

**DEMİR İYONUNUN (Fe³⁺) SIÇAN (*RATTUS*
NORVEGICUS) KARACIĞER DOKUSUNDAKİ ISI
STRES PROTEİNİ (HSP) GENLERİNİN EKSPRESYON
SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Atena Ghosi Ghareaghaji

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN
2013
Her Hakkı Saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DEMİR İYONUNUN (Fe^{3+}) SIÇAN (*RATTUS NORVEGICUS*)
KARACİĞER DOKUSUNDAKİ ISI STRES PROTEİNİ (HSP)
GENLERİNİN EKSPRESYON SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Atena GHOSI GHAREAGHAJI

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

ERZURUM
2013

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**DEMİR İYONUNUN (Fe^{3+}) SIÇAN (*Rattus norvegicus*) KARACİĞER
DOKUSUNDAKİ ISI STRES PROTEİNİ (HSP) GENLERİNİN EKSPRESYON
SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN danışmanlığında Atena GHOSI GHAREAGHAJI tarafından hazırlanan bu çalışma 24.01.2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Harun BUDAK

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirilerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DEMİR İYONUNUN (Fe^{3+}) SIÇAN (*RATTUS NORVEGICUS*) KARACİĞER DOKUSUNDAKI ISI STRES PROTEİNİ (HSP) GENLERİNİN EKSPRESYON SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Atena GHOSI GHAREAGHAJI

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

Dünyada en fazla bulunan metallerden birisi olan demir, organizma için önemlidir. Yüksek konsantrasyonlarda dokular tarafından tutularak özellikle karaciğer, pankreas, kalp gibi organlarda hasar oluşturduğu bilinmektedir. Çalışmamızda demir iyonu *Rattus norvegicus*'da küçük stress proteinler; 50,60 kDa HSP ailesi, 70 kDa HSP ailesi, 90 kDa HSP ailesi ve 100 kDa ve üzeri HSP ailesi olmak üzere 5 farklı gen grubunda gen ekspresyonu nasıl etkilendiği araştırıldı. Bu çalışma kapsamında 5 farklı uygulama grubuna farklı konsantrasyonlarda demir iyonu Fe^{3+} (0,87ppm, 3ppm, 30ppm, 300 ppm) verilmiştir. Bu uygulama süreci sonunda canlıdan alınan karaciğer dokularından cDNA kütüphanesi oluşturulmuştur. Yapılan bu kütüphaneler kullanılarak HSP70 (hspa1a, hspa4, hspa5) HSP90 (hsp90aa1) genlerinde meydana gelen ekspresyon seviyelerindeki değişimler Real -Time PCR metodu ile tespit edilmiştir.

2013, 73 sayfa

AnahtarKelimeler: HSP (Heat Shock Proteins), HSP70, HSP90 , Demir iyonu, *Rattus norvegicus*, Gen ekspresyonu, Real-Time PCR

ABSTRACT

MS Thesis

IRON EXPRESSION Fe^{3+} LEVELS OF ION *RATTUS NORVEGICUS*' EFFECTS
OF HEAT STRESS PROTEINS HSP GENES

Atena GHOSI GHAREAGHAJI

Atatürk University
Graduate School of Agriculture Faculty
Department Molecular Biology and Genetik of Sciences

Supervisor: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

One of the most abundant metals in the world, is iron, which is essential for the organism. The incidence of injury to internal organs such as heart is kept by tissues in high concentrations in the liver and the pancreas. In our study, a small stress proteins of various iron ions, *Rattus norvegicus*: 50.60 kDa HSP family, HSP 70 kDa family, 90 kDa and 100 kDa and higher HSP family, including five different genes that affects gene expression was investigated.

In this study, different concentrations of 5 different iron ion Fe^{3+} application sets (0.87ppm, 3ppm, 30ppm, 300 ppm) are provided. At the end of the implementation process these creatures created in the liver tissue in cDNA library. The use of this HSP70 (hspa1a, hspa4, hspa5), HSP90 (hsp90aa1) that occurring in the expression levels of genes have been identified by changes in the Real-Time PCR method.

2013, 73 pages

Keywords: HSP (Heat Shock Proteins), HSP70, HSP90, iron ions, *Rattus norvegicus*, gene expression, Real-Time PCR.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Genetik Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Sunduğum bu çalışmanın araştırma konusunun belirlenmesi, planlanıp yürütülmesi ve tez haline getirilmesinde bana yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN'a ve çalışmamın her adımında yanımda olan ilgi ve desteğini sürekli hissettiğim Sayın Arş. Gör. Hamid CEYLAN'a sonsuz şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım esnasında gerekli yardımı ve yakın ilgiyi esirgemeyen Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN başta olmak üzere Sayın Yrd. Doç. Dr. Harun BUDAK, Sayın Arş. Gör. Yağmur ÜNVER ve en iyi arkadaşım Sayın Nurdan GÖNÜL'e ve Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e ve tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında maddi ve manavi desteklerini esirgemeyen sevgili babam Sayın Daryoush Ghosi Gharehaghaji'ye, canım annem Sayın Tahere FANAYİ'ye ve kardeşlerime göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı şükranlarımı sunarım.

Atena GHOSI GHAREAGHAJI

Ocak 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Ağır metal.....	4
1.1.1. Canlı organizmalarla ilişkileri	5
1.1.2. Ağır metal zehirlenmesi	5
1.1.3. Tıpta kullanımı	6
1.2. Demir.....	6
1.2.1. Demirin biyolojik önemi	6
1.4. Moleküler Şaperonlar	10
1.4.1. Şaperon sisteminde protein şekillenmesi	10
1.5. Isı Şoku Proteinleri	10
1.5.1. Büyük ısı şoku proteinleri	13
1.5.2. Küçük ısı şoku proteinleri (HSPs).....	14
1.6. Isı Şoku Proteinlerinin (HSP) Gruplandırılması	15
1.6.1. HSP100.....	15
1.6.2. HSP90.....	15
1.6.3. HSP70.....	17
1.6.4. HSP60.....	19
1.7. Hsc 70 Ve HSP 90 İlişkisi.....	21
1.8. Isı Şok Proteinini 70 (HSP70) Görevleri.....	22
1.9. Isı Şoku Yanıtının Gen Düzenlenmesi	26
1.10. Apoptotik Süreçlerin Isı Şok Proteinleri Tarafından Düzenlenmesi.....	32
1.10.1. Mitokondriyal düzeyde ısı şok proteini hedefleri.....	33
1.10.2. Post mitokondriyal düzeyde ısı şok proteinleri hedefleri.....	34

1.11. Renal İskemi ve HSP	35
1.11.1. HSP ve ünilateral obstrüksiyon	37
1.12. Isı Şok Proteinleri ve Homeostazis	38
1.12.1. Redoks homeostazında ısı şok proteinlerinin rolü	38
1.13. Stres Cevabının Özellikleri	38
1.14. Kantitatif Real-Time PCR Yöntemi	39
1.14.1. Kantitatif real-time PCR metodları	40
1.14.2. Real-Time PCR için kullanılan problemler	40
2. KAYNAK ÖZETLERİ	43
3. MATERYAL ve YÖNTEM	47
3.1. Materyal.....	47
3.1.1. Sıçanların temin edildiği yer	47
3.1.2. Çalışmanın yürütüldüğü yer	47
3.1.3. Sıçanların bakımı.....	47
3.1.4. Sıçanların beslenmesi	47
3.1.5. Primerler	48
3.1.6. Kullanılan kimyasal maddeler	49
3.1.6.a. RNA izolasyonunda kullanılan kimyasal maddeler	49
3.1.6.b. Elektrophorezde kullanılan kimyasal maddeler	49
3.1.6.c. PCR’da kullanılan kimyasal maddeler	50
3.1.6.d. cDNA kütüphanesinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler.....	50
3.1.7. Deney aşamalarında kullanılan aletler	50
3.2. Yöntem	50
3.2.1. Sıvı azotla RNA izolasyonu	50
3.2.2. RNA’ nın agaroz jel elektrophorezinde kontrolü.....	51
3.2.2.a. Jelde yürütülecek RNA örneğinin hazırlanışı.....	51
3.2.2.b. Jelin hazırlanışı.....	51
3.2.2.c. Elektrophorez işlemi	52
3.2.3. cDNA sentezi	52
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	54
4.1. RNA Ekstraksiyonuna İlişkin Bulgular.....	54
4.1.1. RNA bulgusu.....	54

4.1.2. RNA ve cDNA konsantrasyonu kantitatif tayini bulgusu	55
4.2. İstatistiksel Sonuçlar.....	56
4.2.1. Gen ekspresyonu sonuçları.....	56
5. SONUÇ ve TARTIŞMA.....	61
KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	74

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ATP	Adenosine-5'-triphosphate
cDNA	Koplementer DNA (complementary DNA)
ddH₂O	Distile Steril Su
dGTP	Deoksi guanozin tri fosfat
DMSO	Di metil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleikasit
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
DPEC	Dietil Pirokarbonat
dTTP	Deoksi timidintrifosfa
ER	Endoplazmik Retikulum
HSC	Heat Shock Cognate
HSE	Heat Shock Eleman
HSF	Heat Shock factor
Hsf1-a	Heat Shock Factor 1-a
kDA	Kilo Dalton
MOPS	Morpholinopropanesulphonic Acid
RT-PCR	Real Time PCR

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. HSP70 proteini ve domainlerin çeşitli (A, B, C, D) moleküler gösterimi.....	25
Şekil 1.2. HSF'lerin HSE' lere bağlanması.	29
Şekil 1.3. HSF'lerin sıcaklık şok genlerinde transkripsiyonu başlatması ve sıcaklık şok genlerinin yapısı.	30
Şekil 1.4. HSF aracılığıyla sıcaklık şok protein genlerinin aktivasyonu	31
Şekil 1.5. İnsan ve Drosophila hücreleri Hsp'ler de stres indükleyici artışın va önerilen mekanizması.....	32
Sekil 1.6. Mitokondrial membran üzerinde katlanmamış proteinlerin geçişine katılan HSP70 tarafından yapılan işlemin şematik gösterimi protein mitokondri dış zarında reseptör komplekse bağlanır.	35
Şekil 4.1. Karaciğer dokusundan izole edilen total RNA jel elektroforez görüntüsü....	54
Şekil 4.2. Karaciğer dokusunda hsp90aa1 bağlı gen ekspresyon seviyeleri kırmızı yıldız olarak ifade edilen degerler Tukey's Multiple Comparison Test analizi sonucu elde edilen p değerlerini ifade etmektedir. önemlilik derecesine göre yıldız sayısı 1 ile 3 arasında doğru orantılı olarak değişmektedir.	56
Şekil 4.3. Karaciğer dokusunda hspa1a bağlı gen ekspresyon seviyeleri grupların kontrole göre karşılaştırmalarında Tukey's Multiple Comparison Test analizi sonucu elde edilen $p<0.001=***$ bulunanlar anlami kabul edilmiştir.	57
Şekil 4.4. Karaciğer dokusunda hspa4 bağlı gen ekspresyon seviyeleri kontrol diğer gruplara ve diğer grupların kendi aralarındaki karşılaştırmalarında ise istatistik olarak Tukey's Multiple Comparison Test analiziyle önemli bulunmuştur.....	58
Şekil 4.5. Karaciğer dokusunda Tukey's Multiple Comparison Test analiziyle hspa5 bağlı gen ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. HSP sınıflaması	21
Çizelge 1.2. Protein aile üyelerinin hücrede bulundukları yerler ve görevleri	23
Çizelge 3.1. Sıçan gruplarına verilen ppm cinsinden demir iyonunun konsantrasyonları ve beslenme süreleri.....	48
Çizelge 3.2. Genlerin spesifik forward ve revers primerleri.....	49
Çizelge 3.3. RNA için Agaroz Jel Elektroforezinin Hazırlanışı.....	52
Çizelge 4.1. Kantitatif tayini yapılan RNA ve cDNA konsantrasyonları	55
Çizelge 4.2. Karaciğer dokusunda hspa90aa1 geninin Ct ve $\Delta\Delta Ct$ değerleri.....	57
Çizelge 4.3. Karaciğer dokusunda hspa1a geninin Ct ve $\Delta\Delta Ct$ değerleri	58
Çizelge 4.4. Karaciğer dokusunda hspa4 geninin Ct ve $\Delta\Delta Ct$ değerleri	59
Çizelge 4.5. Karaciğer dokusunda hspa5 geninin Ct ve $\Delta\Delta Ct$ değerleri	60

1. GİRİŞ

Canlılarda, fizyolojik dengenin bozulmasına neden olan iç ve dış etmenlere stres faktörleri, hücrenin stres faktörlerine karşı geliştirdiği tepkiye ise “hücre stres yanıtı” adı verilmektedir (Jolly and Morimoto 2000).

Hücreler, sıcaklık şoku gibi stres yaratıcı durumlarla karşılaştıklarında sıcaklık şok ya da stres proteinleri adı verilen bir grup proteinin sentezini artırmaktadırlar. Tüm canlılarda görülen stres tepkisi gelişim içerisinde yüksek derecede korunmuş, özel bir gen grubu tarafından biçimlendirilmektedir (Mezquita *et al.* 2001).

Sıcak uygulaması haricinde ağır metaller, serbest oksijen radikalleri, amino asit analogları gibi stres faktörlerinin de hücrede sıcaklık şok protein sentezini uyardığı bilinmektedir (Lindquist and Craig 1988). Stres etkisinin bulunmadığı koşullarda da hücrelerde sıcaklık şok proteinleri bulunmakta ve sürekli eksprese edilen bu proteinler, sıcaklık şok kognatları olarak adlandırılarak hücre içerisinde proteinlerin katlanması, taşınması ve düzenlenmesi mekanizmalarında görev almaktadırlar (Mathew and Morimoto 1998; Yeğenoğlu 2007).

Isı şoku proteinleri, adları “ısı” ile anılmakla birlikte sentezlenmeleri soğuk ve sıcak şoku, hiperosmotik basınç, kimyasal maddeler, pestisitler, PCB’ler (Poliklorobifeniller) ağır metaller, oksijen azlığı/yokluğu, besin azlığı/yokluğu gibi stres faktörlerinde de artmaktadır (Gao *et al.* 2008). Yani hücre içi sinyal ağını uyaran stres faktörünün şiddeti yeterli derecede ise ısı şoku proteinlerinin ekspresyonu uyarılmaktadır. Isı şoku proteinlerine ait genlerin transkripsiyonunun uyarılması, çevresel stres faktörleri gibi birçok stres sinyaline tepki olarak gerçekleşen bir yanıttır. Isı şoku proteinleri diğer proteinlere bağlanarak agregasyonlarını önleyen ve neredeyse her türde mevcut olan düşük molekül ağırlıklı moleküler şaperonlardır (Heikkila *et al.* 1982; Kayhan Esin *et al.* 2010). Sıcaklık, organizmalardaki fizyolojik fonksiyonları etkileyen en önemli çevresel etmenlerden biridir. Moleküler düzeyde, sıcaklıkta görülen küçük bir değişim

kimyasal reaksiyonların oranını etkilemekte ve zayıf makromoleküler bağları tahrip etmektedir. Zayıf moleküler bağlar protein konformasyonu, nükleik asit yapısı, lipid viskozitesi vb. metabolik yapılar için önemlidir. Vücut sıcaklığında değişikliklere neden olan yaş, mevsim, havadaki nem oranı, sindirim, su tüketimi ve çevre sıcaklığı gibi pek çok etmen bulunmaktadır. Bedenin iç bölümünden dışa doğru gidildikçe sıcaklığın azaldığı görülmektedir. Örneğin karaciğerde sıcaklık, rektal sıcaklıktan 1–2°C daha fazladır. Aynı şekilde beyin dokusundaki sıcaklığın da toplardamar kan sıcaklığından yüksek olduğu belirlenmiştir (Yaman 1996; Yeğenoğlu 2007).

Sıcaklık ile meydana gelen stres şartlarında ısı şoku proteinlerinin hemostatik bir fonksiyona hizmet edip etmediği henüz bilinmemektedir. Isı şoku proteinleri stres faktörlerinin etkili olmadığı koşullarda da hücre içerisinde bulunurlar ve bu durumda ısı şok kognatları (Hsc) olarak tanımlanırlar. Hsc'lar, moleküler şaperon proteinleridir ve oluşan yeni polipeptid zincirlerin düzgün katlanmasına, görev yerlerine taşınmasına ve işlevlerinin düzenlenmesine yardımcı olurlar (Pirkkala *et al.* 2000; Boone and Vijayan 2002).

Sıcaklık stresi esnasında DNA sentezi, transkripsiyon, RNA işleme, translasyon olayları ve hücre döngüsünün ilerlemesi durmaktadır. Aynı zamanda proteinlerde denaturasyon görülmekte, lizozomal yıkım olayları artmakta, membran geçirgenliği değişmekte ve hücre dışına iyon geçişinde artışlar olmaktadır. Bunun sonucunda da ısı şoku proteini genlerinin transkripsiyonu ve translasyonu başlamaktadır. Böyle durumlarda ısı şoku proteinlerinin görevi, örneğin HSP70, moleküler şaperon göreviyle denatüre olmuş proteinlerin çökmesini önlemek, bu proteinlerin yeniden düzgün şekilde katlanmasını sağlamak ve kazanılmış stres toleransı geliştirmektir (Boone and Vijayan 2002; Micovic *et al.* 2009).

Organizmaların maruz kaldığı stres ajanları, protein ekspresyonlarının seviyesini ve tiplerini değiştirebilir. Çünkü organizmanın adaptasyon stratejisinden dolayı farklı doku ve organlar strese karşı farklı hassasiyet gösterebilirler. İlk başlarda ısı şoku proteinleri ile ilgili araştırmalar daha çok memeliler ve model organizmalar ile sınırlıydı. Son

yıllarda ise *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Dreissena polymorpha*, *Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata*, *Ostrea edulis*, *Haliotis rufescens* gibi farklı sucul organizmalar ile yapılan çalışmalar göze çarpmaktadır (Gao *et al.* 2007; Farcy *et al.* 2007; Choi *et al.* 2008).

Rahman *et al.* (2004) hücreler, dokular ve organizmaların akut olarak ısı şokuna maruz kaldığı zaman yanıt olarak bir veya daha fazla ısı şoku proteini sentezlediği ve termotolerans geliştirdiği fikrinden yola çıkarak yaptıkları çalışmalarında, *Macrobrachium rosenbergii* (tatlı su karidesi) larvalarının ısı şoku stresinin, termotolerans geliştirme üzerine etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar termotolerans gelişiminin karides larvalarının hayatta kalmalarında ve büyüme performanslarının gelişiminde olumlu etki yarattığını belirtmişlerdir .

Gonzales-Riopedre *et al.* (2007) yaptıkları çalışmalarında, midyelerin doğal ortamlarında düşük ve yüksek sıcaklıklara bağlı olarak protein ekspresyonlarının seviyesinde ve tiplerinde oluşabilecek değişiklikleri ve fizyolojik tepkileri moleküler açıdan incelemişlerdir. Çalışmada midyelerin manto, posterior çekme kası, ayak kası, solungaç ve hematositlerinde ısı kaynaklı oluşan protein tipleri araştırılmıştır. Deney sonucunda, farklı dokularda ve farklı koşullarda protein ekspresyonu gözlenmiştir (Kayhan *et al.* 2010).

Hücresel düzeyde sıcak stresi esnasında DNA sentezi, transkripsiyon, RNA işleme, translasyon olayları ve hücre döngüsünün ilerlemesi durdurulmaktadır. Sıcaklık şok proteinleri (heat shock proteins; Hsp) genlerinin transkripsiyonu ve translasyonu başlamaktadır (Banerji *et al.* 1986; Sonna *et al.* 2002; Rivera *et al.* 2005). Stres esnasında hücrelerde sıcaklık şok proteinlerinin görevleri yaygın olarak araştırılmış, HSP70 proteininin moleküler şaperon göreviyle denatüre proteinlerin çökmesini önlediği ve bu proteinlerin yeniden düzgün bir şekilde katlanmasında yardımcı olduğu saptanmıştır (Welch 1993; Hightower *et al.* 1994; Georgopoulos and Baler *et al.* 1996). Bazı araştırmalar ise HSP70 proteininin artan sentezi ile kazanılmış stres toleransı

arasında bir ilişki bulunduğunu göstermiştir (Dewey 1987; Lazlo 1988; Yeğenoğlu 2007).

1.1. Ağır metal

Ağır metal iyonları taşıdıkları teknolojik önem nedeniyle çeşitli endüstrilerde yaygın olarak kullanılmakta ve bu endüstrilerden gelen atık sular kalıcı toksik etkiye sahip ağır metal iyonlarını önemli miktarlarda içermektedirler. Biyosorbsiyonla ağır metal iyonlarının giderimi üzerine ülkemizde ve dünyada günümüze değin yapılan çalışmalar genellikle tek bileşenli sentetik sulu metal çözeltilerinin arıtımına yöneliktir (Tsezos and Volesky 1981; Norberg and Persson 1984; Wehrheim and Wettern 1994; Sag and Kutsal 1995; Bhide *et al.* 1996). Oysa, atıksularda genellikle birden fazla metal iyonu bulunur. Canlı hücrelerin, sulu çevrelerinden metal katyonlarını toplayarak, hücre içinde biriktirmeleri bilinen bir özellik olmasına rağmen, mikroorganizmaların ağır metal iyonlarını seçici olarak alıkoyma özelliği üzerindeki çalışmalar yenidir. Sınır değerlerin üzerindeki ağır metal derişimleri aktif çamur proseslerini deaktive etmektedir. Bu nedenle, atıksularda mevcut ağır metal iyonlarının biyolojik arıtma öncesi giderilmesi gerekmektedir. Ağır metal iyonlarının mikroorganizmalar üzerine biyosorbsiyonu incelendiğinde, kullanılan mikroorganizmanın hücre yapısına bağlı olarak değişik mekanizmaların etkili olduğu görülmektedir (Wilde and Benemann 1993; Leborans and Novillo 1996; El-Nady and Atta 1996). Açıklanan en genel mekanizma, metal gideriminin iki basamaktan oluştuğu şeklindedir. Genellikle pasif giderim olarak adlandırılan, birinci basamak başlangıçta hızlı, fakat tersinir giderim basamağıdır. Genellikle aktif giderim olarak adlandırılan, ikinci basamak ise daha yavaş bir iç hücresel biyogiderim basamağı olup, metabolik aktivite ile ilişkilidir (Ting *et al.* 1989; Aksu *et al.* 1992). Ölü organizmalarla yapılan, adsorbsiyon işlemi genellikle biyosorbsiyon olarak tanımlanmaktadır (Tsezos and Volesky 1981). Aslında biyosorbsiyon, fiziksel ve kimyasal adsorbsiyon, iyon değişimi, kompleksleme ve mikro çökeltme gibi pasif giderim prosesleri için kullanılan genel bir terim olarak düşünülebilir (Brady *et al.* 1994). Mikroorganizmalara ağır metal iyonlarının tek türlerini biyosorbsiyonunu etkileyen faktörler arasında organizmanın özgül yüzey

özellikleri, pH, sıcaklık, başlangıç metal iyon derişimi, biyokütle derişimi sayılabilir. Birden daha çok metal iyonunun mikroorganizmalara simultane bağlanmasını ise, metal kombinasyonu, metal derişim düzeyleri, metal eklenme sırası gibi daha birçok faktör etkiler. Belirli bir mikroorganizma türünün, belirli bir metal iyonunu adsorblama kapasitesi, ortamda baska bir metal varken, tek bileşenli duruma göre artabilir (synergism), azalabilir (antagonism) veya hiçbir değişim göstermez (noninteraction) (Ting *et al.* 1991; Avery and Tobin, 1993; Hu *et al.* 1996). Birden çok ağır metal iyonunun, mikroorganizmalara yarışmalı ve/veya kısmi yarışmalı (seçimli) biyosorbsiyonu üzerine pek az sayıda çalışma yapılmıştır (Ting *et al.* 1991; Pascucci and Sneddon 1993; Hascucci 1993).

1.1.1. Canlı organizmalarla ilişkileri

Canlı organizmaların değişen miktarlarda "ağır metallere" gereksinimleri vardır. İnsanlar demir, kobalt, bakır, mangan, molibden, ve çinkoya gerek duyar. Aşırı düzeyleri organizmaya zarar verebilir. Diğer ağır metaller cıva, plütonyum, ve kurşun gibi toksik metallerin organizmalar üzerinde bilinen yaşamsal ve yararlı etkileri yoktur ve zaman içinde vücutta birikmeleri çok ciddi hastalıklara yol açar. Normalde toksik olan bazı elementler ise, bazı organizmalar için bazı durumlarda yararlıdır. Bunların arasında vanadyum, tungsten, ve hatta kadmiyum da bulunur.

1.1.2. Ağır metal zehirlenmesi

Ağır metal zehirlenmesi çeşitli kaynaklardan oluşabilir ama en çok saf metal elde edilmesinden, örneğin cevherlerin eritilmesinden ve nükleer yakıtların hazırlanmasından oluşur. Elektrokaplama krom ve kadmiyum zehirlenmesinin ana kaynağıdır. Bileşiklerinin yağmur yoluyla ya da iyon değişimi ile toprağa ve körfez çamurlarına karışmasıyla ağır metaller doğada birikebilir. Organik atıkların aksine ağır metaller bozunmadıkları için tehlikelidir. Çok iyi belgelenmiş olan ve ağır metallerle ilgili bir çevre felaketi, cıva zehirlenmesi ile oluşan Minamata hastalığıdır.

1.1.3. Tıpta kullanımı

Tıpta ağır metal tanımı biraz geniştir ve atomik ağırlıklarına bakmaksızın tüm toksik metalleri içerir: "Ağır metal zehirlenmesi" aşırı miktarda demir, mangan, alüminyum, berilyum (dördüncü en hafif element) ya da arsenik gibi yarı metallerin alınmasıyla oluşur. Bu tanımlamada kararlı elementlerin en ağırlığı olan bizmut dışarıda tutulmaktadır çünkü toksisitesi düşüktür.

1.2. Demir

Dünyada oksijen, silisyum ve alüminyumdan sonra en bol bulunan element Fe sembolü ile gösterilir. Ağır metallerin en önemlidir. Yer kabuğunda %4,2 nispetinde bulunur. Demir, uygarlığın vazgeçilmez bir unsuru olarak arkeolojik kronolojide bir çağa isim vermiştir. Avrupalı tarihçiler taş devrinden sonra gelen çağa demir devri demişlerdir. Onlara göre; demir devri dünyanın farklı bölgelerinde farklı zamanlarda başlamıştır. Demir, milattan 1200 yıl önce Yakındoğu'da Türkler tarafından bilinmekteydi. Hatta Türk milletinin demir dağı eriterek yeni yurtlara göçtüğü efsanesi de söylenmektedir. Demir devri, Avrupa içlerinde milattan 900 yıl önce, İngiltere'de 600 yıl önce, Japonya'da ise 200 yıl önce başlamıştır. Bazı Avustralya ve Yeni Gine kabileleri İkinci Dünya Harbinden sonra taş devrinden demir devrine geçmişlerdir.

1.2.1. Demirin biyolojik önemi

Demir hayati açıdan da önemli bir elementtir. Kanda oksijen taşıyıcısı olan hemoglobin yapısında demir bulunur. Dolayısıyla demir iyonlarının insan ve hayvan organizmasında, solunum olaylarında çok önemli bir görevi vardır. Bunların dışında demir, kasların myoglobininde, sitokrom, peroksidaz ve katalaz enzim sistemlerinde yer almasından dolayı da hayati bir mineraldir. Bütün insan vücudundaki total demir miktarı ancak 4-5 gr arasında olmasına rağmen bunun 700 mg kadarı karaciğerdedir. Hayvansal organizma büyük kısmıyla alyuvarlarda yer alan demir muhtevasını tekrar tekrar kullanma kabiliyetindedir. Bu sebeple günlük demir ihtiyacı oldukça azdır.

Çocuklar için 10-15 mg arasında değişir. Büyüklerin demir ihtiyacı da cinsiyete ve yaşa göre farklılık gösterir. İnsanlar yedikleri her türlü et besinleri ile yeteri miktarda demir alırlar. Ayrıca sebzelerde başta ıspanak olmak üzere, fasülyede, kuşkonmazda, incirde, hurmada ve diğerlerinde demir bulunur. Demir organizmada esas olarak enerji metabolizmasında yer alır. Dokulara oksijen transportu, elektron transferi, DNA sentezi ve pekçok yaşamsal önemi olan enzimin yapı ve fonksiyonu için gereklidir. Kolaylıkla ferroz (Fe^{++}) ve fenik (Fe^{+++}) şeklinde değişebilen redoks kimyası ile, insan varlığı demire bağımlıdır ve demir metabolizmasındaki değişiklikler insan sağlığını önemli şekilde etkilemektedir. Demir eksikliğinin en önemli nedeni, diyetle alınan demir ile, büyüme ve metabolik fonksiyonlar için gerekli demir ihtiyacı arasındaki dengesizliktir. Erişkinlerde eritrosit yapımı için gereken demirin %95'i yaşlı eritrositlerin yıkımından sağlanırken, çocuklarda hızlı büyüme nedeniyle yıkılan eritrositlerden sağlanan demir miktarı, sadece %70'dir. Bu dönemde eritropoez ve diğer yaşamsal fonksiyonlar için gereken demirin %30'u diyetle alınması gerektiğinden, diyet eksiklikleri daha kolaylıkla demir eksikliğine neden olabilmektedir. Demir, yaşayan canlılar için eksikliği de fazlalığı da önemli sorunlara yol açan esansiyel bir elementtir.

Son yıllarda demir emiliminin moleküler kontrolü, demir transportu ve hücrel demir alımı ile ilgili çok geniş araştırmalar ve buluşlar olmakla birlikte halen tam bilinmeyen bazı noktalar bulunmaktadır.

Demir elde edilmesinde daha ziyade oksitli demir cevherleri kullanılır. Oksitli olmayan cevherler de oksidine çevrilerek kullanılabilir. Topraktan çıkarılan oksitli cevherler mekanik olarak temizlendikten sonra yüksek fırın adı verilen özel fırında kok kömürüyle indirgenir. Burada indirgeme işlemini kömürün yetersiz oksijenle yanmasından meydana gelen karbon monoksit gazı yapmaktadır.

Türkiye'de birçok yerde demir ve çelik işletmeleri kurulmuş olup, bunların başlıcaları; Karabük Demir ve Çelik İşletmesi, Ereğli Demir ve Çelik İşletmesi, Kırıkkale Çelik Fabrikasıdır. Türkiye'nin yıldan yıla artmakta olan demir cevheri üretimi 1992 yılında 4.650.000 tona ulaşmıştır.

1.3. Glutamin

Glutamin vücuttaki en önemli enerji kaynağıdır ve plazma amino asit havuzunun %20'sini, iskelet kası amino asit havuzunun da %60'ını glutamin oluşturur. Başlıca endojen glutamin sentez kaynağı kaslardır. Glutamin vücutta sentez edilebildiğinden nonesansiyel bir amino asit olarak bilinmesine karşın katabolik durumlarda olduğu gibi belli koşullarda esansiyel özellik kazanabilen bir amino asittir. Kritik şekilde hasta olanlarda glutamin metabolizması hızlanmıştır. Katabolik evredeki hastalarda strese bir yanıt olarak kas dokusundan yüksek miktarlarda glutamin salınımı olur. önceleri, stres durumlarında glutamin salınımının artması; hızla çoğalan hücrelerin yakıt gereksiniminin karşılanması, nükleik asit sentezinde prekürsor olması ve böbreklerdeki tamponlama işlevi ile ilişkilendirilmiştir. Kaslardan yüksek miktarlarda salınmasına karşın kritik şekilde hasta olan bireylerde kan glutamin düzeylerinin düşük ve bu düşüşün artmış mortalite ile birlikte olduğu anlaşılmıştır. İnsanlar travma sonrası glutamin depolarını kullanarak serum glutamin düzeylerini ancak 24-48 saat devam ettirebilmektedir (Weitzel and Wischmeyer 2010). Son veriler kritik hastalık ve travma sonrası glutaminin hücre koruyucu mekanizmaları harekete geçirmede, enflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde ve organ zedelenmesinin önlenmesinde yaşamsal rol oynadığına işaret etmektedir. Glutamin, hücre içi sinyal yollarını uyarmakta, hücre içi sinyal iletimi ile ilgili genlerin ekspresyonunu, apoptoz ve metabolizmayı düzenlemektedir. Bir başka deyişle, kaslardan glutamin salınımının organizmada hücre koruyucu mekanizmaların harekete geçirilmesi ve immün düzenleme ilişkili genlerin aktivasyonu için bir stres sinyali olduğunu söyleyebiliriz (Weitzel and Wischmeyer 2010).

Glutaminin en önemli etkisi "Heat Shock Protein" (HSP), özellikle de HSP70 yapımını arttırmasıdır. HSP70 yapımı hücre ölümünü arttıracak ve iyileşmeyi kötü yönde etkileyebilecek olan, devamlı zedelenme yapan mekanizmalara karşı koruyucudur ve stres toleransını arttırır. HSP70'in yarattığı stres toleransı hücre zedelenmesi, akciğer zedelenmesi, iskemi-reperfüzyon sonucu zedelenme ve septik şoka karşı koruyucudur. HSP70 ekspresyonu için ortamda yeterli miktarda glutamin bulunmalıdır.

Glutamin düzeyleri düşük, kritik şekilde hasta bireyler yeterli miktarda Hsp-70 üretemez (Weitzel and Wischmeyer 2010).

Glutamin başlıca bağırsaklar, karaciğer, böbrekler ve lenfoid doku tarafından alınır. Hipermetabolik stres durumlarında endojen glutamin sentezi artmış gereksinimleri karşılayamaz ve immun sistem işlevleri bozulur. Lenfosit proliferasyonu için glutamin gereklidir.

Glutamin enerji sağlaması yanı sıra nitrojen ve karbon da sağlamaktadır. Makrofajların fagositik aktiviteleri için de glutamin gereklidir. Glutaminin makrofaj antijen ekspresyonu ve doğal öldürücü hücre işlevlerinde de rolü vardır (Weitzel and Wischmeyer 2010).

Glutamin, kritik hastalık ve travma sonrası proenflamatuar sitokin salınımını baskılar. Enfeksiyonlu hastalarda sistemik enflamatuar yanıt sendromunun baskılanmış olması iyi bir klinik gidiş ile ilişkili bulunmuştur. Deneysel hayvan modellerinde cerrahi sonrası enfeksiyon geliştirildiğinde erken glutamin desteğinin hiperenflamatuar yanıtı ve yoğun sitokin salınımını baskıladığı gösterilmiştir. Özellikle IL-6, TNF- α yanıtı baskılanmaktadır. Hiperenflamatuar yanıtın glutamin desteği ile baskılanması NF- κ B'nin bağlanma/ aktivasyonunun glutaminle baskılanması sonucu olduğu anlaşılmıştır. Deneysel sepsis (kan zehirlenmesi) modellerinde 0.75 gr/kg glutamin, NF- κ B yi baskılayabilmektedir. Glutaminin bu etkilerinin de HSP70 üzerinden olduğu düşünülmektedir. HSP70 “knock-out” farelerde (HSP70 geninde delesyon bulunan fareler) glutamin desteği sonrası NK- κ B, IL-6 ve TNF- α 'da baskılanma yaratılamamaktadır (Weitzel and Wischmeyer 2010) .

Glutamin çok sayıda esansiyel metabolik işlevleri olan bir amino asittir. Pürin, pirimidin, nukleotid, amino şeker ve glutatyon sentezinde nitrojen donorudur. Asit-baz dengesi açısından önem taşıyan renal amonyagenezin substratıdır. Dokular arasında nitrojen taşınmasında rol oynar.

1.4. Moleküler Şaperonlar

Moleküler şaperonlar proteinlerin bir sınıfı olup yüksek düzeyde korunmuş hücresel molekülüdür. Organizmanın yaşamı için gerekli yapılardır. Moleküler şaperonlar arasında *E.coli*'de de saptanan ve stres proteinleri adı verilen GroEL-GroES ve Dna K, Dna J, GrpE şeklinde moleküller saptanmıştır. Bir çok stres protein türü tanımlanmıştır. Örneğin ısı şoku proteinleri gibi (HSP 70, HSP 40).

1. HSP 70: M.ağırlığı: 70000 dalton (kendi başına)
2. HSP40: M. ağırlığı: 40000 dalton (kendi başına)

Stres proteinleri protein katlanmalarında yeni sentezlenen proteinleri içerdikleri gibi, katlanma yapan proteinlerin rasgele toplamalarını da engellerler. Bu proteinlerin en öncelikli görevi budur. Şaperon yapıları stres altında bozulmuş proteinleri ATP ve diğer Co-faktörlerinde yardımıyla onarırlar (Üzümcü 2009).

1.4.1. Şaperon sisteminde protein şekillenmesi

Katlanmada şaperonlar 2 mekanizmayla yer alırlar. Trigger faktör ve Hsp70 gibi şaperonlar ribozomların çıkış noktasında katlanmaya hazır hale getirecek şekilde tutunurlar (çoğu küçük proteine bu bölgedeki şaperonlama yeterli olur.) Aksine; büyük silindirik şaperon içine bir proteini alacak kompartmanlar içerir (daha uzun zincirler 2 kademe şaperonlara gereksinim duyar.) Bu şaperonlar direk ribozom bağlanmazlar. Çoğu ökaryotik hücrede 2 bir alt grup şaperonin daha vardır (Fan CY, Lee S, Cyr DM. 2003).

1.5. Isı Şoku Proteinleri

Yükselen çevre sıcaklığıyla gelişen sıcaklık şok yanıtının varlığı, ilk kez Ritossa tarafından saptanmıştır (Ritossa 1962 Ritossa 1996'dan). İnkübatörde tutulan

Drosophila hydei larvalarının tükürük bezi hücrelerinin politen kromozomlarında artan gen ifadesine bağlı olarak meydana gelen ve puff (şişkinlik) adı verilen yapılar gözlemlenmiş, kısa süreli uygulanan yüksek sıcaklık karşısında tükürük bezi kromozomlarında birçok yeni şişkinliklerin belirdiği ve önceden var olan şişkinliklerde gerileme görüldüğü bildirilmiştir (Katchinski 2004).

Drosophila kromozomlarının puff bölgelerinde kodlanan proteinler, ilk kez Tissieres *et al.* (1974) tarafından tanımlanmış ve çevre sıcaklığındaki ani yükselmeye bağlı olarak sentezlerinin artması nedeniyle “sıcaklık şok proteinleri” olarak adlandırılmışlardır. *Drosophila*’da görülen puff (şişkinlik) bölgelerinin, yeni sentezlenen mRNA birikiminin ve yoğun bir mRNA sentezinin merkezi olduğu belirlenmiştir.

Hücre içi sinyal ağını uyaran stres etmeninin şiddeti yeterli düzeyde ise, sıcaklık şok proteinlerinin ekspresyonu uyarılmaktadır. Sıcaklık şok proteinleri aynı zamanda “stres proteinleri” olarak da adlandırılmaktadır. Bu proteinlerin ekspresyonunun uyarılması ise “stres tepkisi” olarak tanımlanmaktadır (Feder and Hofmann 1999).

Proteinler, bazı yardımcı moleküller yardımıyla görevlerini gerçekleştirebilmek için gereksinim duydukları işlevsel kuvaterner (dört elementli), tersiyerya da sekonder yapılarını kazanırlar. Bu işleme “protein katlanması (protein folding)” adı verilmektedir. Polipeptid zincirlerinin katlanmasında yardımcı olan proteinler ise “moleküler şaperonlar” olarak tanımlanmaktadır (Martin and Hartl 1997).

Isı şoku proteinleri molekül ağırlıklarına göre beş grup içinde sınıflandırılırlar. Bunlar sırasıyla, Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 ve küçük ısı şoku proteinleri (sHsp) olarak adlandırılmaktadır (Farcy *et al.* 2007). Stres etkenine hücrel yanıt olarak, stresin kendisi tarafından indüklenen ve stres proteini olarak adlandırılan proteinler sentezlenir. Bu proteinler hücreyi koruma özelliğindedirler ve tüm organizmalarda bulunurlar. Stres proteinlerinin artması, strese toleransın artması ile ilişkilidir. Eğer stres etkeni canlıyı hafif derecede etkiliyorsa hayati bir önem taşımaz ancak şiddetli stres etkisi organizma için öldürücü olabilir. Son yıllarda ısı şoku proteinleri çevre kirliliği çalışmalarında da

indikatör olarak kullanılmaktadır (Micovic *et al.* 2009; Gonzales-Riopedre *et al.* 2007) HSPlerin diğer bir fizyolojik sorumluluğu ise moleküler şaperon olarak görev yapmasıdır. Şaperonlar, proteinlerin katlanarak üç boyutlu hale gelmesini sağlayan, aynı zamanda yanlış katlanan proteinleri düzelten ve proteinlerin hücre içine giriş çıkışlarında yardımcı olan refakatçi proteinlerdir. raf üç boyutlu hale gelmesini sağlayan, aynı zamanda yanlış katlanan proteinleri düzelten ve proteinlerin hücre içine giriş çıkışlarında yardımcı olan refakatçi proteinlerdir. (Kayhan 2010).

Tüm sıcaklık şok proteinleri stres uyarımlı değildir. Sıcaklık şok proteinleri stres faktörlerinin etkili olmadığı koşullarda da hücre içerisinde bulunmakta ve bu durumda sıcaklık şok kognatları (heat shock cognates) olarak tanımlanmaktadır. Sıcaklık şok kognatları, moleküler şaperon proteinler olarak, meydana gelen yeni polipeptid zincirlerinin düzgün bir şekilde katlanmasında, hücredeki görev yerlerine taşınması ve işlevlerinin düzenlenmesinde görev almaktadırlar (Martin and Hartl 1997). Hücrede üstlendikleri fonksiyonlara göre sıcaklık şok proteinleri iki gruba ayrılmaktadır (Üzümcü 2009).

Sürekli eksprese olanlar (sıcaklık şok kognatları): Normal hücre şartlarında henüz katlanmamış polipeptid zincirlerine bağlanırlar ve bunların düzgün şekilde hedef organellere taşınmasına yardımcı olurlar.

Stres uyarımlılar: ısı şoku proteinleri ise, stres koşullarına bağlı olarak ortaya çıkan hücre hasarını sınırlandırmak, proteinlerin agregasyonunu önlemek, bozulan proteinlerin uzaklaştırılmasını sağlamak ve stres uyarımlı hücre ölümüne engel olmaktır. (Kahyan 2010).

Isı şoku proteinlerini kodlayan genlerin bulunduğu gen ailelerinin gelişim sürecinde fonksiyon ve yapı bakımından en fazla korunmuş gen ailesi olduğu bilinmektedir (Feder and Hofmann 1999; Sorensen and Loeschke 2004). Çünkü gelişim sürecinde hücreler bir stres ile karşılaştıkları zaman canlı kalabilmelerini sağlayacak, stres sinyali saptayan, izleyen ve yanıt verebilen bir mekanizma geliştirmişlerdir. Uzun süreli ve

artan stres etkisi, canlı hücrelerinin bazı etkin korunma mekanizmalarını çalıştırmaktadır. Bu nedenle çevresel stres faktörlerinin stres sinyallerine tepki olarak ısı şoku proteinlerine ait genlerin transkripsiyonu uyarılır. Oluşabilecek protein hasarının engellenmesine yardımcı olmak için ısı şoku proteinleri koruyucu rol üstlenirler. Canlılarda çeşitli çevresel stres etkileri karşısında bir veya daha fazla sayıda ısı şoku proteininin sentezi uyarılabilir ve böylece hücreler ve dokular stres esnasında moleküler şaperon etkileriyle hücresel hasardan ve apoptozisten korunmuş olurlar (Cruz-Rodriguez and Chu 2002; Alak 2007;).

1.5.1. Büyük ısı şoku proteinleri

Bu grupta farklı şekillerde tanımlanmış çok sayıda protein vardır. Bu proteinler genel olarak HSP (Isı şoku proteini) şeklinde adlandırılmışlardır. Isı şoku proteinler HSP8, HSP10, HSP20, HSP25, HSP27, HSP32 (hücreyi strese karşı koruma), HSP40, HSP47, Hsp60 (protein katlanmasında görevli), HSP70 (Polipeptid zincirinin uzatılması ve ısı şoku yanıtlarının düzenlenmesinde görevli), HSP90 (Steroid reseptörlerin düzenlenmesi, proteinlerin katlanması ve sabitlenmesinde görevli), HSP100 ve HSP110 (termotoleranslıktan sorumlu) şeklinde gruplanmışlardır. HSP8 Sitoplazmik proteinlerin hücre içi düzenlenmelerinde önemli role sahiptir. HSP10, HSP60 ile kompleks yaparak işlevsel duruma geçer. HSP20 Farklı hetero kompleks diğer HSP' lerle birleştiği zaman işlevsellik kazanmaktadır. Isı ile oluşan stres koşullarında membran yapılarının düzgün şekilde yerleşmesine yardımcı olurlar. HSP25, HSP27 ve HSP32 küçük moleküler ağırlıklı şaperonlar şeklinde adlandırılırlar. Moleküler ağırlıkları 15-30 kDa arasında değişiklik gösterir. HSP25 ve HSP27 stres bulunmayan koşullarda sitoplazmada lokalize olmuş durumda bulunurlar ve apoptosisin düzenlenmesinde etkindirler. HSP40 ökaryot organizmalarda HSP70' in fonksiyonlarına yardımcı olur. Büyük moleküllu şaperon grubuna ait olup, HSP70 ile aynı görevi yerine getirmektedir. HSP47 özellikle fotofosforilizasyon sırasında hücredeki miktarı önemli düzeyde artar ve serin proteaz enziminin aktivitesinde rol oynar. HSP60 sıcaklıkla özelliği bozulmuş proteinlerin tekrar aktive olmasını sağlar. HSP70'in görevi bakteride ve ökaryotta farklıdır. Olgun polipeptid zincirlerinin veya hatalı katlanmış protein moleküllerinin yeniden ve düzgün

şekilde katlanmalarına yardımcı olur. Bakterilerde HSP70'de meydana gelecek mutasyonun çoğu kez ölümle sonuçlandığı saptanmıştır. HSP90 dimer ya da hetero komplekslerin birleştirilmesini gerçekleştirir (Üzümcü 2009).

Dev AAA süperailisinin (çeşitli hücre aktiviteleriyle ilgili ATPazlar)üyesi HSP100 şaperonları kararlı katlanmış proteinleri bile çözme ve büyük protein çöktürmelerini çekip ayırma yeteneğine sahiptirler. ATPaz halkalarının tek (2.sınıf) ya da çift (1.sınıf) katları katlanmamış polipeptit zincirinin translokasyonu için anahtar rezidüleriyle işaretlenmiş bir kanal düzenler (Saibil HR 2008).

1.5.2. Küçük ısı şoku proteinleri (HSPs)

Küçük HSP'ler β sandviç katlanmalı yaygın α kristal bölgesi küçük birimlerin geniş kompleksleridir. Genellikle değişken N ve C uç temasları yapan dimerlerden oluşmuşlardır. Stresle bozulan protein çöktürmelerinin açılması ve yeniden katlamada kullanılan ATP bağımlı şaperonlar için stabilizasyonunda çeşitli rolleri vardır (Saibil HR 2008).

Molekül ağırlıkları 15-40 kDa arasında olan protein gruplarıdır. Organizmalardaki dağılımı çok değişkendir. Küçük ısı şoku proteinleri, HSP60 ve HSP70' den farklı olarak, proteinlerin düzgün katlanmasında görev almazlar. Bunun yerine hücre stres yanıtı esnasında kısmi katlanmış proteinler ile etkileşime girerek bu proteinleri stabilize ettikleri ve yapışarak çöktürmelerini engelledikleri belirlenmiştir (Pantartzzi *et al.* 2009). Kristal yapıdaki küçük ısı şoku protein (HSPs) ailesi üyelerinin hücre dengesi, hasar cevapları ve hastalıklarda önemli rolleri bulunmaktadır. Büyük molekül ağırlıklı HSP'ler geniş organizma aralığında bulunan stres proteinleri iken küçük molekül ağırlıklı stres proteinleri türlere spesifiktir ve tanısız amaçlarla kullanılmaktadırlar. Örneğin HSP40 balıklarda, midye ve salyangoz gibi sucül organizmalarda tespit edilmiştir (Lyons *et al.* 2003; Tomanek 2005). En yaygın olarak gözlenen ve üzerinde çeşitli araştırmalar yapılmış bir HSPs proteini olan HSP27 deki anlatım farklılığı ve fosforilasyonunun hipertermi, oksidatif hasar (Baek *et al.* 2000), metal toksisitesi

(Benndorf ve Welsh, 2004) ve anoksi iskemi (Bruey *et al.* 2000) gibi subletal hasarlara yanıt vermekte olan hücre ve dokularda gözlemlendiği bildirilmiştir. Zebra balığında tanımlanan 13 adet HSP kodlayan mRNA dizisinden 10 tanesinin insan HSP'leri ile homolog olduğu bilinmektedir (Franck *et al.* 2007).

Zebra balığında HSP27'yi kodlayan gen ile insandaki HSP27/HspB1 ile homolog olup, fosforilasyon, termo koruyucu aktiviteler ve hücre içindeki dağılımı açılarından benzerlik göstermektedir. Zebra balığındaki ısı şoku proteinlerinin (zfHSP) anlatım düzeylerinin belirlenmesine ait çalışmalar devam etmektedir. HSP27'nin spesifik etki mekanizması ve gelişimdeki rolleri halen araştırılmaktadır. Bu çok çeşitli fonksiyonların HSP27'nin etkileri sırasında tek bir mekanizma ile mi, farklı hücre tiplerine spesifik mi, yoksa hasar tipine mi spesifik olduğu araştırılmaktadır. HSP70'in hücre tamir sürecindeki rolü de tam olarak açığa çıkarılmamıştır.

1.6. Isı Şoku Proteinlerinin (HSP) Gruplandırılması

1.6.1. HSP100

Bu grup yüksek molekül ağırlığına sahip olan ısı şoku proteinleridir. 100-110 kDa arasında bir ağırlığa sahiptirler. Stres altında bulunmasa bile normal olarak hücrelerde sürekli olarak sentezlenen kognatlar (Hsc) olarak bilinmektedirler. Termotoleransın geliştirilmesinde rol oynadıkları öngörülmektedir. Fizyolojik koşullar altında HSP100 proteinleri moleküler şaperonlar gibi fonksiyon gösterirler ve proteinlerin yeniden düzenlenmesinde rol oynarlar (Feder and Hofmann 1999; Aşkar *et al.* 2007).

1.6.2. HSP90

HSP100 ve HSp90 β : Bu iki molekül birbirine çok benzer etkiler göstermektedir. Ayrıca bu iki molekülün beraber etkinlik gösterdiğine dair çalışmalar vardır. En iyi bilinen etkileri kalmodulin bağlayıcılıklarıdır (Koyasu *et al.* 1989). Yüksek konsantrasyonda ise aktin filamentleri ile etkileşime girerler. Etkilerini gösterebilmeleri

için Ca^{+2} 'a ihtiyaç duyarlar. Ayrıca HSP90 β 'nın glukoz metabolizmasında da rol aldığı düşünülmektedir. Bir çalışmada diyabetiklerde HSF1 ve HSP72'nin azaldığı buna karşın HSP90 β artışı olduğu gözlemlenmiştir (Atalay *et al.* 2004) Yine aynı çalışmada diyabetiklerde iskemik stresin HSF1 ve HSP72 düzeylerini etkilemediği ama egzersizin HSF. 1 ve HSP72 düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir. Diyabetiklerdeki insülin direncinin Hsp. ile ilişkisi şu an için ilgi çeken bir araştırma konusudur. HSP90 α : Günümüzde en iyi bilinen özelliği tümörgenesis ile olan ilişkidir.(Neckers *et al.* 2003). HSP90 daha çok HSP70, HSP40 ve HSP organize edici protein gibi co-şaperon'larla birlikte multiprotein şaperon kompleksi şeklinde bulunur (Pearl *et al.* 2000). Hücrelerin iletişimi ve normal morfolojik yapılarının korunmasında önemli rolleri vardır. HSF1 ile transkripsiyonu düzenlenir (Westerheide *et al.* 2005). Epidermal büyüme factor reseptör sinyal iletimi ve Akt sinyal yolu gibi muhtelif sinyal yolları ile apoptotik yollarda görev alır ve steroid hormon reseptörlerinin düzenlenmesinde rol oynar (Neckers *et al.* 2003). Apoptozda birden fazla noktada görevi vardır ancak genel olarak antiapoptotik bir role sahiptir.(Garrido *et al.* 2001). Dolayısıyla kanser hücrelerinin canlılığının devam etmesine yardımcı olur (Otaka ve *et al.* 2006). Özellikle androjenik hormon reseptörlerinin fonksiyonlarının ve stabilitelerinin düzenlenmesinde etkilidir ve birçok tümörün gelişiminde etkisi olan damar büyüme endothelial factor reseptörlerinin fonksiyon göstermesi HSP90 α bağlıdır (Neckers *et al.* 2003).

Hipertermi ve hipoksi tümöral hücrelerde HSP90 artışına bağlı olarak tümör direncini artırır. Bloklanması hücre ölümünü hızlandırır. Lenfomalarda büyümeyi arttıran şimerik protein anaplastic lymphoma kinase (NFK-ALK), HSP90 varlığında fonksiyon görür (Schmitt *et al.* 2007).Geldanamycin ile bloklanması kemoterapiye destek amaçlı deneysel olarak kullanılmaktadır. Geldanamycin türevlerinin kullanımı ile kanser hastalarında Önemli hayatta kalma artışı bildirilmiştir (Westerheide *et al.* 2005).Ancak intestinal mukozanın enlamatuar ya da iskemik hadiselerle karşı korunmasında etkisi olmadığı gösterilmiştir (Otaka *et al.* 2006).

hsp90aa1: HSP90 (90 kDa ısı şok proteini) çok sayıdaki proteinler için proteinin katlanmasına ve kalite kontrolünün yapılmasına yardım eden moleküler bir şaperondur.

Fonksiyonel HSP90 dimer olarak çalışır ve intrinsik ATPaz aktivitesi vardır. HSP90 dimer diğer şaperonlar (örneğin, HSP70) ile uyum içinde çalışır ve Birkaç ko-şaperon ya da yardımcı proteinler(Hop, cdc37) tarafından düzenlenir. Hsp90'ın 100den fazla proteinlerle etkileşimi olduğu gösterilmiş ve bazı önemli alıcı proteinler; kinazlar (örneğin, Raf-1), nükleer hormon reseptörleri (örneğin, östrojen reseptörleri) transkripsiyon faktörleri (örneğin p53), GPCRs (örn. CB2 reseptörleri) ve iyon kanalları (örn. CFTR) gibi proteinlerde bunlardan bazılarıdır. İnsanlarda, HSP90 α izoformları stres altında eksprese olurken Hsp90 β izoformu yapısal olarak eksprese olur. HSP90 bazı tümör hücre tiplerinde mutasyona uğramış onkogenik proteinleri stabilize ederek önemli bir rol oynar.

1.6.3. HSP70

HSP70 polipeptitlerin açılmış hidrofobik alanlarına bağlanır. HSP70 aktivitesi ATP bağlama, ATP hidrolizi, nükleotit değiştirme döngüleriyle kontrol edilir (Yang *et al.* 1999). HSP40, HSP70 ile alıcı proteinlerin arasındaki biçimlenmeyi düzenleyen koşaperondur. HSP70 ve HSP40 aynı hücre içi kompartmanda birlikte yerleşebilirler. HSP40'ın en önemli görevi, HSP70'e ATP-bağımlı polipeptid bağlamayı düzenlemektir (Maines 2005)

3 mekanizmayla HSP40, HSP70 ve polipeptid arasındaki formatleri düzenler.

- 1) HSP40, HSP70'e özel alıcıları bırakan ve bağlayan polipeptid bağlama bölgeleri (PPD) içerir.
- 2) HSP40, HSP70'in ATP formunu ADP formuna dönüşümünü sürdürerek HSP70-polipeptid kompleksini sabitler.
- 3) HSP40 üyeleri aynı hücresel kompartmanda farklı yerlere yerleşir bunlar ile HSP70 etkileşimi farklı HSP40-HSP70 çiftlerini oluşturur (Maines 2005)

Yaklaşık olarak yeni sentezlenmiş proteinlerin üçte biri katlanma ve oligomerizasyon için ER lümenine taşınır. HSP40 içeren ER moleküler şaperonları, bu proteinlerin

çökmesini engeller ve katlanmasına yardım eder (Yang *et al.* 1999). HSP70'in yapısı ve özellikleri en iyi öbakteriyel HSP70 ile anlaşılır. HSP70'in (Dnak) koşaperonu yani HSP40'a Dnaj denir ve nükleotid değiştirme faktörüne GrpE denir. DnaK'ın N-ucu 44 kD'luk bir ATPaz bölgesi içerir C- ucu ise 27 kD'luk bir peptid bağlama bölgesi içerir (Yang *et al.* 1999).

Stresin zararlı etkilerinden hücreyi koruyan ve proteinlerin düzgün katlanmasında rol oynayan ısı şoku proteini HSP70 üzerindedir. HSP70 üzerinde en çok çalışılmış ve tanımlanmış ısı şoku proteini olup birçok balık türünde tanımlanmıştır. HSP70 gelişimi sırasında korunmuş olan en önemli stres uyarımlı proteindir (Ojima 2005). Hücredeki sentezi en fazla yüksek ısı ve ağır metal etkisinde artmaktadır. HSP70 ilk olarak Ritossa adlı araştırmacı tarafından 1962 yılında *Drosophila melanogaster* (Sirke sineği) tükrük bezi hücrelerinde tanımlanmıştır. Yapılan diğer çalışmalarda HSP70'in hücrede ısı şoku uyarımlı (HSP70) ve kognat (Hsc70) olmak üzere iki çeşit protein ailesi üyesi bulunduğu bildirilmiştir (Clark and Peck 2009). HSP70 protein ailesini hücrede bulundukları yer ve görevlerine göre, ısı şoku kognatı 70 (Hsc70), stres uyarımlı HSP72, mitokondrial HSP75 ve endoplazmik retikulumda bulunan HSP78 olarak dört alt grupta da incelemek mümkündür. HSP70 aynı zamanda, stres sırasında proteinlerin hidrofobik rezidülerine bağlanarak, ortaya çıkabilecek denatürasyon ve agregasyonları önlemek suretiyle hücreyi ısı ve oksidatif hasardan da korumaktadır. Sıcaklık ve kadmiyum arasındaki etkileşimlerin zebra balığı gelişimi üzerindeki etkilerini farklı sıcaklıklarda (21, 26 ve 33 C'lik) ve altı farklı kadmiyum konsantrasyonunda (0.025, 0.5, 2, 5, 10 mg/l) inceleyen araştırmacılar kalp hızı, karaciğer histopatolojisi, yumurtlama oranı, embriyo anomalileri ve ısı şoku proteini indüksiyonunu incelemişlerdir. Kadmiyum varlığından bağımsız olarak sıcaklık artışının gelişim hızını anlamlı olarak hızlandırdığını bulmuşlardır. Hem kadmiyum varlığı hem de 21 derecelik soğuk stres uygulamasının kalp atımı sayısında düşme, kalp hızı ve yumurtlamada azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir (Hallare *et al.* 2005). Keller ve diğerleri (2008) yaptıkları çalışmalarında ısı şoku ile indüklenen HSP70 ekspresyonunun zebra balığı hücrelerinde ERK aktivasyonuna bağlı olduğunu belirtmişlerdir. HSP70'ler birçok subselüler bölgede görülebilir. Bu grubun temel izoformu HSP72'dir ve

sitoplazmada yer alır. Normal şartlar altında diğer hücresel proteinlerle birleşir ve onların diğer proteinler ile bağlanmalarına ve yer değiştirmelerine yardımcı olur. Anormal şartlar altında ise, hücrede HSP72 ve diğer HSP70 üyelerinin seviyesi artar ve hücreyi korumak amacıyla stresin sebep olduğu hücresel hasarı onarırlar (Kayhan 2010).

hspa5: Bu gen tarafından kodlanan protein, ısı şoku proteini 70 (HSP70) ailesinin bir üyesidir. Bu endoplazmik retikulum(ER) lümeninde lokalizedir ve Endoplazmik retikulumda proteilerin katlanma ve birleşmesinde görev alır. Bu protein birçok ER proteinleri ile etkileşim içinde olduğundan hücrede proteinin taşınmasında önemli bir rol oynayabilir.

hspa1a: Bu intronsuz gen ısı şok proteini 70 ailesinin bir üyesi olan 70kDa'luk ısı şok proteinini kodlar. Diğer ısı şok proteinleri ile bağlantılı olarak, bu protein, varolan proteinleri agregasyona karşı stabilize eder ve sitoplazma ve organellerde yeni translasyona uğramış proteinlerin katlanmasına aracılık eder. Ayrıca, AU-zengini eleman RNA'ya bağlanan protein 1 ile etkileşim yoluyla ubiquitin-proteazom yoluyla da ilişkilidir. Gen, MHC kompleksi sınıf III bölgesinde, benzer proteinleri kodlayan yakın ilişkili iki genin yer aldığı klusterda yer almaktadır.

1.6.4. HSP60

HSP 60 ailesi daha çok 6-8 molekülünün birleşimine HSP10 eklenmesi ile oluşan şaperonin şeklinde bulunur (Otaka *et al.* 2006; Parcellier *et al.* 2003). *E. Col*'de büyüme için mutlak varlığı gereklidir (GroEL) (Horwich *et al.* 2006). ATP bağımlı bir reaksiyonla polipeptid zincirlerinin katlanmasını düzenler (Parcellier *et al.* 2003). Birçok hücrede sitoprotektif etki gösterir. Bu etkileri HSP70 ailesine benzer özellikler gösterir, ancak farklı mekanizmalarla gerçekleşir. HSP70 tek başına etki ederken HSP60 şaperonini, GroES/HSP10 co-şaperonin ile birlikte yaklaşık 1000 kDa ağırlığında bir moleküldür (Deocaris *et al.* 2006). HSP 60 şaperoninin en önemli özelliği mitokondride yer almasıdır. (Möbius *et al.* 1997; Parcellier *et al.* 2003; Otaka *et al.* 2006; Deocaris *et*

al. 2006). Mitokondri matriksindeki en önemli protein katlayıcı moleküldür (Möbius *et al.* 1997). Genetik mutasyonlarında ciddi mitokondriyal hastalıklar gelişmektedir (Deocaris *et al.* 2006). Mitokondrinin hücresel strese lokal yanıtla tolerans göstermesi HSP60 sayesinde olur (Zhao *et al.* 2002).

Hücrede mitokondri dışında membranda da saptanmıştır. Aminoasit transportunda rolü olduğu düşünülmektedir (Deocaris *et al.* 2006). Pankreas β hücre membranında olması ve nonobez diyabetik sıçan HSP60 kaybının insülitise eşlik etmesi, insülin sekresyonunda görevi olduğunu düşündürmektedir (Brudzynski *et al.* 1992). Kanser hücrelerin membranlarında tümörün kaynaklandığı dokunun orijinal hücrelerinin membranlarına oranla daha fazla HSP60 olduğu saptanmıştır (Shin *et al.* 2003). Serviks (rahim ağazi cervical) ve mesane kanseri gibi bazı kanserlerde HSP60 seviyesinin yüksek oluşunun kötü prognostik faktör olduğunu gösteren çalışmalar vardır (Lebret *et al.* 2003; Cappello *et al.* 2003). Apoptoz ve HSP60 arasındaki ilişki henüz tam aydınlatılamamıştır. HSP60 'nın apoptozu arttırdığını gösteren çalışmalar kadar azalttığını gösteren çalışmalar da vardır (Deocaris *et al.* 2006). Dolaşıma çıkan HSP60 vasküler ve myeloid hücrelerin yüzeyinde adhezyon molekülü oluşmasını ve bu hücrelerden proinflamatuvar sitokinlerin salınımını artırır (Pockley *et al.* 1999). Ayrıca renal ve vasküler hastalıklarda dolaşımda HSP60 saptanır. Muhtemelen vasküler yatak gerilime karşı HSP60 yanıtı vermektedir. Hipertansiyonlu hastalarda anti-HSP60 da saptanmıştır (Pockley *et al.* 2002). HSP60, mitokondriyal rejenerasyonun göstergesi olduğundan, sürekli rejenerasyon görülen gastrointestinal sistem hücrelerinin epitel dokusunda normalde de ölçülebilir düzeylerde de vardır (Möbius *et al.* 1997). Stres koşullarında hem ince barsak hem kolonda arttığı gösterilmişken, ne ince barsak ne de kolonda koruyucu etkileri gözlemlenmemiştir (Otaka *et al.* 2006). Ancak, barsaklarda epitel dışında barsak duvarında da farklı hücrelerde bulunması, HSP60'ın barsaklarda daha çok motilite ile ilişkili fonksiyonları olabileceğini düşündürmektedir (Möbius *et al.* 1997; Pockley *et al.* 1999; Otaka *et al.* 2006). HSP leri ağırlıklarına göre dört ana gruba ayrılırlar. Çizelge 1.1 HSP sınıflaması özetlenmiştir (Ersin 2009) .

Çizelge 1.1. HSP sınıflaması

	HSP	Moleküler ağırlığı	Fizyolojik yerleşim	Streste yerleşim	Fonksiyon
HSP90 ailesi	HSP100	100	ER	ER	Glukoz met.
	HSP 90 α	86	Sitoplazma	Sitoplazma	Steroid reseptör
	HSP 90 β	84	Sitoplazma	Sitoplazma	Aktin
HSP 70 ailesi	HSP 80	80	ER	ER	Immünglobulin
	HSP 75	75	Mitokondri	Mitokondri	Glukoz met.
	HSP 73	73	Sitoplazma	Nükleus	Protein katlanması
	HSP72	72	Sitoplazma , Nükleus	Nükleus	Protein katlanması
HSP 60 ailesi	HSP 60	58 ,60	Sitoplazma, mitokondri	Mitokondri	Protein katlanması
Küçük hsp ailesi	HSP 47	47	Sitoplazma, mitokondri	Mitokondri, sitoplazma	Kollajen spesifik
	HSP 32	32	Sitoplazma	Sitoplazma, nükleus	Heme oksijenaz-1
	HSP 25	25	Sitoplazma	Sitoplazma	α -kristallin
	HSP 8	8	Sitoplazma, membran	Sitoplazma, membran	PDGF

*ER: Endoplazmik Retikulum.

PDGF: Platelet Derived Growth Factor

1.7. Hsc 70 Ve HSP 90 İlişkisi

Hsc70 ve HSP90 birlikte çalıştıkları için tek bir multi şaperon makine veya bileşik olarak ele alınabilirler. Bu Hsc70-HSP90 bileşiğinin fonksiyonları bunların ATPaz döngülerini ve sonuç olarak bağ kurma eğilimlerini etkileyen çeşitli kofaktör proteinler

veya ko-şaperonlar tarafından ayarlanır. Bu Hsc70-HSP90 makinesinin protein yer değiştirmesi veya indirgenmesi gibi katlanmasının yanı sıra çeşitli fonksiyonlarda yer almasına olanak sağlar (Young *et al.* 2004).

Hsc70-HSP90 bileşiği ile çeşitli ko-şaperonlar arasındaki ilişki ve bunların farklı protein katlanma fazları, memelilerdeki hormon reseptörlerinin olgunlaşması çalışmalarında en çok gözlemlenendir. Polipeptid katlanmasındaki rolünün yanı sıra, Hsc70-HSP90 bileşiği çeşitli ko-şaperonlarla beraber proteinlerin hücre içi organellere ya da proteazomlara sıralanmasında yer alır. Örneğin, mitokondriyal proteinler genellikle işaretçi polipeptid, ya da sitozol içindeki öncül polipeptidler olarak sentezlenirler ve daha sonra organelle aktarılırlar. Hsc diğer ko-şaperonlar olan HDJ1 ya da HDJ2 ile bu öncül polipeptidlerin mitokondriona kolay taşınması için çözünürlüğünü sağlar. Mitokondriyal zar içinde dış mitokondriyal zarın translokazı (TOM 70) yer alır (Fan CY and Lee S 2003).

1.8. Isı Şok Proteini 70 (HSP70) Görevleri

Üzerinde en çok çalışılmış ve tanımlanmış sıcaklık şok proteinidir. Lindquist and Craig (1988) yapılan ilk çalışmalarda hücrede kognat (Hsc70) ve sıcaklık şoku uyarımlı (HSP70) olmak üzere iki çeşit HSP70 protein ailesi üyesinin saptandığını bildirmişlerdir. Hsc70, normal koşullarda sitoplazma ve çekirdekte dağılmış durumda bulunmakta ve memeliler arasında gelişimi içerisinde yüksek oranda korunmuş bir genetik diziyi paylaşmaktadır. Yirmidört ökaryotik ve prokaryotik türde, HSP70 geninin Boorstein *et al.* (1994) tarafından gerçekleştirilen DNA dizi analizleri sonucunda söz konusu proteinin türler arasında yüksek benzerlik gösterdiği saptanmıştır. HSP70 protein ailesi, hücrede bulundukları yer ve görevlerine göre, sıcaklık şok kognatı 70 (Hsc70/HSP73), stres uyarımlı HSP72, mitokondriyal HSP75 (Hsp75/grp75) ve endoplazmik retikulumda bulunan HSP78 (HSP78/grp78) olarak dört alt grupta toplanmaktadır (Green *et al.* 1995).

Çizelge 1.2’de HSP70 protein aile üyelerinin hücrede bulundukları yerler ile görevleri verilmiştir (Green *et al.* 1995).

Çizelge 1.2. Protein aile üyelerinin hücrede bulundukları yerler ve görevleri (Green *et al.* 1995).

Hsp70 Ailesi	Hücrede Bulunduğu Yer	Görev
Hsc70/Hsp73	Çekirdek, sitozol katlanması ve taşınması	Moleküler şaperon, protein
Hsp72	Çekirdek, sitozol korunması, proteinlerin	Stres uyarımlı, hücre denaturasyonu ve agregatlaşmasının önlenmesi
Hsp75/ grp75	Mitokondri	Moleküler şaperon
Hsp78/ grp78	Endoplazmik retikulum (ER)	Moleküler şaperon

HSP70 ailesi içerisinde, üzerinde en çok araştırma yapılan gruplar stres uyarımlı olan HSP72 ve hücrede sürekli eksprese edilen sıcaklık şok kognatı 70 (Hsc70)’dir. HSP70 ailesi içinde yer alan ve stres uyarımlı olan HSP72 proteini literatürlerde genel olarak HSP70 olarak ifade edilmektedir. Hsc70, henüz sentezlenmiş yeni polipeptit zincirlerine sıkıca bağlanıp, işlevsel yapısını kazanmamış işlevsel yapısını kazanmamış proteinlerin agregatlaşmasını önleyerek bozulmalarına engel olmaktadır.

Stres uyarımlı HSP72 genel ifadesiyle HSP70 ise sıcaklık veya oksidatif stres gibi protein yapısına zarar verebilecek koşullarda yeni oluşmuş polipeptid zincirlerinin yanlış katlanmalarını veya yapışarak çökelmelerini önlemektedir. Tipik olarak bir HSP70 proteini, 613–635 aminoasit uzunluğundadır. Tüm HSP70 proteinlerinin yapısında üç adet ortak fonksiyonel ana domain bulunmaktadır (Morimoto *et al.* 1996);

1. N- ucu ATPase domaini:

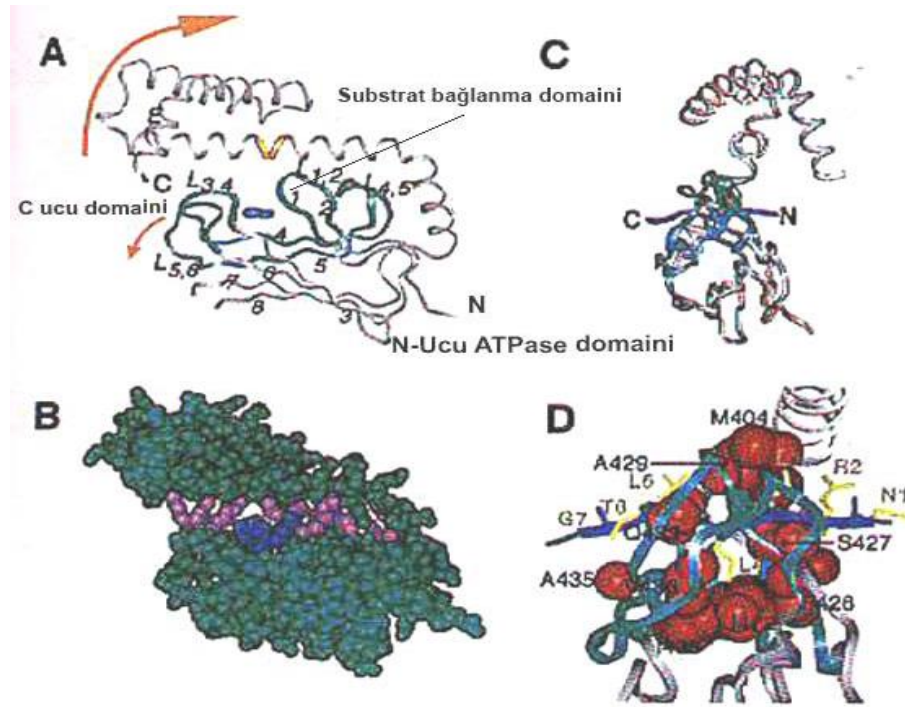
Bu bölge ATP'ye bağlanarak, ADP'ye hidrolize olmasını ve ATP'den ADP'ye dönüşüm, yapısal değişim için gerekli enerjiyi sağlamaktadır. Bu bölge yaklaşık 385 aminoasitten oluşmaktadır.

2. Substrat bağlanma domaini:

Nötral ve hidrofobik aminoasit rezidülerine yüksek afinite gösteren bu alan aracılığıyla peptidlerle etkileşim kurulması gerçekleştirilmektedir.

3. C- ucu domaini:

Bu bölge substrat bağlanma alanı için bir tür kapak görevini görmektedir. Hsp70 proteinine ATP bağlı olduğunda Cucu domaini açık olmakta, peptidler hızla proteine bağlanmakta ve ayrılmaktaiken, ADP bağlı olduğunda C- ucu domaini kapalı durumda olup peptidler substrat bağlanma alanına sıkıca tutturulmaktadır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. HSP70 proteini ve domainlerin çeşitli (A, B, C, D) moleküler gösterimi. (<http://homepages.bw.edu/~mbumbuli/cell/chaplec/index.html>)

Yeni sentezlenmiş polipeptid zincirleri, ribozomdan ayrıldıklarında HSP70 proteininin substrat bağlanma bölgesi hidrofobik amino asid rezidülerini tanıyarak etkileşime girer ve bağlanır. Bu bağlanma ve polipeptidleri salma mekanizması ATP-ADP dönüşümü yoluyla sağlanmaktadır. ADP bağlı durumdayken yeni sentezlenmiş polipeptid zincirleri, kolayca HSP70 proteini ile birleşir ve serbest kalır. Ökaryotlarda HSP40 ve prokaryotlarda *E. coli* DnaJ yardımcı şaperonu ile Hsp70 proteininin oluşturduğu yapı aracılığıyla henüz kısmi katlanmış proteinlerin çökmesini ya da yanlış katlanmalarının engellenmesi sağlanmaktadır (Hartl 1996). HSP70 proteini aynı zamanda hücreyi, sıcak veya oksidatif stresin etkilerinden de korumaktadır. Stres esnasında proteinlerin hidrofobik rezidülerine bağlanmakta, ortaya çıkabilecek denaturasyon ve çökelmeleri engelleyerek yeniden katlanmalarını yönlendirmektedir. Eddington and Hightower (1990) tavuklarda RNA northern blot analizi yoluyla, insan HSP27 proteininin cDNA klonunun spesifik olarak tanıdığı 23 kDa ağırlığında küçük sıcaklık şok proteinini saptamışlardır. Aynı araştırmacılar insan HSP27 proteininin rodent hücrelerinde sıcaklığa tolerans ile *Drosophila* gelişimi esnasında sıcaklığa termotolerans geliştirilmesinde ve

domates hücrelerinde sıcaklık şoku yanıtında görev aldığını bildirmişlerdir. Stres yaratan çevresel koşullarda proteinler, işlevsel formlarına katlanamayabilir, yanlış katlanabilir veya çökebilirler. Hücrede stres yanıtı mekanizması sıcaklık şok proteinlerinin ve proteazların artan sentezini içermekte ve hücrenin stres koşullarında hayatta kalmasına yardımcı olmaktadır.

Sıcaklık şok proteinlerine ait genlerin transkripsiyonunun uyarılması çevresel stres faktörleri gibi birçok stres sinyaline tepki olarak gerçekleşen bir yanıttır. Yalnızca stres koşullarında değil, stresin görülmediği belirli bazı durumlarda veya kimi hastalıklarda da HSP genlerinin sentezi uyarılmaktadır. Sıcaklık şok proteinlerinin koruyucu rolleri, protein hasarının engellenmesinde yardımcı olma yeteneklerinden ileri gelmektedir. Prokaryotlar ve ökaryotlarda çeşitli çevresel stres etmenleri karşısında bir ya da daha fazla Hsp'nin sentezinin artan uyarımı, hücreler ve dokuları stres esnasında moleküler şaperon etkileriyle hasardan ve apoptozisten korumaktadırlar (Jolly and Morimoto 2000; Yeğenoğlu 2007).

1.9. Isı Şoku Yanıtının Gen Düzenlenmesi

Gelişim içerisinde hücreler, stres ile karşılaştıklarında hayatta kalabilmelerini sağlayacak, stres sinyalini saptayan, izleyen ve yanıt veren bir mekanizma geliştirmek zorunda kalmışlardır. Uzun süreli stres, hücrelerin bazı etkin mekanizmaları çalıştırmalarına neden olurken, amaç proteinlerin yapısını ve biyokimyasal özelliklerini koruyarak hücreyi işlevsel bir halde tutmayı başarmaktır. Bu nedenle sıcaklık şokunda, sıcaklık şok proteinleri ve proteazların aktivitesi ile ekspresyonları protein hasarının tamir edilmesi ve hücrenin düzelmesine yardımcı olmak üzere artmaktadır (Morimoto 1998). Sıcaklık şok genlerinin transkripsiyonunun başlaması giderek artan stres sinyallerine karşı bir yanıttır. Prokaryot ve ökaryotlarda, bir ya da daha çok sıcaklık şok proteininin fazla ekspresyonu, hidrojen peroksit, ekstrem sıcaklıklar ya da etanol gibi çevresel stres uyarıcılarına karşı hücreyi korumada yeterli olmaktadır (Parsell and Lindquist 1994).

Strese karşı hücresel yanıt mekanizmasında sıcaklık şok faktörleri (heat shock factors; HSF) görev almaktadır (Pirkkala *et al.* 2001). Omurgalılar arasında saptanan HSF'lerden 1, 2 ve 4 yaygın iken, HSF 3 yalnızca kanatlı türlerinde görülmektedir. Sıcaklık şoku yanıtının gen düzenlenmesi (regulasyonu) üzerine yapılan araştırmalar sonucunda üç tip kanatlı sıcaklık şok faktör (HSF) geni olduğu belirlenmiştir (HSF1, HSF2, HSF3). HSF1 ve HSF2 genlerinin memeli genleriyle homolog oldukları fakat HSF3 geninin yeni bir sıcaklık şok faktör geni olduğu saptanmıştır (Nakai and Morimoto 1993).

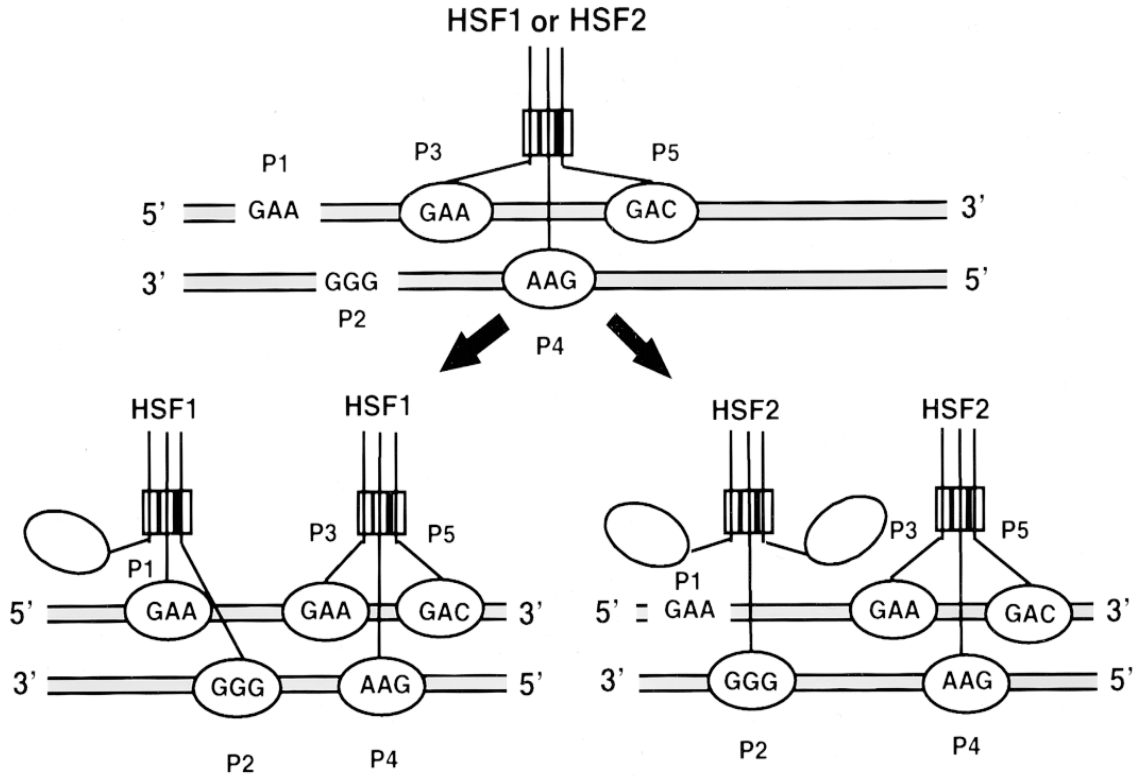
Stres uyarımlı genlerin transkripsiyonun başlaması ve diğer hücresel proteinlerin sentezinin durdurulması için HSF'lerin aktivasyonuna gereksinim vardır. HSF'ler, sıcaklık şok genlerinin karakteristik penta nükleotid 5'-nGAAn-3' dizisini taşıyan sıcaklık şok elementi (heat shock element, HSE) bölgesine bağlanarak stres uyarımlı gen ekspresyonunu başlatmaktadırlar. Sıcaklık şok faktörlerinin yapısının, helix-turn-helix DNA bağlanma domaini, trimer yapısının oluşturulması için gerekli bitişik 80 rezidümlük hidrofobik tekrar bölgesi ve C- karboksil ucu transaktivasyon domaininden oluştuğu saptanmıştır (Wishniewski *et al.* 1996; Morimoto 1998).

HSF1'in çalışması; sıcaklık şoku, oksidatif stres ya da amino asit analogları gibi doğal olmayan (non-native) proteinlerin, hücrede sentezine izin veren tüm stres koşullarında uyarılmaktadır. Sıcaklık şoku, protein sentezinin engellenmesine, yeni oluşan polipeptid zincirlerinin yanlış katlanmasına neden olmaktadır. HSF1, doğal olmayan proteinlerin varlığında gösterilen hücresel tepkide önemli rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür (Morimoto 1998; Yeğenoğlu 2007).

HSF1 ve HSF3 kanatlı hücrelerinde kimyasal ve fiziksel stres karşısında aktive olmaktadır. Yalnızca kanatlı hücrelerinde bulunan HSF3'ün stres karşısında HSF1 ile beraber eksprese olmasına karşılık düzenleme mekanizmasının bağımsız olduğu saptanmıştır (Nakai and Morimoto 1993; Nakai *et al.* 1997). Tanabe *et al.* (1998) HSF3 faktörünce eksik hücrelerde HSF1'in DNA'ya bağlanma işlevini gerçekleştirmesine rağmen sıcaklık şoku yanıtının belirgin şekilde zayıfladığını saptamıştır. Hücrelere

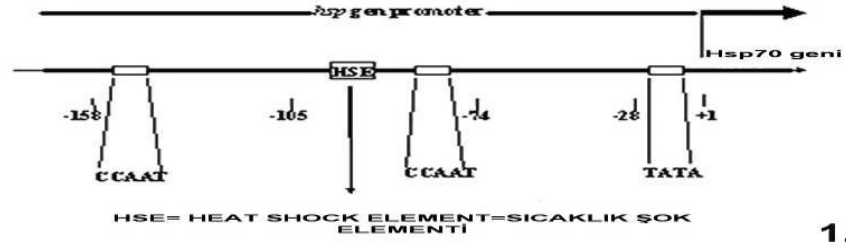
yeniden HSF3 geni yerleştirildiğinde sıcaklık şoku yanıtının düzeldiğini bildirmişlerdir. Bu da HSF3'ün kanatlı sıcaklık şoku mekanizmasında önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. Sıcaklık şok yanıtı, doğal olmayan proteinlerin hücrede belirmesi ve HSF1 proteininin aktivasyonu ile bağlantılıdır ve proteinlerin yanlış katlanmalarının önlenmesi amacıyla moleküler şaperon karakteristiği gösteren sıcaklık şok proteinlerine gereksinim duymaktadır (HSP90, HSP70 vb.). Normal koşullar altında HSF1 aktivitesi, hücrede baskılanmıştır. Hem sitozol hem de çekirdekte inert monomerik durumdadır. Sıcaklık şoku gibi stres koşullarında HSF1 üzerindeki baskı kaldırılmakta ve transkripsiyonel olarak aktif trimer oluşturmaktadır. HSP70 geninin transkripsiyonu, genin kodlama bölgesinin upstream kısmında yer alan sıcaklık şok elementi (heat shock elements; HSE) dizisine sıcaklık şok faktörünün (HSF) bağlanmasıyla başlamaktadır. Hsp genlerinin transkripsiyonu adım adım ilerleyen bir süreçtir (Morimoto, 1998). Bu aşamalar aşağıda verilmiştir (Şekil 1.2 ve Şekil 1.3).

1. HSF monomerlerinin sitoplazmadan çekirdeğe taşınması,
2. Monomerik HSF ünitelerinin trimerik forma düzenlenmesi,
3. HSF trimerinin sıcaklık şok genlerinin promoter bölgesindeki HSE'ye (heat shock element) bağlanması.
4. HSF trimerinin fosforilasyonu ile genin transkripsiyonel aktivasyonunun başlaması ve HSP70 miktarının artması.



Şekil 1.2. HSF'lerin HSE' lere bağlanması.

*nGAAn nin üç tam eşleşmesi ve Hsp70 geninin promotörü üzerinde yerlesik nGACn ve nGGGn'nin kusurlu eşleşmesi görülüyor.pozisyon 3(p3) ve 4 (p4) teki HSE'ler simetriktrir ve HSF1 ve HSF2'nin trimerlerinin tercih edilen bağlanmasidir.HSF1'in 2 molekülü sonra p1 ve p2'deki HSE'lere bağlanir fakat,HSF2 HSE'ye yalanizca p2'de bağlanir.



1.



2.



3.

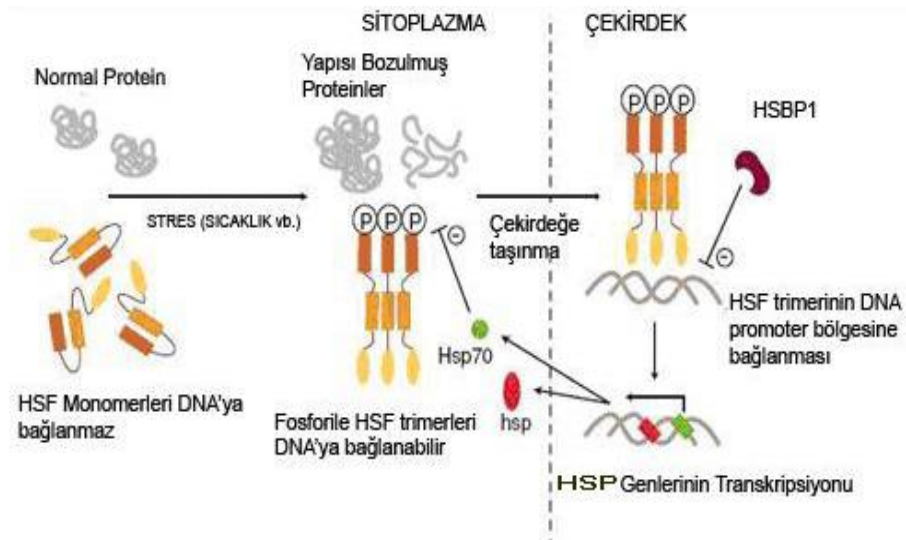


4.

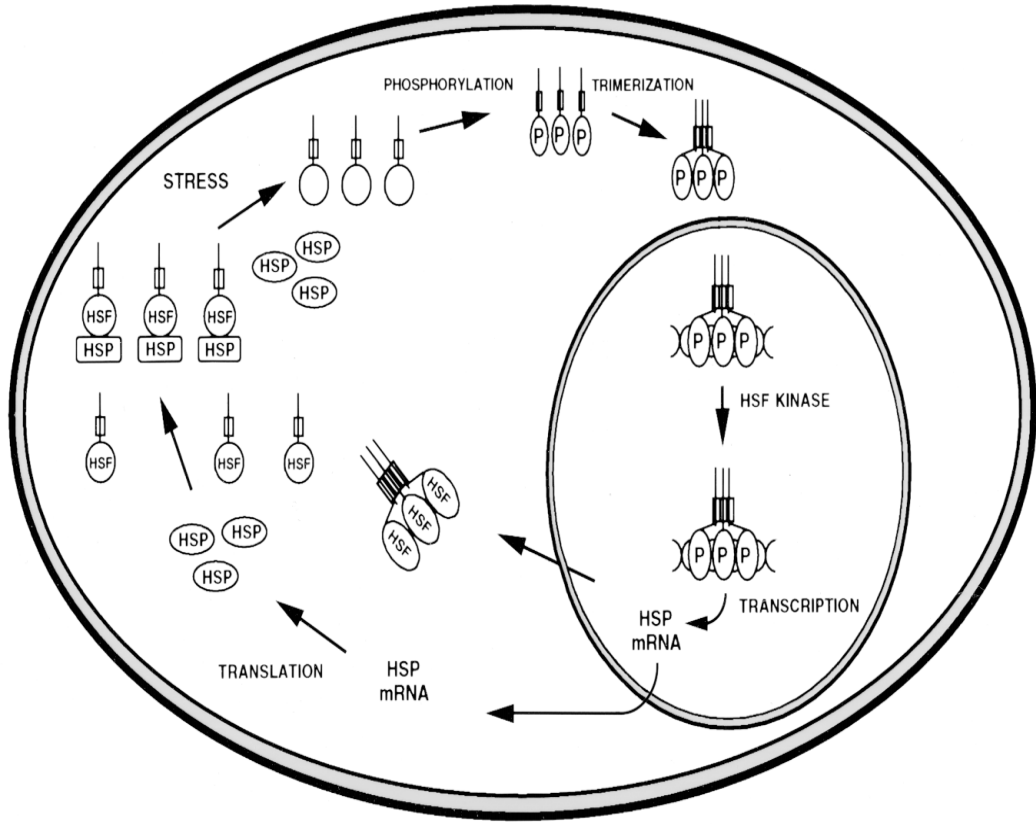
Şekil 1.3. HSF'lerin sıcaklık şok genlerinde transkripsiyonu başlatması ve sıcaklık şok genlerinin yapısı.

*1. Sıcaklık şok gen yapısı, 2. Normal çevre sıcaklığında monomerik formda HSF, 3. Sıcaklık yükseldiğinde HSF trimerizasyonu ve HSE'ye bağlanma, 4. Transkripsiyonun başlaması.

HSF hidrofobik bölgeleriyle etkileşime giren ve düzenlemede görev alan sıcaklık şok faktörü bağlanma proteini (heat shock binding protein 1, HSBP1) Satyal *et al.* (1998) tarafından saptanmıştır. Bu protein HSF1 proteininin trimerik yapısıyla ve HSP70 geni ile etkileşime girerek stres yanıtı mekanizmasında görev almaktadır. Sıcaklık şoku yanıtının azalmaya başladığı durumda ise HSF1'in transkripsiyonel aktivitesi doğrudan HSP70'in bağlanmasıyla zayıflatılıp, HSBP1 aracılığıyla negatif olarak düzenlenmektedir. HSBP1 hem HSF1 hem de HSP70 proteininin hidrofobik altılı tekrar bölgelerine bağlanarak kontrol edilmektedir. Bu şekilde trimerik formun yeniden monomerik inert forma çözülmesi aşaması tetiklenmektedir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. HSF aracılığıyla sıcaklık şok protein genlerinin aktivasyonu (<http://wwwermm.cbcu.cam.ac.uk>)



Şekil 1.5. İnsan ve Drosophila hücreleri Hsp'ler de stres indükleyici artışın ve önerilen mekanizması

*Sitozolde bulunan HSF'ler Hsp tarafından normal olarak bağlanır ve inaktiftir. ısı şoku gibi stres altında Hsp'lerden ayrılan HSFler PKC gibi protein kinazlar tarafından fosforillenir ve sitozolde Hsp geninin promotör bölgesinde HSE'lere bağlanmak için nükleusa giren trimerlesini oluşturur. Daha sonra HSF fosforillenir. Hsp mRNA'sı transkribe olur ve sitozole geçmek için nükleuzu terk eder. sitozolde yeni Hsp sentezler. HSF sitozolüne döner ve tekrar HSF tarafından bağlanır.

1.10. Apoptotik Süreçlerin Isı Şok Proteinleri Tarafından Düzenlenmesi

Isı şok proteinleri kaspaz aktivasyonunu engelleyerek apoptozisi bloke edebilirler. HSP27, HSP70, HSP60 ve HSP90'ın aşırı sentezlenmesi apoptozisi inhibe edebilir. Farklı hücre modellerinde HSP'lerin yanlış katlanmış proteinlerin birikmesini engellediği ve serbest radikaller ile DNA hasarına neden olan hücresel stres durumlarında apoptozisi inhibe ettikleri gösterilmiştir. Bunun aksine HSP27, HSP70, HSP60 ve HSP90'ın yeterli düzeyde sentezlenmemesi hücrelerin apoptotik uyarılara duyarlılığını artırır. Bazı hücrelerde HSP70 kaybı herhangi bir ek stres faktörü olmaksızın kaspaz-3 aktivasyonu ile başlatılan apoptotik süreç için yeterlidir. Böylece

HSP'ler doğrudan ya da dolaylı olarak kaspaz aktivasyonunun modülasyonu ile apoptozisde görev almaktadır. HSP'ler intrinsik ve ekstrinsik apoptotik yolları, üç noktada anahtar proteinlerle tepkimeye girerek bloke edebilir. Bu noktalar;

1. Mitokondriden önceki süreçte sinyal yollarının düzenlenmesi,
2. Mitokondride gerçekleşen apoptojenik moleküllerin salınmasının kontrolü,
3. Post mitokondriyal süreçte apoptozom oluşumunun kontrolüdür (Lanneau *et al.* 2008; Petek 2009)

1.10.1. Mitokondriyal düzeyde ısı şok proteini hedefleri

Hücre kültürlerinde HSP27'nin sitokalsin D ya da staurosporin etkisinde hücre iskeletinin bozulmasını ve mitokondriden *sitokrom c* salınımını engellediği belirlenmiştir (Paul *et al.* 2002). HSP27 aynı zamanda mitokondriden Smac salınımını da inhibe edebilir (Chauhan *et al.* 2003). HSP70 HSP40 ile eşleşerek Bax'ların mitokondri dış membranına lokalizasyonunu engeller ve mitokondri dış membran geçirgenliğini korur (Stankiewicz *et al.* 2005). HSP60 ile Bax proteinleri kompleks oluşturarak apoptozisi inhibe edebilmektedir (Ruchalski *et al.* 2006).

HSP60'ın Bax'dan ayrılması bu proteinin mitokondriye bağlanmasına neden olur ve apoptozis indüklenebilir (Kirchhoff *et al.* 2002). Tümör hücrelerinde HSP90 mitokondride TRAP molekülü ile birlikte bulunur. Mitokondride bulunan HSP90 mitokondri membran geçirgenliğini ve sitokrom *c* salınımını kontrol eder. HSP90'ın çeşitli ajanlarla inhibisyonu mitokondri membranında depolarizasyona neden olur ve doza bağımlı sitokrom *c* salınımı gözlenir. Bu durum HSP90'ın normal hücre mitokondrilerinde değil de tümör hücrelerindeki mitokondrilerde şaperon işlevlerinin kanser tedavisinde kullanılması açısından önemli olabilir (Kang *et al.* 2007). Bazı araştırmalar mast hücrelerinde Bcl2/HSP90 kompleksinin mitokondrilerden *sitokrom c* salınımını inhibe ederek kaspaz-3 aktivasyonunu engellediğini göstermiştir (Cohen-Saidon *et al.* 2006).

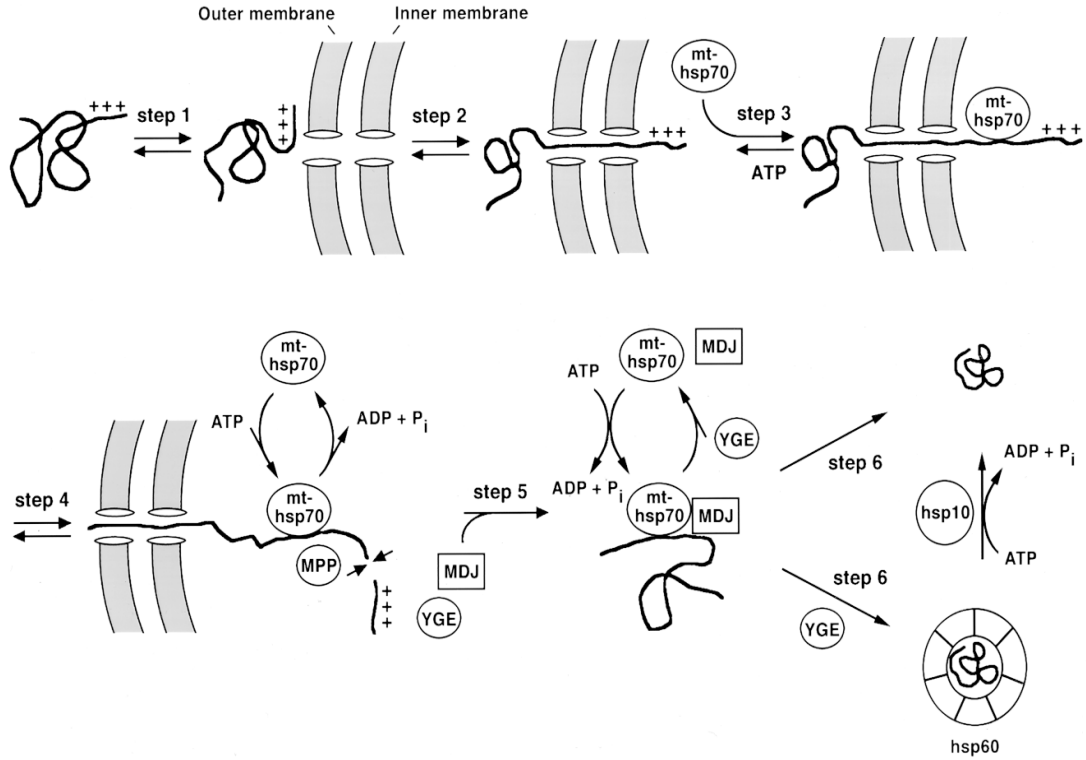
1.10.2. Post mitokondriyal düzeyde ısı şok proteinleri hedefleri

HSP27'nin mitokondriden sitosole sitokrom c salınımını engelleyerek kaspaz aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Bruey *et al.* 2000). İnsan monositlerinde apoptozis sırasında HSP27'nin aktif kaspaz-3'ü bloke ettiği belirtilmiştir (Voss *et al.* 2007). HSP27 aynı zamanda hücrede serbest radikal miktarını azaltarak ve okside proteinlerin toksik etkilerini nötralize ederek antioksidant savunmayı artırır (Rogalla *et al.* 1999). HSP27 apoptozisin son aşamalarında meydana gelen membran şişmesi gibi morfolojik değişimleri de etkileyebilir (Coleman *et al.* 2001). Aktin-miyozin sistemi membran şişmesinde kontraktıl gücü sağlar, burada Hsp27 f-aktin'nin reorganizasyonunda görev alır (Pivovarova *et al.* 2007).

HSP70'in sitokrom c salınımını inhibe ederek kaspaz-3 aktivasyonunu engellediği ve böylece apoptozisi inhibe ettiği belirlenmiştir (Li *et al.* 2000). Buna ek olarak HSP70'in Apaf-1 molekülüne doğrudan bağlanarak prokaspaz-9 ile apoptozom oluşumunu engellediği belirtilmiştir (Beere *et al.* 2000). HSP70'in ATPaz bağlanan bölgesi bu etkileşim için gereklidir (Saleh *et al.* 2000). TNF indüklü apoptoziste HSP70 kaspaz-3 aktivasyonuna engel olmaz, fakat fosfolipaz A2'nin aktivasyonu gibi hücre ölümünün karakteristiği olan morfolojik değişimlerden korur (Jaattela *et al.* 1998). Apoptozisin yıkım fazında kaspaz-3 aktivasyonunu takiben kromozomal DNA, DNAaz CAD tarafından (Kaspaz ile aktive olan DNAaz) parçalanır. Enzimatik aktivite ve CAD'ın katlanması HSP70 tarafından Hsp40 ve ICAD'ın ko-şaperon etkisiyle düzenlenir. ICAD CAD'ın inhibitörüdür (Sakahira and Nagata 2002). HSP90 Apaf-1'in işlevini negatif yönde etkiler. HSP90 Apaf-1'e doğrudan bağlanır ve prokaspaz-9 ile oligomerizasyonunu engeller (Pandey *et al.* 2000). Ara filamentlerin en önemli bileşeni olan vimentin apoptotik uyarılara yanıt olarak parçalanır. HSP90 vimentine bağlanır ve apoptotik parçalanmayı engeller (Zhang *et al.* 2006).

HSP60 ve HSP10'un proapoptotik rollerinin olduğu gösterilmiştir. HeLa ve Jurkat hücrelerinde camptothecin ya da staurosporin ile kaspaz-3 aktivasyonu mitokondriden HSP60 ve HSP10'un salınımı ile birlikte meydana gelir. Çalışmalar *in vivo* ve *in vitro*

ATP bağımlı süreçte prokaspaz-3'ün sitokrom *c* ile aktivasyonunun HSP60 ve HSP10 ile ilişkili olduğunu göstermiştir.(Şekil 1.6) (Samali *et al.* 1999; Petek 2009)



Sekil 1.6. Mitokondrial membran üzerinde katlanmamış proteinlerin geçişine katılan HSP70 tarafından yapılan işlemin şematik gösterimi protein mitokondri dış zarında reseptör komplekse bağlanır.

*(1.adım).sonra translokasyon açıklığına girer(2.adım) ilk olarak translokasyon çıkar ,protein mitokondriyal Hsp70' bağlar,ATP gerektiren bir adımdır .(3.adım) protein sinyal peptidi matiks işlemeci peptidaz (mpp) tarafından bölünür (4 adım).MDJ, YGE ve ATP hidrolizi içeren bir işlemde (5.adım) ya Hsp 70 gibi kendiliğinden katlanarak uzaklaştırılır, ya da Hsp 60'in olacılık ettiği bir işlem tarafından aktif olarak katlanır(6.adım)

1.11. Renal İskemi ve HSP

İskemi sonrası iyileşme sürecinde HSP'nin rolüne dair bir çok kanıt bulunmaktadır. (Van *et al.* 1994; Smoyer *et al.* 1998). Hücre düzeyinde olan renal iskemide hücre disfonksiyonundan hücre ölümüne kadar değişen belirgin hasarlar oluşur. Nekroz hücre ölümünün görüldüğü genellikle çabucak ortaya çıkan bir yıkım sürecidir. Apoptozis (programlanmış hücre ölümü) dikkatli bir şekilde düzenlenmiş aktif bir süreçtir. Klinik

ve deneysel akut renal hasarda apopitozis hücre ölümünün ana nedenidir (Bonegio *et al.* 1998).

Tedavi yaklaşımları açısından canlı hasarlı hücelere müdahale en önemli hedeftir. Hücre hasarı, tamir ve ölüm yolu arasında bir denge vardır. Her bir renal hücre epiteli iyileşip hayatta kalır ya da apopitozise uğrayıp ölür. Stresin uyardığı apopitoziste hasar tespit edilir. Hücre tamir mekanizmasının yardımıyla hücrede oluşan hasarın daha fazla devam etmesine izin verilmez. Renal tübül hücrelerde enerji tükendiği zaman protein-protein arasındaki etkileşimle regüle edilen spesifik moleküler yollar aracılığıyla apopitozis gerçekleşir (Bonegio *et al.* 1998). HSP, proteinlerin toplanmasına, katlanmasına, taşınmasına etki eder. Apopitotik yolların yürütülmesini ya da inhibe olmasını etkileyen önemli bir adaydır. Yeni yapılan deneysel bir çalışmada HSP'nin apopitozise karşı hücre koruyucu etkisi olduğu tespit edilmiştir (Garrido *et al.* 2001).

Enerjisi tükenmiş renal epitel hücrelerde HSP70 aracılığıyla apopitozis azalır. HSP70 mitokondride sitokrom c'nin strese bağlı salınımını baskılar. Apopitozise neden olan faktörlerin nükleer translokasyonu HSP tarafından baskılanır. Bu çalışmaların vivo sisteme taşıyan çalışma yoktur. Son yıllarda renal iskemiye takiben hücre hasarı oluştuğunda hücre iskeletinin yeniden organize olmasına Hsp'nin katkıları konusunda yapılmış *in vitro* ve *in vivo* çalışma sayısında artış bulunmaktadır. Renal iskemi veya enerji tükenmesi sonucu renal tübül hücrelerinde aktin hücre iskeleti birikiminde artma olur (Molitoris *et al.* 1992). Mikro villuslar parçalanır. Hücre-hücre ve hücre-substrat bağlantıları ayrılır. Bütün bunların sonucu olarak hücre polaritesi bozulur. Hücre polaritesi tübül hücrelerinin fonksiyon göstermesi için gayet önemlidir. Belirli yönde substrat taşınmasında hücre polaritesi önemlidir. HSP'nin hücre iskeletinin bütünlüğünü sağladığını ve hücre polaritesinin restorasyonunda yer aldığını gösteren çok sayıda deneysel kanıt vardır. Renal iskemi oluştuğunda ve hücredeki enerji azaldıkça zaman hücre stres cevabıyla HSP uyarılır. Diğer proteinlerin yapımı azalır. Örneğin Na-K adenozin trifosfat (ATP) kanalı proteinlerinin yapımı azalır. HSP'nin hasarlı ve bozulmuş proteinlerin stabilizasyonunu aktive ettiği düşünülmektedir. HSP70 açığa

çıkınca hücre iskeletinin parçasıolarak Na-K ATP'ase stabilize olur (Aufrecht *et al.* 1998).

Organizmada oluşan iskemilerden sonra HSP miktarıartar. HSP miktarının arttığı hücreler daha ağır olan stres durumlarına dirençlidirler. Tekrarlayan hücre hasarlarına direncin artması hücre koruma olarak adlandırılır. Renal iskemi durumu oluşturulduğunda HSP70'in uyarılmasıile beraber hücre iskeletinin bozulmasıda önlenir. HSP antikorlarıile stabilizasyon önlenirse hücre hasarının daha kötü olduğu tespit edilmiştir (Riordion *et al.* 2004).

İmmatür böbrekte hipoksik ve iskemik hasara karşı korunmayla bağlantılı olarak HSP70 düzeyleri yüksek bulunmuştur. Deneysel çalışmalarda immatür tübül hücrelerinde matür tübül hücrelerine göre HSF miktarınının fazla olduğu tespit edilmiştir. İmmatür hücrelerdeki yüksek HSF miktarına bağlıolarak, HSP70 yapımıartmaktadır. Bu durum immatür tübülüs hücrelerini hipoksiye karşı daha korunaklıhale getirir (Gaudio *et al.* 1998).

1.11.1. HSP ve ünilateral obstrüksiyon

Obstrüktif nefropati, iskemi ve takipeden reperfüzyon aracılığıyla hücresel ve moleküler mekanizmalarıtetikler. Birtakım dokularda iskemi stresine bağlı HSP70 sentezi uyarılmaktadır (Williams *et al.* 1993).

Sıçanlarda yapılan çalışmada ünilateral üreteral obstrüksiyon sonucu yaygın oksidatif stres cevabıgörülmüştür. Obstrükte ve kontralateral böbrekte oksidatif stresin arttığıtespit edilmiştir. Ünilateral üreteral obtrüksiyonun 7 gününde HSP70'in 3.7 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Kwei *et al.* 1998). Obstrüksiyon giderildikten 24 saat sonra HSP70 düzeyinde azalma tespit edilmiştir. 7 gün sonra ise HSP70 düzeyi kontrol grubu ile eşit düzeye inmiştir. Kontralateral böbrekte HSP70 düzeyleri kontrol grubu ile deneyin her aşamasında paralellik göstermiştir. Sonuç olarak oksidatif stres ünilateral obstrüksiyon sonrasibilateral görülür iken HSP70 pozitifliği yalnızca

obstrükte böbrekte tespit edilmiştir. Ünilateral obstrüksiyonda HSP70 cevabı, spesifik ve lokalize oksidatif strese bağlı oluşmaktadı denilebilir (Kwei *et al.* 1998).

1.12. Isı Şok Proteinleri ve Homeostazis

Isı şok proteinleri yalnızca proteinlerin tekrar katlanması ya da yanlış katlanmış, denatüre olmuş proteinlerin eliminasyonlarına yardımcı olmaz, aynı zamanda birçok açıdan hücresel yaşamda kritik rolü olan çok sayıda hücresel proteinin sentezlenmesini sağlar. Hücresel homeostazın sağlanmasında HSP'lerin çok sayıda rolü bulunmaktadır (Sreedhar and Csermely 2004).

1.12.1. Redoks homeostazında ısı şok proteinlerinin rolü

Oksidatif stres apoptotik süreç için önemli bir sinyaldir. Hücresel redoks durumunda meydana gelen değişimler farklı apoptotik yolları düzenlemek için etkili bir yoldur. HSF-1 geni çıkarılan farelerin oksidatif strese daha duyarlı oldukları belirlenmiştir (Yan *et al.* 2002). Hsp'ler hücresel redoks durumunun korunmasında antioksidant olarak görev yaparlar. Hem oksijenaz, bilirubin ve biliverdin antioksidantların üretiminden sorumlu bir Hsp'dir. Hsp70'in oksidatif stres koşullarında peptid kompleks stabilitesi ve peptid bağlanma yeteneğinin artırılmasını sağladığı bilinmektedir. Hücrede redoks durumu HSP70 sentezini etkiler. Böylece azalmış GSH düzeyi HSF-1'in doğrudan aktivasyonuna neden olabilir. Bunun aksine güçlü oksitleyici ajanlar DNA'ya bağlanma yeteneğini engelleyerek HSF-1'in trimerizasyonunu inhibe ederler. Sonuç olarak redoks homeostazında orta düzeydeki bir değişim HSF-1'in aktivasyonuna neden olurken, redoks homeostazında büyük değişimler HSF-1'i inhibe etmektedir (Sreedhar and Csermely 2004).

1.13. Stres Cevabının Özellikleri

Stres proteinlerinin fizyolojik fonksiyonları, hücre ısı şokuna maruz kaldığında daha önemli hale gelir. Stres proteinleri, ısı şoku altında oligomerik komplekslerin

ayrılmasını ve polipeptitlerin açılmasını önler. Tekrar katlanma imkansız hale gelmişse, denature olmuş proteinlerin atılmasını hızlandırır. Diğer taraftan hücre içinde denatüre proteinlerin varlığı stres proteinlerinin yapımını uyarır. Mikrobiyal patojenler, konakçı fagositlerinin yarattığı stresten kendilerini korumak için, stres proteinlerinin sentezini hızlandırırlar. Hücre içi patojen olan Salmonella, önceden hidrojen peroksit ile muamele edilirse stres proteinlerinin sentezi artar ve bu durum onu daha yüksek öldürücü dozdaki hidrojen peroksit etkisinden korur. Genel olarak, yüksek dozda stres proteinleri üreten mutantların, ısı ve oksiden ajanlara ileri derecede dirençli olduğunu, buna karşılık stres proteinlerine ait genlerinde bozukluklar olan mutantların ise aktif makrofajların öldürücü etkisine ileri derecede hassasiyet gösterdikleri tespit edilmiştir (Zuhal 2009).

1.14. Kantitatif Real-Time PCR Yöntemi

Bilim ve tıp alanındaki çalışmalar, nükleik asit miktarı belirleme analizleri içerisinde en etkili tekniği sunmayı başarmıştır: Real-time PCR tekniği. Bu teknik seksenli yılların ortasında Kary Mullis ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilen PCR'ın ileri bir versiyonudur. Klasik PCR ile çok karmaşık bir örnekten herhangi bir nükleik asit dizisini analiz etmek için çok sayıda döngüsel işlemle istenilen miktarda çoğaltmak mümkündür. Ancak bu işlem tek başına matematiksel olarak ürün miktarı hakkında bilgi sağlamamakla birlikte sonrasında ürün miktarını net olarak belirlemek de oldukça güçtür. Çünkü klasik PCR, başlangıçta var olan DNA miktarından bağımsız olarak bir ürün miktarı ortaya çıkarır. Higuchi ve arkadaşları 1992 yılında Real-Time PCR' ı geliştirmişlerdir. Real-Time PCR tekniği ile DNA dizileri eş zamanlı olarak çoğaltılmış ve belirlenebilmiş, reaksiyon süreci boyunca, oluşan ürünün miktarını Real-time PCR sırasında gözlemek mümkün olmuştur. Amplifikasyonun her basamağını takip edilebilmesi, Real-time PCR'ı özel kılan en önemli özelliğidir. Amplifikasyon eğrileri üzerinden tüm amplifikasyon profili gözlenebilmektedir. Bu imkân reaksiyon için kullanılan primerler ve hedefe özgü flöresan işaretli probalar ile sağlanır (Wilhelm *et al.* 2003; Kubista *et al.* 2006).

1.14.1. Kantitatif real-time PCR metodları

Mutlak kantifikasyon (Absolute Quantification): Hedefin konsantrasyonu mutlak değerler olarak ifade edilir. Mutlak kantifikasyon konsantrasyonları önceden bilinen seri olarak dilüe edilmiş eksternal standartların kullanımıyla oluşturulan standart bir eğri yardımıyla yapılır. Konsantrasyonları bilinmeyen örneklerin konsantrasyonlarının belirlenmesi crossing points (Cp) değerlerinin belirlenmesi ile sağlanır. (Cp değeri, PCR içindeki her bir eğriye ait PCR ürünü miktarını gösterdiği varsayılan, bir örneğin PCR amplifikasyonuna başladığı noktayı ifade eder).

Rölatif kantifikasyon (Relative Quantification): Hedefin konsantrasyonu hedefin belli bir referansa oranı olarak ifade edilir. Bu metot ile hedef ve referans genin konsantrasyonlarını belirleyebilmek için her ikisine ait standart eğrilerin kullanımına ihtiyaç duyulur (Vert and Kenneth 2004).

1.14.2. Real-Time PCR için kullanılan problemler

Tüm Real-Time PCR sistemleri, reaksiyondaki PCR ürünü miktarı ile sistem içerisinde kullanılan belirleyici bir flöresan boyadan alınan boya miktarı arasındaki orantı esasına dayalı olarak çalışır. Flöresan boya miktarının ölçümü esasına dayanan bu sistemlerde belli bir diziye bağlı kalmadan tüm çift iplikli DNA molekülüne bağlanan flöresan boyalar ya da belirlenmiş bir PCR ürünü üzerindeki spesifik bir diziye bağlanabilen oligonükleotit hibridizasyon problemleri kullanılır (Vert and Kenneth 2004).

Dizi spesifik olmayan flöresan boyalar: Bu tip boyalar çift iplikli DNA'nın tamamına bağlanabilme özelliği taşıyan etidyum bromid benzeri boyalardır. Real-Time PCR sistemlerinde kullanılan boya SYBR Green I'dir. SYBR Green I, onun emisyon özelliğini önemli ölçüde arttıran bir solüsyon içerisinde bulunduğunda DNA molekülüne bağlanır. PCR boyunca amplifiye olan ürün miktarı ile doğru orantılı olarak SYBR Green I'in sinyali artacaktır (Vert and Kenneth 2004).

Dizi spesifik flörsan problar: Oldukça yüksek hassasiyete sahip floroforlar ile işaretli dizi spesifik problemlerdir. Reaksiyon içerisinde sadece spesifik hedef mevcut ise flörsan artışı gözlenir. Bu reaksiyonlarda ürünün belirlenmesi için melting curve analizine genellikle ihtiyaç duyulmaz. Bu hassas dizi spesifikliğinden dolayı primer dimerleri gibi ürünlere bağlı ekstra görüntüler elde edilmeyecektir. Buna rağmen reaksiyon sırasında bu tip görüntülerle karşılaşılabilen ve bu durum PCR hassasiyetini ve verimliliğini düşürmektedir. Dizi spesifik flörsan problemler de yapılmak istenen çalışmaya göre çeşitlilik gösterir (Vert and Kenneth 2004).

Simple Probe Format: Tek işaretli problemler, mutasyon ve tek nükleotit polimorfizmlerinin (SNP) taranmasında kullanılan, basitçe dizayn edilmiş hibridizasyon problemlerinin özel bir tipidir. ‘Simple Probe Format’ olarak adlandırılan bu problemler, sadece bir floroforla işaretlenmiş ve sadece bir hibridizasyon probuna ihtiyaç duyan dizi spesifik problemlerdir. Bir prob, SNP’yi içeren hedef diziyi hibridize olacak şekilde spesifik olarak dizayn edilir. Hedef diziyi bir kez hibridize olmasıyla, hibridizasyon olmadığı durumda Simple Probe prob çok miktarda flörsan emer. Bu problemler, flörsan miktarındaki değişikliklerin, sadece probun hibridizasyon düzeyine göre belirleme prensibine göre dizayn edilir (Vert and Kenneth 2004).

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) ile dizi spesifik prob kullanımı: Çoğu dizi spesifik prob formatları “FRET” olarak adlandırılan teknolojiye dayalı olarak dizayn edilir. FRET, flörsan ile işaretli bir molekülün enerjisinin, bir diğer komşu flörsan moleküle aktarılması prensibine dayanır. FRET için sağlanması gereken temel koşullar vardır. Verici (donor) ve alıcı (acceptor) moleküller birbirlerine oldukça yakın konumlanmalıdır, alıcının uyarım spektrumu, vericinin yayılım spektrumu örtüşmelidir, alıcının ve vericinin dipol yerleşimi neredeyse paralel olmalıdır (Vert and Kenneth 2004).

Hibridizasyon Probe Format: Hibridizasyon prob formatı özel olarak dizayn edilmiş iki oligonükleotit dizisi kullanır. Yakın pozisyonda hibridize olan bu oligonükleotitler, PCR’ın bağlanma basamağı boyunca amplifiye olan fragmenti içerisindeki dizilerdir.

Verici probun 3' ucu flöresein gibi flörasan bir boya ile, alıcı probun 5'ucu ise florofor gibi farklı bir flörasan boya ile işaretlenir. İki oligonükleotit PCR'ın bağlanma basamağı sırasında hedef üzerinde yer alan komşu bölgelere bağlandığı zaman bu işaretler birbirlerine yakın konumlanır. FRET'in oluşması ancak böyle bir yerleşimle mümkün olmaktadır. Birinci prob üzerindeki verici boyanın enerjisi ikinci hibrid prob üzerindeki alıcı boyayı uyarır. Bunu takiben farklı dalga boylarında flörasan ışık salınımı gerçekleşir ve Real-Time PCR sistemi bu salınan ışık miktarını belirler. Salınan bu flörasan miktarı PCR boyunca oluşan hedef DNA miktarı ile orantılıdır. Hibridizasyon prob formatı kantifikasyon için, melting curve çalışmalarında, mutasyon saptama ve SNP analizleri için uygundur (Vert and Kenneth 2004).

Hydrolysis Probes (TaqMan): Bu problemlerin kullanımında Taq Polimeraz'ın 5'→3' aktivitesinden faydalanılır. Taq Polimeraz'ın 5'→3' aktivitesi ile hidroliz problemleri hidrolize olduğu zaman problemler flörasan yayılımı yapar. Bu yöntem, spesifik hedef DNA dizisinin artışı belirleyen 3'yönünde uzama yapmayan tek bir problemin bağlanmasını kullanır. Bu tek prob flörasan özelliğe sahip hem raportör (reporter) hem söndürücü (quencher) özellikte boyaya sahiptir. Söndürücü boya, raportör boyaya, raportör boyanın flörasan sinyalini baskılayabilecek kadar yakın konumlanmıştır. PCR boyunca polimerazın 5'nükleaz aktivitesi probu keser, raportör ile söndürücü ayrılır ve raportör boyanın flörasan salınımına izin verir. PCR ürününün artışı söndürücü boyanın artışı ile direkt olarak izlenebilir. TaqMan PCR yönteminde amplifikasyon sonrası tüm problemler parçalanması melting curve analizine izin vermez. Bu sebeple bu tip çalışmalar mutasyon ve SNP taraması için farklı deneysel yöntemlere ihtiyaç duyar (Roche 2004). Kantitatif Real-Time PCR teknolojisi, gen düzeyinin ölçümünde rutin olarak kullanılan, uygulaması kolay, kesin sonuçlar veren, hassasiyeti iyi olan bir uygulamadır. Farklı dilüsyon oranlarında hazırlanmış standart eğrilerin kullanımı ile örnekler ve deneyler arasında karşılaştırma imkânı sağlayan, internal standartlar yardımı ile başlangıç miktarı farklılığından kaynaklanacak problemlere son veren yüksek verimde sonuçlar sağlamaktadır. Pek çok uygulaması kanser araştırmaları için fırsat yaratmış olmasıyla birlikte, tümör davranışıyla ilgili araştırmacıya ve klinisyne büyük ölçüde bilgi sağlamaktadır (Mocellin *et al.* 2003; Derya 2007).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Williams *et al.* (1996) metal kontaminasyonuna maruz kalan gökkuşağı alabalığının solungaçlarında HSP70'in birikim yaptığını, ağaç endüstri atıkları, SDS (sodyum dodecylsülfat), BNF (β -naphthoflavone) ve ağır metal gibi kirleticilerin çalışılan balık dokularında Hsp70 seviyesini yükselttiğini bildirmiştir. Benzer bir çalışma olarak Vijayan *et al.* (1998) ağaç endüstri atıkları ve SDS'nin subletal konsantrasyonlarının 96 saatte karaciğerde total HSP70 seviyesini önemli bir şekilde artırdığını bildirmiştir. Bakırın değişik konsantrasyonlarına (0, 25, 50, 100 ve 200 μ M) maruz bırakılan gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nin karaciğer dokusunda HSP70 ekspresyonuna bakılmış ve uygulanan doza bağlı olarak arttığı rapor edilmiştir (Feng *et al.* 2003). Benzer bir çalışma olarak Boone and Vijayan (2002); bakır, kadmiyum ve arsenite maruz bıraktıkları aynı balık türünün karaciğer dokusunda HSP70'i 3-6 kat yükselttiğini, fakat hsc70 (HSP70 ailesini oluşturan üyelerden biri ekspresyonunda herhangi bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir.

Ağır metallerin subletal dozlarının *in vitro* ve *in vivo* ortamda denendiği pek çok organizmada HSPs'yi indüklediği bilinmektedir (Dilworth and Timbrell 1998). Pasifik salmonu (*Oncorhynchus kisutch*) ile yapılan bir çalışmada çinko ve sıcaklığın birlikte kombinasyonu ile HSP ekspresyonu üzerindeki etkisine bakılmış. Balıklara değişik rasyonlar hazırlanmış (düşük sıcaklık çinkosuz diyet, yüksek sıcaklık çinkolu diyet, düşük sıcaklık çinkolu diyet ve yüksek sıcaklık çinkosuz diyet) ve yüksek sıcaklıkta yüksek düzeyde çinko içeren diyetle beslenen balıkların karaciğerinde HSP70 seviyesinin düştüğünü western blot yöntemi ile belirlenmiştir (Bowen *et al.* 2006). Benzer bir çalışma olarak Varó *et al.* (2001) chlorpyrifos denen bir pestisiti besin zinciri yoluyla medeka balığı (*Aphanius iberus*)'na vererek HSP70 seviyesindeki değişime bakmışlar. Çalışmada artemialar bu pestisite maruz bırakılmış ve Medeka balıklarına 32 gün boyunca yoğunluğu 6,5-14 ng/g olan diyetler halinde verilmiş sonuçta HSP70 seviyesinde ciddi düzeyde artış gözlemlenmiştir (Alak 2007).

HSP sentezi ve termotolerans arasındaki moleküler ilişki pek çok araştırmacı tarafından incelenmiştir (Bone and Vijayan 2001; Mao 2005; Bowen *et al.* 2006; Elicker and Hutson 2007). Su ortamında tarımsal kimyasalların (pestisitler) ve ağır metallerin birikmesi, sıcaklık, pH, çözülmüş oksijen gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değişmesi, sucul organizmalarda hücresel strese neden olmakta ve organizmaların bu etkenlere karşı fizyolojik tepki olarak stres proteinleri ürettikleri görülmektedir.

Çevre sıcaklığı ve beden arasındaki ilişkileri bakımından omurgalı hayvanlar, sıcakkanlı (homoeterm, endoterm) ya da soğukkanlı (poikiloterm, ektoderm) olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Sıcakkanlı hayvanlarda vücut sıcaklığının çevre sıcaklığına göre ayarlanması (termoregulasyon) hipotalamustaki sıcaklık denetim merkezlerince gerçekleştirilmektedir. Bu merkezler bedende ısıнын korunması veya salınması işlemlerini yönlendirerek sıcakkanlı canlılarda vücut sıcaklığının sabit bir değerde kalmasını sağlamaktadırlar (Yaman 1996; Yeğenoğlu 2007).

Canlıların, en az eforla normal fizyolojik işlevlerini yerine getirdiği çevre sıcaklığı aralığına “termal nötral bölge” ya da “konfor bölgesi” adı verilmektedir. Çevre sıcaklığı termal nötral bölge değerlerinin üst sınırını aştığında canlılarda vücut sıcaklığı ve vücuttan atılan ısı arasındaki dengenin bozulmasıyla ortaya çıkan duruma “sıcak stresi” adı verilmektedir. (Etches *et al.* 1995).

In-vitro ortamda hücreler, ölümcül olmayan sıcaklık şokuna maruz bırakıldıklarında, ileride görülebilecek öldürücü sıcak stresine karşı dayanıklılık kazanmaktadırlar. Organizmalarda da doğrudan bir ekstrem çevre sıcaklığı ile karşılaşmak yoğun bir hücre hasarı ve ölüme neden olmaktadır. Bununla beraber organizma önceden ılımlı bir yüksek sıcaklığa maruz kalırsa, ilerideki yaşlarda karşılaştığı ekstrem sıcaklık değerlerine karşı daha dayanıklı olmaktadır. Bu olguya, “kazanılmış termotolerans (acquired thermotolerance)” ve organizmaların önceden ılımlı bir sıcak stresine maruz bırakılmasına “sıcaklığa alıştırma (heat acclimatization, conditioning)” adı verilmektedir (Feder and Hoffmann 1999; Ohtsuka and Suzuki 2000; Sorensen *et al.* 2003; Yeğenoğlu 2007).

Birçok memeli hücre hatlarında termotoleransın gelişmesi ve bozulması, HSP70 proteinin birikimi ve yarı ömrü ile ilişkilidir (Li and Duncan 1995). Laboratuvar koşullarında yapılan çalışmalarda, sıcaklık şok proteini genlerinden yoksun, dolayısıyla söz konusu protein ekspresyonunun olmadığı hücrelerin, sıcaklık şok proteini eksprese eden hücrelere göre strese daha az tolerans gösterdiği, uyarılan termal tolerans derecesinin Hsp'lerin ekspresyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Krebs and Bettencourt 1999; Solomon *et al.* 1991'den; Yeğenoğlu 2007).

Ehrenfried *et al.* (1996), kalorik kısıtlamanın yaşlı ve genç farelerin bağırsaklarında HSP70 mRNA seviyesini nasıl etkilediğini northern blot analiz metodu ile incelemişlerdir. Araştırma sonucunda kalorik kısıtlamanın bağırsaklarda HSP70 gen ekspresyonunu artırdığını ve hücre içi bu artışın bağırsaklarda yararlı bir etkiye (örneğin kanseri geciktirmesi gibi) sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Ekspresyonunda doza bağlı olarak özellikle kadmiyum toksisitesinde artış gözlenirken çinko uygulamasında herhangi bir etki belirlenememiştir. Her iki metal birlikte uygulandığında ise HSP70 ekspresyonu maksimum seviyeye ulaşmıştır. Sanders *et al.* (1991) bakır toksisitesinin mavi midye (*Mytilus edulis*)'de Hsp60 seviyesini yükselttiğini rapor etmişlerdir. Bakır hücresel fonksiyonlarda bazı enzimlerin yapısında yer alan bir iz element olmakla birlikte hücre içi seviyesi arttığında ya direkt enzim denatürasyonu ile ya da indirekt olarak reaktif oksijen türlerinin ortaya çıkması ile toksik hale gelmektedir (Pourahmad and O'Brien 2000). La Porte (2005) arseniğin 100 µg l-1 lik miktarının midye (*Mytilus trossulus*) HSP70 seviyesini etkilemezken 1000 µg l-1 konsantrasyonunun HSP70 seviyesinde değişime neden olduğunu bildirmiştir. Kadmiyuma maruz bırakılan Asya deniz tarağı (*Potamocorbula amurensis*)'nda HSP70 ve HSP76'nın sentezlendiği ve HSP70 miktarının daha fazla olduğu bildirilmiştir (Wernerand Hinton 1999; Alak 2007).

İki farklı kadmiyum (Cd) derişiminin etkisindeki *Gobius niger*'de karaciğerde ve testis dokusunda HSP70 mRNA miktarının ve testis dokusunda kaspaz-3 mRNA miktarının derişime bağlı olarak arttığı bildirilmiştir. Kaspaz-3 ekspresyonu ile birlikte

HSP70 ekspresyonundaki artışın testislerde apoptotik süreçlerin varlığını gösterdiği bildirilmektedir (Migliarini *et al.* 2005; Piner 2009).

Gastrik intubasyonla aflatoksin B1 uygulanan sıçanlarda kaspaz-3 aktivitesi ve HSP70 miktarı önemli düzeylerde artış göstermektedir. Artan kaspaz-aktivitesinin artan lipid peroksidasyonu ve azalan GSH miktarları ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Aynı zamanda artan kaspaz-3 aktivitesinin artan HSP70 miktarı ile de ilişkili olduğu bulunmuştur. Aflatoksinin indüklediği oksidatif strese bağlı olarak meydana gelen GSH azalmasının, apoptozisin ve HSP artışının indüklenmesinde rol oynayabileceği gösterilmiştir (Meki *et al.* 2004; Piner 2009).

İlımlı iskemi-reperfüzyon koşullarında sıçanda karaciğerde HSP70 ekspresyonunun çalışılan tüm sürelerde önemli derecede arttığı ve kısa süreli iskemi sonrasında kaspaz-3 aktivitesinin baskılandığı bulunmuştur. HSP70'in kaspaz-3 aktivasyonunu inhibe ederek apoptozisi engellediği bildirilmektedir (Sakai *et al.* 2003).

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Sıçanların temin edildiği yer

Erkek *Rattus Norvegicus* türünün Sprague-Dawley ırkı sıçanlar Atatürk Üniversitesi (Erzurum, Türkiye), Deneysel Tıbbi Uygulama ve Araştırma Merkezinde temin edilmiştir.

3.1.2. Çalışmanın yürütüldüğü yer

Çalışmalar, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Genetik Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1.3. Sıçanların bakımı

Bu deneyde kullanılan Sıçanlar kontrollü bir sıcaklıkta ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) ve nemlilikte (%40-60) ve İstenildiği ölçüde besin ve su verilerek düzenli 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık olan bir odada barındırıldı. sıçanlar en az bir hafta, deneye başlamadan önce deiyonize su ile alışma periyoduna bırakıldı. 100 gün boyunca hayvanlar günlük deiyonize edilmiş su ile metal karışımına maruz bırakıldı. İlk haftadan sonraki haftalarda her grup kendi beslenme konsantrasyonuna getirilene kadar suyun iyon konsantrasyonu düzenli olarak artırıldı.

3.1.4. Sıçanların beslenmesi

Yapılan bu deneyde 5 rat grubu kullanıldı. Kontrol olarak kullanılan ilk gruba sadece deiyonize edilmiş su verildi. Temel doz grubuna (1X; 3 ppm) demir konsantrasyonu ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) şeklinde verildi. Diğer iki gruba temel grubun 10 (30

ppm) ve 100 (300 ppm) katı kadar verildi. Bir başka sıçan grubuna WHO (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından belirlenen maksimum olması gereken sınırlara eşdeğer konsantrasyonlarda demir bileşiği verildi. Hiçbir hayvan ölmedi ve görülebilen toksik işaretlerin hiçbiri görülmedi.

Çizelge 3.1. Sıçan gruplarına verilen ppm cinsinden demir iyonunun konsantrasyonları ve beslenme süreleri

Hafta	Ppm				
	Kontrol (3) 0	MPL (3) 0.87	1X (3) 3	10X (3) 30	100X (3) 300
0.	DIW	DIW	DIW	DIW	DIW
1.	DIW	MPL	MPL	MPL	MPL
2.	DIW	MPL	1X	1X	1X
3.	DIW	MPL	1X	10X	10X
4.	DIW	MPL	1X	10X	100X
5.	DIW	MPL	1X	10X	100X
6.	DIW	MPL	1X	10X	100X
7.	DIW	MPL	1X	10X	100X
8.	DIW	MPL	1X	10X	100X
9.	DIW	MPL	1X	10X	100X
10.	DIW	MPL	1X	10X	100X
11.	DIW	MPL	1X	10X	100X
12.	Kesim	MPL	1X	10X	100X
13.		Kesim	1X	10X	100X
14.			Kesim	10X	100X
15.				Kesim	100X
16.					Kesim

3.1.5. Primerler

Gen materyali olarak RNA, primer olarak ise hspa1a, hspa4, hspa5, hsp90aa1 kullanılmıştır. İnternet ortamındaki gen bankasından (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) rat ait HSP70 ve HSP90 genine aitsırasıyla NM 031971, NM 153629, NM 013083, NM 17576102 kod numaralı mRNA verileri ışığında baz dizilimleri değerlendirmeye alınmış ve yine internet ortamındaki başka bir primer dizayn programı (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi/) kullanılarak genlerin maksimum 1000 bp lik kısmına spesifik primerler oluşturulmuştur. Oluşturulan

primerlerin ilgili bölgeye spesifiklikleri (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) kullanılarak kontrol edilmiştir.

Çizelge 3.2. Genlerin spesifik forward ve revers primerleri

hspa1a	Forward Primer	5' ACGCTGGCTGAGAAAGAGG 3'
hspa1a	Reverse Primer	5' ATCCACCTCCTCGATGGTG 3'
hspa1a	Tagman	FAM-TGCACAAGCGGGAGGAGCTG-TAMRA
hspa4	Forward Primer	5' TGCTTGGAAGGCTGAGTGG 3'
hspa4	Reverse Primer	5' TGGGAATAGAGGGCAATGAG 3'
hspa4	Tagman	FAM-TGGGACTGTGGGGCTGGTGC-TAMRA
hspa5	Forward Primer	5' ATTCCTGCGTCGGTGTATTC 3'
hspa5	Reverse Primer	5' TGGACGTGAGTTGGTTCTTG 3'
hspa5	Tagman	FAM-ACGATCAGGGCAACCGCATC-TAMRA
hsp90aa1	Forward Primer	5' CGAGAGCTTGACCGACCCTAG 3'
hsp90aa1	Reverse Primer	5' ATTCCAATGCCAGTATCCAC 3'
hsp90aa1	Tagman	FAM-TGGACTCGGGGAAGGAGCTGC-TAMRA

3.1.6. Kullanılan kimyasal maddeler

3.1.6.a. RNA izolasyonunda kullanılan kimyasal maddeler

RNA Ekstraksiyonunda; trizol, kloroform, izopropil alkol, %70'lik etanol, DPEC (Dietil pirokarbonat) kullanılmıştır.

3.1.6.b. Elektrophorezde kullanılan kimyasal maddeler

Elektrophorezde; agaroz, EtBr (10mg/ml), TBE tamponu (0.89 M Tris, pH=8.3; 0.02 M EDTA, Tris- Borik asit- EDTA), MOPS (morpholinopropanesulphonic acid), DNA işaretleyici (50 bç-2.000 bç) ve yükleme tamponu (BFB; Brom Fenol Blue) kullanılmıştır.

3.1.6.c. PCR’da kullanılan kimyasal maddeler

PCR uygulamalarında; Taq DNA polimeraz, 10 mM dNTP mix, PCR tamponu, 25 mM MgCl₂, DMSO (Dimetilsülfoksit) ve dH₂O (deiyonize su) kullanılmıştır.

3.1.6.d. cDNA kütüphanesinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler

0.1 M DTT (500 µL), 5x First Strand Buffer (1 mL), Oligo dT23 (0.1 mL), dNTP , 10x reaksiyon buffer, amplifikasyon grade DNase I (1 unit/µL), super script III RT (200 unit/µL), stop solüsyonu, dH₂O.

3.1.7. Deney aşamalarında kullanılan aletler

Laboratuarda yapılan işlemler sırasında; PCR, UV görüntüleme sistemi, elektroforez, mikrodalga fırın, otoklav, derin dondurucu, -80 buzdolabı, santrifüj, mikrosantrifüj, çeker ocak, saf su cihazı, su trompu, elektronik terazi (0.001g-320g), vorteks, pH metre, otomatik pipetler, PCR tüpleri, plastik tüp, cerrahi makas, pensetler, pensler, bisturi ve değişik ebatlarda cam malzemeler (beher, erlenmayer, ölçü silindiri vs.) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Sıvı azotla RNA izolasyonu

1. 0.3 gr doku tartılıp küçük parçalara ayrılır ve sıvı azotla parçalanır.
2. Toz haline getirilen dokudan 100 mg tartılıp temiz ve soğuk bir ependorfa alınır ve üzerine 1 ml Trizol eklenip karıştırılır.
3. 12000 g’de 10 dk +4°C’de santrifüj edilir.
4. Süpernatant yeni tüpe alınır (900 µl) 5 dk buz üzerinde bekletilip üzerine 200 ul kloroform eklenir ve kuvvetlice karıştırılır. 2 dk buzda bekletilir.
5. 12000 g’de 15 dk +4°C’de santrifüj edilir. Süpernatant yeni tüpe alınır.

6. Süpernatant üzerine 500 µl soğuk izopropanol eklenip ters yüz edilir ve 10 dk buz üzerinde bekletilir.
7. 12000 g'de 10 dk +4°C'de santrifüj edilir. Süpernatant uzaklaştırılır.
8. Dipte kalan pellet üzerine 1 ml soğuk saf etanol ilave edilir ve kısa süreli vortekslenir.
9. 9000 g'de 5 dk +4°C'de santrifüj edilir. Süpernatant tamamen uzaklaştırılır. (Op.; 8. basamak tekrarlanırsa daha iyi bir sonuç elde edilir)
10. Pellet 10-15 dk süresince oda sıcaklığında kurutulmaya bırakılır
11. 50 µl DEPC su içinde çözündürülür.

3.2.2. RNA' nın agaroz jel elektroforezinde kontrolü

3.2.2.a. Jelde yürütülecek RNA örneğinin hazırlanışı

1 µl izole ettiğimiz RNA'nın üzerine 3.5 µl ddH₂O, 0.5 µl 20xMOPS solisyonu ve 5 µl formamid sırasıyla ilave edilerek 65°C'de 15 dk inkübe edilmiştir.

3.2.2.b. Jelin hazırlanışı

1.88 ml 20xMOPS solüsyonuna 0.3 gr agaroz, 28.5 ml ddH₂O sırasıyla konulup kaynatılmıştır. 37°C'ye kadar soğuyunca 6.68 µl formamid eklenmiştir. Hemen ardından 5.5 µl etidium bromür eklenip jel donmaya bırakılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.3. RNA için Agaroz Jel Elektroforezinin Hazırlanışı

Jelde yürütülecek RNA örneğinin hazırlanışı	Jelin hazırlanışı	Küvet solüsyonu
RNA+ ddH ₂ O= 4.5 µl ↓ (1µl RNA + 3.5 µl ddH ₂ O) ↓ 0.5 µl 20xMOPS solüsyonu ↓ 5 µl formamid ↓ 65 °C’de 15 dk inkübe et	1.88 ml 20 x MOPS solüsyonu 0.3 gr Agaroz 28.5 ml ddH ₂ O Kaynat ↓ 37 °C’ye kadar soğuyunca ↓ 6.68 µl Formamid ekle Hemen ardından 5.5 µl Etidium bromür ekle Jeli donmaya bırak	1xMOPS solüsyonu kullanılır.

3.2.2.c. Elektroforez işlemi

Yüklemeye hazır hale getirilen RNA örnekleri 6X yükleme boyasıyla karıştırılmıştır. Bu karışımdan alınan 7 µl jelde oluşturulan kuyulara ayrı ayrı yüklenmiştir. Yükleme bittikten sonra 60 V’ta 30 dk elektrik akımı uygulanmış, daha sonra jel UV altında gözlemlenerek kalitatif analiz yapılmıştır.

3.2.3. cDNA sentezi

cDNA sentezi moleküler biyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan ters transkriptaz enzimi ile yapılmıştır. Saklanan ve miktar tayini yapılan mRNA örnekleri First Strand cDNA synthesis System for qPCR (Invitrogen) ile cDNA haline getirilmiştir.

Uygulama şu şekilde yapılmıştır;

1. RT reaksiyon karışımı aşağıdaki içeriğe göre toplamda 20 µl olacak şekilde hazırlanır;

4 µl RNA örneği (1 pg- 500 ng)

1 µl oligodT primeri

1 µl 10mM dNTP mix

7 µl ampul su

2. Hazırlanan karışım vortekslenip 65 °C de 5 dakika inkübe edilmiştir.

3. 1. aşamada hazırlanan karışıma

4 µl 5X RT tamponu

1 µl 0.1 M DTT

1 µl RNaseOUT (40 U/µl)

1 µl SuperScript III RT (200 U/µl) eklenmiş ve 45 dakika 50°C’de inkübe edilmiştir.

4. 70°C’de 15 dakika bekletilerek reaksiyon durdurulmuştur.

5. Kısa bir santrifüjle reaksiyon tüpünün içi toplanmış ve 1 µl RNaseH eklenip 37°C’de 20 dakika bekletilmiştir.

6. Spektrofotometre ile sentezlenen tek zincirli cDNA’nın kantifikasyonu yapılmıştır.

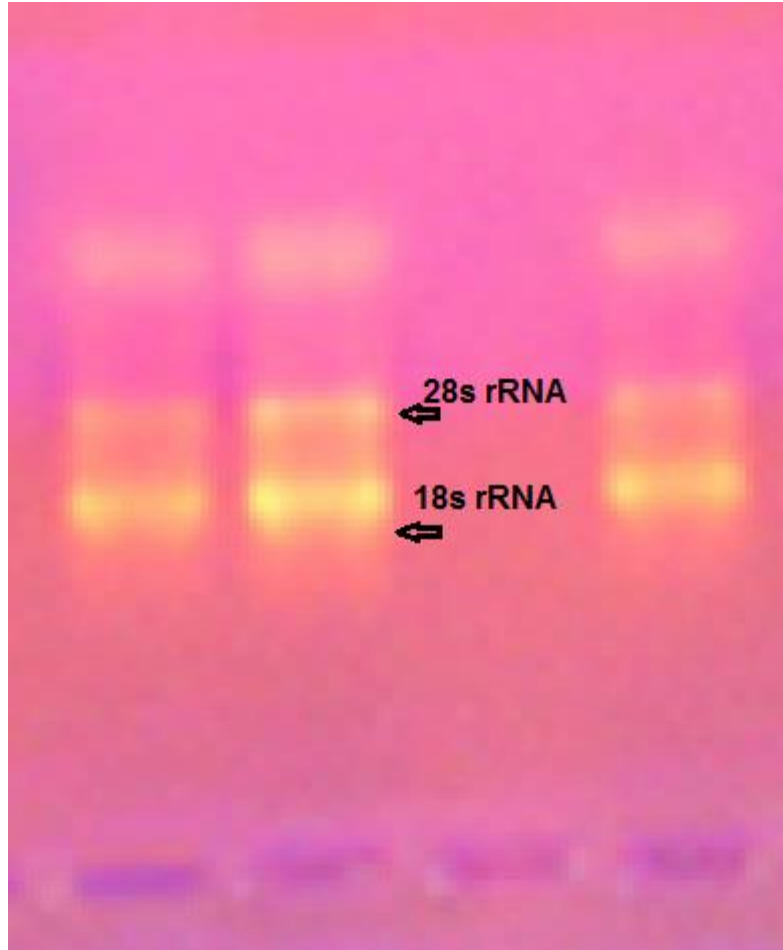
7. Artık cDNA hazırlanmış ve PCR’da kullanılmak üzere -20°C’de saklanmıştır

4. ARAşTIRMA BULGULARI

4.1. RNA Ekstraksiyonuna İlişkin Bulgular

4.1.1. RNA bulgusu

Karacięerin dokularından izole edilen total RNA'ların varlığı şekil 4.1'de ispat edilmiştir.



şekil 4.1. Karaciğer dokusundan izole edilen total RNA jel elektroforez görüntüsü

4.1.2. RNA ve cDNA konsantrasyonu kantitatif tayini bulgusu

İzole edilen RNA ve cDNA konsantrasyon ve saflıkları nanodrop cihazı 260 ve 280 nm’de okuma yapılarak belirlenmiştir. Veriler Çizelge 4.1’de belirtilmiştir.

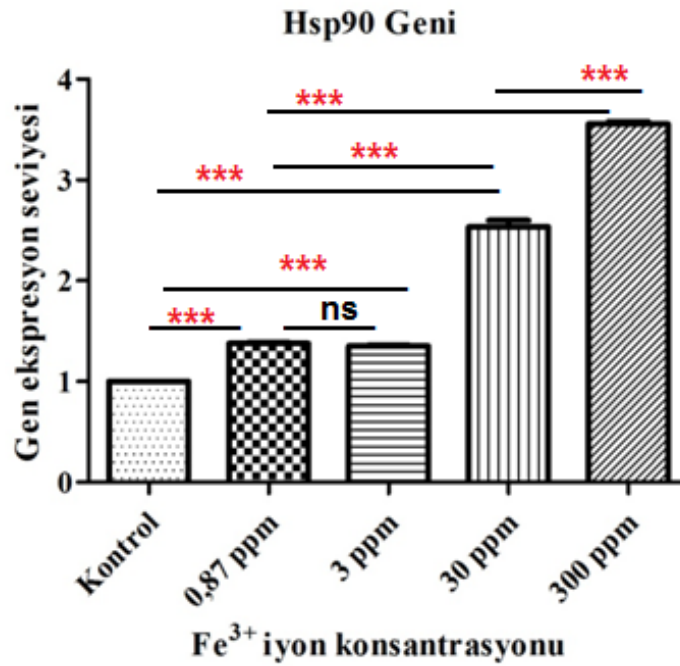
Çizelge 4.1. Kantitatif tayini yapılan RNA ve cDNA konsantrasyonları

No	Numune Kodu	RNA Konsantrasyonu		cDNA Konsantrasyonu	
		260/280	ng/μl	260/280	ng/μl
1	Kontrol1-karaciğer	1,859	1779.88	1.906	1001.34
2	Kontrol 2-karaciğer	1,908	1542.86	1.805	1214.93
3	Kontrol 3-karaciğer	1,715	2042.54	1.915	1167.15
4	3ppm1- karaciğer	1,732	2074.14	1.872	982.74
5	3ppm 2 – karaciğer	1,734	2495.81	1.850	1345.00
6	3ppm 3 – karaciğer	1,833	1818.95	1.885	1232.51
7	30ppm 1 karaciğer	1,432	2846.02	1.877	1237.61
8	30ppm 2 – karaciğer	1,413	2767.13	1.904	1131.92
9	30ppm 3 – karaciğer	1,815	1849.17	1.866	1365.41
10	300ppm1 – karaciğer	1,487	2361.82	1.837	1320.79
11	300ppm 2- karaciğer	1,616	2164.67	1.897	1204.58
12	300ppm karaciğer	1,715	2034.34	1.890	1028.90
13	0.87ppm1 – karaciğer	1,476	2459.69	1.882	1156.83
14	0.87ppm 2 – karaciğer	1,730	2074.62	1.837	1083.98
15	0.87ppm 3 – karaciğer	1,863	1701.71	1.859	954.55

4.2. İstatistiksel Sonuçlar

4.2.1. Gen ekspresyonu sonuçları

Demir ağır metalinin farklı dozlarına maruz kalmış sıçanların karaciğer dokusundaki hsp90aa1 gen ekspresyonu istatistiksel olarak 0,87ppm, 3ppm, 30ppm ve 300 ppm uygulama gruplarında kontrole nazaran mRNA seviyesi 300 ppm de daha yukesek oldu görülmüştür. (Şekil 4.2) ve (Çizelge 4.2).



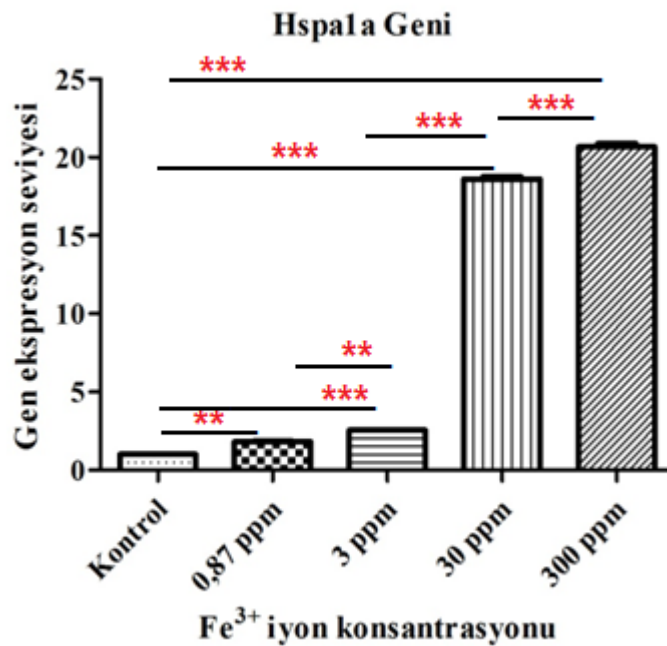
Şekil 4.2. Karaciğer dokusunda hsp90aa1 bağlı gen ekspresyon seviyeleri kırmızı yıldız olarak ifade edilen degerler Tukey's Multiple Comparison Test analizi sonucu elde edilen p değerlerini ifade etmektedir. önemlilik derecesine göre yıldız sayısı 1 ile 3 arasında doğru orantılı olarak değişmektedir.

p<0,05=, p<0,01=**, p<0,001=***

Çizelge 4.2. Karaciğer dokusunda hsp90aa1 geninin Ct ve $\Delta\Delta Ct$ değerleri

GRUP hsp90aa	n	ct	$\Delta\Delta Ct$
KONTROL	3	27.803 $\pm$ 0.4386	1 $\pm$ 0.00
0.87PPM	3	27.218 $\pm$ 0.819	1.377 $\pm$ 0.017
3PPM	3	27.484 $\pm$ 1.0258	1.351 $\pm$ 0.018
30PPM	3	26.107 $\pm$ 1.210	2.535 $\pm$ 0.109
300PPM	3	26.125 $\pm$ 2.727	3.554 $\pm$ 0.0408

Sıçanların demir ağır metalinin subletal dozlarına maruz kalmış karaciğer dokularının hsp90aa1 mRNA seviyesi arasında istatistiksel olarak farklılıklar bulunmuştur. 0.87ppm ve 3ppm ve 30 ppm ve 300 ppm gruplarında karşılaştırmalarında $p < 0,001 = ***$, kontrol ve 0.87ppm karşılaştırması ve 0,87ppm ve 3 ppm karşılaştırmalarında $p < 0.01 = **$ bulunanlar anlamlı kabul edilmiştir (Şekil 4.3) ve (Çizelge 4.3).

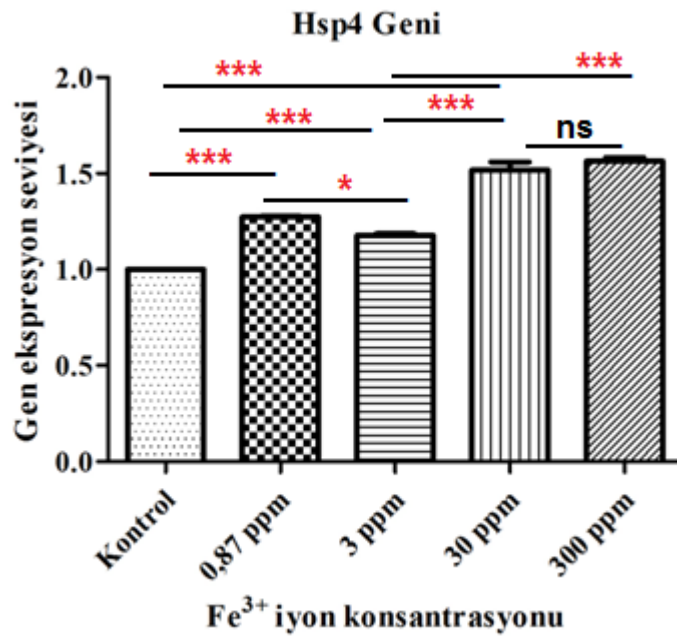


Şekil 4.3. Karaciğer dokusunda hsp90aa1 bağılı gen ekspresyon seviyeleri grupların kontrole göre karşılaştırmalarında Tukey's Multiple Comparison Test analizi sonucu elde edilen $p < 0.001 = ***$ bulunanlar anlamlı kabul edilmiştir.

Çizelge 4.3. Karaciğer dokusunda hspa1a geninin Ct ve $\Delta\Delta Ct$ değerleri

GRUP hspa1a	n	ct	$\Delta\Delta Ct$
KONTROL	3	30.775±0.231	1±0.00
0.87PPM	3	29.996±0.312	1.817±0.069
3PPM	3	29.122±1.386	2.546±0.0478
30PPM	3	27.126±0.943	18.617±0.235
300PPM	3	25.747±0.498	20.685±0.342

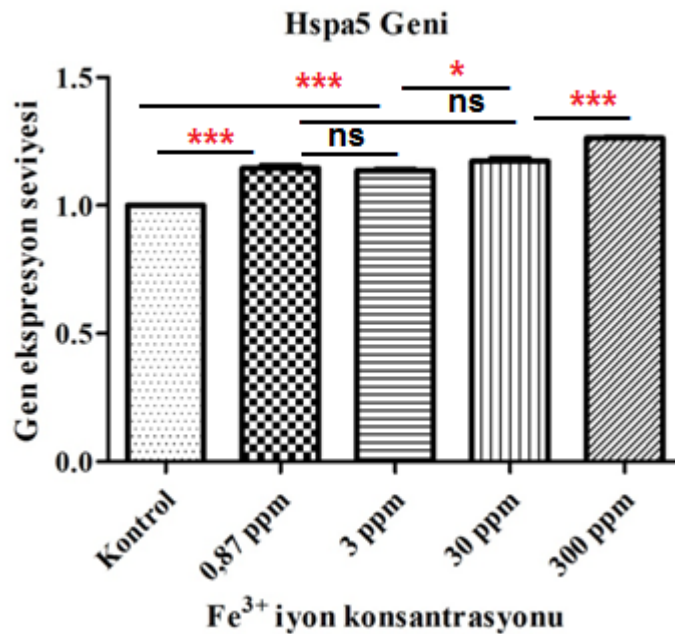
Karaciğer dokusunda hspa4 bağlı gen ekspresyon incelendiğinde 0.87ppm ve 30ppm kontrole göre farklarının anlami olduğu görülmektedir.(0.87ppm ve 3ppm: $p<0.05=*$, 30ppm ve 300ppm: $p>0.05=ns$) (Şekil 4.4) ve (Çizelge 4.4).

**Şekil 4.4.** Karaciğer dokusunda hspa4 bağlı gen ekspresyon seviyeleri kontrol diğer gruplara ve diğer grupların kendi aralarındaki karşılaştırmalarında ise istatistik olarak Tukey's Multiple Comparison Test analiziyle önemli bulunmuştur. $p<0.001=***$.

Çizelge 4.4. Karaciğer dokusunda hspa4 geninin Ct ve $\Delta\Delta Ct$ değerleri

GRUP a4	n	ct	$\Delta\Delta Ct$
KONTROL	3	25.829±0.478	1±0.00
0.87PPM	3	25.424±0.492	1.273±0.005
3PPM	3	25.211±0.532	1.177±0.014
30PPM	3	25.432±0.94	1.517±0.071
300PPM	3	25.507±2.126	1.563±0.032

Rattus norvegicus karaciğer dokusunda grup karşılaştırmalarının genel olarak incelendiğinde ise bütün grupların kontrol grupe göre gen ekspresyonları arasındaki farklar oldukça anlamlı olarak bulunmuştur. (0.87ppm ve 3ppm karşılaştırmalarının ve 0.87 ppm ve 30 ppm karşılaştırmalarına $p>0.05=ns$, 3ppm ve 30ppm deki aralarında $p<0.05=*$ bunlardan haric diğer gruplar kendi aralarında karşılaştırdığında ise gen ekspresyonu Fe^{3+} iyon konsantrasyonu arasındaki değişiklik kontrole göre ve istatistik olarak önemli bulunmuştur. $p<0.001=***$ (Şekil 4.5) ve (Çizelge 4.5).



Şekil 4.5. Karaciğer dokusunda Tukey's Multiple Comparison Test analiziyle hspa5 bağlı gen ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. $p<0.001=***$

Çizelge 4.5. Karaciğer dokusunda hspa5 geninin Ct ve $\Delta\Delta$ Ct değerleri

GRUP hspa5	n	ct	$\Delta\Delta$ ct
KONTROL	3	26.996±0.823	1±0.00
0.87PPM	3	26.901±0.761	1.145±0.019
3PPM	3	25.98±0.945	1.136±0.008
30PPM	3	26.816±0.649	1.172±0.019
300PPM	3	27.002±2.197	1.263±0.006

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

HSP ile ilgili birçok çalışma mevcut olup ekspresyon durumunda ağır metallerin, sıcaklığın, tuzluluğun, stok yoğunluğunun, rekabetin hatta kalorik kısıtlamanın etkisine bakılmıştır. Yaptığımız bu çalışma HSP ekspresyonuna direkt doku etkisini belirlenmesi açısından önemli ve ilktir.

HSP ekspresyonunda ısı şokuna cevapta yaş farklılıklarının olabileceği belirtilmiş (Murtha *et al.* 2003) ve mevsimlerin de etkili olabileceği nitekim yaz ve kış aylarında karaciğerde HSP70 seviyesinin yüksek, ilkbaharda (mayıs) ise bu seviyenin düştüğü belirtilmiş, suların değişik kirleticilere maruz kalması da bu duruma sebep olarak gösterilmiştir (Köhler *et al.* 2001). İstiridyelerde yapılan bir çalışmada ise HSP70'in sonbahar ayında daha fazla eksprese olduğu bildirilmiştir (Encomio *et al.* 2005).

Olgun zebra balıkları ile yapılan bir çalışmada balıklar 37°C'lik sıcaklığa maruz bırakılarak değişik dokulardan RNA izole edilmiş ve RT-PCR yöntemi kullanılarak Hsp ekspresyonlarını karşılaştırmışlardır. HSP70 ekspresyonu beyin, karaciğer ve kasta düzenli artış göstermesine rağmen HSP47 yalnızca beyinde artış göstermiş, HSP90 α - β ve ısı şok faktörü 1a (hsf1a) üç dokuda da eksprese olduğunu fakat sıcaklık stersine cevap olarak artmadığını bildirmişlerdir. HSP ekspresyonunun mukayesesinde yaşlılarda gençlere nazaran bazal HSP70 ve Hsf1a seviyesinde artış gözlemlemişlerdir. Ayrıca ısı şokuna cevapta yaş farklılıklarının olabileceğini ve olgun zebra balıklarının Hsp çalışmaları için yaşlanma sürecinde uygun modeller olduğunu kaydetmişlerdir (Murtha *et al.* 2003).

Bu gen ile yapılan tüm çalışmalarda yaygın olarak ısı şokunun ve ağır metallerin etkisi incelenmiştir. Farklı balık türlerine değişik sıcaklık uygulamaları yapılmış ve genel olarak hepsinde bu HSP ailesinin eksprese olmasında artış kaydedilmiştir (Lele *et al.* 1997; Currie *et al.* 2000; Palmisano *et al.* 2000; Mesa *et al.* 2002; Murtha *et al.* 2003;

Bowen *et al.* 2006). HSP grubunun ekspresyonunu araştırmada uygulanan bir başka kriter de ağır metaller ve çeşitli kirleticiler olup değişik konsantrasyonları balık gruplarına uygulanarak incelenmiş (Ait-Ai ssa *et al.* 2000; Boone and Vijayan 2002; Feng *et al.* 2003) ve uygulanan dozların hepsinde HSP ekspresyonunda artış kaydedilmiştir.

Bu çalışmada Erkek *Rattus norvegicus* türünün *Sprague-Dawley* ırkı sıçanlar Beş farklı konsantrasyonlarda demir iyonu (0,87ppm, 3ppm, 30ppm, 300 ppm) verildi ve HSP geninin eksprese olma durumuna bakılmış ve farklı konsantrasyonlarda demir iyonu birlikte HSP ekspresyonunda bir artış gözlenmiştir. Elde edilen bantların yoğunlukları kullanılarak ölçülmüş ve demirin konsantrasyonlar arttıkça HSP ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Yapılan bu kütüpaneler kullanılarak HSP70 (hspa1a, hspa4, hspa5) HSP90 (hsp90aa1) genlerin de meydana gelen ekspresyon seviyelerindeki değişimler real time PCR metoduile tespit edildi ki hsp90aa1 ve hspa1a bağlı gen ekspresyon seviyelerinde 30ppm ve 300ppm de' hsp ekspresyonları kontorora göre daha artmışler $p<0.001=***$. hspa5 ve hspa4 bağlı gen ekspresyon seviyelerinde 3ppm konsantrasyonunda hsp ekspresyonunda artış gözlenmiştir. *Rattus norvegicus* karaciğer dokusunda grup karşılaştırmalarının genel olarak incelendiğinde ise bütün grupların kontrol grupe göre gen ekspresyonları arasındaki farklar oldukça anlamlı olarak bulunmuştur. 0.87ppm ve 3ppm hspa5 ve hsp90aa1 bağlı gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırmaların ve 0.87 ppm ve 30 ppm hspa5 bağlı gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırmalara $p>0.05=ns$,3ppm ve 30ppm deki aralarında $p<0.05=*$,30 ppm ve 300ppm hspa4 bağlı gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırmalara bunlardan haric diğer gruplar kendi aralarında karşılaştırdığında ise gen ekspersyon fe^{3+} iyon konsantrasyonu arasındaki değişiklik kontrole göre ve istatistik olarak önemli bulunmuştur. $p<0.001=***$

Bu stres proteinlerinin ekspresyonu birçok psikolojik, patolojik ve yaş gibi faktörlerle değişim gösterebilmektedir (Murtha *et al.* 2003).

Tüm organizmalarda moleküler koruyucu olan bu stres proteiniyle yapılan çalışmalar tabi ki sadece balıklarla sınırlı olmayıp insandan fareye kadar tüm organizmalarda denenmiştir. Mesela Heydari *et al.* (1993) fareler üzerindeki çalışmalarında 4-7 ve 22-28 aylık fareleri 42.5°C'de 30 dakikalık sıcaklık stresine maruz bırakmışlar ve HSP70 ekspresyonu yaşlılarda genç farelere göre %40-50 daha az bulmuşlardır. Farelerle yapılan başka bir çalışmada sıcaklık maruziyeti sonucu HSP ve protein ekspresyonunun nöronlarda (Pardue *et al.* 1992), karaciğerde (Rogue *et al.* 1993) ve kalp kasında (Locke and Tanguay 1996) yaşla birlikte arttığını gözlemlemişlerdir (Keller *et al.* 2004). HSP ekspresyonunda etkili olan fiziksel ve kimyasal şartlar göz önünde bulundurularak, tek ortamı su olan balıkların stres faktörlerini birazda olsa ortadan kaldırmak için ortam şartlarının daha iyi ayarlanması gerekir.

KAYNAKLAR

- AıT-AıSsa, S., Ausseil, O., Palluel, O., Vindimian, E., Garnier-La , J. and Porcher, J.-M. 2003. Biomarker responses in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after single and combined exposure to low doses of cadmium, zinc, PCB77 and 17b-oestradiol. *Biomarkers*, Vol. 8, No. 6.
- Alak, G., (2007). Farklı yaşlardaki gökkuşağı alabalıklarında Hsp70 geninin kantitaif analizi, *Yüksek Lisans Tezi*, Danışman Çiltaş, A., Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum
- Aşkar, T.K., Ergün, N., Turunç, V., (2007). Isı Şok proteinler ve Fizyolojik Roller, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi **13**(1): 109-114
- Atalay M, Oksala Nk, Laaksonen De, Khanna S, Nakao C, Lappalainen J, Roy S, Hänninen O, Sen Ck. Exercise Training Modulates Heat Shock Protein Response In Diabetic Rats. *Journal Of Applied Physiology*, 97: 605-611, 2004.
- Aufricht C Lu E, Thulin G, Kashgarian M, Siegal NJ, Van Why SK. ATP releases HSP-from protein aggregates after renal ischemia. *Am J Physiol* 1998;274:268-274.
- Baek, S.H., Min, J.N., Park, E.M., Han, M.Y., Lee, Y.S., Lee, Y.J., Park, Y.M., (2000). Role of small heat shock protein Hsp25 in radioresistance and glutathione-redox cycle, *Journal of Cellular Physiology*, 183(1): 100-107. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(200004)183:1<100::AID-JCP12>3.0.CO;2-F
- Baler, R., Zou, J., and Voellmy, R., 1996, Evidence for a role of HSP7 in the regulation of the heat shock response in mammalian cells. *Cell Stress Chaperones*, 1: 33-39.
- Banerji, S. S, Berg, L., and Morimoto, R. I., 1986, Transcriptional a transcriptional regulation of avian HSP70 gene expression. *J. Biol. Chem.*, 261 (33):15740-15745.
- Beere, H.M., Wolf, B.B., Cain, K., Mosser, D.D, Mahboubi, A. Kuwana, T., Tailor, P., Morimoto, R.I., Cohen, G.M., Green, D.R., 2000. Heat-Shock Protein 70 Inhibits Apoptosis By Preventing Recruitment Of Procaspase-9 To The Apaf-1 Apoptosome. *Nature Cell Biology*, 2: 469-475.
- Benndorf, R., Welsh, M.J., (2004). Shocking de-generation, *Natura Genetics*, 36: 547-548. doi: 10.1038/ng0604-547
- Bonegio R, Lieberthal W. Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal renal failure. *Curr Opin Nephrol Hipertens* 2002; 11:301-308.
- Boone, A.N., Vijayan, M.M., (2002). Constitutive Heat Shock Protein 70 (Hsc70) Expression In Rainbow Trout Hepatocytes: Effect Of Heat Shock And Heavy Metal Exposure, *Comparative Biochemistry And Physiology, Part C*, 132: 223-233. Doi:10.1016/S1532-0456(02)00066-2
- Boorstein, W. R., Ziegelhoffer T., and Craig, E.A., 1994, Molecular evolution of the HSP70 multigene family, *J. Mol. Evol.*, 38: 1-17.
- Bowen, L., Werner, I. & Johnson, M. L. 2006. Physiological and behavioral effects of zinc and temperature on coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Hydrobiologia* 559:161-168.
- Brudzynski K, Martinez V, Gupta Rs. Immunocytochemical Localization Of Heat-Shock Protein 60-Related Protein In Beta-Cell Secretory Granules And Its

- Altered Distribution In Non-Obese Diabetic Mice. *Diabetologia*, 35: 316-324, 1992.
- Bruey, J.M., Ducasse, C., Bonniaud, P., Ravagnan, L., Susin, S.A., Diaz-Latoud, C., Gurbuxani, S., Arrigo, A.P., Kroemer, G, Solary, E., Garrido, C., (2000). Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c, *Nature Cell Biology*, 2(9): 645-652. doi: 10.1038/35023595
- Cappello F. Hsp60 And Hsp10 As Diagnostic And Prognostic Tools In The Management Of Exocervical Carcinoma. *Gynecological Oncology*, 91: 661, 2003.
- Chauhan, D., Li, G., Hideshima, T., Podar, K., Mitsades, C., Mitsiades, N., Catley, L., Tai, Y.T., Hayashi, T., Shringarpure, R., Burger, R., Munshi, N., Ohtake, Y., Saxena, S., Anderson, K.C., 2003. Hsp27 Inhibits Release Of Mitochondrial Protein Smac In Multiple Myeloma Cells And Confers Dexamethasone Resistance. *Blood*, 102: 3379-3386
- Choi, C.K., Jo, P.G., Choi, C.Y., (2008). Cadmium affects the expression of Hsp90 and Metallothionein Mrna In The Pacific Oyster, *Crassostrea Gigas*, Comparative Biochemistry And Physiology Part C., 147: 286-292. Doi: 10.1016/J.Cbpc.2007.11.002
- Cohen-Saidon, C., Carmi, I., Keren, A., Razin, E., 2006. Antiapoptotic Function Of Bcl-2 In Mast Cells Is Dependent On Its Association With Heat Shock Protein 90beta. *Blood*, 107: 1413-1420.
- Coleman, M.L., Sahai, E.A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., Olson, M.F., 2001. Membrane Blebbing During Apoptosis Results From Caspase-mediated Activation Of Rock I. *Nature Cell Biology*, 3: 339-345.
- Cruz-Rodriguez, L. A., Chu, F.- L., (2002). Heat-shock protein (HSP70) response in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to PAHs sorbed to suspended artificial clay particles and to suspended field contaminated sediments, *Aquatic Toxicology*, 60: 157-168. doi: 10.1016/S0166-445X(02)00008-5
- Currie S.; Moyes C.D.; Tufts B.L. 2000. The effects of heat shock and acclimation temperature on hsp70 and hsp30 mRNA expression in rainbow trout: in vivo and in vitro comparisons. *Journal of Fish Biology*, Volume 56, No:2, pp. 398-408.
- Deocaris Cc, Kaul Sc, Wadhwa R. On The Brotherhood Of The Mitochondrial Chaperones Mortalin And Heat Shock Protein 60. *Cell Stress And Chaperones*, 11: 116-28, 2006.
- Dilworth, C. and Timbrell, J. A. 1998. An investigation into the sensitivity of heat shock proteins as markers of cellular damage: a comparative study of hydrazine and cadmium chloride in primary rat hepatocyte cultures. *Biomarkers*, 1998, Vol. 3, No. 3, 177-190
- Eddington, V. B., and Hightower L.E., 1990, Induction of a Chicken Small Heat Shock (Stress) Protein: Evidence of multilevel posttranscriptional regulation. *Mol. Cell. Biol.*, 9:4886-4898
- Elicker, K.S., Hutson, L.D., (2007). Genome-wide analysis and expression profiling of the small heat shock proteins in zebrafish, *Gene*, 15(1-2): 60-69. doi: 10.1016/j.gene.2007.08.003

- Encomio, V.G., Chu, F. 2005. Seasonal variation of heat shock protein 70 in eastern oysters (*Crassostrea virginica*) infected with *Perkinsus marinus* (dermo). *Journal of Shellfish Research* 5: 335-341.
- Etches, R. J., John, T. M., and Verrinder Gibbins, A. M., 1995, Behavioural, physiological, neuroendocrine and molecular responses to heat stress. Ed. Daghir, N. J. CAB International, 31-65.
- Fan CY, Lee S, Cyr DM. Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell Stress Chaperones*. 2003 Winter;8(4):309-16.
- Farcy, E., Serpentine, A., Fievet, B., Lebel, J.M., (2007). Identification of cDNAs encoding HSP70 and HSP90 in the abalone *Haliotis tuberculata*: Transcriptional induction in response to thermal stress in hemocyte primary culture, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 146(4): 540-550. doi: 10.1016/j.cbpb.2006.12.006
- Feder, M. E., And Hofmann, G. E., 1999, Evolutionary And Ecological Physiology Of Heat-Shock Proteins And The Heat-Shock Response: A Comprehensive Bibliography. Supplement To *Ann. Rev. Physiol.* 61: [Http://Www.Annurev.Org/Sup/Material.Htm](http://Www.Annurev.Org/Sup/Material.Htm).
- Feng, Q., Boone, A. N., Vijayan, M. M. 2003. Copper impact on heat shock protein 70 expression and apoptosis in rainbow trout hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 135, 345-355.
- Franck, E., Madsen, O., van Rheede, T., Ricard, G., Huynen, M.A., de Jong, W.W., (2007). Evolutionary diversity of vertebrate small heat shock proteins, *Journal of Molecular Evolution*, 59(6): 792-805. doi: 10.1007/s00239-004-0013-Z.
- Gao, Q., Zhao, J., Song, L., Qiu, L., Yu, Y., Zhang, H., Ni D., (2008),. Molecular cloning, characterization and expression of Hsp90 gene in the haemocytes of bay scallop *Argopecten irradians*, *Fish & Shellfish Immunology*, 24: 379-385. doi: 10.1016/j.fsi.2007.08.00
- Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G. Heat shock proteins: Endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286:433-442.
- Georgopoulos, C., and Welch, W. J., 1993, Role of major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 9: 601-635.
- Gonzalez-Riopiedre, M., Novas, A., Dobano, E., Ramos-Martinez, J.I., Barcia, R., (2007) Effect of thermal stress on protein expression in the mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 147:3, 531-540. doi: 10.1016/j.cbpb.2007.03.006
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281:1309-1312
- Green, J. M., Gu, L., Ifkovits, J., Kaumaya, P. T., Conrad, S., and Pierce, S. K., 1995, Generation and characterization of monoclonal antibodies specific for members of the mammalian 70kda heat shock protein family. *Hybridoma*, 14 (4): 347.
- Hallare, A.V., Schirling, M., Luckenbach, T., Köhler, H.R., Triebkorn, R., (2005), Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish embryos. *Journal of Thermal Biology*, 30: 7-17. doi: 10.1016/j.jtherbio.2004.06.002
- Heydari, A.R., Wu, B., Takahashi, R., Strong, R., Richardson, A. 1993. Expression of heat shock protein 70 is altered by age and diet at the level of transcription. *Mol Cell Biol.* 13(5): 2909-2918.

- Hightower, L. E., Sadis, S. E., and Takenaka, I. M., 1994, Interactions of vertebrate hsc70 and hsp70 with unfolded proteins and peptides. *In The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones.*, eds.R. I. Morimoto, A. Tissieres and C. Georgopoulos, pp. 179-208.
- Horwich Al, Farr Gw, Fenton Wa. Groel-Groes-Mediated Protein Folding. *Chemistry Reviews*, 106: 1917-1930, 2006.
- [Http://gene4.weizmann.ac.il/cgibin/carddisp.pl?gene=HSP90AA1&SEARCH=PRIONS](http://gene4.weizmann.ac.il/cgibin/carddisp.pl?gene=HSP90AA1&SEARCH=PRIONS)
- Itoh, H., Kobayashi, R., Wakui, H., Komatsuda, A., Ohtani, H., Miura, A. B., Otaka, M., Masamune, O., Andoh, H., Koyama, K., Sato, Y., and Tashima, Y., 2002, Mammalian 60-kda Stress Protein. *FEBS J.*, 269 (23): 5931 - 5938.
- Jaattela, M., Wissing, D., Kokholm, K., Kallunki, T., Egeblad, M., 1998. Hsp70 Exerts Its Anti-Apoptotic Function Downstream Of Caspase-3-Like Proteases. *The Embo Journal*, 17: 6124-6134.
- Janz, D.M., McMaster, M.E., Munkittrick, K.R. and Van der Kraak, G. 1997. Elevated ovarian follicular apoptosis and heat shock protein-70 expression in white sucker exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (in press).
- Johnson, R.B., Fearon, K., Mason, T., and Jindal, S., 2003 Cloning and characterization of the yeast chaperonin HSP60 gene. *Gene*, 84: 295-302.
- Jolly, C., and Morimoto, R. I., 2000, Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *Journal of the National Cancer Institute*, 92: 1564-1572.
- Kang, B.H., Plescia, J., Dohi, T., Rosa, J., Doxsey, S.J., Altieri, D.C., 2007. Regulation Of Tumor Cell Mitochondrial Homeostasis By An Organellespecific Hsp90 Chaperone Network. *Cell*, 131: 257-270.
- Katchinski, D. M., 2004, On heat and cells and proteins. *News. Physiol.Sci.*, 19: 11-15.
- Kayhan Esin, F., Atasayar, Z., 2007. Sucul Organizmalarda Isi Şoku Proteinlerinin (Hsp) Biyolojik Önemi ve Termotolerans, *Journal of Fisheries Sciences.com*, 4(3): 246-253 (2010). DOI: 10.3153/jfsc.com.2010026
- Keller, E.T., Murtha, J.M. 2004. The use of mature zebrafish (*Danio rerio*) as a model for human aging and disease \$ *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 138: 335-341.
- Keller, J.M., Escara-Wilke, F., Keller, E.T., (2008), Heat stres-induced heat shock prote-in 70 expression is dependent on ERK activation in zebrafish cells. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 15A: 307-314. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.03.021
- Kirchhoff, S.R., Gupta, S., Knowlton, A.A., 2002. Cytosolic Heat Shock Protein 60, Apoptosis, And Myocardial Injury. *Circulation*, 105: 2899-2904.
- Koyasu S, Nishida E, Miyata Y, Sakai H, Yahara I. Hsp100, A 100-Kda Heat Shock Protein, Is A Ca²⁺-Calmodulin-Regulated Actin-Binding Protein. *Journal Of Biological Chemistry*, 264: 15083-15087, 1989. (Sadece Özeti Var).
- Krebs, R. A., and Bettencourt, B., R., 1999, Evolution of thermotolerance and variation in the heat shock protein, Hsp70. *Amer. Zool.*, 39: 9
- Kubista, M., Andrade, J. M., et all, 2006, The real-time polymerase chain reaction, 27: 95-125, 20 p.

- La Porte, P. F. 2005. *Mytilus trossulus* hsp70 as a biomarker for arsenic exposure in the marine environment: Laboratory and real-world results. *Biomarkers*, 10(6):417-428
- Lanneau, D., Brunet, M., Frisan, E., Solary, E., Fontenay, M., Garrido, C., 2008. Heat Shock Proteins: Essential Proteins For Apoptosis Regulation. *Journal Of Cellular And Molecular Medicine*, 12: 743-761.
- Lazlo, A., 1988, The relationship of heat shock proteins, thermotolerance and protein synthesis. *Exp. Cell Res.*, 178: 401-414
- Lebret T, Watson R, Molinie V, O'Neill A, Gabriel C, Fitzpatrick J, Botto H. Heat Shock Proteins Hsp27, Hsp60, Hsp70, And Hsp90: Expression In Bladder Carcinoma. *Cancer*, 98: 970-977, 2003.
- Lee, Y. J., and Dewey, W., 1987, Effect of cycloheximide or puromycin on induction of thermotolerance by heat in Chinese Hamster ovary cells: dose fractionation at 45.5°C. *Cancer Res.*, 47: 5960-5966
- Lele, Z., Engel, S., and Krone, P. H. 1997. hsp47 and hsp70 Gene Expression Is Differentially Regulated in a Stress- and Tissue-Specific Manner in Zebrafish Embryos. *Developmental Genetics* 21:123-133.
- Li, C.Y., Lee, J.S., Ko, Y.G., Kim, J.I., Seo, J.S., 2000. Heat Shock Protein 70 Inhibits Apoptosis Downstream Of Cytochrome C Release And Upstream Of Caspase-3 Activation. *The Journal Of Biological Chemistry*, 2000; 275: 25665-25671.
- Li, D., and Duncan, R.F., 1995, Transient acquired thermotolerance in *Drosophila*, correlated with rapid degradation of Hsp70 during recovery. *Eur. J. Biochem.*, 15: 231 (2): 454-465.
- Lindquist, S., and Craig, E.A., 1988, The heat shock proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 22:631-677.
- Locke, M., Tanguay, R.M., 1996. Diminished heat shock response in the aged myocardium. *Cell Stress Chaperones* 1, 251-260.
- Lyons, C., Dowling, V., Tedengren, M., Gardestrom, J., Hartl, M.J., O'Brien, N., Van Pelt, F., O'Halloran, J., Sheehan, D., (2003). Variability of heat shock proteins and glutathione S-transferase in gill and digestive gland of blue mussel, *Mytilus edulis*, *Marine Environmental Research*, 56(5): 585-597. doi:10.1016/S0141-1136(03)00044-8.
- Maines M. The Heme Oxygenase System: Update 2005. *Antioxidant & Redox Signaling*, 7: 1761-1766, 2005. (Sadece Özet Var).
- Martin, J., and Hartl, F. U., 1997, Chaperone-assisted protein folding *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:41-52.
- Mathew, A., and Morimoto, R. I., 1998, Role of the heat-shock response in the life and death of proteins. *Ann NY Acad Sci.*, 851:99-111.
- Matz, C.J., Treble, R.G., Krone, P.H., (2007). Accumulation and elimination of cadmium in larval stage zebrafish following acute exposure, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66: 44-48. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.11.001
- Meki, A.M.A., Esmail, E.E.F., Hussein, A.A., Hassanein, H.M., 2004 Caspase-3 And Heat Shock Protein-70 In Rat Liver Treated With Aflatoxin B1: Effect Of Melatonin. *Toxicol.*, 43: 93-100.
- Mesa, M.G., ; Welland, L. K. ; Wagner, P. 2002. Effects of acute thermal stress on the survival, predator avoidance, and physiology of juvenile fall chinook salmon. *Northwest science (Northwest sci.)*. vol. 76, no2, pp. 118-128.

- Mezquita, B., Mezquita, J., and Durfort, M., 2001, Constitutive and heat-shock induced expression of Hsp70 mRNA during chicken testicular development and regression. *J. Cell. Biol.*, 82 (3): 480-490.
- Micovic, V., Bulog, A., Natalia Kucic, N., Jakovac, H., Radosevic-Stasic, B., (2009). Metallothioneins and heat shock proteins 70 in marine mussels as sensors of environmental pollution in Northern Adriatic Sea, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28(3): 439-447. doi: 10.1016/j.etap.2009.08.005
- Migliarini, B., Campisi, A.M., Maradona, F., Truzzi, C., Annibaldi, A., Scarponi, G., Carnevali, O., 2005. Effects Of Cadmium Exposure On Testis Apoptosis In The Marine Teleost *Gobius Niger*. *General And Comparative Endocrinology*, 142: 241-247.
- Mocellin, S., Rossi, C. R., et all., 2003, Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research, *TRENDS in Molecular Medicine*, 9: 189-195, 6 p.
- Molitoris BA, Dahl R Geerdes A. Cytoskeletal disruption and apical redistribution of proximal tubule Na-K ATPase during ischemia. *Am J Physiol* 1992; 263: 488-495
- Morimoto, R. I., 1998, Regulation of the heat shock transcriptional response: Cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes. Dev.*, 12: 3788-3796.E
- Möbius J, Groos S, Meinhardt A, Seitz J. Differential Distribution Of The Mitochondrial Heat Shock Protein 60 In Rat Gastrointestinal Tract. *Cell And Tissue Response*, 287: 343-350, 1997.
- Murtha, J.M., Keller, E.T., 2003. Characterization of the heat shock response in mature Zebrafish (*Danio rerio*). *Exp. Gerontol.* 38, 683- 691.
- Nakai, A., and Morimoto, R. I., 1993, Characterization of a novel chicken heat shock transcription factor, HSF3, suggests a new regulatory pathway. *Mol. Cell Biol.*, 13: 1983-1997.
- Nakai, A., Tanabe, M., Kawazoe, Y., Inazawa, J., Morimoto, R. I., and Nagata, K., 1997. HSF4, a new member of the human heat shock factor family which lacks properties of a transcriptional activator. *Mol. Cell. Biol.*, 17: 469-481.
- Neckers L, Percy Si. Heat Shock Protein 90. *Current Opinion In Oncology*, 15: 419-424, 2003.
- Ohtsuka, K., and Suzuki, T., 2000, Roles of molecular chaperones in the nervous system. *Brain Res.* 53:141-146.
- Ojima, N., (2005). Rainbow trout hspb1 (hsp27): Identification of two mRNA splice variants that show predominant expression in muscle tissues, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 148(3): 277-285. doi: 10.1016/j.cbpb.2007.06.005
- Otaka M, Odashima M, Watanabe S. Role Of Heat Shock Proteins (Molecular Chaperones) In Intestinal Mucosal Protection. *Biochemical And Biophysiological Research Communicaitons*, 348: 1-5, 2006.
- Palmisano, A.N., Winton, J.R., and Dickhoff, W.W. (2000). Tissue- specific induction of hsp90 mRNA and plasma cortisol response in Chinook salmon following heat shock, seawater challenge, and handling challenge. *Mar Biolechnol* 2:329-338.
- Pandey, P., Saleh, A., Nakazawa, A., Kumar, S., Srinivasula, S.M., Kumar, V., Weichselbaum, R., Nalin, C., Alnemri, E.S., Kufe, D., Kharbanda, S., 2000. Negative Regulation Of Cytochrome C-Mediated Oligomerization Of Apaf-1

- And Activation Of Procaspase-9 By Heat Shock Protein 90 .The Embo Journal,19:4310-4322.
- Pantartzzi, C.N., Kourtidis, A., Drosopoulou, E., Yiangou, M., Scouras, Z.G., (2009). Isolation and characterization of two cytoplasmic hsp90s from *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca: Bivalvia) that contain a complex promoter with a p53 binding site, *Gene*, 431(1-2): 47-54. doi: 10.1016/j.gene.2008.10.028
- Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, Solary E, Garrido C. Heat Shock Proteins, Cellular Chaperones That Modulate Mitochondrial Cell Death Pathways. *Biochemical And Biophysiological Research Communicaitons*, 304: 505-512, 2003.
- Pardue, S., Groshan, K., Raese, J.D., Morrison-Bogorad, M., 1992. Hsp70 mRNA induction is reduced in neurons of aged rat hippocampus after thermal stress. *Neurobiol. Aging* 13, 661-672.
- Parsell, D.A., and Lindquist, S., 1994, Heat Shock Proteins and Stress Tolerance. Morimoto, R. J., Tissieres, A.; Georgopoulos, S. (Eds.) *The Biology Of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 457-494.
- Paul, C., Manero, F., Gonin, S., Kretz-Remy, C., Viot, S., Arrigo, A.P., 2002. Hsp27 As A Negative Regulator Of Cytochrome C Release. *Molecular And Cellular Biology*, 22: 816-834.
- Pearl Lh, Prodromou C. Structure And In Vivo Function Of Hsp90. *Current Opinion In Structural Biology*, 10: 46-51, 2000.
- Piner, P., 2009. Lambda-Cyhalothrinin *Oreochromis Niloticus*'da Karaciğerde Piperonil Bütoksitmodulatörlüğünde Oksidatif Stres Potansiyelinin Belirlenmesi, Stres Proteinleri ve Apoptozis Üzerine Etkileri, Doktora Tezi, Danışman: ÜNER, N., Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana
- Pirkkala, L., Nykanen, P., Sistonen, L., (2001). Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond, *FASEB Journal*, 15 (7): 1118-1131. PMID: 11344080
- Pivovarova, A.V., Chebotareva, N.A., Chernik, I.S., Gusev, N.B., Levitsky, D.I., 2007. Small Heat Shock Protein Hsp27 Prevents Heat-Induced Aggregation Of F-Actin By Forming Soluble Complexes With Denatured Actin. *Febs Journal*, 274: 5937-5948.
- Pockley Ag, Bulmer J, Hanks Bm, Wright Bh. Identification Of Human Heat Shock Protein 60 (Hsp60) And Anti-Hsp60 Antibodies In The Peripheral Circulation Of Normal Individuals. *Cell Stress And Chaperones*, 4: 29-35, 1999.
- Pockley Ga, Faire U, Kiessling R, Lemne C, Thulin T, Frosteg J. Circulating Heat Shock Protein And Heat Shock Protein Antibody Levels In Established Hypertension. *Journal Of Hypertension*, 20: 1815-1820, 2002.
- Poulaki V, Iliaki E, Mitsiades N, Mitsiades Cs, Paulus Yn, Bula Dv, Gragoudas Es, Miller Jw. Inhibition Of Hsp90 Attenuates Inflammation In Endotoxin-Induced Uveitis. *Faseb Journal*, 21: 2113-2123, 2007.
- Rahman, M.M., Wille, M., Cavalli, R. O., Sorgeloos, P., Clegg J. S., (2004). Induced thermotolerance and stress resistance in larvae of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (deMan, 1879), *Aquaculture*, 230(1-4): 569-579. doi:10.1016/j.aquaculture.2003.10.010

- Rendell, J.L., Fowler, S., Cockshutt, A., Currie, S., (2006). Development-dependent differences in intracellular localization of stress proteins (hsps) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, following heat shock, *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 1(2): 238-252. doi: 10.1016/j.cbd.2005.12.004
- Riordion M Garg V, Thulin G, Kashgarian M, Siegal J. Differential inhibition of HSP 72 and HSP 25 produces profound impairment of cellular integrity. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:1557-1566.
- Ritossa, F., 1962, A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 18:571–573.
- Ritossa, F., 1996, Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones*. 1:97–98.
- Rivera, R., E., Christensen V.L., Edens, F.W., and Wineland, M.J., 2005, Influence of selenium on heat shock protein 70 expression in heat stressed turkey embryos (*Meleagris gallopavo*). *Comp. Biochem. Physiol Part A: Molecular & Integrative Physiology* 142 :(4),427-432.
- Roche Applied Science, Technical Note, No. LC 18/2004.
- Rogalla, T., Ehrnsperger, M., Preville, X., Kotlyarov, A., Lutsch, G., Ducasse, C., Paul, C., Wieske, M., Arrigo, A.P., Buchner, J., Gaestel, M., 1999. Regulation Of Hsp27 Oligomerization, Chaperone Function, And Protective Activity Against Oxidative Stress/Tumor Necrosis Factor Alpha By Phosphorylation. *The Journal Of Biological Chemistry*, 274:18947-18956.
- Rogue, P.J., Ritz, M.F., Malviya, A.N., 1993. Impaired gene transcription and nuclear protein kinase C activation in the brain and liver of aged rats. *FEBS Lett.* 334, 351- 354.
- Ruchalski, K., Mao, H., Li, Z., Wang, Z., Gillers, S., Wang, Y., Mosser, D.D., Gabai, V., Schwartz, J.H., Borkan, S.C., 2006. Distinct Hsp70 Domains Mediate Apoptosis-Inducing Factor Release And Nuclear Accumulation. *The Journal Of Biological Chemistry*, 281:7873-7880.
- Saibil Hr. Chaperone Machines In Action. *Curr Opin Struct Biol.* 2008 Feb;18(1):35- 42
- Sakahira, H., Nagata, S., 2002. Co-Translational Folding Of Caspase-Activated Dnase With Hsp70, Hsp40, And Inhibitor Of Caspase-Activated Dnase. *The Journal of Biological Chemistry*, 277:3364-3370.
- Sakai, T., Takaya, S., Fukuda, A., Harada, O., Kobayashi, M., 2003. Evaluation Of Warm Ischemia-Reperfusion Injury Using Heat Shock Protein In The Rat Liver. *Transplant International*, 16: 88-99.
- Saleh, A., Srinivasula, S.M., Balkir, L., Robbins, P.D., Alnemri, E.S., 2000. Negative Regulation Of The Apaf-1 Apoptosome By Hsp70. *Nature Cell Biology*, 2: 476-483.S
- Samali, A., Cai, J., Zhivotovsky, B., Jones, D.P., Orrenius, S., 1999. Presence Of A Pre-Apoptotic Complex Of Pro-Caspase-3, Hsp60 And Hsp10 In The Mitochondrial Fraction Of Jurkat Cells. *The Embo Journal* 18: 2040-2048.
- Sanders, B.M., Martin, L. S., Nelson, W. G., Phelps, D. K. And Welch, W. 1991. Relationships Between Accumulation Of A 60 Kda Stress Protein And Scope For Growth In *Mytilus Edulis* Exposed To A Range Of Copper Concentrations. *Marine Environmental Research* 31, 81-97.

- Satyal, S. H., Chen, D., Fox, S. G., Kramer, J. M., And Morimoto, R. I., 1998, Negative Regulation Of Heat Shock Transcriptional Response By Hsbp1. *Genes. Dev.*, 12, 1962-1974.
- Schulte, P.M., (2007). Responses To Environmental Stressors In An Estuarine Fish: Interacting Stressors And The Impacts Of Local Adaptation, *Journal Of Thermal Biology*, 32(3): 152-161. Doi: 10.1016/J.Jtherbio.2007.01.012
- Shin Bk, Wang H, Yim Am, Le Naour F, Brichory F, Jang Jh, Zhao R, Puravs E, Tra J, Michael Cw, Misek De, Hanash Sm. Global Profiling Of The Cell Surface Proteome Of Cancer Cells Uncovers An Abundance Of Proteins With Chaperone Function. *Journal Of Biological Chemistry*, 278: 7607-7616, 2003.
- Smoyer We, Ransom R, Harris Rc, Welsh Mj, Lutsch G, Benndorf R. Ischemic Acute Renal Failure Induces Differential Expression Of Small Heat Shock Proteins. *J Am Soc Nephrol* 1998; 11:211-221.
- Solomon, J. M., Rossi, J. M., Golic, K., Mcgarry, T., And Lindquist, S., 1991, Changes In Hsp70 Alter Thermotolerance And Heat-Shock Regulation In *Drosophila*. *New. Biol.*, 3: 1106-1120.
- Sonna, L. A., Fujita, J., Gaffin, S. L., And Lilly, C.M., 2002, Effects Of Heat And Cold Stress On Mammalian Gene Expression. *J. Appl. Physiol.*, 92: 1725-1742.
- Sorensen, J. G., Kristensen, T. N., And Loeschcke, V., 2003, The Evolutionary And Ecological Role Of Heat Shock Proteins. *Ecol. Lett.*, 6:1025-1037.
- Sreedhar, A.S., Csermely, P., 2004. Heat Shock Proteins In The Regulation Of Apoptosis: New Strategies In Tumor Therapy. A Comprehensive Review. *Pharmacology And Therapeutics*, 101: 227-257.
- Stankiewicz, A.R., Lachapelle, G., Foo, C.P., Radicioni, S.M., Mosser, D.D., 2005. Hsp70 Inhibits Heat-Induced Apoptosis Upstream O Mitochondria By Preventing Bax Translocation. *The Journal Of Biological Chemistry*, 280: 38729-38739.
- Tanabe, M., Kawazoe, Y., Takeda, S., Morimoto, R. I., Nagata, K., And Nakai, A., 1998, Disruption Of The Hsf3 Gene Results In The Severe Reduction Of Heat Shock Gene Expression And Loss Of Thermotolerance. *Embo J.*, 17: 1750-1758.
- Tissieres, A., Mitchell, H.K., And Tracy, U. M., 1974, Protein Synthesis In Salivary Glands Of *D. Melanogaster*: Relation To Chromosome Puffs. *J. Molec. Biol.*, 85: 389-398.
- Tomanek, L., (2005). The Heat-Shock Response: Its Variation, Regulation And Ecological Importance In Intertidal Gastropods (Genus *Tegula*), *Integrative And Comparative Biology*, 42(4): 797-807. Doi: 10.1093/Icb/42.4.797
- Van Why Sk Siegel Nj. Heat Shock Proteins Renal Injury And Recovery. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1994; 7:407-412.
- Vert, V., Kenneth, W. K., 2004, Cancer genes and the pathways they control, *Nature Medicine*, 10:789-799, 10p.
- Vijayan, M.M., Pereira, C., Kruzynski, G., Iwama, G.K. 1998. Sublethal Concentrations Of Contaminant Induce The Expression Of Hepatic Heat Shock Protein 70 In Two Salmonids. *Aquatic Toxicology*, Volume 40, Number 2, Pp. 101-108(8)
- Voss, O.H., Batra, S., Kolattukudy, S.J., Gonzalez-Mejia, M.E., Smith, J.B., Doseff, A.I., 2007. Binding Of Caspase-3 Prodomain To Heat Shock Protein 27

- Regulates Monocyte Apoptosis By Inhibiting Caspase-3 Proteolytic Activation. The Journal Of Biological Chemistry, 282: 2508
- Weitzel Lr, Wischmeyer Pe. Glutamine In Critical Illness: The Time Has Come, The Time Is Now. Crit Care Clin 2010; 26: 515-525.
- Werner, I. And Hinton, D. E. 1999. Field Validation Of Hsp70 Stress Proteins As Biomarkers In A Sian Clam (Potamocorbula Amurensis): Is Downregulation An Indicator Of Stress?. Biomarkers, Vol. 4, No. 6, Pp. 473-484.
- Westerheide Sd, Morimoto Ri. Heat Shock Response Modulators As Therapeutic Tools For Diseases Of Protein Conformation. Journal Of Biological Chemistry, 280: 33097-33100, 2005.
- Wilhelm, J., Pingoud, A., 2003, Real-Time Polymerase Chain Reaction, ChemBioChem, 4: 1120-1128, 8 p.
- Williams Rs, Thomas Ja, Fina M, German Z, Benjamin Ij. Human Heat Shock Protein-70 Protects Murine Cells From Injury During Metabolic Stress. J Clin Invest 1993; 92:503-508.
- Wishniewski, M., Close, T. J., Artlip, T., And Arora, R., 1996, Seasonal Patterns Of Dehydrins And 70-Kda Heat-Shock Proteins In Bark Tissues Of Eight Species Of Woody Plants. Physiol. Plant., 96: 496-505.
- Yaman, K., 1996, Fizyoloji, 2. Baskı, Uludağ Üniversitesi Basımevi, 507-525.
- Yan, L.J., Christians, E.S., Liu, L., Xiao, X., Sohal, R.S., Benjamin, I.J., 2002. Mouse Heat Shock Transcription Factor 1 Deficiency Alters Cardiac Redox Homeostasis And Increases Mitochondrial Oxidative Damage. The Journal Of Embo, 21: 5164-5172.
- Yang L, Quan S, Abraham Ng. Retrovirus-Mediated Ho Gene Transfer Into Endothelial Cells Protects Against Oxidant-Induced Injury. American Journal Of Physiology, 277: 127-133, 1999.
- Young Jc, Agashe Vr, Siegers K, *Et al.* Pathways Of Chaperone-Mediated Protein Folding In The Cytosol. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004 Oct;5(10):781-
- Zhang, M.H., Lee, J.S., Kim, H.J., Jin, D.I., Kim, J.I., Lee, K.J., Seo, J.S., 2006. Hsp90 Protects Apoptotic Cleavage Of Vimentin In Geldanamycininduced Apoptosis. Molecular And Cellular Biochemistry, 281: 111-121.
- Zhang, X.Y., Zhang, M.Z., Zheng, C.J., Liu, J., Hu, H.J., (2009). Identification Of Two Hsp90 Genes From The Marine Crab, Portunus Trituberculatus And Their Specific Expression Profiles Under Different Environmental Conditions, Comparative Biochemistry And Physiology Part C, 4: 465-473. Doi: 10.1016/J.Cbpc.2009.07.002
- Zhao Q, Wang J, Levichkin Iv, Stasinopoulos S, Ryan Mt, Hoogenraad Nj. A Mitochondrial Specific Stress Response In Mammalian Cells. Embo Reports, 21: 4411-4419, 2002.
- Zuhal, U. 2009 .Pseudomonas Sp. Suslarında Cold Shock Protein İzolasyonu Ve Sds – Page Analizi, Yüksek Lisans Tezi, Danışman Burhan, A., Cukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında İran’da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Tahran’da tamamladım. 2006-2010 yılları arasında Tahran üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik bölümünde lisans öğrenimimi tamamlayarak Mikrobiyoloji ve Genetik uzmanı ünvanı ile mezun oldum. Yüksek lisans öğrenimimi 2011-2013 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda tamamladım.