gerçekleşmesi için bana laboratuvarında çalışma fırsatı veren ve tecrübeleriyle yol gösteren Sayın Dr. Öğr. Üyesi Süreyya ÖZCAN KABASAKAL'a, çoğu zaman sayesinde enerji kazandığımız Sayın Dr. Burak BİLKİ'ye, laboratuvar ekip arkadaşlarım Nasim ALLAHYARI, Hatice AKKULAK, Hayri Kerim İNCE, Tuğberk KARAKAŞ, Mehmet ÇALISEKİ, Sema AYGAR'a; stajyerlerimiz Zeynep ÇOLAK, Ebru AVCI, Sernur Sena YILDIZ ve Elif Büşra KARAKAYA'ya; doktora sürecimde her konuda her zaman yanımda olan dostlarım Damla ATAKENT, Güneş CANBAY, Gizem BİTER, Buse AKBAY, Elif KALE, Çiğdem KARAHASAN ve can dostum Semih IŞIK'a çok teşekkür ederim.

Bu tezi, küçüklüğümden beri bana bilimi sevdiren ve bu yolda bana ışık olan canım babam Aykut GÖÇ'e, bugün kendimi gerçekleştirebilmem için tüm fedakarlıkları yapan canım annem Deniz GÖÇ'e, biricik kardeşim Doğukan GÖÇ'e ve doktora yolculuğumda desteğini hep yanımda hissettiğim nişanlım Ali Can CANBAY'a ithaf etmekten onur duyarım.

Tez çalışmamı destekleyen TÜBİTAK'a (Proje Numarası: 118C225), Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje Numarası: FDK-2021-2613) birimine ve altyapı desteği için Türk Hızlandırıcı ve Işınım Laboratuvarı'na şükranlarımı sunarım.

Aralık 2023

Günce GÖÇ

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN VE ARAŞTIRMA FONU DESTEĞİ.....	i
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Protein Kalite Kontrolü.....	3
2.1.1. Moleküler Şaperonlar	3
2.1.2. Proteolitik Sistemler	4
2.2. Hücrede Membran Denetimi	6
2.3. Membran Proteinleri	7
2.4. AAA+ Proteazlar ve FtsH.....	14
2.4.1. FtsH'nin Biyokimyasal Özellikleri	16
2.4.2. FtsH'nin Yapısal Özellikleri	17
2.4.3. FtsH'nin Substratları	20
2.5. Stomatin, Prohibitin, Flottilin ve HflK/C (SPFH) Domaini	22
2.6. FtsH-HflKC Kompleksi.....	24
2.7. Elektron Kriyo-Mikroskopisi (Kriyo-EM)	26
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	32
3.1. Malzemeler	32
3.2. Yöntem.....	32
3.2.1. Klonlama ve Transformasyon Stratejileri	32
3.2.2. Ekspresyon Optimizasyonu	34
3.2.3. Solübilizasyon ve Saflaştırma Deneyleri	35
3.2.4. Farklı Deterjanların Saflaştırma Üzerine Etkisi ve Amfipol.....	36
3.2.5. ATPaz Aktivite Deneyleri	37
3.2.6. Proteaz Aktivite Deneyleri	37
3.2.7. Transmisyon Elektron Mikroskopisi Analizleri	38
3.2.8. Kriyo-Elektron Mikroskobu ile Veri Toplama.....	38
3.2.9. Küçük Açılı X-ışını Saçılım (SAXS) Deneyi.....	40
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	41
4.1. FtsH-HflKC'nin Ekspresyonu ve Saflaştırılması	41
4.2. HflKC'nin Ekspresyonu ve Saflaştırılması.....	53
4.3. FtsH ve FtsH-HflKC'nin Biyokimyasal Karakterizasyonu	58
4.3.1. FtsH ve FtsH-HflKC'nin ATPaz Aktivitesi	58
4.3.2. FtsH ve FtsH-HflKC'nin Proteolitik Aktivitesi	63
4.4. Transmisyon Elektron Mikroskopisi (TEM) Analizleri	66
4.5. FtsH-HflKC'nin Yapısal Karakterizasyonu.....	68
4.5.1. Kriyo-EM Tekli Parçacık Veri Toplama Parametreleri	69
4.5.2. RELION 4.1'de Tekli Parçacık Görüntü İşleme Süreci.....	69
4.5.3. CryoSPARC'ta Tekli Parçacık Görüntü İşleme Süreci.....	76
4.5.4. Küçük Açılı X-ışını Saçılım Analizi	90

4.6. FtsH-HflKC'nin Yapısal Analizi	93
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	101
KAYNAKLAR.....	103
EKLER	115
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER.....	121
ÖZGEÇMİŞ.....	123



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Şaperonların dahil oldukları metabolik faaliyetlerin şematik gösterimi.	4
Şekil 2.2.	FtsH'nin proteaz aktivitesinin gerçekleştiği aktif merkezdeki metal iyonunun gösterimi	6
Şekil 2.3.	Membran proteinlerinin sınıflandırılması.....	8
Şekil 2.4.	Yapıları Kriyo-Elektron Mikroskopu ile elde edilen ve özelliklerine göre α heliks ya da β -fiçısına sahip integral membran proteinlerinin PyMOL'da gösterimi	9
Şekil 2.5.	SecYEG translokunun katıldığı metabolik süreçler	10
Şekil 2.6.	Membran proteininin solübilizasyon süreci.....	12
Şekil 2.7.	DDM'in yapısı (kimyasal formül: $C_{24}H_{46}O_{11}$)	12
Şekil 2.8.	LMNG'nin yapısı (Kimyasal formül: $C_{47}H_{88}O_{26}$)	13
Şekil 2.9.	Amfipollerin yapısı (Kimyasal formül: $(C_{6.2}H_{10.3}O_{1.35}N_{0.65}Na_{0.35})_{72}$).....	13
Şekil 2.10.	Seçili türlerin FtsH ortologlarının filogenetik analizi.....	15
Şekil 2.11.	FtsH'nin proteolitik aktivitesinin şematik gösterimi (PDB: 7WI4)	17
Şekil 2.12.	FtsH'nin periplazmik domaininde Walker A ve Walker B motiflerinin gösterimi (PDB: 7WI4)	18
Şekil 2.13.	Hekzamerik FtsH membran proteininin ATPaz domainini içeren sitozolik kısımlarının C3 (A), C2 (B) ve C6 (C)sahip olduğu farklı konformasyonları	19
Şekil 2.14.	Kriyo-EM ile yoğunluk haritası 3,4 Å çözünürlükte elde edilen YME1 iç mitokondriyal membran proteini (PDB: 6AZ0)	19
Şekil 2.15.	HflK ve HflC membran proteinlerinin bulunduğu SPFH domainindeki seçili türlerden oluşan filogenetik analiz	23
Şekil 2.16.	HflK ve HflC membran proteinlerinin yapıları (PDB: 7VHP).....	24
Şekil 2.17.	FtsH-HflKC kompleks membran proteinin 6,8 Å çözünürlükte Kriyo Elektron Mikroskopu ile elde edilen yapısı (PDB: 7VHP)	25
Şekil 2.18.	Kriyo-EM'nin çalışma prensibi	26
Şekil 2.19.	Kriyo-EM tekniğinde görüntü işleme sürecinin detaylı (A) ve şematik gösterimi (B).....	28
Şekil 2.20.	Yapısal Biyolojide protein yapı analizi için kullanılan tekniklerin dağılım yüzdeleri	29
Şekil 2.21.	Yıllara göre farklı tekniklerle elde edilen yapıların logaritmik ölçekteki sayıları	30
Şekil 2.22.	EMDB verilerine göre, Kriyo-EM ile elde edilen yoğunluk haritalarının yıllara göre çözünürlük dağılımları	30
Şekil 3.1.	Restriksiyon enzimleri ile plazmitlerin kesimi sonrası agaroz jelde görüntülenmesi beklenen bantlar	33
Şekil 3.2.	Küçük ölçekli ekspresyon testi koşulları	35
Şekil 3.3.	RELION 4.1 (A) ve CryoSPARC (B) programlarının ara yüzleri	39
Şekil 4.1.	pAce-HflKC-His10_x_pDS-FtsH-3strep (10419 bç) ve pAce-HflKC-His10 (4817 bp) plazmitlerin izolasyonları ve restriksiyon enzimleri kesim sonuçları	42
Şekil 4.2.	pAce-HflKC-His10_x_pDS-FtsH-3strep (10419 bç) plazmitinin BL21 (DE3) (A), Lemo21 (B) ve pozitif kontrol (C) sonuçları	42
Şekil 4.3.	FtsH-HflKC plazmitini içeren <i>E. coli</i> Lemo21 (DE3) ve BL21 (DE3) hücrelerinin büyüme grafiği	43

Şekil 4.4.	FtsH-HflKC plazmitini içeren BL21 (DE3) ve Lemo21 (DE3) konak hücrelerinin membran ayırma işlemi sonrası optimum ekspresyon koşulunun bulunması amacı ile yapılan SDS-PAGE (%12) analizi	45
Şekil 4.5.	FtsH-HflKC membran protein kompleksinin Kobalt reçinesi ve Streptaktin reçinesi (Strep etiketi) ile saflaştırma sonuçlarının SDS-PAGE (%12) analizi	49
Şekil 4.6.	FtsH-HflKC'nin Streptaktin reçinesi ile saflaştırma sonuçlarının SDS-PAGE (%12) analizi	50
Şekil 4.7.	FtsH-HflKC'nin Doğal Jel (%3-8) analizi.....	50
Şekil 4.8.	FtsH-HflKC membran protein kompleksinin Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi sonuçları	52
Şekil 4.9.	HflKC membran protein kompleksini kodlayan plazmitin doğrulanma süreci.....	53
Şekil 4.10.	HflKC'nin küçük ölçekli ekspresyon testinin SDS-PAGE (%12) analizi.....	55
Şekil 4.11.	Saflaştırılan HflKC membran protein kompleksinin saflaştırma sonuçlarının SDS-PAGE (%12) analizi.....	56
Şekil 4.12.	ATPaz aktivitesinin ölçüm mekanizması	58
Şekil 4.13.	Fosfat Standart Eğrisi	59
Şekil 4.14.	Farklı konsantrasyonlarda Adenozin 5-Trifosfataz ile zamana karşı gerçekleştirilen kontrol deneyi sonuçları	59
Şekil 4.15.	FtsH ve FtsH-HflKC'nin 1, 5 ve 10 mM ATP konsantrasyonlarında serbest fosfat salınımları	60
Şekil 4.16.	FtsH ve FtsH-HflKC'nin 1, 5 ve 10 mM ATP konsantrasyonlarında spesifik aktivitesi	61
Şekil 4.17.	FtsH'nin 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 ve 20 mM ATP varlığında ATPaz aktivite ölçümleri ile oluşturulan Lineweaver-Burk grafiği	62
Şekil 4.18.	FtsH-HflKC'nin 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 ve 20 mM ATP varlığında ATPaz aktivite ölçümleri ile oluşturulan Lineweaver-Burk grafiği	63
Şekil 4.19.	Tripsin ile %0,4 kazein kullanılarak gerçekleştirilen proteolitik aktivite kontrol deneyi	63
Şekil 4.20.	FtsH ve FtsH-HflKC'nin %0,4 kazein ile 37 °C'de gerçekleştirilen proteolitik aktivite deney sonuçları	64
Şekil 4.21.	FtsH ve FtsH-HflKC'nin %0,4 kazein kullanılarak ATP varlığı ve yokluğunda 50 °C'de gerçekleştirilen proteolitik aktivite sonuçları	65
Şekil 4.22.	FtsH-HflKC'nin DDM içerisindeki elektron mikrosafı (100000x)	67
Şekil 4.23.	FtsH-HflKC'nin amfipol içerisindeki elektron mikrosafı (72000x).....	67
Şekil 4.24.	FtsH-HflKC'nin LMNG içerisindeki elektron mikrosafı (58000x)	68
Şekil 4.25.	FtsH-HflKC örneğinin mikrosafıların Kontrast Transfer Fonksiyonu tahmini ile Fourier Dönüşümü	70
Şekil 4.26.	FtsH-HflKC parçacıkları içeren otomatik seçim sonucu.....	70
Şekil 4.27.	VDAM (A) ve EM (B) algoritması kullanılarak oluşturulan iki boyutlu FtsH-HflKC parçacık sınıfları	71
Şekil 4.28.	Farklı parametreler denenerek gerçekleştirilen <i>ab-initio</i> modellerinin görüntüleri ve yapıları.....	72
Şekil 4.29.	Üç Boyutlu Sınıflandırma için kullanılan <i>ab-initio</i> modeli.....	72

Şekil 4.30. Birinci Üç Boyutlu Sınıflandırma sonuçlarının görüntüleri ve yapıları	73
Şekil 4.31. İkinci Üç Boyutlu Sınıflandırma sonuçlarının görüntüleri ve yapıları	73
Şekil 4.32. Üçüncü Üç Boyutlu Sınıflandırma sonucunun görüntüsü ve yapısı.....	74
Şekil 4.33. Üç Boyutlu İyileştirme sonucunun görüntüsü ve yapısı.....	74
Şekil 4.34. FtsH-HflKC haritasının RELION 4.1’de tek parçacık görüntü işleme iş akış süreci	76
Şekil 4.35. Buz içerisinde farklı yüksekliklerdeki proteinlerin (A) CryoSPARC’ta Kontrast Transfer Fonskiyon Tahmini işlemi ve (B) Fourier dönüşümü ile sinyali oluşturulma (C) süreci	77
Şekil 4.36. CryoSPARC’ta parçacık seçimi, inceleme ve ekstraksiyon süreci	77
Şekil 4.37. İki Boyutlu Sınıflandırma sonucundan seçilen 9 sınıf.....	78
Şekil 4.38. Dokuz sınıfla tekrarlanan ikinci iki boyutlu 22 sınıf.....	78
Şekil 4.39. Yirmi iki sınıfla tekrarlanan üçüncü iki boyutlu 45 sınıf	79
Şekil 4.40. Şablon ile parçacık seçimi, inceleme işlemi ve ekstraksiyon sonuçları.	79
Şekil 4.41. Seçilen parçacıklarla tekrarlanan iki boyutlu sınıflar	80
Şekil 4.42. C6 simetrisi ve bir sınıftan oluşan <i>ab-initio</i> modelinin gerçek uzay projeksiyonu ve modelleri	80
Şekil 4.43. C6 simetrisi ve iki sınıftan oluşan <i>ab-initio</i> modelinin gerçek uzay projeksiyonu ve modelleri	81
Şekil 4.44. C4 simetrisi ve iki sınıftan oluşan <i>ab-initio</i> modelinin gerçek uzay projeksiyonu ve modelleri	81
Şekil 4.45. C2 simetrisi ve iki sınıftan oluşan <i>ab-initio</i> modelinin gerçek uzay projeksiyonu ve modelleri	81
Şekil 4.46. C12 simetrisi ve iki sınıftan oluşan <i>ab-initio</i> modelinin gerçek uzay projeksiyonu ve modelleri	82
Şekil 4.47. C6 simetrisinde tek sınıf <i>ab-initio</i> modelin mesafe dağılım grafiği	83
Şekil 4.48. C6 simetrisinde iki sınıf <i>ab-initio</i> modelin mesafe dağılım grafiği.....	83
Şekil 4.49. C4 simetrisinde iki sınıf <i>ab-initio</i> modelin mesafe dağılım grafiği.....	84
Şekil 4.50. C2 simetrisinde iki sınıf <i>ab-initio</i> modelin mesafe dağılım grafiği.....	84
Şekil 4.51. C12 simetrisinde iki sınıf <i>ab-initio</i> modelin mesafe dağılım grafiği.....	85
Şekil 4.52. C1 simetrisi ile bir ve iki sınıftan oluşan <i>ab-initio</i> modellerinin gerçek uzay projeksiyonu ve modelleri	86
Şekil 4.53. <i>Ab-initio</i> modeller ile farklı simetritelerde gerçekleştirilen uniform olmayan ve heterojen iyileştirme sonuçları	87
Şekil 4.54. Başlangıç modelleri kullanılarak UCSF ChimeraX – Segger ile oluşturulan maskeler	87
Şekil 4.55. Model 4 ve maskesi ile üç boyutlu sınıflandırma sonuçları.	88
Şekil 4.56. Model 5 ve maskesi ile oluşturulan üç boyutlu sınıflandırma sonuçları.....	88
Şekil 4.57. Model 7 ve maskesi ile oluşturulan üç boyutlu sınıflandırma sonuçları.....	89
Şekil 4.58. Uniform olmayan iyileştirmelerin GSFSC eğrilerine bağlı çözünürlük grafikleri	90
Şekil 4.59. SEC-SAXS analizine gönderilmeden yapılan FtsH-HflKC saflaştırma sonuçlarının SDS-PAGE (%12) analizi	91

Şekil 4.60. FtsH-HflKC'nin elüsyon profilinin (A) CHROMIXS, (B) Primus grafikleri.....	91
Şekil 4.61. FtsH-HflKC'nin mesafe dağılım fonksiyonu $p(r)$ 'a karşılık gelen r (nm) değerlerinin grafiği.....	92
Şekil 4.62. FtsH-HflKC'nin SEC-SAXS sonucundan DAMMIF ile oluşturulan modelin üstten ve alttan görünümü	92
Şekil 4.63. FtsH-HflKC Kriyo-EM haritaları (RELION 4.1 (A), CryoSPARC (B)) ile SAXS (yeşil) hizalama sonucu.....	93
Şekil 4.64. RELION 4.1 ile elde edilen FtsH-HflKC haritasında (A) pembe ile gösterilen HflKC'nin üstten (B), alttan (C) ve gri ile gösterilen FtsH'nin üstten (Ç), alttan (D) görünümü	94
Şekil 4.65. CryoSPARC ile elde edilen (A) FtsH-HflKC haritasında HflKC'nin üstten (B) ve FtsH'nin (C) alttan görünümü	94
Şekil 4.66. İki hekzamerik FtsH içeren iki boyutlu FtsH-HflKC membran kompleks protein sınıfları	95
Şekil 4.67. RELION 4.1 (A) ve CryoSPARC (B) ile elde edilen FtsH-HflKC haritasının PDB: 7WI3 ve 7WI4 ile hizalama sonucunun yandan görünümü	96
Şekil 4.68. RELION 4.1 ile elde edilen FtsH-HflKC haritasında boyut ölçümleri	97
Şekil 4.69. CryoSPARC ile elde edilen FtsH-HflKC haritasında boyut ölçümleri	97
Şekil 4.70. HflKC dimerinin AlphaFold yapılarının, RELION 4.1 (A) ve CryoSPARC (B) haritasına fit ettirme sonucu	100

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1. <i>E. coli</i> FtsH'nin substratları ve tanıma mekanizmaları	21
Tablo 3.1. Plazmitlerin kesimi için gerçekleştirilen reaksiyon içeriği.....	33
Tablo 3.2. Proteaz aktivitesi için hazırlanan solüsyonlar ve içerikleri.	37
Tablo 3.3. Proteaz aktivitesi için hazırlanan reaksiyon karışımı.	38
Tablo 4.1. İzolasyon sonrası plazmit konsantrasyonları	41
Tablo 4.2. FtsH-HflKC membran protein kompleksinin ifadesi için optimizasyon koşulları.....	44
Tablo 4.3. FtsH-HflKC membran protein kompleksinin ekspresyon optimizasyon sonucu gerçekleştirilen sonikasyon ve membran ayırma işlemi ile elde edilen protein konsantrasyonları.	45
Tablo 4.4. Strep-Etiketi ve His-Etiketi ile elde edilen örneklerin protein konsantrasyon karşılaştırmaları.	48
Tablo 4.5. İki farklı deterjan ile yapılan saflaştırmalarının konsantrasyon sonuçları.....	51
Tablo 4.6. HflKC membran protein kompleksinin küçük ölçekli ekspresyon testinde tercih edilen koşullar	54
Tablo 4.7. Küçük ölçekli ekspresyon testi sonuçlarına göre protein konsantrasyonları	55
Tablo 4.8. HflKC saflaştırma sürecinde konsantrasyon sonuçları.....	57
Tablo 4.9. Bağlı proteolitik aktiviteler	65
Tablo 4.10. Çoklu gövde iyileştirme işlemi için optimize edilen parametreler	75
Tablo A.1. Laboratuvarında kullanılan ekipmanlar	117

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
=	: Eşittir
<	: Daha küçük
>	: Daha büyük
Å	: Angström
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
g	: Gram
kV	: Kilovolt
l	: Litre
M	: Molar
mAu	: Mili Absorbans Unit
mg/ml	: Miligram/mililitre
mM	: Milimolar
ng/µl	: Nanogram/mikrolitre
nm	: Nanometre
°C	: Santigrat derece
U/mg	: Unit/miligram
s	: Saniye
µmol/ml/dk	: Unit/mililitre/dakika

Kısaltmalar

ATP	: Adenozin Trifosfat
bç	: Baz Çifti
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EC	: Enzyme Commission (Enzim Komisyonu)
ftsh	: Filamentous temperature sensitive <i>h</i>
IPTG	: İzopropil β-D-tiyogalaktopiranozit
hfl	: High frequency lysogenization
GSFSC	: Gold-Standard Fourier Shell Correlation
kDa	: Kilodalton
Kriyo-EM	: Kriyo-Elektron Mikroskobu
MDa	: Megadalton
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
pI	: Isoelectric Point (İzoelektrik Noktası)
RPM	: Revolutions per Minute (Dakikada Devir Sayısı)
SAXS	: Small Scale X-ray Scattering (Küçük Açılı X-ışını Saçılımı)
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SEC	: Size Exclusion Chromatography (Büyükölçek Ayırma Kromatografisi)
SPFH	: Stomatin, Prohibitin, Flotilin ve HflKC
TEM	: Transmisyon Elektron Mikroskobu

PROTEİN KALİTE KONTROLÜNDE GÖREV ALAN FtsH-HflKC PROTEİN KOMPLEKSİNİN YAPISAL BİYOLOJİSİ

ÖZET

Escherichia coli membran proteini FtsH, AAA+ ATPaz ve metalloproteaz özelliklerine sahip, yanlış katlanmış veya hatalı proteinleri parçalayan bir proteindir. FtsH'nin proteolitik aktivitesi, HflKC tarafından düzenlenmektedir. Bu çalışma, FtsH-HflKC kompleksinin biyokimyasal karakterizasyonunu ve yapısal analizini içermektedir. FtsH-HflKC ve HflKC'nin rekombinant üretimi, Lemo21 (DE3) konak hücrelerinde optimize edilmiş, Streptaktin ve/veya Kobalt reçineleri kullanılarak saflaştırılmıştır. FtsH ve FtsH-HflKC'nin proteolitik deneyleri, ATP varlığı ve yokluğunda %0,4 kazein kullanılarak 574 nm'de 37 ve 50°C'de gerçekleştirilmiştir. Buna göre 37°C'de ATP yokluğunda FtsH'nin bağıl aktivitesi %100, ATP varlığında %90 olarak belirlenmiştir. FtsH, HflKC ile kompleks oluşturduğunda 37°C'deki ATP varlığında ve yokluğunda bağıl proteolitik aktivitesi sırasıyla %39 ve %40 olarak tespit edilmiştir. Sonuçlar, HflKC'nin FtsH'nin proteolitik aktivitesinde düşüşe neden olduğunu göstermiştir. ATPaz aktiviteleri, farklı ATP konsantrasyonlarında 360 nm'de incelenmiştir. 2 µM FtsH ve FtsH-HflKC'nin 10 mM ATP varlığında spesifik aktiviteleri sırasıyla 9,97 U/mg ve 3,85 U/mg olarak hesaplanmıştır. Yapısal analizde, FtsH-HflKC, TEM, Kriyo-EM ve SAXS ile incelenmiştir. RELION 4.1 ve CryoSPARC programlarında FtsH-HflKC'nin üç boyutlu haritaları elde edilmiştir. İki boyutlu sınıflandırmada FtsH-HflKC'nin dinamik yapısını koruduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle, RELION 4.1'de yapı, FtsH ve HflKC olarak iki ayrı harita şeklinde işlenmiş, CryoSPARC'ta kompleks yapı bir tutularak algoritması esneklik üzerine olan Uniform Olmayan İyileştirme işlemi gerçekleştirilmiştir. C6 simetrisinde olduğu SAXS deneyleriyle desteklenen ve ~27 nm büyüklüğündeki kompleksin çözünürlükleri; RELION 4.1'de FtsH için 8,8 Å, HflKC için 9,32 Å; CryoSPARC'ta tüm yapı için 9,25 Å olarak belirlenmiştir. Harita, hekzamerik FtsH yapısının altı HflKC dimeriyle kompleks oluşturduğunu göstermektedir. Bu araştırma, antibiyotik direnciyle mücadelede önemli katkılar sunarak yeni antibiyotiklerin geliştirilmesine yönelik fırsatlar sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: CryoSPARC, FtsH-HflKC, Kriyo-EM, RELION 4.1, SAXS.

STRUCTURAL BIOLOGY OF FtsH-HflKC PROTEIN COMPLEX INVOLVED IN PROTEIN QUALITY CONTROL

ABSTRACT

Escherichia coli membrane protein FtsH is an AAA+ ATPase and metalloprotease and cleaves misfolded proteins. Proteolytic activity of FtsH is regulated by HflKC. This study encompasses biochemical and structural analysis of FtsH-HflKC complex. Recombinant production of FtsH-HflKC and HflKC was optimized in Lemo21 (DE3) cells, purified using Streptactin and/or Cobalt resins. Proteolytic experiments of FtsH and FtsH-HflKC were conducted at 574 nm, using 0.4% casein, at 37 and 50°C, with and without ATP. At 37°C without ATP, FtsH exhibited a relative activity of 100%, while in presence of ATP, relative activity was 90%. Relative proteolytic activities of FtsH-HflKC were 39-40% in presence and absence of ATP, respectively. Results indicate that HflKC has down-regulatory effect on FtsH's proteolytic activity. ATPase activities were performed at 360 nm under different ATP concentrations. Specific activities of FtsH and FtsH-HflKC are found 9.97 U/mg and 3.85 U/mg, respectively. Structural analysis employed TEM, Cryo-EM, and SAXS for FtsH-HflKC. Three-dimensional maps were obtained using RELION 4.1 and CryoSPARC. Two-dimensional classification revealed dynamic structure preservation of FtsH-HflKC. Separate maps as FtsH and HflKC were generated in RELION 4.1, while in CryoSPARC, structure was processed as FtsH-HflKC. SAXS experiments confirming C6 symmetry, ~27 nm-sized particles have resolutions of 8.8Å for FtsH and 9.32Å for HflKC in RELION 4.1, and 9.25Å for the entire structure in CryoSPARC. Maps indicate formation of complex with a hexameric FtsH structure and six HflKC dimers. This research makes a significant contribution to combating antibiotic resistance by providing opportunities for the development of novel antibiotics.

Keywords: CryoSPARC, FtsH-HflKC, Cryo-EM, RELION 4.1, SAXS.

1. GİRİŞ

Membran proteinleri hücrede yapılarının bir kısmı membrandaki lipid çift tabakaya gömülü olarak bulunan proteinlerdir. Bu sayede, hücrenin dış ve iç ortam arasında bir geçit oluşturarak membran fonksiyonunda ve madde taşıma, sinyalleşme gibi birçok önemli hücresel faaliyette önemli bir rol üstlenmektedir. Membran proteinleri tüm hücre proteomunun %25'ten fazlasını oluşturmaktadır (Krogh ve diğ., 2001). Membran proteinlerinin doğru işleve sahip olabilmesi için, doğru konumda bulunmaları gerekmektedir. Bu nedenle, proteinlerin membran içindeki konumu, yapısı ve etkileşimi, hücre membranının doğru çalışmasında kritik önem taşımaktadır (Torres ve diğ., 2003; Engelman, 2005). Örneğin ilaç tasarımı, potansiyel ilaç hedeflerinin belirlenmesi, sentezlenmesi; etkinlik ve güvenliklerinin test edilmesi gibi karmaşık bir süreç söz konusudur. Membran proteinleri birçok fizyolojik süreç ve hastalıkta yer almaları nedeniyle önemli ilaç hedeflerindendir ve hidrofobik doğaları ve karmaşık yapıları nedeniyle çalışılması zor olan proteinler arasında yer almaktadır. Ancak, X-ışını kristalografisi ve kriyo-elektron mikroskobu (Kriyo-EM) gibi yapısal biyoloji tekniklerindeki son gelişmeler, birçok membran proteinin yüksek çözünürlüklü yapılarının belirlenmesine olanak sağlamış, işlevleri ve mekanizmaları hakkında değerli bilgiler sunmuştur (Birch ve diğ., 2020). Membran proteinleri, protein translokasyonu olarak bilinen süreçle hücresel membrana entegre edilmektedir (Kudva ve diğ., 2013; Denks ve diğ., 2014). Bu işlem sırasında protein kalite kontrolü, şaperonlar ve proteazlar tarafından gerçekleştirilmektedir. AAA+ proteaz ailesinin metalloproteaz üyesi olan FtsH (EC 3.4.24.-), yanlış katlanmış integral membran proteinlerini parçalayan, ATP bağımlı bir endonükleazdır. İki N-terminal transmembran heliks, bir sitoplazmik ATPaz ve çinko bağlama bölgesi olan bir C-terminal metalloproteaz domainine sahiptir (Dalbey ve diğ., 2012). Yapılan çalışmalar, FtsH'nin SPFH (Stomatinler, Prohibitinler, Flotillinler ve HflKC) protein ailesine bağlı HflK ve HflC'nin hekzamer formları ile bir araya gelerek büyük bir kompleks oluşturduğunu göstermiştir (Kihara ve diğ., 1996; Kihara ve diğ., 1998; Saikawa ve diğ., 2004). Ancak FtsH'nin dört hekzamer formunun, HflK ve HflC'nin on iki kopyası ile bir araya geldiği, C4 simetrisinde “kafes” formu oluşturdukları rapor edilmiştir (Qiao ve diğ., 2022). HflKC'nin oluşturduğu bu kafes formunun FtsH'nin sahip olduğu proteolitik aktiviteyi inhibe ederek substratların

degradasyonunu önleyici rol üstlendiği düşünülmektedir (Kihara ve diğ., 1996, 1997, 1998; Akiyama, 2009; Langklotz ve diğ., 2012; Qiao ve diğ., 2022).

Bu tezin amacı FtsH-HflKC membran protein kompleksinin hücrede sahip olduğu rolleri aydınlatmak ve hücrede üretilen proteinlerin kalite kontrol süreci ile FtsH-HflKC membran proteini arasındaki bağlantıyı anlamaktır. Bu doğrultuda rekombinant ekspresyon *E. coli* Lemo21 (DE3) hücreleri kullanılarak gerçekleştirildi, hücre peletleri sonikasyon ile parçalandı ve sonrasında membran ayırma işlemi yapıldı. Bu süreci takiben membran hafif deterjanlar kullanılarak çözdürüldü ve afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Protein-protein etkileşimleri ve varsayılan protein komplekslerini doğrulamak için kütle spektrometresi kullanıldı. Protein komplekslerinin stokiyometrisi büyüklükçe ayırma kromatografisi ve doğal jel elektroforezi ile belirlendi. FtsH-HflKC protein kompleksinin etki mekanizmasını anlamak için FtsH membran proteini saflaştırıldı, bu doğrultuda proteolitik aktivite ve ATPaz aktivite testleri gerçekleştirildi. Kriyo-elektron mikroskopisi (Kriyo-EM) tekniği ile RELION 4.1 (Scheres, 2012) programında FtsH 8,8 Å; HflKC ise 9,32 Å; CryoSPARC (Punjani ve diğ., 2017) programında ise FtsH-HflKC kompleks yapısı 9,25 Å çözünürlüğünde elde edildi.

Bu çalışma, FtsH-HflKC membran protein kompleksinin nasıl işlediğini ve membran protein biyogenezinde bu iki proteinin nasıl iş birliği yaptıklarını ortaya çıkarmaktadır. Elde edilen sonuçlar, dirençli bakteri suşlarının neden olduğu giderek artan antimikrobiyal direnç tehdidinin üstesinden gelmek için yeni antibiyotiklerin geliştirilmesine önemli bilgiler sağlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Protein Kalite Kontrolü

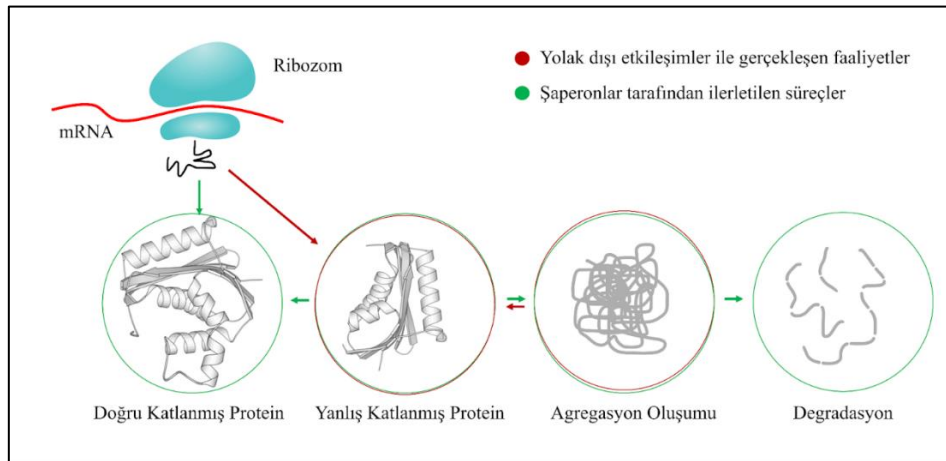
Bir genom tarafından kodlanan proteinlerin tamamına “Proteom” adı verilmektedir (Ansari ve Strom, 2010) ve canlılığın temel işlevlerini getiren yapı taşları olduğu göz önüne alındığında, sıkı bir denetim altında olmaları kaçınılmazdır (Marques ve diğ., 2009; Saha ve diğ., 2020). Bu denetim, dolaylı veya doğrudan hücredeki tüm sistemler tarafından gerçekleştirilmektedir. Süreçlerin bu kadar hassas gerçekleşmesinin nedeni, bu sistemlerde meydana gelebilecek herhangi bir hatanın, hücrenin homeostazisini ve hatta işlevini kaybetmesine neden olmalarıdır (Blanco, 2017; Koga ve diğ., 2011). Ancak proteinler, hücre döngüsü sürecinde mutasyon ve stres gibi metabolik zorluklar karşısında yanlış katlanabilmekte ve bunun sonucunda akümüle olabilmektedir. Bu akümülyasyon, hücrede toksisiteye neden olmaktadır. Bu durumdan kaynaklanan toksisiteye “Proteotoksite” adı verilmektedir ve protein homeostazisine katkıda bulunan karmaşık hücre sistemleri ise “Proteostazis” olarak tanımlanmaktadır (Balch ve diğ., 2008). Proteostazisin korunması, “arızalı” olan yanlış katlanmış polipeptitlerin “tamir edilmesi” yani yeniden katlanması, parçalanması veya hücreden uzaklaştırılması üzerine kuruludur ve bu süreçler “Protein Kalite Kontrol Mekanizmaları” olarak tanımlanmaktadır (Powers ve diğ., 2009).

2.1.1. Moleküler Şaperonlar

Bir polipeptit zincirinin etkileşime girdiği, stabil hala getirdiği veya işlevsel olduğu konformasyonunu kazanmasına yardımcı olduğu proteinler “Moleküler Şaperon” olarak tanımlanmaktadır (Hartl ve diğ., 1996; Balchin ve diğ., 2016). Moleküler şaperonlar veya ısı şoku proteinleri (HSP), stres ve yüksek sıcaklıklarda hücre yanıtı olarak artış göstermekte ve bakterilerden memelilere kadar tüm canlılarda yüksek oranda korunmuş olarak bulunmaktadır (Koga ve diğ., 2011).

1950 yılında Anfinsen ve ekibi tarafından yapılan öncül deneyler, protein katlanmasına ilişkin temel bilgilere ışık tutarak bir proteinin doğal konformasyonunun belirlenmesinde aminoasit dizisinin önemini ortaya çıkartmıştır, ancak katlanmanın ek faktörlere ihtiyaç duyulmadan gerçekleştiğini öne sürmüştür (Anfinsen ve diğ., 1950). 1980 yılında yapılan

çalışmada ise proteinlerin *in vivo* katlanma için moleküler şaperonların yardımı gerektiğini kanıtlamıştır (Hartl ve diğ., 1990). Son yirmi yılda yapılan çalışmalar, henüz tam katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin hidrofobik aminoasitlerinin yüzeye maruz kalmalarının agregasyona yol açtığını göstermektedir (Chiti ve diğ., 2006). Şaperonin (Hsp60) (Bakteride GroEL ya da GroES), Hsp70 (Bakteride DnaK) ve Hsp90 gibi moleküler şaperon sistemler, bu noktada dahil olarak hidrofobik aminoasitleri tanıyarak polipeptit omurganın adenozin 5'-trifosfat (ATP) aracılığı ile doğru bir şekilde katlanmasını tetiklemekte veya agregasyon oluşumunu önlemekte görev almaktadır (Balchin ve diğ., 2016). Aynı zamanda şaperonlar, hatalı katlanmış ve geri dönüşümü olmayan proteinlerin degradasyonu için proteazlar ile iş birliği halindedir (Şekil 2.1) (Balchin ve diğ., 2016; Hipp ve diğ., 2019). Bu iş birliğinde Ribozomdan yeni sentezlenen zincir, doğru katlanabilmek ve kararlı yapısını koruyabilmek için şaperonlara ihtiyaç duymaktadır. Benzer şekilde kararlı yapısını koruyamadan konformasyonel değişikliğe uğrayan proteinler de, doğrudan şaperonlar tarafından veya şaperonların etkileşim halinde olduğu diğer proteinler aracılığı ile dolaylı olarak yönlendirilmektedir. Bu yönlendirme agregasyon oluşumuna veya doğru katlanarak tekrar fonksiyon kazanmaya doğru ilerleyebilmektedir (Gregersen ve diğ., 2006).



Şekil 2.1. Şaperonların dahil oldukları metabolik faaliyetlerin şematik gösterimi

2.1.2. Proteolitik Sistemler

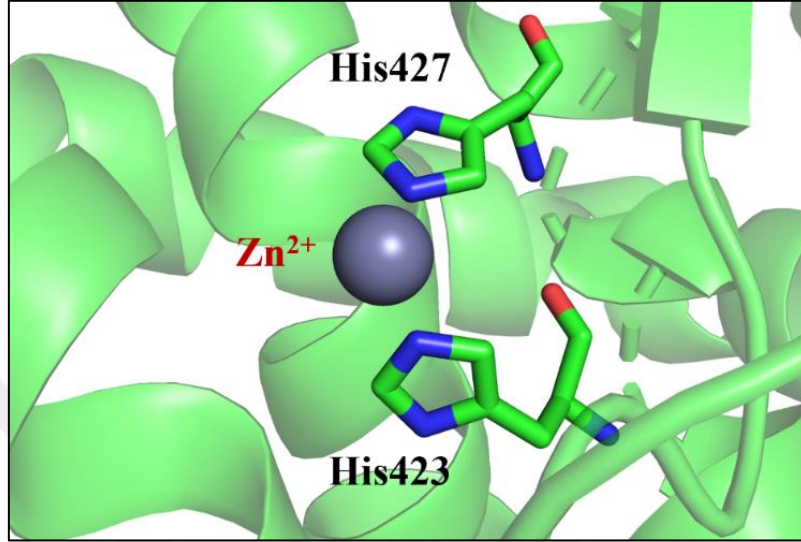
Bir hücre döngüsünde gerçekleşen metabolik faaliyetler tamamlandıktan sonra, bu süreçlerde yer alan proteinlerin parçalanması gerekmektedir. Aksi takdirde, bu proteinler akümülyasyona ve proteotoksisiteye neden olmaktadır. Evrimsel süreçte protein

birikiminin önlenmesi, bu proteinlerin “proteaz” adı verilen enzim grubu tarafından parçalanması ile sağlanmıştır. İki aminoasit arasındaki peptit bağlarının hidrolizini katalizleyen proteazların bu metabolik faaliyeti, “proteoliz” olarak adlandırılmaktadır. Geri dönüşümsüz olan bu metabolik faaliyet sonucunda hasar görmüş proteinlerin ortadan kaldırılması sağlanmakta ve bu sayede protein seviyeleri kontrol altında tutulması “Kalite Kontrol Mekanizması” olarak adlandırılmaktadır. Hücredeki bu işlevi sayesinde proteazlar, hücre ölümü, hücre farklılaşması, bağışıklık gibi birçok süreçte sinyal proteinleri olarak anahtar rol üstlenmektedir (Richard, 2005).

Proteazlar, Ubikuitin-Proteazom, Kaspaz, Kalsain Sistemleri ve Otofaji gibi proteolitik süreçlerde yer almaktadır. Örneğin, proteinler, ubikuitin molekülleriyle işaretlenmekte ve daha sonra büyük proteolitik kompleks olan 26S proteazom tarafından küçük peptitlere parçalanmaları için sinyal sağlanmaktadır. Hasarlı veya istenmeyen proteinlerin otofagosom adı verilen çift membranlı veziküller tarafından alınıp lizozomlarla parçalanması sağlanmaktadır. Özel hedef proteinleri belirli bölgelerinden kesen kalsiyum bağımlı proteazlar kalsain sistemi olarak adlandırılmaktadır. Programlı hücre ölümü (apoptoz) ve hasarlı veya istenmeyen proteinlerin uzaklaştırılmasında önemli bir rol oynayan ve kaspaz adı verilen bir proteaz ailesi tarafından degradasyon gerçekleşmektedir. Endositoz veya fagositoz yoluyla hücreler tarafından yutulan ekstraselüler proteinlerin parçalanması lizozomal proteoliz ile gerçekleşmektedir (Koga ve diğ., 2010).

Proteazlar başlangıçta iç kısımdaki peptit bağlarını hedef alan endopeptidaz ve substratın NH_3 ve COOH terminallerini hedef alan ekzopeptidazlar olarak sınıflandırılmıştır. Ancak yapısal ve mekanistik özellikleri hakkında elde edilen bilgiler doğrultusunda yeni bir sınıflandırılmaya ihtiyaç duyulmuştur. Kataliz mekanizmasına göre proteazlar, Aspartik, Glutamik, Sistein, Serin, Treonin ve Metalloproteazlar olarak altı sınıfta incelenmektedir. Aspartik, Glutamik ve Metalloproteazlar, substratın peptit bağı kırabilmek için bir su molekülünü nükleofil olarak kullanmaktadır; ancak Sistein, Serin ve Treonin için nükleofil, aktif merkezde bulunan, adlarını da aldıkları aminoasittir. Proteazlar, aminoasit dizilerine veya üç boyutlu yapılarındaki benzerliklerine göre de daha fazla gruplandırılabilir (Lopez ve Bond, 2008).

Metalloproteazlar, gerçekleştirdikleri reaksiyonun ara basamağı olan su molekülünün hidrolizi için aktif merkezlerinde bulundurdıkları metal iyonunu kullanan proteaz grubu enzimlerdir. Aktif merkezdeki bu metal iyonu, genellikle Zn^{2+} olmakla birlikte, Mg^{2+} veya Cu^{2+} olanlar da vardır (Şekil 2.2) (Wu ve diğ., 2011).



Şekil 2.2. FtsH'nin proteaz aktivitesinin gerçekleştiği aktif merkezdeki metal iyonunun gösterimi (PDB: 3KDS)

Hücreler, stres durumlarında protein sentezi yerine proteolize yönelmekte ve bu sayede hasarlı, yanlış katlanmış proteinlerin degradasyonu gerçekleştirilerek hücrelerin normal işlevlerini sürdürmelerini, yani homeostazinin korunmasını sağlamaktadır. Bu sayede hücre içerisinde yanlış katlanmış veya hasarlı proteinler degrade edilmekte ve homeostatik işlev korunmaktadır. Homeostatik dengenin hücrede korunması için proteinlerin doğru şekilde katlanması, modifikasyonu, işlevsellikleri ve gereksiz veya hasarlı olanların parçalanması gerekmektedir. Bu nedenle, hücre homeostazı ve proteoliz arasındaki bağlantı; hücredeki proteinlerin dinamiğinin yönetimi ile dengenin korunmasını sağlanmaktadır (Balchin ve diğ., 2016; Goldberg, 2003).

2.2. Hücrede Membran Denetimi

Membran, hücreyi dış ortamdan ayıran ve organelleri çevreleyen bariyerler olarak iş görmektedir. Membranların temel yapısı fosfolipitlerden ve bu fosfolipitlerin aralarına yerleşmiş veya bağlanmış proteinlerden oluşmaktadır. Lipitlere gömülü proteinler, membran kütesinin yarısını oluşturmaktadır (Luckey ve diğ., 2008). Membran

proteinlerin fonksiyonlarını devam ettirebilmeleri ve stabilitelelerini koruyabilmeleri için bulundukları lipit ortamı anahtar bir role sahiptir. Birçok membran proteini, eşsiz bir lipit bileşimine ve lokalizasyonuna sahiptir (Simons ve Sampaio, 2011). Lipit bileşimine uygulanan herhangi bir müdahale, transmembran proteinlerin direkt olarak fonksiyon kaybına ve tüm hücrenin yapısının bozulmasına yol açabilmektedir (Babst, 2014; Lauwers ve diğ., 2007; Pineau ve diğ., 2008; Payet ve diğ., 2013).

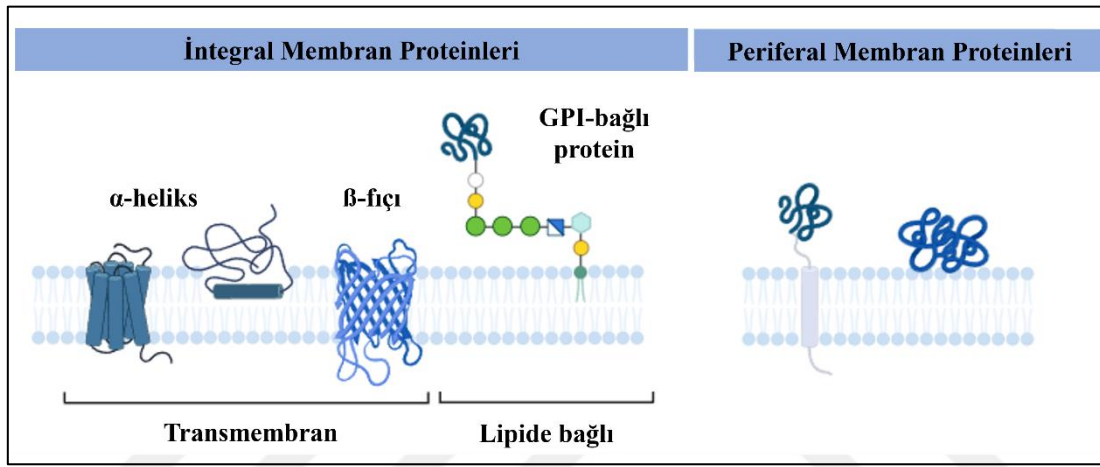
Trans-golgi ağı ve plazma membranı kalite kontrol sistemlerinin işlevlerinden biri, membran proteinlerin uygun lipit ortamı ile etraflıca çevrenmesini sağlamaktır. Bu sistemlerin özellikle de membran akışkanlığındaki değişikliklere duyarlı olmaları gerekmektedir. Membran proteinleri, taşıma faaliyetlerinin bir parçası olarak konformasyonel değişikliğe uğramaktadır ve membran akışkanlığının bu proteinlerin faaliyetlerini etkilemesi kaçınılmazdır; yoğun bir membran, taşımada gereken konformasyonel değişikliği engellemekte ve proteinin işlevini bozmaktadır. Ancak bunun aksine çok akışkan bir membran da taşıyıcı membran proteininin fazla esnek olmasına neden olacak ve substrat yokluğunda dahi konformasyonel değişikliğe neden olacaktır. Bu mekanizma, tuz konsantrasyonu, sıcaklık gibi çevresel faktörlere uyum sağlamak için membran akışkanlığının sıkı bir kontrol altında tutulması gerektiğini açıklamaktadır (Babst, 2014).

2.3. Membran Proteinleri

Membran proteinleri, hücre içi ve hücre dışı trafiğin düzenlenmesinde görevli, lipitler ile etkileşim halinde olan proteinlerdir (Almeida ve diğ., 2017). Ökaryotlar, bakteriler ve arkelerdeki tüm proteomlar karşılaştırıldığında, yaklaşık %30'unun membran proteinleri olduğu bilinmektedir (Fernandez-Leiro ve diğ., 2016). Farmakolojide geliştirilen ilaçların %50'sinin membran protein odaklı olduğu göz önüne alındığında, membran proteini ve fonksiyonu arasındaki ilişkiyi moleküler düzeyde anlamının ilaç tasarımı geliştirmeleri hızlandırması kaçınılmazdır (Almeida ve diğ., 2017).

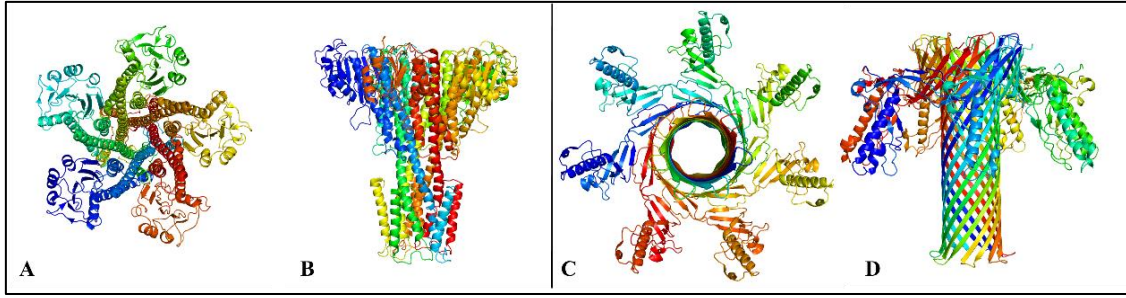
Membran proteinleri, lipitlerle çeşitli şekillerde işbirliği yapmaktadır. Buna göre, membrana gömülü olarak bulunan integral membran proteinleri (transmembran proteinler), başka bir integral membran proteinine ya da lipitlere elektrostatik veya van der Waals etkileşimleri ile bağlı olarak bulunabilen periferik membran proteinleri olarak

sınıflandırılmaktadır. Aynı zamanda, integral membran proteinleri, yapısal özelliklerine göre α heliks ve β -fiçı sekonder yapılarını oluşturmaktadır (Şekil 2.3) (Tan ve diğ., 2008). İntegral membran proteinleri, lipid çift tabakalı membranın içerisinde geçme özelliklerine sahip olduklarından dolayı, lipidler gibi amfipatiktir; yapılarında hem hidrofilik hem hidrofobik bölgeler bulunmaktadır. İntegral membran proteininin hidrofobik kısmı membranın iç kısmında bulunan lipid moleküllerin hidrofobik kısımları ile; hidrofilik kısmı ise membranın iki tarafında da bulunan su molekülleri ile etkileşim halindedir (Alberts ve diğ., 2002; Deisenhofer ve diğ., 1985; Michel ve diğ., 1986).



Şekil 2.3. Membran proteinlerinin sınıflandırılması

Bir membran proteininin fonksiyonu, bu proteinin lipid çift tabakalı yapı ile nasıl işbirliği halinde olduğu ile yakından ilgilidir. Örneğin, sadece integral membran proteinleri çift tabakalı yapının iki tarafında da işlevseldir ve moleküllerin geçişlerini sağlamaktadır. Ayrıca peptit bağının polar olması ve integral membran proteinlerinin membranın içinden geçen kısmının hidrofobik olması nedeni ile, bu bölgede peptit bağlarının kendi içlerinde hidrojen bağı oluşturdukları gözlemlenmektedir; bu hidrojen bağlarının sayısı ise, polipeptit zincirinin α heliks yapısı sayesinde en üst seviyeye çıkmaktadır. Bu neden ile, integral membran proteinlerinin membrana yayılan segmentinde çoğunlukla α heliks yapısı gözlemlenmektedir. Hidrojen bağlarını arttırmanın bir diğer yolu ise polipeptit zincirinin bir fiçı şekli oluşturacak şekilde β -tabakalar olarak düzenlenmesidir (Şekil 2.4) (Alberts ve diğ., 2002).



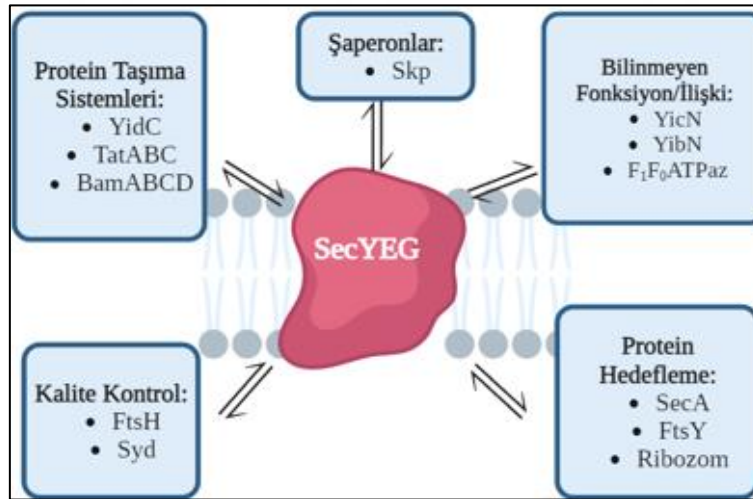
Şekil 2.4. Yapıları Kriyo-Elektron Mikroskopu ile elde edilen ve özelliklerine göre α heliks ya da β -fiçısına sahip integral membran proteinlerinin PyMOL'da gösterimi. α heliks yapısına sahip *Staphylococcus aureus* Zn^{2+} taşıyıcı membran proteini ZntB'nin üstten (A) ve yandan (B) görünüşü (PDB: 5N9Y), β -fiçısı içeren *Clostridium perfringens* epsilon toksin-B'nin üstten (C) ve yandan (D) görünümü (PDB: 6RB9) (Her bir alt ünite farklı renk ile gösterildi)

Membran protein biyogenezi ve protein sentezi, hücre içindeki temel süreçlerdir. Her ne kadar, deneysel süreçlerinin zorluğu nedeni ile membran proteinlerinin katlanmaları, kompleks oluşturmaları gibi süreçler hala tam olarak aydınlatılamamış olsa da (Komar ve diğ., 2006), membran protein biyogenezi, hedeflenme, yerleşme, katlanma ve kompleks oluşturma olmak üzere dört aşamadan oluşmaktadır. Bu faaliyetler dahil hücredeki tüm metabolik süreçler, hücre içerisinde kompartmanlara ayrılmış ve bu sayede çeşitlilik oluşmuştur. Sitozolün dışında faaliyet gösteren proteinlerin hepsinin ortak özellikleri; özel translokasyon sistemlerine ihtiyaç duymalarıdır. Bu sistemler ise salgı proteinlerinin sahip oldukları N-terminal dizileri, parçalanabilir sinyal dizileri ve iç membran proteinlerindeki parçalanamayan sinyal dizileri sayesinde gerçekleşmektedir (Hegde ve Bernstein, 2006; Oswald ve diğ., 2021; Pugsley, 1990; Steinberg ve diğ., 2018; von Heijne, 1994).

SecYEG translokonu, evrensel olarak korunmuş ve birçok metabolik sürece dahil olan en önemli translokasyon sistemidir (Şekil 2.5). Translokasyonu iç membrana veya periplazmaya gerçekleştirilecek olan membran proteinleri, bu translokasyon sistemi sayesinde taşınmaktadır (Denks ve diğ., 2014; Kudva ve diğ., 2013; Oswald ve diğ., 2021). SecY, SecE ve SecG'den meydana gelen heterotrimerik SecYEG translokonu, potansiyel substratlarını seçebilmek, protein taşınmasında itici güç sağlayabilmek ve substratın SecYEG kanalından salınımı için proteostazis ağındaki diğer proteinlerle işbirliği halindedir (Angelini ve diğ., 2005; Beck ve diğ., 2001; Lill ve diğ., 1990; Knyazev ve diğ., 2018; Houben ve diğ., 2004; Oswald ve diğ., 2021; Sachelaru ve diğ.,

2017; Tsukazaki ve diğ., 2011; van der Does ve diğ., 1996). Aynı zamanda translokasyon sürecinde SecYEG translokonu, YidC insertaz, Tat taşıma sistemi, Bam kompleksi gibi farklı protein taşıma sistemleri ile ortak çalışmaktadır (Alvira ve diğ., 2020; Keller ve diğ., 2012; Kudva ve diğ., 2013; Kuhn ve diğ., 2017; Oswald ve diğ., 2021; Petriman ve diğ., 2018; Scotti ve diğ., 2000; Tooke ve diğ., 2017; Wang ve diğ., 2016).

SecYEG'in substratlarını tanıması, SecA ve sinyal tanıma partikülü (SRP) adı verilen ve bakteri hücrelerinde paralel olarak çalışan iki protein hedefleme sistemine bağlıdır (Kuhn ve diğ., 2017). SecA, çoğunlukla post-translasyonel olarak parçalanabilir N-terminal sinyal dizileri üzerinde; buna karşın SRP genellikle kotranslasyonel olarak parçalanamayan sinyal çapa sekanslarına özelleşmiş hedefleme yollarında faaliyet göstermektedir (Driessen ve Nouwen, 2008; Gu ve diğ., 2003; Halic ve diğ., 2004; Koch ve diğ., 2003; Kudva ve diğ., 2013; Oswald ve diğ., 2021; Pool ve diğ., 2002; Rapoport ve diğ., 2007; Schaffitzel ve diğ., 2006; Smets ve diğ., 2019). Aynı zamanda SRP yolağı, membran proteinlerini SecYEG translokonundan bağımsız olarak çalışabilen ancak işbirliği yapan YidC insertaza iletilmesini sağlayabilmektedir (Kuhn ve diğ., 2017; McDowell ve diğ., 2021).



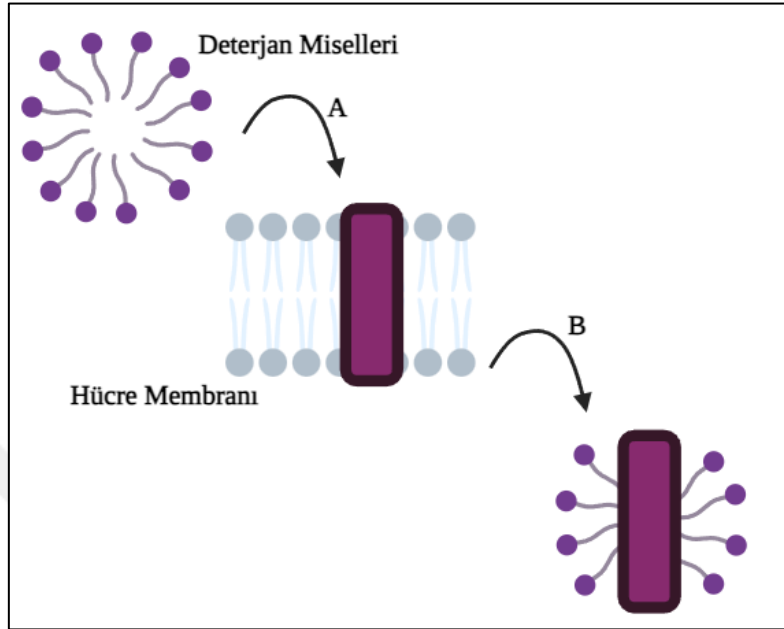
Şekil 2.5. SecYEG translokunun katıldığı metabolik süreçler (URL-1)

E. coli SecYEG translokonu monomer olarak fonksiyonel olsa da, SecA, YidC, SecD-SecF-YajC, FtsY-Sinyal Tanıma Partikülü-Ribozoma bağlı yeni oluşan polipeptit zinciri (FtsY-SRP-RNC) gibi birçok aksesuar protein ile heterohekzamerik kompleks oluşturmaktadır (Duong ve Wickner, 1997; Jomaa ve diğ., 2017; Oswald ve diğ., 2021).

Son olarak heteroheptamerik SecYEGSecDFYajC-YidC kompleksi ise Holo-translokon adını almış ve biyokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır (Schulze ve diğ., 2014; Schaffitzel ve diğ., 2016). Ayrıca YfgM-PpiD şaperon kompleksi ve Sec translokonunun kalite kontrolünde metalloproteaz FtsH ile birlikte görev yaptığı öne sürülen sitozolik bir protein olan Syd gibi birkaç protein daha bulunmaktadır (Akiyama ve diğ., 1996; Antonoeae ve diğ., 2008; Dalal ve diğ., 2009; Jauss ve diğ., 2019; Oswald ve diğ., 2021). SecYEG ve kompleksleri arasındaki dinamik denge, bu kompleksin çok çeşitli substratlara ve farklı fizyolojik koşullara uyum sağlamasına olanak tanıdığı görülmektedir (Oswald ve diğ., 2021). Bahsedilen dinamik dengenin bozulması durumunda, çok yönlü bir tepki ortaya çıkmaktadır. Bunlardan biri σ^{32} 'nin indüklenmesidir. Bu durumda şaperon ve proteaz üretimi artmakta ve bu sayede σ^{32} yanıtını düşürebilmek adına negatif geri besleme sağlanmakta; sonuç olarak FtsH σ^{32} 'yi degrade etmektedir. Bu metabolik süreçte, FtsH'nin σ^{32} 'yi degrade etmesi, ortamdaki SRP/FtsY ve SecYEG'e bağlıdır. Aynı zamanda translokon oluşturmamış SecY'nin de hücre büyümesi ve protein translokasyonu gibi metabolik faaliyetlere zararı olması nedeni ile FtsH tarafından degrade edildiği rapor edilmiştir (Akiyama ve diğ., 1995).

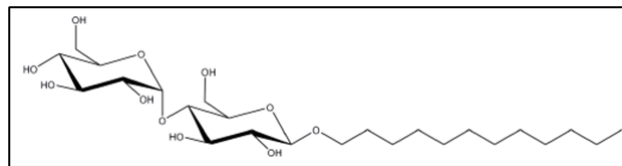
Bahsedilen bu kompleks organizasyon düzeneklerinin aydınlatılabilmesi, yapısal biyolojideki son gelişmelere dayanmaktadır. Yine de tüm bu gelişmelere karşın, Protein Data Bankası (PDB)'na yüklenen proteinlerin sadece %18'i transmembran proteinlerden oluşmaktadır (Fernandez-Leiro ve Scheres, 2016). Çünkü membran proteinlerinin rekombinant üretimleri ve yüksek saflıklarda elde edilmesi, membran gibi sınırlı bir yapıda kalmalarından dolayı zordur. Aynı zamanda bu proteinlerin fonksiyonel hallerinde kalarak saflaştırılabilmeleri için membran yapısını taklit eden deterjanlar ile solübilize edilmeleri gerekmektedir (Carpenter ve diğ., 2008). Bu işlemde kullanılan deterjanlar, hidrofilik baş grupları ve hidrofobik kuyruk kısımları olması nedeniyle yüzey aktif (sürfaktan) moleküllerdir; miseller oluşturarak proteinleri çözebilmektedirler (Şekil 2.6). Burada, Kritik Misel Konsantrasyonu (KMK) ön plana çıkmaktadır. KMK, gerekli olan sürfaktan miktarını tanımlamaktadır; yani misel yapısı kendiliğinden oluşmaya başladığı andaki yüzey aktif maddelerin konsantrasyonudur (Kalipatnapu ve Chattopadhyay, 2005). Deterjan molekülünün diğer kısmı polar olduğundan, kritik misel konsantrasyonuna ulaşılır ulaşılmaz, kritik misel sıcaklığının da aşılması koşuluyla deterjan molekülleri kendiliğinden miseller oluşturmaya başlamaktadır. KMK değerinin

altında deterjan molekülleri çoğunlukla monomer olarak bulunmaktadır. Misel oluşumu nedeniyle, membran proteini, deterjan-lipit-protein kompleksinin bir parçası haline gelmektedir (Stetsenko ve Guskov, 2017).



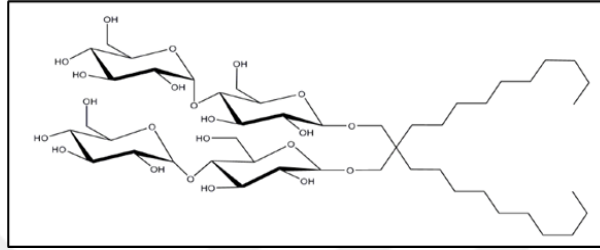
Şekil 2.6. Membran proteininin solübilizasyon süreci (URL-1)

Solübilizasyon sürecinde kullanılan deterjanlar yapısal özelliklerine göre, zwitteriyonik, safra asidi tuzları, iyonik ve iyonik olmayan olmak üzere dört ana grupta incelenmektedir. İyonik ve iyonik olmayan deterjanlar membran protein solübilizasyonunda en çok kullanılan deterjan türleridir. Örneğin, bu çalışmada da kullanılan ve iyonik olmayan deterjan grubunda bulunan DDM (n-Dodesil-D-maltopiranozit), alkil maltozit sınıfına ait olması nedeniyle hidrofilik maltoz ana grubuna ve hidrofobik alkil zincirine sahiptir (Şekil 2.7). Bu deterjanın yaygın olmasının nedenleri, 1980 yılında membran proteinlerinin yapısal çalışmalarının başlangıcında kullanılan OG (Oktil-beta-Glikozit) deterjanına göre daha ucuz bir alternatif olarak geliştirilmesi ve kritik misel konsantrasyon (CMC) değerinin düşük olmasıdır ($\sim 0,0087/0,17$ mM) (Chae ve diğ., 2010).



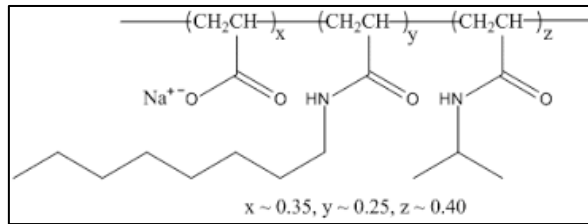
Şekil 2.7. DDM'in yapısı (kimyasal formül: $C_{24}H_{46}O_{11}$)

Lauril maltoz neopentil glikol (LMNG), iki hidrofilik baş grubun ve iki hidrofobik kuyruğun birleşmesine izin veren kuaterner karbon atomuna sahiptir (Şekil 2.8). LMNG'nin misel boyutu ~91 kDa'dır ve düşük bir CMC değerine (%0.001/0.01 mM) sahiptir. Hem protein ekstraksiyonunda hem de birkaç hassas membran proteininin stabilizasyonunda etkili olduğu bildirilmiştir (Stetsenko ve Guskov, 2017; Chae ve diğ., 2010; Craig ve diğ., 2016; Chen ve diğ., 2016; Kang ve diğ., 2015; White ve diğ., 2015).



Şekil 2.8. LMNG'nin yapısı (Kimyasal formül: $C_{47}H_{88}O_{26}$)

Kriyo-EM ile yapı analizlerinde, düşük KMK'ye sahip deterjanlar tercih edilmektedir. Bunun nedeni, proteini solübilize halde tutarken deterjan konsantrasyonunun olabildiğince az olmasıdır (Li, 2022). Çünkü membran proteininin, diğer proteinlerle, lipidlerle ve kofaktörlerle olan spesifik etkileşimleri de membran proteinlerinin kararlılıklarında önemli bir rol oynamaktadır (Bowie ve diğ., 2001; Garavito ve Ferguson-Miller, 2001; Popot ve Engelman, 2000). Deterjan ise bu etkileşimlerle rekabete girerek bir süre sonra kararlılığın bozulmasına yol açabilmektedir. Deterjanlara alternatif olarak ise stiren maleik asit lipid partikülleri (SMALP'ler) veya amfipoller gibi polimerler kullanılmaktadır. Amfipoller (APoller), membran proteinlerin transmembran alanına çoklu hidrofobik temas noktaları ile bağlanacak şekilde tasarlanmış kısa ve esnek amfipatik polimerlerdir. A8-35 olarak adlandırılan en yaygın kullanılan APol'ün moleküler ağırlığı ~4,3 kDa'dır ve pH 7'nin üzerinde iyonize olmaktadır (Zoonens ve diğ., 2014) (Şekil 2.9).



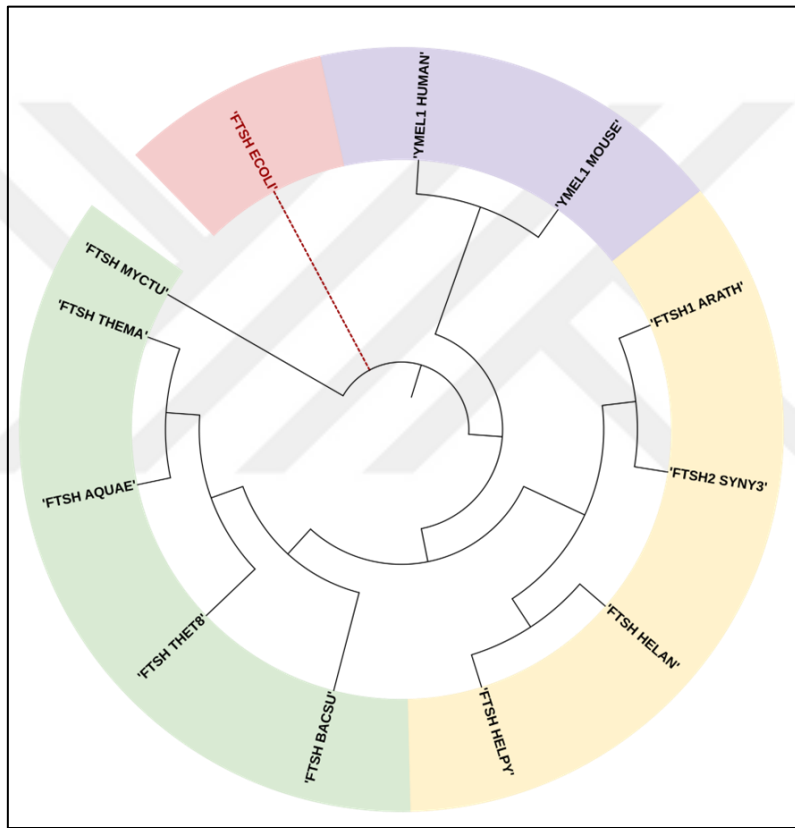
Şekil 2.9. Amfipollerin yapısı (Kimyasal formül: $(C_{6.2}H_{10.3}O_{1.35}N_{0.65}Na_{0.35})_{72}$)

2.4. AAA+ Proteazlar ve FtsH

ATP ile ilişkilendirilmiş çeşitli hücrel faaliyetler gösteren (AAA+; Çeşitli hücrel aktiviteler ile ilişkili ATPazlar) proteazlar, tüm organizmalarda bulunmaktadır ve ATPaz, Proteaz ve yardımcı olmak üzere sekanslarına bağlı olarak çeşitli ailelere ayrılmaktadır; en basit AAA+ proteazlar dahil, tüm çeşitleri büyük oligomerler halinde fonksiyon göstermektedir (Vale, 2000). Aynı zamanda N-terminallerinde yaklaşık 250 aminoasitten oluşan korunmuş bir bağlanma bölgesi içermektedir. Bu protein ailesi, protein degradasyonu, DNA replikasyonu, membran füzyonu ve sinyal iletimi gibi birçok metabolik faaliyette yer almaktadır ve bu faaliyetleri ATP'yi kullanarak gerçekleştirmektedir; bu sayede kimyasal enerjiyi mekanik enerjiye dönüştürmektedir. AAA+ proteazlar için bu mekanik enerji, hedef proteinin üç boyutlu yapısının açılarak polipeptit zincirine ve aminoasitlere ayrıştırılmasına kullanılmaktadır (Yedidi ve diğ., 2017). Bakterilerde, arkelerde ve ökaryotlarda yaygın olarak bulunan AAA+ proteazların bakteri, arke ve ökaryot olmak üzere tüm organizmalarda bulunması, evrimsel süreçte korunduğunu ve bu sınıfın önemini kanıtlamaktadır (Vale, 2000).

AAA+ proteazlar, protein substratların yıkımlarını, “ATP hidrolizi”ne bağlı olarak gerçekleştirmektedir. Degradasyon işleminin yıkıcılığı göz önünde bulundurulduğunda, protein substratının proteaz tarafından doğru bir şekilde tanınması kritik öneme sahiptir. Bu nedenle protein substratların çoğu, bir AAA+ proteaz tarafından tanınmasını sağlayacak belirleyici sekanslara (tanınma etiketi veya degron) sahiptir. Degronlar aracılığı ile protein substratının tanıma süreci başlatılmaktadır ve proteazın sahip olduğu merkezdeki aromatik bir aminoasit sayesinde ya da adaptör proteinlerinin yardımları ile tanınma tamamlanmaktadır. Bunu takiben, substratın üç boyutlu yapısı bozulmakta ve translokasyon işlemi gerçekleşmektedir. AAA+ proteazın ATP domaininde meydana gelen ATP hidrolizi ile konformasyonel değişikliklere; konformasyonel değişiklikler ile ise “Çekme Hareketi”ne dönüşmektedir ve böylece substrat, merkezdeki açıklıktan ileri hareket etmektedir. Translokasyondan sonra, substrat, degradasyonun gerçekleştiği kısma geçmekte ve burada peptit parçalanması meydana gelmektedir, bu yıkım ile substrat 10 - 20 aminoasit uzunluklarında oligopeptitlere parçalanmaktadır (Sauer ve Baker, 2011).

FtsH, 1975 yılında Santos ve De Almeida tarafından yapılan çalışmada tanımlanmıştır. Bu araştırmada, *E. coli* mutanları izole edilmiştir ve uzun hücrelerin ısı şokuna hassasiyet gösterdiği bulunmuştur. Bu nedenle de “Filament şeklinde ısıya duyarlı H” (Filamentous temperature sensitive H) olarak adlandırılmıştır (Santos ve De Almeida, 1975). Aynı gen tarafından kodlandığı kesinleşene kadar ise *E. coli* FtsH, aynı zamanda HflB (High frequency lysogenization) olarak adlandırılmıştır (Herman ve diğ., 1993). Ayrıca FtsH’nin kodlandığı gen, maya, bakteri, insan ve bitkilerde yaklaşık %40 oranında korunmuş olarak bulunmaktadır (Şekil 2.10).

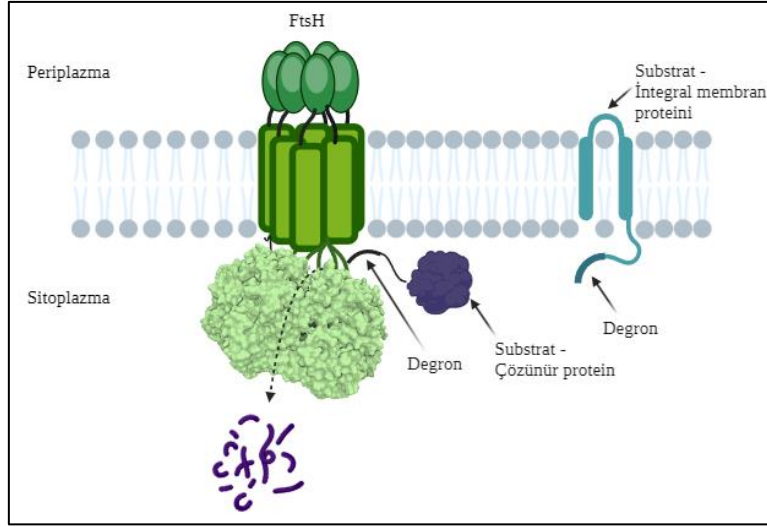


Şekil 2.10. Seçili türlerin FtsH ortologlarının filogenetik analizi. Dört grup altında kümeleşen FtsH ortologlarında *E. coli* FtsH kırmızı renk ile gösterildi. Mor renk kümeleşiminde memeli FtsH ortologları *Homo sapiens* ('YMEL1 HUMAN') ve *Mus musculus* ('YMEL1 MOUSE') bulunurken; Mavi kümeleşim hücre membranında bulunan FtsH ortologlarını (*Mycobacterium tuberculosis*, 'FTSH MYCTU'; *Thermatoga maritima*, 'FTSH THEMA'; *Aquifex aeolicus*, 'FTSH AQUAE'; *Thermus thermophilus*, 'FTSH THETS'; *Bacillus subtilis*, 'FTSH BACSU') ve Turuncu kümeleşimler kloroplast veya mitokondride bulunan FtsH ortologlarını (*Arabidopsis thaliana*, 'FTSH ARATH'; *Synechocystis sp.*, 'FTSH2 SYNY9'; *Heliantus annuus*, 'FTSH HELAN'; *Helicobacter pylori*, 'FTSH HELPY') temsil etmektedir.

ATP'ye bağımlı olması dışında, integral membran proteinlere karşı etki gösteren FtsH'nin kendisi de bir membran proteindir. Bu özelliği ile FtsH, benzersiz bir proteazdır. Ökaryotik hücrelerin mitokondri ve kloroplastlarının yanı sıra, prokaryotik organizmalardaki anormal membran proteinlerini ve sitozolde bulunan bazı kısa ömürlü proteinleri hızla parçalaması nedeniyle en önemli görevi, proteinlerin kalite kontrolüdür. FtsH'nin hem membrana bağlı veya çözünebilir proteinlerin degradasyonunda, hem de farklı metabolik süreçlerin düzenlenmesinde rol alması nedeni ile substrat yelpazesinin oldukça geniş olduğu bilinmektedir (Ogura ve diğ., 1999; Ito ve Akiyama, 2005; Janska ve diğ., 2013; Kato ve Sakamoto, 2018; Yi ve diğ., 2022).

2.4.1. FtsH'nin Biyokimyasal Özellikleri

E. coli'de, beş farklı AAA+ proteaz vardır: ClpAP, Lon, ClpXP, HslUV ve FtsH. Bunlardan Lon ve FtsH, membranda bulunan tek AAA+ proteazlardır (Ogura ve diğ., 1999). FtsH'nin biyokimyasal karakterizasyon sürecinde substrat tanıma ve proteolitik aktivitenin detaylı olarak nasıl gerçekleştirildiği hala araştırılmaktadır (Bittner ve diğ., 2017; Yi ve diğ., 2022). Güncel bilgilere göre, transmembran ve ATPaz domaini arasında bulunan 20 amino asitlik esnek bir “bağlantı noktası” substratların proteolitik domaine geçişini sağlamaktadır (Carvalho ve diğ., 2021). Ayrıca, ATPaz domaininde bulunan merkezi açıklığın en üst bölgesinde konumlanmış fenilalanin amino asidinin substrat bağlanması için sorumlu olduğu düşünülmektedir (Bieniossek ve diğ., 2006; Narberhaus ve diğ., 2009). ATP hidrolizinin, ATPaz domaininde sebep olduğu konformasyonel değişiklik, fenilalaninin substrat ile birlikte merkezi açıklığa doğru kaymasına yol açmaktadır (Suno ve diğ., 2006). FtsH, substratta degran adı verilen spesifik peptit dizisine bağlanması ile degradasyonu başlatmaktadır (Varshavsky ve diğ., 1991; Morehouse ve diğ., 2022). FtsH, hem membran, hem de çözünür (sitozolik) proteinlerin degradasyonunu gerçekleştirebilmektedir. Sitoplazmik AAA+ domaini, substratın degranundan tanımayı gerçekleştirmekte ve açılarak substrat içeri çekilmektedir. Substrat, kanaldan içeri girerek parçalanmaktadır (Şekil 2.11) (Morehouse ve diğ., 2022). Murata ve Nishiyama tarafından 2018 yılında gerçekleştirilen çalışma, FtsH'nin her bir peptite parçalama işleminde 8 ATP kullandığını ortaya çıkartmıştır (Murata ve Nishiyama, 2018).



Şekil 2.11. FtsH'nin proteolitik aktivitesinin şematik gösterimi (PDB: 7WI4)

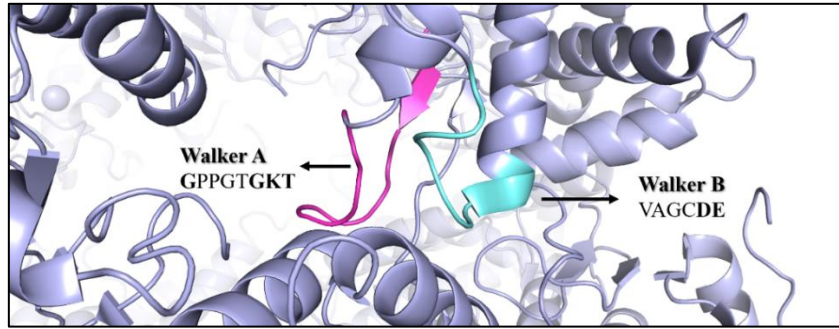
FtsH'nin gerçekleştirdiği proteolitik reaksiyonun karakterizasyonu için çoğunlukla σ^{32} ve λ CII substratları kullanılmıştır (Kihara ve diğ., 1996; Herman ve diğ., 1998; Tomoyasu ve diğ., 1995; Shotland ve diğ., 1997, 2000; Ito ve Akiyama, 2005). Ayrıca, ATP-bağımlı proteolitik aktivitesi olan FtsH'nin ATP'nin analogu sitidin trifosfat (CTP) varlığında da proteolitik aktivitesinin devam ettiği rapor edilmiştir. Ancak, adenosin monofosfat (AMP), guanozin trifosfat (GTP) ve adenosin difosfat (ADP) varlığında FtsH'nin proteolitik aktivitesinin %95 oranında inhibisyona uğradığı bildirilmiştir (Bruckner ve diğ., 2003; Asahara ve diğ., 2000). Bunların yanı sıra, aktif merkezde bulunan Zn^{2+} 'nin Fe^{2+} ile değiştirilmesi sonucunda σ^{32} 'nin FtsH tarafından degradasyona uğramadığı; ancak Mn^{2+} ile değiştirilmesi sonucunda aktivitede bir değişikliğin gerçekleşmediği bulunmuştur. *E. coli* FtsH'nin substrat yokluğunda ATP'yi hidrolize uğratma hızının 459 nmol/dk/mg olarak, K_m değeri ise 80 μ M olarak rapor edilmiştir (Tomoyasu ve diğ., 1995). FtsH'nin ATPaz aktivitesi proteolizden bağımsız olmasına karşın, proteolitik substratlar tarafından önemli ölçüde aktifleştirilmektedir. Proteolitik reaksiyonun ürünleri, ~3 kDa'dan küçük oligopeptitlerdir (Asahara ve diğ., 2000; Yamada-Inagawa ve diğ., 2003; Ito ve Akiyama, 2005).

2.4.2. FtsH'nin Yapısal Özellikleri

Yaklaşık 70 kDa büyüklüğündeki FtsH, 650 amino asit uzunluğunda bir proteindir. ATPaz ve proteaz domainleri tek bir polipeptit zinciri üzerindedir. İki transmembran heliksi içeren N-terminal transmembran bölgeye sahiptir ve bu bölgeyi takiben, ATP'nin

bağlanmasından ve hidrolizinden sorumlu Walker A ve Walker B motiflerine sahip AAA+ ATPaz domaini yer almaktadır (Şekil 2.12). Walker A (amino asit sekansı: GPPGTGKT) ve Walker B (amino asit sekansı: VAGCDE) motifleri, hidroliz sırasında ATP, Zn^{2+} ve H_2O moleküllerini koordine etmektedir. ATPaz domaininde bulunan arjininler, FtsH'nin oligomerizasyonunda kritik öneme sahiptir. Proteolitik aktivitenin gerçekleştiği domainde çinko bağlanma bölgesi ve ATPaz domaini ile bağlantı kuran HEXXH motifi bulunmaktadır. Aynı zamanda bu motif, iki histidin aminoasidi aracılığı ile çinkonun koordinasyonundan sorumludur (Carvalho ve diğ., 2021; Qiao ve diğ., 2022). ATPaz domaininin, çinko içeren proteolitik domain ile karşılaştırıldığında evrimsel süreçte daha çok korunduğu bildirilmiştir (Yi ve diğ., 2022; Langer, 2000).

FtsH'nin yapısal analizleri çoğunlukla C-terminal bölgesine ait sitozolik kısmı veya yalnızca periplazmik alanı içeren formları üzerine gerçekleştirilmiştir (Vostrukhina ve diğ., 2015; Bittner ve diğ., 2016; Bieniossek ve diğ., 2006, 2009; Kim ve diğ., 2008; Niwa ve diğ., 2002; Suno ve diğ., 2006, 2012). Lee ve ekibinin 2011 yılında yaptığı çalışma, FtsH'nin mayadaki mitokondriyal ortoloğunun tam uzunluktaki yapısını 12 Å çözünürlükte ortaya çıkartmıştır. *Aquifex aeolicus* FtsH'nin tam uzunluktaki üç boyutlu yapısı, Carvalho ve diğerleri tarafından 2021 yılında yapılan çalışmada C6 simetrisi ile 6,6 Å çözünürlükte elde edilmiştir.

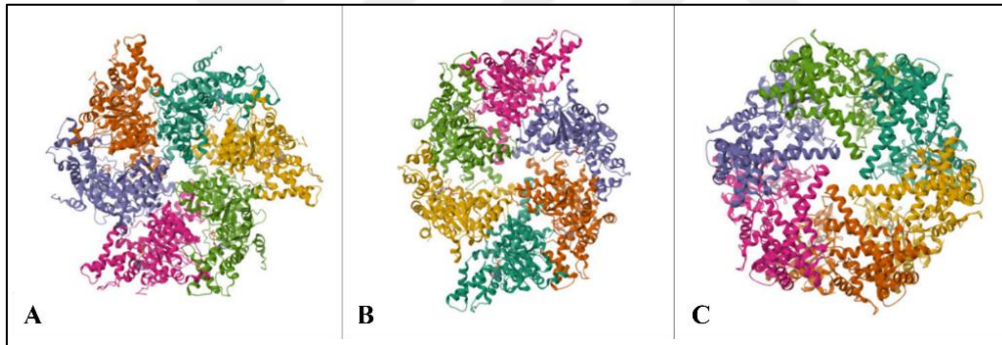


Şekil 2.12. FtsH'nin periplazmik domaininde Walker A ve Walker B motiflerinin gösterimi (PDB: 7WI4)

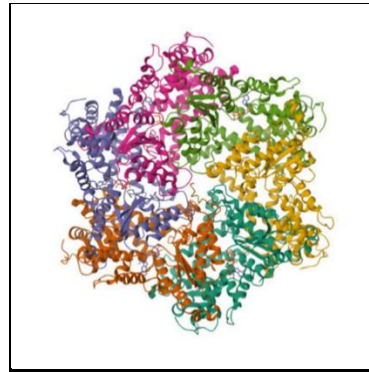
Literatürde, FtsH'nin sitozolik kısmının kristal yapıları da mevcuttur (PDB: 4EIW, 2CEA, 3KDS) ve bu yapılar, FtsH'nin ATPaz domaininin C3, C2 ve C6 simetrisindeki farklı konformasyonlarına sahiptir (Şekil 2.13). Bu modellere göre, ATPaz domaininin ATP hidrolizi sırasında polipeptitleri merkezi boşluğa hareket ettirdiği düşünülmektedir (Bieniossek ve diğ., 2009).

Kristal yapılarının yanı sıra, Kriyo-EM ile 3,4 Å çözünürlükte yoğunluk haritası elde edilen YME1 (*Saccharomyces cerevisiae*'nin iç mitokondriyal membranında bulunan FtsH'nin homoloğu, PDB: 6AZ0)'in ATPaz domaininin “merdiven” simetrisinde olduğu rapor edilmiştir (Şekil 2.14) (Puchades ve diğ., 2017). Bu merdiven simetrisinin sahip olduğu 1,4 nm'lik açıklıkların, küçük peptitlerin bozunması için gerektiği ve aynı zamanda, peptitlerin proteolitik domaine ulaşabilmesi için ATPaz domaininin 35° dönebildiğini öne sürmektedir (Puchades ve diğ., 2017).

ATPaz domaininde bulunan farklı simetrik katlanmalar, C-terminaldeki proteolitik domain için geçerli değildir. Farklı organizmalardan (örneğin, *Thermus thermophilus*, *Thermotoga maritima*, *Aquifex aeolicus*, *Escherichia coli* vb.) izole edilen FtsH'nin C-terminal proteaz domaininin her zaman C6 simetrisine sahip olduğu görülmüştür (Suno ve diğ., 2006; Bieniossek ve diğ., 2006, 2009; Vostrukhina ve diğ., 2015; Puchades ve diğ., 2017).



Şekil 2.13. Hekzamerik FtsH membran proteininin ATPaz domainini içeren sitozolik kısımlarının C3 (A), C2 (B) ve C6 (C)sahip olduğu farklı konformasyonları (Her bir alt ünite farklı renkle gösterilmiştir)



Şekil 2.14. Kriyo-EM ile yoğunluk haritası 3,4 Å çözünürlükte elde edilen YME1 iç mitokondriyal membran proteini (PDB: 6AZ0)

2.4.3. FtsH'nin Substratları

FtsH, substrat protein ile birden fazla yolla etkileşime girebilmektedir. Kararsız yapıda olan membran ve çözünür proteinleri degrade edebilme yeteneğine sahiptir. FtsH'nin, konumlarına ve işlevlerine bağlı olarak birçok substratı bulunmaktadır (Tablo 2.1) (Bittner ve diğ., 2017).

Viral çözünür substratlar genellikle kısa ömürlüdür ve çoğu bakteriyofaj tarafından kodlanmaktadır. Örneğin Lambda (λ) fajında bulunan üç genin ifade ettiği proteinler, FtsH'nin substratlarıdır. *cII* geninin ürünü, lizojenizasyonda görevli genler için önemli olan bir transkripsiyon faktörüdür ve *in vivo* ya da *in vitro* fark etmeksizin FtsH tarafından hızlı bir şekilde degrade edilmektedir (Kobiler ve diğ., 2002; Kihara ve diğ., 1998; Shotland ve diğ., 1997). *cIII* geninin kodladığı protein, FtsH tarafından yavaş bir şekilde degrade edilmekte ve CII proteininin proteolizine karşı antagonist bir şekilde çalışmakta olduğu bildirilmiştir. Bu iki genin ifade edildiği proteinlerin miktarları arasındaki denge, FtsH tarafından sağlanmaktadır. Bu sayede λ genomunun enfeksiyonunun litik ya da lizojeni fazında olduğunun kararı, dolaylı olarak FtsH tarafından verilmektedir (Herman ve diğ., 1997).

Isı şoku transkripsiyon faktörü, σ^{32} , ısı şoku veya benzer bir stres faktörünün olmadığı durumlarda FtsH ve diğer ATP-bağımlı proteazlar tarafından hızlıca degrade edilmektedir (Obrist ve diğ., 2008; Herman ve diğ., 1995). FtsH, aynı zamanda kendi kendini de parçalayabilme özelliğine sahiptir; bu reaksiyonun ise fizyolojik önemi henüz tam olarak belirlenmemiştir (Akiyama ve diğ., 1999). ATP sentaz kompleksinin alt birimi olan F_0 ile, SecYEG holo-translokazının partner proteini olan SecY, kompleks oluşturmadıkları zaman, FtsH tarafından degradasyona uğramaktadır. F_0 ve SecY'nin FtsH tarafından tanınması, sekans dizilerinden bağımsız olarak N ile C terminallerine gerçekleştirilmektedir (Akiyama ve diğ., 1996). FtsH'nin proteolitik aktivitesine karşı inhibitör görevi olduğu düşünülen YccA, FtsH tarafından parçalanmaktadır (Chiba ve diğ., 2002). Aynı zamanda, fosfolipitlerin lipopolisakkaritlere dönüşümünde rol oynayan LpxC membran proteini de FtsH'nin substratlarından biridir. DadA, PspC, FdoH, SecD, YfgM, PpiD, ExbD ve YlaC gibi birçok membran proteini de FtsH'nin substratları arasındadır; ancak tanıma mekanizması henüz aydınlatılmamıştır.

FtsH'nin substratlarının ortak olarak tanımlanabilecek bir özelliğe sahip olmamaları, FtsH'nin tanıma ve reaksiyon mekanizmasının daha karmaşık hale gelmesine sebep olmaktadır (Bittner ve diğ., 2017; Carvalho ve diğ., 2021).

Tablo 2.1. *E. coli* FtsH'nin substratları ve tanıma mekanizmaları (Bittner ve diğ., 2017)

Substrat	Tanınma Mekanizması	Referans
Sitoplazmik Substratlar		
SsrA	C-terminal	Herman ve diğ., 1998
LpxC	C-terminal	Ogura ve diğ., 1999
λ CII	HflD, HflK/C, C terminal	Kihara ve diğ., 1997, 2001
λ CIII	Terminal	Herman ve diğ., 1997
λ Xhis	Belirlenmedi	Leffers veGottesman, 1998
RpoH	DnaK/J, GroEL, GroES	Herman ve diğ., 1995
SoxS	N-terminal	Griffith ve diğ., 2004
IscS	Bilinmiyor	Westphal ve diğ., 2012
YhbT	Bilinmiyor	Arends ve diğ., 2016
Membrana Gömülü Substratlar		
SecY	SecYEG holo-translokonda yer almıyorsa	Akiyama ve diğ., 1996
YccA	N-terminal	Chiba ve diğ., 2002
PspC	Psp kompleksi oluşturmamışsa	Singh ve Darwin, 2011
F0a	Proton ATPaz kompleksinde yer almıyorsa	Akiyama ve diğ., 1996
KdtA	Bilinmiyor	Katz ve Ron, 2008
DadA	Bilinmiyor	Westphal ve diğ., 2012
FdoH	Bilinmiyor	Westphal ve diğ., 2012
YfgM	N-terminal	Westphal ve diğ., 2012
PpiD	Bilinmiyor	Bittner ve diğ., 2015
SecD	Bilinmiyor	Arends ve diğ., 2016
ExbD	Bilinmiyor	Arends ve diğ., 2016
YlaC	Bilinmiyor	Arends ve diğ., 2016

Sahip olduğu proteolitik aktivite ve dolaylı olarak göstermiş olduğu düzenleyici rolü ile FtsH, hücre içerisinde kontrol noktası olarak görev yapmaktadır. Bu durum, FtsH’i ilaç endüstrisinde oldukça kullanışlı bir hedef haline getirmektedir. Bu proteini hedef alan moleküler stratejiler enfeksiyona sebep olan bakterilerin ortadan kaldırılmasını sağlayarak; günümüz antibiyotik direncine karşı bir çözüm olacaktır.

2.5. Stomatin, Prohibitin, Flottilin ve HflK/C (SPFH) Domaini

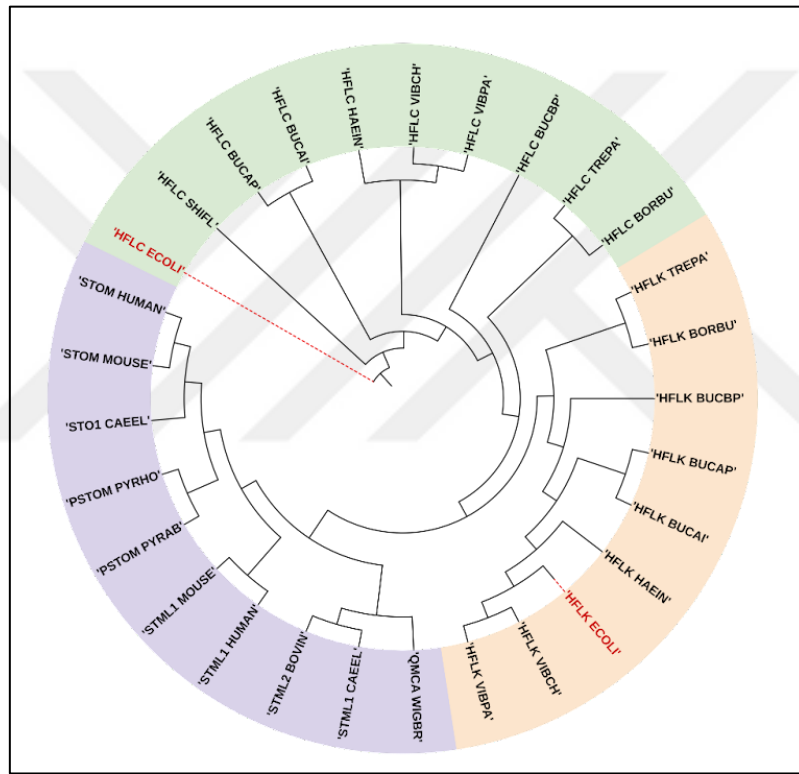
Stomatin, Prohibitin, Flottilin ve HflK/C domaini, sinyal iletimi, protein taşınması ve hücrel organizasyon gibi birçok temel biyolojik süreçte kritik rol oynayan protein ailesidir. SPFH membran proteinleri ailesinin, lipid raflarda bulunan diğer membran proteinlerine bir platform görevi gördüğü bildirilmiştir (Langhorst ve diğ., 2005; Morrow ve diğ., 2005; Stuermer ve diğ., 2005; Browman ve diğ., 2007; Zeke ve diğ., 2009; Zhao ve diğ., 2011; Wessel ve diğ., 2023). SPFH proteinleri, tüm organizmalarda bulunmaktadır, bu da SPFH domaininin evrimsel süreçte korunduğuna işaret etmektedir (Şekil 2.15) (Tavernarakis ve diğ. 1999; Rivera-Milla ve diğ., 2006; Green ve Young, 2008). SPFH proteinleri genellikle bir N-terminal transmembran kısmı ve inter- ve/veya intramoleküler α heliks yapıları sahiptir (Hinderhofer ve diğ., 2009; Dempwolff ve diğ., 2012).

Membran lipidlerinin ve proteinlerinin yanyana lokalize olmaları “fonksiyonel membran mikrodoman”i (FMM) olarak adlandırılmaktadır (Owen ve diğ., 2010; Spira ve diğ., 2012). Hücre membranları, hücrenin iç kısmı ile çevresi arasındaki dinamik sınırlardır. Sınırı oluşturan membran tabaka içerisinde basit ve kompleks lipidler başta olmak üzere proteinler ve diğer bileşikler bulunmaktadır. Mikrodomanın doğru bir şekilde organize olması, hücrel süreçler için hayati önem taşımaktadır (Grecco ve diğ., 2011). Hücre membranlarında proteinlerin yerleşimleri için özel fizikokimyasal özelliklere sahip çeşitli lipid türleri bulunmaktadır; membran yapısı heterojendir ve bu heterojen düzen, hücre membranına gömülü olan membran proteinlerinin farklı şekillerde dağılımlarını düzenlemektedir.

Stomatin yaklaşık 300 kDa büyüklüğünde olup, membranda kolesterol açısından zengin olan bölgelerde bulunmaktadır; çeşitli iyon kanalları ile etkileşime girerek kanal aktivitelerini kolesterole bağımlı bir şekilde düzenlemektedir (Huber ve diğ., 2006).

Flottillin, lipid tabakaya spesifik bir proteindir ve ağırlıkla sinyal iletiminde görev almaktadır; hatta Alzheimer ve Parkinson hastalığı dahil olmak üzere insanlarda çeşitli nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilmektedir (Michel ve Bakovic, 2007; Bramkamp ve Lopez 2015).

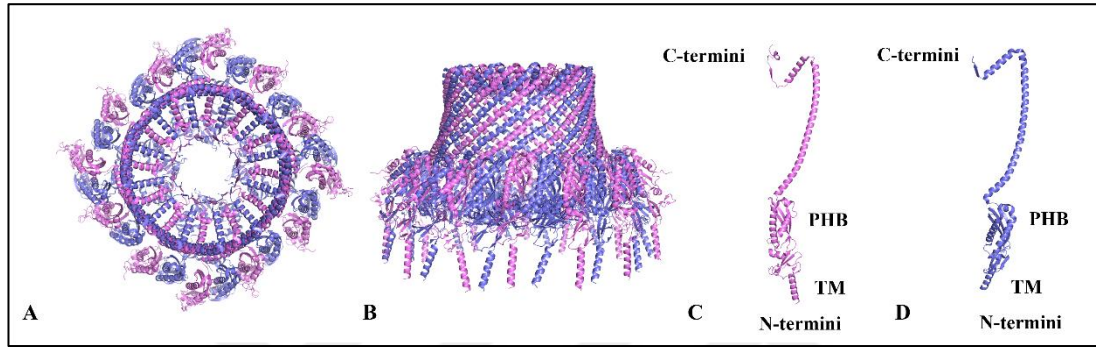
Prohibitinler, SPFH domainindeki diğer proteinlerden farklı olarak, mitokondrinin iç membranında bulunmaktadır (PHB1/2) ve yapılan çalışmalar, prohibitini hedef alarak üretilen moleküllerin kanser, nörodejeneratif, metabolik ve enfeksiyon hastalıklarına karşı umut verici sonuçlar ortaya koymuştur (Ma ve diğ., 2022).



Şekil 2.15. HfLK ve HfLC membran proteinlerinin bulunduğu SPFH domainindeki seçili türlerden oluşan filogenetik analiz. HfLK proteinleri turuncu (*E. coli*, 'HFLK ECOLI'; *Schzaphis graminum*, 'HFLK BUCAP'; *Acyrtosiphon pisum*, 'HFLK BUCAI'; *Vibrio cholera*, 'HFLK VIBCH'; *Vibrio parahaemolyticus* serotype, 'HFLK VIBPA'; *Baizongia pistaciae*, 'HFLK BUCBP'; *Treponema pallidum*, 'HFLK TREPA'; *Borrelia burgdorferi*, 'HFLK BORBU'), Stomatin ve Follitin mor (*Wigglesworthia glossinidia brevipalpis*, 'QMCA WIGBR'; *Caenorhabditis elegans*, 'STML1 CAEEL'; *Bos taurus*, 'STML2 BOVIN'; *Homo sapiens*, 'STML1 HUMAN'; *Mus musculus*, 'STML1 MOUSE', *Pyrococcus abyssi*, 'PSTOM PYRAB'; *Pyrococcus horikoshii*, 'PSTOM PYRHO'; *Caenorhabditis elegans*, 'STO1 CAEEL'; *Mus musculus*, 'STOM MOUSE'; *Homo sapiens*, 'STOM HUMAN'), HfLC yeşil renkte (*E. coli*, 'HFLC ECOLI'; *Shigella flexneri*, 'HFLC SHIFL'; *Schzaphis graminum*, 'HFLC BUCAP'; *Acyrtosiphon pisum*, 'HFLC BUCAI'; *Vibrio cholera*, 'HFLC VIBCH'; *Vibrio*

parahaemolyticus serotype, 'HFLC VIBPA'; *Baizongia pistaciae*, 'HFLC BUCBP'; *Treponema pallidum*, 'HFLC TREPA'; *Borrelia burgdorferi*, 'HFLC BORBU') kümelendirildi.

E. coli K-12'de, *yqiK*, *qmcA*, *hflK* ve *hflC* genleri SPFH domainindeki proteinleri kodlamakta ve her biri N-terminal transmembran segmentine sahip olduğu bilinmektedir. Yapısal olarak prohibitin homologisi gösterirken, N-terminalde bir transmembran heliks yapısı içermektedir (Qiao ve diğ., 2022) (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. HflK ve HflC membran proteinlerinin yapıları (PDB: 7VHP) (On iki alt ünitelerden oluşan HflK ve HflC'nin oluşturduğu kompleks yapının üstten (A) ve yandan (B) görünümü ile HflK (C) ve HflC (D)'nin prohibitin (PHB) domainleri ve transmembran © kısımları PyMOL kullanılarak gösterildi)

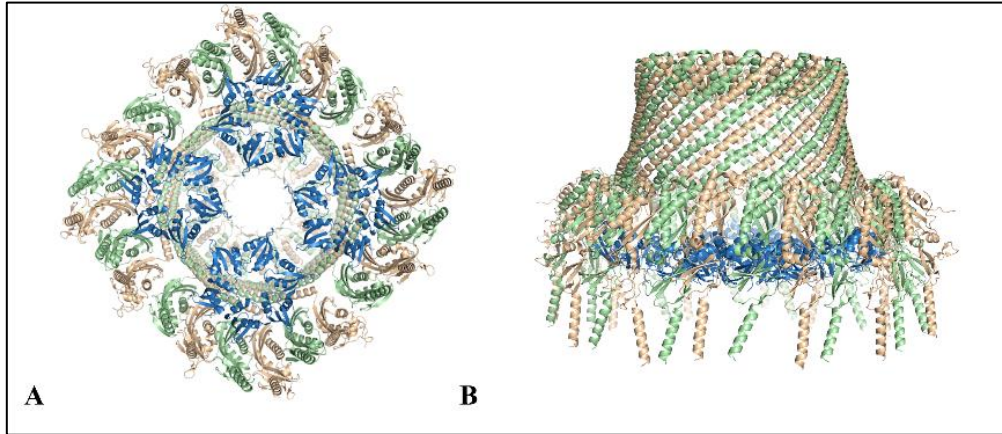
İkisi de tek geçişli membran proteini olan HflK ve HflC'nin yapısal olarak belli farklılıkları vardır: HflK (~45.5 kDa), HflC (~38 kDa)'ye göre fazladan bir N-terminal uzantısına sahiptir ve HflC'nin C-terminali periplazmik tarafta konumlanmaktadır (Ma ve diğ., 2022). PHB1/2 ve homologları HflK/C, sırası ile Yta10/Yta1224 ve FtsH proteinleriyle kompleks oluşturmakta, bu sayede ise membran proteinlerinin kalite kontrolünde ve homeostazis sürecinde düzenleyici olarak görev almaktadır (Ma ve diğ., 2022). HflKC üzerinde yapılan mutasyon çalışmaları, FtsH'nin substratlarından biri olan SecY'nin *in vivo* degradasyonunu hızlandırdığı rapor edilmiştir; bu durum, FtsH ile kompleks oluşturan HflKC'nin proteolitik aktivite üzerinde negatif yönde etkisinin olduğunu göstermektedir (Akiyama ve diğ., 1996; Akiyama ve diğ., 2009; Qiao ve diğ., 2022).

2.6. FtsH-HflKC Kompleksi

FtsH'nin *in vivo* aktiviteleri, SPFH protein ailesi tarafından düzenlenmektedir (Kihara ve diğ., 1996). FtsH'nin HflKC ile oluşturduğu kompleks çapraz bağlamalı ve ortak

saflaştırma deneyleri ile kanıtlanmıştır. FtsH'nin, HflK'nin ve HflC'nin hekzamer formları ile ~1000 kDa moleküler ağırlığa sahip bir kompleks oluşturduğu ileri sürülmüştür (Saikawa ve diğ., 2004). Ancak 2022 yılında Qiao ve diğerlerinin yaptığı çalışmada, FtsH'nin dört hekzamer formunun, HflK ve HflC'nin on iki kopyası ile bir araya geldiği, C4 simetrisinde “kafes/şapka” formu oluşturdukları rapor edilmiştir (Şekil 2.17). FtsH'nin protein kalite kontrolündeki fonksiyonu göz önüne alındığında, proteolitik aktivitesinin hassas bir şekilde düzenlenmesi gerekmektedir (Qiao ve diğ., 2022). HflKC protein kompleksinin, FtsH ile bir araya geldiğinde substratların degradasyonunu inhibe eden bir “modülatör” olarak görev yaptığı düşünülmektedir (Kihara ve diğ., 1996; Kihara ve diğ., 1997; Kihara ve diğ., 1998; Akiyama, 2009).

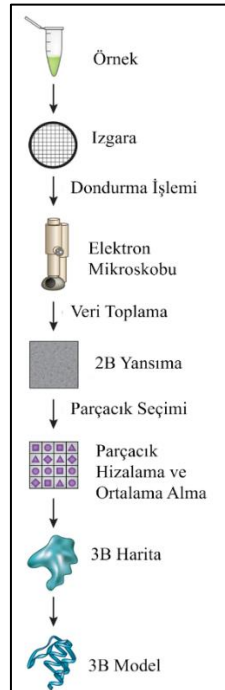
FtsH, HflK ve HflC'nin hepsi membran proteinleridir; kompleks oluşturduklarında çok büyük bir holoenzimi oluşturmaktadır. Şimdiye kadar yapılan tüm çalışmalar, FtsH'nin ayrı ayrı periplazmik, ATPaz, proteaz ve sitozolik domainlerine odaklanırken, 2022 yılında Qiao ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada 6,8 Å çözünürlükte yapısı elde edilmiştir (Şekil 2.17) (Bieniossek ve diğ., 2006, 2009; Ito ve Akiyama, 2005; Kryzwa ve diğ., 2002; Niwa ve diğ., 2002; Scharfenberg ve diğ., 2015; Suno ve diğ., 2006; Suno ve diğ., 2012; Vostrukhina ve diğ., 2015; Qiao ve diğ., 2022).



Şekil 2.17. FtsH-HflKC kompleks membran proteininin 6,8 Å çözünürlükte Kriyo Elektron Mikroskobu ile elde edilen yapısı (PDB: 7VHP) (Qiao ve diğ., 2022) (Sırası ile FtsH mavi, HflK sarı, HflC ise yeşil renkte gösterildi)

2.7. Elektron Kriyo-Mikroskopisi (Kriyo-EM)

Elektron Kriyo-Mikroskopisi (Kriyo-EM), kriyojenik sıcaklıklarda örnekleri incelememize izin veren bir transmisyon elektron mikroskopi yöntemidir. Uzun yıllar boyunca elektron mikroskopisi, biyomakromoleküllerin yapılarının incelenmesi amacıyla kullanılmıştır (Bai ve diğ., 2015). Ancak son yıllarda kriyojenik ve hızlı soğutma teknolojilerinin geliştirilmesi sayesinde, Kriyo-EM'nin doğuşu kaçınılmaz hale gelmiştir. Yapısal Biyoloji'de çığır açan bu teknoloji 2017 yılında Jacques Dubochet, Joachim Frank ve Richard Henderson'un Kimya Nobel Ödülü almasını sağlamıştır. Proteinlerin camsı (vitroz) buz içerisinde dondurularak sabitlenmesine dayanan Kriyo-EM tekniğinde, moleküller, tüm açılardan “fotoğraflanmaktadır”. Bu görüntülere mikrograf adı verilmektedir. Sonrasında iki boyutlu bu mikrograflar, bir bilgisayar programı aracılığıyla işlenmektedir. Bilgisayarda yapılan bu hesaplamalar ile biyomakromolekülün, üç boyutlu yapısı oluşturulmaktadır (Şekil 2.18) (Benjin ve Ling, 2020). Aaron Klug'un 1968 yılında önerdiği “Merkezi Kesit Teoremi”, üç boyutlu rekonstrüksiyon sürecinde kullanılmaktadır: Belirli bir yönde yansıtılan bir işlemin Fourier dönüşümü, orijinden geçen ve yansıtma yönüne dik olarak yapılan işlemin kesitine eşittir (De Rosier ve Klug, 1968).

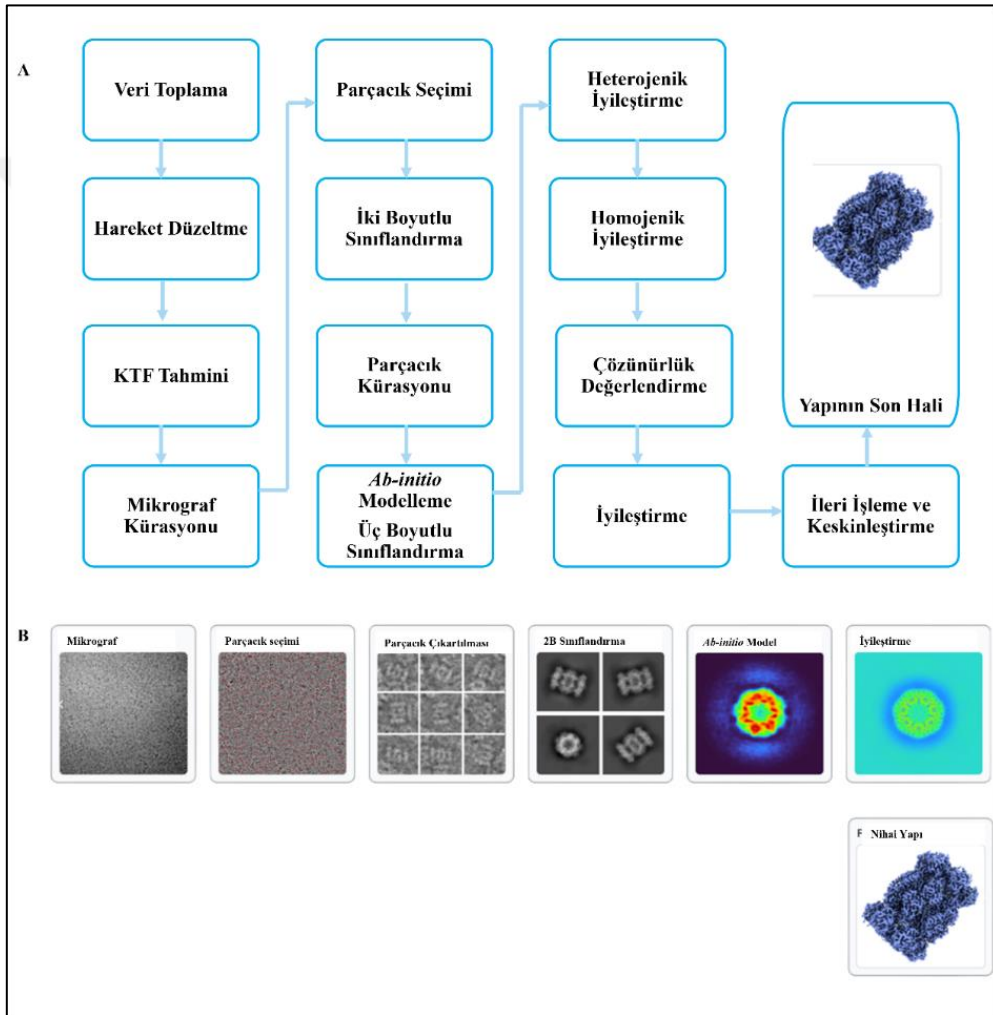


Şekil 2.18. Kriyo-EM'nin çalışma prensibi (Doerr, 2016)

Kriyo-EM'in çığır açan gelişmelerinin altında yatan temel teknolojiler řu şekildedir: Günümüzde en gelişmiş cihazlardan biri olan Titan Krios (Thermo Fisher Scientific, ABD) 300 kV alan emisyonlu düşük sıcaklıkta iletim elektron mikroskobunda bir seferde on iki örneğin incelenmesini sağlayabilmektedir. Cihazların sahip olduğu otomatik sıvı azot dolum sistemi sayesinde düşük sıcaklık uzun süreli çalışma için ideal hale getirilmiştir. Aynı zamanda cihaz üzerinde yüksek görüntülemeye stabilite sağlayan sabit güç modlu manyetik lens sistemi geliştirilmiştir. Yeni dedektör donanımının geliştirilmesi, Kriyo-EM'nin çözünürlük devrimine yol açmıştır. Yeni doğrudan elektronik dedektör, geleneksel dedektörlerden (CCD kamera veya fotoğraf filmi) daha hassas ve hızlıdır. Ayrıca tek uzun pozlama yerine saniyede birden fazla kare hızında görüntü verilerini kaydedebilmektedir. Doğrudan elektronik dedektör kamerası sadece dedektör verimliliğinde önemli bir iyileşme sağlamakla kalmaz, görüntülerin yığılmış karelerden oluşan “filmler” olarak elde edilmesine olanak tanımaktadır. Düşük sinyal – gürültü oranı ve zayıf kontrast, Kriyo-EM'nin başlıca zorluklarından biridir ve biyolojik örnekler radyasyona karşı hassas olduğu için bu sorun kaçınılmaz durumdadır. Yeni doğrudan elektronik dedektörleri, görüntü işleme ve algoritmalarının da geliştirilmesinin önünü açmıştır (Benjin ve Ling, 2020). Gürültülü görüntülerden yapısal bilgiler, kullanıcı müdahalesi olmadan RELION 4.1, (Scheres, 2012), CryoSPARC (Punjani ve diğ., 2017), Scipion (de la Rosa-Trevín ve diğ., 2016) ve EMAN2 (Tang ve diğ., 2007) gibi programlar üzerinden işlenebilmektedir. Yeni algoritmanın geliştirilmesi ve ilerlemesi, araştırmacıların örnek işlemede yeni bir anlayışa sahip olmalarını sağlamaktadır: Örnekler, zorlu, zaman alıcı ve örneğe zarar verebilen biyokimyasal süreçler aracılığıyla değil, bilgisayarlarda saflaştırılmaktadır.

Görüntü işleme sürecinde, elektron mikroskobundan toplanan mikrografların çözünürlükleri hakkında bilgi edinebilmek için ilk olarak hareketli yapı olmalarına karşı “Hareket Düzeltmesi” yapılarak kontrast transfer fonksiyonundan (KTF) geçirilmektedir; işlem sonunda .logfile uzantılı dosyada yoğunluk haritasının çözünürlüğü hakkında bilgi sahibi olunmaktadır. Sonrasında manuel ya da otomatik (makine öğrenmesi) şekilde parçacıklar seçilerek, İki Boyutlu Sınıflandırma yapılmaktadır. Bu sınıflandırma sonucunda, birbirine benzeyen parçacıklar bir araya getirilmekte ve frekanslarına bağlı olarak en baştan itibaren sıralanmaktadır. Sonrasında Üç Boyutlu Sınıflandırma ile işleme devam edilmekte ve referans alınan data ile üç boyutlu sınıflandırmadan seçilen bir sınıfın

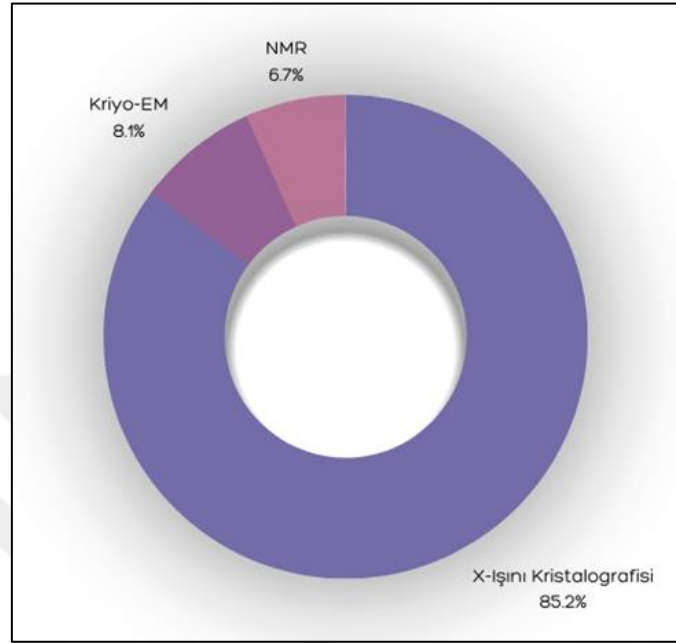
arasında “Hizalama” işlemi yapılarak modelin son haline yakınsaması gerçekleştirilmektedir. İki harita, birbirine daha fazla yakınsamadığı zaman “İyileştirme” işlemi sona ermektedir. Bir sonraki aşama olan “İleri İşleme”de ise bir “maske” üretilmektedir. Bu maskenin amacı, bir önceki haritadan geri plandaki ve çözücünden kaynaklanan gürültüyü çıkartıp, haritanın daha keskin görünmesini ve bu sayede çözünürlüğünün artmasını sağlamaktır. Sonuç olarak ise yoğunluk haritası elde edilmektedir (Şekil 2.19).



Şekil 2.19. Kriyo-EM tekniğinde görüntü işleme sürecinin detaylı (A) ve şematik gösterimi (B) (Punjani ve diğ., 2017)

Yapısal Biyoloji, protein ve benzeri biyolojik makromoleküllerin yapılarını ve işlevlerini atomik düzeyde inceleyen bir disiplindir. Bu alanda yaygın olarak kullanılan üç teknik vardır: X-Işını Kristalografisi, Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) ve Kriyo-EM. Protein Data Bankası (PDB)’nin 2023 yılı verilerine göre, yapıların %85,2’si X-Işını

Kristalografisi kullanılarak, %8,1'i Kriyo-EM ile ve %6,1'i ise NMR tekniği ile elde edilmiştir (Şekil 2.20). Kriyo-EM ile yapı çözümlemeye 11 Eylül 2023 tarihi itibarı ile 16,952 yapı kaydedilmiştir (URL-2).

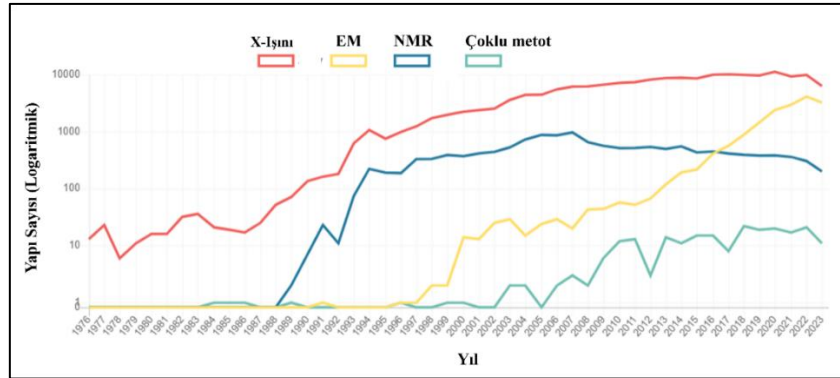


Şekil 2.20. Yapısal Biyolojide protein yapı analizi için kullanılan tekniklerin dağılım yüzdeleri (URL-2)

Yapı çözümlemeye kullanılacak olan tekniğin seçiminde belirli kriterler bulunmaktadır. Eğer örnek, kristalize edilebiliyorsa, X-ışını kristalografisi ile genel olarak 10-150 kDa büyüklüğündeki örneklerin atomik çözünürlükte yapılarına ulaşılabilir.

Nükleer manyetik rezonans (NMR), dinamikler ve etkileşimler hakkında bilgiler sağlayabilmekte, ancak atomik yapı belirleme işlemi örneğin boyutu (>40-50 kDa) ile sınırlıdır. Her iki teknik de yüksek saflıkta ve konsantrasyonda örnek gerektirmektedir.

Kriyo-EM'de, az miktarda (~0.1 mg) örnek yeterlidir ve kristalleştirmeyi gerektirmemektedir (Benjin ve Ling, 2020). Bu sınırlandırmalar olmadan Kriyo-EM, birçok yönden X-ışını kristalografisi ile rekabet edebilir hatta onun yerini alabilir hale gelmiştir. Kriyo-EM'in sağladığı hız ve verim, PDB'nin (Şekil 2.21) ve Elektron Mikroskopisi Data Bankası (EMDB) (Şekil 2.22) istatistiklerine de yansımaktadır.



Avantajlarının yanı sıra, örneğin homojen olması gerekliliği Kriyo-EM'nin sahip olduğu bir dezavantaj olarak belirtilmektedir. Aynı zamanda Kriyo-EM tekniğinde uygulama sırasında karşılaşılabilecek sorunlar vardır. Bunların başında, örneğin kararsız, bozulmuş veya agrege olması gelmektedir. Bu durumu takiben proteinin sahip olduğu esnekliğin de iki boyutlu ve üç boyutlu rekonstrüksiyonda çözünürlüğü düşürmesi gelmektedir. Bunların üstesinden gelebilmek için çalışılan proteinin özelliklerinin bilinmesi, ve deneysel sürecin iyi yönetilmesi gerekmektedir (Bai ve diğ., 2015; Benjin ve Ling, 2020).

Kriyo EM, bilimsel araştırmanın çeşitli alanlarında uygulanabilmekte ve biyolojik makromoleküllerin yapısal organizasyonu ve dinamikleri hakkında bilgi sağlamaktadır. Yapısal analizler ise ilaç keşfi, hücre organizasyonu ve biyokimyasal reaksiyonların aydınlatılmasında hayati rol oynamaktadır. Örneğin 2019-2020 yıllarında COVID-19 salgınının çok sayıda insanı etkilemesi ile başlatılan aşı çalışmalarının çok hızlı sonuç vermesinin nedenlerinden biri, Ke ve diğerlerinin 2020 yılında SARS-CoV-2'nin insan ACE2 reseptörlerine bağlanan "spike" proteinlerinin yapılarının (PDB: 6M3W, 6VXX, 6VYB ve 6X2B) Kriyo-EM ile belirlenmesi olarak gösterilmektedir (Subramaniam, 2020).

FtsH-HflKC membran protein kompleksi, membranın yapısını ve işlevselliğini düzenlemekte önemli bir rol oynamaktadır. Ancak, membran proteinlerinin dinamik yapısı, ve saflaştırma sürecinde deterjan kullanımının gerekliliği, ve membran protein kompleksinin boyutu kristal yapısının oluşturulmasını zorlaştırmaktadır. Bu doğrultuda, FtsH-HflKC membran protein kompleksinin yapısını çözmek amacıyla kriyo-EM yöntemi kullanıldı.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. Malzemeler

Proje kapsamında gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, Carbosynth (Amerika), Sigma Aldrich (Almanya), Thermo Fischer Scientific (Amerika), Invitrogen (İngiltere), Bioline (İtalya), Jena Bioscience (Almanya), Merck (Almanya), Purolite (Amerika) ve Cytiva (İngiltere) firmalarından temin edilen kimyasallar kullanıldı. Plazmit izolasyonu, MN (Almanya) Plazmit DNA İzolasyon Kit'i kullanılarak gerçekleştirildi. Restriksiyon enzimleri olarak ClaI, EcoRV ve HindIII (NEB, İngiltere) kullanıldı. Saflaştırma sürecinde IBA Lifesciences (Almanya) firmasından alınan Streptaktin reçinesi kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Klonlama ve Transformasyon Stratejileri

FtsH-HflKC membran protein kompleksini ifade eden genleri içeren plazmit (pAce-HflKC-His10_x_pDS-FtsH-3strep), ACEMBL MultiColi (Berger ve diğ., 2011) adı verilen modüler bir kompleks protein ekspresyon sistemi ile tasarlanmış ve Prof. Christiane Berger-Schaffitzel (Bristol Üniversitesi, Biyokimya Bölümü) tarafından gönderilmiştir. Bu sistem, çoklu gen içeren kompleks proteinlerin ekspresyonu için gereken genleri klonlamak amacı ile *de novo* tasarımı donör ve alıcı vektörleri kullanmaktadır.

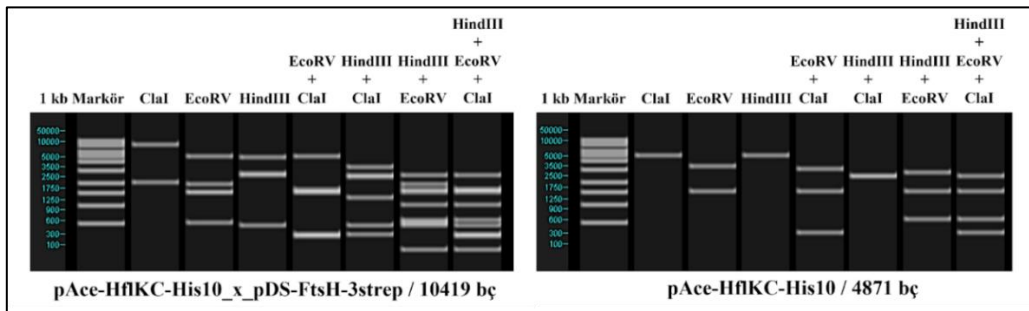
pAce-HflKC-His10_x_pDS-FtsH-3strep plazmitinin çoğaltılması amacıyla 10beta (NEB, İngiltere), protein ekspresyonu amacıyla ise BL21 (DE3), Lemo21 (DE3) (NEB, İngiltere) kompetan hücrelerine aktarıldı. -80 °C'de muhafaza edilen 10beta kompetan hücreleri, buzda bekletildi. Hücrelere, 10 ng olacak şekilde plazmitler eklendi ve kuru su banyosunda (42 °C) 30 saniye bekletilerek tekrar buza konuldu. Plazmiti içeren hücreler; 0,95 ml LB sıvı besiyeri içerisinde 37 °C'de bir saat inkübe edildi. Kültürden 100 µl alınarak petrinin yarısına yayma yöntemi ile inoküle edilirken, geri kalan 850 µl santrifüjlenerek hücreler çöktürüldü. Pelet, tüp içerisinde bırakılan 100 µl besiyeri ile çözündürüldü. Sonrasında FtsH-HflKC için 100 µg/ml ampicilin ve spektinomisin içeren agar ortamına yayma yöntemi ile inoküle edildi. Petri üzerinden seçilen kolonilerden hücre stoğu yapmak üzere uygun antibiyotiği içeren LB sıvı besiyerine ekilerek, gece

boyu büyümeye bırakıldı. Bu kültürden stok amacı ile alınarak %80 gliserol (h/h) içeren ortama eklendi ve sıvı azot ile dondurularak -80 °C’de saklandı. 10beta kompetan hücrelerine aktarılan plazmitlerin izolasyonları kitinin satın alındığı firma (MN, Almanya) tarafından temin edilen bilgiler doğrultusunda gerçekleştirildi. Buna göre, gliserol stoğu da yapılan hücrelerden tekrar büyütme yapıldı. Büyütülen kültür, 11,000 × g’de santrifüj edilerek 0,25 ml A1 tampon çözeltisi eklendi. Bu işlemi takiben 0,25 ml A2 tamponu tüplere eklendi ve tekrar 11,000 × g’de santrifüjlendi. 0,3 ml A3 tamponu da eklendikten sonra yine santrifüj işlemi 11,000 × g’de 10 dakika tekrarlandı. Supernatan, firmadan temin edilen silika matriksli kolonlara sahip tüplere aktarıldı ve tekrar santrifüj edildi. 0,5 ml A4 tamponu kolona eklendi ve tekrar santrifüj edilerek DNA’nın bağlandığı silika matriksinin kurutulması sağlandı. Sonrasında dH₂O eklendi ve bir dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılıp tekrar santrifüj edilerek DNA tüplere aktarıldı. Konsantrasyon ve saflık ölçümleri için Allsheng Nano-300 (Çin) cihazı kullanıldı. Sonrasında doğrulama için ClaI, EcoRV ve HindIII (NEB, İngiltere) restriksiyon enzimleri arasından seçilerek 15 dakika boyunca 37 °C’de inkübe edildi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Plazmitlerin kesimi için gerçekleştirilen reaksiyon içeriği.

Karışım	Reaksiyon Hacmi (50 µl)
DNA	1 µg
10X Tampon	5 µl
Restriksiyon Enzimi	1 µl (10 U)
ddH ₂ O	50 µl’ye tamamlayacak şekilde

Restriksiyon enzimleri ile muamele sonrası agaroz jelde görüntülenmesi beklenen bantlar DNASTAR (URL-5) uygulaması kullanılarak simüle edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Restriksiyon enzimleri ile plazmitlerin kesimi sonrası agaroz jelde görüntülenmesi beklenen bantlar

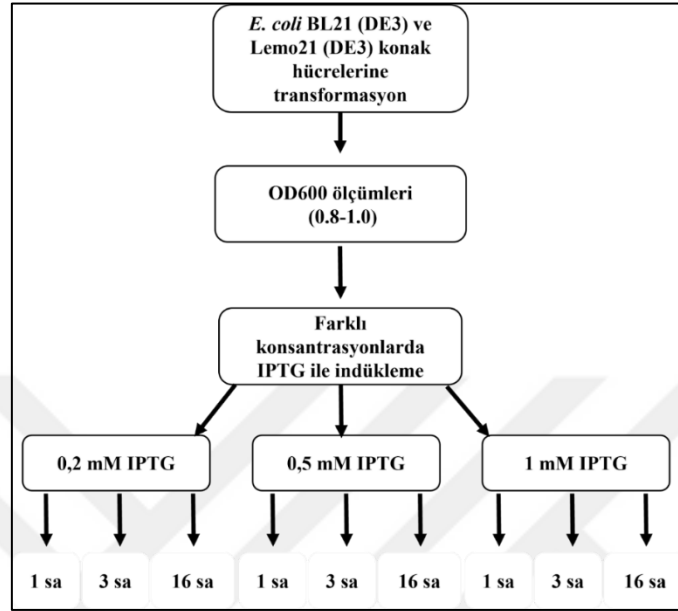
3.2.2. Ekspresyon Optimizasyonu

E. coli Lemo21 (DE3) ve BL21 (DE3) kompetan hücrelerine transforme edilen FtsH-HflKC plazmiti, İzopropil β -D-1-tiyogalaktopiranozit (IPTG) varlığı ve konsantrasyonu, indüksiyon süresi, sıcaklık ve sadece Lemo21 (DE3) kompetan hücre tipi için gereken Ramnoz konsantrasyonu olmak üzere beş farklı büyüme parametresi ile optimize edildi.

-80 °C’de muhafaza edilen gliserol stok hücrelerden Ampisilin (100 μ g/ml) ve Spektinomisin (100 μ g/ml) içeren LB agar çizgi ekim gerçekleştirildi. Gece boyu 37 °C’de inkübe edilen kolonilerden biri seçilerek LB sıvı besiyerine ön kültür elde etmek amacı ile inokülasyon gerçekleştirildi. Bu ön kültürden 20 ml alınarak büyük ölçekte üretim için bir litre hacimdeki 2xYT sıvı besiyerine aktarıldı. İndüksiyon için OD₆₀₀ ölçümlerinin 0,3-0,6 arasında olması beklendi. Daha sonrasında her bir koşul için elde edilen hücre özütü, 5000 rpm’de 25 dakika santrifüj (Beckman Coulter Avanti –JLA 8000, Amerika) ile izole edildi ve 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, içeren “Parçalama Tamponu” içerisinde çözündürüldü ve sonikasyon ile parçalandı (VibraCell VCX130, Sonics, Amerika). Sonikasyon koşulları; %50 amplitütte, bir dakikalık (1 s açık, 1 s kapalı) atımlar toplamda üç döngü olacak şekilde gerçekleştirildi. Örnekler, 4x yükleme tamponu (50 mM Tris-HCl pH 6,8; %2 SDS; %1 β -mercaptoethanol; %0,02 Bromofenol mavisi; %10 gliserol; 12,5 mM EDTA) kullanılarak SDS-PAGE (%12) jeline yüklendi ve analiz edildi.

FtsH-HflKC genlerini kodlayan plazmite benzer şekilde, HflKC genlerini kodlayan plazmit de *E. coli* Lemo21 (DE3) ve BL21 (DE3) kompetan hücrelerine transforme edildi ve küçük ölçekli ekspresyon testi yapılarak optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Gliserol stok aracılığı ile önce tek koloni elde edildi ve sıvı besiyerine aktarılıp inkübe edilerek ön kültür hazırlandı. Şekil 3.2’de belirlenen koşullar uygulanmak üzere ön kültürden bir ml alınarak 10 ml hacimdeki 2xYT besiyerlerine aktarıldı. IPTG ile İndüksiyon için OD₆₀₀ ölçümlerinin 0,8-1 arasında olması beklendi. Daha sonrasında her bir koşul için elde edilen hücre özütü, 5000 rpm’de 25 dakika santrifüj (Beckman Coulter Avanti –JLA 8000, Amerika) ile izole edildi ve 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl içeren “Parçalama Tamponu” içerisinde çözündürüldü ve sonikasyon ile parçalandı (VibraCell VCX130, Sonics, Amerika). Sonikasyon koşulları; %50 amplitütte, 1 dakikalık (1 s açık, 1 s kapalı) atımlar toplamda üç döngü olacak şekilde gerçekleştirildi.

Örnekler, 4x yükleme tamponu (50 mM Tris-HCl pH 6,8; %2 SDS; %1 β -mercaptoethanol; %0,02 Bromofenol mavis; %10 gliserol; 12,5 mM EDTA) kullanılarak SDS-PAGE (%12) jeline yüklendi ve analiz edildi.



Şekil 3.2. Küçük ölçekli ekspresyon testi koşulları

3.2.3. Solübilizasyon ve Saflaştırma Deneyleri

FtsH-HflKC membran protein kompleksini çözünür hale getirmek üzere, farklı Kritik Misel Konsantrasyonlarına sahip hafif deterjanlar (DDM; n-Dodecyl β -D-Maltoside ve LMNG; Lauryl Maltose Neopentyl Glycol; Carbosynth, Amerika) kullanıldı. Solübilizasyon süreci için altı farklı koşul denendi. Her bir koşul için 0,7 g membran peleti kullanıldı. İki farklı deterjan (DDM ve LMNG), iki farklı inkübasyon periyodunda (4 °C’de 1 saat ve 4 °C’de 2 saat), farklı türde son konsantrasyonlar ile (mumsu membran peletine ağırlıkça %2 DDM ve %1 LMNG; %10’luk (a/h) DDM’den %1; %2 ve %5’lik (a/h) LMNG’den son konsantrasyonları %0,5; %1 olacak şekilde) optimizasyon gerçekleştirildi (2 zaman $\times$ 2 deterjan $\times$ 3 farklı konsantrasyon). Membran solübilizasyon sürecinde 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) ve 100 mM NaCl içeren “Parçalama Tamponu” kullanıldı ve inkübasyon, farklı koşulları takiben manyetik döndürücüde yavaş hızda gerçekleştirildi. Solübilizasyon sonrasında örnekler, Beckman Optima XE, Ti45 rotor kullanılarak 100,000 $\times$ g’de 45 dakika boyunca santrifüj edildi ve süpernatantlar, SDS-PAGE (%12) ile analiz edildi.

Solubilize FtsH-HflKC membran protein kompleksi, plazmitinde bulunan İkili-Strep etiketi sayesinde afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Saflaştırma süreci, firmanın sağladığı protokol aracılığı ile tamamlandı. Solubilize FtsH-HflKC proteini kolona yüklendi ve 10 dakika inkübasyon sonrasında “Flow Through” toplandı. Sonrasında kolon, uygun deterjan içeren “Tampon W” ile yıkandı. İlk yapılan yıkamadan 2 µl, kalanından ise 13 µl alınarak SDS-PAGE’de analiz için -80 °C’de saklandı. 2,5 mM Destiyobiyotin ve solubilizasyon sırasında kullanılan hafif deterjan içerikli “Tampon E” ile elüsyon gerçekleştirilerek elüatlar fraksiyonlarda toplandı; -80 °C’de saklanmak üzere sıvı azot ile donduruldu. Sonuçlar SDS-PAGE (%12) ve Doğal Jel (%3-8) ile analiz edildi.

Karakterizasyon sürecinde karşılaştırma yapmak üzere sadece FtsH membran proteini de Strep etiketi içerdiği için FtsH-HflKC membran protein kompleksi ile aynı şekilde saflaştırıldı.

3.2.4. Farklı Deterjanların Saflaştırma Üzerine Etkisi ve Amfipol

LMNG ve DDM’nin saflaştırma sürecindeki etkisini araştırmak üzere iki farklı deney düzeneği kuruldu. Membran solubilizasyonun optimize edildiği koşul olan iki ayrı mumsu membran peleti elde edildi ve bir örneğe ağırlıkça %2 DDM ve diğer örneğe %1 LMNG eklendi; 15 ml Parçalama Tamponu eklenip yavaşça çözdürüldükten sonra bir saat boyunca 4 °C’de inkübe edildi. Inkübasyonu takiben, $100,000 \times g$ ’de 45 dakika santrifüj edilerek üst faz alındı ve saflaştırma işlemine geçildi. İki ayrı koşul için saflaştırma tamponları her bir deterjana uygun olacak şekilde hazırlandı (%0,01 DDM ve %0,005 LMNG). Saflaştırma işlemine Bölüm 3.2.3’te anlatıldığı şekilde devam edildi. FtsH-HflKC’nin saflaştırma sonrasında kararlılığını arttırarak konsantre etmek amacıyla A8-35 amfipolü (Jena Bioscience, Almanya) kullanıldı. Bu doğrultuda saf proteinden 150 µg alınarak protein/amfipol oranı 1:7 olacak şekilde iki saat boyunca 4 °C’de inkübasyona bırakıldı. Bu süre içerisinde polisistrenik boncuklar (PAD600, Purolite, ABD) hazırlanarak protein/amfipol karışımına eklendi; bir gece boyunca 4 °C’de inkübasyona bırakıldı. Sonrasında santrifüj edilerek 36üpernatant alındı ve konsantrasyon tüpleri kullanılarak 50 µl’ye kadar konsantre edildi; sıvı azotla dondurularak -80 °C’de saklandı. Sonuçlar SDS-PAGE (%12) ile analiz edildi.

3.2.5. ATPaz Aktivite Deneyleri

FtsH'nin ve FtsH-HflKC'nin ATPaz aktivite ölçümleri, EnzChek Fosfat Ölçüm (Thermo Fisher Scientific, USA) kitinin sağladığı protokol kullanılarak optimize edildi. Optimizasyon sürecinde ilk olarak serbest inorganik fosfat için bir standart eğri oluşturuldu. Bu eğrinin oluşturulmasında kullanılan SD0, SD1, SD2, SD3, SD4, SD5, SD6 reaksiyon karışımlarında sırasıyla 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μM konsantrasyonlarında KH_2PO_4 inorganik fosfat (Pi) kaynağı olarak kullanıldı ve 360 nm'de ölçüm alındı. ATPaz aktivitesinin ölçümleri ise 30 μl 20X Reaksiyon Tamponu, 120 μl MESG, 6 μl PNP (1 U), 2 μM FtsH ya da 2 μM FtsH-HflKC toplam 600 μl hacminde bir araya getirilerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 ve 20 mM ATP; 1 mM KCl, 1 mM NaCl içeren substrat karışımı reaksiyon karışımına eklenerek 360 nm'de ölçüm gerçekleştirildi.

3.2.6. Proteaz Aktivite Deneyleri

Proteaz Aktivitesi için evrensel proteaz substratı olan resofurin-etiketli kazein, Sigma-Aldrich (Almanya)'ten temin edildi. Kitin sağladığı protokol doğrultusunda, proteolitik aktivite optimize edildi. Deney öncesinde Tablo 3.2'de verilen tampon çözeltiler hazırlandı.

Tablo 3.2. Proteaz aktivitesi için hazırlanan solüsyonlar ve içerikleri.

Solüsyon	İçerik
Substrat Çözeltisi	%0,4 Kazein (ddH ₂ O)
İnkübasyon Çözeltisi	0,2 M Tris-HCl, pH 7,8; 0,02 M CaCl ₂
Durdurma Çözeltisi	%5 Trikloroasetik Asit (a/h) (ddH ₂ O)
Aktivite Çözeltisi	0,5 M Tris-HCl, pH 8,8

Hazırlanan solüsyonlar, reaksiyonu kurmak üzere Tablo 3.3'te verilen sıra ile kuruldu. Proteaz aktivitesi için hazırlanan örnekler, 37 °C'de sırasıyla 15, 30, 45, 60 ve 120 dakika boyunca inkübe edildi. Reaksiyonu durdurmak için kör ve örneklere 288 μl %5 Trikloroasetik Asit eklenip tekrar 37 °C'de 10 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Sonrasında $12,000 \times g$ 'de beş dakika santrifüj edildi; 240 μl süpernatant alındı ve küvete

konuldu; üzerine 360 µl Aktivite Çözeltisi eklenip karıştırıldı ve hemen 574 nm’de ölçüm alındı.

Tablo 3.3. Proteaz aktivitesi için hazırlanan reaksiyon karışımı.

Reaksiyon Karışımı	Örnek (µl)	Kör (µl)
Substrat Çözeltisi	30	30
İnkübasyon Çözeltisi	30	30
ddH ₂ O	-	60
FtsH / FtsH-HflKC	60	-

3.2.7. Transmisyon Elektron Mikroskopisi Analizleri

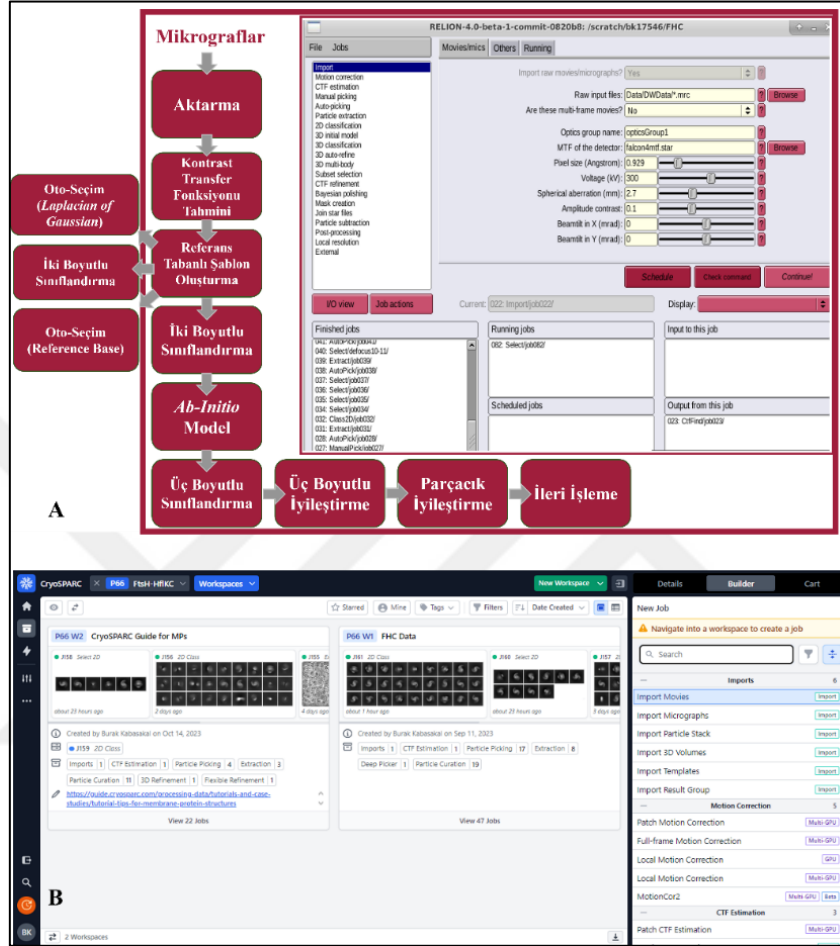
Saf FtsH-HflKC örnekleri ayrı ayrı DDM, LMNG ve amfipol içeren 0,05 mg/ml konsantrasyonlarında hazırlandı. Homojenlik açısından kontrol edilmek üzere; karbon kaplı ızgaralar (grid), %70’lik etanol içerisinde bir saat inkübe edildi ve ızgaralar kurumaya bırakıldı. 5 µl örnek, ızgara üzerine kondu ve bir dakika bekletildi. Sonrasında ızgaradaki fazla örnek kurutma kağıdı yardımı ile emdirildi ve ızgara 20 µl ddH₂O üzerine bırakıldı; 15 saniye bekletildi ve tekrar kurutma kağıdı ile fazlası alındı. Sonrasında ise ızgara son olarak 15 µl Uranil Asetata kondu; bir dakika bekletildi; fazlası kurutma kağıdı ile alındı.

Örnekler, yukarıda bahsedilen işlemlerden geçirilerek Ankara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nde Araştırma Görevlisi Hakan Eskizengin aracılığı ile Transmisyon Elektron Mikroskobu’nda incelendi.

3.2.8. Kriyo-Elektron Mikroskobu ile Veri Toplama

Saflaştırılan FtsH-HflKC membran protein kompleksi, ince bir delikli karbon filmi ile kaplanmış bir EM ızgarasına (grid) uygulandı ve çözeltiyi uzaklaştırmak için filtre kağıdı kullanılarak karbon filmde ince bir sıvı tabaka oluşturuldu. Daha sonrasında, Dubochet ve arkadaşları (1982) tarafından geliştirilen “daldırmalı dondurma” (plunge-freezing) tekniği ile, ızgara, sıvı nitrojen ile soğutulan sıvı etan içerisinde yerleştirildi. Örneğin kriyo-EM mikrografları Thermo Fisher Scientific Nanoport (Customer Demonstration and Excellence Center Eindhoven, Hollanda) laboratuvarlarında Titan Krios cihazında

toplandı. Veriler, yoğunluk haritasını elde etmek üzere RELION (Regularised Likelihood Optimisation) (Scheres, 2012) 4.1 ve CryoSPARC (Punjani ve diğ., 2017) programı kullanılarak işlendi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. RELION 4.1 (A) ve CryoSPARC (B) programlarının ara yüzleri

Kriyo-EM ile elde edilen mikrografların çözünürlükleri hakkında bilgi edinebilmek için Bölüm 2.7’de anlatıldığı şekilde bir yol izlendi. Kullanılan programdan bağımsız şekilde ilk olarak mikrograflar programa aktarıldı, bunu takiben Kontrast Transfer Fonksiyonu gerçekleştirildi. Sonrasında otomatik (makine öğrenmesi) şekilde parçacıklar seçilerek, İki Boyutlu Sınıflandırma gerçekleştirildi. Bu sınıflandırma sonucunda, birbirine benzeyen parçacıklar bir araya getirildi ve frekanslarına bağlı olarak en baştan itibaren sıralandı. Sonrasında Üç Boyutlu Sınıflandırma ile işleme devam edildi ve referans alınan data ile üç boyutlu sınıflandırmadan seçilen sınıfın arasında “Hizalama” işlemi öncesinde “Çoklu-kısım İyileştirme” ile FtsH ve Hf1KC olarak iki ayrı model ve maske oluşturuldu. Hizalama ve iyileştirme işlemleri ayrı ayrı hem FtsH hem de Hf1KC için gerçekleştirildi.

Bir sonraki aşama olan “İleri İşleme (Post-Processing)”de ise bir “maske” üretildi. Bu sayede diğer haritalardan gürültü çıkartıldı ve kesinleştirilerek çözünürlük arttırıldı. Bu sayede FtsH-HflKC membran protein kompleksinin yoğunluk haritasının son hali elde edildi.

3.2.9. Küçük Açılı X-ışını Saçılım (SAXS) Deneyi

Saflaştırılan FtsH-HflKC membran protein kompleksi (1,5 mg/ml), Küçük Açılı X-ışını Saçılım analizlerini gerçekleştirmek üzere, European Molecular Biology Laboratory (EMBL, Hamburg), BioSAXS, PETRA-III P12’ye soğuk zincir ile gönderildi. Burada 100 µl örnek, ilk olarak HPLC Superdex 200 Increase 5/150 GL kolonundan geçirildi ve Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi gerçekleştirildi. SAXS verileri, saçılımları (q) 0,007 – 0,4 Å⁻¹ aralığında olacak şekilde toplandı (Blanchet ve diğ., 2015). Veriler, *ab-initio* yapı modelleme programı ATSAS kullanılarak işlendi (Manalastas-Cantos ve diğ., 2021). Elde edilen model, elektron yoğunluğu farkının en büyük olduğu yapıların en baskın morfolojilerini göstermektedir (Blanchet ve diğ., 2015).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. FtsH-HflKC'nin Ekspresyonu ve Saflaştırılması

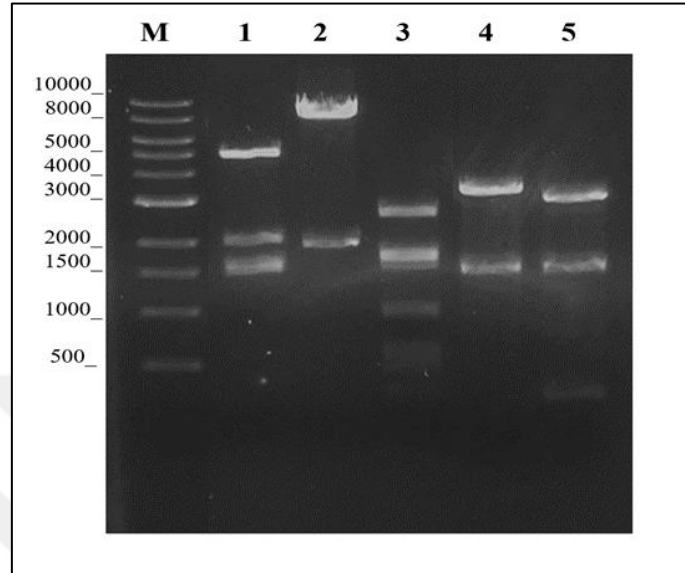
FtsH-HflKC kompleks membran proteinlerini ifade eden genleri içeren plazmit (pAce-HflKC-His10_x_pDS-FtsH-3strep; 10,419 bç), “ACEMBL Multicoli” adı verilen teknikte Bristol Üniversitesi’nde bulunan Prof. Dr. Christiane Berger-Schaffitzel’in grubu tarafından üretilmiştir (Bieniossek ve diğ., 2009). Vektörün dizaynı, aşırı ekspresyonun gerçekleşmesi için laktoz analogu olan IPTG ve Arabinoz promotör genleri içermekte ve aynı zamanda afinite kromatografisi ile saflaştırılabilmesi için HflC’nin N-terminalinde on histidin etiketi ve FtsH’nin N-terminalinde Streptaktin etiketi içermektedir. Bu sayede üretilen plazmitlerde, üretimi zor olan kompleks ve membran proteinlerinin hücre içerisinde aşırı ekspresyonunun gerçekleşebilmesi için *de novo* tasarımına dayanan “donör” ve “alıcı” vektörler kullanılmaktadır. Sonrasında ise ligasyondan bağımsız bir şekilde entegre edilerek “çoklu gen içeren vektör” üretimi gerçekleştirilmektedir. Ma ve diğerleri (2022) tarafından yapılan çalışmada, FtsH ve HflKC membran proteinlerini ifade eden genler, ayrı ayrı sırası ile pETDuet ve pRSFDuet plazmit vektörlerine entegre edilmiş, daha sonrasında iki rekombinant plazmit *E. coli* BL21 (DE3) konak hücrelerine ekspresyon için aktarılmıştır. Ancak bu çalışmada “çoklu gen” vektörü sayesinde FtsH-HflKC membran protein kompleksinin ifadesi tek bir plazmit üzerinde sağlandı. FtsH, HflK ve HflC membran proteinlerinin, doğal şekilde oluşturdukları kompleks yapı göz önüne alındığında, tek bir vektöre entegre edilerek bu genlerin ifadelerinin sağlanmasının doğal yapıyı destekleyeceği kaçınılmazdır.

FtsH-HflKC membran proteinlerini kodlayan genleri içeren plazmitin, Bölüm 3.2.1’de açıklandığı şekilde *E. coli* 10beta (NEB, İngiltere) konak hücrelere aktarılıp, tekrar izole edilerek amplifikasyonu sağlandı. Plazmit konsantrasyonları nanodrop cihazında (Allcheng, Nano-300) ölçüldü (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. İzolasyon sonrası plazmit konsantrasyonları.

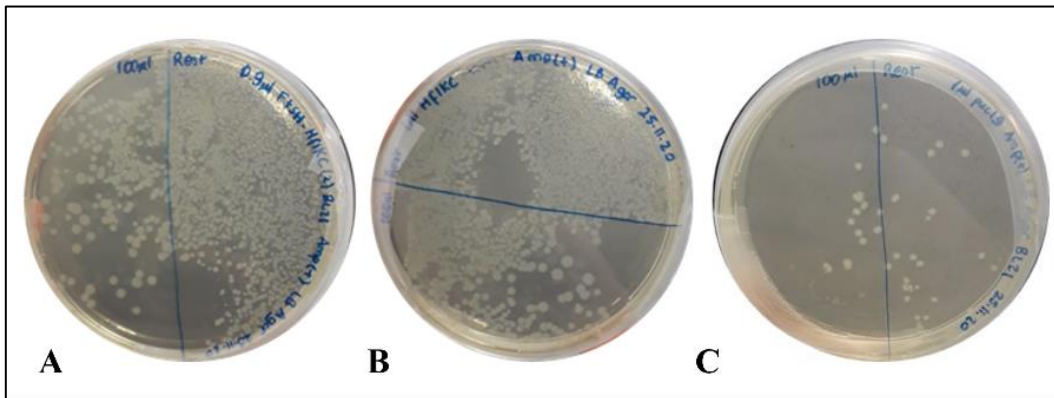
Örnek	DNA Konsantrasyonu	A260/A280 Oranı
FtsH-HflKC Plazmiti (pAce-HflKC-His10_x_pDS-FtsH-3strep) (1)	101,04 ng/μl	1,89
FtsH-HflKC Plazmiti (pAce-HflKC-His10_x_pDS-FtsH-3strep) (2)	114,49 ng/μl	1,89

Plazmitler, Bölüm 3.2.1’de belirtildiği şekilde seçilen EcoRV, ClaI ve EcoRV+ClaI restriksiyon enzimleri ile kesildi ve beklenen büyüklüklerde bantlar %0,8’lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 4.1).



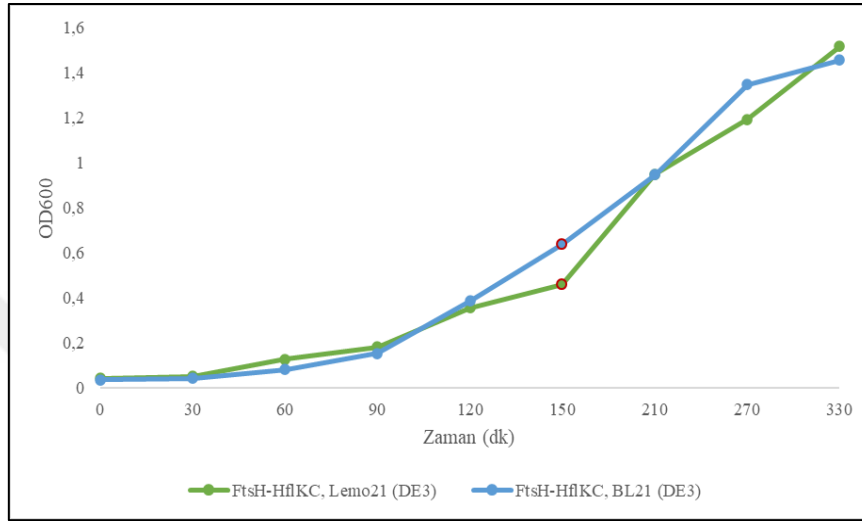
Şekil 4.1. pAce-HflKC-His10_x_pDS-FtsH-3strep (10419 bç) ve pAce-HflKC-His10 (4817 bp) plazmitlerin izolasyonları sonrasında restriksiyon enzimleri kesim sonuçları (%0,8 agaroz). M; Markör (NEB, İngiltere), 1 kb DNA Ladder (NEB, İngiltere); 1, FtsH-HflKC+EcoRV; 2, FtsH-HflKC+ClaI; 3; FtsH+HindIII+EcoRV+ClaI; 4, HflKC+EcoRV; 5, HflKC+EcoRV+ClaI

Restriksiyon enzimleri ile doğrulanmış pAce-HflKC-His10_x_pDS-FtsH-3strep plazmiti, protein ekspresyonu için *E. coli* BL21 ve Lemo21 konak hücrelerine Bölüm 3.2.1’de belirtildiği şekilde aktarıldı (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. pAce-HflKC-His10_x_pDS-FtsH-3strep (10419 bç) plazmitinin BL21 (DE3) (A), Lemo21 (B) ve pozitif kontrol (C) sonuçları

FtsH-HflKC membran protein kompleksinin yüksek verimle ifadesinin optimizasyonunu gerçekleştirmek üzere beş farklı parametre değerlendirildi ve süreçlerin sonunda her bir koşulda hücreler parçalanıp membrandan ayrılarak konsantrasyonları ölçüldü ve SDS-PAGE (%12) ile analiz edildi. Optimizasyon için ilk olarak, *E. coli* konak hücre tipleri BL21 (DE3) ve Lemo21 (DE3) değerlendirildi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. FtsH-HflKC plazmitini içeren *E. coli* Lemo21 (DE3) ve BL21 (DE3) hücrelerinin büyüme grafiği. Kırmızı nokta indüklenme zamanını göstermektedir (1 mM IPTG)

E. coli BL21(DE3), proteinlerin aşırı ekspresyonunu sağlamak için kullanılan en yaygın konak hücredir. Bu hücrelerde, hedef proteini kodlayan gen bir plazmit üzerindedir ve sadece T7 RNA polimeraz (RNAP) tarafından tanınan T7 promotörünün kontrolündedir. T7 RNAP geni, kromozom üzerinde lokalizedir ve ifadesi IPTG ile indüklenebilen lacUV5 promotörü tarafından yönetilmektedir. Ancak, Lemo21 (DE3) konak hücresi, ramnoz promotörünün kontrolü altında T7 RNAP'nin bir inhibitörü olan T7 lizozimi kodlayan gene sahiptir ve BL21 (DE3)'ün süsüdür. Ramnoz promotörü, aşırı ekspresyon gerçekleşirken hedef protein dışındaki diğer toksisitelerin azalmasını sağlamaktadır (Wagner ve diğ., 2008; Schlegel ve diğ., 2012). FtsH-HflKC ifadesinin optimizasyonunda *E. coli* BL21 (DE3) ve Lemo21 (DE3) konak hücreleri karşılaştırıldı. Hücre büyümesinde OD600 ölçümleri, BL21 (DE3) konak hücre tipi ile Lemo21 (DE3) arasında ciddi bir fark oluşmadığını gösterse de, indüklenme zaman noktalarına bakıldığında BL21 (DE3) konak hücre tipinin daha fazla miktarda bulunduğu görülmektedir. Ancak hücrelerin hasat zaman noktalarında, BL21 (DE3) konak hücre tipinin durağan faza geçtiği söylenebilir.

Bu durumda Lemo21 (DE3) konak hücre tipinin sahip olduğu ramnoz promotörünün toksisiteyi önleme özelliği, FtsH-HflKC membran protein kompleksinin aşırı ekspresyonunun optimizasyonunda daha avantajlı olmasını sağladığı görülmektedir. Konak hücre tipi koşulunu takiben, hücreler hasat edilerek parçalandı ve membrandan ayrıştırıldı. IPTG varlığı ve konsantrasyonu, indüksiyon süresi, sıcaklık ve sadece Lemo21 (DE3) konak hücre tipi için gereken Ramnoz konsantrasyonu olmak üzere toplamda beş farklı büyüme parametresi ise Tablo 4.2’de verildiği şekilde gerçekleştirildi.

Tablo 4.2. FtsH-HflKC membran protein kompleksinin ifadesi için optimizasyon koşulları.

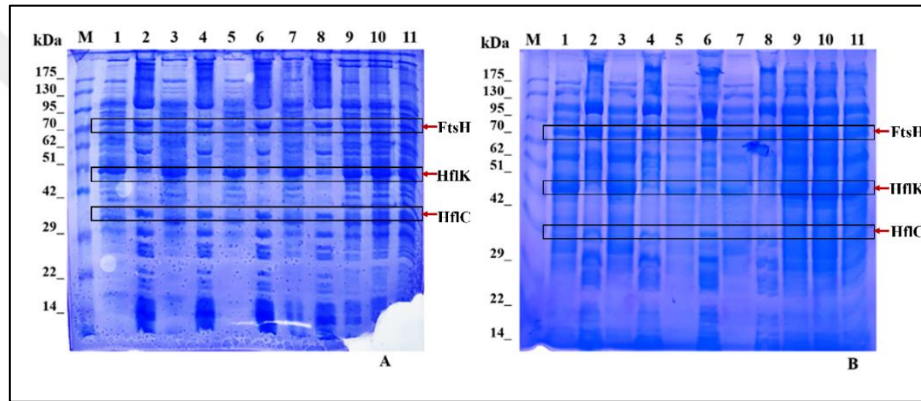
Örnek	Koşul	Hücre Tipi	IPTG Konsantrasyonu	İndüksiyon Süresi	Sıcaklık	Ramnoz Konsantrasyonu
FtsH-HflKC	1	Lemo21 (DE3)	1 mM	3 sa	37°C	1 mM
	2	Lemo21 (DE3)	-	4 sa	37°C	-
	3	BL21 (DE3)	1 mM	3 sa	37°C	-
	4	BL21 (DE3)	1 mM	4 sa	37°C	-
	5	BL21 (DE3)	1 mM	3 sa	30°C	-
	6	BL21 (DE3)	1 mM	4 sa	30°C	-
	7	Lemo21 (DE3)	0,4 mM	3 sa	37°C	1 mM
	8	Lemo21 (DE3)	0,4 mM	4 sa	37°C	1 mM
	9	Lemo21 (DE3)	0,4 mM	3 sa	30°C	1 mM
	10	Lemo21 (DE3)	0,4 mM	4 sa	30°C	1 mM

Aşırı ekspresyon optimizasyonunda gerçekleştirilen tüm koşullar SDS-PAGE (%12) ile analiz edilmeden önce büyütülen hücreler hasat edilerek sonikasyon ile parçalandı ve membrandan ayrılarak protein konsantrasyonları nanodrop cihazında (Allcheng, Nano-300) ölçüldü, ölçüm sonuçları Tablo 4.3’te verildi.

Aynı zamanda örneklerden 20 µg protein olacak şekilde %12’lik SDS-PAGE analizi gerçekleştirildi, sonuçlar Şekil 4.4’te verildi. Optimizasyon süreci hem ölçüm sonuçları, hem de SDS-PAGE sonuçları karşılaştırılarak tamamlandı.

Tablo 4.3. FtsH-HflKC membran protein kompleksinin ekspresyon optimizasyon sonucu sonikasyon ve membran ayırma işlemi ile elde edilen protein konsantrasyonları.

Örnek	Toplam Protein Konsantrasyonu (mg/ml)		
	Sonikasyon Sonrası	Membran Ayırma Sonrası (Süpernatant)	Membran Ayırma Sonrası (Pelet)
FtsH-HflKC, BL21 (DE3), 3 sa inkübasyon, 37°C	10,87	5,05	10,5
FtsH-HflKC, BL21 (DE3), 3 sa inkübasyon, 30°C	23,91	2,79	39,59
FtsH-HflKC, BL21 (DE3), 4 sa inkübasyon, 37°C	13,78	6,32	6,84
FtsH-HflKC, BL21 (DE3), 4 sa inkübasyon, 30°C	18,17	7,46	20,92
FtsH-HflKC, Lemo21 (DE3), 3 sa inkübasyon, 37°C	10	2,57	5
FtsH-HflKC, Lemo21 (DE3), 3 sa inkübasyon, 30°C	22,38	4,23	33,44
FtsH-HflKC, Lemo21 (DE3), 4 sa inkübasyon, 37°C	11,5	3,5	5,7
FtsH-HflKC, Lemo21 (DE3), 4 sa inkübasyon, 30°C	23,6	10,5	55,5



Şekil 4.4. FtsH-HflKC plazmitini içeren BL21 (DE3) ve Lemo21 (DE3) konak hücrelerinin membran ayırma işlemi sonrası optimum ekspresyon koşulunun bulunması amacı ile yapılan SDS-PAGE (%12) analizi. A. BL21 (DE3) ve Lemo21 (DE3) konak hücrelerinin inkübasyonlarının 30 °C’de yapılan 3 ve 4 saatlik büyütmelelerinin membran ayırma işlemi sonrası SDS-PAGE görüntüsü. M, Markör (ABM, Kanada); 1-2, Lemo21 (DE3) 3 saat inkübasyonunun membran ayırma işlemi sonrası süpernatant ve peleti; 3-4, Lemo21 (DE3) 4 saat inkübasyonunun membran ayırma işlemi sonrası süpernatantı ve peleti; 5-6, BL21 (DE3) 3 saat inkübasyonunun membran ayırma işlemi sonrası süpernatantı ve peleti; 7-8, BL21 (DE3) 4 saat inkübasyonunun membran ayırma işlemi sonrası süpernatantı ve peleti; 9-10, Lemo21 (DE3) sırası ile 3, 4 saat inkübasyonu, sonikasyon sonrası hücre lizatı; 11, BL21 (DE3) 3 saat inkübasyonu, sonikasyon sonrası hücre lizatı. B. BL21 (DE3) ve Lemo21 (DE3) konak hücrelerinin inkübasyonlarının 37 °C’de yapılan 3 ve 4 saatlik büyütmelelerinin membran ayırma işlemi sonrası SDS-PAGE görüntüsü. M, Markör (ABM, Kanada); 1-2, Lemo21 (DE3) 3 saat inkübasyonunun membran ayırma işlemi sonrası süpernatantı ve peleti; 3-4, Lemo21 (DE3) 4 saat inkübasyonunun membran ayırma işlemi sonrası süpernatantı ve peleti; 5-6, BL21 (DE3) 3 saat inkübasyonunun membran ayırma işlemi sonrası süpernatantı ve peleti; 7-8, BL21 (DE3) 4 saat inkübasyonunun membran ayırma işlemi sonrası süpernatantı ve peleti; 9-10, Lemo21 (DE3) 3 ve 4 saat inkübasyonu, sonikasyon sonrası hücre lizatı; 11, BL21 (DE3) 3 saat inkübasyonu, sonikasyon sonrası hücre lizatı

Sonuçlar, farklı ifade koşullarının hem membranda hem süpernatantta etkili olduğunu göstermektedir. Membran ayırma sürecinde çözünür proteinlerin süpernatanta kaldığı ve FtsH-HflKC'nin aşırı eksprese edildiği SDS-PAGE (%12) analizlerinde görülmektedir. Membran peletinde gözlemlenen toplam proteinler, koşuldan koşula farklılık göstermemektedir, aynı zamanda bu durum çözünür proteinlerin bulunduğu süpernatant için de geçerlidir. Aşırı ekspresyonun saat farkı analizlere yansımamış olmasına rağmen, 37 °C'nin sahip olduğu toplam protein miktarı, 30 °C'ye kıyasla daha fazla olduğu, yoğun bantlardan gözlemlenmektedir. Bu duruma FtsH-HflKC'nin daha fazla ifade edilmesi de dahil olmak üzere, diğer proteinlerin de aşırı üretilmesi, yani toksisitenin artması, temelde aşırı ekspresyonun yan etkilerinden kaynaklanmaktadır. Aşırı miktarda protein üretimi, hücre içinde çeşitli olumsuz etkilerin ortaya çıkmasına neden olabilir. Bu durumda, hücre içindeki protein agregasyon oranları artmakta, çözünürlük sorunları ortaya çıkmakta ve hücre işlemleri, özellikle transkripsiyon, translasyon ve hücre bölünmesi gibi temel süreçler, normalden daha yavaş bir hızda gerçekleşmektedir.

Aşırı ekspresyon sıcaklığının düşük (25-30 °C) olması, bu olumsuz etkileri azaltma amacı taşımaktadır. Düşük sıcaklık altında, hücre içindeki temel işlemler yavaşlamakta, bu da rekombinant olarak ifade edilen proteinlerin daha etkili bir şekilde çözünmesine ve protein agregasyonunun minimuma indirilmesine olanak tanımaktadır. Ayrıca, düşük sıcaklık proteolitik olarak duyarlı proteinlerin degradasyonunu azaltarak toksisitenin minimize edilmesine katkı sağlamaktadır. Bu nedenle, toksisitenin azaltılmasında etkin bir rol oynayan ramnoz Lemo21 (DE3) konak hücresinin kullanılması ve sıcaklığın 30 °C'ye düşürülmesi, FtsH-HflKC'nin aşırı ekspresyonu için daha uygun bir ortam sağlamaktadır.

Transkripsiyon ve/veya translasyon oranlarını azaltmak, yeni sentezlenen proteinin agrege olmadan önce katlanmasına izin vererek, katlanmanın kolay olmasını sağlayacaktır. Bu hücre döngüleri, indüksiyon süresi ve sıcaklık tarafından kontrol edildiğinden, ekspresyon optimizasyonunda rol oynayan iki önemli parametre konumundadır. Bir bakteri popülasyonunda, durgun fazla ulaştıktan sonra inkübasyon devam ederse çoğunluk ölüm fazına geçerek proteinin kalitesini düşürmektedir. Doğru indüksiyon süresi ile bu durum önlenilmektedir. Sonuçlar, FtsH-HflKC'nin aşırı ekspresyonunda dört saatlik büyütmenin uygun olduğunu göstermektedir.

Carvalho ve diğeri (2020) tarafından yapılan çalışmalarda, rekombinant FtsH plazmiti için Lemo21 (DE3) konak hücresindeki ekspresyon optimizasyon çalışmalarında 0,9 mM IPTG konsantrasyonunun en verimli konsantrasyon olduğu bildirilmiş olsa da ticari olarak temin edilen Lemo21 (DE3) konak hücresinin protokolünde IPTG konsantrasyonunun 400 µM'den yüksek olmaması gerektiğinin belirtilmesi neticesinde FtsH-HflKC'nin aşırı ekspresyonunda 400 µM IPTG konsantrasyonunun üzerine çıkılmamasına karar verilmiştir (Schlegel ve diğ., 2012). Aynı zamanda, Carvalho ve diğeri (2018) tarafından yapılan çalışmada rekombinant *E. coli* FtsH membran proteini, Lemo21 (DE3) konak hücresinin kullanılmasına karar verilerek optimum büyüme koşullarına dört saatlik inkübasyon ile ulaşıldığı rapor edilmiştir. Bu çalışmaya benzer olarak, rekombinant *E. coli* FtsH-HflKC membran protein kompleksinin optimum büyüme koşulları, Lemo21 (DE3) konak hücresinde 1 mM Ramnoz konsantrasyonunda 400 µM IPTG ve %0,2 arabinoz varlığında, 4 saat, 200 rpm ve 30 °C'lik inkübasyon ile sağlandığı sonucuna varıldı. FtsH-HflKC membran protein kompleksinin en verimli ifade edildiği büyüme koşulları belirlendikten sonra, sonikasyon koşullarında da optimizasyona gidildi. Bu doğrultuda, en verimli koşul %50 amplitüdde 3 döngü (1 saniye atım açık, 1 saniye atım kapalı) olarak belirlense de yapılan iyileştirmeler sonucunda en verimli koşul %40 amplitüdde 2 döngü (2 saniye atım açık, 8 saniye atım kapalı, 2 dakika) olarak güncellendi. Carvalho ve diğeri (2022) tarafından gerçekleştirilen çalışmada FtsH membran proteininin sonikasyon koşulları 3 döngüde %40 amplitüd olarak belirlenmiş olsa da, membran proteinlerinin yapılarının oldukça hassas olması nedeni ile bu çalışmada %40 amplitüd değeri, iki döngüde sınırlandırıldı.

Sonikasyonu takiben yapılan membran ayırma işlemi sonrasında, solübilizasyon optimizasyonu iki farklı deterjan ile (DDM ve LMNG) gerçekleştirildi. Homojenizasyon yapılan örneklerde protein kaybı görülürken; homojenizasyon yapılmadan membran peletine ağırlıkça %2 DDM eklenen solübilizasyon yönteminin (Perez ve Maier, 2020), saflaştırmada daha iyi sonuçlar verdiği gözlemlendi.

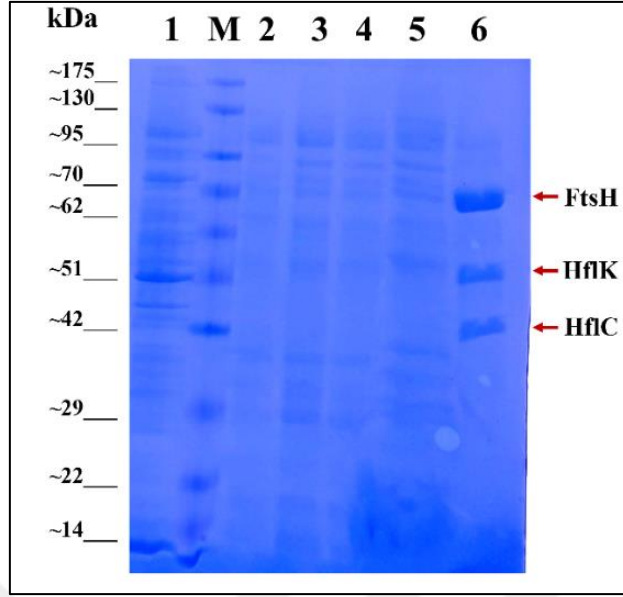
Qiao ve diğeri (2022) tarafından yapılan çalışma ile benzer şekilde bu çalışmada da, FtsH-HflKC membran protein kompleksinin homojenizasyon yapılmadan saflaştırılması, protein kaybını azaltarak daha verimli sonuçlar elde edilmesini sağladı. Saflaştırma optimizasyonunda elde edilen protein konsantrasyonları Tablo 4.4'te verildi.

Gerçekleştirilen SDS-PAGE analizlerine göre; 10x Histidin etiketi ile uygulanan protokolde elde edilen elüsyonların daha kirli olması nedeni ile başarısız olduğu gözlemlendi. Bu doğrultuda, özgüllüğü ve saflığı, His Etiketi'nden daha yüksek Strep-Etiketi'nin reçinesi olan StrepTaktin ile sürece devam edildi (Şekil 4.5). SDS-PAGE (%12) ve konsantrasyon analizlerine göre Iba Life Sciences firmasının kullanım kılavuzu ile gerçekleştirilen saflaştırma protokolünün verimli olduğu sonucuna varıldı. Sürece amfipol kullanılarak gerçekleştirilen konsantrasyon işlemiyle devam edildi.

Tablo 4.4. Strep-Etiketi ve His-Etiketi ile elde edilen örneklerin protein konsantrasyon karşılaştırmaları.

Örnek (FtsH-HflKC)	StrepTaktin ile Saflaştırma		Kobalt Reçinesi ile Saflaştırma	
	Protein Konsantrasyonu (mg/ml)	A260/280	Protein Konsantrasyonu (mg/ml)	A260/280
Sonikasyon sonrası	65	1,7	66	1,71
Membran Süpernatant	37	1,77	36	1,69
Solübilize Membran Pelet %2 DDM (a/a) İnkübasyon öncesi	17	1,54	18	1,6
Solübilize Membran + Yıkama Tamponu (1:1)	7,8	1,7	6,9	1,9
FT	6,08	1,89	5,7	1,91
Yıkama	1,22	1,87	0,034	1,25
Elüsyon	0,75	0,95	1,9 (50 mM*)	1,62 (50 mM*)
			2,2 (100 mM*)	1,6 (100 mM*)
			2,21 (200 mM*)	1,6 (200 mM*)
			3,6 (400 mM*)	1,63 (400 mM*)
A8-35 Amfipol ile Konsantrasyon Sonrası	0,82	1,0	-	-

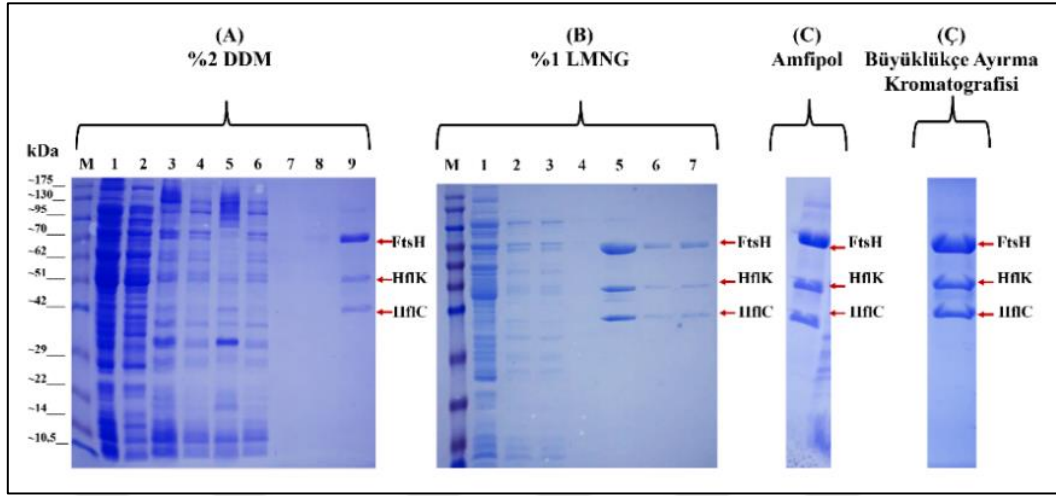
*Belirtilen konsantrasyonlar, imidazol konsantrasyonlarıdır.



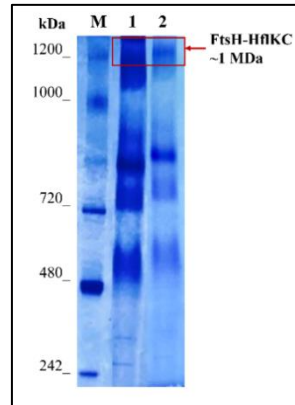
Şekil 4.5. FtsH-HflKC membran protein kompleksinin Kobalt reçinesi ve Streptaktin reçinesi ile saflaştırma sonuçlarının SDS-PAGE (%12) analizi (Her bir kuyucuk 20 µg protein içermektedir). M, Markör (ABM, Kanada); 1, Solübilize membran; 2-5, Kobalt reçinesi ile saflaştırma sonuçları (sırası ile 50, 100, 200, 400 mM imidazol içeren FtsH-HflKC elüsyonları); 6, Streptaktin reçinesi ile saflaştırma sonucu.

Membran proteinleri doğal ortamlarındayken, yapılarını membranın sahip olduğu özellikler (membran kalınlığı, suya yakınlığı, yük dağılımları vb.) sayesinde korumaktadır. Ayrıca, membran proteininin, diğer proteinlerle, lipidlerle ve kofaktörlerle olan spesifik etkileşimleri de membran proteinlerinin kararlılığında önemli bir rol oynamaktadır (Bowie ve diğ., 2001; Garavito ve Ferguson-Miller, 2001; Popot ve Engelman, 2000). Deterjan ise bu etkileşimlerle rekabete girerek bir süre sonra kararlılığın bozulmasına yol açabilmektedir. Deterjanlar ile solübilize edilen membran proteinlerin kararlılığını korumak için kritik misel konsantrasyonuna yakın çalışma, misellerin lipidler veya kofaktörler ile güçlendirilmesi gibi birçok yol bulunmaktadır. Bu yollara alternatif olarak ise klasik deterjanları stiren maleik asit lipid partikülleri (SMALP'ler) veya amfipoller gibi polimerler kullanmaktır. Amfipoller (APoller), Bölüm 2.3'te anlatıldığı üzere membran proteinlerin transmembran alanına çoklu hidrofobik temas noktaları ile bağlanacak şekilde tasarlanmış kısa ve esnek amfipatik polimerlerdir. A8-35 olarak adlandırılan en yaygın kullanılan APol'ün moleküler ağırlığı ~4,3 kDa'dır ve pH 7'nin üzerinde iyonize olmaktadır (Zoonens ve diğ., 2014). Bu doğrultuda, saflaştırmayı takiben FtsH-HflKC membran protein kompleksi, deterjanlardan uzaklaştırılarak APol'e aktarıldı (Şekil 4.6 - C). Saflaştırma süreçlerinin analizine ek

olarak, FtsH-HflKC'nin oluşturdıkları kompleks yapısı Doğal Jel ile görüntülendi ve yaklaşık 1000 kDa olduğu sonucuna varıldı (Şekil 4.7).



Şekil 4.6. FtsH-HflKC'nin Streptaktin reçinesi ile saflaştırma sonuçlarının 20 µg protein kullanılarak gerçekleştirilen SDS-PAGE (%12) analizi. A. %2 DDM ile solübilizasyon sonrası saflaştırma sonuçları, M; Markör (ABM, Kanada), 1; Sonikasyon sonrası, 2; Membran Süpernatant, 3; Membran Pelet, 4; Solübilize Süpernatant (DDM), 5; Pelet (DDM), 6; 'Flow Through', 7; Yıkama, 8; Elüsyon, 9; Konsantre Elüsyon. B. %1 LMNG ile solübilizasyon sonrası saflaştırma sonuçları, M; Markör (ABM, Kanada), 1; Sonikasyon Sonrası, 2; Solübilize Süpernatant (LMNG), 3; 'Flow Through', 4; Yıkama, 5; Konsantre Elüsyon, 6-7; Elüsyon. C. Konsantrasyon sonrası Amfipole geçirilen elüsyon örneği, D. Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi fraksiyon örneği



Şekil 4.7. FtsH-HflKC'nin Doğal Jel (%3-8) analizi. M; Markör (Invitrogen, Amerika), 1; FtsH-HflKC Elüsyon (30 µg), 2; FtsH-HflKC Elüsyon (20 µg)

Sonuçlar, farklı deterjanlardan elde edilen saflaştırmada elüsyon konsantrasyonlarında farklılıklar olduğunu göstermektedir; LMNG ile yapılan saflaştırmanın elüsyon konsantrasyonu, DDM'e göre daha yüksektir (Tablo 4.5). DDM'den Amfipole geçirilen örnek için ise bir kayıp bulunmamaktadır. SDS-PAGE (%12) analizlerinde de görüleceği

üzere LMNG ile çözünürleştirilen FtsH-HflKC'nin saflaştırma sonucunda, HflK ve HflC membran proteinlerinin daha yoğun gözlemlenmektedir.

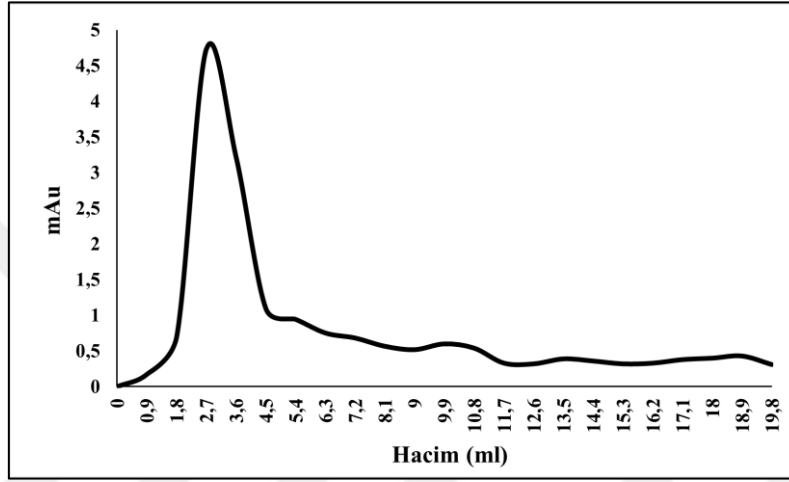
Tablo 4.5. İki farklı deterjan ile yapılan saflaştırmalarının konsantrasyon sonuçları.

Deney	FtsH-HflKC & %2 (a/a) DDM		FtsH-HflKC & %1 (a/a) LMNG	
	Protein Konsantrasyonu (mg/ml)	A260/A280	Protein Konsantrasyonu (mg/ml)	A260/A280
Sonikasyon Sonrası	65	1,7	65	1,7
Solübilize Membran	20	1,54	30	1,6
Solübilize Membran (Yıkama Tamponu ile dengelendi)	7,8	1,7	17	1,97
Flow Through	6,1	1,89	10	1,99
Yıkama	1,22	1,87	3	2,01
Elüsyon (Konsantre)	0,75	0,95	0,73	0,8

Ma ve diğerleri (2022) tarafından, *E. coli*'den elde edilen FtsH-HflKC membran protein kompleksinin yapısını ortaya çıkartmak amacıyla yapılan çalışmada gerçekleştirilen deterjan taramasında DDM, LMNG, Digitonin, 100x-Triton kullanılmıştır. Sonuç olarak, bu tez çalışmasında %2 oranında kullanılan DDM, bahsi geçen çalışmada %0,02 oranında tercih edilmiş ve FtsH-HflKC kompleksinde FtsH'nin sitoplazmik kısmının yapısı çözülmemiştir. Bunun nedenlerinden biri, yanlış deterjan tercihi ve protein:deterjan oranı olabilir. 2015 yılında Singh ve Sigworth tarafından yapılan bildiriye göre, LMNG deterjanının çok düşük kritik misel konsantrasyonuna sahip olması nedeniyle Kriyo-EM çalışmaları için probleme neden olabileceği öne sürülse de, bu çalışmada, Kriyo-EM çalışmaları için gönderilen üç örnekten (DDM + FtsH-HflKC, LMNG + FtsH-HflKC, Apol + FtsH-HflKC), LMNG kullanılarak solübilize edilen FtsH-HflKC membran protein kompleksinin verileri elde edildi.

Ma ve diğerleri (2022) tarafından yapılan çalışmada, *E. coli* FtsH-HflKC membran kompleksinin rekombinant olarak elde edilmesi amacıyla *ftsH*, *hflK* ve *hflC* genleri, iki ayrı plazmit olacak şekilde tasarlanarak; ekspresyon aşamasında kompleks oluşturması beklenmiş; %0,02 DDM ile solübilize edilen membran protein kompleksi, plazmitte bulunan FLAG etiketleri ile saflaştırılmıştır. Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi

yapılmayan örneklerin, Kriyo-EM verilerinde, homojen dağılım göstermediği; 12’şer HflKC membran protein kompleksinin bir “şapka” yapısı oluşturarak iç kısmında 0 ile 4 arasında değişen sayıda hekzamerik FtsH membran proteinin (periplazmik kısmının) bulunduğu rapor edilmiştir. Buna karşın, bu çalışmada FtsH-HflKC membran protein kompleksi tek bir plazmit üzerinde tasarlandı ve ek olarak Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi de yapılarak (Şekil 4.8), başta agregasyon/kirlilikler olmak üzere, heterojen dağılımın da en aza indirgenmesi sağlandı.



Şekil 4.8. FtsH-HflKC membran protein kompleksinin Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi sonuçları

Saflaştırma süreci optimize edildikten sonra, FtsH-HflKC kompleks yapısı kompleks oluşturmaları ya da var olan kompleksin daha kararlı hale getirilmesi amacı ile çapraz bağlanma reaksiyonları, DSBU (Disuccinimidyl Dibutyric Urea) ve BS3 (Bis[sulfosuccinimidyl] suberate) (Thermo Fischer Scientific, Amerika) reaktifleri kullanılarak gerçekleştirildi. Çapraz bağlanma reaksiyonu için örnekler, SDS-PAGE (%12) ile analiz edilerek bantlar seçildi ve deneyler, California Üniversitesi, Kimya Bölümü’nde Prof. Dr. Carlito Lebrilla işbirliğinde gerçekleştirildi. Örnekler, poliakrilamid jel içerisinde tripsin ile parçalanarak peptitlerine ayrıştırılmış ve Kütle Spektrometresi ile analiz edilmiştir.

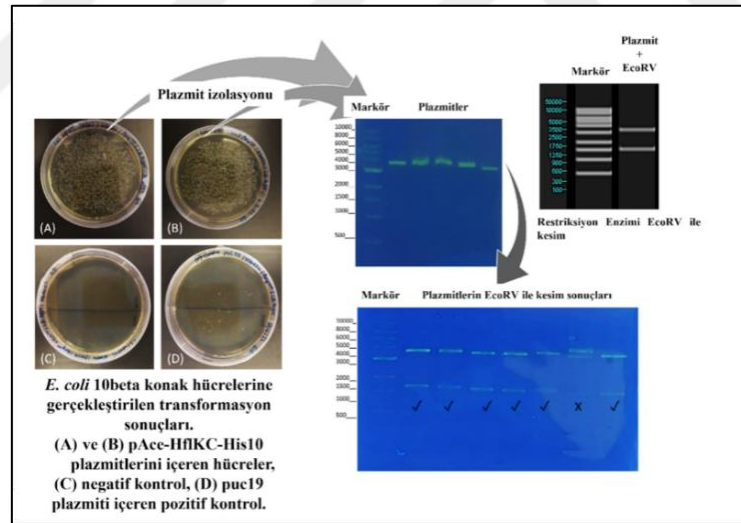
Çapraz bağlantılar, farklı programlar ile incelenmiş ve sonuçlar, FtsH ve HflKC’nin kompleks oluşturduğunu doğrulamak ile kalmayıp; protein içi ve proteinler arası olmak üzere 300’den fazla etkileşim ortaya çıkartmıştır (Akkulak, 2023).

4.2. HflKC'nin Ekspresyonu ve Saflaştırılması

HflK ve HflC membran proteinlerini kodlayan genleri içeren “pAce-HflKC-His10” plazmiti, Bölüm 4.1’de açıklandığı üzere, “MultiColi” tekniği ile Bristol Üniversitesi’nde bulunan Prof. Dr. Christiane Berger-Schaffitzel grubu tarafından üretilmiştir (Bionissek ve diğ., 2009).

FtsH-HflKC membran protein kompleksini kodlayan genlerin bulunduğu plazmite benzer şekilde, bu plazmitin de amplifikasyonu gerçekleştirilmek üzere ilk olarak *E. coli* 10beta (NEB, İngiltere) konak hücrelerine aktarıldı ve plazmit izolasyonu gerçekleştirildi.

HflK ve HflC membran proteinlerini kodlayan plazmit üzerinde restriksiyon enzimi EcoRV (NEB, İngiltere) ile kesim yapıldı ve plazmit doğrulaması gerçekleştirildi. Sonrasında plazmit, *E. coli* Lemo21 (DE3) ve BL21 (DE3) hücrelerine transforme edildi. Sürece küçük ölçekli ekspresyon testi ile devam edilerek optimum koşullar belirlenmek üzere SDS-PAGE (%12) ile analiz edildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. HflKC membran protein kompleksini kodlayan plazmitin doğrulanma süreci

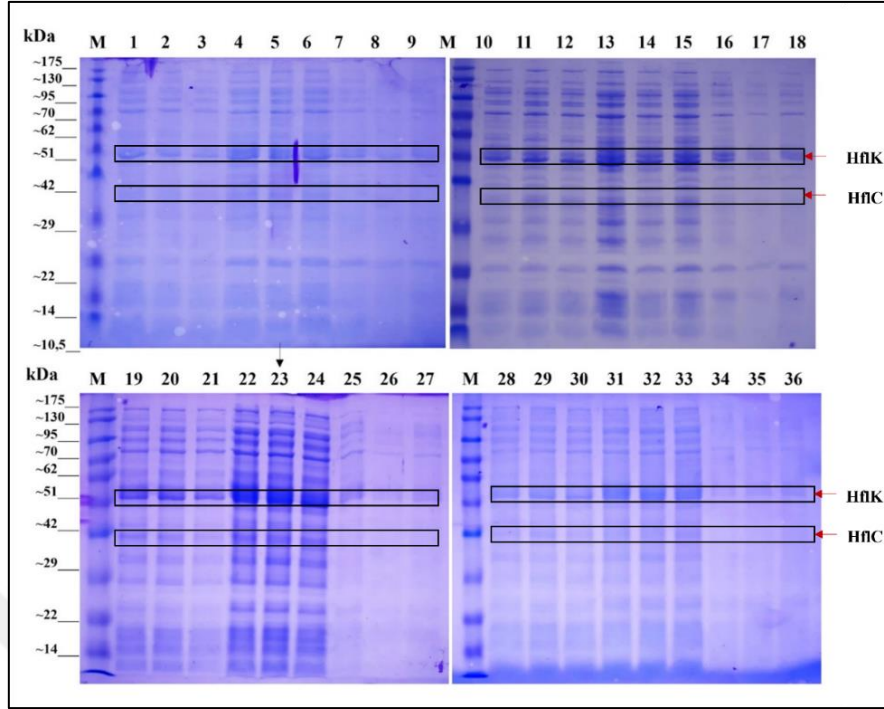
Küçük ölçekte gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları, Maier ve Perez tarafından (2020) yayınlanan protokole göre Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Büyütme koşullarında Lemo21 (DE3) ve BL21 (DE3) olmak üzere iki farklı konak hücre, 0,2; 0,5 ve 1 mM IPTG, 1 mM Ramnoz konsantrasyonu ve 1, 3 ve 16 saatten oluşan üç farklı indüklenme süresi olmak üzere dört farklı parametre denendi (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. HfKc membran protein kompleksinin küçük ölçekli ekspresyon testinde tercih edilen koşullar.

Koşul	Hücre Tipi	IPTG Konsantrasyonu	Ramnoz Konsantrasyonu*	İndüksiyon Süresi
1	BL21	0,2 mM	-	1 sa
2	BL21	0,2 mM	-	3 sa
3	BL21	0,2 mM	-	16 sa
4	BL21	0,5 mM	-	1 sa
5	BL21	0,5 mM	-	3 sa
6	BL21	0,5 mM	-	16 sa
7	BL21	1 mM	-	1 sa
8	BL21	1 mM	-	3 sa
9	BL21	1 mM	-	16 sa
10	Lemo21	0,2 mM	-	1 sa
11	Lemo21	0,2 mM	-	3 sa
12	Lemo21	0,2 mM	-	16 sa
13	Lemo21	0,5 mM	-	1 sa
14	Lemo21	0,5 mM	-	3 sa
15	Lemo21	0,5 mM	-	16 sa
16	Lemo21	1 mM	-	1 sa
17	Lemo21	1 mM	-	3 sa
18	Lemo21	1 mM	-	16 sa
19	Lemo21	0,2 mM	1 mM	1 sa
20	Lemo21	0,2 mM	1 mM	3 sa
21	Lemo21	0,2 mM	1 mM	16 sa
22	Lemo21	0,5 mM	1 mM	1 sa
23	Lemo21	0,5 mM	1 mM	3 sa
24	Lemo21	0,5 mM	1 mM	16 sa
25	Lemo21	1 mM	1 mM	1 sa
26	Lemo21	1 mM	1 mM	3 sa
27	Lemo21	1 mM	1 mM	16 sa
28	BL21	-	-	1 sa
29	BL21	-	-	3 sa
30	BL21	-	-	16 sa
31	Lemo21	-	1mM	1 sa
32	Lemo21	-	1 mM	3 sa
33	Lemo21	-	1 mM	16 sa
34	Lemo21	-	-	1 sa
35	Lemo21	-	-	3 sa
36	Lemo21	-	-	16 sa

Küçük ölçekli ekspresyon testinin SDS-PAGE (%12) analizi 20 µg protein konsantrasyonu ile gerçekleştirildi (Şekil 4.10). Ayrıca örneklerin protein konsantrasyonları nanodrop cihazında ölçüldü (Tablo 4.7).

SDS-PAGE (%12) analizi ve protein konsantrasyonları sonuçlarına göre, HfKc membran protein kompleksinin optimum büyüme koşulları *E. coli* Lemo21 (DE3) konak hücresinde, 0,5 mM IPTG ve 1 mM Ramnoz varlığında üç saatlik inkübasyon olarak belirlendi.



Şekil 4.10. HfIKC'nin küçük ölçekli ekspresyon testinin %12'lik SDS-PAGE analizi (Sıralama, Tablo 4.7'de verilen koşulları içermektedir)

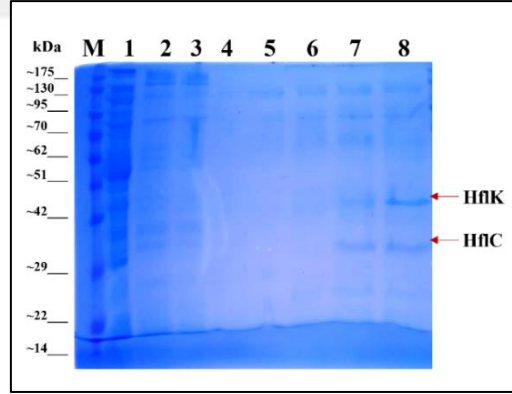
Tablo 4.7. Küçük ölçekli ekspresyon testi sonuçlarına göre protein konsantrasyonları.

Koşul	Protein Konsantrasyonu (mg/ml)	A260/A280
1	6,8	1,52
2	7,12	1,53
3	7,17	1,53
4	12	1,51
5	12,5	1,5
6	12,32	1,52
7	4,6	1,76
8	5	1,63
9	5,65	1,65
10	9,14	1,43
11	9,2	1,44
12	9,22	1,44
13	15	1,7
14	15,42	1,75
15	16,22	1,72
16	4,43	1,64
17	4,22	1,63
18	4,37	1,57
19	9,8	1,62
20	9,58	1,6
21	9,63	1,7
22	15,8	1,76
23	17	1,75
24	17,8	1,72
25	5,42	1,62

Tablo 4.7. (Devam) Küçük ölçekli ekspresyon testi sonuçlarına göre protein konsantrasyonları.

Koşul	Protein Konsantrasyonu (mg/ml)	A260/A280
26	3,2	1,52
27	4,37	1,61
28	9	1,5
29	9,7	1,54
30	8,89	1,52
31	15	1,7
32	15,42	1,75
33	16,22	1,72
34	5,03	1,67
35	4,47	1,61
36	4,41	1,68

Küçük ölçekli ekspresyon testinin sonuçlarına göre HflKC membran protein kompleksinin, büyük ölçekte aşırı ekspresyonu gerçekleştirildi ve hücrelerin hasatlarını takiben sırasıyla sonikasyon, membran ekstraksiyonu ve DDM (%2 a/a) ile solübilizasyonu sonrasında Ni-NTA reçinesi ile bir gece inkübasyona bırakılarak saflaştırıldı. Sonuçlar, %12 SDS-PAGE ile analiz edildi (Şekil 4.11) ve HflK (45 kDa), HflC (38 kDa) beklenen yerlerde tespit edildi.



Şekil 4.11. Saflaştırılan HflKC membran protein kompleksinin saflaştırma sonuçlarının SDS-PAGE (%12) analizi (Her bir kuyucuk, 20 µg protein içermektedir). M; Markör (ABM, Kanada), 1; Sonikasyon sonrası, 2; Solübilize Supernatan (DDM), 3; 'Flow Through', 4; Yıkama, 5; Elüsyon (100 mM İmidazol), 6; Elüsyon (200 mM İmidazol), 7; Elüsyon (300 mM İmidazol), 8; Elüsyon (400 mM İmidazol).

Bir litre hücre kültüründen elde edilen HflKC membran protein kompleksi, 400 mM İmidazol içeren elüsyonda daha saf olarak elde edildiği hem SDS-PAGE (%12) analizi ile, hem de konsantrasyonlarda A260/A280 oranında da gözlemlendi (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. HflKC saflaştırma sürecinde konsantrasyon sonuçları.

Örnek (HflKC)	Protein Konsantrasyonu (mg/ml)	A260/A280
Sonikasyon Sonrası	45	1,72
Solübilize Membran	20	1,4
Solübilize Membran (Denge Tamponu ile ekilibre edildi)	8,2	1,7
Flow Through	7,1	1,9
Yıkama	1,22	1,87
Elüsyon (Konsantre, 400 mM İmidazol)	0,45	1

HflKC membran proteininin üretim ve saflaştırma sürecinin, FtsH-HflKC membran protein kompleksi ile karşılaştırıldığında daha zorlu bir gerçekleştiği söylenebilir. Bunun nedeni olarak, HflK ve HflC membran proteinlerinin, birlikte HflKC kompleksini oluşturmada yeterli düzeyde kararlı olmamasıdır, kararlı bir yapı için FtsH'nin de gerekli olduğu söylenebilir. HflK ve HflC olarak iki membran protein de, periplazmik domaine doğru büyük bir C-terminale ve N-terminalde bulunan transmembran segmentine sahiptir. Yapılan çalışmalar, HflK ve HflC'nin N-terminallerinde bulunan transmembran segmentlerinin, protein taşınması için normalden daha fazla hidrofobik amino asit dizisine sahip olduğunu göstermiştir (Izard ve Kendall, 1994). Bu sinyal dizisinin sahip olduğu özellik ile, SecA-SecYEG-SecDF holotranslokunun mekanizmasını hızlandırarak çok çabuk bir şekilde translokasyonun gerçekleşmesini sağladığı düşünülmektedir (Kihara ve Ito, 1998). Ancak HflKC membran proteinlerinin sahip olduğu uzun hidrofobik amino asit dizisi, kararlı yapıyı ve dolayısı ile afinite ile saflaştırmayı negatif etkileyen bir durum olabilir.

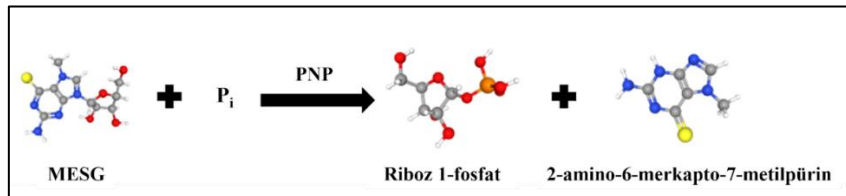
HflK ve HflC'nin yapılarına bakıldığında, hidrofobik sekans dizisi, FtsH olmadığı süreçte hücrede "açıkta" kalmaktadır ve bu proteinlerin katlanma ve fonksiyonlarını kazanabilmek için istenmeyen bir özelliktir. Hücrede FtsH doğal olarak üretilse dahi, HflKC'nin rekombinant aşırı ekspresyonunda yetersiz kalmaktadır. Bu da HflKC'nin stabilitesinde önemli bir etken olabilir. Banuett ve Herskowitz, 1987 yılında yaptığı çalışmada HflK ve HflC'nin birbirlerini kararlı hale getirdiğini rapor etse de, Kihara ve Ito tarafından 1998 yılında yapılan çalışmaya paralel olarak bu çalışmada da FtsH'nin HflK ve HflC'yi kararlı hale getirdiği bulundu.

4.3. FtsH ve FtsH-HflKC'nin Biyokimyasal Karakterizasyonu

FtsH ve FtsH-HflKC membran protein komplekslerinin biyokimyasal özelliklerini ve farklılıklarını ortaya çıkartabilmek için gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmaları, hem ATPaz hem de Proteaz aktiviteleri esas alınarak yapıldı. Bu doğrultuda saflaştırılan FtsH ve FtsH-HflKC membran proteinlerinin farklı konsantrasyonlarda ATP içeren reaksiyonlar kurularak ATPaz aktiviteleri incelendi. Benzer şekilde, proteolitik aktiviteleri de farklı substrat konsantrasyonlarında ve sıcaklıklarda 5 mM ATP içeren ve içermeyen reaksiyonları ile belirlendi.

4.3.1. FtsH ve FtsH-HflKC'nin ATPaz Aktivitesi

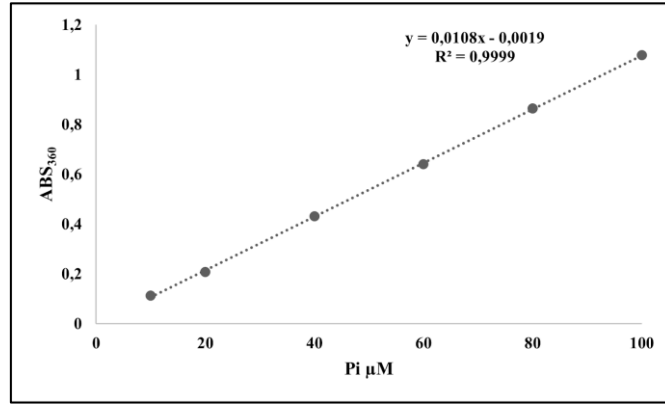
Proteinlerin *in vitro* ATPaz aktivitesini ölçmek için kullanılan tekniklerin temelinde serbest inorganik fosfatın (Pi) tespit edilmesi bulunmaktadır. FtsH'nin ATPaz aktivitesinde de serbest inorganik fosfat (Pi) ortaya çıkmaktadır. FtsH, ATPaz aktivitesi sonucunda, ATP hidrolize uğramakta, ADP ve serbest fosfata dönüşmektedir. Bu, FtsH'in konformasyonel değişikliğe uğraması ile sonuçlanmaktadır. EnzChek Fosfat Ölçüm Kiti (Thermo Fisher Scientific, ABD) içerisinde bulunan pürin nükleozit fosforilaz (PNP) enzimi, serbest inorganik fosfat (Pi) varlığında 2-amino-6-merkapto-7-metilpurin ribositi (metiltioguanozin, guanosin analogu: MESG)'i riboz 1-fosfat ve 2-amino-6-merkapto-7-metilpurine dönüştürmektedir. MESG substratından enzimatik reaksiyon ile 2-amino-6-merkapto-7-metilpurinin açığa çıkması sonucu, MESG'nin maksimum absorpsiyon değeri olan 330 nm'den 360 nm'ye doğru spektrofotometrik bir kayma meydana gelmektedir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. ATPaz aktivitesinin ölçüm mekanizması

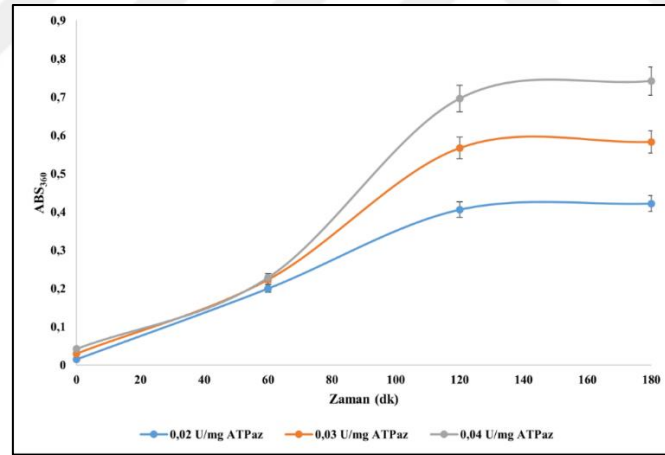
FtsH ve FtsH-HflKC'nin ATPaz aktivitelerinde serbest fosfat (Pi) ölçümlerini gerçekleştirebilmek için ilk olarak fosfat standart eğrisi oluşturuldu. Oluşturulan serbest Pi kalibrasyon eğrisinde belirlenen OD₃₆₀ değeri (Şekil 4.13), örneklerin ölçümlerinde doygunluğa ulaşılan dakikanın optik yoğunluk değerinden sıfırıncı dakikanın optik

yoğunluk değeri çıkartılarak eşleştirildi. Enzimatik aktivite, dakikada 1 mikromol serbest fosfatın üretimi sağlayan enzim miktarı olacak şekilde U/mg cinsinden hesaplandı.



Şekil 4.13. Fosfat standart eğrisi

Aynı zamanda ATPaz aktivite deneyleri, ticari olarak satın alınan liyofilize Adenozin 5-Trifosfataz enzimi kullanılarak gerçekleştirildi. Bu doğrultuda, 1 mM ATP varlığında 0,02; 0,03 ve 0,04 U/mg Adenozin 5-Trifosfataz enziminin ölçümleri yapıldı (Şekil 4.14).

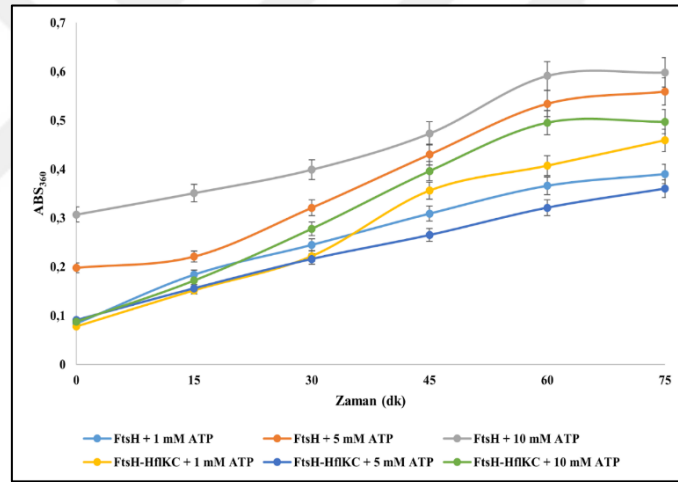


Şekil 4.14. Farklı konsantrasyonlarda Adenozin 5-Trifosfataz (Merck, Almanya) kullanılarak zamana karşı gerçekleştirilen kontrol deneyi sonuçları

FtsH membran proteininin sahip olduğu ATPaz aktivitesi, günümüze kadar yapılan çalışmalarda kısmen veya dolaylı olarak karakterize edilmiştir. Bu karakterizasyonlar, sitoplazmik domaini taşıyan FtsH mutanları ile elde edilmiş olup, tam uzunluktaki proteinin sitoplazmik kısmından daha yüksek proteolitik aktiviteye sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır (Carvalho ve diğ., 2020). Daha önce yapılan bir çalışma, proteaz ve ATPaz alanı (G399L) arasındaki glisin rezidüsünü mutasyona uğratmanın FtsH aktivitesinin

kaybına yol açtığını da göstermiştir (Vostrukhina ve diğ., 2015). Carvalho ve diğerleri (2020) tarafından yapılan çalışmada ise FtsH'nin aktivite sonuçları, yüksek oranda ATP varlığında fosfat salınımının daha yüksek olduğunu tespit edilmiş olup; ATP miktarının ATPaz aktivitesini ölçmek için sınırlayıcı bir faktör olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuca paralel olarak bu çalışmada elde edilen bulgulara göre, FtsH, 10 mM ATP substratı varlığında aktivitesi daha yüksektir, ancak 75. dakika itibari ile plato oluşumu görülürken, 1 mM ATP varlığında aktivite 75. dakikada halen artmaktadır (Şekil 4.15).

FtsH ve FtsH-HfIKC'nin spesifik ATPaz aktivitesini hesaplamak için 1, 5 ve 10 mM ATP; K_m ve V_{max} değerlerini hesaplamak amacı ile sırası ile 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 ve 20 mM ATP varlığında serbest salınan fosfat ölçümleri Bölüm 3.2.5'te açıklandığı şekilde gerçekleştirildi. Bu doğrultuda 2 μ M FtsH ve FtsH-HfIKC'nin spesifik ATPaz aktiviteleri, U/mg cinsinden hesaplandı (Şekil 4.16).

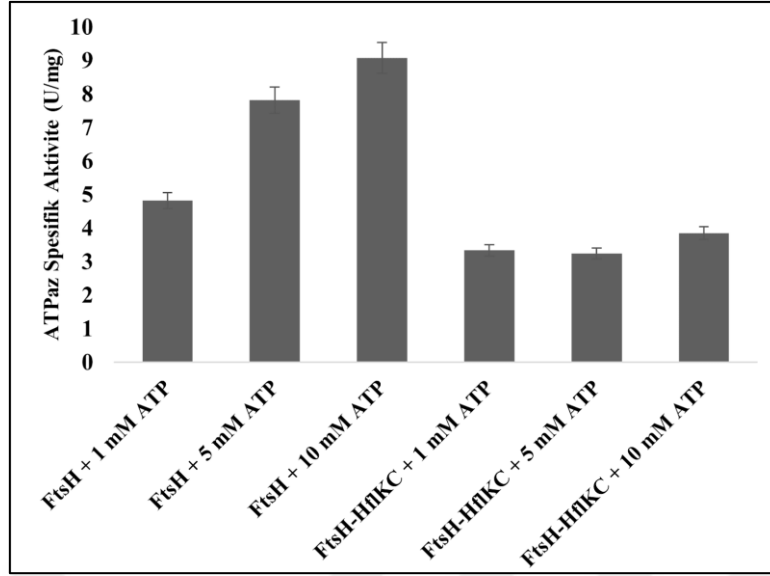


Şekil 4.15. FtsH ve FtsH-HfIKC'nin 1, 5 ve 10 mM ATP konsantrasyonlarındaki serbest fosfat salınımlarının 360 nm'de zamana karşı ölçümleri

Bir ATPaz ünitesi, bir dakikada ve 25 °C'de, fosfatın inorganik fosfata dönüşmesini katalizleyen enzim miktarı olarak ifade edilmektedir ve aşağıda verilen Denklem (4.1)'deki şekilde;

$$\text{ATPaz Aktivitesi (nmol/min/}\mu\text{l)} = \frac{\text{nmol (Pi)}}{t \text{ (dk)} \times V(\mu\text{l})} \times \text{Dilüsyon Faktörü} \quad (4.1)$$

hesaplanmaktadır (Rule ve diğ., 2016).

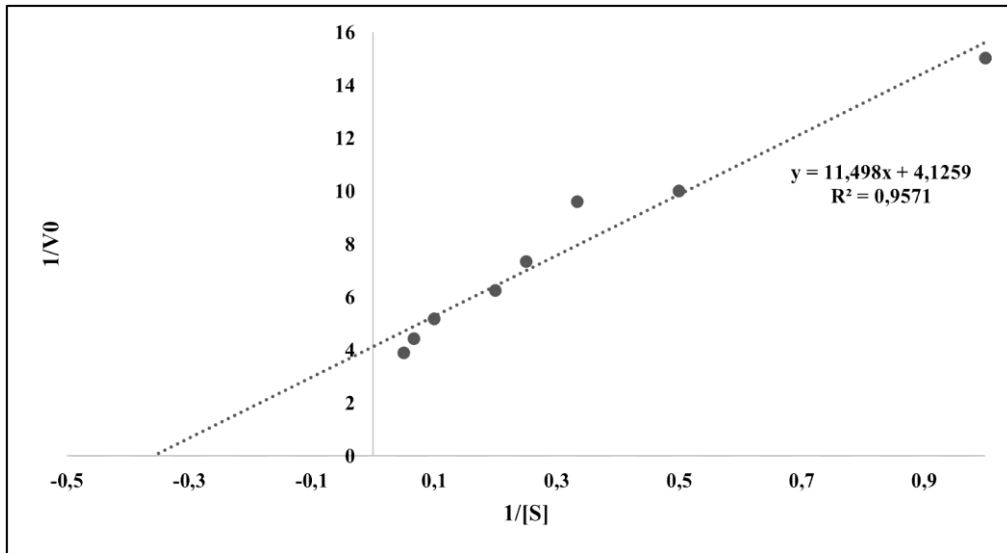


Şekil 4.16. FtsH ve FtsH-HflKC'nin 1, 5 ve 10 mM ATP konsantrasyonlarında hesaplanan spesifik aktivitesi

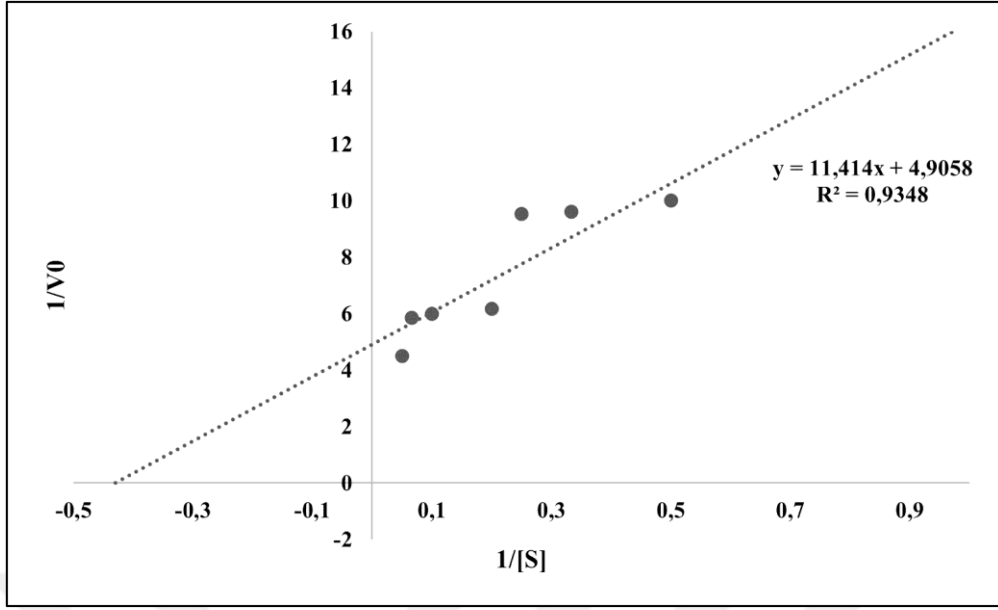
2 μ M FtsH'nin spesifik ATPaz aktivitesi, 10 mM ATP varlığında 9,97 U/mg; 2 μ M FtsH-HflKC'nin spesifik ATPaz aktivitesi ise 10 mM ATP varlığında 3,85 U/mg olarak elde edildi. Spesifik aktiviteler karşılaştırıldığında, FtsH'nin ATP'nin artan konsantrasyonlarda gösterdiği artış, FtsH-HflKC için geçerli olmadığı görülmektedir. Bunun nedeni olarak HflKC'nin proteolitik aktivitede de benzer şekilde, FtsH'ye sağladığı “seçicilik” olduğu söylenebilir.

FtsH'in hekzamerik yapısı, on iki transmembran sarmalından meydana gelmektedir. FtsH'nin ATPaz domaininde bulunan korunmuş arjinin aminoasitleri, FtsH'nin oligomerizasyonunda önemli rol oynamaktadır (Bieniossek ve diğ., 2009; Vostrukhina ve diğ., 2015; Carvalho ve diğ., 2020). Bu domainde ATPaz aktivitesinin karakterizasyonu amacı ile FtsH ve FtsH-HflKC'nin 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 ve 20 mM ATP varlığında aktivite ölçümleri Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi ve verilere göre $1/V_0$ 'a karşılık $1/[S]$ grafikleri olan Lineweaver-Burk plotları çizilerek K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. Carvalho ve diğerleri tarafından 2020 yılında yapılan çalışmada, ATPaz aktivitesinin, FtsH'nin sitozolik kısmının lipit çift tabakaya uygun bir şekilde “eğilerek” oluşturduğu konformasyonel değişiklik sayesinde gerçekleştiği önerilmiştir. Bu durumda, FtsH'ye bağlanarak kompleks oluşturan HflKC'nin bu eğimi, substrat afinitesine bağlı olarak “seçici” hale getirdiği; bu nedenle de FtsH'ye oranla daha düşük spesifik aktiviteye sahip olduğu söylenebilir.

FtsH'nin ve FtsH-HflKC'nin ATPaz aktivitelerini daha fazla karşılaştırabilmek için, Michaelis-Menten sabitleri, K_m ve V_{max} hesaplamaları, farklı ATP konsantrasyonlarındaki başlangıç hızlarına göre Lineweaver-Burk grafikleri üzerinden hesaplandı (Şekil 4.17-18). ATPaz aktiviteleri, Carvalho ve diğerlerinin (2020) yaptığı çalışmada kullandıkları FtsH'nin termofilik olması nedeni ile kullandıkları yüksek sıcaklıklardan farklı olarak bu çalışmada, 37 °C'de ölçüldü. Sonuçlar, FtsH ve FtsH-HflKC'nin ATPaz aktivitesinin K_m değerlerinin sırası ile 2,79 mM ve 2,33 mM olduğunu göstermektedir. FtsH'nin ATPaz aktivite sonucundan elde edilen 2,79 mM K_m değeri, Carvalho ve diğerleri (2020) tarafından yapılan çalışmaya göre oldukça yüksektir. Bunun nedenleri olarak, Carvalho ve diğerleri (2020) tarafından yapılan çalışmada kullanılan FtsH membran proteinlerinin, hekzamerik/dodamerik yapıya ve yüksek sıcaklıklarda aktivitelerini koruyabilmeye bağlı olarak afinitesinin yükselmesi veya farklı metot ile Pi ölçümünün gerçekleştirilmesi ile ilgili olabilir. Bu çalışmada kullanılan FtsH ve FtsH-HflKC'nin K_m (sırası ile 2,79 mM ve 2,33 mM) ve V_{max} (sırası ile 0,242 min⁻¹ ve 0,203 min⁻¹) değerleri kendi içlerinde karşılaştırıldığında değerlerin birbirlerine çok yakın olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara göre ATPaz aktivitesi incelendiğinde FtsH-HflKC, FtsH'ye göre daha yüksek afiniteye sahip olduğu, ancak reaksiyon hızının FtsH'ye göre daha düşük olduğu söylenebilir.



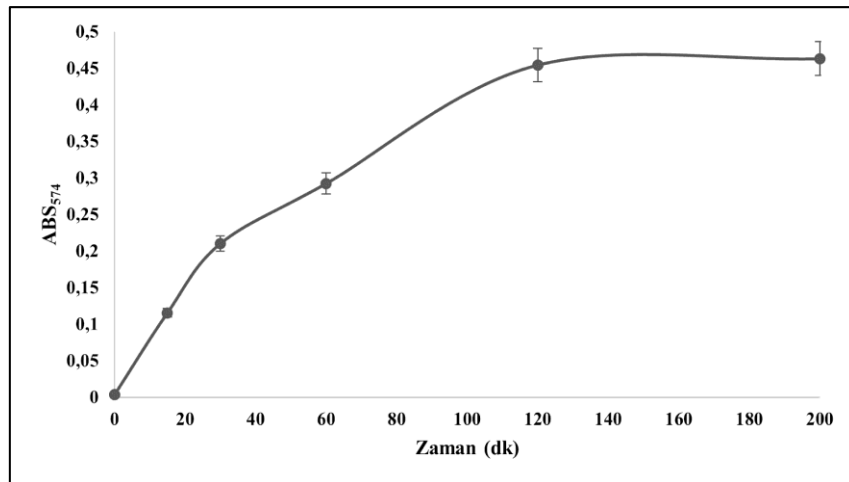
Şekil 4.17. FtsH'nin 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 ve 20 mM ATP varlığında gerçekleştirilen ATPaz aktivite ölçümleri ile oluşturulan Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.18. FtsH-HflKC'nin 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 ve 20 mM ATP varlığında gerçekleştirilen ATPaz aktivite ölçümleri ile oluşturulan Lineweaver-Burk grafiği

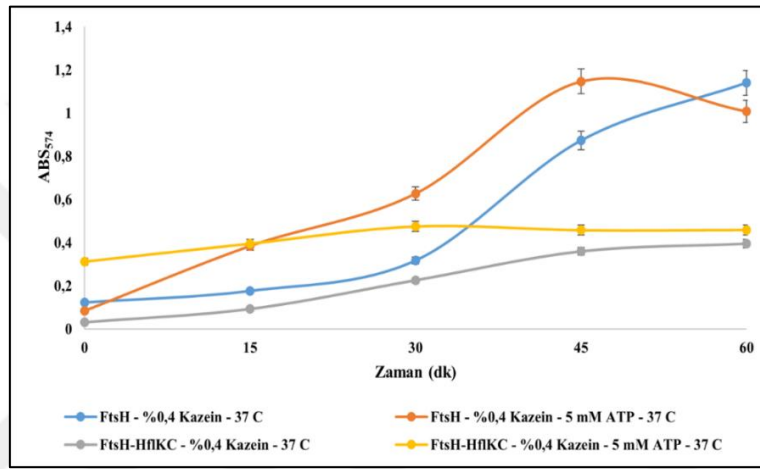
4.3.2. FtsH ve FtsH-HflKC'nin Proteolitik Aktivitesi

Metalloproteaz sınıfında bulunan FtsH'nin ve FtsH-HflKC'nin proteolitik aktivitesinin ölçümü, Bölüm 3.2.7'de belirtildiği üzere gerçekleştirildi. FtsH'nin yanı sıra, onun modulatori olarak tanımlanan HflKC'nin de ayrıca proteolitik aktivitesi ölçüldü. Bu kapsamda Tripsin'in, evrensel proteaz substratı olan rezofurin-etiketli Kazein (Roche, İsviçre) ile pozitif kontrol deneyi gerçekleştirildi (Şekil 4.19).



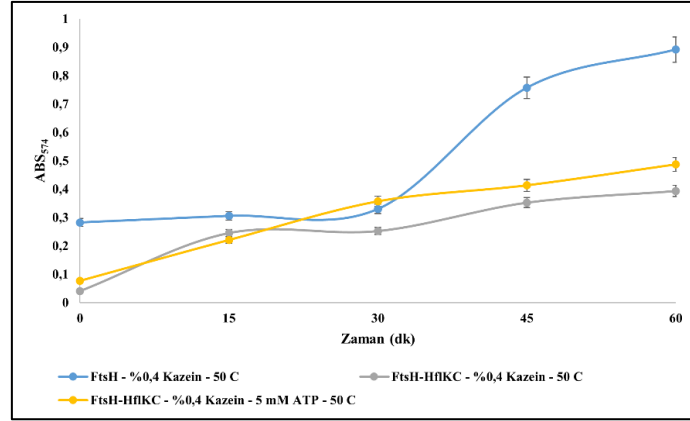
Şekil 4.19. Tripsin (Thermo Fischer Scientific, Amerika) ile %0,4 kazein kullanılarak gerçekleştirilen proteolitik aktivite kontrol deneyi

ATP içermeyen proteolitik aktivite deney sonucuna göre FtsH, 37 °C’de 5 mM ATP varlığında daha yüksek aktiviteye sahiptir. Bu noktada ATP’nin FtsH’nin proteolitik aktivitesi için bir itici güç sağladığı düşünülebilir. Benzer bir sonuç, FtsH-HflKC için de geçerlidir. ATP varlığında FtsH-HflKC aktivitesi, ATP içermeyen proteolitik aktivite sonucuna göre daha yüksek seviyededir (Şekil 4.20). FtsH ve FtsH-HflKC karşılaştırıldığında, HflKC’nin FtsH’nin modülatörü olarak görev yaptığı; FtsH’nin proteolitik aktivitesini negatif yönde etkileyerek seçicilik kazandırdığı bu sonuçlarda da göze çarpmaktadır.



Şekil 4.20. FtsH ve FtsH-HflKC’nin %0,4 kazein ile 37 °C’de gerçekleştirilen proteolitik aktivite deney sonuçları

Proteolitik aktivitenin sıcaklıkta nasıl gerçekleştiğini anlamak üzere 50 °C’de yapılan deney sonuçları, FtsH’nin 30. dakikadan sonra proteolitik aktivitesinin diğer örneklerle göre hızla arttığını gösterdi (Şekil 4.21). Benzer şekilde, Ruer ve diğerleri tarafından 2018 yılında yapılan çalışma, *Thermotoga maritima* FtsH için sıcaklık faktörünün konformasyonel değişiklikte anahtar rol oynadığı rapor edilmiştir. Ancak bu durum, bu sıcaklıkta FtsH-HflKC’nin proteolitik aktivitesinin FtsH’nin ATP içermeyen konsantrasyonuna göre daha yüksek olmasını açıklamamaktadır. FtsH’nin, sıcaklık ve ATP varlığında stabilitesini koruyamamış olabileceği düşünülmektedir; bu da, Ma ve diğerleri tarafından (2022) yapılan çalışmada “şapka” olarak HflKC’nin, FtsH’nin stabilitesini sıcaklıkta arttırabileceği anlamına gelmektedir.



Şekil 4.21. FtsH ve FtsH-HflKC'nin %0,4 kazein kullanılarak ATP varlığı ve yokluğunda 50 °C'de gerçekleştirilen proteolitik aktivite sonuçları

Akiyama tarafından 2002 yılında yapılan çalışmada, HflKC'nin proteolitik aktivitesinin bulunmadığı rapor edilmiştir. Bu sonuca benzer şekilde, bu çalışmada da 5 mM ATP varlığında ve yokluğunda HflKC'nin 574 nm'de yapılan ölçümler sonucu proteolitik aktivitesine sahip olmadığı gözlemlendi.

Bağıl aktiviteler, 37 °C'de ATP yokluğunda FtsH %100 alınarak hesaplandı. Buna göre, aynı sıcaklıkta 5 mM ATP varlığında gerçekleştirilen reaksiyonda FtsH'nin bağıl aktivitesi %91; FtsH-HflKC'nin ise 5 mM ATP varlığında ve yokluğunda sırası ile %39 ve %40 olarak hesaplandı. Benzer şekilde, FtsH-HflKC'nin 50 °C'de 5 mM ATP varlığında ve yokluğundaki reaksiyonlarında sırası ile %35 ve %40 olarak hesaplanırken FtsH'nin bağıl aktivitesi, ATP yokluğunda %60 olarak bulundu (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. Bağıl proteolitik aktiviteler.

Örnek	Sıcaklık	ATP (5 mM)	Bağıl Aktivite
FtsH	37 °C	-	%100
FtsH	37 °C	+	%91
FtsH	50 °C	-	%60
FtsH-HflKC	37 °C	-	%39
FtsH-HflKC	37 °C	+	%40
FtsH-HflKC	50 °C	-	%40
FtsH-HflKC	50 °C	+	%35

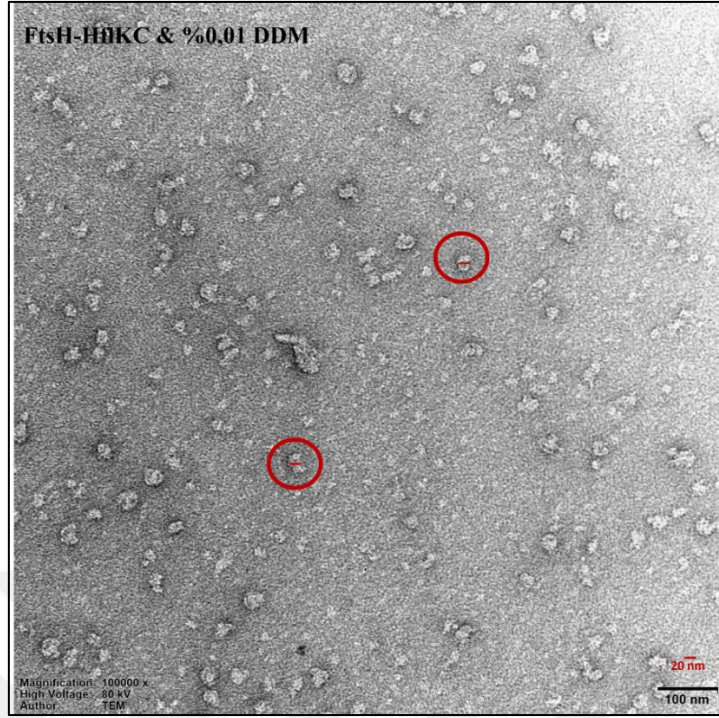
Bu sonuçlar karşılaştırıldığında, HflKC'nin FtsH'nin proteolitik aktivitesinde düşüşe neden olduğu görülmektedir. Kihara ve diğerlerinin (1996) yaptığı çalışma ile benzer olarak, elde edilen sonuçlar, FtsH'nin HflKC ile kompleks oluşturduğu zaman proteolitik aktivitenin negatif yönde etkilendiğini göstermektedir. HflKC'nin proteolitik aktivitesinin olmaması ise beklenen bir durumdur. Ayrıca, bu sonuçlar, FtsH'nin protein türüne göre hareket ettiğini işaret etmektedir: Çözünür protein substratları, FtsH tarafından ATP'ye ihtiyaç duyulmadan degrade edilebilir.

4.4. Transmisyon Elektron Mikroskopisi (TEM) Analizleri

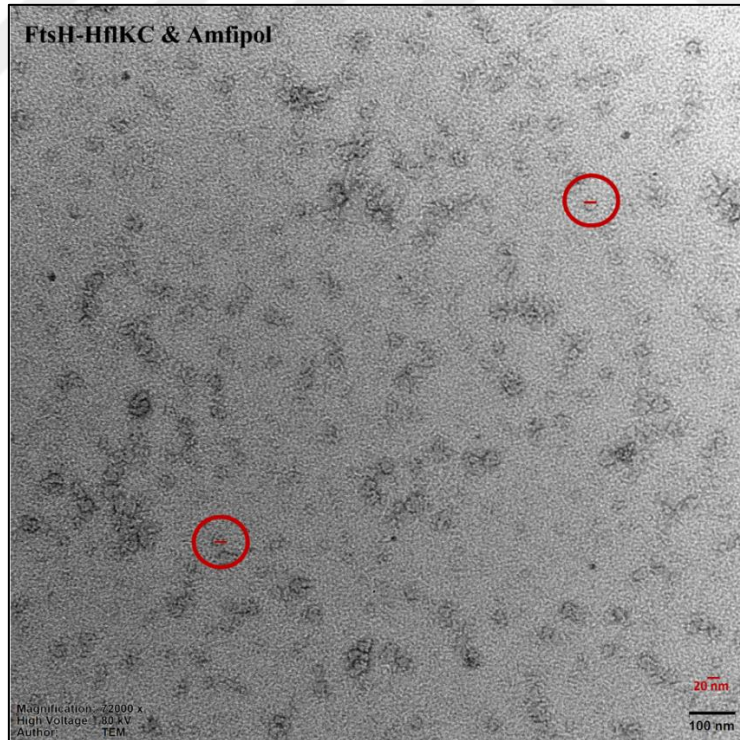
Saf proteinin, Kriyo-EM ile yapısının elde edilmesinden önce, negatif boyama işlemi gerçekleştirilmektedir. Bu sayede örneğin homojenliği/heterojenliği hakkında bilgi sahibi olunmakta; daha da önemlisi örneğin kalitesi değerlendirilebilmektedir (Booth ve diğ., 2011). TEM'de analiz için gerçekleştirilen negatif boyama işlemi, örneklerin yüklü ağır metal iyonlarla kaplanması aracılığı ile gerçekleştirilmektedir; ağır metaller, örneğin etrafını karanlık hale getirerek, kontrast sağlamaktadır.

TEM'de analizlerde fosfotungstik asit, metilamin tungstat, silikon tungstat, uranil asetat gibi çok sayıda ağır metal iyonları bulunmaktadır ve yaygın olarak fosfotungstik asit kullanılmaktadır (Rames ve diğ., 2014). Ancak, uranil asetat ve uranil format gibi tuz benzeri ağır metaller, henüz bilinmeyen bir şekilde fosfotungstik aside göre daha hızlı protein yapısını sabitlediği Rames ve diğerleri tarafından 2014 yılında rapor edilmiştir. Bu bağlamda, bu çalışmada da uranil asetat kullanıldı.

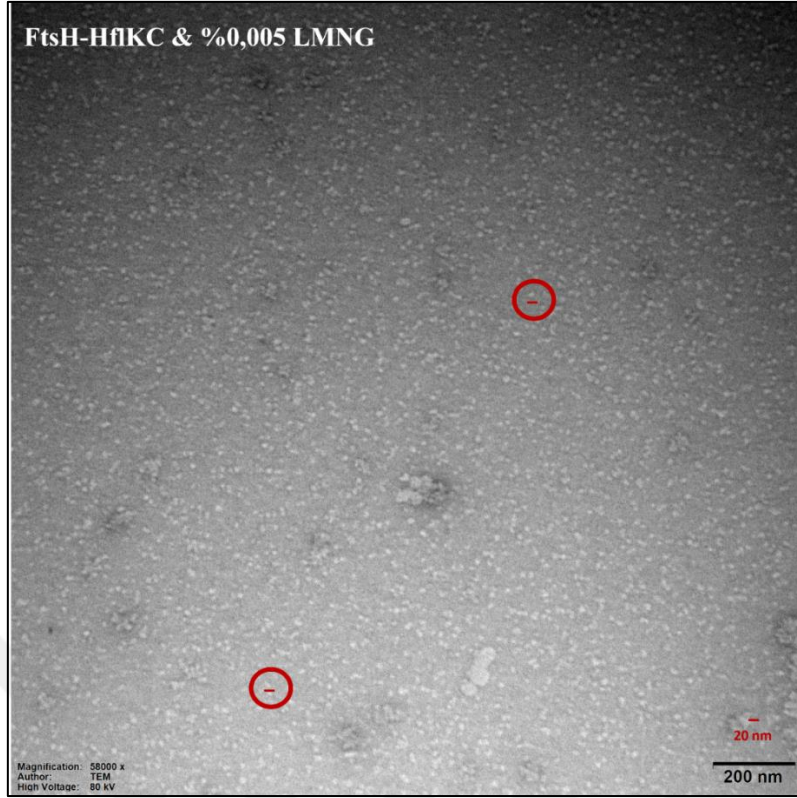
FtsH-HflKC membran protein kompleksinin hafif deterjan (DDM ve LMNG) ve amfipol içeren 0,05 mg/ml konsantrasyonlarının TEM görüntüleri sırası ile Şekil 4.22-24'te verildi. Elde edilen görüntülerde, 20 nm boyutunda FtsH-HflKC komplekslerinin bulunduğu tespit edildi. Sonuçların, Carvalho ve diğerleri (2020) tarafından gerçekleştirilen FtsH'nin TEM analiz sonuçları ile uyumlu olduğu gözlemlendi. Ayrıca, farklı solüsyonlardaki örneklerin, homojen dağılım gösterdiği ve dolayısı ile Kriyo-EM ile veri toplamak için uygun olduğu tespit edildi.



Şekil 4.22. FtsH-HflKC'nin DDM içerisindeki elektron mikrosafı (100000x). Kompleks yaklaşık olarak 20 nm büyüklüğe denk gelmektedir (Ölçek çubuğu, 100 nm)



Şekil 4.23. FtsH-HflKC'nin amfipol içerisindeki elektron mikrosafı (72000x). Kompleks yaklaşık olarak 20 nm büyüklüğe denk gelmektedir (Ölçek çubuğu, 100 nm)



Şekil 4.24. FtsH-HflKC'nin LMNG içerisindeki elektron mikrofrafı (58000x). Kompleks yaklaşık olarak 20 nm büyüklüğe denk gelmektedir (Ölçek çubuğu, 200 nm)

Sonuçlar, deterjan (DDM) ve Amfipol içerisinde bulunan FtsH-HflKC membran protein kompleksinin benzer büyüklükte olduğunu, dolayısı ile homojen dağılımda bir fark olmadığını göstermektedir. Bunun nedeni, Amfipole geçirilen FtsH-HflKC membran protein kompleksinin daha öncesinden DDM ile saflaştırılması kaynaklı olabilir. Bu çalışmada, FtsH-HflKC'nin TEM görüntüleri neredeyse birbirinin aynısıdır. Ancak, Kriyo-EM için hazırlanan LMNG, DDM ve Amfipol içeren örneklerin DDM ve Amfipol içerisinde degradasyona uğradığı, bu nedenle sadece LMNG içeren FtsH-HflKC membran protein kompleksinin verisinin toplanabildiği görüldü.

4.5. FtsH-HflKC'nin Yapısal Karakterizasyonu

FtsH-HflKC membran protein kompleksinin %0,005 LMNG deterjanı ile misel oluşturulmuş yapısının mikrofrafı, ilk olarak RELION 4.1 (Scheres, 2012) programında, sonrasında ise CryoSPARC (Punjani ve diğ., 2017) programı kullanılarak Bölüm 3.2.8'de anlatıldığı şekilde işlendi. Aynı zamanda, FtsH-HflKC membran protein kompleksinin %0,01 DDM deterjanı içeren yapısının SAXS analizleri gerçekleştirildi. Bu

doğrultuda elde edilen modeller, UCSF 1.16 (Pettersen ve diğ., 2004) ve ChimeraX (Meng ve diğ., 2023) programında görselleştirildi.

4.5.1. Kriyo-EM Tekli Parçacık Veri Toplama Parametreleri

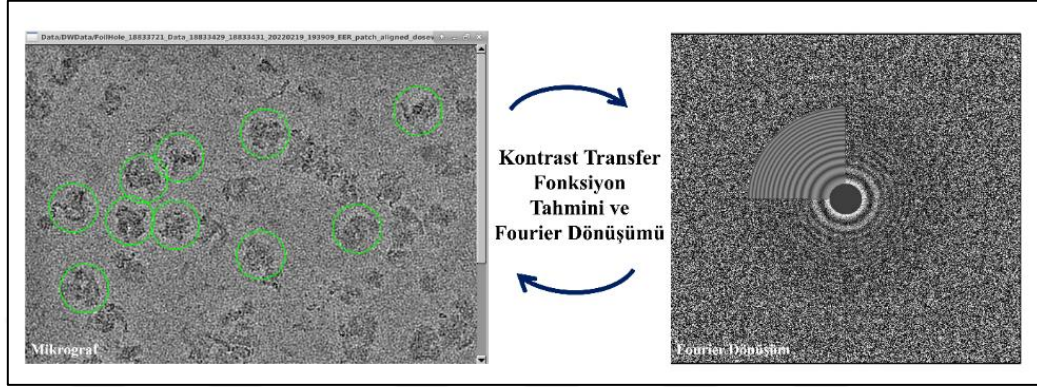
Saflaştırılan FtsH-HflKC membran protein kompleksini içeren örnekler, soğuk zincir ile Hollanda'ya gönderildi. Mikrograflar, Thermo Fischer Scientific, Dr. Deniz Uğurlar tarafından Titan Krios Elektron Mikroskobu'nda toplanmıştır. Veriler Falcon 4 dedektöründe; piksel boyutu 0,929 Å; doz hızı 6,5 e/pix/s; toplam doz 50 e/Å parametrelerinde toplanmış ve maruz kalma süresi 8,92 s; mikrograf sayısı (görüntü sayısı) 6632 olarak sonuçlanmıştır.

Kriyo-EM'de örneğin maruz kaldığı elektron dozu, her bir mikrografta bir öncekine göre artmaktadır. Bu durumda ilk mikrograf, en az radyasyon hasarına sahip mikrograf olmaktadır. Elektronların birikmesi, yüksek kontrastlı görüntüleri sağlamaktadır ancak radyasyon hasarı nedeni ile yüksek çözünürlüklü bilgiler hızla bozulmaya uğramaktadır. Bu nedenle mikrograflarda doz ağırlıklandırma algoritması geliştirilerek bir filtreleme yöntemi uygulanmaktadır. Bu sayede, mikrograflarda radyasyon hasarı görmüş ögeler uzaklaştırılarak görüntü işleme süreci için en iyi bilgilerin kullanılması sağlanmaktadır (Kühlbrandt, 2014). FtsH-HflKC'yi içeren mikrograflar, doz ağırlıklandırılmış olarak modeli geliştirmek üzere tarafımıza ulaştırılmıştır.

4.5.2. RELION 4.1'de Tekli Parçacık Görüntü İşleme Süreci

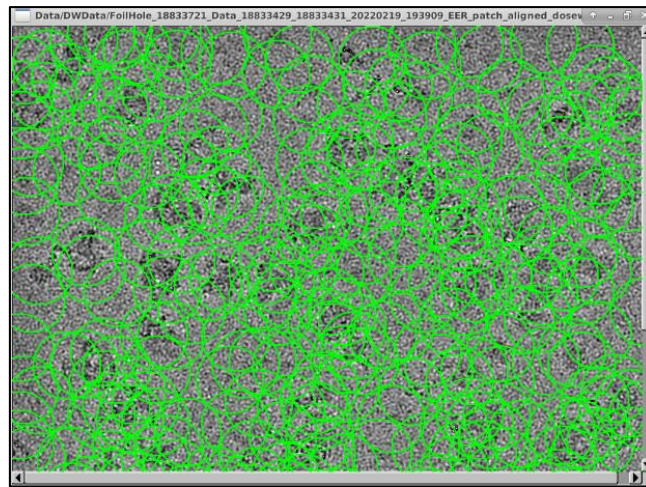
RELION 4.1 programına erişim, Bristol Üniversitesi aracılığı ile uzaktan sağlanarak görüntü işleme süreci tamamlandı. Bu doğrultuda, mikrograflar, RELION 4.1 programına aktarıldı ve ön-işlemenin bir parçası olarak Kontrast Transfer Fonksiyon Tahmini basamağına geçildi. Elektron mikroskobundan iki boyutlu (x, y) olarak elde edilen mikrografların üçüncü boyutlarını (z) ortaya çıkartabilmek adına, odak dışı (defokus) değeri kullanılmaktadır. Odak dışı değer, optik eksen boyunca z-yüksekliğine karşılık gelmektedir. Saçılım gösteren elektronlar bir sinyal vermekte ve bu sinyalin, odak dışı değere bağlı olarak protein ve su moleküllerinden geldiğinden emin olmak üzere kontrast transfer fonksiyonu işleminden geçirilmektedir. Kontrast Transfer Fonksiyon Tahmini işlemi sayesinde, Fourier dönüşüm sonuçları elde edilmekte ve uzamsal frekansa bağlı

sonuçlar görülmektedir (He ve Scheres, 2017). FtsH-HflKC membran protein kompleksinin mikrograflarına ait Kontrast Transfer Fonksiyonu Tahmini işlemine Fourier dönüşümlerindeki oluşturduğu sinyal, halkalar şeklinde görülmektedir. Bu halkaların arkasında kalan kısım ise gürültüdür (şekil 4.25).



şekil 4.25. FtsH-HflKC örneğinin mikrograflarının Kontrast Transfer Fonksiyonu tahmini ile Fourier Dönüşümü

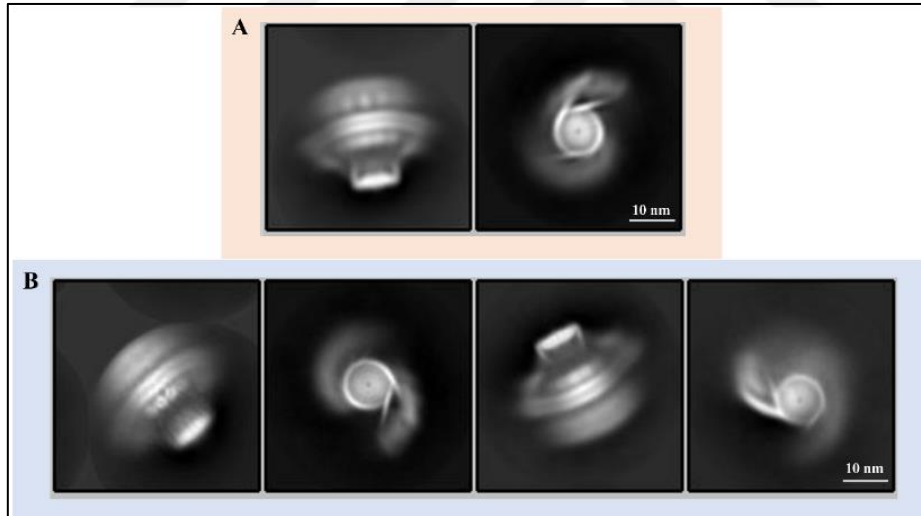
RELION 4.1’de FtsH-HflKC membran protein kompleksi olan parçacıklar, alt küme seçimi (Subset Selection) işlemi ile seçildi. Bu işlem için kontrast transfer fonksiyonu tahmininden gelen meta veri kullanıldı ve bu verilere göre ilk 10 mikrograf üzerinden denemeler gerçekleştirildi. Daha sonrasında tüm mikrograflar üzerinde znrlğ 4,5 Å ve üstü olan parçacıkları içeren 5708 mikrograf seçildi. Bu mikrograflardan, Laplacian-of-Gaussian (LoG) filtresine dayanarak referans gerektirmeden 1786815 parçacık, otomatik seçim (Autopick) işlemi ile seçildi (şekil 4.26).



şekil 4.26. FtsH-HflKC parçacıkları içeren otomatik seçim sonucu

Parçacık seçimi, ön işlem olarak ele alındığında Şekil 4.26'da da görüldüğü üzere çok sayıda düşük kalitede ve yanlış pozitif parçacıklar içerebilmektedir. Ancak İki Boyutlu Sınıflandırma işlemi birkaç kez tekrar edilerek bu hatalı parçacıklar filtrelenmektedir. Bu doğrultuda VDAM (Variable-metric gradient Descent algorithm with Adaptive Moments estimation) algoritması kullanılarak İki Boyutlu Sınıflandırma (2D Classification) işlemi gerçekleştirildi. Bu sınıflandırma işleminde parametreler, maske çapı 480 Å, düzenleme parametresi 2 seçilip 200 sınıf oluşturulacak şekilde 750 iterasyon ile tamamlandı.

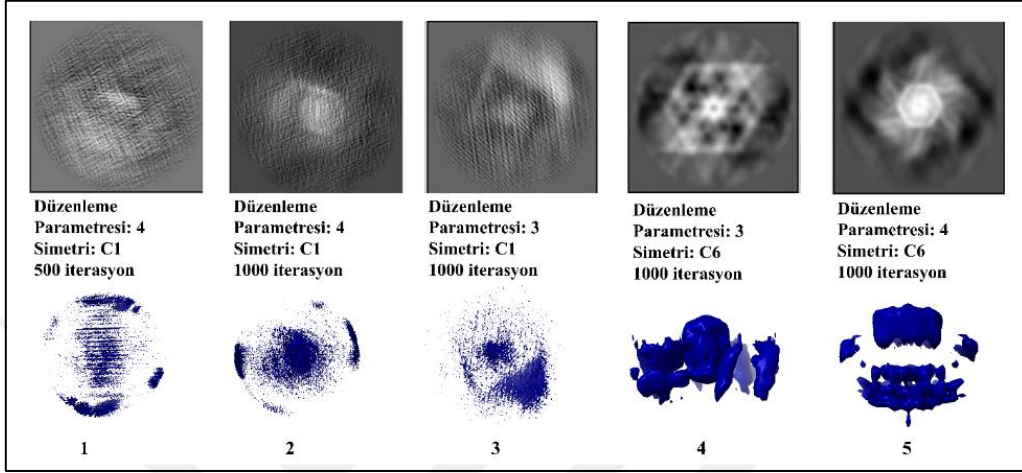
İki boyutlu sınıflandırma sonrasında parçacıklar seçildi ve hem VDAM algoritması hem de EM (Expectation Maximization) algoritması ile parametreler, maske çapı 480 Å, düzenleme parametresi (T) 2 seçilip 10 sınıf oluşturacak şekilde 1000 iterasyon ile ayrı ayrı tekrar İki Boyutlu Sınıflandırma yapıldı (Şekil 4.27). Farklı algoritmalar kullanılarak gerçekleştirilen bu İki Boyutlu Sınıflandırma işlemleri sonrasında sınıflar seçildi ve iki algoritmadan gelen toplamda altı tane iki boyutlu sınıf, birleştirilip (JoinStar) duplike parçacıklar çıkartıldı ve 60094 parçacık elde edildi.



Şekil 4.27. VDAM (A) ve EM (B) algoritması kullanılarak oluşturulan iki boyutlu FtsH-HflKC parçacık sınıfları

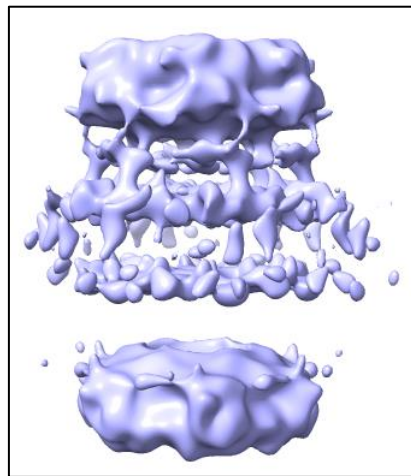
İki Boyutlu Sınıflandırmalardan gelen parçacıklar parçacık kutu boyutu 512 piksel olacak şekilde ekstrakt edildi ve Şekil 4.28'de gösterilen şekilde parametreler değiştirilerek *ab-initio* modeli oluşturuldu. T değeri, Scheres ve Chen tarafından 2012 yılında yapılan çalışmaya göre, sinyal – gürültü oranı arasındaki uyumu sağlamaktadır. Rapora göre bu değer, Üç Boyutlu Sınıflandırmalarda (3D Classification) 2-4 arasında olmalıdır,

genellikle gürültü fazla ise T değeri düşürülmekte, düşük çözünürlükte ise artırılmaktadır. Bu doğrultuda *ab-initio* modeli oluşturulurken 3 ve 4 değerleri, C1 ve C6 simetrisinde, VDAM algoritması kullanılarak 500 ile 1000 iterasyon ile denemeler yapıldı (Şekil 4.28).



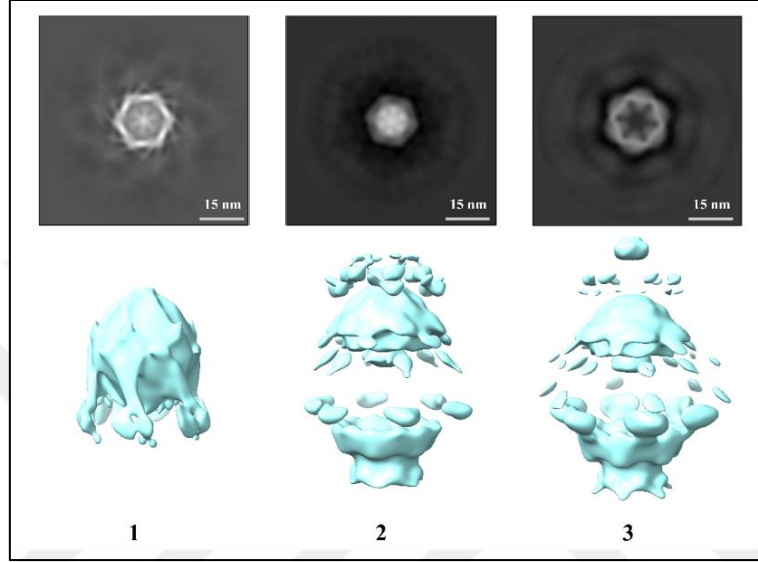
Şekil 4.28. Farklı parametreler denenerek gerçekleştirilen *ab-initio* modellerinin görüntüleri (üstte) ve yapıları (altta)

Ab-initio modelleri incelendiğinde, Şekil 4.28’de 5 ile numaralandırılan modelin dahi dinamik yapıya sahip olduğu görüldü. Bu nedenle, Bristol Üniversitesi’nde eş zamanlı olarak elde edilen ve Dr. Burak V. Kabasakal tarafından görüntü işleme süreci devam ettirilen modelin, *ab-initio* modeli olarak kullanılmasının daha uygun olduğuna karar verildi (Şekil 4.29).

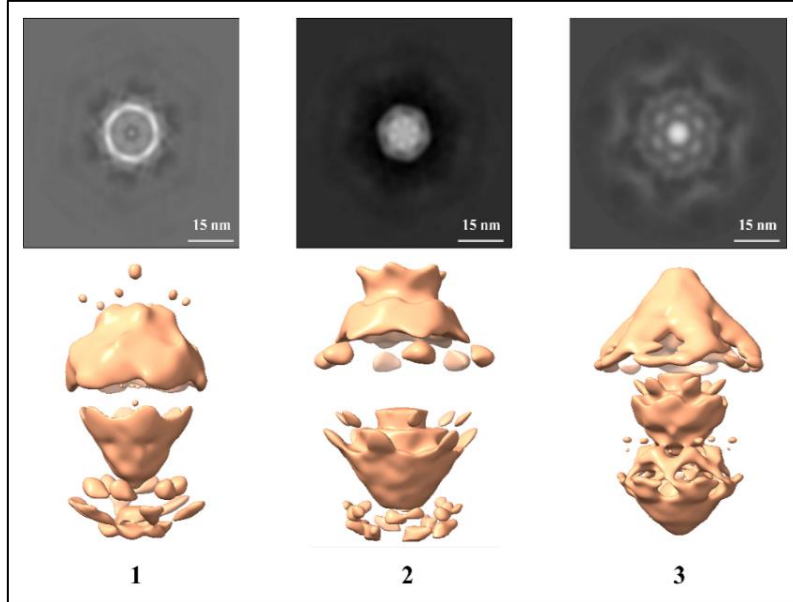


Şekil 4.29. Üç Boyutlu Sınıflandırma için kullanılan *ab-initio* modeli

Üç Boyutlu Sınıflandırma, Şekil 4.29’da verilen *ab-initio* modeli ile maske odaklı olarak iki kez tekrar edildi. Bu doğrultuda sınıf sayısı 3, düzenleme parametresi 2 ve 4 olmak üzere, simetri C6, iterasyon sayısı 25 ve maske çapı 480 Å olarak başlatıldı. Üç Boyutlu Sınıflandırma sonuçları, Şekil 4.30-31’de verildi. Bu doğrultuda düzenleme parametresi 4 olan 3 numaralı sınıfın sahip olduğu parçacık sayısı sırası ile 4730 olarak belirlendi.

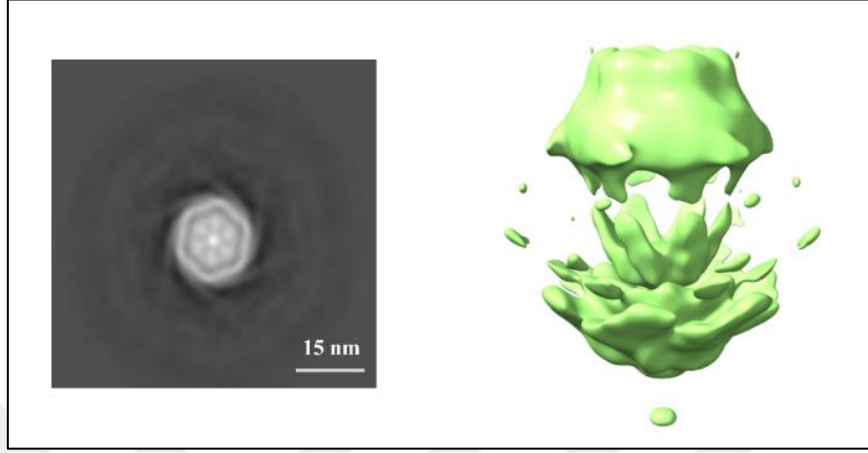


Şekil 4.30. Birinci Üç Boyutlu Sınıflandırma sonuçlarının görüntüleri (üstte) ve yapıları (altta)



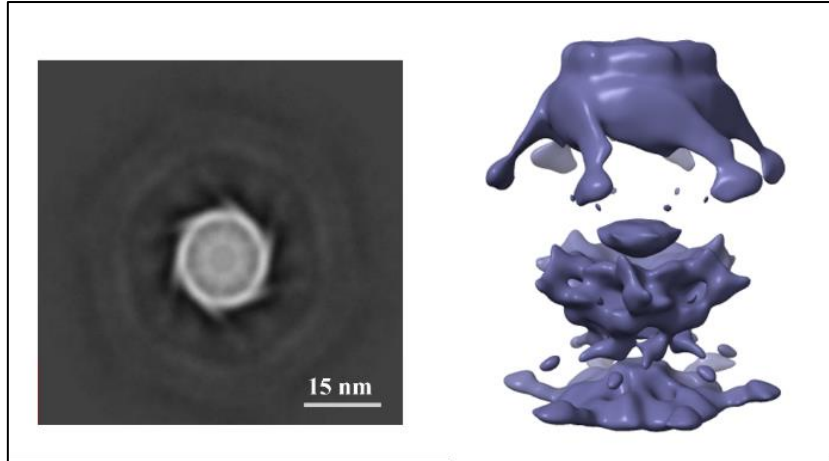
Şekil 4.31. İkinci Üç Boyutlu Sınıflandırma sonuçlarının görüntüleri (üstte) ve yapıları (altta)

Parçacık sayısının düşük olması nedeni ile, bir Üç Boyutlu Sınıflandırma, sınıf sayısı 1, T değeri 4, iterasyon sayısı 25 ve çözünürlük limiti 5'e ayarlanarak tekrar edildi ve 13,6 Å çözünürlükte 58899 parçacıktan oluşan bir sınıf elde edildi (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. Üçüncü Üç Boyutlu Sınıflandırma sonucunun görüntüsü (solda) ve yapısı (sağda)

Üçüncü üç boyutlu sınıflandırmadan gelen harita ile Üç Boyutlu İyileştirme (Refine3D) işlemi gerçekleştirildi (Şekil 4.30). Bu iyileştirme ile 13,58 Å çözünürlükte harita elde edildi.



Şekil 4.33. Üç Boyutlu İyileştirme sonucunun görüntüsü (solda) ve yapısı (sağda)

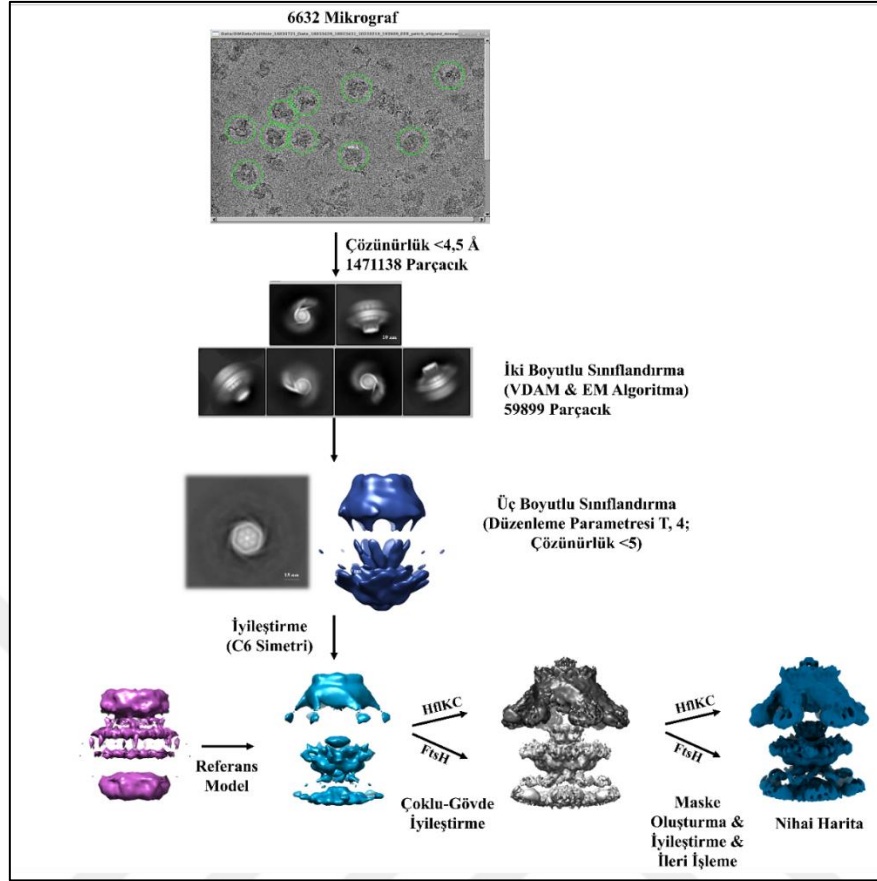
Tüm bu sonuçlar, FtsH-HflKC membran protein kompleksinin esnek ve dinamik yapısını göstermektedir. Dinamik yapının, çözünürlüğe olan negatif etkisi nedeni ile, FtsH ve HflKC üzerinde ayrı ayrı çoklu-gövde iyileştirme işlemi (Multi-Body Refinement) gerçekleştirildi (Nakane ve diğ., 2018). Bunun için, iyileştirme işleminden sonra elde

edilen harita UCSF Chimera 1.16 üzerinde ikiye bölündü. Bu sayede veri kümesinde parçalara ayrılan kısımların birbirlerine bağlı olarak nasıl ve ne kadar bağlı şekilde hareket ettiklerini açıklayan değerler elde edildi. Sigma açıları, parçacığın Euler açılarının standart deviasyonunu tanımlamaktadır ve parçacığın daha kararlı kısmı için 10 derece, daha hareketli kısmı için ise bu değer 15-30 derece arasında olması gerektiği bildirilmiştir (Nakane ve diğ., 2018). Ayrıca Sigma ofset değeri de bahsedilen standart deviasyonun piksel karşılığı olarak ele alınmaktadır. Bu doğrultuda, programda dokuz farklı deneme gerçekleştirilerek en yüksek çözünürlüklü çoklu-gövde iyileştirme işlemi gerçekleştirildi (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. Çoklu gövde iyileştirme işlemi için optimize edilen parametreler.

Referans Harita	Sigma Ofset Değeri		Sigma Açı Değeri		Eigen Vektör Değeri	Çözünürlük (Å)
	FtsH	HfIKC	FtsH	HfIKC		
Şekil 4.29	2	5	30	10	3	7,5
Şekil 4.29	5	2	30	10	3	7,4
Şekil 4.33	2	5	10	30	3	9,3
Şekil 4.33	5	2	30	10	3	7,9
Şekil 4.33	5	5	30	30	3	7,9
Şekil 4.33	5	5	30	30	5	7,9
Şekil 4.29	5	5	30	10	5	8,3
Şekil 4.29	5	5	30	30	5	7,5
Şekil 4.29	5	5	40	40	5	8,0

Sonuçlara göre, en yüksek çözünürlük, Şekil 4.29'da verilen modelin referans olarak kullanıldığı denemede elde edildi. Sigma ofset değeri ve açı değerlerine göre, FtsH'nin HfIKC'ye göre daha dinamik olduğu görüldü ve bu işlem ile HfIKC, FtsH'e bağlı olarak hareket ettirilmesi sağlanmış oldu. Çoklu gövde işleminden sonra, FtsH ve HfIKC için ayrı ayrı maskeler UCSF Chimera 1.16'da eşik değerine bağlı olarak oluşturuldu ve Üç Boyutlu İyileştirme (3DRefine) ile Kontrast Transfer Fonksiyon İyileştirme (CTFRefine) işlemleri gerçekleştirildi. Bu iyileştirmeleri takiben tekrar maske oluşturma (Mask Creation) ve son olarak İleri İşleme (Post-processing) işlemleri gerçekleştirilerek haritanın son hali elde edildi. RELION 4.1'de tekli parçacık görüntü işleme süreci sonucunda FtsH 8,8 Å; HfIKC ise 9,32 Å çözünürlükte elde edildi. RELION 4.1 programında tek parçacık görüntü işleme süreci ile mikrografların bir yukarıda anlatılan denemeler sonucunda haritanın son hali elde edildi. Bu bağlamda, iş akışının özeti Şekil 4.34'te bulunmaktadır.



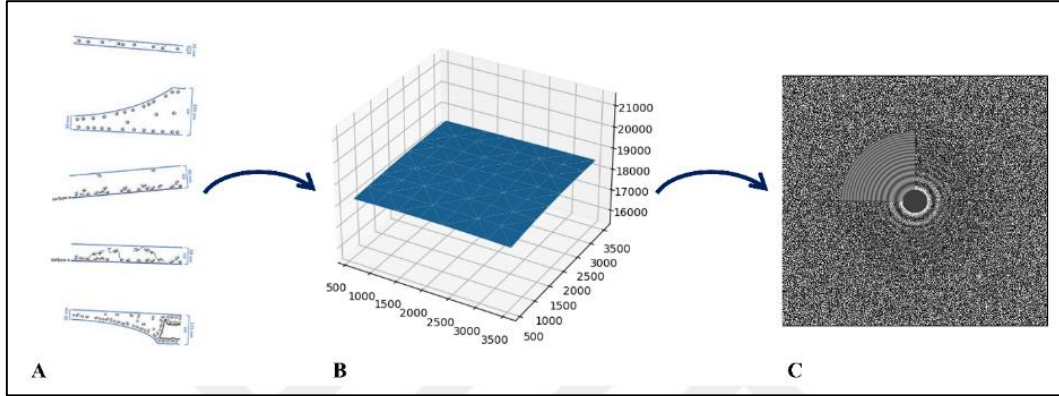
Şekil 4.34. FtsH-HflKC haritasının RELION 4.1’de tek parçacık görüntü işleme iş akış süreci

4.5.3. CryoSPARC’ta Tekli Parçacık Görüntü İşleme Süreci

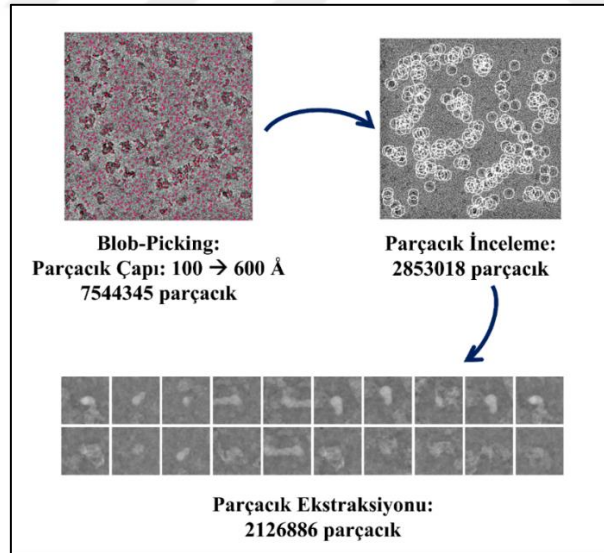
Kriyo-EM'den elde edilen mikrograflar, sadece RELION 4.1 ile değil, aynı zamanda CryoSPARC üzerinde de işlendi. Bu çift yaklaşım, elde edilen verilerin daha kapsamlı bir şekilde analiz edilmesine olanak tanıdı.

CryoSPARC (Punjani ve diğ., 2017) kullanılarak gerçekleştirilen tekli parçacık görüntü işleme sürecinde ise, programa 6632 mikrograf aktarıldı. Bu işlemi takiben, Kontrast Transfer Fonksiyon Tahmini gerçekleştirildi (Şekil 4.35). Buradaki Kontrast Transfer Fonksiyon Tahmini, buzun içerisinde bulunan her bir proteinin yüksekliğini birbirinden ayrı ele alarak z-yüksekliğini ayarlanmasını sağlamaktadır (Noble ve diğ., 2018). Kontrast Transfer Fonksiyonu işlemini takiben parçacık seçimi için CryoSPARC üzerinde üç farklı yol izlenebilmektedir: Şablondan bağımsız parçacık seçimi (Blob-Picker); Şablon ile parçacık seçimi ve Derin Nöral Ağ. Bu işlemler arasından, membran proteinleri için en uygun olan parçacık seçimi olan şablondan bağımsız parçacık seçimi

işlemi uygulandı, bu seçim türü daha az ayırt edici özelliğe sahip olmakla birlikte sonraki aşamalarda şablon oluşturulması üzere daha avantajlı olduğu bildirilmiştir (Punjani ve diğ., 2017). Bu doğrultuda parçacık çapı 100 Å'dan 600 Å'ya kadar olacak şekilde 7544345 parçacık “Blob-Picker” ile seçtirildi. Sonrasında bu parçacık sayısı, korelasyon düzenlenip yanlış pozitifler çıkartılarak 2853018 parçacığa düşürüldü. Mikrograflardan, ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilerek 2126886 parçacık çıkartıldı (Şekil 4.36).

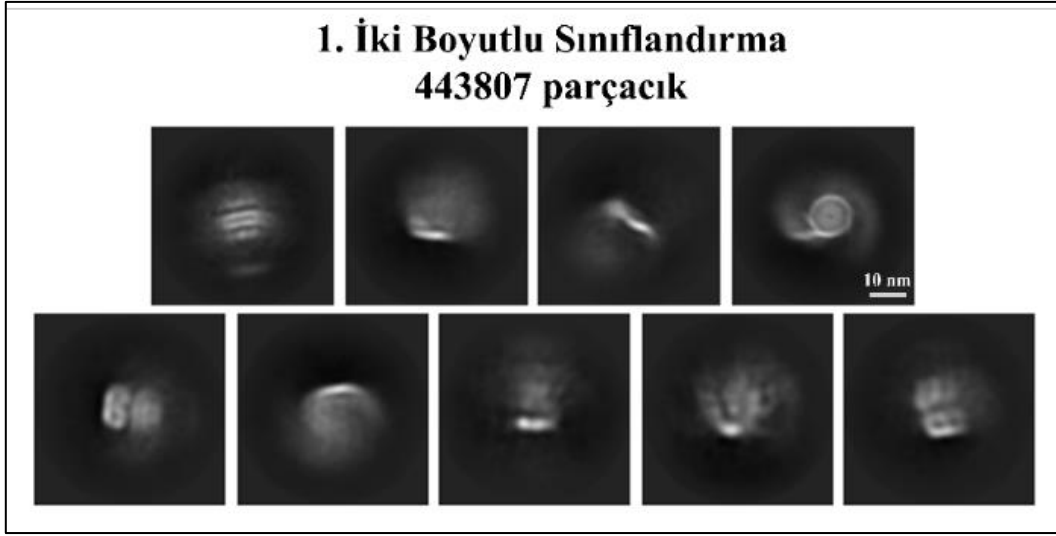


Şekil 4.35. Buz içerisinde farklı yüksekliklerdeki proteinlerin (A) CryoSPARC'ta Kontrast Transfer Fonskiyon Tahmini işlemi ve (B) Fourier dönüşümü ile sinyali oluşturulma (C) süreci



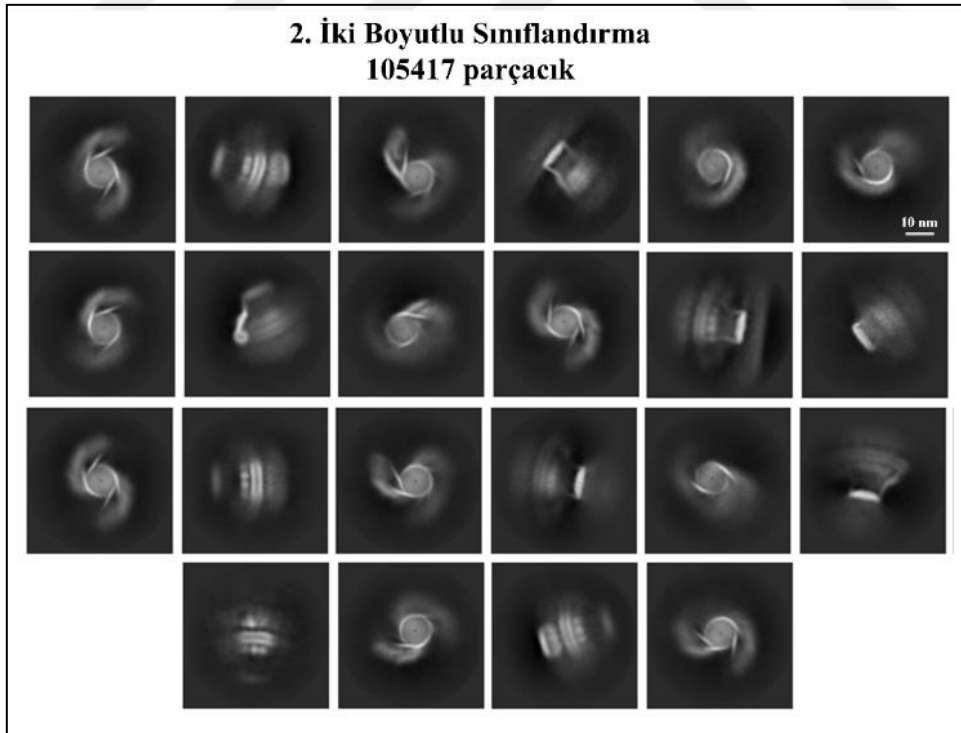
Şekil 4.36. CryoSPARC'ta parçacık seçimi, inceleme ve ekstraksiyon süreci

Bu parçacıklardan 50 sınıf oluşturmak üzere İki Boyutlu Sınıflandırma gerçekleştirildi. Sınıfların parçacık sayısı ve görüntü kalitesine bağlı olarak, dokuz tanesi seçilerek 443807 parçacıktan tekrar 50 sınıflı İki Boyutlu Sınıflandırma yapıldı (Şekil 4.37).

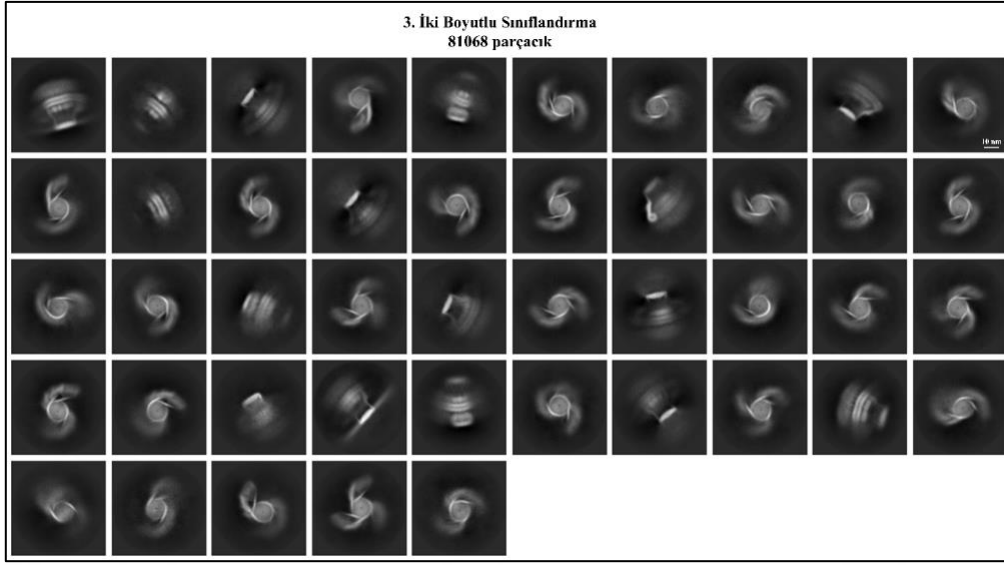


Şekil 4.37. İki Boyutlu Sınıflandırma sonucundan seçilen 9 sınıf

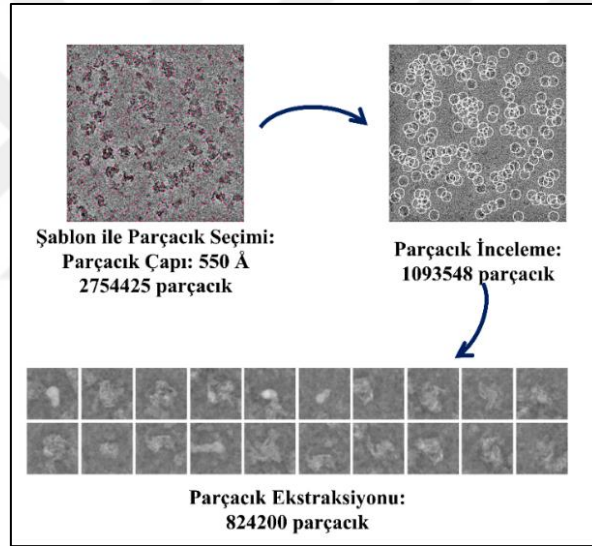
Şekil 4.38’de 100 sınıftan oluşan İki Boyutlu Sınıf arasından ise 22 sınıf seçildi ve tekrar 100 sınıflı İki Boyutlu Sınıflandırma gerçekleştirilerek buradan 45 sınıf (81068 parçacık) seçildi (Şekil 4.39). Tekrar eden sınıflandırma süreçleri, hatalı parçacıkların ayıklanmasını sağladı.



Şekil 4.38. Dokuz sınıfla tekrarlanan ikinci iki boyutlu 22 sınıf



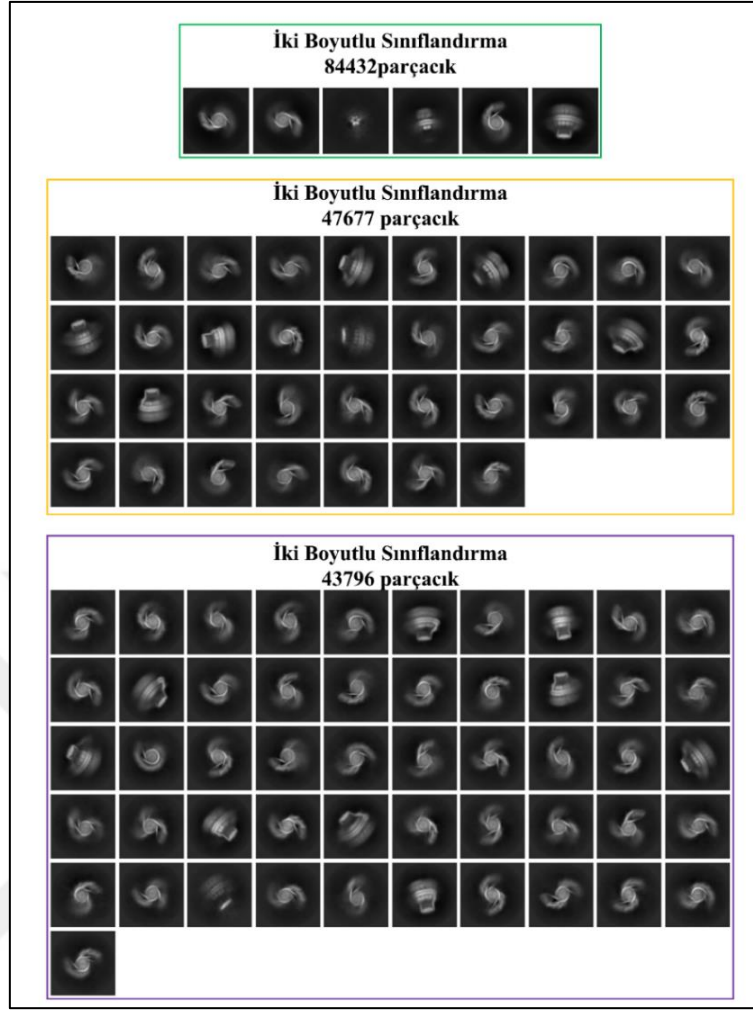
Şekil 4.39. Yirmi iki sınıfla tekrarlanan üçüncü iki boyutlu 45 sınıf



Şekil 4.40. Şablon ile parçacık seçimi, inceleme işlemi ve ekstraksiyon sonuçları

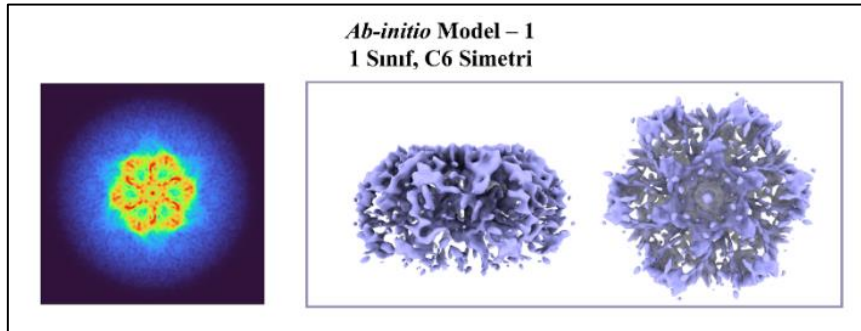
Toplamda 81068 parçacık şablon oluşturmak üzere “Şablon ile Parçacık Seçimi (Template Picker)” işlemi gerçekleştirildi ve 2754425 parçacık, korelasyon düzenlenip yanlış pozitifleri çıkartılması ve ekstrakte edilmesi ile 1093548 parçacık sayısına düşürüldü. İşlem süreci Şekil 4.40’ta verildi.

Şablon ile parçacık seçimi, takiben üç kez daha parçacık gerçekleştirildi. Bunu takiben, İki Boyutlu Sınıflandırma hatalı parçacık sayısını daha da düşürmek amacı ile tekrar edildi. İşlem sonucunda seçilen sınıflar, Şekil 4.41’de verildi.

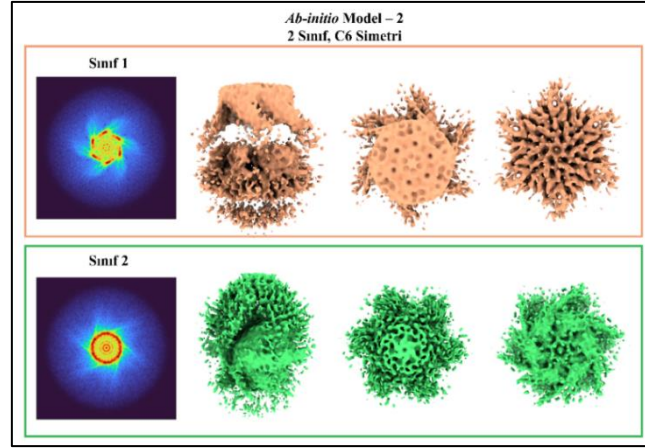


Şekil 4.41. Seçilen parçacıklarla tekrarlanan iki boyutlu sınıflar

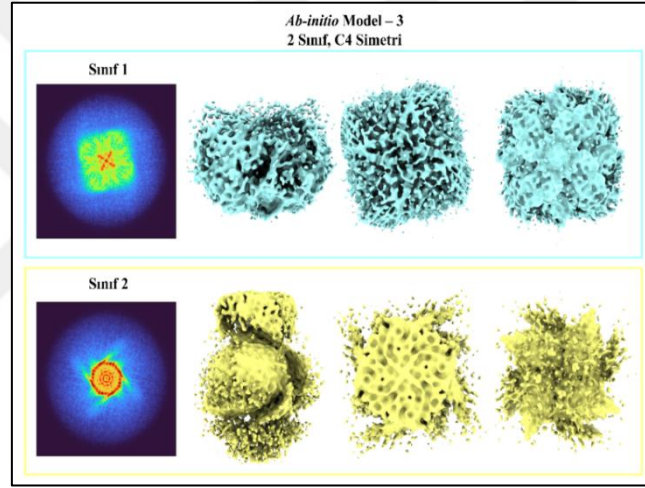
Bu sınıflandırma sonucunda 43796 parçacık sayısı ile dört farklı simetride (C6, C4, C2, C12 ve C1) *ab-initio* modeller oluşturuldu (Şekil 4.42-46).



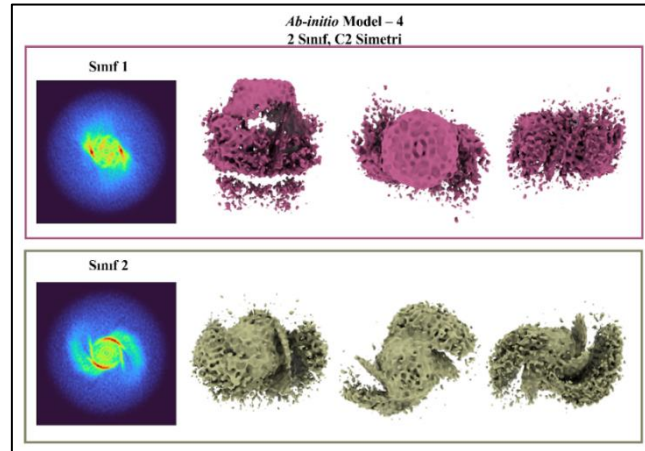
Şekil 4.42. C6 simetrisi ve bir sınıftan oluşan *ab-initio* modelinin gerçek uzay projeksiyonu (sol) ve modelleri (sağ)



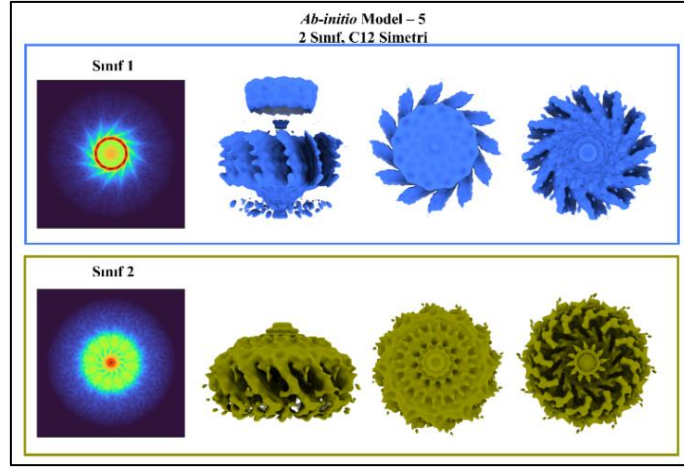
Şekil 4.43. C6 simetrisi ve iki sınıftan oluşan *ab-initio* modelinin gerçek uzay projeksiyonu (sol) ve modelleri (sağ)



Şekil 4.44. C4 simetrisi ve iki sınıftan oluşan *ab-initio* modelinin gerçek uzay projeksiyonu (sol) ve modelleri (sağ)



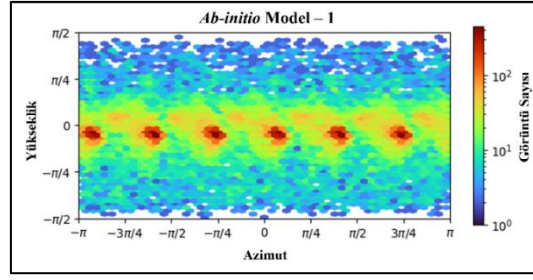
Şekil 4.45. C2 simetrisi ve iki sınıftan oluşan *ab-initio* modelinin gerçek uzay projeksiyonu (sol) ve modelleri (sağ)



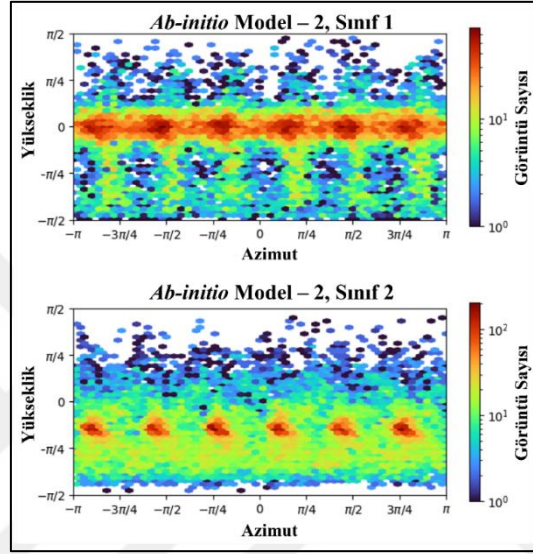
Şekil 4.46. C12 simetrisi ve iki sınıftan oluşan *ab-initio* modelinin gerçek uzay projeksiyonu (sol) ve modelleri (sağ)

Tüm parçacıklar içerisinde şablon görevi göreceği için doğru bir *ab-initio* model elde etmek önemlidir. Ancak, Kriyo-EM ile tekli parçacık görüntü işleme sürecinde, örneklerden elde edilen her bir veri seti kendisine özgü karakteristik özellikler içermektedir. Bu nedenle, haritanın elde edilmesinde kullanılan programlardaki iş akışları genellikle benzer olsa da, her bir iş akışı, örneğe bağlı olarak spesifik “deneme ve yanılma” yöntemi ile geliştirilen basamaklar içermektedir. *Ab-initio* model geliştirme süreci, doğru haritanın elde edilmesinde en önemli basamaklardan biridir; sonraki basamaklar için şablon görevi görmektedir. Bu nedenle farklı parametrelerde yedi ayrı *ab-initio* modelleme işi gerçekleştirildi. Bu denemelerden ilki, daha önce yapılan çalışmalara bağlı olarak seçilen simetri olan C6 ile gerçekleştirilen tek sınıflı bir modeldi (Şekil 4.42).

Başlangıç modellerinin incelenmesi için mesafe dağılım grafikleri ele alındı. Mesafe dağılım grafiği incelendiğinde, tüm açılardan elde edilen görüntülerin dağılımlarının simetri zorlamasına da bağlı olarak altı pik verdiği (kırmızı) görüldü (Şekil 4.47). Model, Şekil 4.42’de verildiği gibi UCSF ChimeraX ile incelendiği zaman, basık ve elips bir yapı ortaya çıkmaktadır. Bunun nedenlerinden biri, bu modelin mikrograflarda çoğunlukta olan FtsH sitoplazmik domaini ele alarak oluşturulmuş olması, diğeri ise, FtsH-HflKC membran protein kompleksinin iç içe geçerek sahip olabileceği farklı bir konformasyonel durum olabilir.



Şekil 4.47. C6 simetrisinde tek sınıf *ab-initio* modelin mesafe dağılım grafiği

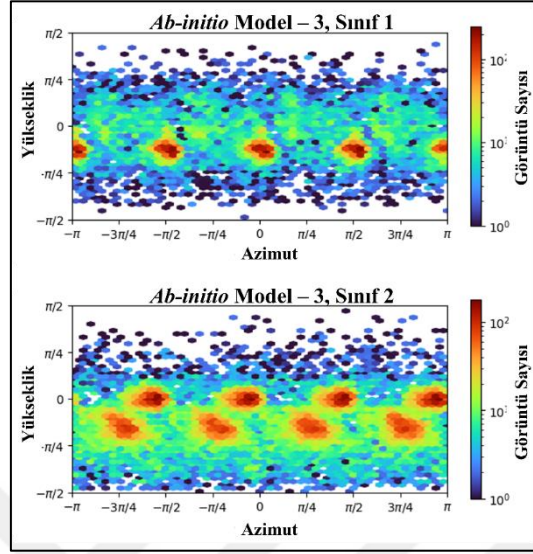


Şekil 4.48. C6 simetrisinde iki sınıf *ab-initio* modelin mesafe dağılım grafiği

İkinci *ab-initio* denemesinde, tekrar C6 simetride oluşturulan iki farklı sınıfın modelleri UCSF ChimeraX'te incelendi (Şekil 4.43). Ancak ikinci sınıfın *ab-initio* model için uygun olmadığı gözlemlendi. Bunun nedeni, ikinci sınıfın mesafe dağılım grafiğinde modelin iki farklı açıdaki görüntü üzerinde yoğunlaşması olarak belirlendi. Birinci sınıfın mesafe dağılım grafiğine bakıldığı zaman ise (Şekil 4.48), hem UCSF ChimeraX'te incelenen yapının iki boyutlu sınıflardaki görüntüsüne benzemesi, hem de mesafe dağılım grafiğinin kesiksiz bir şekilde farklı açılardan görüntüsünün olduğunu göstermesi, bu yapının *ab-initio* modeli olarak kullanılabileceğini işaret etmektedir.

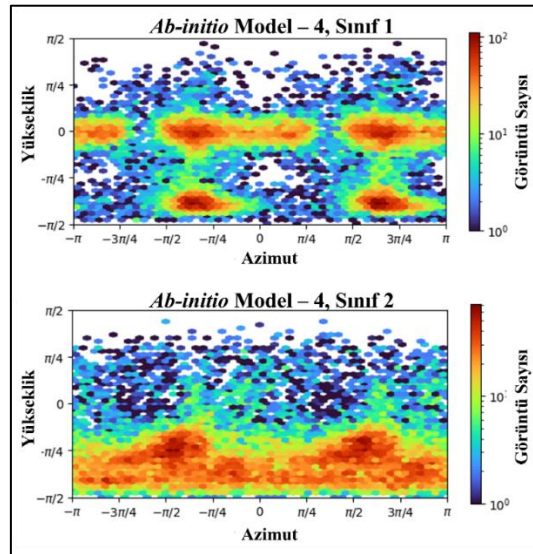
C4 simetrisinde iki sınıf ile gerçekleştirilen üçüncü *ab-initio* denemesi, UCSF ChimeraX'te incelendiğinde uygun bir model oluşturmadığı görüldü (Şekil 4.44). Ma ve diğerlerinin 2022 yılında yaptığı çalışmada, HfIKC'nin şapka kısmı ile omuz kısmının sırası ile C12 ve C4 simetrisinde olduğu gözlemlenmiştir. Ancak bu çalışmada C4 simetrisinde gerçekleştirilen *ab-initio* modelde, şapka kısmın dahil olmak üzere

HfIKC'nin C4 simetrisine uygun olmadığı görüldü. Bu sonucu, mesafe dağılım grafiğinde görülen kesiklilik (kırmızı) de (Şekil 4.49) destekledi.



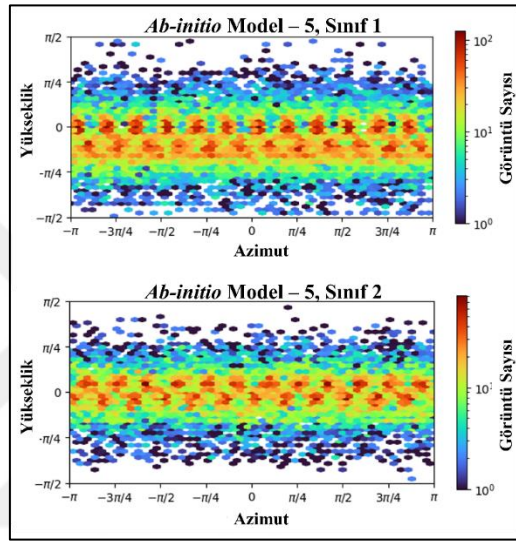
Şekil 4.49. C4 simetrisinde iki sınıf *ab-initio* modelin mesafe dağılım grafiği

C2 ile gerçekleştirilen dördüncü *ab-initio* model denemesinin sonuçları, UCSF ChimeraX'te incelendiğinde (Şekil 4.44), birinci sınıfta HfIKC kısmı görülmekteyken, FtsH net olarak gözükmemekte idi. Benzer şekilde ikinci sınıfın hareketli yapıyı gösterdiği ancak *ab-initio* modeli olarak uygun olmadığı sonucuna varıldı. Mesafe dağılım grafiklerine bakıldığında, bu simetrideki iki sınıfın da *ab-initio* model olarak kullanılamayacağı görüldü (Şekil 4.50).



Şekil 4.50. C2 simetrisinde iki sınıf *ab-initio* modelin mesafe dağılım grafiği

Ma ve diğerleri (2022) tarafından rapor edilen FtsH-HflKC yapısının modellenmesinde kullanılan simetri olan C12 simetrisi ile beşinci *ab-initio* model denemesi gerçekleştirildi. Sonuçlar UCSF ChimeraX'te incelendiğinde ikinci sınıfın model olarak uygun olmadığı ancak birinci sınıfın *ab-initio* model olarak kullanılabileceği düşünülse de, mesafe dağılım grafiklerine bakıldığında kesiklilik gözlemlenmesi ve farklı açılardaki görüntü sayısının diğer modellere kıyasla daha az fit olmuş hali, C12 simetrisinin uygun olmayabileceğini göstermektedir (Şekil 4.51).

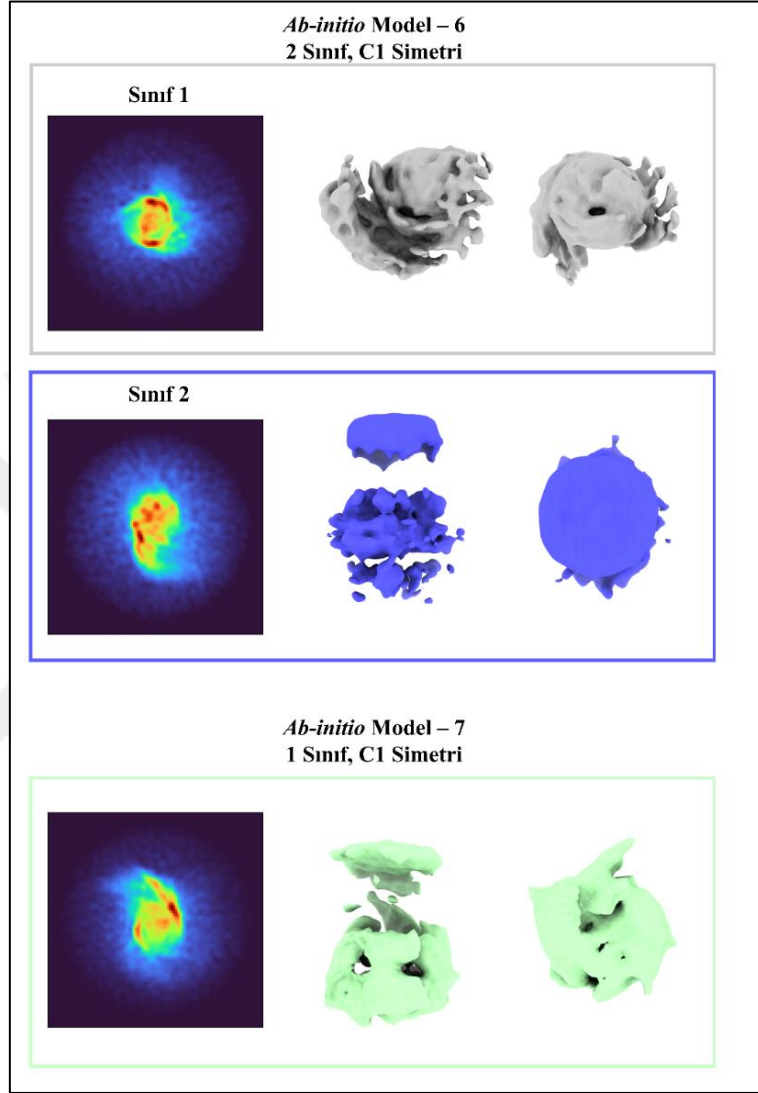


Şekil 4.51. C12 simetrisinde iki sınıf *ab-initio* modelin mesafe dağılım grafiği

Yapısal analizlerde, daha önceki çalışmalara bakılarak üç boyutlu haritanın sahip olacağı simetri hakkında bilgi sahibi olunabilir. Ancak, *ab-initio* modelinde simetriyi zorlamak, üç boyutlu haritanın yanıltıcı olmasına neden olabilir. Bu nedenle, bu çalışmada simetri uygulanmadan (C1) iki sınıflı *ab-initio* modeller de oluşturuldu (Şekil 4.52). Bu süreçte, CryoSPARC'ta bulunan farklı değerler ile parametreler (Stokastik Gradyan İniş (SGD) Momentum ve Seyreklik Önceliği) değiştirilerek bir ve iki sınıflı *ab-initio* modelleri oluşturuldu.

C1 simetrisindeki *ab-initio* modellerinde simetri zorlama süreci (enforce symmetry) olmadığı için düzgün bir yapı ve mesafe dağılım grafiği göstermediği görüldü. Ancak, simetri zorlaması, tekli parçacık görüntü işleme sürecinin ileriki aşamalarında hatalı modele sebep olabileceği düşünülerek, C1 simetride oluşturulan ikinci (*ab-initio* model – 6, sınıf 2) ve C1 (*ab-initio* model – 7) simetrisi ile oluşturulan tek sınıflarla devam edilmesi kararı alındı. Simetri zorlaması olmadığı halde bu modeller, iki boyutlu

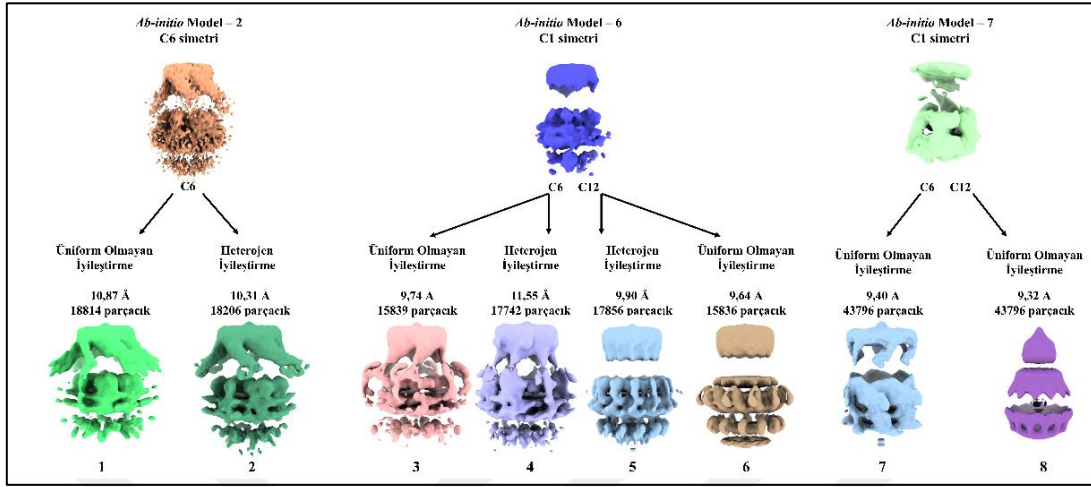
sınıflandırmadaki görüntülere benzerlik göstermekte idi ve bu sayede, başlangıç modelleri ile parçacık görüntü işleme sürecine üniform olmayan iyileştirme ve/veya heterojen iyileştirme işleri ile devam edildi.



Şekil 4.52. C1 simetrisi ile bir ve iki sınıftan oluşan *ab-initio* modellerinin gerçek uzay projeksiyonu (sol) ve modelleri (sağ)

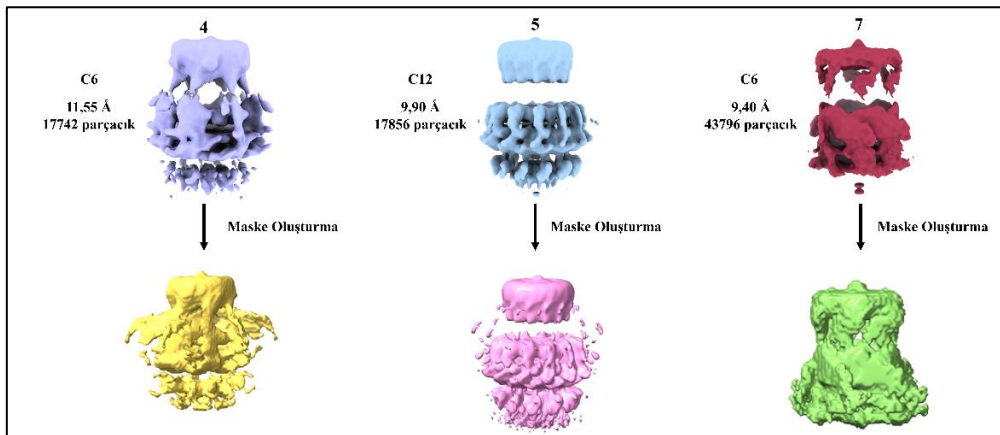
Özetle, ilk olarak tek sınıflı *ab-initio* model denense de, C6 simetriye sahip tek sınıfın kompleks yerine sadece FtsH'i modellediği görüldü. İki sınıflı *ab-initio* model oluşturmanın dinamik yapıda ve heterojen dağılım gösteren FtsH-HflKC membran protein kompleksi parçacıkları için daha doğru sonuç vereceği düşünüldü. Altı farklı *ab-initio* modeli arasından, mesafe dağılım grafiği ve modellere bağlı olarak C6 ve C1 simetriye sahip *ab-initio* modelleri ile görüntü işleme sürecine devam edildi (Şekil 4.53).

C1 simetrideki *ab-initio* modeli, ayrı ayrı hem C6 hem de C12 simetrisinde uniform olmayan ve heterojen iyileştirmeleri gerçekleştirildi.



Şekil 4.53. *Ab-initio* modeller ile farklı simetride gerçekleştirilen uniform olmayan ve heterojen iyileştirme sonuçları

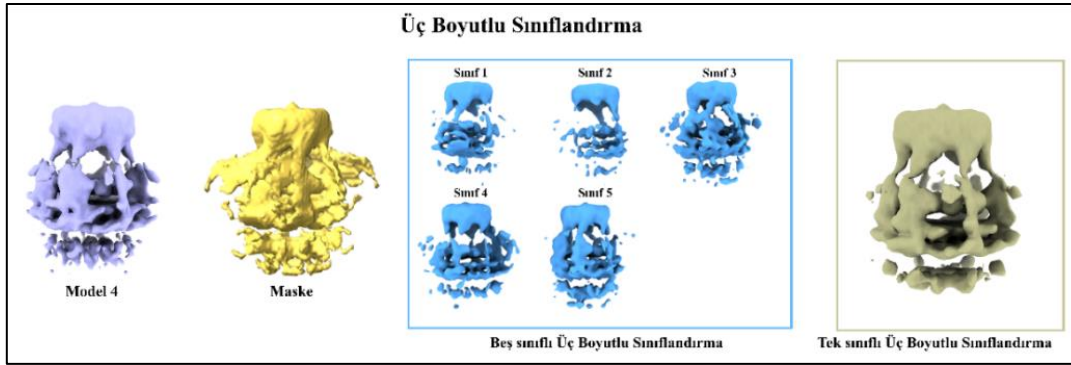
Elde edilen *ab-initio* modelleri arasından, Şekil 4.53'te 4, 5 ve 7 numaralı iyileştirilmiş modeller seçildi ve maske odaklı üç boyutlu sınıflandırma işlemi gerçekleştirildi. Bunun için ilk olarak UCSF ChimeraX programı üzerinde maske oluşturuldu. Her bir modelin yoğunluk haritaları, Segger (Pintilie ve diğ., 2012) aracılığı ile ekstrakt edildi ve CryoSPARC programında içe aktarıldı (Şekil 4.54).



Şekil 4.54. Başlangıç modelleri kullanılarak UCSF ChimeraX – Segger ile oluşturulan maskeler

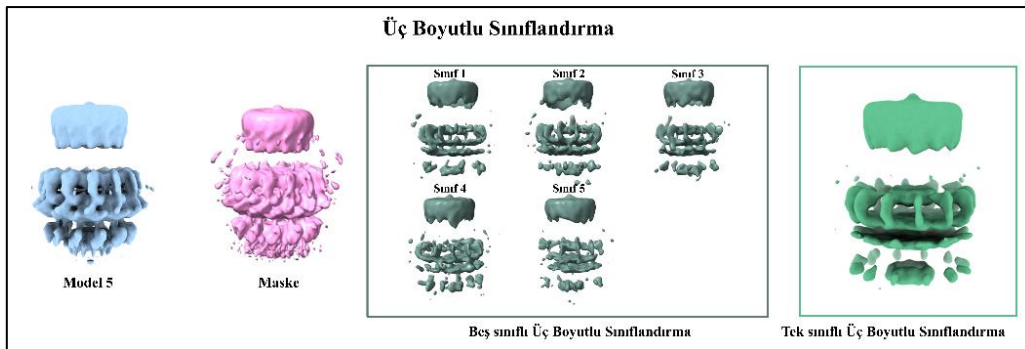
Şekil 4.54'te gösterilen maskeler, odak maskesi olarak kullanıldı, her biri beş sınıftan oluşan Üç Boyutlu Sınıflandırmalar gerçekleştirildi. Şekil 4.54'te 4 numaralı modelden

elde edilen odak maske ile gerçekleştirilen üç boyutlu sınıflandırma sonuçlarında sınıfların hepsi, eksik kısımlar içerdiği görüldü (Şekil 4.55). Bu durum, FtsH-HflKC membran protein kompleksinin dinamik yapısından kaynaklı olabilir. Aynı zamanda tüm sınıflar bir araya getirildiğinde birbirlerinin eksiklerinin tamamlandığı görüldü. Bu nedenle, bu model ile tek sınıflı üç boyutlu sınıflandırma gerçekleştirildi (Şekil 4.55)



Şekil 4.55. Model 4 ve maskesi ile üç boyutlu sınıflandırma sonuçları

Şekil 4.54’te 5 numaralı model ile oluşturulan maske ile C12 simetrisinde gerçekleştirilen üç boyutlu sınıflandırma sonuçlarında da benzer şekilde eksik kısımlar görüldü (Şekil 4.56). Bu nedenle tek sınıflı üç boyutlu sınıflandırma işlemi gerçekleştirildi. Ancak, C12 simetrisinin, HflKC’nin oluşturduğu “şapka” kısmının FtsH ile bağlantı kurmadığı gözlemlendi.

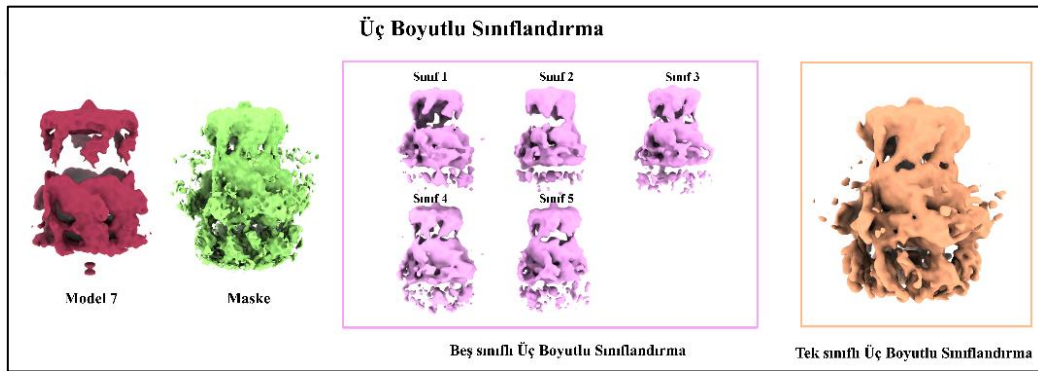


Şekil 4.56. Model 5 ve maskesi ile oluşturulan üç boyutlu sınıflandırma sonuçları

Qiao ve diğerleri (2022) ile Ma ve diğerleri (2022) tarafından yapılan çalışmada heterojen şekilde FtsH’nin bir, iki, üç ve dört tane hekzamerik yapısının HflKC ile kompleks oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada da benzer şekilde bir ve iki tane hekzamerik FtsH’nin HflKC ile kompleks oluşturduğu parçacıklar tespit edildi, ancak hem Doğal Jel ve SAXS deneyleri hem de tek hekzamerik FtsH’nin HflKC ile kompleks oluşturduğu

yapıların İki Boyutlu Sınıflandırma işleminde çoğunlukta olması nedeni ile bir hekzamerik FtsH'nin altı HflK ve altı HflC ile oluşturduğu kompleksin üzerinde durulma kararı alındı. Bu doğrultuda CryoSPARC'ta tekli parçacık görüntü işleme süreci, C6 simetrisi ile

Şekil 4.54'te yedi numaralı model ile oluşturulan maske ile C6 simetrisinde gerçekleştirilen üç boyutlu sınıflandırma sonuçlarında da, diğerlerine benzer şekilde eksik kısımlar görüldü (Şekil 4.57). Bu nedenle üç boyutlu sınıflandırma işlemi, bu model-maske kullanılarak da tek sınıf ile gerçekleştirildi.

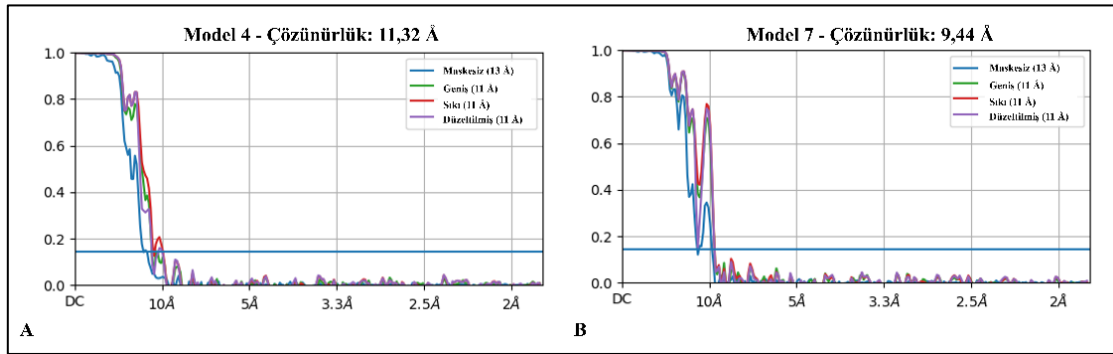


Şekil 4.57. Model 7 ve maskesi ile oluşturulan üç boyutlu sınıflandırma sonuçları

Sınıflandırmalar sonrasında, Model 4 ve 7 üzerinde uniform olmayan iyileştirmeler gerçekleştirildi. Buradan elde edilen Altın-Standart Fourier Kabuk Korelasyonu (GSFSC, Gold-Standard Fourier Shell Correlation) eğrileri, çözünürlük hakkında bilgi edinmek üzere incelendi (Şekil 4.58).

Fourier Kabuk Korelasyonu (FSC) grafiklerinde verilen her bir eğri, dönüşümlere bağlı olarak yapılara uygulanan gerçek uzay maskelerine olan korelasyonlarını göstermektedir. Bu maskeler sayesinde, protein yapısı olmayan sinyallerin, yani gürültülerin ortadan kaldırılması sağlanmaktadır. Geniş maske, protein sinyallerinin etrafını kaplamakta; sıkı maske ise beklenildiği üzere daha dar bir alanı kaplayan sinyallerden oluşmaktadır. Düzeltilmiş maske ise, sıkı maskeyi kullanarak hesaplanan ancak arka plandan gürültünün düzeltilmesi ile elde edilen bir eğridir (Chen ve diğ., 2013). Genellikle yapının çözünürlüğü, düzeltilmiş maskeden gelmektedir. Eğer düzeltilmiş ve sıkı maske arasında fark oluşursa, bu durum UCSF ChimeraX'te oluşturularak programa verilen maskenin model için uygun olmadığı anlamına gelmektedir. Bu noktada, elde edilen grafiklerde

düzeltilmiş ve sıkı maskelerin iki modelden gelen sonuçlarda da birbirleri ile uygun olduğu görüldü. Ancak, Model 7'den gelen üç boyutlu sınıfın üniform olmayan iyileştirme sonucu, Model 4'ten gelene kıyasla daha iyi çözünürlük verdi. Bu nedenle, Model 7'den gelen üç boyutlu sınıfın üniform olmayan iyileştirme sonucu, önce Kontrast Transfer Fonksiyonu İyileştirme işlemine, sonrasında ise İleri İşleme sürecine tabi tutuldu. Böylelikle buradan gelen harita keskinleştirilerek 9,25 Å çözünürlükte elde edildi.

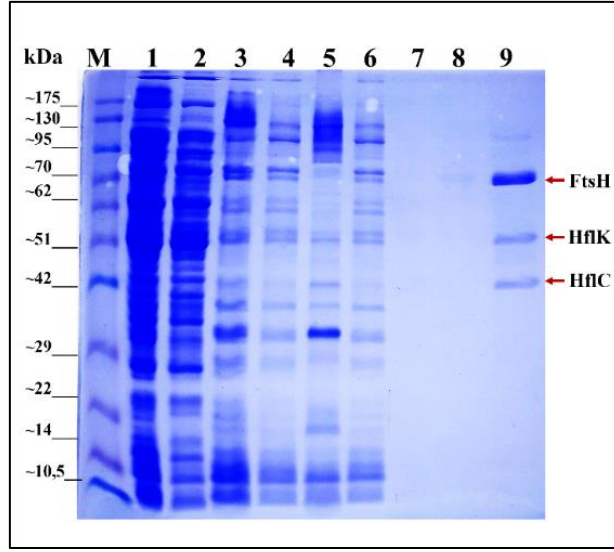


Şekil 4.58. Üniform olmayan iyileştirmelerin GSFSC eğrilerine bağlı çözünürlük grafikleri

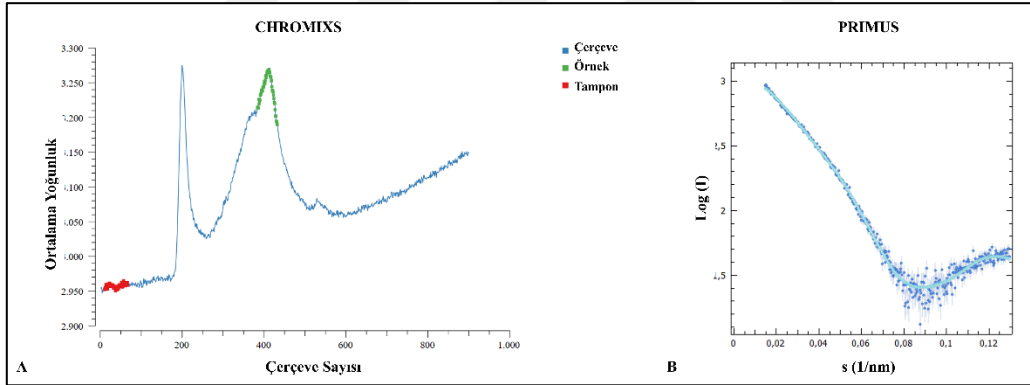
4.5.4. Küçük Açılı X-Işını Saçılım Analizi

Küçük Açılı X-Işını Saçılım (SAXS) deneyleri, Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi ile birleştirilmesi (SEC-SAXS) ile membran proteinlerinin çalışılması oldukça yaygın hale gelmiştir. SAXS deneyleri sayesinde elde edilen veriler, genel parametrelerin ön görülmesini sağlamaktadır (Molodenskiy ve diğ., 2020). Bu doğrultuda, saflaştırılan FtsH-HflKC membran proteininin SEC-SAXS deneyleri yapılmadan önce, SDS-PAGE (%12) analizi gerçekleştirildi (Şekil 4.59). Sonrasında örnek, Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı (European Molecular Biology Laboratory; EMBL, Hamburg), BioSAXS (Turkey-BAG for BioSAXS), PETRA-III P12'ye (Deney Numarası: SAXS-1278) soğuk zincir ile gönderildi ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile entegre edilen bu sistem sayesinde eş zamanlı olarak FtsH-HflKC örneğinin ileri saflaştırması gerçekleştirilirken, X-ışını saçılım verileri toplandı (Şekil 4.60).

Toplanan verilerin incelenmesi (CHROMIXS, Primus) ve bu verilerden *ab-initio* model elde etme süreci (DAMMIF), ATSAS programı kullanılarak gerçekleştirildi (Manalastas-Cantos ve diğ., 2021).



Şekil 4.59. SEC-SAXS analizine gönderilmeden yapılan FtsH-HflKC saflaştırma sonuçlarının SDS-PAGE (%12) analizi (Her bir kuyucuk 30 µg protein içermektedir). M; Markör (ABM, Kanada), 1; Sonikasyon sonrası, 2; Membran Süpernatant, 3; Membran Pelet, 4; Solübilize Süpernatant (DDM), 5; Pelet (DDM), 6; 'Flow Through', 7; Yıkama, 8; Elüsyon, 9; Konsantre Elüsyon

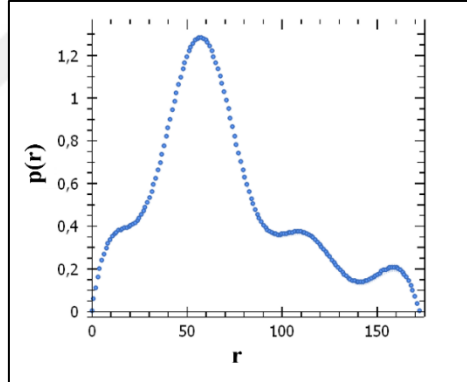


Şekil 4.60. FtsH-HflKC'nin elüsyon profilinin (A) CHROMIXS, (B) Primus grafikleri

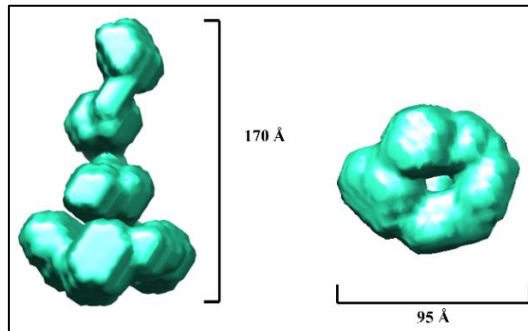
Elüsyon profilinde gözlemlenen iki pik; homojen dağılıma sahip olmadığını gösterdi. Bu durumda, ikinci pikin yaptığı omuz da dahil olarak örneğin iki farklı formunun bulunabileceği düşünüldü. Elüsyon profilinde ilk pikin dönme yarıçapı (R_g) değeri, ATSAS programında Guinier bölgesinin kısa olması nedeni ile (örnekte elde edilen minimum s (1/nm) değeri çok büyük olduğu için) hesaplanamadı. Ancak, ikinci pikten gelen değerler ile makromolekülün R_g değeri, Guinier analizi ile 58,48 olarak bulundu. Proteinin moleküler ağırlığı, sıfır açıda elde edilen saçılım ile R_g değeri arasındaki orantı ile 245 kDa (ATSAS programında hesaplanan %49 olasılık ile) olarak tahmin edildi. Saçılma profilinin üç boyutlu dönüştürülmesi sonucunda, molekülün mesafe dağılımı,

$p(r)$, değeri elde edildi. Svergun ve Koch tarafından 2003 yılında yapılan çalışma, $p(r)$ değerinin r (nm) değerine olan grafiğinin incelenmesi ile parçacık şekli hakkında bilgi sahibi olunabileceğini rapor etmiştir. Buna göre, “halter” benzeri yapılar gösteren makromoleküller, iki pik vermektedir. FtsH-HflKC için verilen $p(r)$ değerinin r (nm)’ye karşı çizilen grafiğine bakıldığında, birbirleri ile eş boyutta olmayan iki pik görülmektedir (Şekil 4.61). Bu, halter benzeri bir yapının bir kısmının diğerine göre daha küçük olabileceği olarak yorumlanabilir.

SAXS veri analizleri takiben DAMMIF kullanılarak gerçekleştirilen *ab-initio* model yapısı, UCSF ChimeraX ile incelendi (Şekil 4.62). Bu sonuca göre, molekülün ortalama konformasyonunu ele alan bu deney sürecinde FtsH’nin HflKC ile kompleks oluşturmadığı halinin baskın olduğu görüldü. Bunun nedeni, FtsH-HflKC’nin dinamik yapısını koruyor olmasından kaynaklı olabileceği gibi, kompleks oluşturmayan FtsH’lerin de heterojen bir şekilde ortamda daha baskın bulunuyor olmasından kaynaklı olabilir.

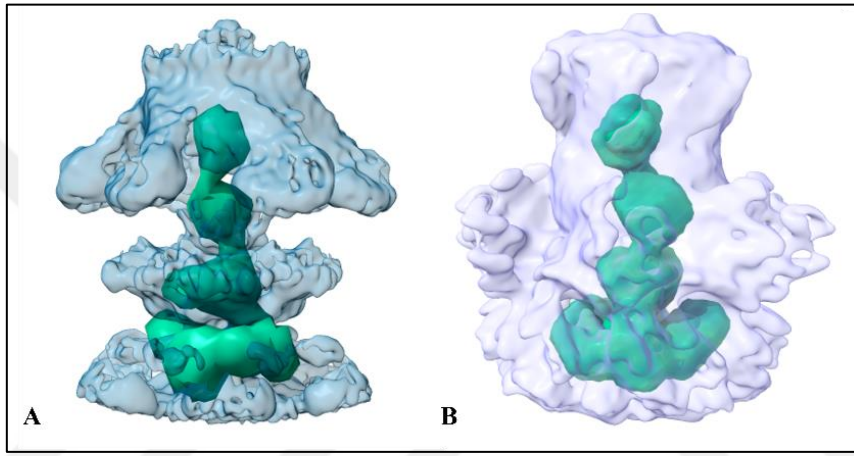


Şekil 4.61. FtsH-HflKC’nin mesafe dağılım fonksiyonu $p(r)$ ’a karşılık gelen r (nm) değerlerinin grafiği



Şekil 4.62. FtsH-HflKC’nin SEC-SAXS sonucundan DAMMIF ile oluşturulan modelin üstten ve alttan görünümü

Aynı zamanda bu model, UCSF ChimeraX kullanılarak Kriyo-EM haritaları ile hizalandı (Şekil 4.63). Hizalama sonucu, SAXS modelinde sadece FtsH'nin bulunduğu doğrular niteliktedir. Ancak, bu sonuçlardan en önemli bulgu, FtsH'nin sitoplazmik domaininin C6 simetrisinde olduğunun SAXS verileri sayesinde doğrulanmış olmasıdır. Yüksek çözünürlük sağlayan tekniklerin, saçılım verileri ile birleştirilmesi aracılığıyla ortaya çıkan bu sonuç, bu ve benzeri hibrit modelleme prosedürlerinin membran proteinleri üzerinde neden bu kadar yaygınlaştığını ortaya çıkartmaktadır (Molodenskiy ve diğ., 2020).

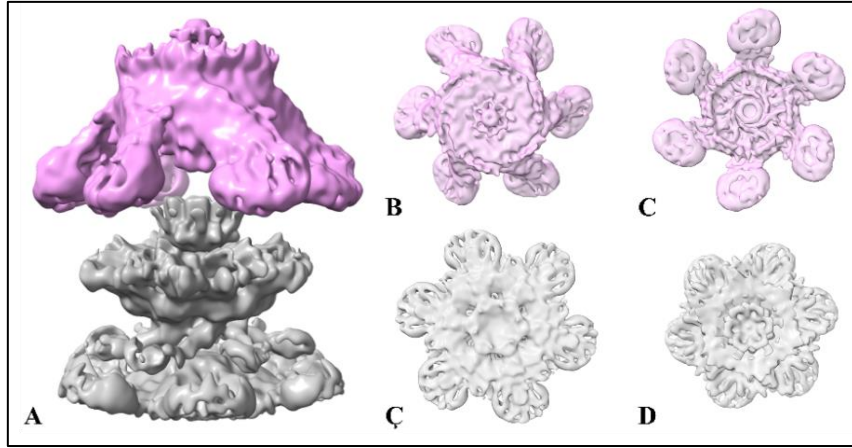


Şekil 4.63. FtsH-HflKC Kriyo-EM haritaları (RELION 4.1 (A), CryoSPARC (B)) ile SAXS (yeşil) hizalama sonucu

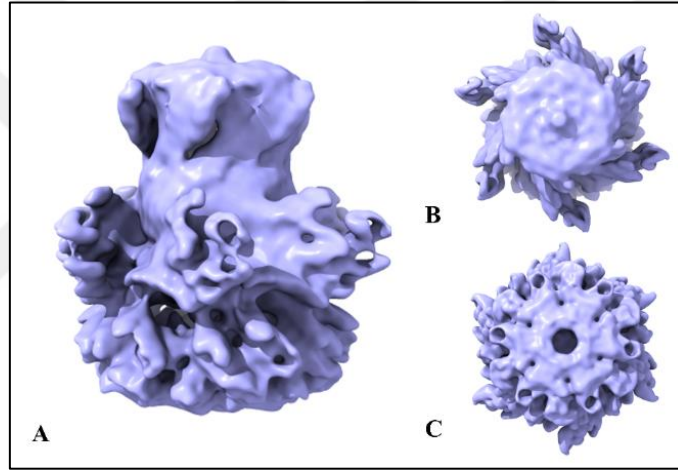
4.6. FtsH-HflKC'nin Yapısal Analizi

FtsH-HflKC membran protein kompleksinin yapısı, hem RELION 4.1 (Scheres, 2012), hem de CryoSPARC (Punjani ve diğ., 2017) programlarında karşılaştırmak üzere C6 simetrisinde elde edildi. RELION 4.1'de FtsH için ayrı, HflKC için ayrı maskeler üzerinden iyileştirmeler gerçekleştirilirken (Şekil 4.64), CryoSPARC'ta kompleks yapısı bir tutuldu (Şekil 4.65).

RELION 4.1 ve CryoSPARC'ta kullanılan *ab-initio* modellerinin değişiklik göstermesinden kaynaklı farklı nihai yapılar elde edilse de iki programın da temel aldığı prensipler benzerdir. Ancak, CryoSPARC'ın sağladığı kullanıcı arayüzü kolaylığı göze çarpmaktadır.



Şekil 4.64. RELION 4.1 ile elde edilen FtsH-HflKC haritasında (A) pembe renk ile gösterilen HflKC'nin üstten (B), alttan (C) ve gri renk ile gösterilen FtsH'nin üstten (Ç), alttan (D) görünümü

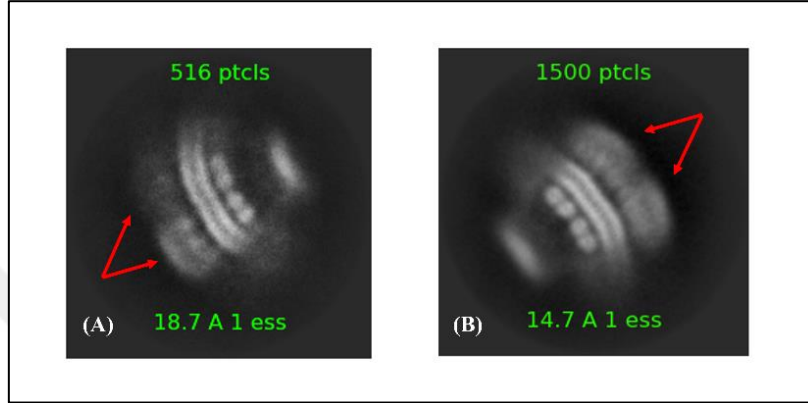


Şekil 4.65. CryoSPARC ile elde edilen (A) FtsH-HflKC haritasında HflKC'nin üstten (B) ve FtsH'nin (C) alttan görünümü

İlk bakışta, FtsH-HflKC membran protein kompleksinin yapısı, HflK ve HflC'nin FtsH'nin sitoplazmik domaini üzerinde substrat erişimini kısıtladığı bir model olarak görülmektedir (Şekil 4.64-65). Bu modelin elde edilme sürecinde, İki Boyutlu Sınıflandırmalardaki birçok sınıf, sadece FtsH veya sadece HflKC parçacıklarını da içermekteydi.

Ma ve diğerleri (2022) ile Qiao ve diğerleri (2022) tarafından yapılan çalışmada, HflKC'nin, dört FtsH hekzameri (sitoplazmik domaini) ile oluşturduğu kompleks nedeni ile dairesel yerine kare şeklinde görüldüğü bulunmuştur ve bu nedenle dört hekzamer FtsH içerecek şekilde parçacıklar seçilmiş, C4 simetrisi kullanılarak iyileştirilmiştir. Bu

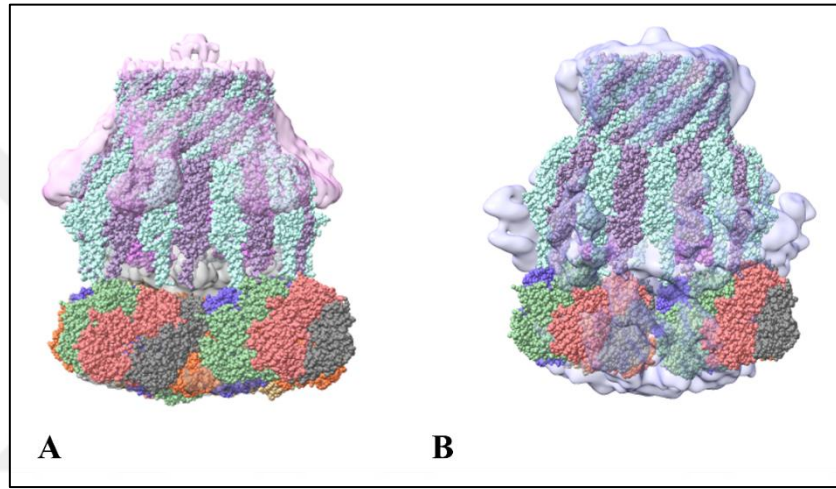
çalışmada ise, iki hegzamerik FtsH içeren kompleksler olduğu gözlemlense de (Şekil 4.66) parçacıkların çoğunlukla tek FtsH hegzameri içerdiği ve HflKC'nin dairesel yapısını da koruduğu görüldü. Bu nedenle RELION 4.1 iyileştirmeler C6 simetride gerçekleştirildi. CryoSPARC'ta C2, C4, C6 ve C12 simetri denemeleri ile iyileştirmeler gerçekleştirilmesine karşın, en iyi çözünürlüğü veren ve SAXS sonucu ile desteklenen C6 simetrisi ile süreç tamamlandı.



Şekil 4.66. İki hegzamerik FtsH içeren iki boyutlu FtsH-HflKC membran kompleks protein sınıfları

Qiao ve diğerleri (2022) tarafından yapılan çalışmada, FtsH-HflKC membran protein kompleksinin dinamik ve esnek yapısını koruduğu bildirilmiştir. Ayrıca, Ma ve diğerleri (2022), FtsH'nin sitozolik kısmının çok esnek olduğunu ve bu neden ile FtsH'yi ancak mutasyon çalışmaları ile stabil hale getirerek yapı analizini gerçekleştirebildiklerini rapor etmiştir. Bu duruma benzer olarak, bu çalışmada da FtsH-HflKC membran protein kompleksinin oldukça dinamik yapıya sahip olduğu üç boyutlu sınıflarda görülmektedir (örneğin Şekil 4.41). Bu nedenle RELION 4.1'de FtsH ve HflKC kısımlarının süreçleri birbirlerinden bağımsız olarak ilerletildi; CryoSPARC programında ise üniform olmayan iyileştirme işlemi tercih edildi. Bu sonuçlara göre, Qiao ve diğerleri (2022) ile Ma ve diğerleri (2022) tarafından yapılan çalışmadaki bulgulardan farklı olarak, hegzamerik FtsH yapısı çoğunlukla dört yerine bir tane; 24-mer HflKC protein kompleks yapısı ise altı HflK, altı HflC olduğu görülmektedir (Şekil 4.67). Ayrıca, Ma ve diğerleri (2022) tarafından yapılan çalışmada, dört hegzamerik FtsH yapısının homojenliğini korumadığını, dört yerine üç, iki ve bir FtsH bulunduran komplekslerin de olduğu bildirilmiştir. Bu heterojenik durumun ve bu çalışma ile karşılaştırıldığında farklı modeller elde edilmesinin nedenlerine, ekspresyon sistemindeki farklılıklar dışında

stabilizasyon için gerçekleştirilen mutasyon çalışmaları da dahil edilebilir. Ayrıca, farklı sayılarda FtsH'nin, HflKC ile kompleks oluşturması; rekombinant üretimdeki aşırı ifade sisteminin yanı sıra, hücrenin ihtiyacı doğrultusunda gerçekleşiyor olabilir. Aynı zamanda bu durum, HflKC'nin oluşturduğu şapka şeklinin sahip olduğu esnekliğin önemini de ortaya çıkartmaktadır: Her bir hekzamerik FtsH için HflKC'nin bulunması, termodinamik açıdan hücre için fazladan enerji harcanması demektir. Dahası, membran gibi kısıtlı bir alanda FtsH'nin bolca bulunabiliyor olmasının; HflKC sayesinde olduğu söylenebilir.



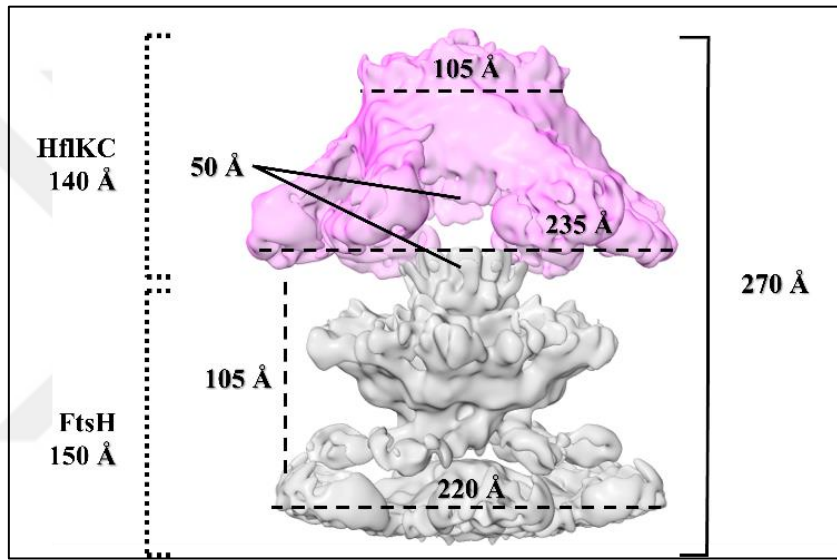
Şekil 4.67. RELION 4.1 (A) ve CryoSPARC (B) ile elde edilen FtsH-HflKC haritasının Qiao ve diğerleri (2020) tarafından elde edilen model (PDB 7WI3, 7WI4) ile hizalama sonucunun yandan görünümü

Bu çalışmada, RELION 4.1 programından elde edilen FtsH-HflKC membran protein kompleks modeli, UCSF ChimeraX'te daha detaylı incelendiğinde FtsH'nin sitoplazmik ve periplazmik domainlerinin toplam 150 Å uzunluğunda olduğu, HflKC'nin ise 140 Å uzunluğunda olduğu görülmektedir (Şekil 4.68-69). CryoSPARC programında ise FtsH'nin sitoplazmik ve periplazmik domainlerinin toplam 150 Å uzunluğunda olduğu, HflKC'nin ise 130 Å uzunluğunda olduğu görülmektedir. Qiao ve diğerleri (2022) tarafından gerçekleştirilen çalışmaya benzer olarak, bu çalışmada da FtsH-HflKC'nin toplam uzunluğu ~27 nm olarak tespit edildi. HflKC'nin oluşturduğu kafes yapısı ile, FtsH'nin sitoplazmik domaini arasında ise ortalama 60 Å açıklık olduğu görüldü.

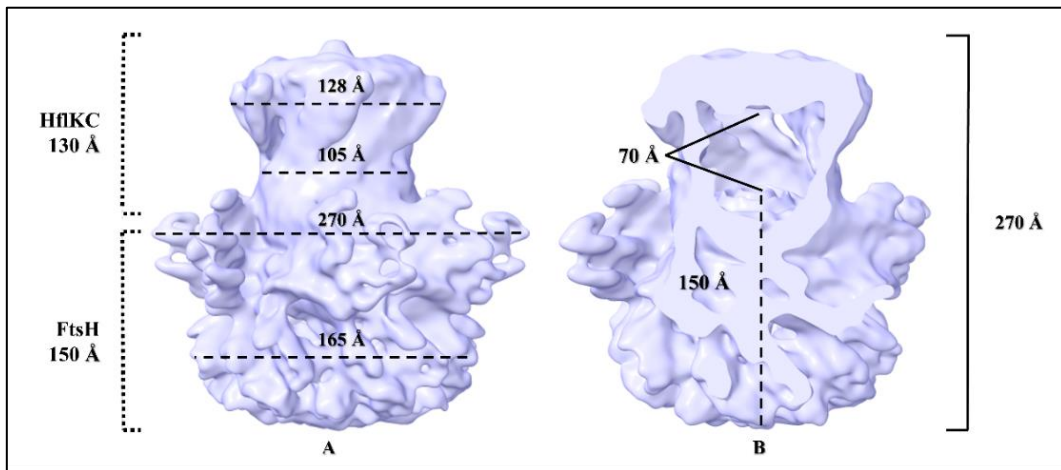
Qiao ve diğerleri, HflKC'nin oluşturduğu şapka yapısının çapının yaklaşık 20 nm olduğunu ve bu boyutun ökaryotik lipid raftlarının boyutu (10 - 200 nm) ile uyumlu

olduğunu rapor etmiştir. Ancak bu çalışmada HflKC'nin çapı yarı yarıya farklılık göstermektedir, yine de bahsedilen lipid raflar ile uyumludur.

CryoSPARC programında elde edilen harita ile diğer çalışmalarla benzer şekilde HflKC'nin oluşturduğu “şapka” yapısının çapı tepeden uca sabit bir model göstermektedir (Qiao ve diğ., 2022; Ma ve diğ., 2022). Ancak, RELION 4.1 ile elde edilen haritada HflKC'nin FtsH ile etkileşime girdiği kısımlara doğru açılarak genişlemektedir. Bu durum, deterjan kaynaklı meydana gelmiş olabileceği gibi, parçacıkların sahip olduğu hareketlilik nedeni ile de olabilir.



Şekil 4.68. RELION 4.1 ile elde edilen FtsH-HflKC haritasında boyut ölçümleri



Şekil 4.69. CryoSPARC ile elde edilen FtsH-HflKC haritasında boyut ölçümleri

HflK ve HflC, Bölüm 2.5'te anlatıldığı üzere tek geçişli ve SPFH domainin üyeleri olan transmembran proteinleridir. Sekansları birbirlerinden oldukça farklı olsa da, yapısal olarak detaylı incelendiğinde, evrimsel süreçte oldukça korunmuş üç boyutlu yapı sergilemektedir (Ma ve diğ., 2022). HflK ve HflC'nin yapısal olarak birbirlerine benzer oldukları, oluşturdukları kompleksin haritasında benzerlik göstermektedir (Şekil 4.64-65).

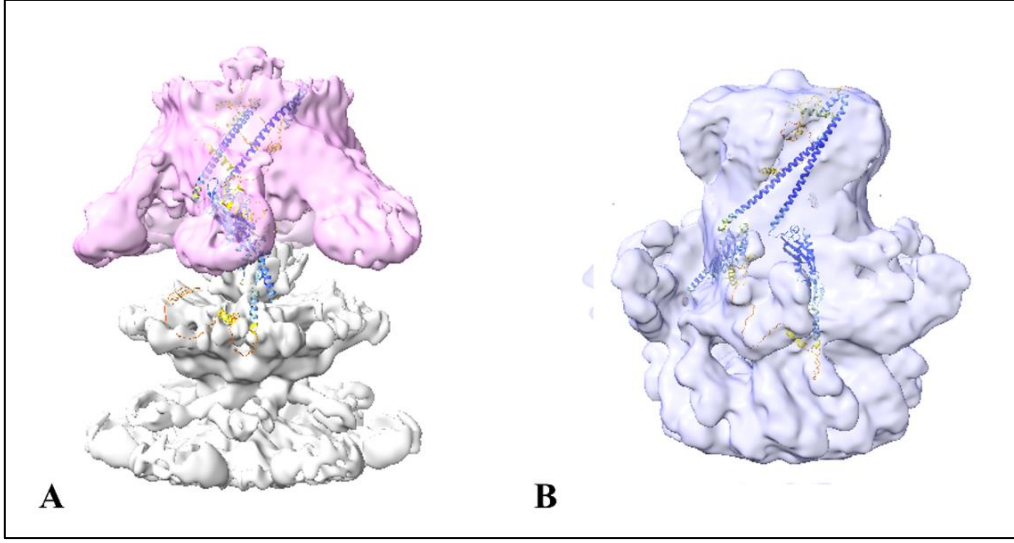
SPFH ailesindeki proteinlerin; membrandaki diğer proteinler için bir “düzenek” oluşturma, lipit türleri ve çeşitli taşıyıcı proteinler ile doğrudan etkileşim halinde olma gibi çeşitli görevleri olduğu düşünülmektedir (Ma ve diğ., 2022). FtsH-HflKC membran protein kompleks yapısına bakıldığında HflKC'nin bu özellikleri sağladığı görülmektedir; FtsH ile kompleks oluşturarak membrandaki lipitler ile direkt etkileşime girmekte ve tepesindeki pordan difüzyon gerçekleşmektedir. Bu çalışma süresince, HflKC membran proteininin tek başına saflaştırılması oldukça zor idi. Aynı zamanda rekombinant *E. coli* FtsH'nin tek başına üretimi ve saflaştırma sonucunun SDS-PAGE'de analizinde HflKC'nin de bağlandığı görüldü. Bu durum, HflKC için FtsH'nin doğal partnerleri olarak yorumlanabilir ve HflKC'nin neden tek başlarına iken kararsız bir yapı göstererek saflaştırma sürecinin zorlu hale geldiğini açıklayabilir.

HflKC'nin yapısı, yapılan diğer çalışmalara benzer olarak bu çalışmada da membran üzerinde bir “şapka” yapısı göstermektedir (Qiao ve diğ., 2022; Ma ve diğ., 2022; Carvalho ve diğ., 2021). HflKC'nin daha önceki topoloji çalışmalarına benzer olarak, bu çalışmada da HflKC, çoğunlukla periplazmada bulunmaktadır (Kihara ve diğ., 1997; Ito ve Akiyama, 2005; Tomoyasu ve diğ., 1993). Ayrıca, HflKC'nin tepe kısmında bulunan porun, FtsH'nin membran ve sitozolik substratlarının tanınmasında rol alabileceği öne sürülmektedir (Qiao ve diğ., 2022; Ma ve diğ., 2022). Benzer şekilde HflKC'nin tepe kısmındaki por, bu çalışmada elde edilen modelde de gözlemlendi (Şekil 4.61). Bahsedilen porun, HflKC'nin FtsH'nin proteolitik aktivitesini negatif düzenlemede substratlar için alternatif bir yolak görevi görebileceği düşünülmektedir. Ancak, HflKC'nin tepe kısmında bahsedilen bu porun, FtsH'nin sitoplazmik kısmına olan uzaklığı göz önüne alındığında (~150 Å) bu alternatif yolağın ihtimali düşmekte; bu alternatif yolağın daha fazla araştırılmaya ihtiyacı olduğu görülmektedir.

Protein yapılarını, amino asit sekanslarından yola çıkarak tahmin edebilen AlphaFold (Jumper ve diğ., 2021) kullanılarak HflK (Uniprot: P0ABC7) ve HflC (Uniprot: P0ABC3) dimerinin öngörülen yapıları, bu çalışmada geliştirilen modele uyum sağlaması için UCSF ChimeraX programı kullanılarak fit edildi. Elde edilen sonuçlara göre, AlphaFold HflKC'nin (Jumper ve diğ., 2021) güven aralığı >%90 olan kısımlarının (mavi renk ile gösterilmiştir) bu çalışmada elde edilen harita ile iyi bir uyum gösterdiğini ifade etmektedir. Diğer renk bölgeleri, farklı güven aralıklarını temsil etmektedir. Örneğin, yeşil renkteki bölgeler %70-90, sarı renkteki bölgeler %50-70 ve kırmızı renkteki bölgeler %0-50 güven aralıklarını belirtmektedir.

HflKC'nin fonksiyonel olarak oluşturdukları kompleks yapısının, ChimeraX aracılığı ile fit sonucunun uyumu, bu yapıda HflKC'nin dimer yapısının kesin olduğunu göstermektedir. Bu dimerin oluşturduğu multimerik form, FtsH membran proteini de dahil edilerek daha ayrıntılı bir şekilde gelecek çalışmalarda analiz edilecektir (Şekil 4.70).

Diğer çalışmaların sonuçlarında elde edilen modellere bakıldığında zaman, FtsH'nin periplazmik domaininin tamamen HflKC içerisinde lokalize olduğu Şekil 4.67'de verilen hizalama sonucundan da görülmektedir (Qiao ve diğ., 2022; Ma ve diğ., 2022). Bu durum, diğer çalışmaların parçacık işleme sürecinde meydana gelen simetri uyumsuzluğunun sebebini açıklamaktadır; FtsH C6, dört FtsH hekzamerini içeride lokalize etmesinden dolayı HflKC ise C4 simetri yapısının uygun olduğu öne sürülmektedir. Ancak, bu çalışmadan elde edilen modelde, tek bir FtsH'nin sitoplazmik kısmının HflKC'nin oluşturduğu şapka formundan açıkta kaldığı görülmektedir. Bu sonuç, Akiyama ve diğerlerinin 1998 yılında yaptığı çalışma ile paralel olarak, FtsH'nin periplazmik kısmının HflKC ile etkileşim için yeterli ve gerekli olduğu sonucunu çıkartmaktadır. Aynı zamanda, FtsH'nin ATPaz aktivitesinin, proteolitik aktivitenin başlangıcı için güç kaynağı olduğu düşünüldüğünde, FtsH'nin HflKC'nin içerisinde gömülü olmasının ATPaz aktivitesini negatif yönde etkileyeceği düşünülebilir. Bu nedenle, FtsH'nin ATPaz aktivitesinin gerçekleştiği sitoplazmik domaininin açıkta kaldığı bir model, bu kompleks için daha olasıdır.



Şekil 4.70. HflKC dimerinin AlphaFold yapılarının, RELION 4.1 (A) ve CryoSPARC (B) haritasına fit ettirme sonucu

Bu çalışmada gerçekleştirilen biyokimyasal karakterizasyonlar ve yapısal analizler, FtsH'nin HflKC sayesinde “seçicilik” kazandığını göstermektedir. Bu sayede FtsH, kusurlu ya da yanlış katlanmış proteinleri, fonksiyonel olan membran proteinlerinden ayırt edebilmektedir. Bu da, FtsH-HflKC membran protein kompleksinin protein kalite kontroldeki rolünü ortaya çıkartmaktadır. SPFH ailesindeki proteinlerden olan HflK ve HflC, stres koşulları altında FtsH'nin düzenlenmesini sağlayacağı için sahip oldukları önem tartışılmazdır. Bu durum, Kohanski ve diğerleri (2008) tarafından yapılan çalışma ile kanıtlanmaktadır; *hflK* ve *hflC* genlerini bulundurmayan hücrelerin, antibiyotiklere karşı daha hassas oldukları tespit edilmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Hücrenin canlılığını tanımlayan mekanizmalarda görevli olan proteinlerin, yanlış katlanmış veya hatalı olanlarını degrade eden FtsH, kalite kontrolden sorumlu bir metalloproteazdır. HflK ve HflC membran proteinleri ise, adeta FtsH'nin mikrokompartmentları gibi görev üstelenerek, proteolitik aktivitenin regülasyonunu sağlamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, bu çalışmadaki bulgular ile benzer şekilde HflK ve HflC membran proteinlerinin FtsH'nin proteolitik aktivitesini inhibe ettiğini göstermektedir.

FtsH-HflKC membran protein kompleksinin tek bir plazmit üzerinde rekombinant üretimi ve saflaştırılmasının optimize edilmesi ile kompleks yapısı, Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi ve Çapraz Bağlama Kütle Spektrometresi ile doğrulandı. Sonrasında analiz süreçleri biyokimyasal ve yapısal olarak iki aşamada gerçekleştirildi. Bu doğrultuda rekombinant olarak ayrıca üretilen FtsH de biyokimyasal karakterizasyon sürecine dahil edildi. ATPaz aktivitesinde 2 μ M FtsH ve FtsH-HflKC'nin 10 mM ATP varlığında spesifik aktiviteleri sırası ile 9,97 U/mg ve 2,85 U/mg olarak; K_m değerleri sırası ile 2,79 mM ve 2,33 mM ve V_{max} değerleri sırası ile 0,242 min^{-1} ve 0,203 min^{-1} olarak hesaplandı. Sonuçlar, FtsH-HflKC'nin FtsH'ye göre daha yüksek afiniteye sahip olduğunu gösterdi. %0,4 kazein kullanılarak gerçekleştirilen proteolitik aktivite sonuçları için bağıl aktivite hesaplamaları gerçekleştirildi. 37 °C'de ATP yokluğunda FtsH'nin bağıl aktivitesi %100 olarak ele alındı ve buna göre FtsH'nin ATP varlığında bağıl aktivitesi %90 olarak hesaplandı. FtsH, HflKC ile kompleks oluşturduğunda 37 °C'de ATP varlığında ve yokluğunda bağıl proteolitik aktivitesi sırasıyla %39 ve %40 olarak belirlendi. Bu sonuçlar, 50 °C'de gerçekleştirilen proteolitik ölçümlerin bağıl aktivite değerleri ile benzerlik göstermektedir. Aynı zamanda bu veriler, substrat sayısı açısından geniş yelpazeye sahip FtsH'nin proteolitik aktivitesinin HflKC tarafından tamamen inhibe edilmediğini, ancak negatif yönde etkilendiğini ortaya çıkartarak, substratça zengin FtsH'nin HflKC sayesinde seçicilik kazandığını vurgulamaktadır.

TEM, SAXS ve Kriyo-EM ile yapılan yapısal analizler, bu kompleksin C6 simetrisine sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Yaklaşık 27 nm boyutunda olan FtsH-HflKC haritasının Kriyo-EM ile toplanan mikrografların hem RELION 4.1, hem de CryoSPARC üzerinde işlenerek elde edilmesi, membran proteinlerinin kristalleşmesini zorlaştıran

deterjan gibi faktörlerin etkilerini azaltarak bir avantaj sağlamaktadır. Küçük açılı X-ışını saçılım verilerinin sağladığı avantaj sayesinde, diğer çalışmalarda farklı plazmitler üzerinde ifadesi gerçekleştirilen, saflaştırılan ve daha sonra bir araya getirilerek kompleks oluşturulan FtsH-HflKC yapılarına göre (Ma ve diğ., 2022; Qiao ve diğ., 2022) fizyolojik olarak doğal haline daha yakın bir harita elde edildiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma; protein kalite kontrolünde FtsH'nin HflKC sayesinde kazanmış olduğu proteolitik aktivitede substrat seçiciliğine dair moleküler ve biyokimyasal bakış açısı kazandırmaktadır. İleri çalışmalar, FtsH ve HflKC üzerinde nokta mutasyonları ile daha detaylı analizler sağlayarak, mekanizmanın tam olarak aydınlatılmasını sağlayacaktır. Aynı zamanda FtsH-HflKC'nin multimerik yapısı, AlphaFold aracılığı ile oluşturularak bu çalışmada elde edilen harita üzerinde açığa çıkartılacaktır. Ek olarak, bu çalışmada elde edilen mikrograflar, ileriki çalışmalarda da çeşitli iş akışları oluşturularak işlenecek, farkların belirginleşmesi sağlanacaktır.

FtsH-HflKC ile ilgili bu çalışma da dahil olmak üzere tüm çalışmalar, bu kompleks membran proteininin biyokimyasal ve yapısal karakterizasyon süreçlerinin zorluğunu ortaya çıkartmıştır. Ancak, bu zorluklar, optimizasyon deneyleri ve Kriyo-EM tekniği sayesinde aşılması imkansız değildir. Bu çalışma, yapısal biyoloji alanındaki ilerlemelerin, FtsH-HflKC'nin mekanizmasının daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacağını ve antibiyotik direnciyle mücadelede yeni yaklaşımların geliştirilmesine olanak tanıyacağını göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Akiyama, Y. (1999). Self-Processing of FtsH and Its Implication for the Cleavage Specificity of This Protease. *Biochemistry*, 38, 11693–11699.
- Akiyama, Y. (2009). Quality control of cytoplasmic membrane proteins in *Escherichia coli*. *Journal of Biochemistry*, 146, 449–454.
- Akiyama, Y., Kihara, A., Mori, H., Ogura, T., Ito, K. (1998). The short periplasmic domain between the transmembrane segments of FtsH is essential for the interaction with the periplasmically exposed HflKC complex. *J Biol Chem*, 273, 22326–22333.
- Akiyama, Y., Kihara, A., Tokuda, H., Ito, K. (1996). FtsH (HflB) is an ATP-dependent protease selectively acting on SecY and some other membrane proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 31196–201.
- Akiyama, Y., Yoshihisa, T., Ito, K. (1995). FtsH, a membrane-bound ATPase, forms a complex in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 23485–23490.
- Akkulak, H. (2023). Çapraz bağlama kütle spektrometresi kullanılarak ftsh komplekslerinin yapısal proteomüğü. Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 822920.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J. (2002). Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; Chapter 10, Membrane Structure.
- Almeida, J. G., Preto, A. J., Koukos, P. I., Bonvin, A. M. J. J., Moreira I. S. (2017). Membrane proteins structures: A review on computational modeling tool. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1859, 2021–2039.
- Alvira, S., Watkins. D. W., Troman, L., Allen, W. J., Lorrinan, J. S., Degliesposti, G., Cohen, E. J., Beeby, M., Daum, B., Gold, V. A., Skehel, J. M., Collinson, I. (2020). Inter-membrane association of the Sec and BAM translocons for bacterial outer-membrane biogenesis. *Elife*, 9:e60669.
- Angelini, S., Deitermann, S., and Koch, H. G. (2005). FtsY, the bacterial signal-recognition particle receptor, interacts functionally and physically with the SecYEG translocon. *EMBO Rep.*, 6, 476–481.
- Arends, J., Thomanek, N., Kuhlmann, K., Marcus, K., Narberhaus, F. (2016). In vivo trapping of FtsH substrates by label-free quantitative proteomics. *Proteomics*, 16, 3161–3172.
- Asahara, Y., Atsuta, K., Motohashi, K., Taguchi, H., Yohda, M., Yoshida, M. (2000). FtsH recognizes proteins with unfolded structure and hydrolyzes the carboxyl side of hydrophobic residues. *Journal of Biochemistry*, 127, 931–7.

- Babst, M. (2014). Quality control at the plasma membrane: One mechanism does not fit all. *Journal of Cell Biology*, 205, 11–20.
- Balch, W. E., Morimoto, R. I., Dillin, A., Kelly, J. W. (2008). Adapting Proteostasis for Disease. *Intervention. Science*, 319, 916–919.
- Balchin, D., Hayer-Hartl, M., Hartl, F. U. (2016). In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science*. 1;353, 6294.
- Banuett, F., Herskowitz, I. (1987). Identification of polypeptides encoded by an *Escherichia coli* locus (hflA) that governs the lysis-lysogeny decision of bacteriophage lambda. *J. Bacteriol.*, 169, 4076–4085
- Beck, K., Eisner, G., Trescher, D., Dalbey, R. E., Brunner, J., Müller, M. (2001). YidC, an assembly site for polytopic *Escherichia coli* membrane proteins located in immediate proximity to the SecYE translocon and lipids. *EMBO Rep.*, 2(8):709-714.
- Bieniossek, C., Nie, Y., Frey, D., Olieric, N., Schaffitzel, C., Collinson, I., Romier, C., Berger, P., Richmond, T. J., Steinmetz, M. O., Berger, I. (2009). Automated unrestricted multigene recombineering for multiprotein complex production. *Nature Methods* 6: 447-450.
- Bieniossek, C., Niederhauser, B., Baumann, U. M. (2009). The crystal structure of apoFtsH reveals domain movements necessary for substrate unfolding and translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, 106, 21579–21584.
- Bieniossek, C., Schalch, T., Bumann, M., Meister, M., Meier, R., Baumann, U. (2006). The molecular architecture of the metalloprotease FtsH. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, 103, 3066–3071.
- Birch, J. (2020). Changes in Membrane Protein Structural Biology. *Biology*, 9.
- Bittner, L. M., Arends, J., Narberhaus, F. (2016). Mini review: ATP-dependent proteases in bacteria. *Biopolymers.*, 105, 505–517.
- Bittner, L. M., Arends, J., Narberhaus, F. (2017). When, how and why? Regulated proteolysis by the essential FtsH protease in *Escherichia coli*. *Biological Chemistry*, 398, 625–635.
- Bittner, L. M., Westphal, K., and Narberhaus, F. (2015). Conditional proteolysis of the membrane protein YfgM by the FtsH protease depends on a novel N-terminal degron. *J. Biol. Chem.*, 290, 19367–19378.
- Blanchet, C. E., Spilotros, A., Schwemmer, F., Graewert, M. A., Kikhney, A., Jeffries, C. M., Franke, D., Mark, D., Zengerle, R., Cipriani, F., Fiedler, S., Roessle, M., Svergun, D. I. (2015). Versatile sample environments and automation for biological

solution X-ray scattering experiments at the P12 beamline (PETRA III, DESY). *Journal of Applied Crystallography*, 48(2), 431–443.

- Blanco, A., Blanco, G. (2017). Posttranslational Protein Modifications in Medical Biochemistry. *Academic Press*, 535–545.
- Bramkamp., M., Lopez, D. (2015). Exploring the existence of lipid rafts in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 79(1), 81-100.
- Browman, D. T., Hoegg, M. B., Robbins, S. M. (2007). The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. *Trends Cell Biol.*, 17(8), 394-402.
- Bruckner, R. L, Robert C., Paul, L. (2003). Coupled Kinetics of ATP and Peptide Hydrolysis by *Escherichia coli* FtsH Protease. *Biochemistry*. 42, 10843–10852.
- Carpenter, E. P., Beis, K., Cameron, A. D., Iwata, S. (2008). Overcoming the challenges of membrane protein crystallography. *Curr Opin Struct Biol.*, 18(5), 581-6.
- Carvalho, V., Prabudiansyah, I., Kovacik, L., Chami, M., Kieffer, R., van der Valk, R., de Lange, N., Engel, A., Aubin-Tam, M. E. (2020). The cytoplasmic domain of the AAA+ protease FtsH is tilted with respect to the membrane to facilitate substrate entry. *Journal of Biological Chemistry*, 296.
- Chae. P. S., Rasmussen, S. G., Rana, R. R., Gotfryd, K., Chandra, R., Goren, M. A., Kruse, A. C., Nurva, S., Loland, C. J., Pierre, Y., Drew, D., Popot, J. L., Picot, D., Fox, B.G., Guan, L., Gether, U., Byrne, B., Kobilka, B., Gellman, S. H. (2010). Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins. *Nat Methods.*, 7(12):1003-8.
- Chen, S., McMullan, G., Faruqi, A. R., Murshudov, G. N., Short, J. M., Scheres, S. H., Henderson, R. (2013). High-resolution noise substitution to measure overfitting and validate resolution in 3D structure determination by single particle electron cryomicroscopy. *Ultramicroscopy*, 135:24-35.
- Chiba, S., Akiyama, Y., Ito, K. (2002). Membrane protein degradation by FtsH can be initiated from either end. *Journal of Bacteriology.*, 184, 4775–82.
- Chiti, F., Dobson, C. M. (2006). Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annu. Rev. Biochem.*, 75, 333–366.
- Craig, A. F. (2016). Tuning the size of styrene-maleic acid copolymer-lipid nanoparticles (SMALPs) using RAFT polymerization for biophysical studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1858, 2931–2939.
- Dalal, K., Nguyen, N., Alami, M., Tan, J., Moraes, T. F., Lee, W. C. (2009). Structure, binding, and activity of Syd, a SecY-interacting protein. *J. Biol. Chem.*, 284, 7897–7902.

- Dalbey, R. E., Kuhn, A. (2012). Protein Traffic in Gram-negative bacteria – how exported and secreted proteins find their way. *FEMS Microbiology Reviews*, 36, 1023–1045.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K. (1985). Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3Å resolution. *Nature*, 318, 618–624.
- Dempwolff, F., Wischhusen, H. M., Specht, M., Graumann, P. L. (2012). The deletion of bacterial dynamin and flotillin genes results in pleiotrophic effects on cell division, cell growth and in cell shape maintenance. *BMC Microbiol.*, 12, 298.
- Denks, K., Vogt, A., Sachelaru, I., Petriman, N. A., Kudva, R., Koch, H. G. (2014). The Sec translocon mediated protein transport in prokaryotes and eukaryotes. *Mol. Membr. Biol.*, 31, 58–84.
- Driessen, A. J., Nouwen, N. (2008). Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu. Rev. Biochem.*, 77, 643–667.
- Fernandez-Leiro, R., Scheres, S. H. W. (2016). Unravelling biological macromolecules with cryo-electron microscopy, *Nature*, 537, 339–346.
- Frieri, M., Kumar, K., Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*, 10, 369–378.
- Garavito, R. M., Ferguson-Miller, S. (2001). Detergents as tools in membrane biochemistry. *J Biol Chem.*, 31;276(35):32403-6.
- Goldberg, A. L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature.*, 426(6968):895-9.
- Gordon, E., Horsefield, R., Herman, G.P., Swarts, J., de Pont H. H. M., Neutze, R., Snijder, A. (2008). Effective high-throughput overproduction of membrane proteins in *Escherichia coli*, *Protein Expression and Purification*, 62(1).
- Gregersen, N., Bross, P., Vang, S., Christensen, J. H. (2006). Protein misfolding and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.*, 7, 103-24.
- Grisshammer, R. (2006). Understanding recombinant expression of membrane proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17, 337–340.
- Gu, S. Q., Peske, F., Wieden, H. J., Rodnina, M. V., Wintermeyer, W. (2003). The signal recognition particle binds to protein L23 at the peptide exit of the *Escherichia coli* ribosome. *RNA*, 9, 566–573.
- Halic, M., Becker, T., Pool, M. R., Spahn, C. M., Grassucci, R. A., Frank, J. (2004). Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation-arrested ribosome. *Nature*, 427, 808–814.

- Hammel, M., Rosenberg D. J., Bierma J., Hura G. L., Thapar, R., Lees-Miller S. P., Tainer J. A. (2021). Visualizing functional dynamicity in the DNA-dependent protein kinase holoenzyme DNA-PK complex by integrating SAXS with cryo-EM. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 163, 74–86.
- Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381, 571–580.
- Hartl, F. U., Lecker, S., Schiebel, E., Hendrick, J. P., Wickner, W. (1990). The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *E. coli* plasma membrane. *Cell* 63, 269–279.
- He, S., Scheres, S. H. W. (2017). Helical reconstruction in RELION. *Journal of Structural Biology*, 198, 163–176.
- Hegde, R. S., Bernstein, H. D. (2006). The surprising complexity of signal sequences. *Trends Biochem. Sci.*, 31, 563–571.
- Herman, C., Ogura, T., Tomoyasu, T., Hiraga, S., Akiyama, Y., Ito, K., Thomas, R., D'Ari, R., Boulloc, P. (1993). Cell growth and lambda phage development controlled by the same essential *Escherichia coli* gene, *ftsH/hflB*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, 90,10861.
- Herman, C., Thévenet, D., Boulloc, P., Walker, G.C., D'Ari, R. (1998). Degradation of carboxy-terminal-tagged cytoplasmic proteins by the *Escherichia coli* protease HflB (FtsH). *Genes Dev.*, 12, 1348–1355.
- Herman, C., Thévenet, D., D'Ari, R., Boulloc, P. (1997). The HflB protease of *Escherichia coli* degrades its inhibitor lambda cIII. *Journal of Bacteriology.*, 179, 358–63.
- Hinderhofer, M., Walker, C. A., Friemel, A., Stuermer, C. A. O., Möller, H. M., Reuter, A. (2009). Evolution of prokaryotic SPFH proteins. *BMC Evol Biol.*, 9, 22.
- Hipp, M. S., Kasturi, P., Hartl, F. U. (2019). The proteostasis network and its decline in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 7, 421-435.
- Houben, E. N., ten Hagen-Jongman, C. M., Brunner, J., Oudega, B., Luirink, J. (2004). The two membrane segments of leader peptidase partition one by one into the lipid bilayer via a Sec/YidC interface. *EMBO Rep.* 5, 970–975.doi: 10.1038/sj.embor.7400261
- Huber, D., Boy, D., Xia, Y., Olma, M. H., Gerstein, M., and Beckwith, J. (2005). Use of thioredoxin as a reporter to identify a subset of *Escherichia coli* signal sequences that promote signal recognition particle-dependent translocation. *J. Bacteriol.*, 187, 2983–2991.
- Ito, K., Akiyama, Y. (2005). Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *Annu. Rev. Microbiol.*, 59, 211–231.

- Izard, J. W., Kendall, D. A. (1994). Signal peptides: exquisitely designed transport promoters. *Mol. Microbiol.*, 13, 765–773.
- Janska, H., Kwasniak, M., and Szczepanowska, J. (2013). Protein quality control in organelles – AAA/FtsH story. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 381–387.
- Jauss, B., Petriman, N. A., Drepper, F., Franz, L., Sachelaru, I., Welte, T. (2019). Non-competitive binding of PpiD and YidC to the SecYEG translocon expands the global view on the SecYEG interactome in *E. coli*. *J. Biol. Chem.*, 294, 19167–19183.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589.
- Kalipatnapu, S., Chattopadhyay, A. (2005). Membrane Protein Solubilization: Recent Advances and Challenges in Solubilization of Serotonin1A Receptors. *IUBMB Life*, 57, 505–512.
- Kang, S. H., Bak, A., Kim, O.-K., Folimonova, S. Y. (2015). Membrane association of a nonconserved viral protein confers virus ability to extend its host range. *Virology*, 482, 208–217.
- Kato, Y., Sakamoto, W. (2018). FtsH Protease in the Thylakoid Membrane: Physiological Functions and the Regulation of Protease Activity. *Front Plant Sci.*, 9, 855.
- Katz, C., Ron, E. Z. (2008). Dual role of FtsH in regulating lipopolysaccharide biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 190, 7117–7122.
- Keller, R., de Keyser, J., Driessen, A. J., Palmer, T. (2012). Co-operation between different targeting pathways during integration of a membrane protein. *J. Cell Biol.*, 199, 303–315.
- Kiefer, H. (2003). In vitro folding of α -helical membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1610, 57–62.
- Kihara, A, Ito, K. (1998). Translocation, folding, and stability of the HflKC complex with signal anchor topogenic sequences. *J Biol Chem.*, 273(45):29770-5.
- Kihara, A., Akiyama, Y., and Ito, K. (1996). A protease complex in the *Escherichia coli* plasma membrane: HflKC (HflA) forms a complex with FtsH (HflB), regulating its proteolytic activity against SecY. *EMBO J.*, 15, 6122–6131.
- Kihara, A., Akiyama, Y., Ito, K. (2001). Revisiting the lysogenization control of bacteriophage λ . Identification and characterization of a new host component, HflD. *J. Biol. Chem.*, 276, 13695–13700.

- Kihara, A., Akiyama, Y., Ito, K. (1997). Host regulation of lysogenic decision in bacteriophage lambda: transmembrane modulation of FtsH (HflB), the cII degrading protease, by HflKC (HflA). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94, 5544–5549.
- Kihara, A., Akiyama, Y., Ito, K. (1998). Different pathways for protein degradation by the FtsH/HflKC membrane-embedded protease complex: an implication from the interference by a mutant form of a new substrate protein, YccA. *Journal of Molecular Biology.*, 279, 175–188.
- Kim, S. H., Kang, G. B., Song, H. E., Park, S. J., Bea, M. H., Eom, S. H. (2008). Structural studies on *Helicobacter pylori* ATP-dependent protease, FtsH. *Journal of Synchrotron Radiation.*, 15, 208–10.
- Knyazev, D. G., Kuttner, R., Zimmermann, M., Sobakinskaya, E., Pohl, P. (2018). Driving forces of translocation through bacterial translocon SecYEG. *J. Membr. Biol.* 251, 329–343.
- Koch, H. G., Moser, M., Muller, M. (2003). Signal recognition particle-dependent protein targeting, universal to all kingdoms of life. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 146, 55–94.
- Koga, H., Kaushik, S., Cuervo, A. M. (2010). Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion. *FASEB J.*, 24(8):3052-3065.
- Koga, H., Kaushik, S., Cuervo, A. M. (2011). Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. *Ageing Research Reviews*, 10, 205–215.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Wierzbowski, J., Cottarel, G., Collins, J. J. (2008). Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell*, 135, 679–690.
- Komar, J., Alvira, S., Schulze, R. J. (2016). Membrane protein insertion and assembly by the bacterial holo-translocon SecYEG-SecDF-YajC-YidC. *Biochem J.*, 473(19):3341-3354.
- Korepanova, A., Gao, F. P., Hua, Y., Qin, H., Nakamoto, R. K., Cross, T. A. (2005). Cloning and expression of multiple integral membrane proteins from *Mycobacterium tuberculosis* in *Escherichia coli*. *Protein Sci.*, 14, 148–158.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol.*, 19;305(3):567-80.
- Krzywda, S., Brzozowski, A. M., Verma, C., Karata, K., Ogura, T., Wilkinson, A. J. (2002). The crystal structure of the AAA domain of the ATP-dependent protease FtsH of *Escherichia coli* at 1.5 Å resolution. *Structure.*, 10(8):1073-83.

- Kudva, R., Denks, K., Kuhn, P., Vogt, A., Muller, M., Koch, H. G. (2013). Protein translocation across the inner membrane of Gram-negative bacteria: the Sec and Tat dependent protein transport pathways. *Res. Microbiol.*, 164, 505–534.
- Kuhn, A., Koch, H. G., Dalbey, R. E. (2017). Targeting and Insertion of Membrane Proteins. *EcoSal Plus*, 7(2).
- Kühlbrandt, W. (2014). Biochemistry. The resolution revolution. *Science* 343: 1443–1444.
- Langhorst, M. F., Reuter, A., Stuermer, C. A. (2005). Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. *Cell Mol Life Sci.*, 62(19-20):2228-40.
- Langklotz, S., Baumann, U., Narberhaus, F. (2012). Structure and function of the bacterial AAA protease FtsH. *Biochim. Biophys. Acta*, 1823, 40–48.
- Leffers, G. G., Gottesman, S. (1998). Lambda Xis degradation in vivo by Lon and FtsH. *J. Bacteriol.*, 180, 1573–1577.
- López-Otín, C., Bond, J. S. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem.*, 283(45):30433-7.
- Ma, C., Wang, C., Luo, D., Yan, L., Yang, W., Li, N., Gao, N. (2022). Structural insights into the membrane microdomain organization by SPFH family proteins. *Cell Res.* 32(2):176-189.
- Manalastas-Cantos, K., Konarev, P. V., Hajizadeh, N. R., Kikhney, A. G., Petoukhov, M. V., Molodenskiy, D. S., Panjkovich, A., Mertens, H. D. T., Gruzinov, A., Borges, C., Jeffries, C. M., Svergun, D. I., Franke, D. (2021). ATSAS 3.0: expanded functionality and new tools for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Cryst.*, 54, 343-355
- McDowell, M. A., Heimes, M., Sinning, I. (2021). Structural and molecular mechanisms for membrane protein biogenesis by the Oxa1 superfamily. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 28, 234–239.
- Meng, E. C., Goddard, T. D., Pettersen, E. F., Couch, G. S., Pearson, Z. J., Morris, J. H. (2023). UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis. *Protein Science.*, 32(11):e4792.
- Molodenskiy, D. S., Mertens, H. D. T., Svergun, D. I. (2020). An automated data processing and analysis pipeline for transmembrane proteins in detergent solutions. *Sci Rep*, 10, 8081.
- Nakane, T., Kimanius, D., Lindahl, E., Scheres, S. H. (2018). Characterisation of molecular motions in cryo-EM single-particle data by multi-body refinement in RELION. *Elife*. 7:e36861.

- Nickels, J. D., Hogg, J., Cordner, D., Katsaras, J. (2019). Lipid Rafts in Bacteria: Structure and Function. Health Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, Cham.
- Niwa H., Tsuchiya, D., Makyio, H., Yoshida, M., Morikawa, K. (2002). Hexameric ring structure of the Atpase domain of the membrane-integrated metalloprotease FtsH from *Thermus thermophilus* HB8. *Structure.*, 10, 1415–1423.
- Noble, A. J., Wei, H., Dandey, V. P. (2018). Reducing effects of particle adsorption to the air–water interface in cryo-EM. *Nat Methods*, 15, 793–795.
- Ogura, T., Inoue, K., Tatsuta, T., Suzaki, T., Karata, K., Young, K., Su, L. H., Fierke, C. A., Jackman, J. E., Raetz, C. R. H., Coleman, J., Tomoyasu, T., Matsuzawa, H. (1999). Balanced biosynthesis of major membrane components through regulated degradation of the committed enzyme of lipid A biosynthesis by the AAA protease FtsH (HflB) in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology.*, 31, 833–844.
- Panjikovich, A., Svergun, D. I. (2017). CHROMIXS: automatic and interactive analysis of chromatography-coupled small-angle X-ray scattering data. *Bioinformatics*, 34, 1944 - 1946.
- Perez, C. & Maier, T. (2020) Expression, Purification, and Structural Biology of Membrane Proteins. <http://www.springer.com/series/7651>.
- Petriman, N. A., Jauss, B., Hufnagel, A., Franz, L., Sachelaru, I., Drepper, F. (2018). The interaction network of the YidC insertase with the SecYEG translocon, SRP and the SRP receptor FtsY. *Sci. Rep.*, 8:578.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G.S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 25(13):1605-12.
- Pintilie, G., Chiu, W. (2012). Comparison of Segger and other methods for segmentation and rigid-body docking of molecular components in cryo-EM density maps. *Biopolymers.* 97(9):742-60.
- Puchades, C., Rampello, A. J., Shin, M., Giuliano, C. J., Wiseman, R. L., Glynn, S. E., Lander, G. C. (2017). Structure of the mitochondrial inner membrane AAA+ protease YME1 gives insight into substrate processing. *Science*, 358, eaao0464.
- Punjani, A., Rubinstein, J., Fleet, D. (2017). cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nat Methods*, 14, 290–296.
- Qiao, Z., Yokoyama, T., Yan, X. F., Beh, I. T., Shi, J., Basak, S., Akiyama, Y., Gao, Y. G. (2022). Cryo-EM structure of the entire FtsH-HflKC AAA protease complex. *Cell Reports*, 39(9), 110890.

- Rames M, Yu Y, Ren G. (2014). Optimized negative staining: a high-throughput protocol for examining small and asymmetric protein structure by electron microscopy. *J Vis Exp.*, 90, 510.
- Rapoport, T. A. (2007). Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature*, 450, 663–669.
- Richard, I. (2005). The genetic and molecular bases of monogenic disorders affecting proteolytic systems. *Journal of Medical Genetics.*, 42, 529–539.
- Rule, C. S., Patrick, M., Sandkvist, M. (2016). Measuring In Vitro ATPase Activity for Enzymatic Characterization. *J Vis Exp.* (114):54305.
- Sachelar, I., Winter, L., Knyazev, D. G., Zimmermann, M., Vogt, A., Kuttner, R. (2017). YidC and SecYEG form a heterotetrameric protein translocation channel. *Sci. Rep.*, 7:101.
- Saikawa, N., Akiyama, Y., and Ito, K. (2004). FtsH exists as an exceptionally large complex containing HflKC in the plasma membrane of *Escherichia coli*. *J. Struct. Biol.*, 146, 123–129.
- Sauer, R. T., Baker, T. A. (2011). AAA+ Proteases: ATP-Fueled Machines of Protein Destruction. *Annual Review of Biochemistry.*, 80, 587–612.
- Schaffitzel, C., Oswald, M., Berger, I., Ishikawa, T., Abrahams, J. P., Koerten, H. K. (2006). Structure of the *E. coli* signal recognition particle bound to a translating ribosome. *Nature*, 444, 503–506.
- Scheres, S. H. (2012). A Bayesian view on cryo-EM structure determination. *J Mol Biol.* Jan 13;415(2):406-18.
- Scheres, S., Chen, S. (2012). Prevention of overfitting in cryo-EM structure determination. *Nat Methods*, 9, 853–854.
- Schlegel, S., Löfblom, J., Lee, C., Hjelm, A., Klepsch, M., Strous, M., Drew, D., Slotboom, D. J., de Gier, J. W. (2012). Optimizing membrane protein overexpression in the *Escherichia coli* strain Lemo21(DE3). *J Mol Biol.*, 423(4):648-59.
- Schulze, R. J., Komar, J., Botte, M., Allen, W. J., Whitehouse, S., Gold, V. A., Lycklama, A., Nijeholt, J. A., Huard, K., Berger, I., Schaffitzel, C., Collinson, I. (2014). Membrane protein insertion and proton-motive-force-dependent secretion through the bacterial holo-translocon SecYEG-SecDF-YajC-YidC. *Proc Natl Acad Sci*, 111, 48844–48849.
- Scotti, P. A., Urbanus, M. L., Brunner, J., de Gier, J. W., von Heijne, G., van der Does, C., Driessen, A. J., Oudega, B., Lührink, J. (2000). YidC, the *Escherichia coli*

homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase. *EMBO J*, 19, 542–549.

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

Singh, S., Darwin, A. J. (2011). FtsH-dependent degradation of phage shock protein C in *Yersinia enterocolitica* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 193, 6436–6442.

Steinberg, R., Knupffer, L., Origi, A., Asti, R., and Koch, H. G. (2018). Cotranslational protein targeting in bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 365.

Suno, R., Niwa, H., Tsuchiya, D., Zhang, X., Yoshida, M., Morikawa, K. (2006). Structure of the Whole Cytosolic Region of ATP-Dependent Protease FtsH. *Molecular Cell*, 22, 575–585.

Suno, R., Shimoyama, M., Abe, A., Shimamura, T., Shimodate, N., Watanabe, Y. H., Akiyama, Y., Yoshida, M. (2012). Conformational transition of the lid helix covering the protease active site is essential for the ATP-dependent protease activity of FtsH. *FEBS Letters*, 586, 3117–3121.

Svergun, D. I., Koch, M. H. J. (2003). Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. *Reports on Progress in Physics*, 66(10), 1735.

Tomoyasu, T. (1993) Topology and subcellular localization of FtsH protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 175, 1352–1357.

Tomoyasu, T., Gamer, J., Bukau, B., Kanemori, M., Mori, H., Rutman, A.J., Oppenheim, A.B., Yura, T., Yamanaka, K., Niki, H. (1995). *Escherichia coli* FtsH is a membrane-bound, ATPdependent protease which degrades the heat-shock transcription factor σ^{32} . *EMBO J*, 14, 2551–2560.

Tomoyasu, T., Yamanaka, K., Murata, K., Suzaki, T., Boulloc, P., Kato, A., Niki, H., Hiraga, S., Ogura, T. (1993). Topology and subcellular localization of FtsH protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175, 1352–1357.

Tsukazaki, T., Mori, H., Echizen, Y., Ishitani, R., Fukai, S., Tanaka, T. (2011). Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export. *Nature* 474, 235–238.

URL-1: <https://www.biorender.com> (Ziyaret Tarihi: 10 Ekim 2023 – 15 Ekim 2023)

URL-2: <https://www.rcsb.org/stats> (Ziyaret Tarihi: 11 Eylül 2023)

URL-3: <https://www.ebi.ac.uk/emdb/statistics> (Ziyaret Tarihi: 11 Eylül 2023)

URL-4: www.snapgene.com/ (Ziyaret Tarihi: 10 Haziran 2021)

URL-5: <https://www.dnastar.com> (Ziyaret Tarihi: 09 Nisan 2021)

Vale, R. D. (2000). AAA proteins: Lords of the ring. *Journal of Cell Biology.*, 150, F13-9.

van der Does, C., den Blaauwen, T., de Wit, J. G., Manting, E. H., Groot, N. A., Fekkes, P. (1996). SecA is an intrinsic subunit of the *Escherichia coli* preprotein translocase and exposes its carboxyl terminus to the periplasm. *Mol. Microbiol.* 22, 619–629.

von Heijne, G. (1994). Signals for protein targeting into and across membranes. *Subcell. Biochem.*, 22, 1–19.

Vostrukhina, M., Popov A., Brunstein, C., Lanz, M. A., Baumgartner, D. A. R., Bieniossek, A. C., Schacherl, C., Ulrich, A., Baumann, C. (2015). The structure of *Aquifex aeolicus* FtsH in the ADP-bound state reveals a C2-symmetric hexamer. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, D71, 1307– 1318.

Wagner, S., Klepsch, M. M., Schlegel, S., Appel, A., Draheim, R., Tarry, M., Högbom, M., van Wijk K. J., Slotboom D. J., Persson, J. O., de Gier J.W. (2008). Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. *Proc Natl Acad Sci*, 105(38):14371-6.

Westphal, K., Langklotz, S., Thomanek, N., Narberhaus, F. (2012). A trapping approach reveals novel substrates and physiological functions of the essential protease FtsH in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2012;287(51):42962-42971.

Wang, Y., Wang, R., Jin, F., Liu, Y., Yu, J., Fu, X. (2016). A supercomplex spanning the inner and outer membranes mediates the biogenesis of b-barrel outer membrane proteins in bacteria. *J. Biol. Chem.*, 291, 16720–16729.

Wu, J. W., Chen, X. L. (2011). Extracellular metalloproteases from bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 92, 253–262.

Yedidi R.S., Wendler, P., Enenkel, C. (2017). AAA-ATPases in Protein Degradation. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 4, 1–14.



EKLER

EK-A

Besiyeri Hazırlama:

Luria-Bertani Broth (1 L): 10 g Tripton, 5 g Maya Özütü, 10 g NaCl tartılır ve son hacim 1 L'ye dH₂O ile tamamlanır, otoklav ile steril edilir.

Luria-Bertani Agar (0,5 L): 5 g Tripton, 2,5 g Maya Özütü, 5 g NaCl tartılır ve son hacim 1 L'ye dH₂O ile tamamlanır, otoklav ile steril edilir.

2xYT Broth: 16 g Tripton, 10 g Maya Özütü, 5 g NaCl tartılır ve son hacim 1 L'ye dH₂O ile tamamlanır, otoklav ile steril edilir.

Solüsyon Hazırlama:

IPTG Stok Solüsyonu (1 M): 2,3 g IPTG tartılır ve son hacim 10 ml olacak şekilde dH₂O ile tamamlanarak 0,45 µm'lik filtreden geçirilir, alikotlanarak -20 °C'de saklanır.

Ramnoz Stok Solüsyonu (1 M): 1,64 g Ramnoz tartılır ve son hacim 10 ml olacak şekilde dH₂O ile tamamlanarak 0,45 µm'lik filtreden geçirilir, alikotlanarak -20 °C'de saklanır.

Arabinoz Stok Solüsyonu (%20): 20 g Arabinoz tartılır ve son hacim 100 ml olacak şekilde dH₂O ile tamamlanarak 0,45 µm'lik filtreden geçirilir

Parçalama Tamponu (1 L): 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl içeren çözeltiye, 2 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 0,02 µl/ml RNAz, 0,02 µl/ml Benzonaz, 0,2 mg/ml Lizozim ve proteaz inhibitör (EDTA içermeyen) eklenir.

Streptaktin Yıkama Tamponu (1 L): 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, %0,01 DDM veya %0,005 LMNG bir araya getirilir ve filtreden geçirilir.

Streptaktin Elüsyon Tamponu (1 L): 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, %0,01 DDM veya %0,005 LMNG, 2,5 mM Destiyobiyotin bir araya getirilir ve filtreden geçirilir.

Tablo A.1. Laboratuvarda kullanılan ekipmanlar

Cihaz	Marka ve Model
Hassas Terazı	OHAUS - PR
pH Metre	OHAUS – Starter 3100
Bulaşık Makinesi	STEELCO Lab – 500 SC
Buz Makinesi	EverMed – FIM60 A
Buzdolabı	Haier – Combined Refrigerator
Buzdolabı	Haier – Ultra Low Temperature
Çalkalamalı İnkübatör	BIOBASE – BJPX-1102C
Otoklav	İldam
Termal Döngü Cihazı	LongGene – Mini 3220
Vorteks	MX-S
Santrifüj	Beckman Coulter – Avanti JXN 26
Santrifüj	Beckman Coulter – Optima XPN 80
Masaüstü Santrifüj	Allsheng – iCEN-24R
Sonikatör	Sonics – VibraCell CV18
Nanodrop	Allsheng – Nano 300
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	HS12
Saf Su Cihazı	ELGA – PF3XXXXM1

EK-B

E. coli FtsH protein sekansı:

MAKNLILWLVIADVLMVSVFQSGPSESNGRKVDYSTFLQEVNNDQVREARING
REINVTKKDSNRYTTYIPVQDPKLLDNLLTKNVKVVGEPPPEPSLLASIFISWFP
MLLLIGVWIFFMRQMQGGGKGAMSFGKSKARMLTEDQIKTTFADVAGCDEA
KEEVAELVEYLREPSRFQKLGGKIPKGVLMVGPPTGKTLLAKAIAGEAKVPPF
TISGSDFVEMFVGVGASRVDRMFQAKKAAPCIIFIDEIDAVGRQRGAGLGGGH
DEREQTLNQMLVEMDGFEGNEGIIVIAATNRPDVLDPALLRPGRFDRQVVVGL
PDVRGREQILKVHMRRVPLAPDIDAAIIARGTPGFSGADLANLVNEAALFAARG
NKRVSMSVEFEKAKDKIMMGAERRSMVMTEAQKESTAYHEAGHAIIGRLVPE
HDPVHKVTIIPRGRALGVTFFLPEGDAISASRQKLESQISTLYGGRLAEEIYGPE
HVSTGASNDIKVATNLARNMVTQWGFSEKLGPLLYAEEEGEVFLGRSVAKAK
HMSDETARIIDQEVKALIERNYNRARQLLTDNMDILHAMKDALMKYETIDAPQ
IDDLMARRDVRPPAGWEEPGASNNSGDNGSPKAPRPVDEPRTPNPGNTMSEQL
GDK

pI: 5,91 - Alifatik İndeks: 86,79 - Uniprot Kodu: P0AAI3

E. coli HflK protein sekansı:

MAWNQPGNNGQDRDPWGSSKPGGNSEGNGNKGGRDQGPPDLDDIFRKLSSK
LGGLGGGKGTGSGGGSSSQGPRPQLGGRVVTIAAAAIVIIWAASGFYTIKEAER
GVVTRFGKFSLVPEGLNWKPTFIDEVKPVNVEAVRELAASGVMLTSDENVVR
VEMNVQYRVTNPEKYLYSVTSPDDSLRQATDSALRGVIGKYTMDRILTEGRTV
IRSQTQRELEETIRPYDMGITLLDVNFQAARPPEEVKAADFDDAIAARENEQQYIR
EAEAYTNEVQPRANGQAQRILEEARAYKAQTILEAQGEVARFAKLLPEYKAAP
EITRERLYIETMEKVLGNTRKVLVNDKGGNLMVLPLDQMLKGGNAPAAKSDN
GASNLLRLPPASSSTTSGASNTSSTSQGDIMDQRRANAQRNDYQRQGE

pI: 6,18 - Alifatik İndeks: 73,84 - Uniprot Kodu: P0ABC7

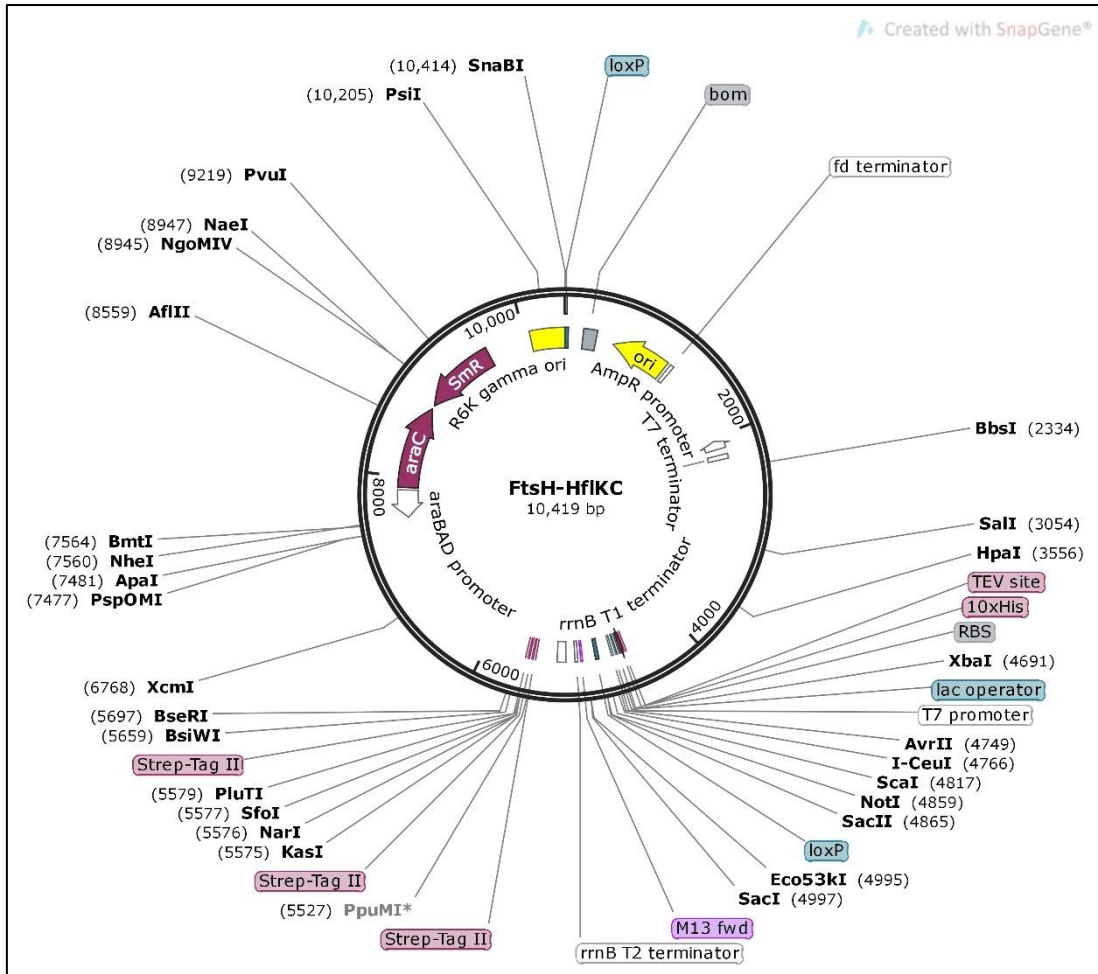
E. coli HflC protein sekansı:

MRKSVIAIIIVLVVLYMSVFVKEGERGITLRFQKVLRRDDDNKPLVYEPGLHFK
IPFIETVKMLDARIQTMDNQADRFVTKEKKDLIVDSYIKWRISDFSRYYLATGG
GDISQAEVLLKRKFSRDLRSEIGRLDVKDIVTDSRGRLTLEVRDALNSGSAGTE
DEVTTTPAADNAIAEAAERVTAETKGVVPVINPNSMAALGIEVVDVRIKQINLPT
EVSEAIYNRMRAEREAVARRHRSQGGQEEAEKLRATADYEVTRTLAEAEERQGRI
MRGEGDAEAAKLFADAFSKDPDFYAFIRSLRAYENSFSGNQDVMVMSPDSDF
RYMKTPTSATR

pI: 6,30 - Alifatik İndeks: 86,74 - Uniprot Kodu: P0ABC3

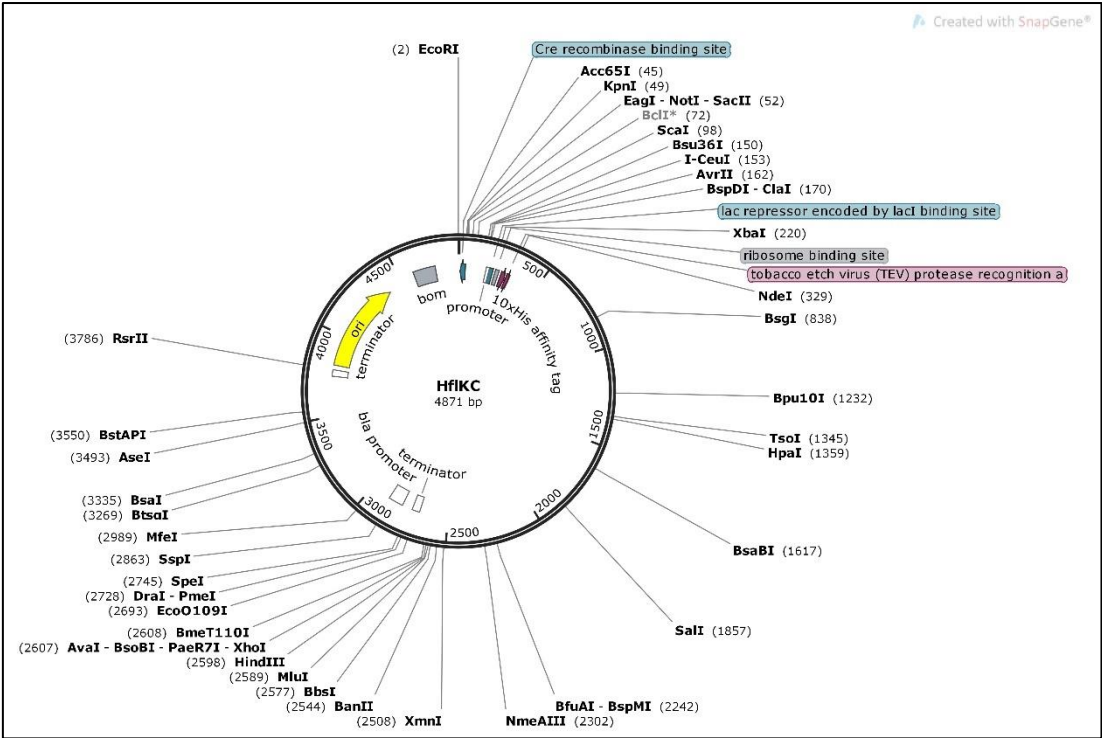
EK-C

E. coli FtsH-HflKC plazmit haritası:



EK-D

E. coli HflKC plazmit haritası:



KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

- Akkulak H., Allahyari N., Biter G., Çalıseki M., **Göç G.**, İnce H. K., Karakaş T., Kabasakal B. V., Integrative Structural Biology Research @BvK LaB, *EMBO Lecture Course, Structural Biology of Biomolecular Complexes*, İstanbul, Türkiye, 4-8 Eylül 2023.
- Akkulak H., Ince H. K., **Goc G.**, Kabasakal B. V., Ozcan S. (2023) Combined workflow for XL-MS data processing: Application to the FtsH-HflK-HflC membrane protein complex, *BioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2023.06.07.544024>
- Atalay, N., Akcan E. K., Gül M., Ayan E., Destan E., Kuzucu F. B., Tokay N., Çakilkaya B., Nergiz Z., Usta G., Kepceoğlu A., Yapıcı I., Tosun B., Baldir N., Yildirim G., Johnson J. A., Güven Ö., Shafiei A., Arslan N. E., Yilmaz M., Kulakman C., Paydos S. S., Çinal S. S., Şabanoğlu K., Pazarçeviren A., Yilmaz A., Canbay B., Aşçi B., Kartal E., Tavli S., Çalıseki M., **Göç G.**, Mermer A., Yeşilay G., Altuntaş S., Tateishi H., Otsuka M., Fujita M., Tekin Ş., Çiftçi H., Durdağı S., Doğanay G., Karaca E., Türköz B., Kabasakal B. V., Kati, A., Demirci H. (2023) *Cryogenic X-ray crystallographic studies of biomacromolecules at Turkish Light Source "Turkish DeLight"*, *Turkish Journal of Biology*: Vol. 47: No. 1, Article 2. <https://doi.org/10.55730/1300-0152.2637>
- Balcı S., Yüzügüllü Y., **Göç G.**, Zengin M., Avcı Duman Y. (2015) *Scytalidium thermophilum* Katalazının Yanal Kanalı Üzerine Kristalografi Çalışmaları, 18. *Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, Konya, Türkiye, 18-19 Aralık 2015.
- Goc G.**, Balci S., Yorke B.A., Pearson A.R., Yuzugullu Karakus Y. (2021) *Probing the role of Val228 on the catalytic activity of Scytalidium catalase*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, Volume 1869, Issue 8.
- Göç G.**, Kabasakal B. V., Aygar S., Allahyari N., Çolak Z., Protein Kalite Kontrolünde Görev Alan FtsH-HflKC Kompleksinin Yapısal Biyolojisi, *Uluslararası Biyokimya Kongresi – 32. Ulusal Biyokimya Kongresi*, Gaziantep, Türkiye, 27-20 Ekim 2021.
- Göç G.**, Yüzügüllü Karakuş Y., *Bacillus pumilus* Katalaz (katX2) Geninin Klonlanması (2017), 19. *Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, Eskişehir, Türkiye, 1-3 Aralık 2017.
- Karakus, Y.Y., **Goc, G.**, Balci, S., Yorke, B.A., Trinh, C.H., McPherson, M.J., Pearson, A.R. (2019) *Identification of the site of oxidase substrate binding in Scytalidium thermophilum catalase*, *Acta Crystallography Section D*, 2019, 74, 979-985.
- Karakus, Y.Y., **Goc, G.** (2019) *Bacillus pumilus Y7 Katalaz (katX2) Geninin Klonlanması ve Açıklanması*, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen ve Mühendislik Dergisi, 2019, 19, 15-20.
- Özcan S., **Göç G.**, Akkulak H., Çalıseki M., İnce H. K., Schaffitzel C., Lebrilla C. B., Kabasakal B. V., Structural insights into protein quality control using cross linking mass spectrometry, *ACS Spring 22 Meeting*, Mart 2022, San Diego, ABD

- Yuzugullu Karakus Y., **Goc G.**, Zengin Karatas M., Balci Unver S., Yorke B. A., Pearson A. R. (2024) Investigation of how gate residues in the main channel affect the catalytic activity of *Scytalidium thermophilum* catalase, *Acta Cryst. D80*, <https://doi.org/10.1107/S2059798323011063>.
- Yuzugullu Karakus Y., **Goc G.**, X-Ray diffraction study of *Scytalidium thermophilum* catalase in the complex with Aminotriazole (2018), *International Molecular Biology and Biotechnology Congress*, Konya, Türkiye, 25-27 Nisan 2018.
- Yuzugullu Y., Balci S., **Goc G.**, Zengin M., Avci Duman Y., Pearson A. R. (2016) Crystallographic Studies of Catalase from the Thermophilic Fungus *Scytalidium thermophilum*, *COST 3rd MC Meeting*, Lizbon, Portekiz, 24-26 Şubat 2016.
- Yuzugullu Y., Zengin M., Balci S., **Goc G.**, Avci Duman Y. (2015) *Role of active site residues on catalytic activity of catalase with oxidase activity from Scytalidium thermophilum*, *Procedia Social and Behavioral Sciences*, 195, 1728-1735.
- Yuzugullu Y., Zengin M., Balci S., **Goc G.**, Avci Duman Y., *Scytalidium thermophilum* Katalaz-Fenol Oksidaz (CATPO) Yanal Kanalının Aktivitedeki Rolü (2015), *Ulusal Moleküler Biyoloji Kongresi*, Afyon, Türkiye, 21-24 Ağustos 2015.

ÖZGEÇMİŞ

İlk, orta ve lise öğrenimini Düzce Cumhuriyet Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2014 yılında Kocaeli Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü bitirdi. Aynı yıl içerisinde Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda, Doç. Dr. Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ danışmanlığında başladığı yüksek lisans eğitimini, 2017 yılında tamamladı. Bu dönemde, COST Action CM1306 tarafından sağlanan kısa dönemli bursu kazanarak, Hamburg Üniversitesi'nde Prof. Dr. Arwen R. Pearson'ın danışmanlığında ziyaretçi araştırmacı olarak protein kristalografisi üzerine çalışmalar gerçekleştirdi. 2018 yılında Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda başladığı doktora eğitimini, eş danışmanı Dr. Burak V. Kabasakal sayesinde TÜBİTAK bursiyeri olarak tamamladı.

