

**Arkeabakteri Kökenli Rekombinant Küçük Isı Şoku
Proteinlerinin *E.coli*'de Yüksek Düzeyde Ekspresyonu ve
Karakterizasyonu; Çeşitli Stres Koşullarında Küçük Isı Şoku
Protein Genlerinin Anlatım Farklılaşmasının Analizi**

Proje No: 109T946

Prof.Dr. Semra KOCABIYIK

NİSAN 2012

Önsöz

Bu projede, ilk defa, orta derecede ısıya dirençli ve asidofilik özellikte bir arkea olan *Thermoplasma volcanium*'un küçük ısı şoku proteinlerinin (sHSP/775 ve sHSP/984) rekombinant olarak üretimi ve farklı stress koşullarında ekspresyon profillerindeki değişim Nicel Gerçek Zamanlı PCR ve Western Aktarım/Hibritleme teknikleri ile incelenmiştir. Rekombinant sHSP/775 proteininin, *in-vitro* olarak, ökaryot kökenli mezofilik enzimleri ısı şokundan koruması ve ayrıca kimyasal olarak denatürlenmiş enzimlerin yeniden katlanmasında etkili olması onun şaperon aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir. Fulorimetrik ve Transmisyon Elektron Mikroskopi ile yürütülen yapısal analizler sHSP/775 proteinin oligomer yapısının ısıya bağlı nasıl bir değişim gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, küçük ısı şoku proteinlerinin *T. volcanium*'un stres tepkisinde etkin rolüne ilişkin sağladığı özgün bilgilerle literature önemli katkılarda bulunmuştur. Proje verilerinden elde edilen sonuçlar bir Ulusal ve iki Uluslararası Bilimsel Kongrede sunulmuş, ayrıca sonuçların bir kısmını içeren bir makalemiz *Process Biochemistry* 'de yayına kabul edilmiş olup basım aşamasındadır (on-line erişimdedir). Bu projeden sağlanan bursiyer desteği ile yürütülen bir Yüksek Lisans tez çalışması tamamlanmıştır. Ayrıca devam etmekte olan iki Y.Lisans tezi için de kısmi bursiyer desteği sağlamıştır.

Projemize verdiği maddi destek dolayısı ile TÜBİTAK'a ve idari konulardaki yardımları dolayısı ile TÜBİTAK-TBAG grubu ile ODTÜ-TÜBİTAK/BAP çalışanlarına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Tablo listeleri	1
Şekil listesi	2
Özet	5
Abstract	6
1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER	7
2. GEREÇ VE YÖNTEM	11
2.1. <i>Tpv</i> sHSP genlerinin <i>E.coli</i> 'de klonlanması, ekspresyonu, pozitif klonların seçilmesi ve karakterizasyonu	11
2.2. N-terminal 6xHis/sHSP-775 ve 6xHis/sHSP-984 füzyon proteinlerinin Ni-NTA afinite kromatografisi ile izolasyonu	12
2.3. Ekspresyonu gerçekleştirilen genlerin dizilerinin belirlenmesi	13
2.4. Şaperon benzeri aktivite ölçümü	13
2.5. Rekombinant sHSP/775 proteininde strese bağlı yapısal değişimin belirlenmesi	14
2.5.1. sHSP/775'in oligomerik yapısında ısıya bağlı konformasyonel değişimin fulorimetrik analizi.	15
2.5.2. Transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) ile yapısal incelemeler	15
2.6. sHSP'lerin Strese Bağlı Gen Anlatım Kinetiğinin Nicel Gerçek Zamanlı PCR ile incelenmesi	16
2.7. Strese Bağlı Protein Sentezindeki değişimin Western Aktarım/Hibridizasyon Tekniği ile incelenmesi	16
3. BULGULAR	17
3.1. sHSP genlerinin klonlanması, ekspresyonu ve karakterizasyonu	17
3.2. N-terminal 6xHis/sHSP-775 füzyon proteinin doğal formda Ni-NTA afinite kromatografisi ile izolasyonu	25
3.3. N-terminal 6xHis/sHSP-984 füzyon proteininin Ni-NTA kromatografi ile izolasyonu.....	25
3.4. sHSP/775 proteininin şaperon aktivitesi	28
3.5. sHSP/775'in oligomerik yapısında ısıya bağlı konformasyonel değişimin fulorimetrik analizi	33
3.6. Transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) ile yapısal incelemeler	35
3.7. Stres koşulunda (ısı ve pH şoku ile oksidatif stres) <i>Tpv</i> sHSP775 ve sHSP984 genlerinin ekspresyon profillerinin Nicel Gerçek Zamanlı PCR tekniği ile incelenmesi	36
3.8. Western Aktarım / Hibritleme ve İmmünolojik belirleme	50
4. TARTIŞMA/SONUÇ.....	52

Tablo listesi:

Tablo 1. cDNA sentezi için kullanılan primerler	15
Tablo 2. Gerçek zamanlı PCR için kullanılan primerler	16
Tablo 3. pDrive vektörde klonlanan sHSP gen fragmentlerinin restriksiyon haritası.....	19
Tablo 4. TVN0775 geninin ısı şoku koşullarında farklılaşmış gen ekspresyonuna ait Ct and Tm değerleri	38
Tablo 5. TVN0984 geninin ısı şoku koşullarında farklılaşmış gen ekspresyonuna ait Ct and Tm değerleri	41
Tablo 6. TVN0775 geninin pH şoku koşullarında farklılaşmış gen ekspresyonuna ait Ct and Tm değerleri	43
Tablo 7. TVN0984 geninin pH şoku koşullarında farklılaşmış gen ekspresyonuna ait Ct and Tm değerleri	44
Tablo 8. TVN0775 geninin oksidatif stres koşullarında farklılaşmış gen ekspresyonuna ait Ct and Tm değerleri	46
Tablo 9. TVN0984 geninin oksidatif stres koşullarında farklılaşmış gen ekspresyonuna ait Ct and Tm değerleri	48

Şekil listesi:

Şekil 1. QIAExpressionist Kiti kullanılarak Ni-NTA kromatografisi ile saflaştırma stratejisi	12
Şekil 2. sHSP genlerinin pDrive vektöre klonlanma stratejisi.....	17
Şekil 3 . Olası TVNO775 (sıra: 1 - 6) ve TVN 0984 (sıra 8 - 10) rekombinant plazmitler	18
Şekil 4. pDrive/775 olası rekombinant plazmitlerin (sıra: 2, 5, 7) agaroz jel elektroforez ile elde edilen <i>EcoRI</i> kesim profili.	19
Şekil 5. TVNO775 ve TVNO984 rekombinant plazmitlerin <i>BamH I</i> ile kesimi	20
Şekil 6. pDrive-1/775 ve pDrive-7/984 rekombinant plazmitlerin çeşitli restriksiyon enzimleri ile kesim profilleri.....	20
Şekil 7 .pQE vektörlerin (30,31,32) ve pDrive-1/775 plazmitinden TVN0775 geninin (1,2,3) jelden izolasyonu	21
Şekil 8. pDrive/ 2-775 plazmitinden çıkarılan TVN0775 geninin pQE vektörlere <i>Sal I/Pst I</i> kesim bölgelerinde klonlanması	22
Şekil 9. pQE/775 transformantların koloni hibritlemeyen sonraki membran resimleri	22
Şekil 10. pQE-31 vektörüne klonlanan TVNO775 genini içeren rekombinant plazmitlerin izolasyonu	23
Şekil 11. pQE-31/775 rekombinant plazmitlerinin kesim profilleri	23
Şekil 12. pQE/984 transformantların koloni hibritlemeyen sonraki membran resimleri	24
Şekil 13. pQE-30 vektörüne klonlanan TVNO984 genini içeren rekombinant plazmitlerin izolasyonu	24
Şekil 14. pQE-30/984 rekombinant plazmitlerinin kesim profilleri	25
Şekil 15. sHSP/775 proteininin izolasyonunun SDS-PAGE analizi.....	26
Şekil 16. Rekombinant TVN0984 proteinin Ni-NTA kromatografisi ile izolasyonu.....	26
Şekil 17. Doğal olarak sHSP/984 proteinin Ni-NTA kolon ile izolasyonu	27
Şekil 18. sHSP/984 proteinin denatürasyon koşullarında Ni-NTA kolon ile izolasyonu.....	28
Şekil 19. sHSP/775 proteininin Ni/NTA kolon kromatografisi ile izolasyonu	29
Şekil 20. sHSP/775 proteinin boGDH enzimini 45 °C'de ısı etkisinden koruması.....	29
Şekil 21. sHSP/775 proteinin boGDH enzimini 50 °C'de ısı etkisinden koruması.....	30
Şekil 22. sHSP/775 proteinin boGDH enzimini 53 °C'de ısı etkisinden koruması.	30

Şekil 23. Farklı GdnCl konsantrasyonda denatürlenmiş boGDH enziminin kalan aktivitesi	31
Şekil 24. GdnCl (2.5M) ile denatürlenmiş boGDH enzim aktivitesinin yeniden kazanımı.....	32
Şekil 25. Farklı derişimlerde sHSP/775 proteinin phCS enzimini 47 °C’de ısı etkisinden koruması...33	
Şekil 26 . GdnCl ile denatürlenmiş phCS enziminin sHSP/775 proteini ile renatürasyonu.....33	
Şekil 27. Farklı sıcaklık derecelerinde TVNO775-sHSP proteinin bis-ANS bağlama kapasitesindeki değişim	34
Şekil 28. Sıcaklığa bağlı maksimum fuloresan emisyon peak’inde değişimi.....	34
Şekil 29. Negatif boyanmış rekombinant sHSP/775 proteininin ile TEM ile görüntülenmesi	35
Şekil 30. sHSP/775’nin TEM ile görüntülenmiş morfolojisi.....	36
Şekil 31. 65 °C ‘de ısı şoku uygulanmış ve uygulanmamış ve (B) 70 °C ‘de ısı şoku uygulanmış <i>T. volcanium</i> hücrelerinden RNA izolasyonu	37
Şekil 32. pH 4.0 (sıra 1,3,5,7) ve pH 5.0’te (sıra 2,4,6,8), süre ile pH şoku uygulanmış <i>T. volcanium</i> hücrelerinden RNA izolasyonu	37
Şekil 33. 0.01 mM (sıra 1-4) ve 0.05 mM (sıra 2-8) H ₂ O ₂ şoku uygulanmış <i>T. volcanium</i> hücrelerinden RNA izolasyonu.....	37
Şekil 34. 65 °C’de 30 dak (A) ve 60 dak (B) ısı şoku uygulamasında TVNO984 geni anlatımının analizin ilişkin RT-PCR eğrileri	39
Şekil 35. 70 °C’de 30 dak (A) ve 60 dak (B) ısı şoku uygulamasında TVNO775 geni anlatımının analizin ilişkin RT-PCR eğrileri.....	39
Şekil 36. TVN0775 gen anlatımına ait RT-PCR ürününün agaroz jel electrophorez görüntüsü.	39
Şekil 37. Isı şokunda sHSP/775 geninin ekspresyon düzeyindeki değişim.....	40
Şekil 38. 65 °C’de 30 dak (A) ve 60 dak (B) ısı şoku uygulamasında TVNO984 geni anlatımının analizin ilişkin RT-PCR eğrileri	41
Şekil 39. 70 °C’de 90 dak (A) ve 120 dak (B) ısı şoku uygulamasında TVNO984 geni anlatımının analizin ilişkin RT-PCR eğrileri.....	41
Şekil 40. TVN0984 geni anlatımına ait RT-PCR ürününün agaroz jel electrophorez görüntüsü.....	42
Şekil 41. Isı şokunda sHSP/984 geninin ekspresyon düzeyindeki değişim.....	42
Şekil 42. pH: 4.0 ‘de 120 dak (test) stress uygulamasında ve uygulama olmadan (kontrol) TVN0775 geni anlatımının analizin ilişkin RT-PCR eğrileri.....	43
Şekil 43. pH: 5.0 ‘de 120 dak (test) stress uygulamasında ve uygulama olmadan (kontrol) TVN0775 geni anlatımının analizin ilişkin RT-PCR eğrileri.....	43

Şekil 44. pH şokunda sHSP/775 geninin ekspresyon düzeyindeki değişim.....	44
Şekil 45. pH: 4.0 'de 120 dak (test) stress uygulamasında ve uygulama olmadan (kontrol) TVN0984 geni anlatımının analizine ilişkin RT-PCR eğrileri.....	45
Şekil 46. pH: 5.0 'de 120 dak (test) stress uygulamasında ve uygulama olmadan (kontrol) TVN0984 geni anlatımının analizine ilişkin RT-PCR eğrileri.....	45
Şekil 47. pH şokunda sHSP/984 geninin ekspresyon düzeyindeki değişim.....	46
Şekil 48. 0.01 mM H ₂ O ₂ (90 dak) uygulamasında ve uygulama olmadan (kontrol) TVN0775 geni anlatımının analizine ilişkin RT-PCR eğrileri.....	47
Şekil 49. 0.05 mM H ₂ O ₂ (60 dak) uygulamasında ve uygulama olmadan (kontrol) TVN0775 geni anlatımının analizine ilişkin RT-PCR eğrileri.....	47
Şekil 50. Oksidatif stres koşulunda sHSP/775 geninin ekspresyon düzeyindeki değişim.....	48
Şekil 51. 0.01 mM H ₂ O ₂ uygulamasında ve uygulama olmadan (kontrol) TVN0984 geni anlatımının analizine ilişkin RT-PCR eğrileri.....	49
Şekil 52. 0.05 mM H ₂ O ₂ uygulamasında ve uygulama olmadan (kontrol) TVN0984 geni anlatımının analizine ilişkin RT-PCR eğrileri.....	49
Şekil 53. Oksidatif stres koşulunda sHSP/775 geninin ekspresyon düzeyindeki değişim.....	50
Şekil 54. sHSP/775 proteini ekspresyonunun insan alfa A kristalin proteinine spesifik antikor kullanılarak Western aktarım/hibritleme tekniği ile analizi.....	51
Şekil 55. sHSP/775 proteini ekspresyonunun sıçan iskelet kası kökenli HSP20proteinine spesifik antikor kullanılarak Western aktarım/hibritleme tekniği ile analizi.....	51

Özet

Arkea bakterilerde küçük ısı şoku proteinlerinin (sHSP) fizyolojik rolleri ve mekanizmalarına ilişkin bilgiler hipertermofilik arkealarla sınırlıdır ve diğer arkea türlerinde sHSP'lerinin stres tepkisindeki rolü henüz bilinmemektedir. Bu projede, ilk defa model olarak orta derecede ısıya dirençli asidofilik özellikteki *Thermoplasma volcanium*'un (optimum gelişme sıcaklığı 60 °C ve optimum pH 2.7) sHSP'lerinin yapı ve şaperon aktiviteleri incelenmiştir. *T. volcanium* genom dizi analizine göre mevcut iki sHSP geni, TVNO775 ve TVNO984, *E.coli*'de klonlanmış ve ekspres edilmişler, ayrıca klonlanan genlerin dizi ve restriksiyon analizleri yapılmıştır. Yüksek düzeyde ekspres edilen rekombinant sHSP/775 proteini (yaklaşık 14 kDa) afinite kromatografisi ile izole edilmiştir. Ancak sHSP/984 geninin klonlama ve ekspresyonun başarılı olmasına karşın, hem doğal hem de denatürasyon koşullarında izolasyonu, muhtemelen proteinin stabilitesinin düşük olması dolayısı ile mümkün olamamıştır. Bu nedenle yapısal/fonksiyonel analizler saflaştırılmış sHSP/775 proteini ile yürütülmüştür. Elde ettiğimiz sonuçlar, sHSP/775'nin mezofilik ve ökaryot kökenli sitrat sentaz ve glutamat dehidrogenaz enzimlerinin hem yüksek sıcaklıkta aktivitelerini koruduğu, hem de kimyasal olarak kısmen denatüre edildiklerinde yeniden katlanmalarına yardımcı olduğu için şaperon aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir. Isıya bağlı olarak sHSP/775 proteininin oligomerik yapısındaki değişim ve oligomer büyüklüğünün artması TEM analizi ve bis-ANS'e bağlanma etkinliğindeki artış ile gözlemlenmiştir. Nicel Gerçek Zamanlı PCR tekniği ile her iki sHSP geninin yazılımının ısı şoku ve oksidatif stres koşullarında arttığı gösterilmiştir. Ancak pH stresi ile sadece TVNO775 geninin uyarıldığı görülmüştür. İnsan ve sıçan kökenli sHSP20 proteinlerine özgün antikorlar ile yürütülen Western aktarım/kros hibritleme analizleri, sHSP/ 775 geni anlatımında transkripsiyon düzeyinde strese bağlı görülen indüklenmenin protein sentezi düzeyinde de olduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Stres yanıtı, moleküler şaperon, küçük ısı-şoku protein (sHSP), *Thermoplasma volcanium*, arkeabakteri.

Abstract

Information about physiological roles and action mechanisms of small heat shock proteins (sHSPs) in archaea is only limited to hyperthermophilic species and there is no report on the roles of sHSPs from other *archaea* in stress response. In this project is, for the first time, we investigated structural features and chaperone activities of sHSP's from moderately thermophilic and acidophilic *Thermoplasma volcanium* (optimum temperature 60 °C, optimum pH 2.7), as the model. Two sHSP genes, TVNO775 ve TVNO984 available in the genome of *T. volcanium* were cloned and expressed in *E.coli*. Also, sequence and restriction analyses of cloned genes were performed. Overexpressed recombinant sHSP/775 protein (approx. 14 kDa) was purified by affinity chromatography. Although cloning and expression of TVNO984 gene was successfull, possibly because of low stability, its purification could not be possible neither in natural nor in denaturated form. Therefore, structural and functional analyses were carried out with purified sHSP/775 protein. Our results showed that sHSP/775 had chaperone activity with its capacity of protecting eucaryotic, mesophilic citrate synthase and glutamate dehydrogenase enzymes from heat denaturation and by inducing renaturation of partially deanturated enzymes through chemical means. Temperature dependent alteration of oligomeric structure and increase in oligomere size were observed by TEM analysis and by increased bis-ANS binding capacity. Quantitative Real-Time PCR showed that transcription of two sHSP genes increase under heat and oxidative stress conditions. However, pH stress induced only transcrption of TVNO775 gene. Western blotting/ cross hybridization studies revealed that stress dependent increase in TVNO775 gene expression at transcriptional level also occurred at translation level.

Keywords:

Stress response, molecular chaperone, small heat shock protein (sHSP), *Thermoplasma volcanium*, archaeabacteria

1. Giriş ve Genel Bilgiler

Hücrede moleküler şaperon sistemi yeni sentezlenmiş proteinlerin katlanmasına ve oligomerik protein komplekslerinin montajına, proteinlerin membrandan transferine, yanlış katlanmış ve kümeleşmiş proteinlerin yeniden katlanması ve parçalanmasına yardımcı olan öğelerdir. Şaperonların önemli bir grubu olan “şaperoninler”, hücrede çok farklı spektrumda katlanmamış, yanlış katlanmış ya da kısmen katlanmış proteinlerin ATP’ye bağımlı doğru katlanmalarını sağlayan büyük protein katlama kompleksleridir [Ranson, *et al.*,1998]. İki tip (Grup I ve Grup II) şaperonin tanımlanmıştır: Grup I şaperoninler bakterilerde (GroEL) ve ökaryotların mitokondri ve kloroplastlarında bulunurlar, ve bugüne dek genomu bilinen *archaea* içerisinde yalnız *Methanosarcina sp.*’de saptanmıştır. Grup II şaperoninler ökaryotik hücre sitoplazmasında ve *archaea* bakterilerde görülmektedir. Grup I ve II şaperoninlerin genel yapısı benzer olup, iki halkanın sırsıra kenetlenmesinden oluşan ve iç boşluğunda protein katlanmasının meydana geldiği bir silindir şeklindedir. Grup I şaperoninlerde silindirin açık ucu bir ko-şaperonin olan Gro ES (kapak) tarafından kapatılırken, Grup II şaperoninlerde böyle bir kapak bulunmamaktadır. Bugüne kadar genom dizileri belirlenen *archaea*’larda en az iki Grup II şaperonin homoloğu saptanmıştır [MaederL *et al.*, 2001]. Bunun yanısıra tüm *archaea*’da küçük ısı şoku proteinleri (sHSP) de başlıca şaperon sistemi olarak yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Diğer şaperon ailelerine ait protein genleri termofilik arkea genomunda büyük ölçüde eksik olduğu için, sHSP’lerinin Grup II şaperoninlerle birlikte hipertermofilik arkeabakterilerin stres karşıtı mekanizmalarında önemli rolleri olduğu düşünülmektedir [Glove and Lindquist, 1998]. sHSP’lerin protein katlanmasında moleküler şaperon olarak yeri, yapıları ve kazanılmış termal toleransta stres karşıtı öğeler olarak işlevleri detaylı olarak bir çok derleme makalede, özellikle ökaryot odaklı olarak, ele alınmıştır [Laksanalamai, and Robb, 2004; Haslbeck, *et al.*,2005; Sun and MacRae, 2005; Nakamoto and Vigh, 2007; Kocacıyık, 2009].

sHSP’ler ve onlarla ilgili olan α -kristalinler, C uçlarına yakın konumlanmış olan 80-100 amino asit uzunluğundaki karakteristik bir “motife” sahip olan, bir şaperon süper ailesini oluşturmaktadırlar. Bu motif “ α -kristalin domaini” olarak adlandırılmakta olup, sHSP’lerin en tanımlayıcı yapısal özelliğidir ve ökaryotlardan prokaryotlara kadar büyük ölçüde korunmuştur. Bu motifin iki yanında ise kısa bir C ucu “domain”i ile, uzunluğu ve dizisi çok değişken olan bir N ucu “domain”i bulunmaktadır. Küçük HSP’ler her birisi 12-42 kD olan, 9 ila 40 alt birimden oluşan büyük, çok birimli protein kompleksleridir (toplam mol. ağırlığı

200-1,000 kDa). Bu güne dek sHSP'lerin üçüncül ve dördüncül (oligomerik) yapısı X-ışığı kristalografisi ile iki canlıda (hipertermofilik bir metanojen olan *Methanocaldococcus jannaschii*, Mj HSP16.5 ile buğday, HSP16.9) ayrıntılı olarak incelenmiştir [Kim *et al.*, 1998; Van Montfort *et al.*, 2001]. Son yıllarda “cryo” elektron mikroskopisi ve 3-D görüntü analizleri ile diğer bazı sHSP'lerin de oligomerik yapısı ve yapısal dinamiklerine ilişkin çok yararlı bilgiler elde edilmiştir [Haslbeck *et al.*, 2008; Haslbeck *et al.*, 1999]. Mj HSP 16.5'in detaylı yapı analizi bu proteininin, 24 alt birimden oluştuğunu ve oktahedral simetrik, içi boş bir küre şeklinde olduğunu ortaya koymuştur. Benzer oligomerik yapı diğer hipertermofilik *archaea* (*Thermococcus spp* KS-1, *Archaeoglobus fulgidis* ve *Sulfolobus tokodaii* strain 7) sHSP'lerinde de gözlenmiştir [Haslbeck *et al.*, 2008; Usui *et al.*, 2001]. Bu yapı, buğday sHSP'ninin iki hegzamerik diskten oluşan simetrik silindirik yapısından farklıdır, ancak *S. cerevisiae*'nin sHSP yapısına çok benzerlik göstermektedir [Montfort *et al.*, 2001; Haslbeck *et al.*, 1999]. Yapısal çalışmalar sHSP'lerin dördüncül yapılarının son derece dinamik olduğunu, bu durumun ısı şokuna bağlı olarak sıkça rastlanan oligomer büyüklüklerindeki heterojenlik ve hızlı alt birim değişikliği şeklinde kendini gösterdiğini ortaya koymuştur. Örneğin *A. fulgidus*'un sHSP 20.2 proteininin ısıyla regüle edilen iki farklı oligomerik formu bulunmaktadır: 1. şaperon aktivitesi yüksek olan büyük oligomerik kompleks, 2. şaperon aktivitesi düşük olan daha küçük oligomerik kompleks. Bu farklı formların birbirine göreceli miktarı ısıya bağlı olup, şaperon aktivitesi yüksek olan form ısı şoku koşullarında dominant olan formdur [Haslbeck *et al.*, 2008]. Bu gibi bulgulara dayanarak sHSP'lerin stresten koruyucu oligomerik bileşikler olarak öngörülen işlevleri, stres etmenlerinin etkisi ile yapısal değişikliklere uğradıkları zaman ya kitlelerinin artması ya da daha küçük birimlere (örneğin dimerlere) ayrışmaları ve böylece baskın konuma geçen aktifleştirilmiş formlarının katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerle etkileşerek yüksek moleküler ağırlıkta kompleksler oluşturmaları olarak açıklanmaktadır. Bu yolla sHSP'ler, yapısı kusurlu olan ya da denatüre olmuş proteinleri çözünebilir fazda tutarak dönüşümsüz agregasyonlarını önlemektedirler. Aksi durumda, çözünmeyen protein kümelerinin hücrede birikimi hücre fonksiyonlarını olumsuz etkileyecek ve toksik etki yapacaktır. Koşullar normale döndüğünde ise denatüre olmuş proteinlerin kompleksten ayrıldıkları ve ATP'ye bağımlı moleküler şaperonların (HSP 104 ve/veya HSP70/HSP40 gibi) yardımı ile yeniden katlanmalarının gerçekleştiği ileri sürülmektedir. Bu nedenle sHSP'lerin özellikle ökaryotlarda proteinlerin yeniden katlanmasını katalizlemek yerine onlara bağlanıp, katlanmaya uygun, çözünür formda sakladıkları düşünülmektedir. sHSP'lerin şaperon ya da şaperon benzeri aktivitelerinde

ATP'nin pozitif ya da negatif etkisi olmadığı bulunmuştur [Muchowski and Clark, 1998]. sHSP ailesinin en çok bilinen üyesi, omurgalılarda göz lensinde bulunan α -kristalin proteindir. İnsanlarda iki alfa kristalin proteini bulunmaktadır: α A-kristalin ve α B-kristalin. Alfa kristalinler yaklaşık 800 kDa büyüklüğünde heterojen yapıda büyük oligomerik komplekslerdir. Bir çok omurgalı lensinde α A- alt birim geni yüksek düzeyde ekspres edilmekte olup, α A- altbiriminin α B-alt birimine oranı 3:1 'dir. Gözde α -kristalin ışığı yansıtılmaktan sorumlu bir eleman olmanın yanısıra, bir moleküler şaperon olarak denatüre olmuş proteinlerin agregasyonunu önlemek yolu ile lens şeffaflığını sağlamada da kritik rol üstlenmiştir. Yaşlanmaya bağlı olarak göz proteinlerinin, çeşitli fizyolojik, çevresel ve genetik etmenlerin de katkısı ile agregasyona (kümeleşme yada biraraya toplanmaya) eğilim göstermesi katarakt oluşumunda etkili olmaktadır [Horwitz, 1992]. α -kristalin genlerinde mutasyon çalışmaları ve yeni oluşturulan α A- ve /ve ya α B-kristalin gen nakavtı taşıyan model hayvanlarla (ki erken yaşlarda katarakt oluşumu gözlenmiştir) yürütülen araştırmalar α -kristalinin şaperon işlevinin fizyolojik ve patolojik önemini desteklemektedir [Litt *et al.*,1998]. Son yıllarda yapılan araştırmalar, küçük ısı şoku proteinlerinin çeşitli kanser türlerinde, Alzheimer's ve prionların etken olduğu Creutzfeld-Jakob hastalığı gibi tedavi yöntemleri tam olarak bilinmeyen hastalıkların oluşumunda önemli rollere sahip olduğu ortaya konulmuştur [Feder, M.E and Hofmann,1999]. Şaperonların çeşitli hastalıklarda sahip oldukları kilit rollerinden dolayı, şaperon terapisi yöntemlerinin geliştirilmesi çalışmaları son yıllarda büyük bir ivme kazanmıştır [Glove and Lindquist, 1998].

Archea'da sHSP'lerle ilgili çalışmalar bazı hipertermofilik arkea türleri ile sınırlıdır: *Methanocaldococcus jannaschii*'den Mj 16.5 (alt birim Mw 16.5 kDa), *Thermococcus* sp. strain KS-1'den T. sHSP (alt birim MW, 20 kDa), *Archaeoglobus fulgidus* 'dan HSP 20.2 (alt birim MW 20.2 kDa), *Sulfolobus tokodaii* strain 7'den St HSP 14.0 ve St HSP 19.7 (alt birim MW sırası ile 14 kDa ve 19.7 kDa) ve *Pyrococcus furiosus* 'dan Pfu-sHSP (alt birim MW 20 kDa) genleri *E.coli*'de klonalarak yüksek düzeyde ekspres edilmişlerdir [Kim, R.*et al.*, 1998; Laksanalamai, P *et al.*, 2001; Usui *et al.*, 2001; Haslbeck *et al.*, 2008]. Bunlar içerisinde özellikle MjHsp 16.5 'in yapısal özellikleri ayrıntılı olarak ortaya konulmuş olmakla birlikte arkea sHSP'lerin şaperon aktiviteleri ve hücrede protein katlanma sürecindeki rolleri, ayrıca termal stabilizasyon ve stres yanıtındaki işlevleri henüz tam olarak anlaşılabilir değildir. *S. tokodaii*, *M. jannaschii* ve *P. furiosus* 'dan klonlanan rekombinant sHSP'lerin yüksek sıcaklıklarda çeşitli protein substratların *in-vitro* termal kümeleşmesini önlediği, ancak düşük sıcaklıklarda, denatüre olmuş protein agregasyonunu önleyici etkilerinin yetersiz kaldığı rapor

edilmiştir [Kim, R. *et al.*, 1998; Laksanalamai, P *et al.*, 2001; Bova *et al.*, 2001; Haslbeck *et al.*, 2008; Usui *et al.*, 2001]. Genel olarak, sHSP'lerin etkileştikleri denatüre olmuş proteinleri yeniden katlama yani şaperon aktivitelerinin çok zayıf olduğu ya da hiç bulunmadığı kabul edilmektedir ve protein katlama aktivitelerini doğrulayan çok az sayıda rapor bulunmaktadır. Bu doğrultuda, *archaea*'da kimyasal olarak denatürlenmiş sitrat sentaz enzimi ile yeşil fuloresan proteinin (GFP) yüksek sıcaklıklarda ve ancak çok fazla miktarlarda sHSP varlığında katlanmalarının mümkün olabileceği yani yeniden katlama aktivitesinin yetersiz olduğu görülmüştür [Usui *et al.*, 2001; Haslbeck *et al.*, 2008]. Hipertermofili *archaea* dışında, soğuğa adapte olmuş bir *archaea* bakterisi olan *Methanococcoides butonii* 'de sHSP proteinin geni de yakın geçmişte klonlanmış ve bu proteinin denatüre olmuş substrat proteinlere güçlü bir şekilde bağlandığı, bu kompleksden proteinin ayırmada yine aynı organizmanın bir şaperonini olan Mb Cpn'nin etkili olduğu gösterilmiştir [Laksanalamai *et al.*, 2009].

Bu projede, ilk defa, ısıya orta düzeyde dayanıklı bir asidofilik *archaea* bakterisi olan *Thermoplasma volcanium*'da (*Tpv*) sHSP'leri *E.coli*'de rekombinant olarak üretilmiş ve şaperon (protein katlama) ve şaperon benzeri (protein kümleşmesini önleme) aktiviteleri çeşitli substrat proteinler kullanılarak çalışılmıştır. Projenin ikinci ayağında ise *Tpv* sHSP'in anti-stres sürecindeki yeri, farklı stres koşullarında (ısı şoku, oksidatif stres ve pH stres) gerçek zamanlı gen ekspresyonu (gen yazılımı ve protein sentezi) kinetiği çalışılarak araştırılmıştır. Böylece, ilk defa bu çalışma ile sHSP'lerin çeşitli stresörlere tepkileri ekspresyon profillerindeki (mRNA ve protein düzeylerinde) değişim belirlenerek ortaya konulmuştur.

2. Gereç ve yöntem

2.1. *Tpv* sHSP genlerinin *E.coli*'de klonlanması, ekspresyonu, pozitif klonların seçilmesi ve karakterizasyonu :

sHSP/775 ve sHSP/984 genlerinin pDrive vektör ile klonlanması:

Thermoplasma volcanium GSS1 genom DNAsı Kocabıyık ve Demirok (2009)' a göre izole edilmiş, daha sonra RNAase uygulaması ve fenol / kloroform ekstraksiyonu ile temizlenmiş ve iki küçük ısı şoku protein geninin (locus tag: TVN 0775 ve TVN0984) PCR ile çoğaltılması için kalıp olarak kullanılmıştır. Proteinlerin amino asit dizileri ve genlerin nükleotit dizileri NCBI veri bankasından elde edilmiştir. Küçük ısı şoku proteinlerinin ekspresyonu için kullanılan QIAGEN QIAexpressionist Kit'in protokolüne uygun olarak

herbir gen için translasyon başlangıç (ATG) kodunu içermeyecek şekilde birer ileri primer tasarlanmıştır. Geri primerler ise açık okuma çerçevesinin 3' ucunun sırası ile 72 bç ve 69 bç aşağısındaki dizilere tümleyici olarak tasarlanmışlardır. DNA'sından sHSP/775 ve sHSP/984 proteinini kodlayan genler PCR ile, $\geq 50^{\circ}\text{C}$ hibridizasyon derecelerinde çoğaltılmışlardır. Olası sHSP gen dizilerini içeren bu özgün iki ampikon agaroz jelden BIO 101 Systems-Gene Clean Kit (Q-BIOgene Corporation) aracılığı ile izole edilmiş ve pDrive klonlama vektörüne Klonlama Kit (QIAGEN, Qiagen Inc., Valencia, USA) protokolü izlenerek bağlanmıştır. Oluşturulan rekombinant plazmitler kompetan *E.coli* TG-1 konukçu hücrelerine transformasyon ile aktarılmıştır. Kompetan hücrelerin hazırlanması ve transformasyon Chung *et al* (1998)' a göre yapılmıştır. Transformasyondan sonra hücreler, mavi/beyaz koloni ayırımına göre rekombinantları belirlemek üzere, ampisilin, X-gal ve IPTG içeren LB agar ortamına ekilmiştir. Elde edilen beyaz koloniler (olası rekombinant hücreler) arasından tesadüfen seçilen 20 şer tanesinden plazmit izolasyonu (SV Mini Preps, Promega) yapılmıştır. Klonlanan genleri ve 3' translasyon yapılmayan dizileri içeren DNA fragmentinin "Restriction Mapper" programı aracılığı ile restriksiyon haritası çıkarılmıştır. Bu haritaya göre seçilen bazı kesim enzimleri ile plazmitlerin istenen gen bölgesini içerip içermediği belirlenmiştir.

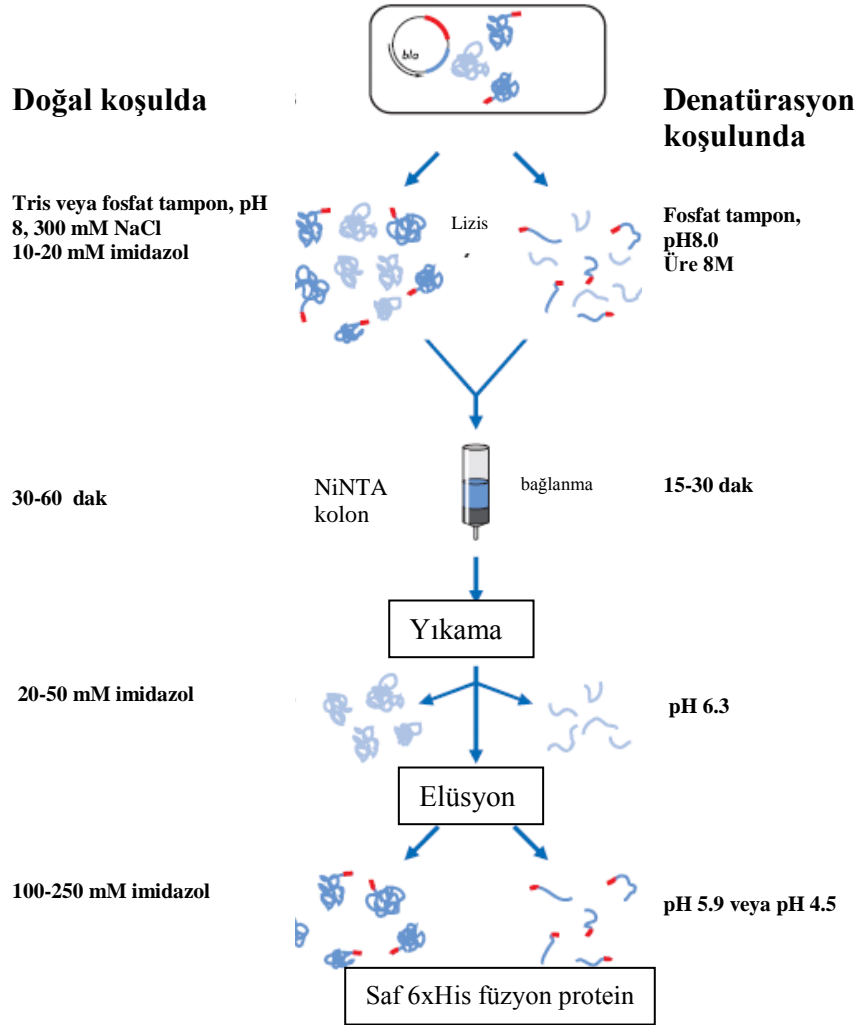
sHSP/775 ve sHSP/984 genlerinin 6xHis füzyon proteini olarak ekspresyonu:

Ekspresyon kiti (QIAGEN QIAexpress Detection and Assay Kit) yardımı ile üçlü pQE vektör seti kullanılarak sHSP proteinlerinin N-terminal 6xHis füzyonları oluşturulmuştur. Rekombinant pDrive/2-775 plazmitleri ve 3 farklı okuma çerçevelerine sahip pQE 30-31-32 vektörleri *Sal* I ve *Pst* I enzimleri ile kesilmiştir. Klonlanmış genler pDrive vektöründen *Pst* I ve *Sal* I enzimleri ile rekombinant p-Drive vektörlerden çıkartılmıştır. Gen fragmentleri agaroz jelden Kit aracılığı ile izole edilmiştir (BIO 101 Systems-Gene Clean Kit, Q-BIOgene Corp.). Gen uçlarındaki ve pQE ekspresyon vektörlerindeki aynı yapışkan uçlar sayesinde, pQE üçlü vektör setine bağlanmışlardır. Böylece genlerin N terminal ucunun pQE vektörlerindeki 6xHis bölgesinin aşağı (5') kısmına yerleşmesi sağlanmıştır. Rekombinant plazmitler daha sonra kompetan *E. coli* TG1 konukçu hücrelerine transformasyon ile aktarılmışlardır. Rekombinant kolonilerin tanısı için immunolojik tarama temelli bir "koloni blot-hibridizasyon" yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemle tanıma için 6x His ucuna özgü Anti-His HRP konjugatı (QIAGEN) kullanılmıştır. Konjugat 'Horse Raddish Peroxidase' enzimi içermektedir ve bu enzime özgü olan DAB (Roche) substratı kullanıldığında mavi renkli

sinyal oluşmaktadır. Pozitif klonlardan izole edilen rekombinant plazmitlerin yapısal analizi, restriksiyon enzim kesimleri/haritalanması ile yapılmıştır.

2.2. N-terminal 6xHis/sHSP-775 ve 6xHis/sHSP-984 füzyon proteinlerinin Ni-NTA afinite kromatografisi ile izolasyonu

Ekspresyonun başarılı olduğu rekombinant pQE-31/775 ve pQE-30/984 vektörlerini taşıyan *E.coli* klonlarının geliştirilen kültürlerinden hücre özütü sonikasyonla hazırlanmış ve saflaştırma, Ni-NTA ilgi kolonu kullanılarak Kit (The QIA Expressionist, QIAGEN GmbH, Germany) protokolü doğrultusunda “doğal ve/veya denatürasyon formda izolasyon” stratejisi izlenerek yapılmıştır (Şekil 1). Saflaştırılan proteinlerin moleküler ağırlıkları SDS-Poliakrilamit Jel Elektroferez ile belirlenmiştir.



Şekil 1. QIAExpressionist Kiti kullanılarak Ni-NTA kromatografisi ile saflaştırma stratejisi.

Doğal koşullarda izolasyon için, rekombinant *E.coli* pQE-31/775 ve *E.coli* pQE-30/sHSP/984 hücrelerinin LB ortamında kültürleri logaritmik faza kadar 37 °C 'de geliştirilmiş, protein ekspresyonu için IPTG ile indüklenmiştir. Daha sonra hücreler 4,000 xg 'de santrifüjle çöktürülmüştür. Hücre peleti 1/10 vol. lizis tamponunda çözülüp sonikasyon ile parçalanmıştır. Lizat 10,000 xg 'de + 4 °C'de santrifüjlenmiş ve süpernatant (hücre özütü) -20 °C'de saklanmıştır. Ni-NTA agaroz kolonda saflaştırma için Ni-NTA agaroz, hücre özütü ile karıştırılıp kolona dökülmüştür. Kolondan akan örnekler toplandıktan sonra, kolon yıkama tamponu ile yıkanmış, ve elüsyon çeşitli konsantrasyonlarda imidazol (50-250 mM) içeren elüsyon tamponları ile yapılmıştır.

Rekombinant sHSP/984 proteininin denatürasyon koşullarında izolasyonu için hücreler, doğal koşullarda saflaştırma için izlenen protokolda olduğu gibi geliştirilmiş, ancak hücre lizati 8 M üre içeren tamponda hazırlanmıştır. Ni-NTA agaroz kolonun hazırlanması doğal koşullarda izolasyon için açıklandığı şekilde yapılmıştır. Elüsyon ise 8 M üre içeren tamponlar (pH 5.9 ve 4.5) ile yapılmıştır. İzolasyon süreçleri jel elektroforez ile izlenmiştir

2.3. Ekspresyonu gerçekleştirilen genlerin dizilerinin belirlenmesi:

Hizmet alımı olarak MicrosynthAG firmasına yaptırılmıştır.

2.4. Şaperon benzeri aktivite ölçümü:

Substrat olarak domuz kalibi orijinli sitrat sentaz enzimi (Sigma) ve sığır glutamik dehidrogenaz enzim (Sigma) kullanılmıştır. Bu çalışmalarda, her iki enzim örneği (0.18 U) sHSP/775 varlığında (100-200 µg/ml) ve yokluğunda (kontrol) 45-53 °C'de 10 dak ısıtılmış ve bu örneklerin kalan aktiviteleri ölçülmüştür. Sığır glutamat dehidrogenaz (boGDH) enzim aktivite tayini üretici firma (Sigma) protokolünde önerildiği şekilde, 25 °C 'de yapılmıştır. Bu yöntemde aktivite ölçümü NADH oksidasyonunun 340 nm'de absorpsiyondaki azalmayı ısı kontrollü UV-Visible spektrofotometrede (Schimadzu) sürekli şekilde, 5 ila 10 dak boyunca ölçmek yolu ile yapılmıştır. Sitrat sentaz enzim aktivite 35 °C'de DTNB yöntemi kullanılarak [Srere *et al.*,1963] yapılmış olup, bunun için ısı kontrollü spektrofotometrede 412 nm de absorpsiyonda artış 5 ila 10 dak boyunca ölçülerek izlenmiştir. Pozitif kontrol olarak ısı uygulaması yapılmamış enzimin aktivitesi ölçülmüştür.

Substrat proteinler ayrıca kimyasal olarak (guanidinyum klorür, GdnCl ile) 60 dak boyunca denatüre edilmiştir. Çeşitli konsantrasyonlarda sHSP varlığında ve yokluğunda aktivitenin

tekrar kazanımı, denatüre edilmiş enzim 100-kat seyreltilip 25 °C de 2 saat inkübe edildikten sonra, spektrofotometrik olarak yukarıda açıklandığı şekilde belirlenmiştir [Buchner *et al.*, 1998].

2.5. Rekombinant sHSP/775 proteininde strese bağlı yapısal değişimin belirlenmesi:

Bu amaçla iki farklı yaklaşım izlenmiştir:

2.5.1. sHSP/775'in oligomerik yapısında ısıya bağlı konformasyonel değişimin fulorimetrik analizi

Isıya bağlı sHSP/775 proteinindeki konformasyonel değişme (dimerlere ayrışma ya da oligomer büyüklüğünün değişmesi), bis-ANS'e (4,4-dianilino-1,1'-binaphthyl-5,5'-disulfonic acid, dipotassium salt) bağlanma etkinliğindeki değişme ile izlenmiştir. Bis-ANS proteinlerin hidrofobik yüzeylerine bağlanan bir fuloresan boyadır. Isı indüklenmesi ile yapısal değişikliğe uğrayan sHSP'lerin hidrofobik yüzeylerinin açığa çıkmasının substrat bağlama kapasitelerini arttıracığı öngörüsü ile, farklı sıcaklıklarda ön ısıtma uygulanan sHSP örneklerine bis-ANS ilave edildikten sonra, ısı kontrollü bir spektrofulorimetre (Varian) ile 450-650 nm arasında fuloresan spektra taraması yapılmıştır.

2.5.2. Transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) ile yapısal incelemeler

Saflaştırılmış rekombinant sHSP örneklerinin oda sıcaklığı ve organizma için sub-optimum olan ve ısı-şoku etkisi gösteren 65 °C 'de uranil asetat (2 %) ile negatif boyama sonrası görüntüleri TEM (FEI Technai 10 electron microscope) ile 80 kV ve 2kx2k side-mounted Veleta CCD kamera (Olympus Soft Imaging Solutions) ile alınmış ve analiz edilmiştir.

2.6. sHSP'lerin Strese Bağlı Gen Anlatım Kinetiğinin Nicel Gerçek Zamanlı PCR ile

İncelenmesi:

***T. volcanium*'dan total RNA izolasyonu:**

T. volcanium kültürleri ayrı ayrı ısı (65 °C ve 70 °C), pH (pH 4.0 ve 5.0) ve oksidatif stress (0.01 mM ve 0.05 mM H₂O₂) de, iki saat boyunca strese maruz bırakılıp, 30 dak aralıklarla alınan örneklerden RNA izolasyonu, RNeasy Mini Kit (QIAGEN GmbH, Germany) kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca, her bir deneyde, kontrol olarak, her bir zaman dilimi için

strese maruz bırakılmayan kültürlerden (60 °C gelişme sıcaklığı, pH 2.0) alınan örneklerden de RNA izolasyonu yapılmıştır.

Tümleyici DNA (cDNA) sentezi:

Aynı miktarlarda kontrol ve test RNA örneklerinden cDNA üretimi M-MuLV Reverse Transcriptase (Roche Diagnostics GmbH) ile enzim protokolünde belirtildiği şekilde ve tasarlanan gene özgü geri primerler (RP) kullanılarak yapılmıştır. Primerler, TIB, MOLBIOL, Syntheselabor GmbH tarafından sentezlenmiştir. cDNA reaksiyon karışımı toplam 25 µl hacim içerisinde :

0.4 µM geri primer, 400 µM dNTP karışımı,

1 µg RNA ,

5 µl MMuLV Reverse Transkriptaz tamponu ve

1 µl MMuLV Reverse Transkriptaz içerecek şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 1. cDNA sentezi için kullanılan primerler

cDNA primerleri	Primer Dizisi
TVN0775 primeri	RP-775 5'- CTAAGTGTAAAGTATGCCTTCAC-3'
TVN0984 primeri	RP-984 5'- GTATAGAGACCTTTCTGCCAC-3'

Nicel Gereçek Zamanlı PCR:

Gerçek zamanlı PCR deneyleri, kontrol ve ısı şoku koşullarında izole edilen eşit miktardaki RNA örneklerinden hazırlanan cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak, LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit'i (Roche Diagnostics GmbH, Germany) ile ve Kit protokolü izlenerek, LightCycler 1.5 (Roche) cihazında yapılmıştır. Bu deneylerdeki başlıca adımlar aşağıda verilmiştir:

Pre inkübasyon: 95 °C 15 dak

Amplifikasyon:

Denatürasyon 95 °C 10 san

Hibridizasyon 60 °C 10 san

Sentez 72 °C 10 san

“Melting” eğrisi:

Denatürasyon 95 °C 0 san

Hibridizasyon 65 °C 15 san

“Melting” 72 °C 10 san

Soğuma: 40 °C 30 san

RT-PCR'da kullanılan ileri ve geri primerlerin dizileri, TIB, MOLBIOL, Syntheselabor GmbH tarafından sentezlenmiştir (Tablo 2).

Deneylerin validasyonu denatürasyon eğrisi ya da "Tm analizi" ile yapılmıştır. Her bir RNA örneği için deneyler optimize edilmiş koşullarda en az 2-3 kez tekrarlanmıştır.

RT-PCR sonuçları, bir göreceli kantitasyon metodu olan $2^{-\Delta\Delta T}$ yönteminin bir varyasyonu kullanılarak analiz edilmiştir [Livak and Schmittgen, 2001]. Bu yöntemle kontrollere göreli olarak testlerde gen ekspresyon düzeyinde kaç kat değişiklik meydana geldiği bulunmuş ve sonuçlar grafik olarak gösterilmiştir.

Tablo 2. Gerçek zamanlı PCR için kullanılan primerler

cDNA primerleri	Primer Dizisi
TVN0775 primerleri	Geri primer Rp- 5'- GCTTCCAATACCAGATCAGAGC -3' İleri primer Fp-5'- ACTGTGAAAGAGGTCTCATCCTTT-3'
TVN0984 primerleri	Geri primer Rp- 5'- TGTAGTCGAAGTCAATGCTCTTG -3' İleri primer Fp-5'- TTACGCTTAACGTGGACGAA -3'

2.7. Strese Bağlı Protein Sentezindeki Değişimin in Western Aktarım/Hibridizasyon Tekniği ile İncelenmesi

İndülenmenin belirlendiği stres koşullarında geliştirilen *T. volcanium* hücreleri 5,000 xg'de 10 dak santrifüjle çöktürülüp, hücreler "50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA" tamponda çözülüp sonikasyonla parçalanmıştır. 20, 000 xg'de 30 dak santrifüjden sonra elde edilen süpernatandaki proteinler SDS-PAGE ile ayrıştırılmış ve 1 bir "semi-dry blotter" (BIO-RAD) ile PVDF membrana transfer edilmiştir. Millipore (Application Notes) ve BIO RAD (TransBlot SD/Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, BioRad, Instruction Manual) jel transfer ve Western aktarım/ hibritleme protokolleri izlenmiştir.

Ticari olarak *archaea* sHSP'ye özel antikor mevcut olmadığı için insan ve sıçan kökenli sHSP20 proteinlerine özgün antikorlar kullanılmıştır. Genel olarak küçük ısı şoku proteinlerinde alfa kristalin bölgelerinin korunmuş olması nedeni ile bu antikor ile "cross immün" tanımanın mümkün olabileceği düşünülmüştür. Antikor biyotininle işaretlenmiş

(Biotin Labelling Kit, Roche) ve hibridizasyondan sonra membranda pozitif sinyallerin belirlenmesi Streptavidin-AP konjugat ile uygun kromojenik substrat (NBT/BCIP)/ belirteçler kullanılarak yapılmıştır. Bu deneylerde Kit protokolleri esas alınmıştır. Kontrol olarak saflaştırdığımız *T. volcanium* rekombinant sHSP/775 kullanılmıştır.

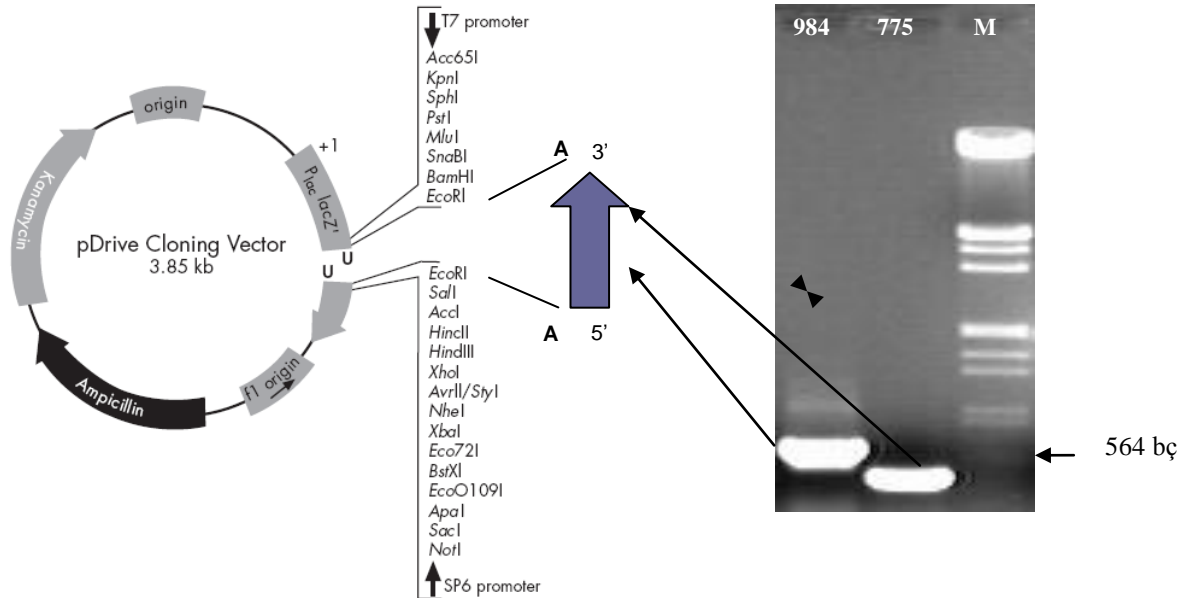
3. Bulgular

3.1. sHSP genlerinin klonlanması, ekspresyonu ve karakterizasyonu

sHSP/775 ve sHSP/984 genlerinin pDrive vektörde klonlanması ve rekombinantların karakterizasyonu:

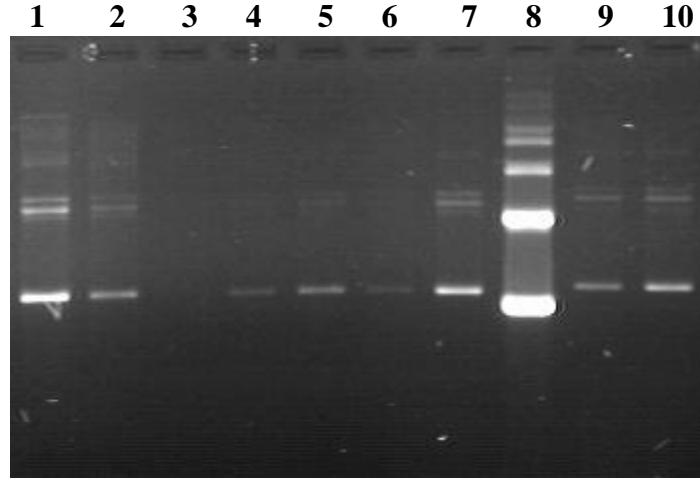
İleri ve geri primer setleri (FP2/RP-775 ve FP2/RP-984) kullanılarak, *T. volcanium* kromozomal DNA'sından sHSP/775 ve sHSP/984 proteinini kodlayan genler PCR ile, sırasıyla 447 bp ve 618 bp büyüklüğünde DNA parçaları olarak çoğaltılmışlardır. Olası sHSP gen dizilerini içeren bu iki ampikon agaroz jelden izole edildikten sonra pDrive klonlama vektörüne bağlanmıştır (Şekil 2).

Transformasyondan sonra elde edilen beyaz koloniler (olası rekombinant hücreler), rekombinantları belirlemek üzere, plazmit izolasyonu yapılmış ve bu plazmitlerin bazılarının agaroz jel görüntüleri Şekil 3' de verilmiştir.



Şekil 2. sHSP genlerinin pDrive vektöre klonlanma stratejisi. *T. volcanium* genom DNA'sından PCR ile çoğaltılmış gen fragmentleri TA bağlama yöntemi ile pDrive vektöre eklenmiştir. M: *Hind III/ Eco RI* ile kesilmiş λ DNAsı

Klonlanan DNA fragmentlerinin restriksiyon haritası Tablo 3’de görülmektedir. TVN0775 geni içermemektedir. pDrive vektörde ise *EcoRI* kesim bölgesi MCS’in başı ve sonunda bulunmaktadır. Bu nedenle pDrive/2-775 plazmitinin *EcoRI* ile kesiminin 3851 bç (vektör) ve 447 bç (gen) büyüklüğünde iki bant oluşturması beklenmektedir ve agaroz jeldeki kesim profili bu beklentiyi doğrulamıştır (Şekil 4).

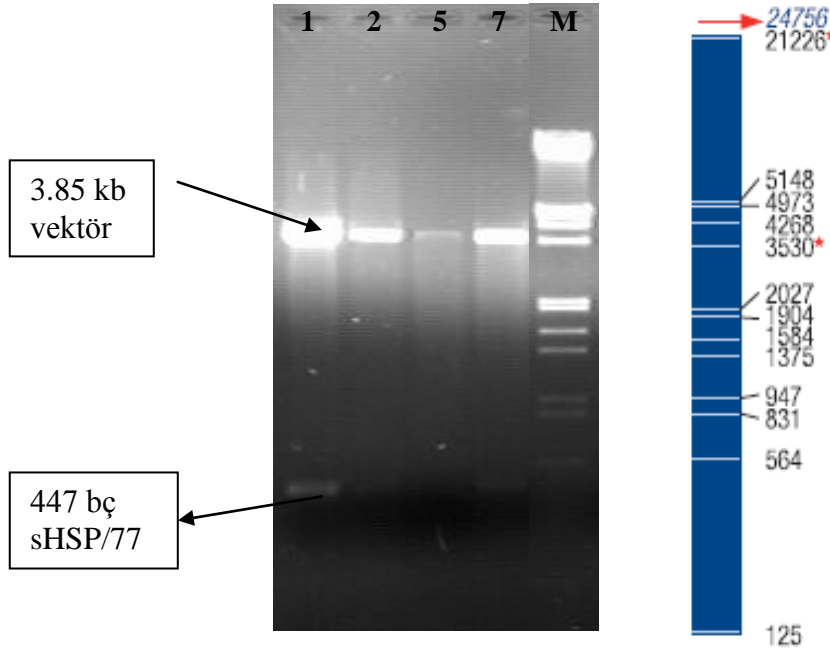


Şekil 3 . Olası TVN0775 (sıra: 1 - 6) ve TVN 0984 (sıra 8 - 10) rekombinant plazmitler

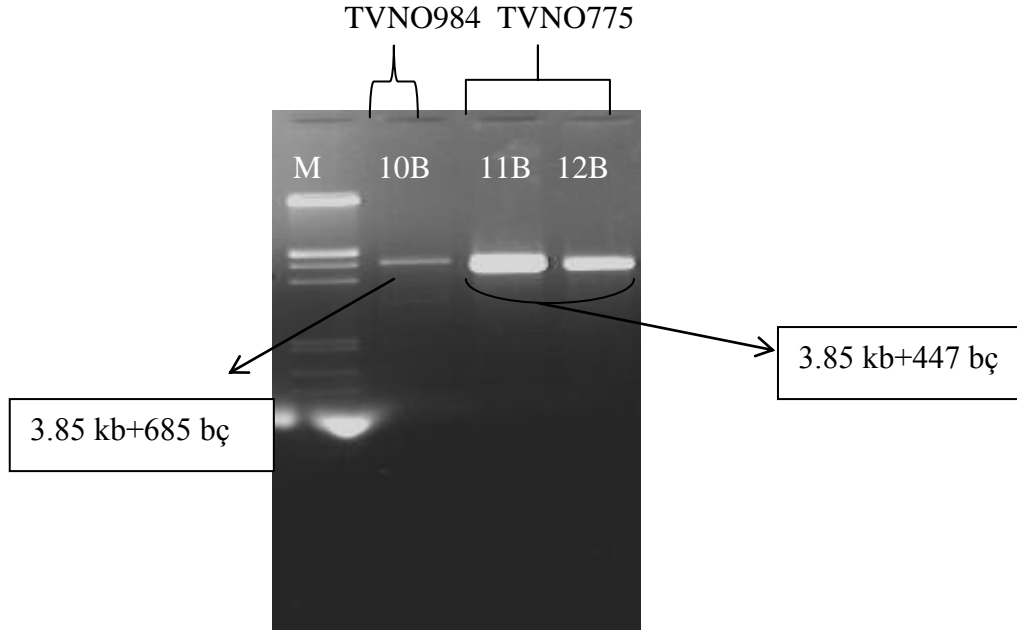
BamHI enzimi sadece pDrive vektörünün MCS içinde kesim bölgesine sahiptir ve bu enzim ile kesim pDrive-1/775 ve pDrive-7/ 984rekombinant vektörlerini düzleştirmiştir (Şekil 5). *Pst I/SalI* kesimi geni vektörden çıkarmış, *HincII* kesimi ise 255 bç ve 4,082 bç fragmentler oluşturmuştur (Şekil 6). pDrive-7/ 984rekombinant vektörün *Eco31I* ile kesimi 2040 ve 2360 bç büyüklüğünde 2 fragment oluşturmuştur (Şekil 6). Beklenen restriksiyon enzim kesim profiline sahip oldukları için p/Drive-1/775 ve p/Drive-7/985 plazmitlerini içeren rekombinant *E.coli* klonları ekspresyon için alt klonlamada kullanılmak üzere seçilmiş ve bu klonlardan yeni plazmit izolasyonları yapılmıştır.

Tablo 3. pDrive vektörde klonlanan sHSP gen fragmentlerinin restriksiyon haritası.

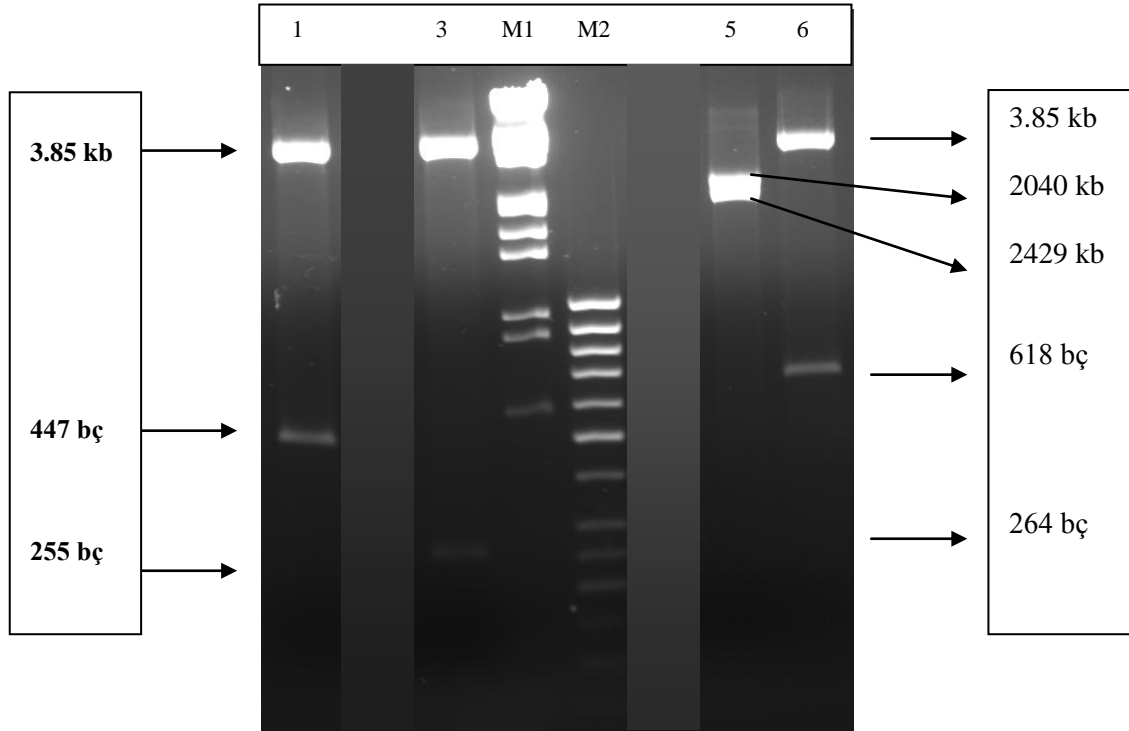
sHSP 775			sHSP 984		
Restriksiyon enzimi	Kesim bölgesi	Kesim sayısı	Restriksiyon enzimi	Kesim bölgesi	Kesim sayısı
<i>Hind</i> II(veya <i>Hinc</i> II)	243	1	<i>EcoRV</i>	362	1
<i>Cla</i> I	230		<i>Stu</i> I(veya <i>Eco</i> 1471)	249	1
<i>Eco</i> 3II	69, 168	2	<i>Hph</i> I	255	1
<i>Pst</i> I		-	<i>Eco</i> RI	52, 211	2
<i>Sal</i> I		-	<i>Cla</i> I	74, 350	2
<i>Bam</i> H I		-	<i>Acc</i> I	308	1
			<i>Pst</i> I		-
			<i>Sal</i> I		-
			<i>Bam</i> H I		-
			<i>Hind</i> III		-



Şekil 4. pDrive/775 olası rekombinant plazmitlerin (sıra: 2, 5, 7) agaroz jel elektroforez ile elde edilen *Eco*RI kesim profili. M: *Hind* III/ *Eco* RI ile kesilmiş λDNAsı



Şekil 5. TVNO775 ve TVNO984 rekombinant plazmitlerin *BamH* I ile kesimi, M: *Hind* III/ *EcoR* I ile kesilmiş λ DNAsı

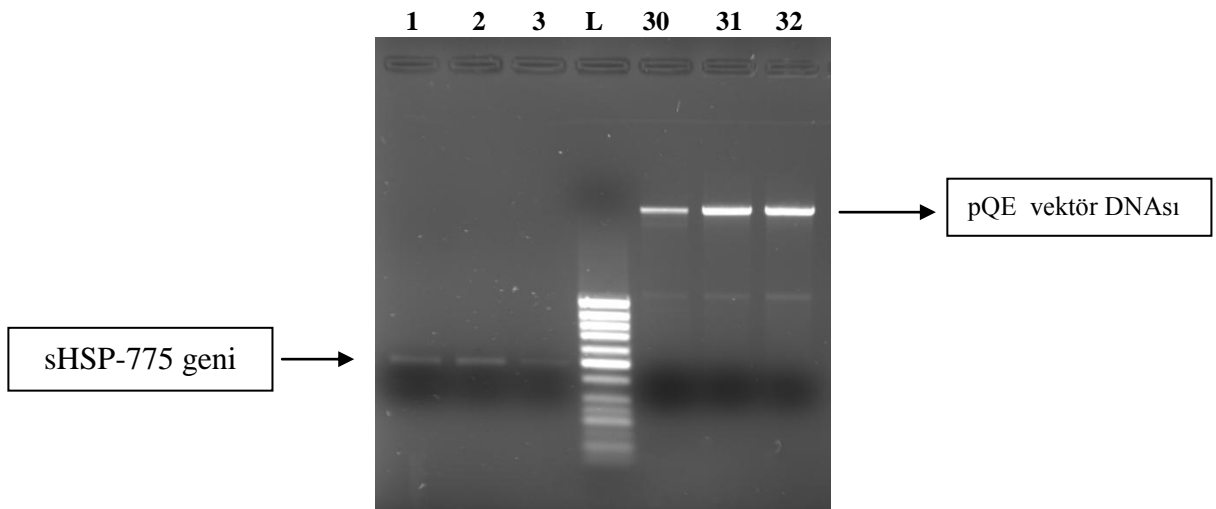


Şekil 6. pDrive-1/775 ve pDrive-7/984 rekombinant plazmitlerin çeşitli restriksiyon enzimleri ile kesim profilleri. pDrive-1/ 775 plazmitin **sıra 1:** *Pst*I/*Sal*I, **sıra 3:** *Hinc*II ile kesim profilleri. pDrive-7/ 984 plazmitin, **sıra 5:** *Eco*31 I, ve **sıra 6:** *Pst* I/*Sal* I ile kesim profilleri. **M1:** *Hind* III/ *Eco*RI ile kesilmiş λ DNAsı; **M2:** 100 bp DNA Ladder, Fermentas.

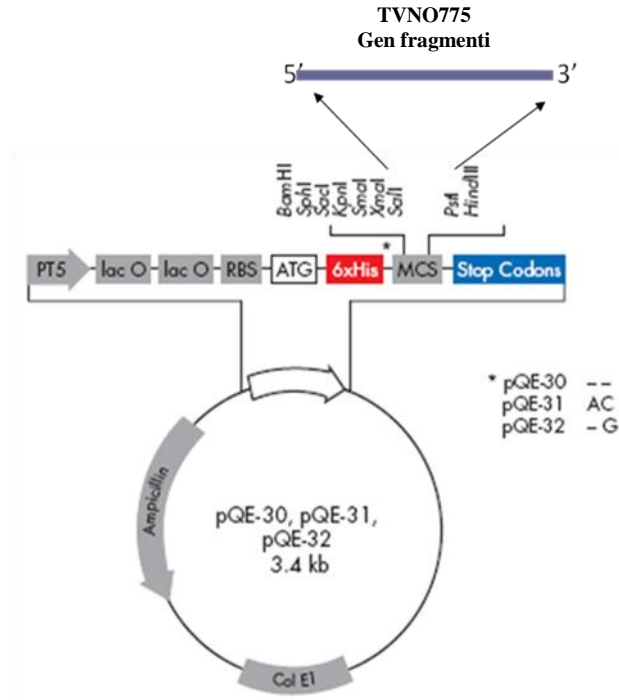
Rekombinant sHSP/775 ve sHSP/984 genlerinin pQE üçlü vector setine alt klonlanması, rekombinantların seçimi ve karakterizasyonu:

Rekombinant pDrive/2-775 plazmitleri ve 3 farklı okuma çerçevelerine sahip pQE 30-31-32 vektörleri *Sal I* ve *Pst I* enzimleri ile enzimleriyle kesilmiştir. Bu enzimlerle kesim sonucu, düzleştirilmiş pQE vektör DNAsı ve p-Drive vektörlerden çıkartılan klonlanmış gen fragmentleri agaroz jelden izole edilmiştir (Şekil 7). Daha sonra genler ekspresyon vektörlerinde aynı yapışkan uçlar ile bağlanmışlardır (Şekil 8). *E. coli* TG1 konukçu hücrelerine transformasyon ile aktarımdan sonra rekombinant koloniler, “koloni blot-hibridizasyon” yöntemi ile, Anti-His HRP konjugatındaki enzime özgü olan DAB substratı kullanıldığında renkli sinyal oluşturmaları ile belirlenmiştir. Rekombinant sHSP-775 geni ile yapılan bu alt klonlama deneylerinde rekombinant pQE-31 vektörünü içeren koloniler güçlü ekspresyon sinyalleri vermiştir (Şekil 9). Bu sonuç, pQE31 anlatım vektöründe klonlanan sHSP-775 geninin doğru açık okuma çerçevesinde bulunduğunu ve 6xHis grubunun ATG kodunu kullanılarak bir füzyon proteini olarak sentezlendiğini göstermiştir.

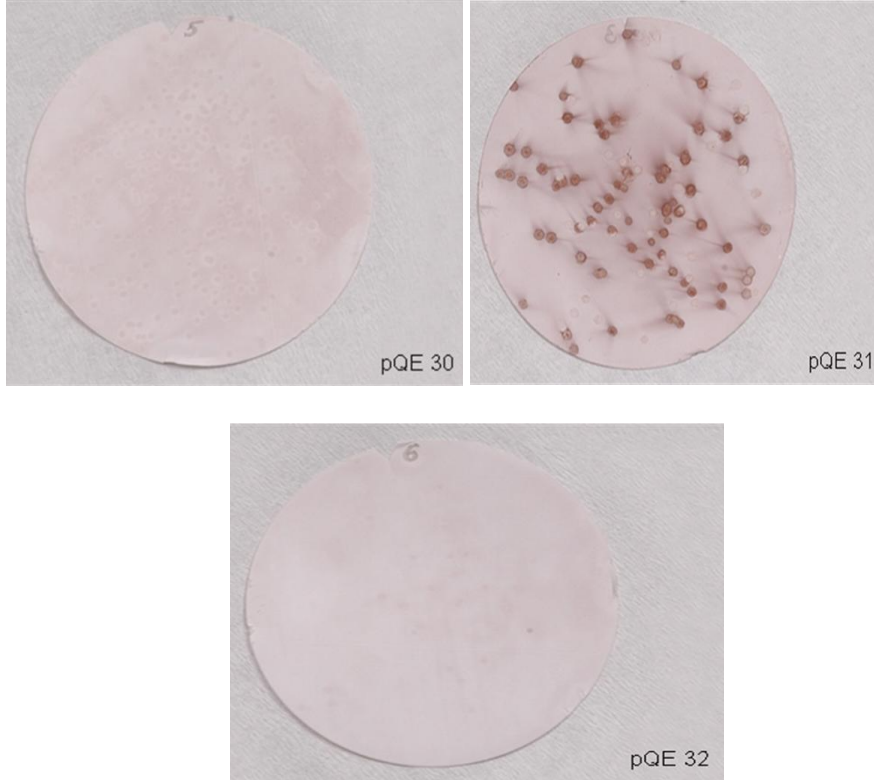
Pozitif klonlardan plazmit izolasyonu yapılmış (Şekil 10) ve bu olası rekombinant plazmitlerin (3.4 kbç pQE + 447(+42bp)sHSP/775 geni= 3889 bç recombinant plazmit) restriksiyon enzimleri ile kesilerek karakterizasyonu yapılmıştır. *PstI* ve *SalI* kesimi ile klonlanmış TVNO775 geni 489 bç DNA fragmenti olarak vektörden çıkarılmıştır (Şekil 11 A). *HincII/Hind III* kesimi ile 237 bç ve 3652 bç büyüklüğünde iki fragment elde edilmiştir (Şekil 11B). Bu kesimler TVNO775 geninin beklenen yönde pQE vektöre klonlanmış olduğunu göstermektedir.



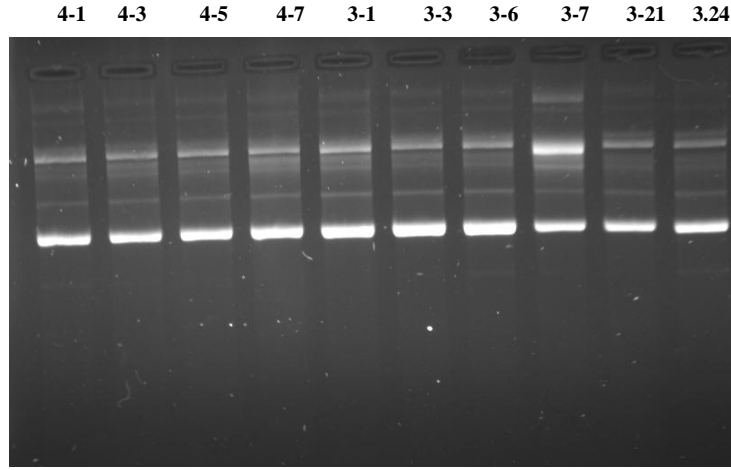
Şekil 7 .pQE vektörlerin (30,31,32) ve pDrive-1/775 plazmitinden TVN0775 geninin (1,2,3) jelden izolasyonu. L: GeneRuler 50bp DNA Ladder, Fermentas.



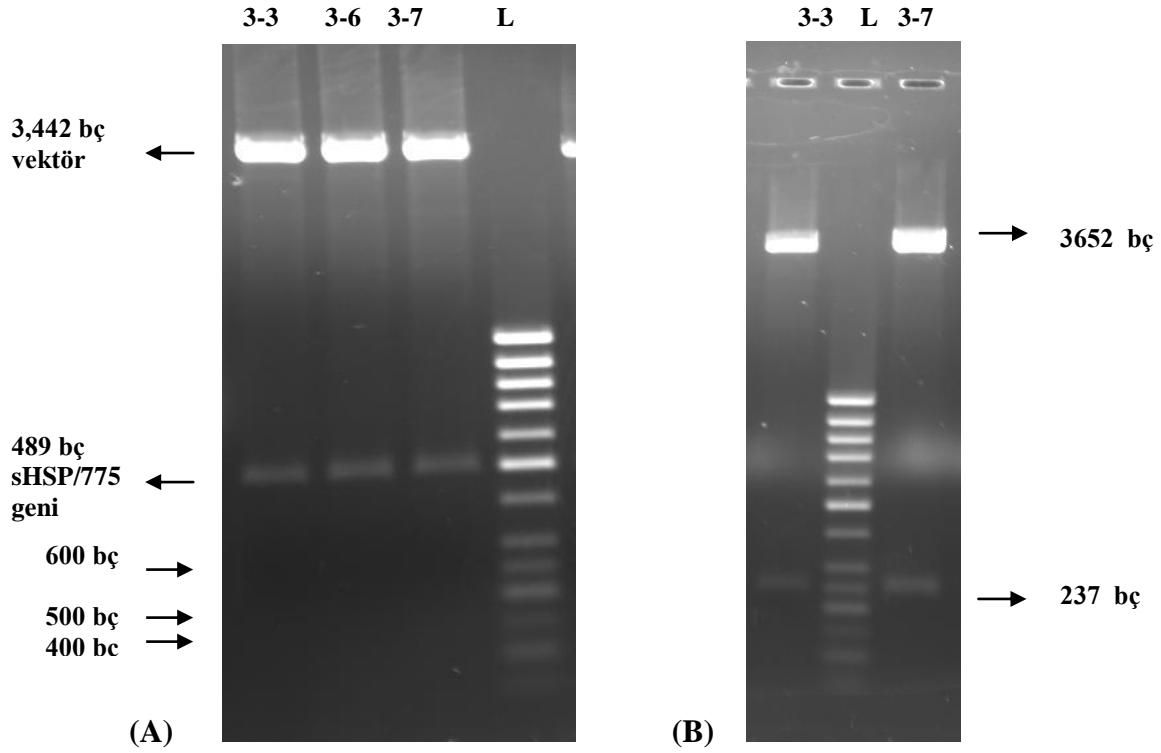
Şekil 8. pDrive/ 2-775 plazmitinden çıkarılan TVN0775 geninin pQE vektörlere *Sal I/Pst I* kesim bölgelerinde klonlanması.



Şekil 9. pQE/775 transformantların koloni hibritlemeyen sonraki membran resimleri



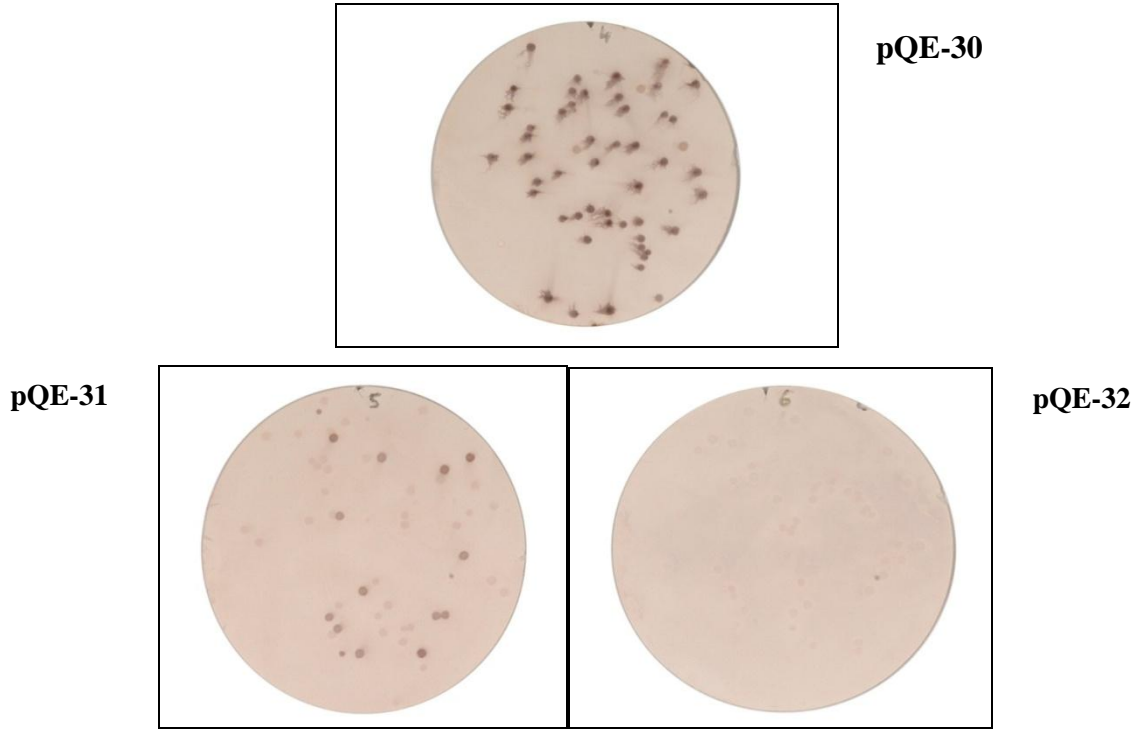
Şekil 10. pQE-31 vektörüne klonlanan TVNO775 genini içeren rekombinant plazmitlerin izolasyonu.



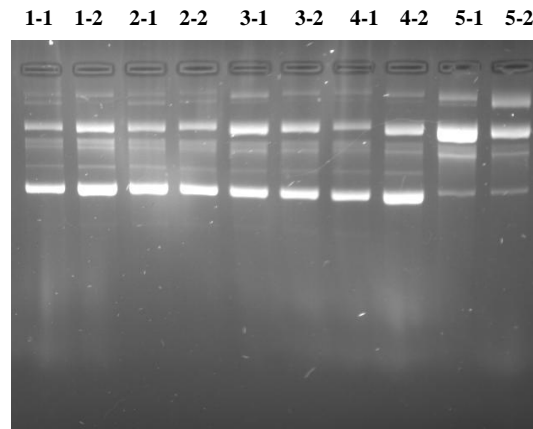
Şekil 11. pQE-31/775 rekombinant plazmitlerinin (A) *SalI/Pst I* (Sıra: 3-3, 3-6, 3-7) ve (B) *Hinc II/Hind III* ile kesim profilleri. L: GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Fermentas.

Rekombinant sHSP-984 geninin pDrive/7-984 plazmitlerinden izolasyonu ve pQE üçlü vektör setine alt klonlaması yukarıda sHSP 775 geni için açıklandığı şekilde yapılmıştır. Bu klonlama deneylerinde rekombinant pQE-30 vektörünü içeren kolonilerden güçlü ekspresyon

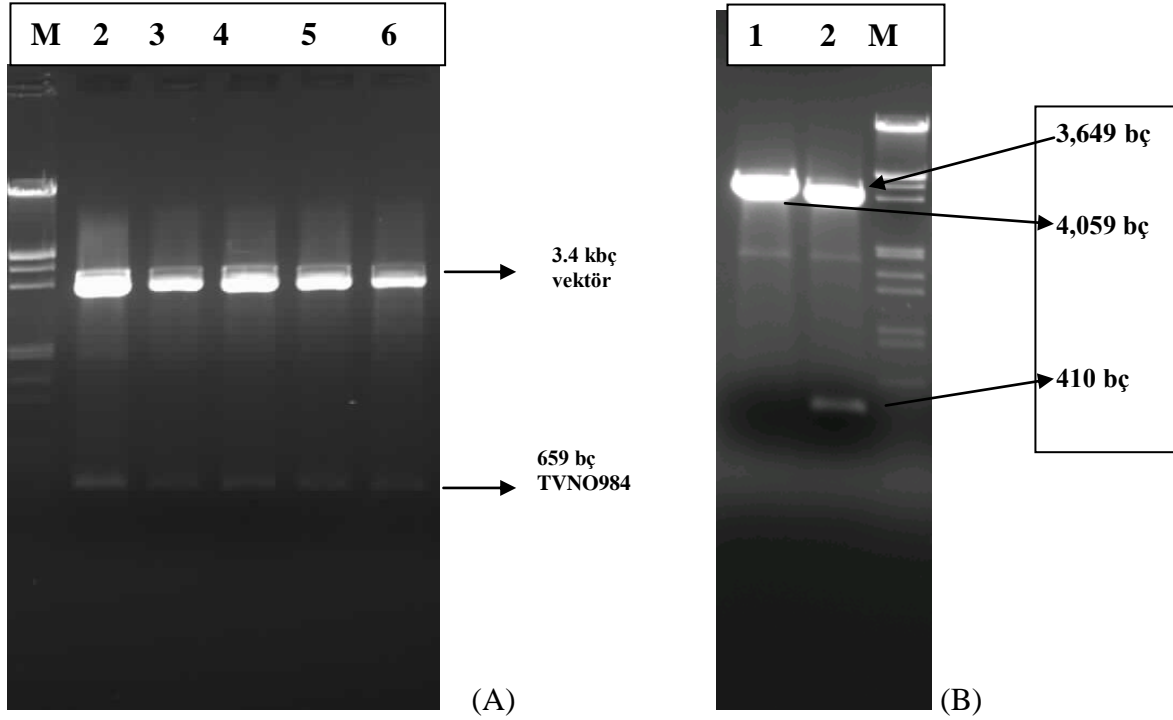
sinyalleri elde edilmiştir (Şekil 12). Bu sonuç, pQE-30 anlatım vektöründe klonlanan sHSP-984 geninin doğru açık okuma çerçevesinde bulunduğunu ve 6xHis grubunun ATG kodunu kullanılarak bir füzyon proteini olarak sentezlendiğini göstermektedir. Rekombinant pQE-30/984 plazmitleri restriksiyon enzimleri ile karakterizasyon için izole edilmişlerdir (Şekil 13). *Pst* I ve *Sal* I kesimi ile klonlanmış TVNO984 geni 659 bç fragment olarak vektörden çıkarılmıştır (Şekil 14 A). *Hind* III ile kesim rekombinant plazmiti düzleştirmiş (4,059 bç), *Hind* III/*Stu* I çift kesimi ile ise 410 bç ve 3,649 bç uzunluğunda iki fragment vermiştir (Şekil 14 B). Bu kesim profilleri ile klonlama doğrulanmıştır.



Şekil 12. pQE/984 transformantlarının koloni hibritlemeye tabii koloni resimleri



Şekil 13. pQE-30 vektörüne klonlanan TVNO984 genini içeren rekombinant plazmitlerin izolasyonu



Şekil 14. pQE-30/984 rekombinant plazmitlerinin (A) *SalI/Pst* I (sıra 2-6) ve (B) *Hind* III (sıra 1) ve *Stu* I (Eco 1471) / *Hind* III (sıra 2) kesim profilleri, M: *Hind* III/ *EcoRI* ile kesilmiş λ DNAsı, Fermentas.

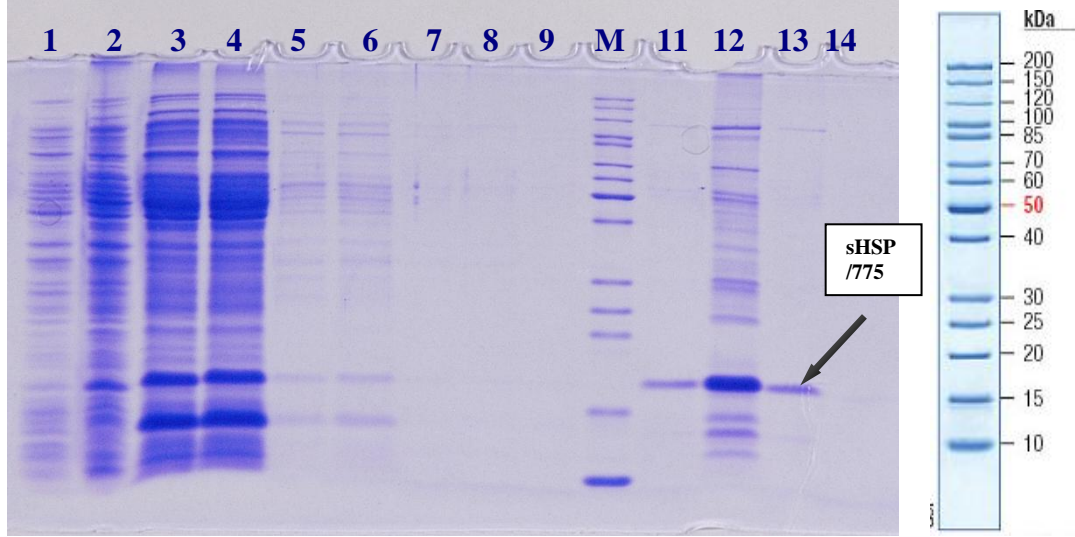
3.2. N-terminal 6xHis/sHSP-775 füzyon proteinin doğal formda Ni-NTA affinite kromatografi ile izolasyonu:

Rekombinant pQE-31/775 vektörünü taşıyan klonlardan N-terminal 6xHis/ sHSP-775 füzyon proteini Ni-NTA affinite kromatografisi ile doğal formda izole edilmiştir. İzolasyonda elde edilen sHSP-775 protein örneklerinin SDS-PAGE 'deki görüntüleri Şekil 15 'de verilmiştir. Elüsyon örneklerinde sHSP/775 proteinine ait 14 kDa civarında beklenen bant belirgin olarak gözlenmiştir. Özellikle ikinci elüsyon fraksiyonunda sHSP-775 füzyon proteinine ait band en kalındır. Birinci ve üçüncü elüsyon fraksiyonlarında ise aynı pozisyonda daha ince ancak tek bant gözlenmiştir. Bu sonuç rekombinant sHSP-775 proteininin başarılı bir şekilde saflaştırıldığını göstermiştir.

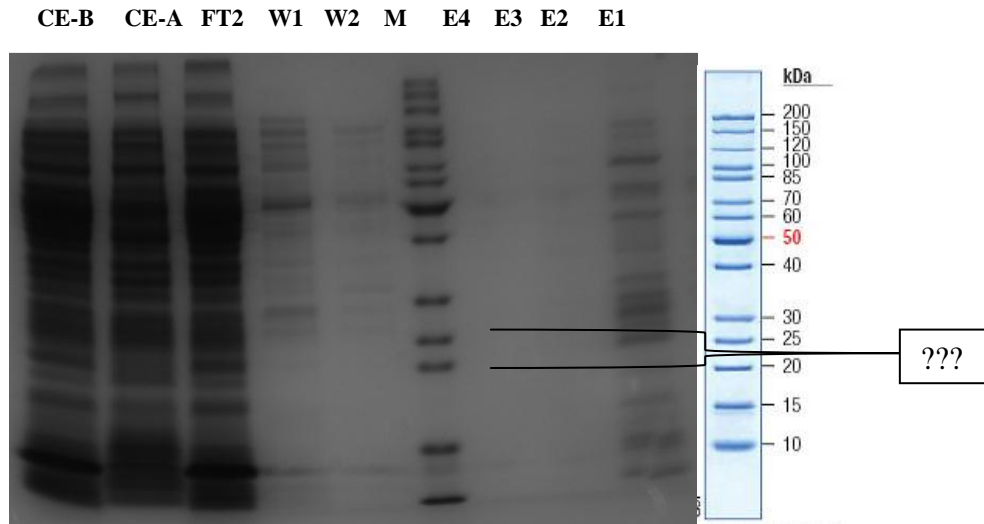
3.3. N-terminal 6xHis/sHSP-984 füzyon proteininin Ni-NTA kromatografi ile izolasyonu

Rekombinant pQE-30/984 vektörünü taşıyan klondan 6xHis/ sHSP-984 proteininin Ni-NTA affinite kromatografisi ile doğal olarak izolasyonunda elüsyon standart protokolde olduğu gibi, tek aşamalı olarak 250 mM imidazol varlığında yapılmıştır. Ancak elüsyon örneklerinde

sHSP/984 proteininin 21 kDa civarında olması beklenen bandı elde edilememiştir. Aynı koşullarda yürütülen 3 farklı izolasyondan birisine ait jel fotoğrafı Şekil 16’da görülmektedir.



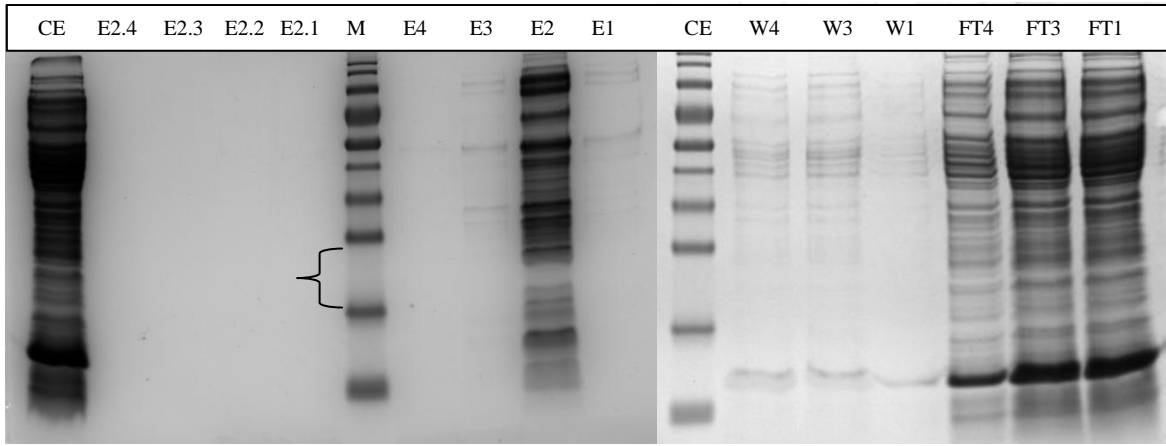
Şekil 15. sHSP/775 proteininin izolasyonunun SDS-PAGE analizi. Sıra 1: IPTG indüklenmesi öncesi, Sıra 2: IPTG indüklenmesi sonrası, Sıra 3: kolondan akan/ I, Sıra 4: Kolondan akan/II, Sıra 5 ve 6: Birinci aşama yıkamalar (II ve IV), Sıra 7-9: İkinci aşama yıkamalar (VI –VIII), Sıra 10: Page Ruler Protein Ladder (unstained) (Fermentas), Sıra 11: Elüsyon I, Sıra 12: Elüsyon II, Sıra13: Elüsyon IV, Sıra14: Elüsyon IV.



Şekil 16. Rekombinant TVN0984 proteininin Ni-NTA kromatografi ile izolasyonu. sHSP'nin beklenen bandının pozisyonu (25-20 kDa arası) okla gösterilmiştir. CE-B: hücre özütü, ısı işlemi öncesi, CE-A: hücre özütü ısı işlemi sonrası; FT: kolondan akan; W: yıkama; M: protein standart; E: elüsyon. Standart protein: Presatined Ladder, Fermentas.

sHSP/984 proteininin izolasyonunun doğal koşullarda başarısız olması üzerine elüsyonda kullanılan imidazol konsantrasyonunun (250 mM) yetersiz olabileceği düşünülerek

300 mM ve 400 mM imidazol içeren elüsyon tamponları ile doğal koşullarda izolasyon tekrar edilmiştir. Saflaştırma süreci fraksiyonların jel elektroforezde verdiği bantlar yolu ile izlenmiştir (Şekil 17). Bant profilinden de görüleceği üzere, beklenen pozisyonda bir bant elde edilememesi, elüsyon probleminin imidazol konsantrasyonundan kaynaklanmadığını göstermektedir. Ayrıca, hücre özütünde de beklenen büyüklükte belirgin bir protein bandı görülmemiştir. Bu sonuca göre, doğal formda sHSP/984 proteininin stabil olmadığı ya da agregat yaptığı (inclusion body) düşünülmüştür. Bu nedenle izolasyonun denatürasyon koşullarında denenmesine karar verilmiştir.



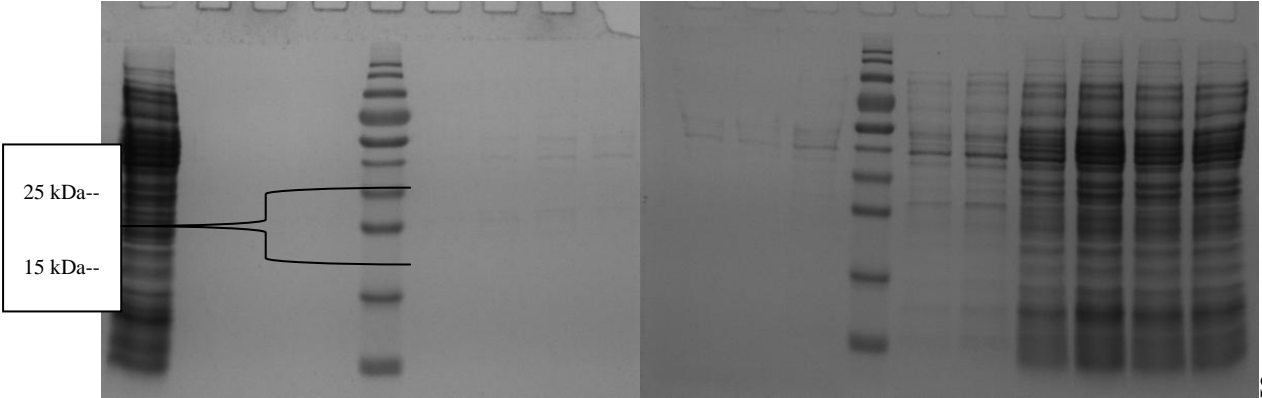
Şekil 17. Doğal olarak sHSP/984 proteininin Ni-NTA kolon ile izolasyonu. CE: hücre özütü, E1-4: 300 mM imidazol ile elüsyon, E2.1-E2.4: 400 mM imidazol ile elüsyon, W: yıkama, FT: kolona yükleme sonrası akan fraksiyonlar, M: Standart

Ancak denatürasyon koşullarında beklenen pozisyonda hücre özütü, yükleme sonrası akan fraksiyonlar, yıkama fraksiyonları ve elüsyon fraksiyonlarında belirgin bir bant bulunmaması (Şekil 18) rekombinant sHSP/984 proteininin stabilitesinin düşük yada defektif / inaktif bir protein olması olasılığını güçlendirmiştir.

Diğer organizmalarda sHSP'lerin "bir hücrede birden fazla paraloğunun bulunması durumunda hepsinin aktif olamayabilceğine" ilişkin sonuçlar da görüşü desteklemektedir.

Söz konusu iki proteinin izolasyonu için yola çıkış noktamız tamamen organizmanın genom dizisi, dizi analizi ve gen/protein annotation'ına dayalı putative sHSP genlerinin bulunmasıdır. Gen/protein annotation'ına dayalı tahminler sHSP/984 proteini için karşılaştığımız durumda olduğu gibi her zaman aktif protein bulunduğunu göstermemektedir. Fonksiyonel, stabil bir sHSP protein izolasyonu mümkün olmadığı için sHSP/984 proteinine ilişkin yapısal/fonksiyonel analizlerinde yapılması mümkün olamamış ve bu çalışmalar saflaştırılan sHSP/775 proteini ile yürütülmüştür.

CE E2_3 E2_2 E2_1 M E4 E3 E2 E1 W2_4 W2_3 W2_1 M W4 W3 W1 FT4 FT3 FT1



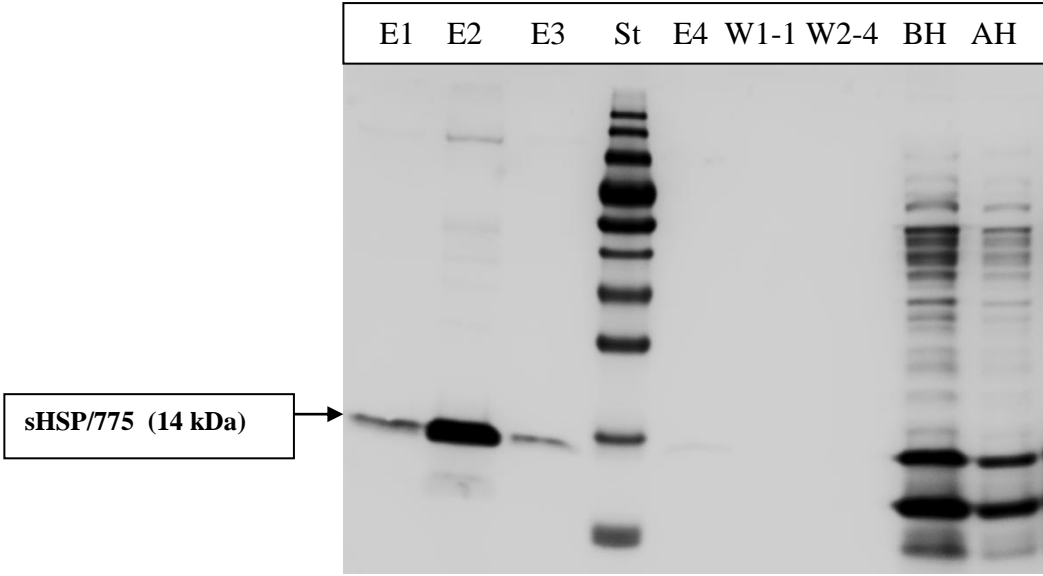
Şek

il 18. sHSP/984 proteinin denatürasyon koşullarında Ni-NTA kolon ile izolasyonu. CE: hücre özütü, E1-4: pH 5.9 tampon ile elüsyon, E2.1-E2.4: pH 4.5 tampon ile elüsyon, W1:1. yıkama, W2: 2. yıkama, FT: kolona yükleme sonrası akan fraksiyonlar, M: Standart

3.4. sHSP/775 Proteininin Şaperon Aktivitesi

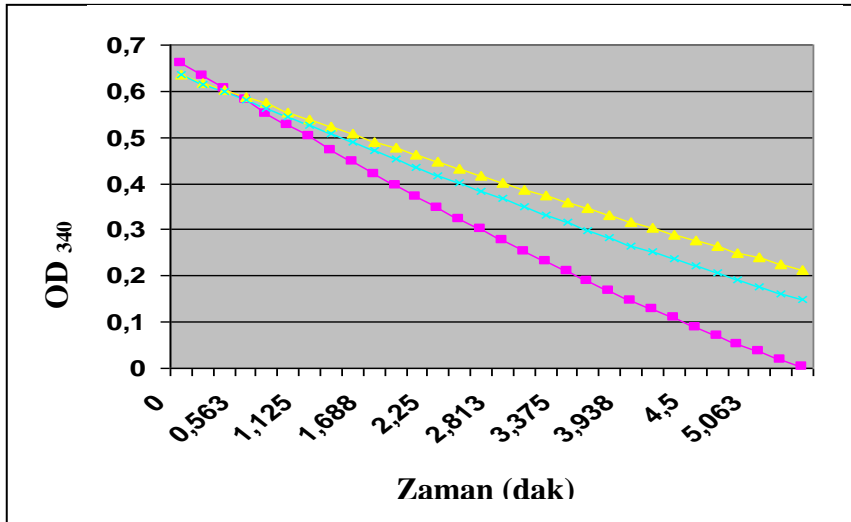
sHSP/775'in L-Glutamat Dehidrogenaz enzimini yüksek ısının etkisinden koruması

Rekombinant sHSP/775 şaperon aktivite deneylerinde kullanılmak üzere yüksek ölçekte enzim izolasyonu ve saflaştırması yapılmıştır (Şekil 19). Şaperon aktivite çalışmaları için, sığır glutamat dehidrogenaz (boGDH) enzim örnekleri sHSP varlığında (200 µg/ml) ve yokluğunda (kontrol) 45°C, 50 °C ve 53 °C 'de 10 dak ısıtılmış ve daha sonra bu örneklerin GDH aktiviteleri ölçülmüştür. boGDH mezofilik bir enzim olup 56 °C'de tamamen inaktive olmaktadır. sHSP bulunmadığında 45 °C de kalan enzim aktivitesi %59, sHSP ile birlikte ısıtıldığında ise, %68.5'dur. Böylece 45 °C'de sHSP/775'in sıcaklıktan koruma etkisinin 1.1 kat olduğu görülmüştür (Şekil 20).



Şekil 19. sHSP/775 proteininin Ni/NTA kolon kromatografisi ile izolasyonu.

E: Elüsyon, St. Presatined protein ladder, W: yıkama, BH: ısı uygulamasından önce hücre özütü, AH: ısı uygulamasından sonra hücre özütü



Şekil 20. sHSP/775 proteinin boGDH enzimini 45 °C’de ısı etkisinden koruması.

— Isı uygulamasından sonra kalan aktivite, - sHSP, — Isı uygulamasından sonra kalan aktivite ısı uygulaması, + sHSP; — Pozitif kontrol, ısı uygulanmamış enzim aktivitesi

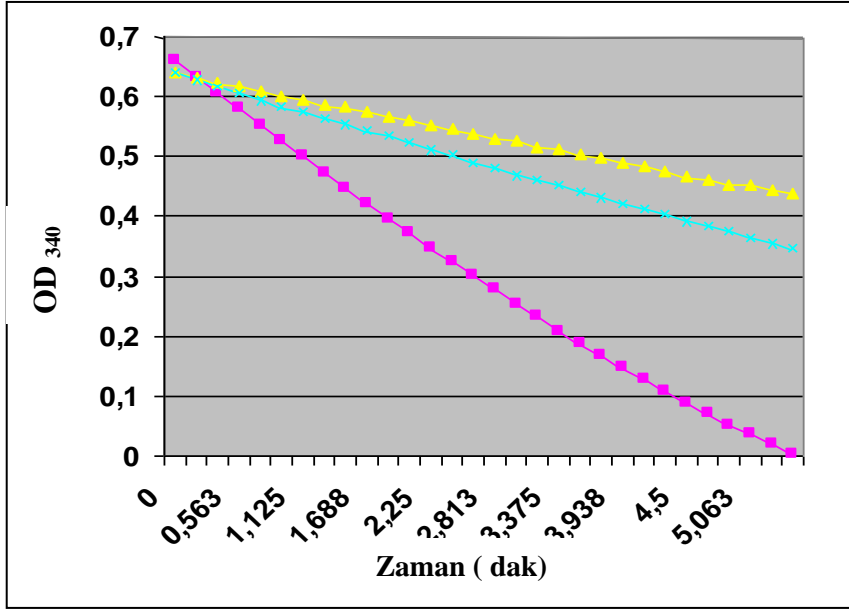
50 °C’de kalan enzim aktivitesi % 26.5, sHSP/775 ile birlikte ısıtıldığında ise %39.5’dir.

Böylece 50 °C’de sHSP/775’in sıcaklıktan koruma etkisi 1.5 kattır (Şekil 21).

53 °C’de kalan enzim aktivitesi % 8.3, sHSP/775 ile birlikte ise %18’dir. Böylece 53 °C’de sHSP/775’nin sıcaklıktan koruma etkisi 2.2 kat kadardır (Şekil 22).

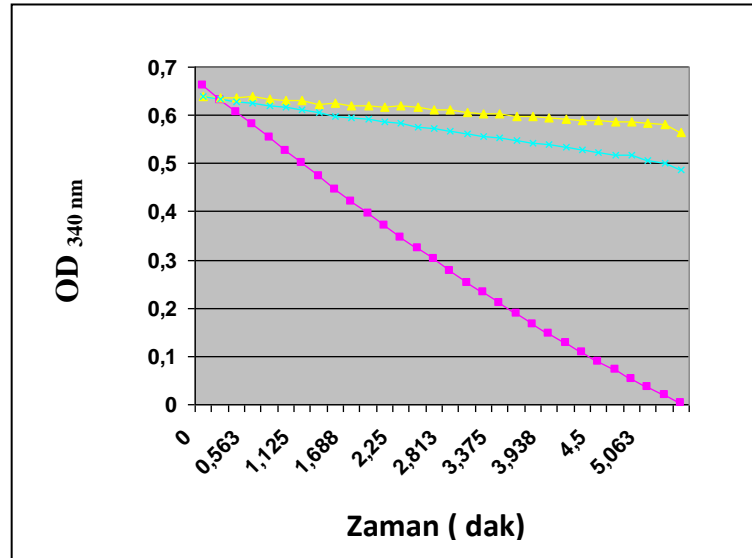
Bu sonuçlar, arkea sHSP proteininin ısı ile aktive olması dolayısı ile şaperon aktivitesinin

yüksek sıcaklıklarda daha etkin olduğunu göstermektedir. boGDH örneğinde 53 °C’de sHSP varlığında kalan aktivite , sHSP/775 olmadığı duruma göre 2.2 kat daha fazladır.



Şekil 20. sHSP/775 proteinin boGDH enzimini 50 °C’de ısı etkisinden koruması.

— Isı uygulamasından sonra kalan aktivite , - sHSP; — Isı uygulamasından sonra kalan aktivite ısı uygulaması, + sHSP; — Pozitif kontrol, ısı uygulanmamış enzim aktivitesi

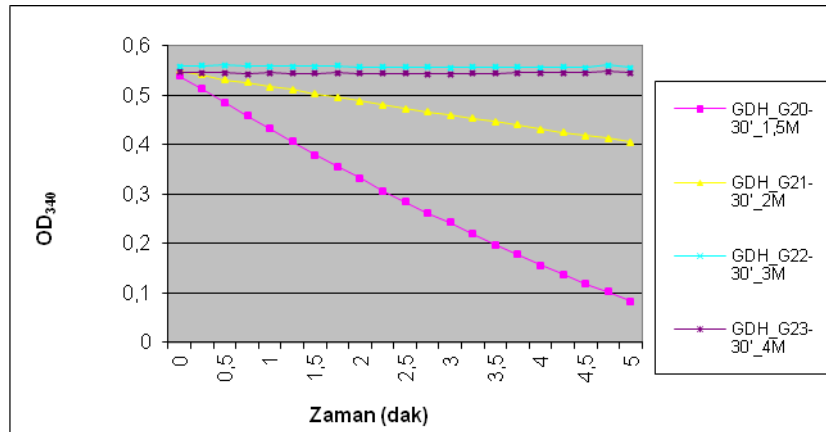


Şekil 21. sHSP/775 proteinin boGDH enzimini 53 °C’de ısı etkisinden koruması.

— Isı uygulamasından sonra kalan aktivite , - sHSP; — Isı uygulamasından sonra kalan aktivite ısı uygulaması, + sHSP; — Pozitif kontrol, ısı uygulanmamış enzim aktivitesi

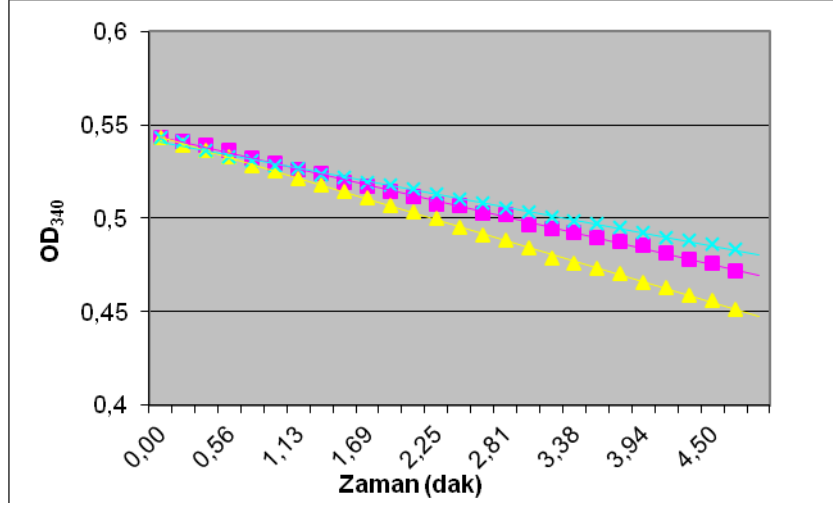
sHSP/775'in kimyasal olarak denatüre edilmiş boGDH'in tekrar katlanması üzerine etkisi

Denatürasyonun kısmi olduğu guanidinium HCL (GdnCl) konsantrasyonunu bulmak için boGDH enzimi, farklı konsantrasyonlarda GdnCl içeren 0.1 M Na₂PO₄, (pH 7.5) tamponunda, oda sıcaklığında 30 dak inkübe edilerek denatüre edilmiştir. Kendiliğinden renatürasyon için ise aynı tamponda 100-kat seyreltme yapılmış ve 25 °C de 2 saat inkübe edilmiştir. Kalan enzim aktivitesi yukarıda açıklandığı şekilde spektrofotometrik olarak 340 nm'de ölçülmüştür. Sonuçlar, 3 M GdnCl konsantrasyonunda enzimin (aktivite: $\Delta A_{340}/\text{min}$: 4×10^{-4}) ve 4 M ($\Delta A_{340}/\text{min}$: 1×10^{-3}) hemen hemen geri dönüşümsüz olarak denatüre olduğunu göstermiştir. 1.5 M ($\Delta A_{340}/\text{min}$: 8×10^{-2}) ve 2 M ($\Delta A_{340}/\text{min}$: 3×10^{-2}) GdnCl ile denatürlenmede ise renatürasyondan sonrası aktivitenin denatürlenmemiş enzime ($\Delta A_{340}/\text{min}$: 1×10^{-1}) göre sırası ile 1.25 ve 3.3 kat daha azladığı bulunmuştur (Şekil 23). Denatürasyon için inkübasyon süresi 60 dak'ya çıkarılarak deney tekrarlanmış ve benzer sonuç elde edilmiştir.



Şekil 23. Farklı GdnCl konsantrasyonunda denatürlenmiş boGDH enziminin kalan aktivitesi

2.5M GdnCl ile kısmen denatürlenmiş boGDH enziminin sHSP/775 yardımıyla renatürasyon için ise, seyreltmeden sonra karışıma sHSP ilave edildikten sonra aynı koşullarda inkübasyon yapılmıştır. Kalan boGDH enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak standart yöntemle ölçülmüştür. sHSP varlığında kazanılan aktivitenin kontrole göre (kendiliğinden renatürasyon) 2.5 kat daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 24).



Şekil 24. GdnCl (2.5M) ile denatürlenmiş boGDH enzim aktivitesinin yeniden kazanımı. Denatürasyon sonrası (—), kendiliğinden renatürasyon sonrası (—) ve sHSP varlığında (—) renatürasyon sonrası aktiviteler

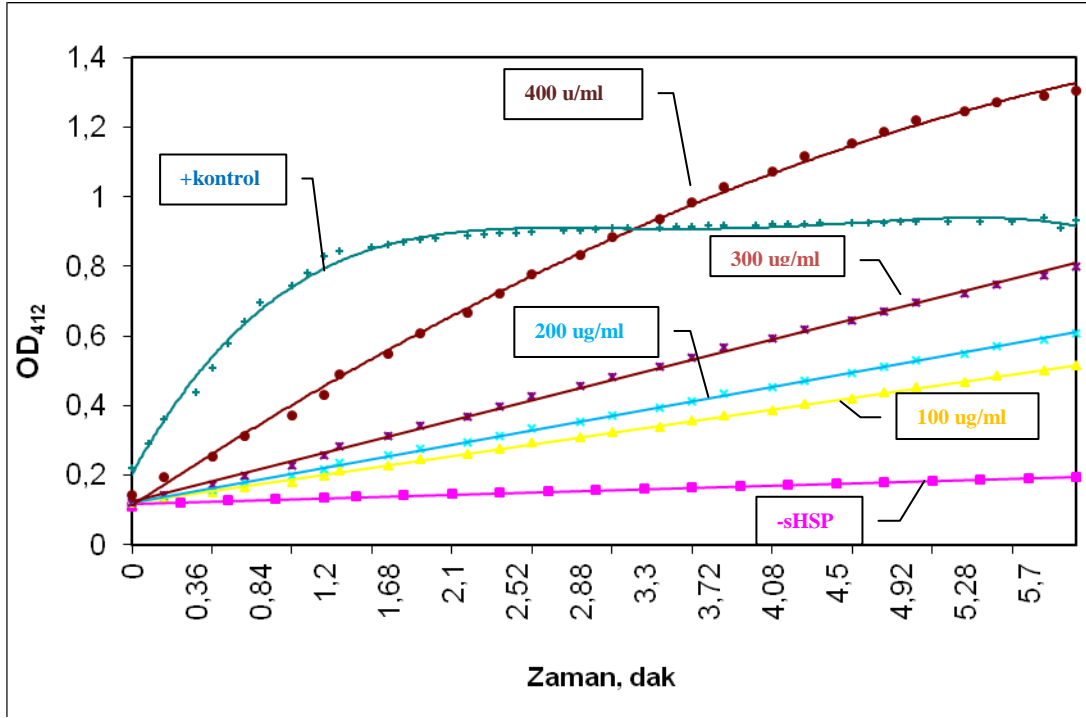
Bu sonuçlar, sHSP/775 proteininin, mezofilik boGDH enziminin hem yüksek sıcaklıkta inaktivasyonunu azaltmak, hem de kimyasal olarak kısmen denatüre olmuş enzimin yeniden katlanmasına yardımcı olmak suretiyle şaperon aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir.

sHSP/775 proteininin şaperon Sitrat Sentaz enzimini yüksek ısıнын etkisinden koruması:

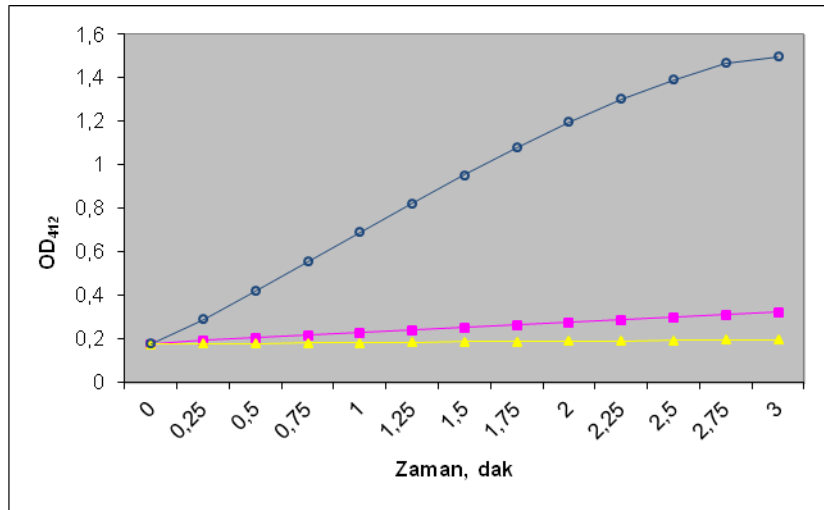
47 °C’de değişik konsantrasyonlarda (100-400 µg/ml) sHSP varlığında ve yokluğunda 10 dak ısıtıldıktan sonra kalan phCS enzim aktivitesi ölçülmüştür. sHSP varlığında yapılan ısı uygulamasından sonra kalan enzim aktivitesi, sHSP olmadan yapılan ısı uygulamasından sonra kalan enzim aktivitesinden (kontrol) daha yüksek bulunmuştur (Şekil 25). sHSP konsantrasyonu arttıkça ısı etkisinden koruma etkisinde artmıştır ve en yüksek koruma (kalan aktivite %41) sHSP konsantrasyonu 400 µg/ml iken elde edilmiştir.

sHSP/775’in kimyasal olarak denatüre edilmiş phCS enziminin tekrar katlanması üzerine etkisi

Enziminin denatürasyonu ve renatürasyonu boGDH enzimi için açıklandığı şekilde yapılmıştır. Kimyasal olarak (GdnCl ile) denatürlenmiş phCS enziminin 1:100 seyreltmeden sonra sHSP varlığında (200 µg/ml) ve yokluğunda renatürasyon için oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve kontrole göre (denatürlenmemiş CS aktivitesi) kalan enzim aktivitesi sırası ile % 36 ve %17 olarak bulunmuştur (Şekil 26).



Şekil 25. Farklı derişimlerde sHSP/775 proteinin phCS enzimini 47 °C’de ısı etkisinden koruması.

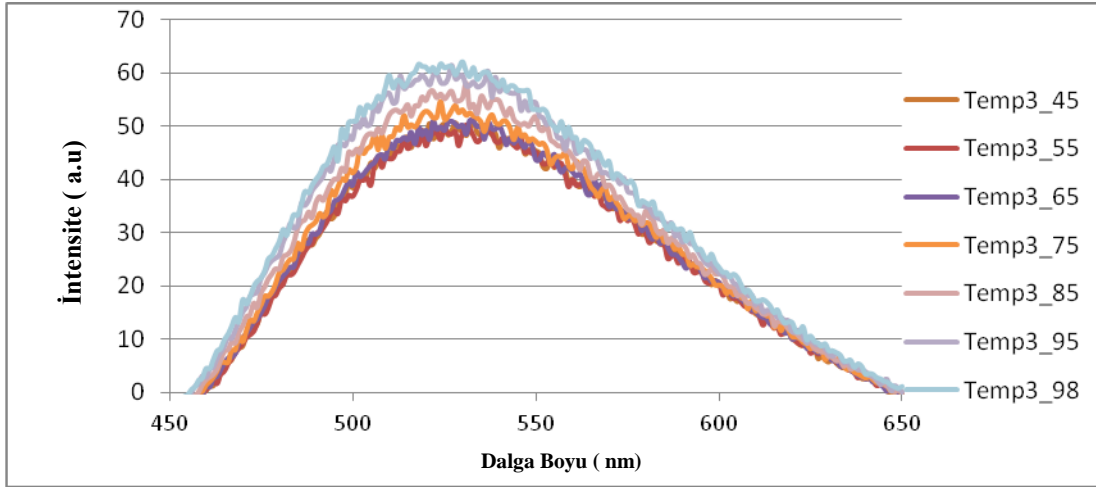


Şekil 26 . GdnCl ile denatürlenmiş phCS enziminin sHSP/775 proteini ile renatürasyonu.
 ○ : pozitif kontrol (denatürlenmemiş enzim), ▲ : kendi kendine renatürasyon (-sHSP),
 ■ : sHSP/775 yardımı ile renatürasyon

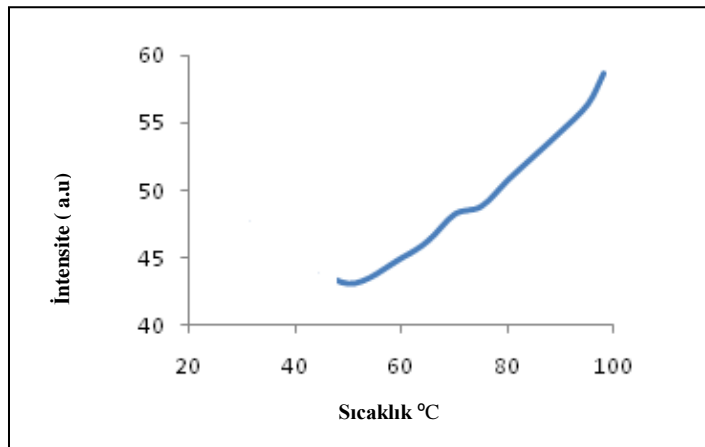
3.5. sHSP/775’in oligomerik yapısında ısıya bağlı konformasyonel değişimin florimetrik analizi

Saflaştırılmış rekombinant sHSP/775’de ısıya bağlı konformasyonel değişme (dimerlere ayrışıp, oligomer büyüklüğünün artması) ve böylece aktif forma dönüşüm, bis-ANS bağlama

etkinliğindeki değişimin ısı kontrollü bir spektroflore metre (Varian) ile 450-650 nm arasında floresan spektra taraması yapılarak izlenmiştir. Bis-ANS proteinlerin hidrofobik yüzeylerine bağlanan bir floresan boyadır. Isı şoku etkisiyle etkinleştirilmiş sHSP'lerin açığa çıkan hidrofobik gruplarına bis-ANS bağlanmasındaki artış, yaklaşık 525 nm'de gözlenen emisyon peak'inin intensitesindeki artış ile gözlenmiştir (Şekil 27). Bu sonuç, sHSP/775'in yapısal organizasyondaki değişikliğin 65°C'den başlayarak 98 °C'ye kadar, muhtemelen sHSP'lerin genel karakteri olarak altünite değişimleri şeklinde giderek arttığına işaret etmektedir. Maksimum emisyon "peak" grafiğinden görüleceği üzere, sHSP/775'in termofilik özelliği nedeni ile bu yapısal geçiş için eşik sıcaklık derecesi 55 °C'dir (Şekil 28).



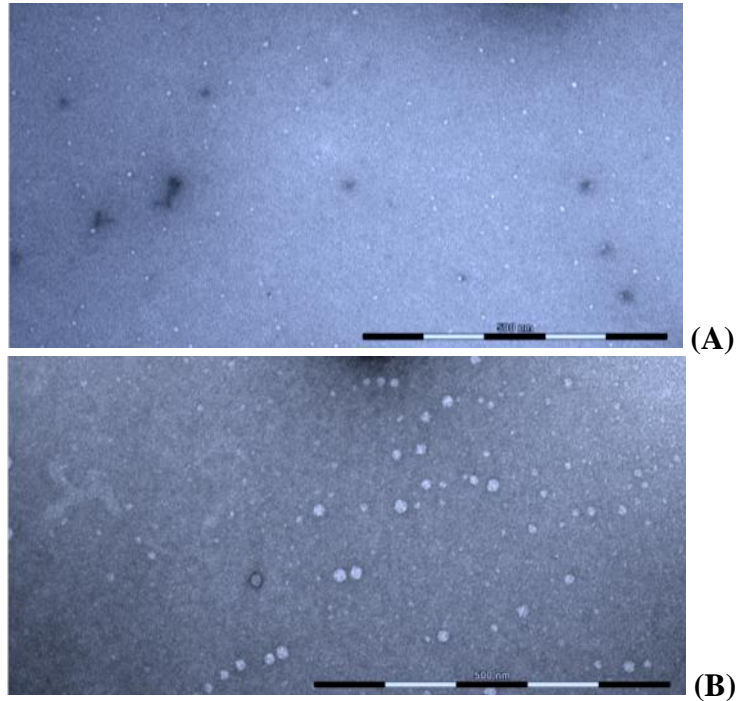
Şekil 27. Farklı sıcaklık derecelerinde TVNO775-sHSP proteininin bis-ANS bağlama kapasitesindeki değişim.



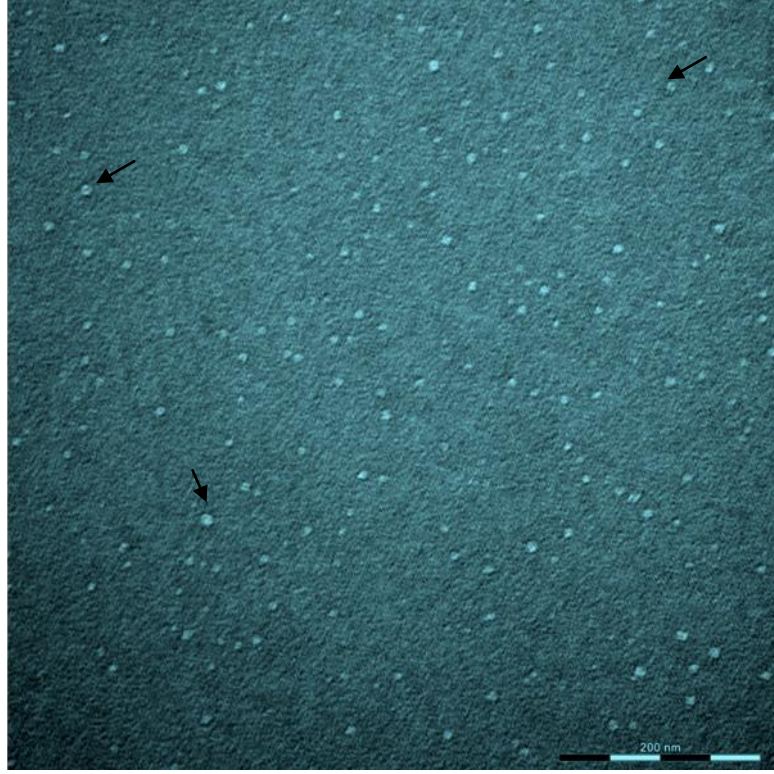
Şekil 28. Sıcaklığa bağlı maksimum floresan emisyon peak'inde değişimi.

3.6. Transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) ile yapısal incelemeler

Saflaştırılmış rekombinant sHSP/775 örneklerinin oda sıcaklığı ve organizma için sub-optimum olan ve ısı-şoku etkisi gösteren 65 °C 'de uranil asetat ile negatif boyama (ns) sonrası görüntüleri TEM ile analiz edilmiştir. Isıya bağlı olarak oligomerik yapıda değişim ve oligomer büyüklüğünün artması TEM görüntü analizlerinde açık bir şekilde gözlemlenmiştir. Oda sıcaklığında dominant olan form yaklaşık 10-20 nm (ortalama 13 nm) çapındaki küresel partiküler yapı iken, 65 °C 'de partikül boyutunun 11-43 nm arasında değiştiği (ortalama 26 nm) görülmüştür (Şekil 29). nsTEM görüntüleme ile sHSP/775 proteinlerin 25 °C 'de oldukça üniform küresel yapılar şeklinde oldukları ve birçoğunun merkezinde siyah nokta olarak dikkat çeken açıklık bulunduğu görülmüştür (Şekil 30'da okla gösterilmiştir).



Şekil 29. Negatif boyanmış rekombinant sHSP/775 proteininin ile TEM ile görüntülenmesi. **A.** 25 °C'de , **B.** 65°C'de görüntüleme

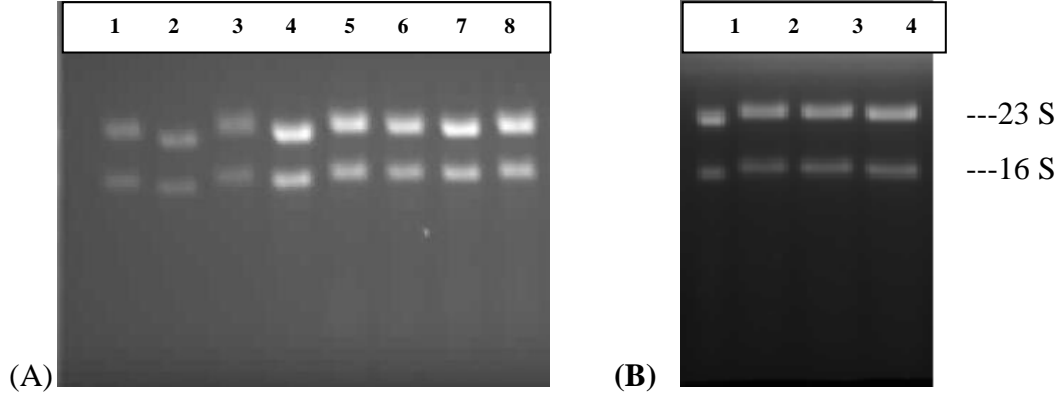


Şekil 30. sHSP/775'nin TEM ile görüntülenmiş morfolojisi.

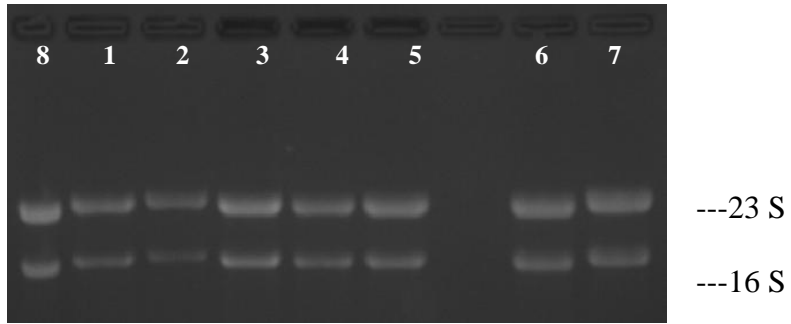
3.7. Stres koşulunda (ısı ve pH şoku ile oksidatif stres) *Tpv* sHSP proteinlerinin ekspresyon profillerinin Nicel Gerçek Zamanlı PCR tekniği ile incelenmesi

T. volcanium'dan total RNA izolasyonu:

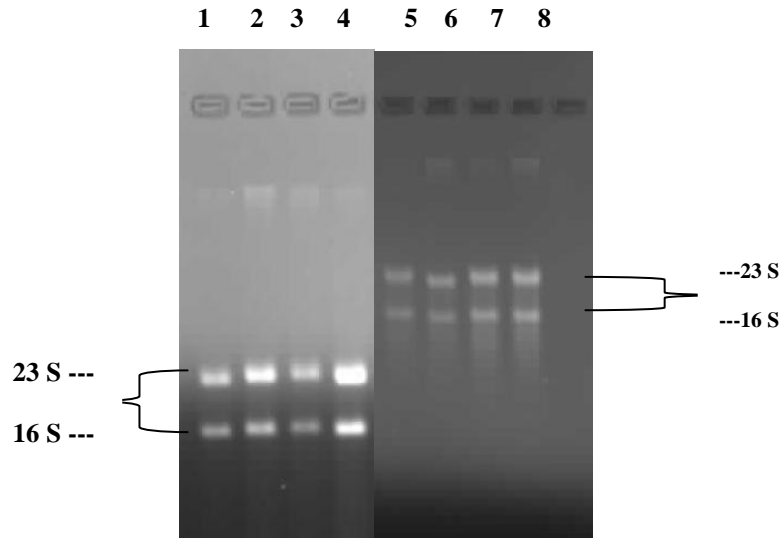
Isı şoku koşulunda zamana bağlı olarak TVNO 744 geni ve TVNO 984 geni ekspresyon profillerindeki değişiklikleri Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR) ile kantitatif olarak belirlemek için ilk aşamada *T. volcanium* kültürleri 65 °C ve 70 °C'de, pH4.0 ve pH 5.0'te, ve 0.01 mM H₂O₂ ve 0.05 mM H₂O₂ ilavesi ile 30 - 120 dak arasında strese maruz bırakılmışlar ve alınan örneklerden RNA izolasyonu yapılmıştır. Zamana bağlı olarak ısı şoku, pH şok ve oksidatif stres koşullarında izole edilen RNA örneklerinin jel elektroforez resimleri sırası ile Şekil 31 (A ve B), Şekil 32 ve Şekil 33'de görülmektedir. Elde edilen RNA örnekleri parçalanmamış olup nicel olarak cDNA elde etmek için uygun oldukları OD₂₆₀/OD₂₈₀ ölçümleri ile de (≥ 1.8) doğrulanmıştır.



Şekil 31. (A) 65 °C 'de ısı şoku uygulanmış (1. 30 dak, 2. 60 dak, 3. 90 dak, 4. 120 dak) ve uygulanmamış (1. 30 dak, 2. 60 dak, 3. 90 dak, 4. 120 dak), ve (B) 70 °C 'de ısı şoku uygulanmış (1. 30 dak, 2. 60 dak, 3. 90 dak, 4. 120 dak) *T. volcanium* hücrelerinden RNA izolasyonu.



Şekil 32. pH 4.0 (sıra 1,3,5,7) ve pH 5.0 (sıra 2,4,6,8), sırası ile 30 dak, 60 dak, 90 dak ve 120 dak süre ile pH şoku uygulanmış *T. volcanium* hücrelerinden RNA izolasyonu.



Şekil 33. 0.01 mM (sıra 1-4) ve 0.05 mM (sıra 2-8), sırası ile 30 dak, 60 dak, 90 dak ve 120 dak süre ile H₂O₂ şoku uygulanmış *T. volcanium* hücrelerinden RNA izolasyonu.

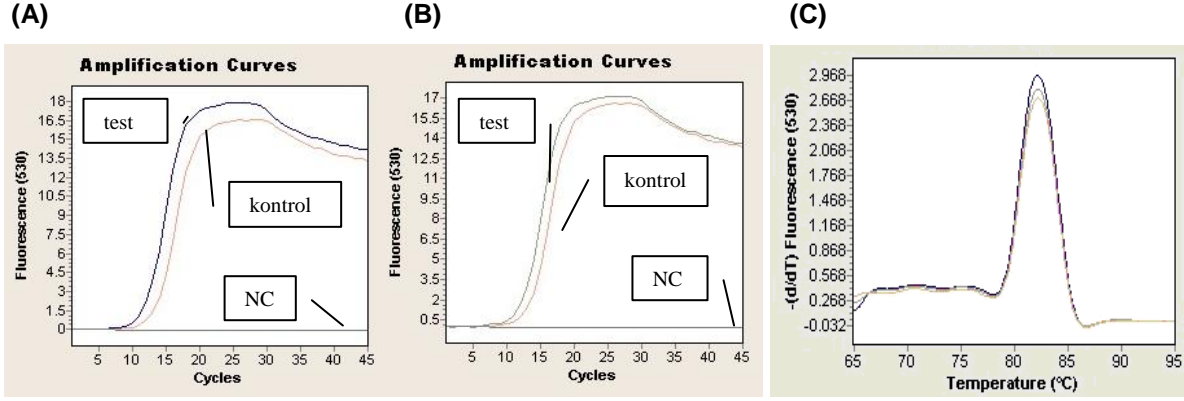
Tpv sHSP775 ve sHSP984 genlerinin strese bağlı transkripsiyon profillerinin değişimi

Isı şoku Etkisi

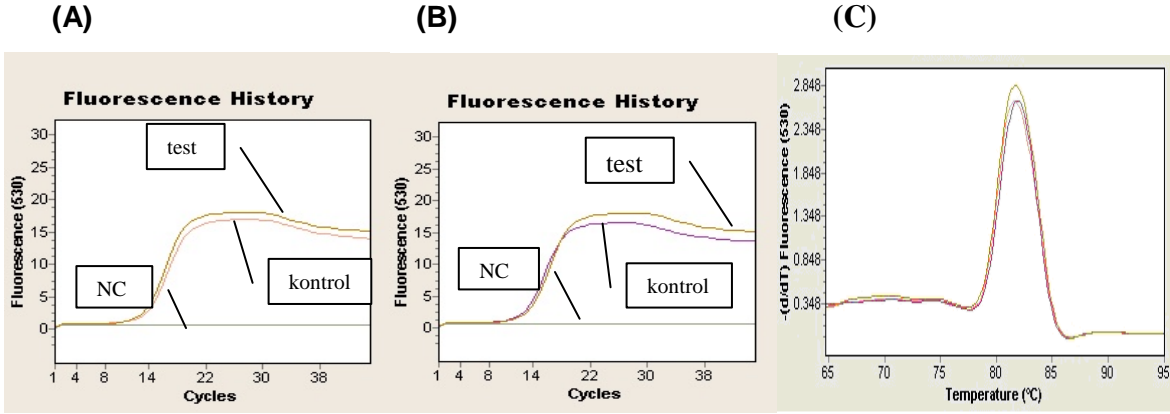
RT-PCR için kullanılan cDNA'nın sentezinde 65 °C ve 70 °C'de ısı şoku sonrası izole edilen RNA örnekleri kullanılmıştır. Tablo 4 ve 5'de 65 °C ve 70 °C 'de ısı şokuna tepki olarak sHSP775 ve sHSP984 genlerinin ekspresyonunun RT- PCR ile analizine ilişkin sonuçlar verilmiştir. TVN0775 geni anlatımı için, 65 °C'de ısı şokunun uygulandığı 1.5 saatlik sürede (30, 60 ve 90 dak), kontrol C_T değerlerinin (belirgin fuloresanın ilk görüldüğü döngü sayısı), test değerlerine göre daha yüksek olması nedeni ile genlerin anlatımını arttırıcı etkisi olması gerekmektedir. İki saat sonunda ise test ve kontrol C_T değerleri arasında fark önemli olmadığı için gen anlatım düzeyinde gözelenabilir bir artış olmaması beklenir. Bu analizlere örnek olarak, şekil 34A ve B'de sırası ile 65 °C'de, 30 dak ve 60 dak sürelerle ısı şoku uygulamasının TVN0775 geninin anlatımına etkisini gösteren RT-PCR eğrileri verilmiştir. 70 °C'de 1 saat süresince uygulanan ısı şoku, kontrollere göre test C_T değerlerini değiştirmemiş yada az bir düşmeye neden olmuş ve 2. saate kadar da benzer eğilim görülmüştür. şekil 35 A ve B'de 90 dak ve 120 dak sürelerle 70 °C'de ısı şoku uygulamasının TVN0775 geninin anlatımına etkisi gösteren RT-PCR eğrileri görülmektedir. Her iki grup deneyde amplifikasyon, DNA denatürasyon eğrilerinden görüleceği üzere çok homojen ve spesifik olup TVN0775 geni için T_m: 82-83°C'dir (şekil 34C ve 35C). Bu sıcaklık derecelerinde tek, özğün bir amplifikasyon bandı elde edilmiştir. Özğün cDNA amplifikasyonu ayrıca, jel elektroforez ile tek bir, 77 bp uzunluğunda bant elde edilmesi ile de doğrulanmıştır (şekil 36)

Tablo 4. TVN0775 geninin ısı şoku koşullarında farklılaşmış gen ekspresyonuna ait Ct and Tm değerleri

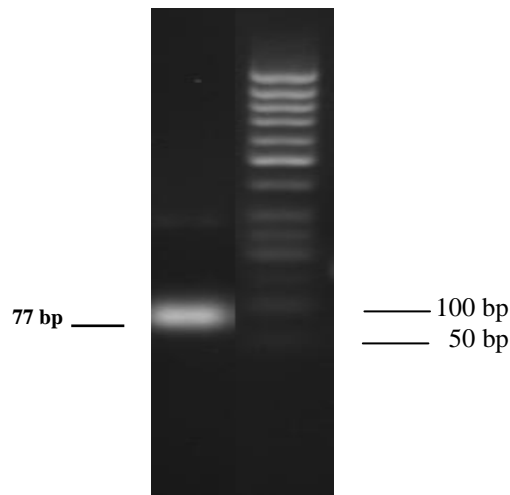
Isı şoku	Zaman (dak)		Ct	Tm
65 °C	30	Test	10,62	82,39
		Kontrol	12,17	82,41
	60	Test	13,46	82,86
		Kontrol	14,97	82,74
	90	Test	13,76	82,85
		Kontrol	14,97	82,74
	120	Test	11,64	82,67
		Kontrol	11,75	82,31
70°C	30	Test	14,29	83,0
		Kontrol	14,97	82,74
	60	Test	14,49	82,98
		Kontrol	14,97	82,74
	90	Test	12,50	81,98
		Kontrol	12,07	82,04
	120	Test	11,56	82,11
		Kontrol	12,07	82,04



Şekil 34. 65 °C’de 30 dak (A) ve 60 dak (B) ısı şoku uygulamasında TVNO775 geni anlatımının analizine ilişkin RT-PCR eğrileri. NC: negatif kontrol (- cDNA) (C) Denatürasyon eğrisi.

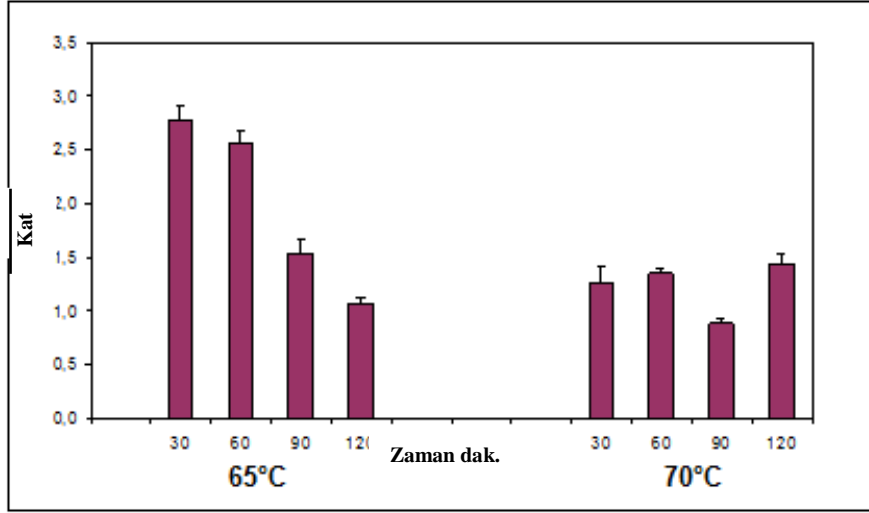


Şekil 35. 70 °C’de 30 dak (A) ve 60 dak (B) ısı şoku uygulamasında TVNO775 geni anlatımının analizine ilişkin RT-PCR eğrileri. NC: negatif kontrol (- cDNA). (C) Denatürasyon eğrisi



Şekil 36. TVNO775 gen anlatımına ait RT-PCR ürününün agaroz jel electrophoresz görüntüsü. S: Çoğaltılmış TVNO775cDNA fragment, L: 50 bp ladder (O'GeneRuler™ 50 bp DNA Ladders Fermentas UAB, Vilnius, Lithuania).

RT-PCR sonuçları, bir göreceli kantitasyon yöntemi olan $2^{-\Delta\Delta T}$ yöntemi ile analiz edildiğinde kontrole göreceli olarak sHSP/775 geninin ekspresyon düzeylerinde görülen farklılık Şekil 37'deki grafikte görülmektedir.



Şekil 37. Isı şokunda sHSP/775 geninin ekspresyon düzeyindeki değişim.

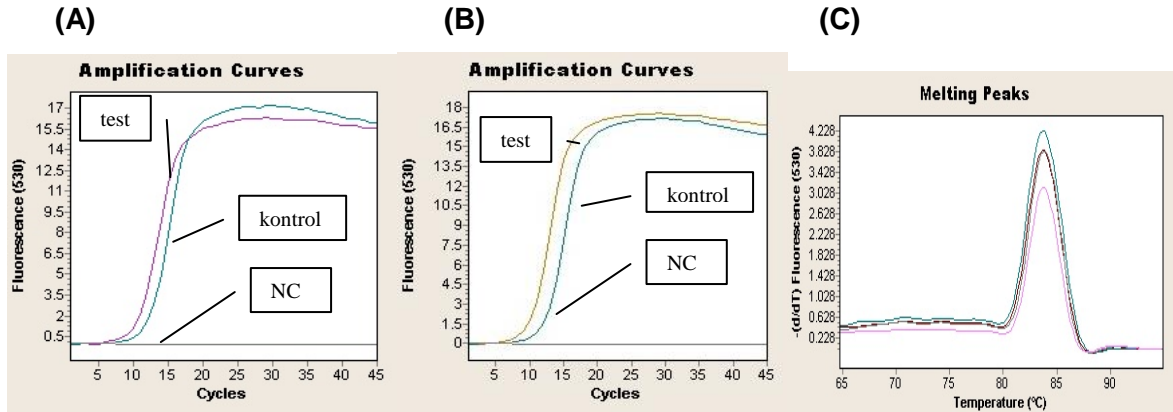
TVN0984 geni transkripsiyonunun, test Ct değerleri, kontrol Ct değerlerinden daha düşük olduğu için, 65 °C ve 70 °C ısı şoku ile 2 saatlik süre boyunca indüklenmesi beklenir (Tablo 5). TVN0984 geni ekspresyonuna ait RT-PCR analizlerine örnek olarak, Şekil 38A ve B 'de sırası ile 65 °C 'de, 30 dak ve 60 dak sürelerle ısı şoku uygulamasının; Şekil 39 A ve B'de sırası ile 70 °C 'de, 90 dak ve 120 dak sürelerle ısı şoku uygulamasının etkisini gösteren RT-PCR eğrileri verilmiştir.

Her iki ısı şoku deneyinde amplifikasyon, DNA denatürasyon eğrilerinden görüleceği üzere çok homojen ve spesifik olup TVN0984 geni için yaklaşık T_m : 84°C (Şekil 38C ve 39 C). Bu sıcaklık derecelerinde tek, özgün bir amplifikasyon bandı elde edilmiştir. Özgün cDNA amplifikasyonu ayrıca, jel elektroforez ile özgün 164 bp uzunluğunda bant elde edilmesi ile doğrulanmıştır (Şekil 40).

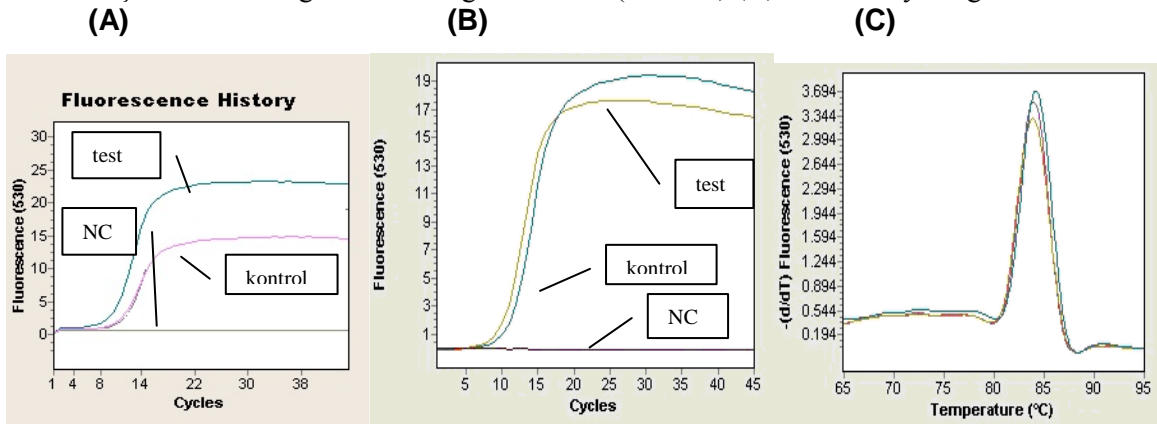
RT-PCR sonuçları, bir göreceli kantitasyon yöntemi olan $2^{-\Delta\Delta T}$ yöntemi ile analiz edildiğinde kontrole göreceli olarak sHSP/984 geninin ekspresyon düzeylerinde görülen farklılık Şekil 41'deki grafikte görülmektedir.

Tablo 5. TVN0984 geninin ısı şoku koşullarında farklılaşmış gen ekspresyonuna ait Ct and Tm değerleri

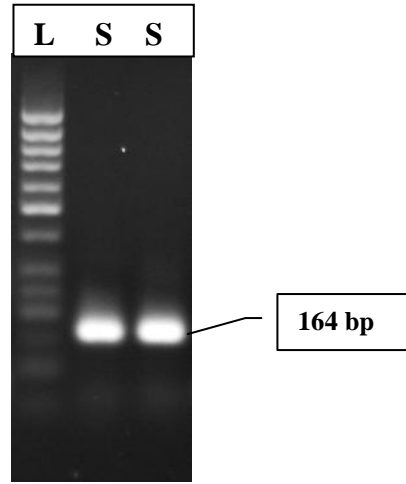
Isı şoku	Zaman (dak)	Ct	TM
65 °C	30	Test 9,48	84,09
		Kontrol 10,96	84,07
	60	Test 8,78	84,16
		Kontrol 10,96	84,07
90	Test 9,83	84,15	
	Kontrol 11,72	84,04	
120	Test 8,88	84,02	
	Kontrol 9,92	84,36	
70°C	30	Test 10,75	84,39
		Kontrol 11,72	84,04
	60	Test 9,74	84,36
		Kontrol 11,72	84,04
90	Test 9,26	84,69	
	Kontrol 11,15	84,29	
120	Test 9,13	84,36	
	Kontrol 11,72	84,04	



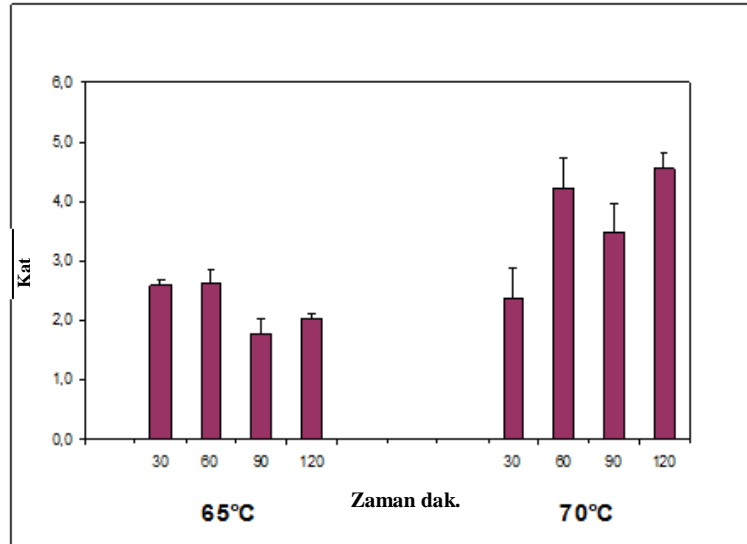
Şekil 38. 65 °C’de 30 dak (A) ve 60 dak (B) ısı şoku uygulamasında TVN0984 geni anlatımının analizine ilişkin RT-PCR eğrileri.NC: negatif kontrol (- cDNA) (C) Denatürasyon eğrisi



Şekil 39. 70 °C’de 90 dak (A) ve 120 dak (B) ısı şoku uygulamasında TVN0984 geni anlatımının analizine ilişkin RT-PCR eğrileri.NC: negatif kontrol (- cDNA) (C) Denatürasyon eğrisi.



Şekil 40. TVN0984 geni anlatımına ait RT-PCR ürününün agaroz jel electrophorez görüntüsü. . **S:** Çoğaltılmış TVN0775cDNA fragmentleri, **L:** 50 bp ladder (O'GeneRuler™ 50 bp DNA Ladders Fermentas UAB, Vilnius, Lithuania).



Şekil 41. Isı şokunda sHSP/984 geninin ekspresyon düzeyindeki değişim.

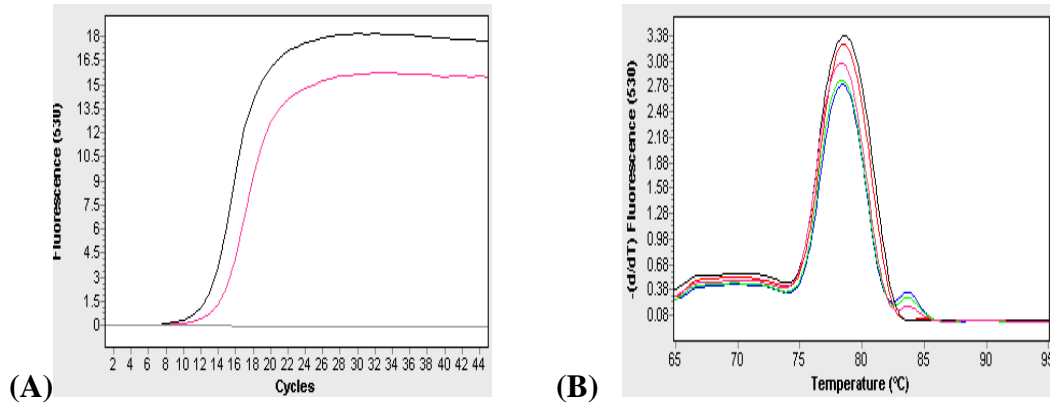
pH Etkisi:

TVN0775 geninin pH stresi koşulları için örnek Gerçek Zamanlı PCR deneylerine ait amplifikasyon eğrileri (pH: 4.0'de 120 dak, ve pH:5.0'de 120 dak) Şekil 42 A ve 43 A da verilmiştir. pH 4.0 ve pH: 5.0'de Ct değerlerinin 2 saat boyunca, kontrol Ct değerinden daha düşük olması bu koşullarda transkripsiyonun indüklendiğine işaret etmektedir (Tablo 6).

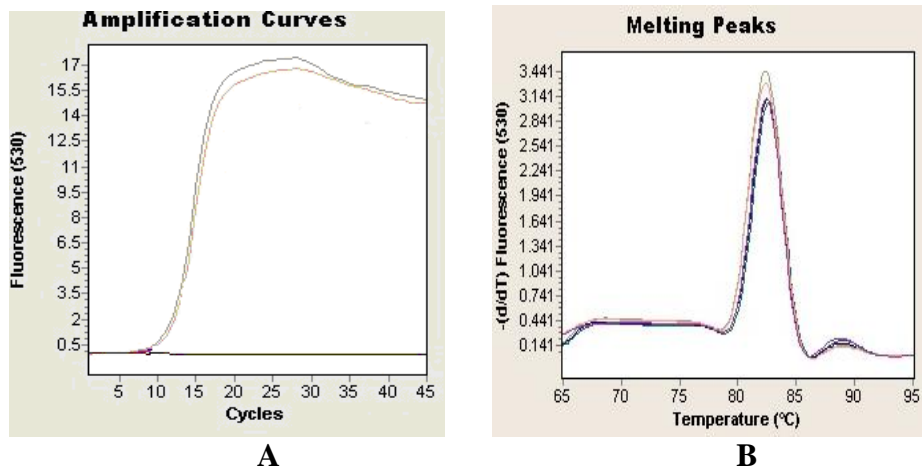
RT PCR deneylerinde özgün amplifikasyon “melting curve” analizi ile doğrulanmış olup, TVN0775 geni cDNA'sı için Tm 82,44°C (±1,67) olarak bulunmuştur (Şekil 42 B ve 43 B).

Tablo 6. TVN0775 geninin pH şoku koşullarında farklılaşmış gen ekspresyonuna ait Cp and Tm değerleri

pH	Zaman(dak)	Ct	Tm
pH: 4.0	30	12,86	82,63
	60	12,67	82,36
	90	11,68	82,79
	120	11,55	82,84
	Kontrol	13,01	82,51
pH: 5.0	30	11,17	82,73
	60	11,0	82,62
	90	10,49	82,49
	120	10,73	82,47
	Kontrol	12,66	81,84

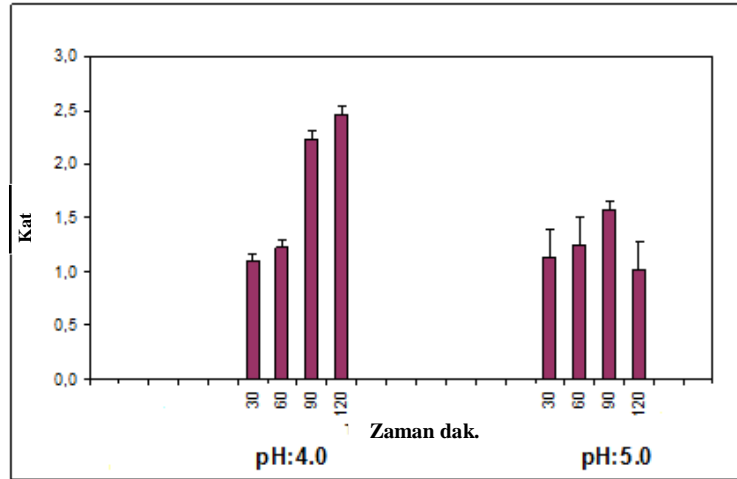


Şekil 42. A. pH: 4.0 'de 120 dak (test) stress uygulamasında ve uygulama olmadan (kontrol) TVN0775 geni anlatımının analizine ilişkin RT-PCR eğrileri. Test —; Kontrol — ; — negatif kontrol (- cDNA), **(B)** Denatürasyon eğrisi



Şekil 43. A. pH: 5.0 'de 120 dak stress uygulamasında ve uygulama olmadan (kontrol) TVN0775 geni anlatımının analizine ilişkin RT-PCR eğrileri. Test —; Kontrol — ; — negatif kontrol (- cDNA), **(B)** Denatürasyon eğrisi

RT-PCR sonuçları, bir göreceli kantitasyon yöntemi olan $2^{-\Delta\Delta T}$ yöntemi ile analiz edildiğinde kontrole göreceli olarak sHSP/775 geninin ekspresyon düzeylerinde görülen farklılık Şekil 44'deki grafikte görülmektedir.

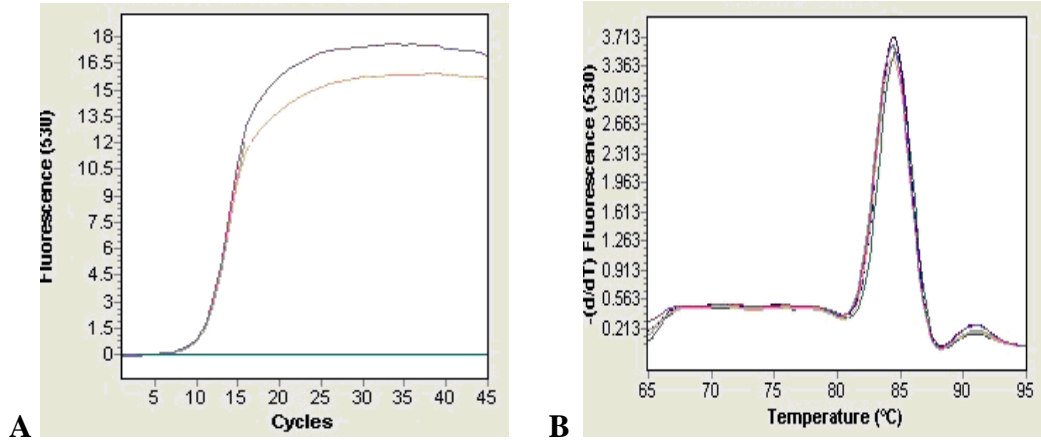


Şekil 44. pH şokunda sHSP/775 geninin ekspresyon düzeyindeki değişim.

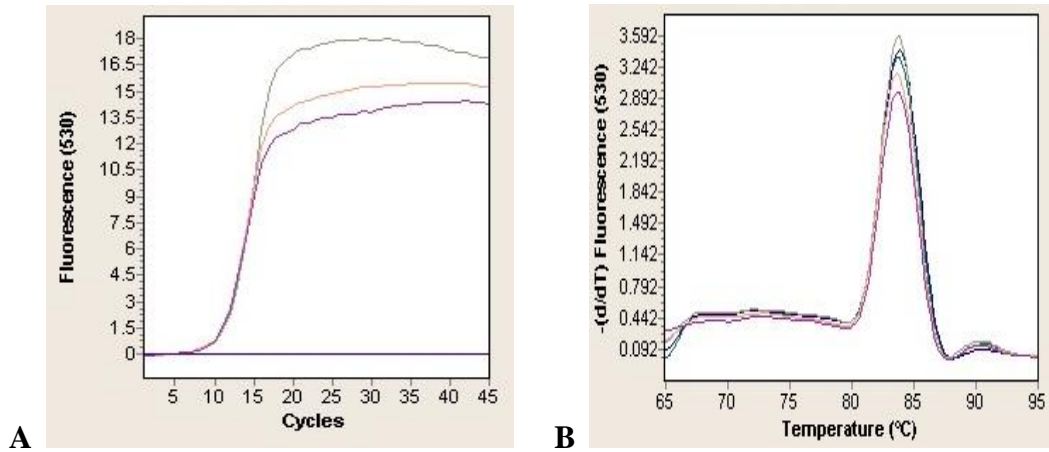
pH stress koşullarında elde edilen RNA örneklerinden hazırlanan TVN0984 cDNA'ları ile yürütülen Gerçek Zamanlı PCR deneylerine ait Ct değerleri Tablo 7'de görülmektedir. Bu sonuçlara göre pH'nın 4.0 ve 5.0 değerlerine yükseltilmesi TVN0984 gen ekspresyonunda herhangi bir artışa neden olmamıştır ve test Ct değerleri 2 saatlik stres koşulunda kontrole aynı yada düşük bulunmuştur. Gerçek Zamanlı PCR deneyleri Melting Curve analizleri ile doğrulanmıştır (T_m : $84,41^\circ\text{C} \pm 2,08$). TVN0984 cDNA'sının pH stresine ilişkin amplifikasyonuna ait iki örnek (pH: 4.0 – 120 dak ve pH: 5.0 – 90 ve 120 dak) Şekil 45 ve 46'de görülmektedir.

Tablo 7. TVN0984 geninin pH şoku koşullarında farklılaşmış gen ekspresyonuna ait Ct and T_m değerleri

	Zaman(dak)	Ct	T_m
pH: 4.0	30	10,28	84,74
	60	10,58	84,57
	90	9,92	84,46
	120	9,64	84,51
	Kontrol	9,83	84,49
pH: 5.0	30	10,86	83,95
	60	11,12	84,03
	90	10,58	83,9
	120	9,94	83,82
	Kontrol	9,82	83,87

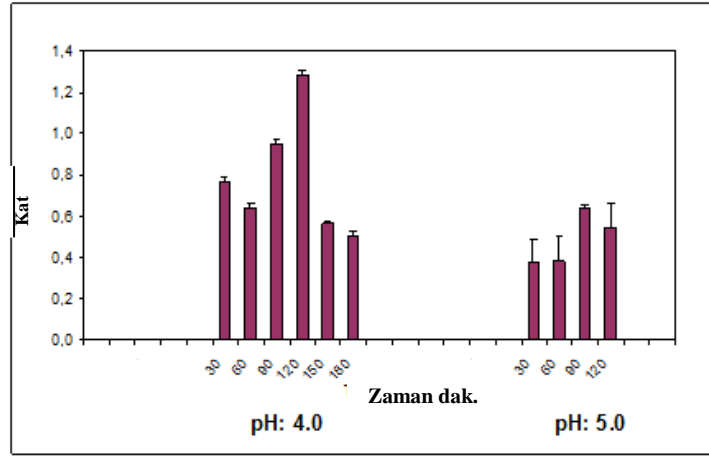


Şekil 45. A. pH:4.0 ‘de 120 dak (test) stress uygulamasında ve uygulama olmadan (kontrol) TVN0984 geni anlatımının analizine ilişkin RT-PCR eğrileri. Test — ; Kontrol — — — negatif kontrol (- cDNA), **(B)** Denatürasyon eğrisi



Şekil 46. A. pH: 5.0 ‘de 90 dak — ve 120 dak — (test) stress uygulamasında ve uygulama olmadan — (kontrol) TVN0984 geni anlatımının analizine ilişkin RT-PCR eğrileri. — — — negatif kontrol (- cDNA), **(B)** Denatürasyon eğrisi

RT-PCR sonuçları, bir göreceli kantitasyon yöntemi olan $2^{-\Delta\Delta T}$ yöntemi ile analiz edildiğinde kontrole göreceli olarak sHSP/775 geninin ekspresyon düzeylerinde görülen farklılık Şekil 47’deki grafikte görülmektedir.



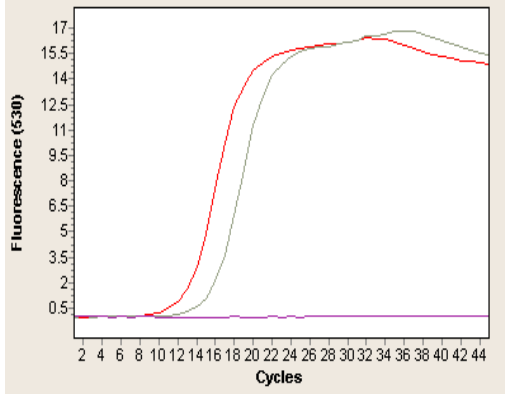
Şekil 47. pH şokunda sHSP/984 geninin ekspresyon düzeyindeki değişim.

Oksidatif stres etkisi:

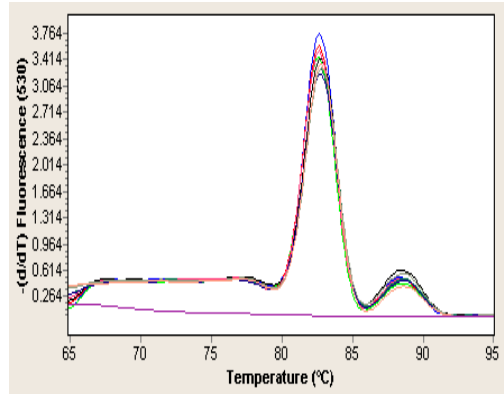
Logaritmik fazdaki *Tp. volcanium* kültürü 0.01 mM ve 0.05 mM H₂O₂'e maruz bırakıldığında TVN0775 geni çoğaltımı için Ct değerleri 2 saatlik stress süresince kontrolünkünden daha düşüktür (Tablo 8). En yüksek Ct 0.01 mM H₂O₂ oksidatif stress koşulunda 90.dakika'da elde edilmiştir. Gerçek zamanlı PCR deneyleri "melting curve" analizleri ile doğrulanmıştır (ortalama Tm: 82,77°C) (±1,52). TVN0775 cDNA'sına ait örnek amplifikasyon eğrileri (0.01 mM H₂O₂ - 90 dak ve 0.05 mM H₂O₂ - 60 dak) Şekil 48 ve 49'de görülmektedir.

Tablo 8. TVN0775 geninin oksidatif stres koşullarında farklılaşmış gen ekspresyonuna ait Ct and Tm değerleri

H ₂ O ₂ derişimi	Zaman (dak)	Ct	Tm
0,01mM	30	14,19	82,74
	60	13,22	82,67
	90	11,83	82,72
	120	13,83	82,82
	Kontrol	14,47	82,91
0,05mM	30	17,76	82,79
	60	18,56	83,04
	90	17,79	82,85
	120	19,12	82,87
	Kontrol	14,97	82,6

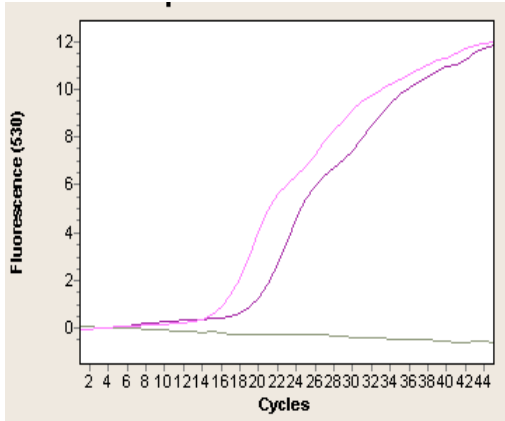


A

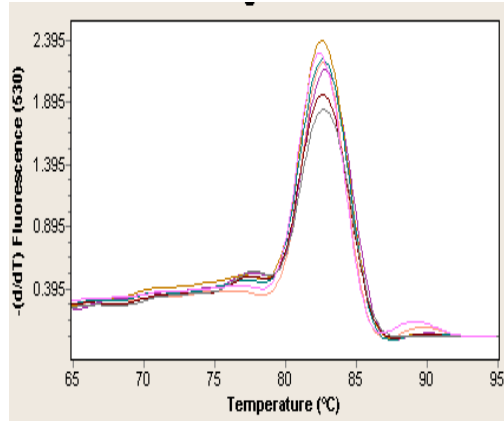


B

Şekil 48. A. 0.01 mM H₂O₂ (90 dak) uygulamasında ve uygulama olmadan (kontrol) TVN0775 geni anlatımının analizine ilişkin RT-PCR eğrileri. Test — ; Kontrol — ; negatif kontrol (- cDNA) — , **(B)** Denatürasyon eğrisi



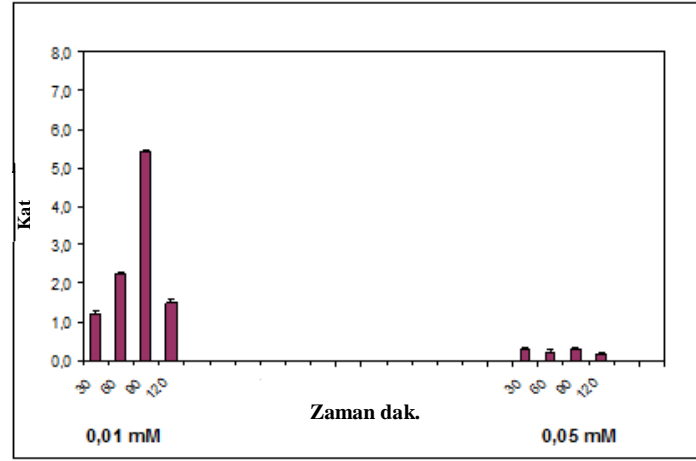
A



B

Şekil 49. 0.05 mM H₂O₂ (60 dak) uygulamasında ve uygulama olmadan (kontrol) TVN0775 geni anlatımının analizine ilişkin RT-PCR eğrileri. Test — ; Kontrol: — ; — negatif kontrol (- cDNA), **(B)** Denatürasyon eğrisi

RT-PCR sonuçları, bir göreceli kantitasyon yöntemi olan $2^{-\Delta\Delta T}$ yöntemi ile analiz edildiğinde kontrole göreceli olarak sHSP/775 geninin ekspresyon düzeylerinde görülen farklılık Şekil 50'deki grafikte görülmektedir.

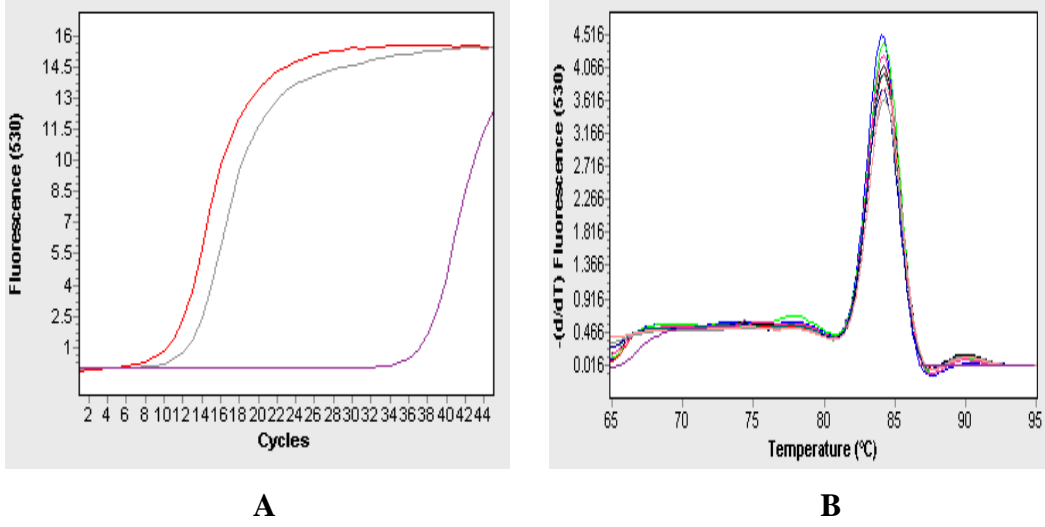


Şekil 50. Oksidatif stres koşulunda sHSP/775 geninin ekspresyon düzeyindeki değişim.

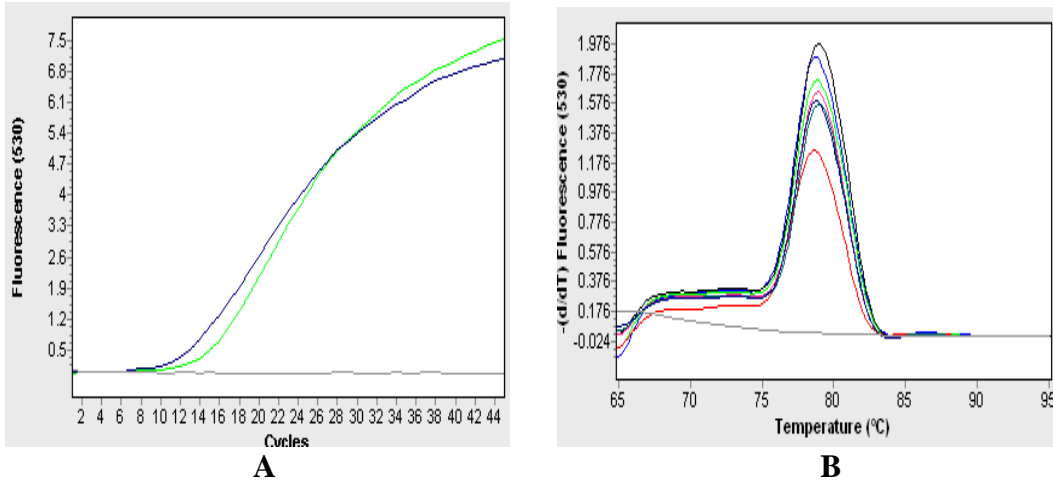
TVN0984 geni ekspresyonu, Ct değerlerindeki değişime göre, 2 saat boyunca 0.01 mM H₂O₂ varlığında 90 dak dışında ya değişmemiş ya da düşme göstermiş, 0.05 mM H₂O₂ ise varlığında azalma göstermiştir. (Tablo 9). TVN0984 cDNA örneklerinin oksidatif stres koşullarında (0.01 mM H₂O₂ - 90 dak, ve 0.05 mM H₂O₂ – 90 dak) amplifikasyonuna ait 2 örnek eğri Şekil 51 ve 52’de görülmektedir. Gerçek zamanlı PCR deneyleri Melting curve analizi ile doğrulanmış olup, TVN0984 geni için Tm: 84,22 °C (±2,30) olarak bulunmuştur.

Tablo 9. TVN0984 geninin oksidatif stres koşullarında farklılaşmış gen ekspresyonuna ait Ct and Tm değerleri

H ₂ O ₂ derişimi	Zaman (dak)	CP	TM
0,01mM	30	12,04	84,17
	60	11,53	84,29
	90	10,14	84,29
	120	11,2	84,29
	Kontrol	11,87	84,33
0,05mM	30	13,08	84,18
	60	13,99	84,26
	90	13,44	83,97
	120	15,19	84,32
	Kontrol	11,63	84,19

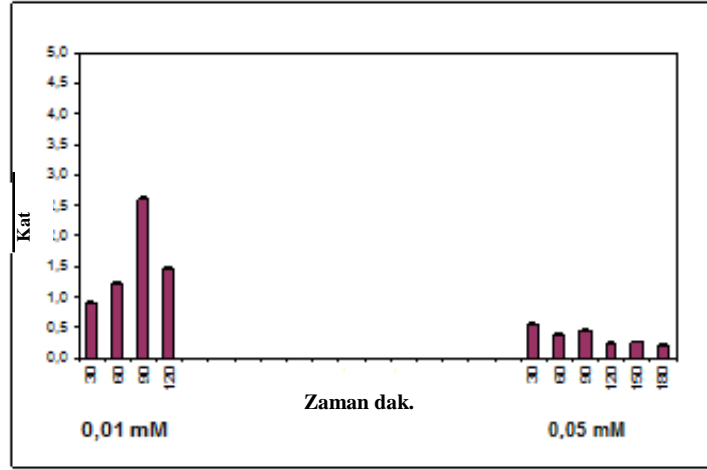


Şekil 51. A. 0.01 mM H₂O₂ uygulamasında ve uygulama olmadan (kontrol) TVN0984 geni anlatımının analizine ilişkin RT-PCR eğrileri. Test — 90 min; Kontrol: — ; — negatif kontrol (- cDNA), **(B)** Denatürasyon eğrisi



Şekil 52. A. 0.05 mM H₂O₂ uygulamasında ve uygulama olmadan (kontrol) TVN0984 geni anlatımının analizine ilişkin RT-PCR eğrileri. Test — 90 dak; Kontrol: — ; — negatif kontrol (- cDNA), **(B)** Denatürasyon eğrisi

RT-PCR sonuçları, bir göreceli kantitasyon yöntemi olan $2^{-\Delta\Delta T}$ yöntemi ile analiz edildiğinde kontrole göreceli olarak sHSP/984 geninin ekspresyon düzeylerinde görülen farklılık Şekil 53'deki grafikte görülmektedir.



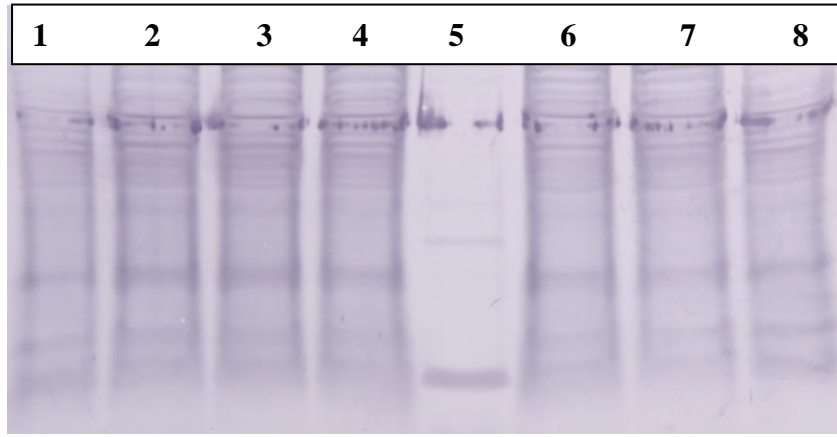
Şekil 53. Oksidatif stres koşulunda sHSP/984 geninin ekspresyon düzeyindeki değişim.

3.8. Western Aktarım / Hibritleme ve İmmünojenik belirleme

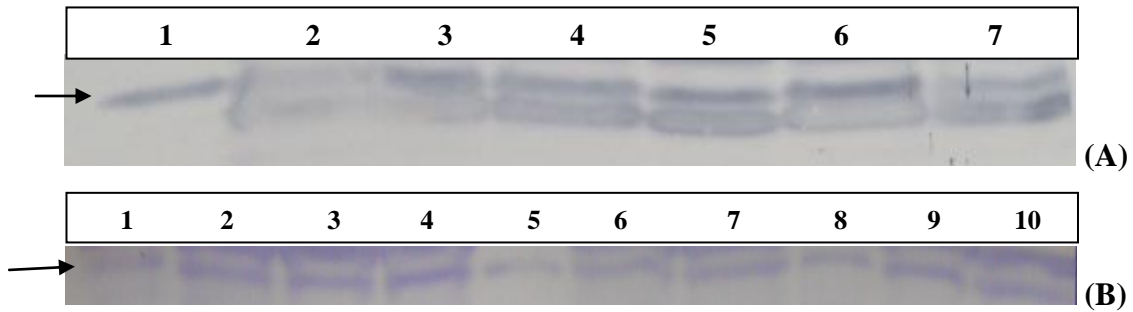
Western aktarım/hibridizasyon deneylerinde kullanmak için arkea kökenli sHSP antiijenleri için spesifik ticari bir antikor bulunmadığı için, kros hibritlenme düşüncesi ile insan alfa A kristalin proteininin alfa kristalin domeni esas alınarak sentezlenmiş bir sentetik peptite karşı tavşandan elde edilen antikor ile sıçan iskelet kası kökenli HSP20 'ye karşı geliştirilen antikor ayrı ayrı denenmiştir. Söz konusu antikorlar sHSP20 ile homolog antiijenlere spesifik oldukları için sHSP20 homloğu olan sHSP/775 proteininin ekspresyonunu incelemek için kullanılmışlardır.

sHSP/775 geninin transkripsiyon düzeyindeki indüklenmenin translasyon düzeyinde de görülüp görülmediğini test etmek için, her 3 stres koşulunda transkripsiyon düzeyinde belirgin artışların olduğu durumlar için Western Analizleri yapılmıştır. Kontrol olarak saflaştırılmış rekombinant sHSP/775 örneği pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Western analizi yapmak üzere, transkripsiyon düzeyinde indüklenmenin görüldüğü 65 °C'de 60 dak, pH 4.0 ve pH 5.0 'de 60 dak, 70 °C'de ve 0.01 mM H₂O₂, 90 dak strese maruz kalmış hücrelerin özütleri kullanılmıştır. Ayrıca transkripsiyon düzeyinde ekspresyonun kontrole göre düşme gösterdiği 70 °C'de 90 dak ve 0.05 mM H₂O₂ 'de 60 dak şok uygulanan hücrelerin özütleri ve *T. volcanium* için optimum gelişme koşullarında geliştirilen hücrelerden elde edilen özütler de negatif kontrol olarak kullanılmıştır. İnsan alfa A kristalin proteinine spesifik antikorla yapılan Western analizlere ait elde edilen tipik bir sonuç Şekil 54'de verilmiştir. Bu deneylerde immünojenik gözlem "Goat antirabbit IgGpAb AP conjugate" ve alkali fosfat için kromojenik substrat kullanılarak yapılmıştır. Her ne kadar elde edilen bantlar negatif kontrole

görelî olarak Gerçek Zamanlı PCR sonuçlarını desteklemekte ise de, bu membran fotoğrafında ve tekrar deneylerine ait membranlarda beklenen pozisyonadaki bantların yeterince belirgin değildir. Bunun kullanılan antikorun yeterince spesifik olmamasından kaynaklanacağı düşünülerek Western analizleri ayrıca biyotinle işaretlediğimiz “rat scelatal muscle Hsp20” proteinine özgü antikor kullanılarak tekrarlanmıştır. Bu deneylerde immünolojik gözlem “AP-streptavidin “ konjugatı ve alkali fosfat için kromojenik substrat kullanılarak yapılmıştır ve iki deneye ait sonuçlar Şekil 55 A ve B’de verilmiştir. Bu antikorla tekrarlı olarak yapılan deneylere ait memebranlarda gözlenen bantlar daha belirgin olup, elde edilen bu sonuçlar, gerçek zamanlı PCR sonuçlarını desteklemiştir.



Şekil 54. sHSP/775 proteini ekspresyonunun insan alfa A kristalin proteinine spesifik antikor kullanılarak Western aktarım/hibritleme tekniği ile analizi. Sıra **1:** pH 4.0; **2:** pH 5.0; **3:** 0.01 mM H₂O₂; **4:** Negatif kontrol ; **5:** Pozitif kontrol (antijen : saf sHSP/775) ; **6:** 0.05 mM H₂O₂; **7:** 70 °C; **8:** 65° C örneklerine ait Western analiz sonucu.



Şekil 53. sHSP/775 proteini ekspresyonunun sıçan iskelet kası kökenli HSP20proteinine spesifik antikor kullanılarak Western aktarım/hibritleme tekniği ile analizi. (A) sıra **1:** Pozitif kontrol (antijen : saf sHSP/775); **2:** 0.05 mM H₂O₂; **3:** 0.01 mM H₂O₂; **4:** 65° C; **5:** Negatif kontrol ; **6:** pH 4.0; **7:** pH 5.0; **8:** Kontrol (şok uygulanmamış) örneklerine ait Western analiz sonucu. (B) sıra **1:** Kontrol (şok uygulanmamış); **2:**65° C ; **3:** 70 °C ; **4:** 0.01 mM H₂O₂; **5:** Pozitif kontrol (antijen : saf sHSP/775); **6:** 0.05 mM H₂O₂; **7:** 0.01 mM H₂O₂; **8:** Kontrol (şok uygulanmamış); **9:** 65° C örneklerine ait Western analiz sonucu.

4. Tartışma/Sonuç

Küçük ısı şoku proteinleri tüm canlı türlerinde yüksek oranda korunmuş olan moleküler şaperonlardır. İnsan dahil ökaryotik canlılarda ve hücrede stres karşıtı mekanizmalarda ve protein kalite kontrol ağlarındaki kritik rolleri bilinmektedir. Ancak sHSP'lerin normal koşullarda yaşayan canlılar için "stres" olarak kabul edilen yaşam koşullarına adapte olmuş *archaea* bakterilerde fizyolojik rolleri ve etki mekanizmalarına ilişkin mevcut bilgi sınırlıdır ve sadece bazı hipertermofilik *archaea* bakterilere ilişkindir. Bu projenin amacı, *archaea*'da moleküler şaperonların bu ilginç grubunun şaperon fonksiyonlarını aydınlatmak ve ayrıca bazı işlevsel ve yapısal özelliklerini araştırmaktır. Bu doğrultuda model sistem olarak orta düzeyde termofilik ve asidofilik bir arkea olan *Thermoplasma volcanium*'un (optimum gelişme sıcaklığı 60 °C ve optimum pH 2.7) sHSP'lerin yapı ve şaperon etkinliği ilk defa incelenmiştir. *T. volcanium* genom dizi analizine göre mevcut iki sHSP geni, TVNO775 ve TVNO984, *E.coli*'de klonlanmış ve ekspres edilmişler, ayrıca klonlanan genlerin dizi ve restriksiyon analizleri yapılmıştır. Yüksek düzeyde ekspres edilen rekombinant sHSP/775 proteini (yaklaşık 14 kDa) afinite kromatografisi ile izole edilmiştir. Ancak HSP/984 geninin klonlama ve ekspresyon vektörüne yapılan alt klonlaması restriksiyon analizi ve DNA dizi belirlemesi ile doğrulanmasına karşın afinite kromatografi ile izolasyonu başarılı olamamıştır. Denatürasyon koşullarında aktif enzim elde edilememesi, bu sorunun "inclusion body" oluşumundan kaynaklanmadığını göstermiştir. Diğer taraftan sHSP/984 geninin ısı şoku koşullarında indüklenmesi, transkripsiyonunun hala aktif olmasına rağmen genin defektif olması ya da proteinin stabilitesinin düşük olması şeklinde açıklanabilir. Diğer organizmalarda sHSP'lerin "bir hücrede birden fazla paraloğunun bulunması durumunda hepsinin aktif olamayabileceğine" ilişkin sonuçlar da görüşü desteklemektedir. Bu projede yola çıkış noktamız tamamen organizmanın genom dizi analizi ve gen/protein "annotation"ına dayalı putative sHSP genlerinin bulunmasıdır. Gen/protein annotation'ına dayalı tahminler sHSP/984 proteini için karşılaştığımız durumda olduğu gibi her zaman aktif protein bulunduğunu anlamına gelemmektedir. Bu nedenle yapısal/fonksiyonel analizler saflaştırılmış sHSP/775 proteini ile yürütülmüştür.

Mezofilik domuz kalbi sitrat sentaz enzimi aktivitesi, inaktif olduğu 41 °C'de sHSP/775 proteini varken kontrole (sHSP/775 bulunmadığı) göre yaklaşık 10 kat fazla bulunmuştur. Kimyasal olarak denatürlenmiş sitrat sentaz enzimini ise, sHSP varken renatürasyondan sonra orijinal aktivitesinin %36'sını geri kazanmıştır. Sığır glutamat dehidrogenaz enzimi

substrat olarak kullanılarak ile yürütülen şaperon aktivite deneylerinde ise enzimin 53 °C 'de sHSP/775 varlığında kalan aktivitesi , sHSP/775 bulunmadığı duruma göre 2.2 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. GdnCl ile denatürlenmiş boGDH enzimi ise renatürasyondan sonrası aktivite geri kazanımı kontrole göre (kendiliğinden renatürasyon) 2.5 kat daha fazla olmuştur. Bu sonuçlar, sHSP/775'nin mezofilik ve ökarot kökenli model enzimlerin hem yüksek sıcaklıkta inaktivasyonunu azaltmak, hem de kimyasal olarak kısmen denatüre olmuş enzimlerin yeniden katlanmasına yardımcı olmak suretiyle şaperon aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir.

sHSP/775'nin ısıya bağlı konformasyonel değişim bis-ANS'e bağlanma etkinliğini spektrofloretride 525 nm'de gözlenen emisyon peak'inin intensitesini ölçmek yolu ile izlenmiştir. Bu deney sonuçları, sHSP/775'in yapısal organizasyondaki değişikliğin 65 °C'den başlayarak 98 °C'ye kadar, muhtemelen sHSP'lerin genel karakteri olarak altünite değişimleri şeklinde giderek arttığını göstermiştir. Isıya bağlı olarak sHSP/775'in oligomerik yapısındaki değişim ve oligomer büyüklüğünün artması TEM analizi ile açık bir şekilde gözlemlenmiş ve görüntülenmiştir.

Her iki *tpv* sHSP'nin *T. volcanium*'un stres tepkisindeki yerini aydınlatmak üzere genlerin transkripsiyonlarının strese bağlı indüklenmesi Gerçek Zamanlı PCR tekniği ile çalışılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar, TVNO775 ve TVNO984 genlerinin yazılımının en fazla sırası ile 65 °C'de ve 70 °C 'de ısı şokunda indüklendiğini, pH şokunun (pH 4.0) TVNO775 gen anlatımını uyarırken, pH 4.0 ve pH 5.0'de TVNO984 gen anlatımına etkisi olmadığını göstermiştir. Her iki *tpv* sHSP geninin yazılımı 0.01 mM H₂O₂ varlığında oksidatif stres koşulunda arttırırken, 0.05 mM H₂O₂ varlığında gen anlatımında düşme görülmüştür (down regulation). Bu sonuçlar diğer moleküler şaperonlarda olduğu gibi *tpv* sHSP/ 775 transkripsiyonunun arttığını göstermiştir. Ayrıca insan ve sıçan kökenli sHSP20 proteinlerine karşı geliştirilen antikorlar kullanılarak yürütülen Western aktarım/Hibritleme analizleri, Gerçek Zamanlı PCR ile strese bağlı transkripsiyon düzeyinde görülen sHSP/ 775 geni anlatımdaki indüklenmenin protein sentezi düzeyinde de olduğunu göstermiştir.

Bu proje ile termoasidofilik arkea olan *T. volcanium*'da stres tepkisinde sHSP/775 proteinin etkin rolü olduğunu göstermektedir. Bundan sonraki çalışmalarımızın hedefi sHSP/775 stres tepkisinde işlevini yerine getirirken *T. volcanium* için major şaperon sistemi olan termozomla nasıl bir etkileşim içinde bulunduğunu ortaya çıkarmaktır. Bu bağlamda sHSP/984 proteinin bu süreçteki muhtemel rolü de aydınlatılmaya çalışılacaktır.

Kaynaklar:

- BOVA, M.P. *et al.*, Subunit Exchange, Conformational Stability, and Chaperone-like Function of the Small Heat Shock Protein 16.5 from *Methanococcus jannaschii*, *J. Biol. Chem.*, 277(41): 38468-75, (2002).
- BUCHNER, J *et al.*, Analysis of chaperone function using citrate synthase as a nonnative substrate protein. *Methods Enzymol.*, 290: 323-338, (1998).
- CHUNG CT *et al.*, One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution, *Proc Nat Acad Sci*, USA 86:2172-75, (1998).
- FEDER, M E., Hofmann, G E., Heat-Shock Proteins, Molecular Chaperones, And The Stress Response: Evolutionary And Ecological Physiology, *Annu. Rev. Physiol.* 61:243–82., *Annu. Rev. Physiol.*, 61, 243-82, (1999).
- GLOVER, J.R., Lindquist, S., Hsp104, Hsp70, and Hsp40: A Novel Chaperone System that Rescues Previously Aggregated Proteins, *Cell*, 94(1): 73-82, (1998).
- HASLBECK, M *et al.*, Structural Dynamics of Archaeal Small Heat Shock Proteins. *J. Mol. Biol.*, 378(2), 362-74, (2008).
- HASLBECK, M *et al.*,. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12(10): 842-46, (2005).
- HASLBECK, M. *et al.*, Hsp26: a temperature-regulated chaperone, *EMBO J.*, 18(23): 6744-51, (1999).
- HORWITZ, J., α -Crystallin can function as a molecular chaperone, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA., 89(21): 10449- 53, (1992).
- KIM, R *et al.*, Small heat shock protein of *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile, *Natl.Acad. Sci.* USA, 95(16): 9129-33, (1998).
- KIM, K.K *et al.*, Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature*, 394: 595-99. (1998).
- KOCABIYIK S., Demirok B., Cloning and over expression of a thermostable signal peptide peptidase (SppA) from *Thermoplasma volcanium* GSS1 in *E. coli*, *Biotechnol J* , 4: 1055-65, (2009).
- KOCABIYIK, S., Essential structural and functional features of small heat-shock proteins in molecular chaperoning process. *Prot. Peptide Lett.*, 16: 613-22, (2009).
- LAKSANALAMAI, P and Robb, FT. Small heat shock proteins from extremophiles. *Extremophiles*, 1-11, (2005).
- LAKSANALAMAI, P *et al.*, Chaperone action of a versatile small heat shock protein from *Methanococcoides burtonii*, a cold adapted archaeon, *Proteins*, 75: 275-81, (2009).
- LAKSANALAMAI, P *et al.*, Regulation And Mechanism Of Action Of The Small Heat Shock Protein From The Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*, *J. Bacteriol.*, 183(17): 5198-202, (2001).

- LITT, M *et al.*, Autosomal dominant congenital cataract associated with a missense mutation in the human alpha crystallin gene CRYAA *Hum. Mol. Genet.* 7(3): 471-74, (1998).
- LIVAK K J., Schmittgen TD., Analysis of Relative Gene Expression Data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta T}$ 2-Delta Delta C(T) Method, *Methods*, 25:402-8, (2001).
- MAEDER, D.L *et al.*, Novel chaperonins in a prokaryote. *J. Mol. Evol.*, 60(3):409-16, (2005).
- MUCHOWSKI, PJ., Clark JM., ATP-enhanced molecular chaperone functions of the small heat shock protein human α B crystallin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 1004-09, (1998).
- NAKAMOTO, H ., Vigh, L., The small heat shock proteins and their clients, *Cell. Mol. Life Sci.*, 64(3): 294-306, (2007).
- RANSON, N A *et al.*, Chaperonins, *Biochem J*, 333 (pt2): 233-42, (1998).
- SRERE PA *et al.*, The citrate –condensing enzyme of pdgion breast muscle and moth flight muscle, *Acta Chem Scand.*, 17:129-134, (1963).
- SUN,Y ., MacRae, T H., Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function, *Cell. Mol. Life Sci.* ., 62: 2460–76, (2005).
- USUI, K *et al.*, Small Heat Shock Protein of a Hyperthermophilic Archaeum, *Thermococcus sp.* Strain KS- 1, Exists as a Spherical 24 mer and Its Expression Is Highly Induced under Heat-Stress Conditions *J. Biosci. Bioeng.*, 92(2):161-66, (2001).
- VAN MONTFORT, R L M *et al.*, Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein, *Nat. Struct. Biol.*, 8(12): 1025-30, (2001).

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

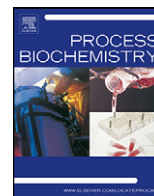
Proje No: 109T946
Proje Başlığı: Arkeabakteri Kökenli Rekombinant Küçük Isı Şoku Proteinlerinin <i>E.coli</i> 'de Yüksek Düzeyde Ekspresyonu ve Karakterizasyonu; Çeşitli Stres Koşullarında Küçük Isı Şoku Protein Genlerinin Anlatım Farklılaşmasının Analizi
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Prof.Dr.Semra Kocabıyık
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Biyolojik Bilimler Bölümü, ODTÜ, Ankara
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:-
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.04.2010-01.04.2012
Öz (en çok 70 kelime) <p>Bu projede, <i>Thermoplasma volcanium</i>'un küçük ısı şoku proteinlerinin (sHSP/775 ve sHSP/984) rekombinant olarak üretimi ve farklı stress koşullarında ekspresyon profillerindeki değişim transkripsiyon ve traslasyon düzeylerinde incelenmiştir. Rekombinant sHSP/775 proteininin, mezofilik enzimleri ısı şokundan koruduğu ve denatürlenmiş enzimlerin yeniden katlanmasında etkili olduğunu göstermiştir. Fulorimetrik ve Transmisyon Elektron Mikroskopi ile yürütülen yapısal analizler sHSP/775 proteinin oligomer yapısının ısıya bağlı olarak değiştiğini göstermiştir. Bu sonuçlar, küçük ısı şoku proteinlerinin <i>T. volcanium</i>'un stres tepkisinde etkin rolüne ilişkin özgün verilerle literature önemli katılarda bulunmuştur.</p>
Anahtar Kelimeler: Stres yanıtı, moleküler şaperon, küçük ısı-şoku protein (sHSP), <i>Thermoplasma volcanium</i> , arkeabakteri
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
Projeden Yapılan Yayınlar: <ol style="list-style-type: none">S. Aygar, S. Kocabıyık. Rekombinant Küçük Isı Şoku Proteinlerinin <i>E.coli</i> Hücrelerinin Isı Direncine Etkisi. 20.Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-25 Haziran, 20101, Denizli. Bildiriler Kitabı, 1021-1022, özet no.PH-020,S.Kocabıyık et al., Improving Protein Stability and Enzyme Recovery under Stress Conditions by use of Recombinant Molecular Chaperones. 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition. IBS2010, 14-18 September 2010, Rimini, Italy, Abstract no. P-I.101.S.Kocabıyık, S.Aygar, S. Kacar Sress induced changes in the oligomeric assembly and expression of a small heat shock protein from Thermoacidophilic archaeon <i>Thermoplasma volcanium</i>. 4th Congress of European Microbiology, 26-30 Temmuz, Cenevre İsviçre 2011. Abstract.S. Kocabıyık S, Aygar S. Improvement of protein stability and enzyme recovery under stress conditions by using a small HSP (tpv-HSP 14.3) from <i>Thermoplasma volcanium</i>. Process Biochem (2011), doi:10.1016/j.procbio.2011.11.014S. Aygar The role of small heat shock proteins of thermoacidophilic atckaeon <i>Thermoplasma volcanium</i> in the stress response. Master Thesis, ODTÜ; 2011



Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Process Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/procbio



Improvement of protein stability and enzyme recovery under stress conditions by using a small HSP (*tpv*-HSP 14.3) from *Thermoplasma volcanium*

Semra Kocabiyık*, Sema Aygar

Department of Biological Sciences, Middle East Technical University, 06800 Ankara, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 August 2011
Received in revised form 31 October 2011
Accepted 18 November 2011
Available online xxx

Keywords:

Thermoplasma volcanium
Small heat-shock protein (sHSP)
Molecular chaperone
Heat-shock response

ABSTRACT

In this study we cloned and expressed a small heat shock protein, *tpv*-HSP 14.3, from thermoacidophilic archaeon *Thermoplasma volcanium*. This novel recombinant small heat shock protein was purified to homogeneity and produced a protein band of 14.3 kDa on SDS-polyacrylamide gel. Transmission electron microscopy images of the negatively stained *tpv*-HSP 14.3 samples showed spherical particles of 13 nm diameter. *E. coli* cells over expressing *tpv*-HSP 14.3 endowed the cells with some degree of thermotolerance. After exposure to 52 °C for 120 min, survivability of the *E. coli* cells expressing *tpv*-HSP 14.3 was approximately 2.5-fold higher than the control cells. As a molecular chaperone *tpv*-HSP 14.3 enhanced the thermal stabilization of substrate proteins, pig heart citrate synthase and bovine L-glutamic dehydrogenase, considerably. The highest protection effect of *tpv*-HSP 14.3 was observed at 47 °C for pig heart citrate synthase; the remaining activity was 5-fold higher than that of the sample without *tpv*-HSP 14.3. The *tpv*-sHSP 14.3 prevented inactivation of bovine L-glutamic dehydrogenase the most effectively at 53 °C; the residual activity was approximately 2-fold higher than that of the sample heated without *tpv*-HSP 14.3. However, refolding activity of the *tpv*-HSP 14.3 was relatively weak for the chemically denatured substrate proteins.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

All living organisms adapt to adverse environmental conditions by evolving several specific molecular responses. In particular, universally conserved heat-shock response occurs when the cells are exposed to various stressors, resulting in the rapid and transient over production of chaperones which are often called heat-shock proteins (HSPs). Under stress, many cellular proteins lose their native configuration and tend to aggregate. This could pose a serious threat to the cellular functionality. Chaperones provide the essential assistance by promoting refolding of the stress-denatured proteins and preventing their aggregation. The predominant HSPs are classified by their molecular masses as HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 and small HSPs (sHSPs) [1]. Comprehensive genome wide surveys for the molecular chaperone genes revealed that homologues of HSP60 family called “chaperonins (group II)” (e.g.

thermosome) are present in all archaea whose genomes have been sequenced thus far [2]. Chaperonins possibly in cooperation with the co-factor prefoldin and sHSPs constitute the major protein folding system of archaea.

The functions of sHSPs, as ATP independent molecular chaperones, in protein folding and, as antistressors, in acquired thermotolerance have been well established and thoroughly covered in several reviews [3–7]. Upon heat-shock or exposure to other stressors, sHSPs capture unfolded proteins and form high molecular weight multimeric complexes, thus prevent their irreversible aggregation by holding them in a soluble and folding competent state. Then, refolding of the captured proteins most likely occur with the assistance of the ATP dependent molecular chaperones, such as ClpB (or Hsp 104) and/or the DnaK/DnaJ/GrpE (or Hsp70/Hsp40) system [8–11].

Small heat shock proteins and the related α -crystallins of the vertebrate eye lens, share a highly conserved “ α -crystallin domain” of 80–100 amino acids [12,13]. The monomeric molecular weight of the sHSPs range from 12 to 43 kDa and most of them form oligomeric structures (200–1000 kDa) of 9–40 subunits [14,15].

Although the role of sHSPs in chaperoning process has been well established in eucarya and bacteria, it largely remains to be established in archaea. To date, sHSPs from strict anaerobic, methane producing archaeon *Methanococcus jannaschii* (MjHsp 16.5), sulfur metabolizing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* (sHSP20.2),

Abbreviations: boGDH, bovine L-glutamic dehydrogenase; HSP, heat shock protein; pHCS, pig heart citrate synthase; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; sHSP, small heat shock protein; TEM, transmission electron microscope; *tpv*-HSP 14.3, *Thermoplasma volcanium* small heat shock protein 14.3.

* Corresponding author. Tel.: +90 312 2105174.

E-mail address: biosemra@metu.edu.tr (S. Kocabiyık).

thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii* strain 7 (*St* Hsp14.0) and *S. solfataricus* (sHSP 14.1), and hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. strain KS-1 (T.sHSP) have been characterized [16–20]. Cryo-EM and/or X-ray crystallographic 3-D image analyses revealed that all archaeal sHSPs exist as a well defined 24-mer oligomeric complex with octahedral symmetry [16,17]. Each subunit contains a disordered, variable N-terminal domain, a conserved α -crystallin domain (which is composed of nine β -strands arranged into two anti-parallel β -sheets) and a C-terminal extension [16,17]. The N-terminal region is thought to be important both structurally and functionally, possibly in oligomer formation and substrate binding. The α -crystallin domain is necessary for dimerization and together with the flanking regions is also critical for the higher-order oligomerization. The C-terminal domain, specifically its consensus IXI/V motif, is involved in stabilization of the oligomeric structure.

Increased understanding of the biochemical and chaperoning properties of the archaeal sHSPs enables us not only to understand the molecular mechanisms by which these protein families function in modulating stress response in *Archaea*, but also to use them for improvement of the performances of enzymes as biocatalysts. One of the most challenging tasks for the biotechnological applications are to enhance the utility and stability of enzymes, because they are readily prone to heat and/or chemical denaturation. Exceptional protein binding capacity of the sHSPs that keep them in the active conformation can be exploited to overcome instability problems commonly encountered in the enzyme based technologies. Since proteins from extremophilic organisms could well resist harsh conditions of industrial applications, their sHSPs might have potential for stabilization and reactivation of the enzymes. There are very limited examples of studies that extend and apply the chaperone activity of archaeal sHSPs for enzyme improvement. Most of the current information for the use of microbial sHSP to control quality and quantity of recombinant proteins came from the studies with *E. coli* sHSPs, lbp and lba [21,22].

This report describes the molecular cloning, over expression and purification of a sHSP, *tpv*-HSP14.3, from thermoacidophilic archaeon *Thermoplasma volcanium* GSS1 (DSM 4299) (a facultative anaerobic heterotroph, which grows optimally at 60 °C and pH 2.0). Also in vitro chaperone-like activity of the recombinant *tpv*-HSP 14.3 was investigated using pig heart citrate synthase (phCS) and bovine L-glutamic dehydrogenase (boGDH) enzymes as the model substrates.

2. Materials and methods

2.1. Microbial strains and culture conditions

T. volcanium GSS1 (type strain DSM 4299) was purchased from DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GmbH, Braunschweig, Germany). Cells were grown in Volcanium medium at 60 °C without agitation as described previously [23].

E. coli TG1 strain (*supE hsd Δ 5 thi Δ (lac-proAB)⁺ F[traD36proAB⁺ lac^qlacZ Δ M15]*) was used in this study for molecular cloning and recombinant protein expression.

2.2. Cloning and subcloning of *tpv*-sHSP14.3 gene for expression

T. volcanium (*tpv*) genomic DNA was isolated as described by Kocabylyk and Demirok [24]. The sHSP gene was amplified from *T. volcanium* genomic DNA by PCR (Gene Cycler, Techne Inc., NJ, USA) using a forward primer (5'-G TAT ACA CCC ATA AAG TTC TTT ACG AAT GAG-3'), which was designed by avoiding the ATG start codon of the gene, and a reverse primer (5'-C ACC CAA TCA CAT CAA GCA TAC-3'). The primer sequences were obtained from the nucleotide sequences of the predicted Hsp-20 related small heat shock protein, HSP 14.3 (locus name TVN0775, coordinates 790978–791352) in the *T. volcanium* genome [25] and synthesized by Operon Biotechnologies GmbH, Germany.

The PCR amplicons were purified (MinElute, PCR Purification Kit, QIAGEN Inc., Valencia, USA) and then cloned into pDrive vector using a PCR Cloning Kit (QIAGEN). The competent *E. coli* TG-1 cells were transformed with recombinant plasmid constructs according to Chung et al. [26] and the recombinant colonies were identified through blue/white colony screening. A selected recombinant plasmid harboring

tpv-HSP14.3 gene was designated pDri/2-hsp14.3. The sequence of cloned DNA fragment was confirmed by sequence analysis (Microsynth AG, Balgach, Switzerland).

Expression of the cloned *tpv*-HSP14.3 gene and purification of the heterologously expressed 6xHis-tagged protein were achieved by use of QIAexpressionist Kit (QIAGEN Inc., Valencia, USA). In the Kit, high level expression of the 6xHis tagged proteins using pQE vectors is based on an optimized translation system consisting of an IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) inducible phage T5 promoter/lac operator, an ATG start codon and a synthetic ribosome binding site, RBSII. The cloned gene was excised from the recombinant plasmid pDri/2-hsp14.3, by digestion with *Sall* and *PstI* restriction enzymes and purified by use of a DNA Extraction Kit (GeneClean Kit, BIO 101 Systems, USA). The pQE 30, 31 and 32 expression vectors were also double digested with the same restriction enzymes. The linearized vector DNA, after gel purification, ligated with the purified sHSP gene fragment. The recombinant pQE constructs were introduced into competent *E. coli* TG-1 cells by transformation. The transformants which expressed N-terminally 6xHis tagged sHSP proteins were detected by colony-blotting and immunological screening method using Anti-His HPR-conjugated antibody (Penta His HRP Conjugate Kit, QIAGEN). Staining, to detect the positive signals on the membrane blots, was performed with DAB substrate (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; metal enhanced, Roche Diagnostics GmbH, Germany) that produced dark brown/black precipitate in the presence of horseradish peroxidase. The positive clones that carry the *tpv*-sHSP 14.3 upstream of and in frame with 6xHis tag were identified among the *E. coli* cells transformed with the constructs prepared using pQE31. The one named *E. coli* pQE31_tv14.3 was selected to be used for heterologous expression of the *tpv*-HSP 14.3 in *E. coli*. The right orientation of the insert was checked by restriction enzyme digestion analysis. The identities of all constructs were confirmed by DNA sequencing.

2.3. Sequence analyses

Amino acid sequences of sHSPs from a group of *Archaea* species were compared by using the ClustalW2.0.12 Program in the EMBL-EBI database (<http://www.ebi.ac.uk>). The gene sequences were identified by BLAST search of databases at National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and Comprehensive Microbial Resource (CMR; <http://cmr.jcvi.org>). The secondary structure predictions were derived from Predict-Protein Server (<http://www.bork.embl-heidelberg.de/Alignment/consensus.html>). The deduced protein sequence of the *tpv*-sHSP 14.3 was analyzed for the functionally important regions using Conserved Domain Search program (CDD v2.15, NCBI).

2.4. Purification of the 6xHis tagged *tpv*-HSP 14.3 protein

The recombinant *tpv*-sHSP 14.3 protein was expressed in the soluble fraction of *E. coli* cells and purification was performed under native conditions by Ni-NTA affinity chromatography (QIAexpressionist Kit, QIAGEN) with some modifications. The *E. coli* pQE31_tv 14.3 cells were grown in 50 ml LB broth (with 100 μ g/ml ampicillin) at 37 °C with shaking at 300 rpm to an OD₆₀₀ of 0.5–0.7. The *tpv*-sHSP 14.3 expression of the cells was induced with IPTG (to a final concentration of 1 mM) and the growth was continued for 4–5 h. The cells were harvested by centrifugation at 4000 \times g for 20 min at 4 °C (Sigma). The cell pellet was resuspended in 5 ml of lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl pH 8.0) containing 20 mM imidazole and 1 mg/ml lysozyme and incubated on ice for 30 min. After sonication (SonicatorVC 100, Sonics and Materials, CT, USA) the cell lysate was centrifuged at 10,000 \times g at 4 °C for 30 min (Sigma 3K30 Centrifuge, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA). The supernatant was heated at 65 °C for 10 min to denature heat labile *E. coli* proteins that were removed by centrifugation at 10,000 \times g at 4 °C for 1.5 h. The cleared lysate was kept at –20 °C until use.

For affinity chromatography, the mixture of lysate (4 ml) and Ni-NTA slurry (1 ml) after gentle shaking at 4 °C for 60 min was loaded to an empty column. The column was washed twice with 4 ml wash buffer (lysis buffer containing 30 mM imidazole). Bound protein was eluted with the lysis buffer containing 250 mM imidazole. The purity of the fractions were assessed by 12.5% SDS-PAGE [27]. The buffer of the fraction that include His-tagged sHSP, was exchanged with the lysis buffer and then concentrated by ultrafiltration using 5000 cut-off membrane (Microcentrifuge filters, Ultrafree-CL Filter Units, Millipore Ltd, Yonezawa). The chromatographic purification steps were carried out at room temperature.

The protein concentration was determined according to Whitaker and Granum [28].

2.5. Electron microscopy

Electron microscopic images were acquired and analyzed by VironovaAB (Stockholm, Sweden). Aliquots (3 μ l) of the diluted samples were applied onto a glow discharged carbon coated for 30 s at room temperature. Excess of buffer was blotted off and the grids were washed with ultrapure water for 3 sec before negative staining with 2% uranyl acetate for 10 sec. Prior to TEM imaging the grids were left to air dry. TEM imaging was done using a FEI Technai 10 electron microscope run at 80 kV and a 2kx2k side-mounted Veleta CCD camera (Olympus Soft Imaging Solutions).

2.6. Survivability at 52 °C of *E. coli* overexpressing *tpv*-sHSP14.3

For thermotolerance experiments, the recombinant *E. coli* cells (pQE.31 *tpv*HSP_{14.3}) and *E. coli* TG-1 cells transformed with the pQE.31 plasmid vector (as a control) were grown in Luria–Bertani (LB) broth containing 100 µg/ml of ampicillin at 37 °C overnight. Fresh LB broth with ampicillin (30 ml in 150 ml flask), was inoculated with 1 ml of the overnight culture and the cells were grown at 37 °C by shaking (at 230 rpm) to mid-log phase (OD₆₀₀ ≈ 0.6). For induction IPTG was added to a final concentration of 1 mM and incubation was continued at 37 °C for 2.5 h. The cells were diluted to OD₆₀₀ = 0.5–0.6 with LB broth that was supplemented with IPTG and ampicillin (total volume 12 ml in 50 ml flask) and the temperature was shifted to 52 °C. The samples (100 µl) were removed at 0, 20, 40, 60 and 120 min after thermal stress and a series of 10-fold dilutions were plated in duplicates onto ampicillin containing LB agar plates. Following the overnight incubation of the plates at 37 °C, the surviving colonies were quantified to determine the percentage of the viable cells. During incubation the growth was followed by measuring the optical density at 600 nm every 30 min, and growth curves were plotted. This experiment was repeated three times.

2.7. Protection of pig heart citrate synthase and bovine L-glutamic dehydrogenase from heat-denaturation by recombinant *tpv*-HSP 14.3

Pig heart citrate synthase (Sigma, St Louis, MO) (phCS) (EC 4.1.3.7, Sigma) and L-glutamic dehydrogenase from bovine liver (boGDH) (EC 1.4.1.3, Sigma) were used as model substrates in the heat-protection assays and chemical denaturation/renaturation experiments. Citrate synthase was diluted in Buffer A (20 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0) to a final concentration of 0.14 U (equivalent to 0.9 µg/ml) and boGDH was diluted in the Buffer B (0.1 M NaPO₄, pH 7.5) to a final concentration of 0.18 U (equivalent to 0.4 µg/ml). The enzyme samples were heated at indicated temperatures, in the presence of excess amounts of purified *tpv*-HSP 14.3 for 10 min. The mixtures were rapidly cooled down on ice and subsequently assayed for the remaining activities, as described below. Control reactions without *tpv*-HSP were also performed with addition of buffer to adjust the total reaction volume.

Three independent experiments were run for each substrate enzyme.

2.8. Chemical denaturation of the substrate proteins and renaturation assays

The phCS (15 U, equivalent to 1 mg/ml) was denatured by incubating the enzyme in the Buffer A containing 5.3 M Guanidinium hydrochloride, GdnCl (Sigma) and 20 mM Dithiothreitol, DTT (Fermentas, UAB, Vilnius, Lithuania) for 60 min at room temperature.

The boGDH (44 U equivalents to 1.25 mg/ml) was denatured by incubating the enzyme in Buffer B containing GdnHCl (1.5–5.3 M) at room temperature for 30 min.

For spontaneous refolding, denatured phCS and boGDH enzyme samples were diluted 100-fold in the Buffer A and B, respectively, and incubated at room temperature for 2 h. For chaperone assisted refolding, GdnCl denatured phCS and boGDH enzyme samples in the refolding mixtures containing excess amounts of purified *tpv*-HSP 14.3, were incubated at the 25 °C for 2 h. Assays for the recovered activity were performed as described below.

Experiments for the model substrates were repeated at least three times.

2.9. Activity assays

Citrate synthase activity assay was performed at 35 °C according to DTNB method of Srere et al. [29]. The reaction is based on enzymatic condensation of OAA and acetyl-CoA. The resulting co-enzyme reduces Ellman's reagent (dithio-1.4.-nitrobenzoic acid; DTNB). This stoichiometric reaction was continuously monitored by the associated increase in absorption at 412 nm, in a thermostatically controlled spectrophotometer (Schimadzu UV-1601A Spectrophotometer, Kyoto, Japan). The final enzyme concentration was about 5×10^{-4} mg/ml (equivalent to approx. 0.07 U/ml) in the reaction mixture.

The assay of boGDH was performed at 25 °C, essentially by following the manufacturer's protocol. The activities were measured by continuous monitoring the NADH oxidation at 340 nm for 5–10 min, in a thermostatically controlled UV-Visible spectrophotometer (Schimadzu). The buffer was 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.5. The reaction was initiated by adding enzyme sufficient to provide a final concentration of about 4×10^{-4} mg/ml (equivalent to approx. 0.02 U).

For both enzyme assays the absorbance was measured at the indicated wavelength (A_{412nm} or A_{340nm}) over 5–10 min to obtain activity trajectories, from which initial rates were calculated.

2.10. Statistical analysis

The heat survivability experiments were repeated three times and data presented were the mean value of the three replicates in each case with the standard deviation (i.e. means ± SD).

The initial reaction rates obtained from triplicate continuous enzyme assays were subjected to the Student's *t*-test.

3. Results and discussion

3.1. Overexpression and purification of the *tpv*-HSP14.3

The *E. coli* cells overexpressing *tpv*-HSP 14.3 were disrupted by sonication and after centrifugation, the *tpv*-HSP 14.3 remained in the supernatant fraction (i.e. cell free extract). Then, heat-treatment of the extract and subsequent centrifugation removed majority of the heat labile *E. coli* proteins while *tpv*-sHSP 14.3 remained soluble (Fig. 1) and fully functional as verified by heat protection assays discussed below. This result implies that heat resistance of the *tpv*-HSP14.3 protein may contribute to its enzyme stabilizing capacity at higher operational temperatures. Heat stability is a typical feature for the other recombinant proteins we cloned from *T. volcanium*, as well (i.e. citrate synthase, signal peptide peptidase, 20S proteasome) [24,30].

The heat-treated cell-free extract containing *tpv*-HSP 14.3 was further purified by affinity chromatography to homogeneity as revealed by SDS-PAGE (Fig. 1). The purified sample produced a protein band of about 14.5 kDa on the gel, which corresponds to the protein molecular weight deduced from the predicted amino acid sequence.

TEM images of the negatively stained *tpv*-HSP 14.3 at 25 °C showed that it exists as a relatively uniform spherical particles within size range 10–20 nm in diameter (mean 13 nm, SD=2) (Fig. 2).

3.2. Sequence analysis of *tpv*-Hsp14.3 and sequence alignment with other representative archaeal sHSPs

As in several other archaea, the protein folding system of the *T. volcanium* has restricted set of molecular chaperones. In the genome sequence of *T. volcanium* there are two group II chaperonin (thermosome) subunit genes (annotated as thermosome subunit-α and subunit-β), two sHSP genes, and two prefoldin (a chaperonin co-factor) subunit genes (annotated as prefoldin subunit-α and subunit-β). Two sHSP homologs of *T. volcanium* (locus names: TVN0775 and TVN0987) are 124 amino acid long *tpv*-HSP14.3 (pI 9.2, MW 14.33) and 182 amino acid long *tpv*-Hsp21.1 (pI 4.5 MW 21.062 kDa), respectively. The existence of genes for multiple sHSP paralogs with acidic pI and/or basic pI in the genomes of extremophiles is a common feature of the members of this domain [4]. In this study the cloning and expression of the low molecular weight sHSP of *T. volcanium*, *tpv*-HSP14.3 was undertaken. The nucleotide sequence of the cloned *tpv*-HSP 14.3 gene together with its untranslated upstream and downstream sequences were verified by DNA sequencing. The coding sequences of *tpv*-HSP 14.3 (375 nucleotides) were identical to the sequences available in GenBank (locus tag TVN0775, accession no. NP_111294). The DNA sequence data reported here is deposited in the EMBL/GenBank/DBJ nucleotide sequence databases with accession no. FR745403. The polypeptide sequence of the *tpv*-sHSP 14.3 protein (calculated MW 14.33 kDa) identified from the gene sequence consists of 124 amino acids. Interproscan (EMBL-EBI) identified two related domains: IPR002068, Hsp20/alpha crystalline family; IPR000978, Hsp20-like chaperone). In parallel to this identification, a BLAST conserved domain search classified the *tpv*-HSP 14.3 protein in the functional category of COG0071 (which is related to posttranslational modifications, protein turnover and chaperones). In this search the α-crystallin domain which is a common signature of the α-crystallin type small heat-shock proteins was mapped between position 33 and 114 in the *tpv*-HSP 14.3 sequence.

The secondary structure prediction obtained from the output of the PredictProtein Server, suggested that monomeric folding module is exclusively beta-strands (% 10.48 helix, % 38.71 beta sheets,

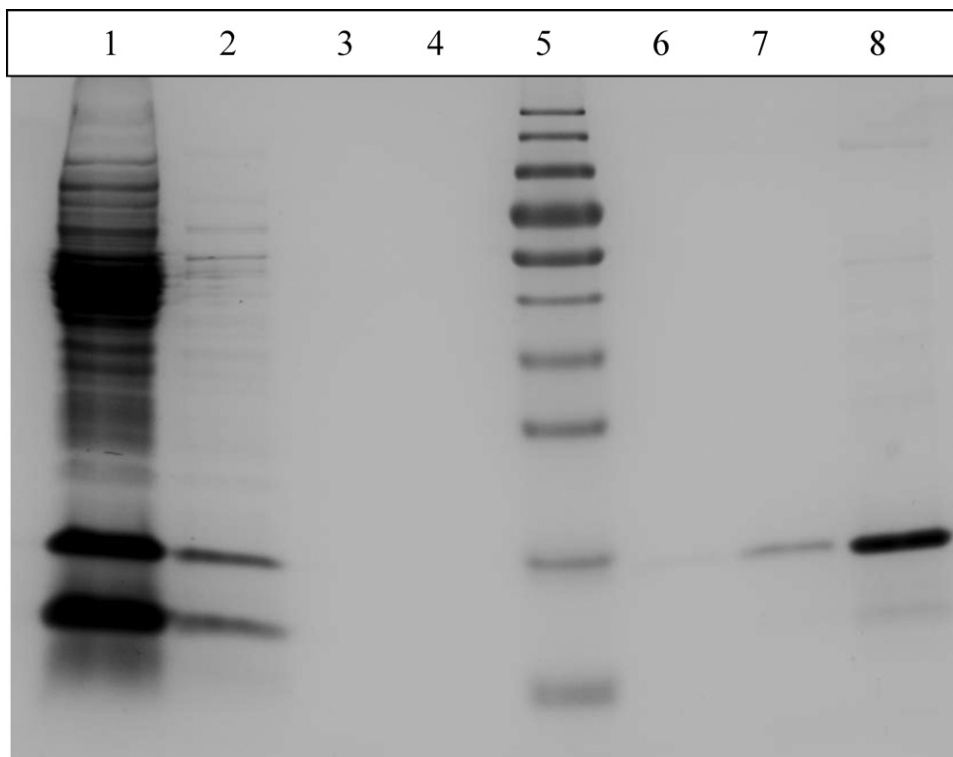


Fig. 1. SDS-PAGE (12.5%) of *tpv*-HSP 14.3 during purification by affinity chromatography. Lane 1, cell-free extract before heat-treatment; lane 2, cell-free extract after heat-treatment at 65 °C for 10 min; lanes 3 and 4, first and second wash, respectively; lane 5, Prestained Protein Ladder (170–10 kDa Fermentas); lanes 6–8, three successive elution fractions containing purified sHSP.

50.81% loops). The folded elements of *tpv*-HSP 14.3 are found at similar positions as the beta-strands of other archaeal sHSPs characterized so far (Fig. 3).

Highly conserved domains which are widespread in the sHSP sequences, such as WDPF motif in the N-terminal part, and

AxxxGVL motif and the binding motif (IXI/V motif) in the C-terminal region are also observed in the selected archaeal sHSPs (Fig. 3). In particular this C-terminal region has been shown to be involved in the stabilization of the oligomeric assembly and maintenance of functionally essential hydrophobicity in the sHSPs from *S. tokodaii* strain 7 [31].

Comparison of the amino acid sequences of *tpv*-HSP 14.3 with other archaeal sHSP sequences by multiple sequence alignment revealed that the *tpv*-HSP 14.3 is significantly homologous to sHSP from closely related species *T. acidophilum* (identity score 75.8%; similarity 91%). The putative small heat shock protein from another member of the same class (Thermoplasmata), *Picrophilus torridus*, also exhibited relatively high sequence identity (identity score 35.5%;) with the *tpv*-HSP 14.3. However, *tpv*-HSP 14.3 showed low degree of sequence similarity to that of sHSP orthologs from hyperthermophilic (identity scores 16–22%) and halophilic (identity score 22.7%) archaea. This result supports the previous reports on the significantly higher diversities in amino acid sequences of low-molecular weight sHSPs [32].

3.3. Thermotolerance of *E. coli* overexpressing *tpv*-HSP 14.3

Based on our experiences and others we know that *E. coli* cells lose viability at temperatures higher than optimum (*i.e.* >50 °C) [33]. There are a few reports suggesting that overexpression of archaeal sHSPs enhances thermotolerance of the mesophilic host, such as *E. coli* [34,35]. In this study, we showed that expression of recombinant *tpv*-HSP 14.3 slightly reduced the lysis of *E. coli* cells upon exposure to 52 °C and the cells are endowed with some thermotolerance. As revealed by time dependent OD₆₀₀ measurements, there was a detectable decline in the growth of the cultures, both with and without overexpression of *tpv*-sHSP 14.3 (control), after 20 min exposure to 52 °C (Fig. 4A). However,

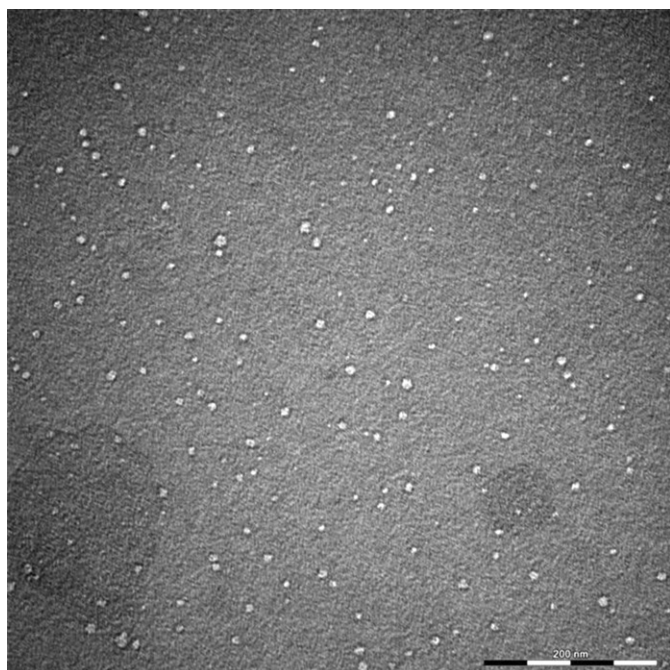


Fig. 2. Electron micrograph of negatively stained *tpv*-HSP 14.3 particles. The scale bar corresponds to 200 nm.

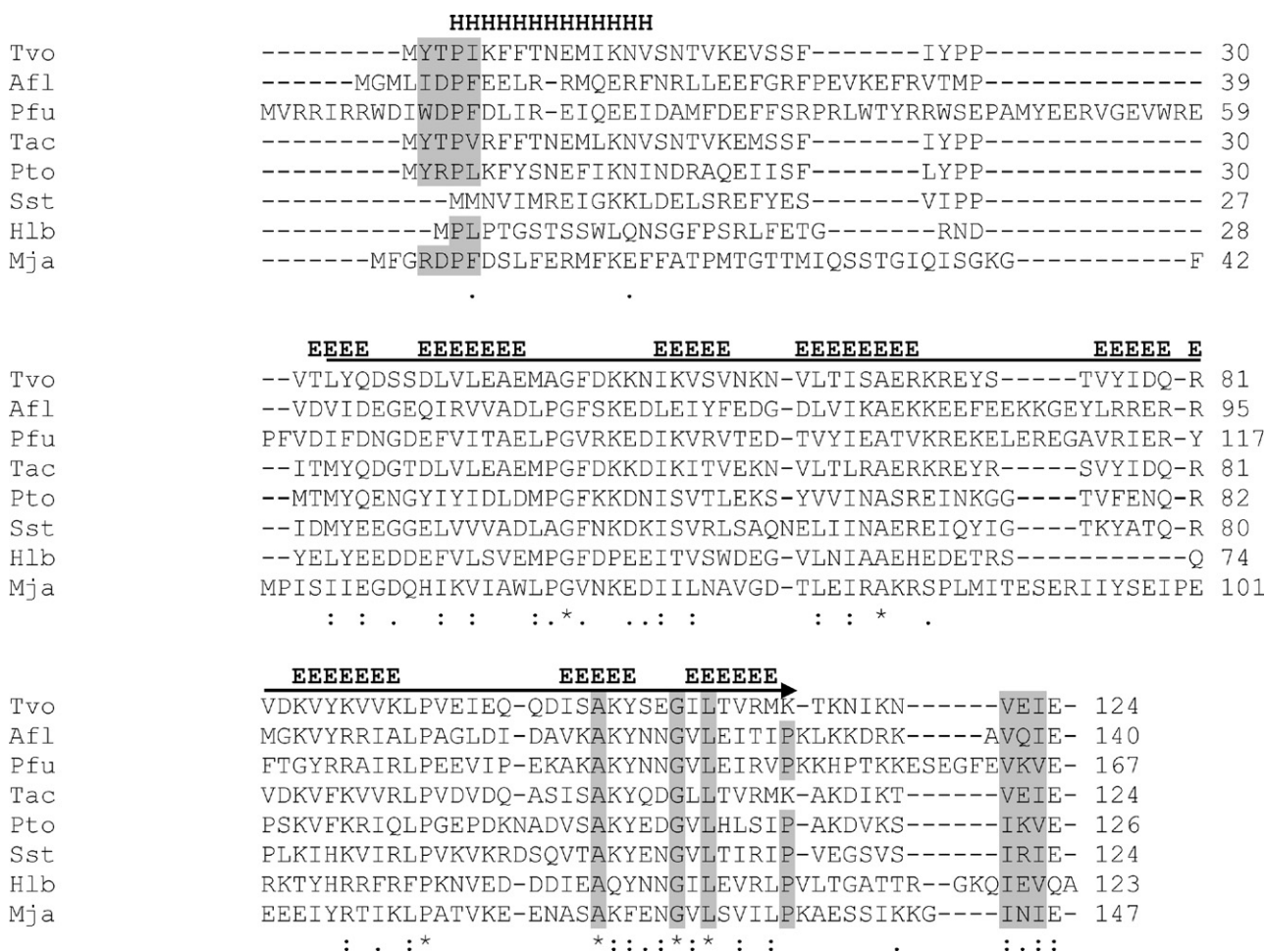


Fig. 3. Multiple amino acid sequence alignments of archaeal putative sHSP proteins. The sequences were aligned using the ClustalW 2.0.12 program with default settings. Identical residues (*), conserved substitutions (:), and semi-conservative substitutions (.) are indicated. Predicted secondary structures of the *tpv*-HSP 14.3 are indicated at the top and the alpha crystallin domain (ACD) is shown by the arrow. Conserved WDPF, AxxGVL and IXI/V motifs within the sequences are boxed. H represents an α -helix and E represents a β -strand. The alignment includes heat-shock protein sequences from Tvo: *Thermoplasma volcanium* (TVN0775); Afl: *Archaeoglobus fulgidus* (AAB89284); Pfu: *Pyrococcus furiosus* (AAF71367); Tac: *Thermoplasma acidophilum* (CAC11993); Pto: *Picrophilus torridus* (AAT43324); Sst: *Sulfolobus solfataricus* (AAK42725); Hlb: *Halobacterium* (VNG6201G); Mja: *Methanococcus jannaschii* (1SHS.B).

the cell viability was stabilized at higher levels in the culture expressing *tpv*-sHSP 14.3 than the control culture without *tpv*-HSP 14.3. These results were also supported by viable cell counts (Fig. 4B). The growth curves based on colony counts exhibited a sharp decline in the initial 20 min of the heat-shock, and afterwards the viable cell counts remained almost constant. By the end of a 120 min exposure to 52 °C survivability of the *E. coli* cells expressing *tpv*-HSP 14.3 (1000 ± 130 , mean viable cell count \pm SE; $n=3$), was approximately 2.5-fold*** (***) $p < 0.004$, unpaired Student's *t*-test) higher than that of the control cells (400 ± 110 , mean viable cell count \pm SE; $n=3$). Previously it was reported that after a 120 min exposure to 50 °C, the viability of *E. coli* cells overexpressing *pfu* sHSP from hyperthermophilic archaeon *P. furiosus* was about 50-fold higher than that of the unprotected cells [34]. In accordance with this result *pfu*-sHSP and *Mj*-sHSP could protect *E. coli* cellular proteins in the lysates from thermal denaturation above 100 °C [34,35]. In contrast to these observations, any protection of the *E. coli* proteins from thermal denaturation at 75 °C after 30 min by sHSP from *Thermococcus* sp. KS-1 was not observed [19]. These results indicate that the degree of thermotolerance conferred by recombinant sHSPs can be related to their source organism and sHSPs from hyperthermophilic archaea might have higher protection efficacy than moderately thermophilic ones.

3.4. Protection of mesophilic enzymes from heat inactivation by *tpv*-HSP 14.3

Chaperone activity of *tpv*-HSP 14.3 was studied using pHCS and boGDH as model substrate proteins. To investigate the heat-protection potency of *tpv*-sHSP 14.3, pHCS (9 μ g/ml) was incubated in the Buffer A at different temperatures for 10 min, in the presence (200 μ g/ml) and absence of *tpv*-HSP 14.3 (Fig. 5). When heated at 65 °C, the enzyme activity was almost lost, and the presence of sHSP did not provide any protection. Enzyme activity also significantly reduced at 50 °C and 47 °C, the remaining activities being 1.2% and 2.4% of the unheated sample, respectively. The activity loss was relatively low at 45 °C and approx. 33% of the original activity remained after heat-treatment. These results are expected since pHCS is inactivated and aggregates irreversibly at temperatures above 40 °C. When heat treatments were performed at 50 °C, 47 °C and 45 °C in the presence of *tpv*-HSP 14.3, the residual activities increased up to 1.6%, 14% and 56%, respectively. The highest protection effect of *tpv*-HSP 14.3 was observed at 47 °C; the remaining activity was 5-fold*** higher than that of the sample without sHSP (***) $p 0.0056$, paired Student's *t*-test, $n=3$).

Also, the protective effect of *tpv*-sHSP14.3 at different concentrations (100–400 μ g/ml) was studied with the model enzyme pHCS at 47 °C as described in Section 2. These studies revealed

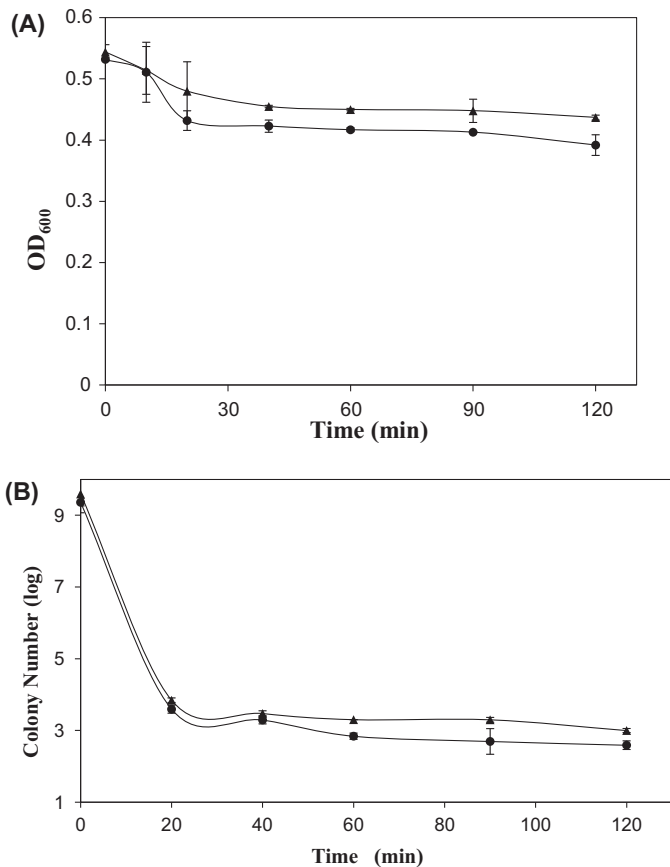


Fig. 4. (A) Growth of *E. coli* TG-1 cells with and without *tpv*-HSP 14.3 gene. After temperature was shifted to 52 °C, samples were taken at the indicated time and the optical densities at 600 nm were measured. ▲: Cells with pQE31-*tpv*-HSP14.3 plasmid, ●: cells with pQE31 plasmid. Each bar represents the mean ± SD of results obtained in three independent experiments. (B) Survival of *E. coli* transformants with and without *tpv*-HSP 14.3 at 52 °C. *E. coli* transformants were cultured as described in Section 2 and subjected to 52 °C treatment for 120 min. After heat treatment samples were taken at the time indicated, diluted and plated on LB plus ampicillin medium. The plot of log.viable cell counts versus time is shown. ▲: Cells with pQE31-*tpv*-HSP14.3 plasmid, ●: cells with pQE31 plasmid. Each bar represents the mean ± SD of results obtained in three independent experiments.

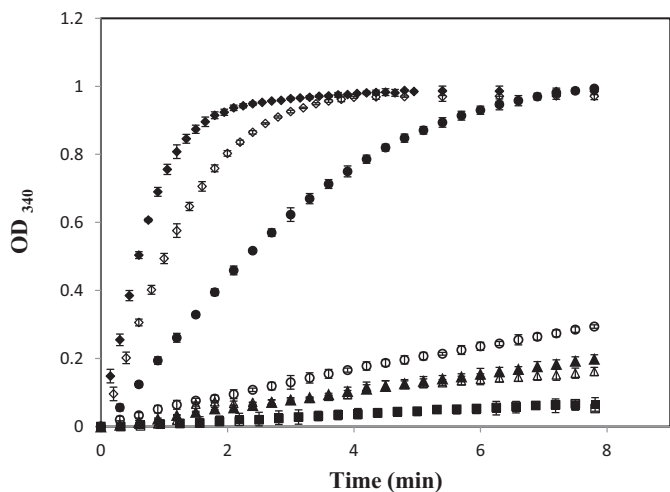


Fig. 5. Protection of phCS from thermal inactivation by *tpv*-HSP14.3. The phCS was incubated at 65 °C (■, in the presence and □, in the absence of *tpv*-HSP14.3), 50 °C (▲, in the presence and △, in the absence of *tpv*-HSP14.3), 47 °C (●, in the presence and ○, in the absence of *tpv*-HSP14.3) and 45 °C (◆, in the presence and ◇, in the absence of *tpv*-HSP14.3) for 10 min. Final concentration of *tpv*-HSP14.3 was 200 µg/ml. The remaining phCS activity was measured at the time points as described in Section 2. Error bars show the mean ± SD of the triplicate independent determinations.

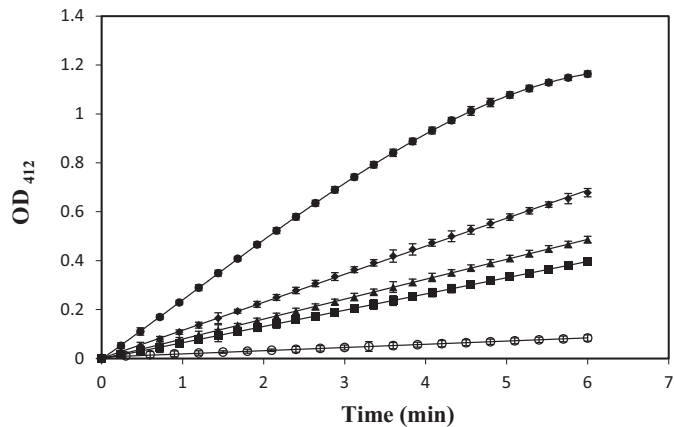


Fig. 6. Effect of *tpv*-HSP14.3 concentration on protection of phCS from heat inactivation at 47 °C. The pig heart citrate synthase was incubated at 47 °C for 10 min in the absence (○) and in the presence of 100 µg/ml (■), 200 µg/ml (▲), 300 µg/ml (◆) and 400 µg/ml (●) *tpv*-HSP 14.3 as described in Section 2. The heat protection was monitored by measuring there remaining phCS activity. Error bars show the mean ± SD of the triplicate independent determinations.

that as the concentration of *tpv*-sHSP 14.3 increased, the remaining activity of the phCS also increased after heat treatment at 47 °C for 10 min (Fig. 6). The highest enzyme activity (about 41%) was recovered when the treatment was carried out in the presence of 400 µg/ml *tpv*-HSP 14.3. Together, these results suggest that at elevated temperatures (*i.e.* >45 °C), excess of *tpv*-HSP 14.3 displays chaperone-like activity by preventing thermal inactivation of the mesophilic phCS. The highest chaperone activity was obtained at 47 °C which is below the optimum temperature of the source organism.

The second model substrate we used in the thermal unfolding/recovery assays was boGDH. The boGDH is a mesophilic enzyme with an optimal assay temperature of 25 °C and inactivated rapidly at 56 °C. Fig. 7 shows the time-course inactivation of the boGDH at 45 °C, 50 °C and 53 °C, in the presence and absence of *tpv*-HSP 14.3. After heat-treatments at 45 °C and 50 °C for 10 min, in the absence of *tpv*-HSP 14.3, the remaining activities were 70% and 40%, respectively. When the enzyme samples together with the

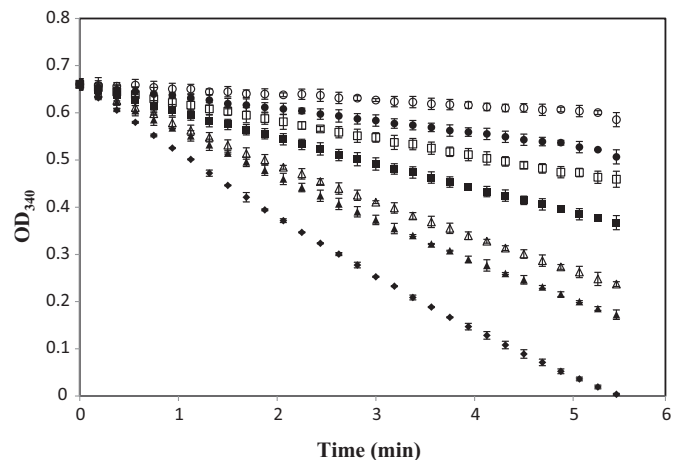


Fig. 7. Protection of boGDH from thermal inactivation by *tpv*-HSP14.3. Bovine GDH (0.4 µg/ml) was incubated at 53 °C (●, in the presence and ○, in the absence of *tpv*-HSP14.3), 50 °C (■, in the presence and □, in the absence of *tpv*-HSP14.3), and 45 °C (▲, in the presence and △, in the absence of *tpv*-HSP14.3) for 10 min. Final concentration of *tpv*-HSP14.3 was 200 µg/ml. The remaining boGDH activity was measured at the time points as described in the text. The activity was also monitored before heat treatment (◆), as a positive control. Error bars show the mean ± SD of the triplicate independent determinations.

tpv-HSP 14.3 were subjected to heat-treatment at 45 °C and 50 °C, 1.1-fold* (**p* 0.0125, paired Student's *t*-test, *n* = 3) and 1.5-fold*** (***p* 0.0005, paired Student's *t*-test, *n* = 3) increase in the remaining activities compared to the samples heated without *tpv*-SHP 14.3 could be attained, respectively. Although boGDH activity was drastically reduced (up to 8.3%) after heating at 53 °C, the *tpv*-sHSP 14.3 prevented inactivation of boGDH the most effectively at this temperature. The residual activity was approx. 2-fold *** higher (***p* 0.0036 paired Student's *t*-test, *n* = 3) than that of the sample heated without sHSP at 53 °C under the experimental conditions.

In this study, in order to characterize possible chaperone function of the *tpv*-s HSP 14.3, we examined its ability to maintain pHCS and boGDH in enzymatically active state under heat stress. Previously, chaperone activities of purified sHSPs from a number of hyperthermophilic archaea were also demonstrated in in vitro settings, mostly by spectral analysis (e.g. by monitoring light scattering) of aggregation or denaturation behavior of model proteins [16,19,34,35]. The results of these studies suggested that excess concentrations of archaeal sHSPs conferred thermal protection of mesophilic enzymes by protecting them from thermal aggregation. However, pfu-sHSP (0.9 mg/ml) from *P. furiosus* was able to prevent boGDH (2.25 mg/ml) from aggregating, but did not stabilize the activity of the enzyme at 56 °C for 2 min [34].

There are several lines of evidence suggesting that the chaperone activity of sHSPs from hyperthermophilic archaea could be more effective at higher temperatures [3,4,20]. However, our results showed *tpv*-HSP 14.3 could endow thermal protection to pHCS at temperatures lower than optimum growth temperature of the *T. volcanium* (47 °C). Similarly, Hsp20.2 from *A. fulgidus* showed chaperone activity by inhibiting CS aggregation at temperatures far below the physiological temperature (43 °C) [16]. On the other hand, *tpv*-HSP 14.3 mediated thermal protection of boGDH more effective at higher temperatures (i.e. 53 °C) compared to pHCS. All together these results might indicate that heat-protection abilities of archaeal sHSPs are not necessarily correlated with the increased temperature for all substrate proteins, even at markedly high *tpv*-HSP 14.3: substrate ratio.

3.5. Refolding of chemical denatured pHCS and boGDH by *tpv*-HSP 14.3

There are a few reports on protein refolding activities of sHSPs from hyperthermophilic archaea. For example, heat activated Hsp20.2 and HSP16.5 significantly enhanced the refolding of the chemically denatured CS as monitored by light scattering [16]. Refolding activity of the *T.* sHSP was also shown due to the recovery of the acid denatured green fluorescent protein (GFP) at higher temperatures (i.e. at 60 °C) when excess of *T.* sHSP was present [19]. In this study, refolding of the chemically denatured pHCS after 1:100 dilution in the renaturation buffer, in the absence and in the presence of *tpv*-HSP 14.3 at various concentrations was followed by measuring the remaining enzyme activity (Fig. 8). Only 1% of the pHCS activity was recovered by spontaneous refolding. When excess of *tpv*-HSP 14.3 (400 µg/ml) was included in the renaturation buffer the recovered pHCS activity was not more than 15% of the original activity. The efficacy in promoting the reactivation of unfolded pHCS did not increase when *tpv* HSP was heated at 65 °C for 15 min before use in refolding assay (data not shown).

Our results showed that, refolding of the chemically denatured boGDH is dependent on the concentration of GdnCl used for denaturation or denaturation state of the enzyme. Reversibility of the inactivation of boGDH that was denatured by GdnCl at concentrations between 1.5 M and 4.0 M for 30 min, in the absence of *tpv*-HSP14.3, is shown in Fig. 9. The result indicated that boGDH was irreversibly inactivated with GdnCl at concentrations more than 3.0 M and under these conditions, any residual activity could

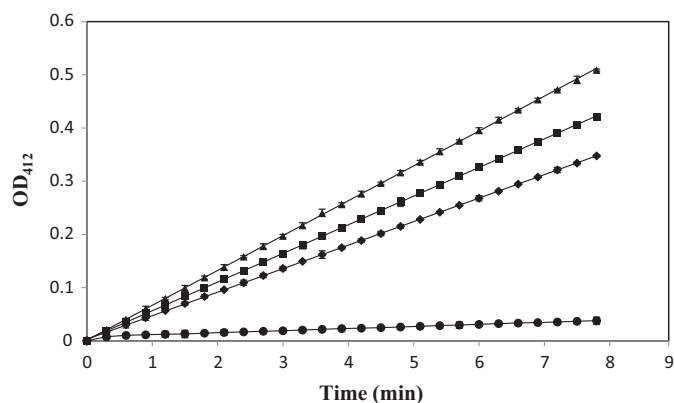


Fig. 8. Renaturation of chemically denatured pHCS by *tpv*-HSP14.3. The pHCS (0.9 mg/ml) was denatured with 5.3 M GdnCl and diluted 1:100 in renaturation buffer to start refolding, as described in the text. The activities regained after 2 h incubation at room temperature in the absence (●) and in the presence of 200 µg/ml (◆), 300 µg/ml (■) and 400 µg/ml (▲) *tpv*-HSP14.3 were measured spectrophotometrically. Error bars show the mean ± SD of the triplicate independent determinations.

not be gained spontaneously. However, detectable activity was restored when denaturation was performed at lower GdnCl concentrations (<3.0 M). This may imply for a critical GdnCl threshold concentration above which spontaneous reactivation rate declines rapidly [36]. For the *tpv*-HSP 14.3 assisted refolding assays, the boGDH was denatured at lower concentrations of GdnCl (i.e. 2.5 M). In the presence of excess *tpv*-HSP14.3 (400 µg/ml), the recovered boGDH activity (Δ mAb₃₂₀/min: -4.4 ± 0.9 , *n* = 3) was not statistically significant (*p* 0.2, paired Student test) than that of the control (Δ mAb₃₂₀/min: -3.0 ± 1.5 , *n* = 3) (Fig. 10).

As a conclusion, in this study the substantial chaperone function performed by the *tpv*-HSP 14.3 in vitro, seemed to occur through preventing the substrate proteins from irreversible heat inactivation. Our results also suggest that excess of *tpv*-sHSP is necessary to accomplish limited refolding of chemically unfolded model enzymes. Since, *tpv*-HSP 14.3 as a molecular chaperone, markedly enhanced the thermal stabilization of the substrate proteins at elevated temperatures, it can potentially be employed for improving the utility and stability of enzymes in various applications such as biochips, bioseparation or diagnostic immunological assays.

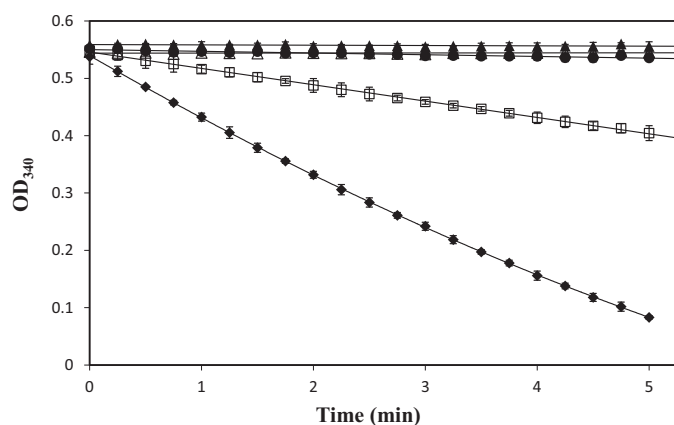


Fig. 9. Spontaneous reactivation of chemically denatured boGDH. The enzyme (1.25 mg/ml) was incubated in the denaturation buffer containing different concentrations of GdnCl at 25 °C for 30 min. After 100-fold dilution, bo GDH activity was monitored as described in the text. ◆, 1.5 M; □, 2.0 M; ●, 2.5 M; △, 3.0 M; ▲, 4.0 M. Error bars show the mean ± SD of the triplicate independent determinations.

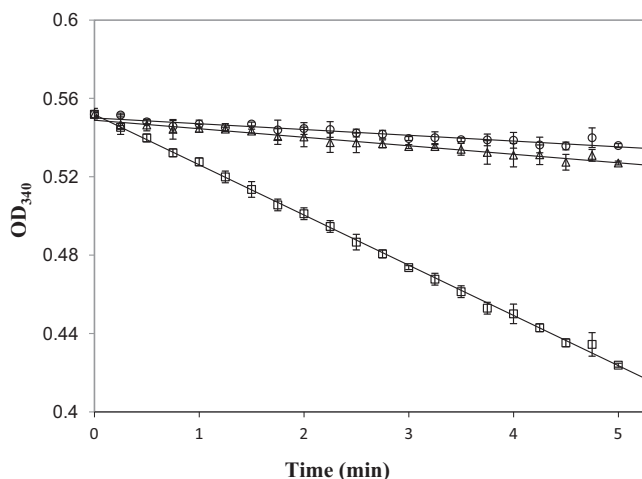


Fig. 10. Reactivation of GdnCl (2.5M) denatured boGDH by *tpv*-HSP 14.3. The enzyme was incubated in the denaturation buffer in the presence (test, ○) and absence (negative control, △) of *tpv*-HSP 14.3 at 25 °C for 30 min. After 100-fold dilution, GDH activity was monitored as described in the text. The enzyme activity of the undenatured enzyme was measured as a positive control (□). Error bars show the mean ± SD of the triplicate independent determinations.

Acknowledgements

We thank Bilsev Koyuncu for her technical assistance and Dr. Josefina Nilsson for TEM imaging and image analysis. This work was supported by Turkish Scientific and Technical Research Council grant TBAG109T946.

References

- [1] Feder ME, Hofmann GE. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 1999;61:243–82.
- [2] Maeder DL, Macario AJL, Conway de Macario EC. Novel chaperonins in a prokaryote. *J Mol Evol* 2005;60:409–16.
- [3] Kocabiyik S. Essential structural and functional features of small heat-shock proteins in molecular chaperoning process. *Protein Peptide Lett* 2009;16:613–22.
- [4] Laksanalamai P, Robb FT. Small heat-shock proteins from extremophiles: a review. *Extremophiles* 2004;8:1–11.
- [5] Haslbeck M, Franzmann T, Weinfurter D, Buchner J. Soma like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat Struct Mol Biol* 2005;12:842–6.
- [6] Nakamoto H, Vigh L. The small heat shock proteins and their clients. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:294–306.
- [7] Haselback M. sHsps and their role in the chaperone network. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:1649–57.
- [8] van Montfort R, Slingsby C, Vieling E. Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones. *Adv Protein Chem* 2002;59:105–56.
- [9] Haselbeck M, Miess A, Stromer T, Walter S, Buchner J. Disassembling protein aggregates in the yeast cytosol: the cooperation of Hsp26 with Ssa 1 and Hsp 104. *J Biol Chem* 2005;280:23861–8.
- [10] Cashikar AG, Duennwald ML, Lindquist SL. A chaperone pathway in protein disaggregation: Hsp26 alters the nature of protein aggregates to facilitate reactivation by Hsp104. *J Biol Chem* 2005;280:23869–75.
- [11] Mogk A, Schlieker C, Friedrich KL, Schonfeld H, Vierling E, Bukau B. Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK. *J Biol Chem* 2003;278:31033–42.
- [12] Jiao W, Li P, Zhang J, Zhang H, Chang Z. Small heat-shock proteins function in the insoluble protein complex. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;335:227–31.
- [13] de Jong WW, Caspers GJ, Leunissen JAM. Genealogy of the alpha-crystalline-small heat-shock protein superfamily. *Int J Biol Macromol* 1998;22:151–62.
- [14] Waters ER, Lee GJ, Vieling E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J Exp Bot* 1996;47:325–38.
- [15] Narberhaus F. Alpha-crystalline-type heat shock proteins: socializing mini chaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002;66:64–93.
- [16] Haslbeck M, Kastenmüller A, Buchner J, Weinkauff S, Braun N. Structural dynamics of archaeal small heat shock proteins. *J Mol Biol* 2008;378:362–74.
- [17] Kim KK, Kim R, Kim S-H. Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature* 1998;394:595–9.
- [18] Wang Y, Xu X, Wen Z, Li W, Yang B, Whiteley C. Isolation, purification and properties of a novel small heat shock protein from the hyperthermophilic *Sulfolobus solfataricus*. *Appl Biochem Biotechnol* 2010;162:476–85.
- [19] Usui K, Yoshida T, Maruyama T, Yohda M. Small heat shock protein of a hyperthermophilic archaeum, *Thermococcus* sp. strain KS-1, exists as a spherical 24 mer and its expression is highly induced under heat-stress conditions. *J Biosci Bioeng* 2001;92:161–6.
- [20] Usui K, Ishii N, Kawarabayasi Y, Yohda M. Expression and biochemical characterization of a small heat shock proteins from the thermoacidophilic crenarchaeon *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *Protein Sci* 2004;13:134–44.
- [21] Carrio MM, Villaverde A. Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. *FEBS Lett* 2001;489:29–33.
- [22] Han MJ, Park SJ, Park TJ, Lee SY. Roles and applications of small heat-shock proteins in the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 2004;88:426–36.
- [23] Robb FT, Place AR. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1995.
- [24] Kocabiyik S, Demirok B. Cloning and over expression of a thermostable signal peptide peptidase (SppA) from *Thermoplasma volcanium* GSS1 in *E. coli*. *Biotechnol J* 2009;4:1055–65.
- [25] Kawashima T, Amano N, Koike H, Makino S, Higuchi S, Kawashima-Ohya Y. Archaeal adaptation to higher temperatures revealed by genomic sequence of *Thermoplasma volcanium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:14257–62.
- [26] Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;86:2172–5.
- [27] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- [28] Whitaker JR, Granum PE. An absolute method for protein determination based on differences in absorbance at 235 and 280 nm. *Anal Biochem* 1980;109:56–159.
- [29] Srere PA, Brazil H, Gonen L. The citrate – condensing enzyme of pigeon breast muscle and moth flight muscle. *Acta Chem Scand* 1963;17:129–34.
- [30] Kocabiyik S, Özdemir İ, Zwickl P, Özdoğan S. Molecular cloning and co-expression of *Thermoplasma volcanium* proteasome subunit genes. *Protein Expr Purif* 2010;73:223–30.
- [31] Saji H, Iizuka R, Yoshida T, Abe T, Kidokoro S-I, Ishii N, et al. Role of the IXI/V motif in oligomer assembly and function of StHsp 14.0, a small heat shock protein from the acidothermophilic archaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *Proteins* 2008;71:771–82.
- [32] Nagao R, Czernicka WB, Gurley WB, Schoff F, Key JL. Genes for low-molecular weight heat-shock proteins of soybeans: sequence analysis of a multigene family. *Mol Cell Biol* 1985;5:3417–28.
- [33] Soto A, Allona I, Collada C, Guevara ThormMA, Casado R, Rodriguez-Cerezo E, Argonillo C, et al. Heterologous expression of a plant small heat-shock protein enhances *Escherichia coli* viability under heat and cold stress. *Plant Physiol* 1999;120:521–8.
- [34] Laksanalamai P, Meader DL, Robb FT. Regulation of mechanisms of action of the small heat shock protein from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Bacteriol* 2001;183:5198–202.
- [35] Kim R, Kim KK, Yokota H, Kim S-H. Small heat shock protein of *Methanococcus jannashii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:9129–33.
- [36] West SM, Price NC. The unfolding and refolding of glutamate dehydrogenase from bovine liver, baker's yeast and *Clostridium symbiosum*. *Biochem J* 1988;251:135–9.