



T.C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
VBY-YL-2014-0002

SAANEN KEÇİLERİNDE HSP 60 ve HSP 70 GENLERİNİN
KANTİTATİF ANALİZİ

Selçuk Ertürk ADIYAMAN

DANIŞMAN

Prof. Dr. Funda KIRAL

AYDIN-2014

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
VBY-YL-2014-0002

SAANEN KEÇİLERİNDE HSP 60 ve HSP 70 GENLERİNİN
KANTİTATİF ANALİZİ

Selçuk Ertürk ADIYAMAN

DANIŞMAN
Prof. Dr. Funda KIRAL

AYDIN-2014

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Selçuk Ertürk ADIYAMAN tarafından hazırlanan “**Saanen Keçilerinde HSP 60 ve HSP 70 Genlerinin Kantitatif Analizi**” başlıklı tez, 12/05/2014 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı ve Soyadı :

1- Prof. Dr. Funda KIRAL

2- Prof. Dr. Ayşegül Günay BİLDİK

3- Prof. Dr. Ferda BELGE

Üniversitesi :

Adnan Menderes Üniversitesi

Adnan Menderes Üniversitesi

Adnan Menderes Üniversitesi

İmzası:



Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans Tezi Enstitü Yönetim Kurulunun
..... Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof.Dr.Sacide KARAKAŞ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışmada Ziraat Fakültesi yakınlarındaki özel bir keçi çiftliğinde aynı yetiştirme koşullarına tabi tutulan klinik olarak sağlıklı farklı yaşlarda 30 keçiden alınan kanlar kullanıldı. Bu kanlardan RNA izolasyonu ve ardından cDNA elde edip, HSP 60 ve HSP 70'in mRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı. HSP 60 ve HSP 70 ekspresyonları değerlendirilerek, keçilerde yaşa bağlı HSP 60 ve HSP 70 ekspresyon değişiklikleri incelendi.

Deney grubumuz; grup I (4-6 yaşlı anaç keçiler) ve grup II (1-8 aylık çepiçler) olarak iki gruba ayrılmaktadır ve 15'er keçiden oluşmaktadır. Bu iki grup arasında ya da grupların kendi aralarındaki HSP 60 ve HSP 70 mRNA ekspresyon düzeyindeki değişimleri Light Cycler Nano Real Time PCR (Roche) cihazı kullanılarak, eş zamanlı olarak ekspresyon düzeyleri izlendi ve sonuçlar kantitatif olarak değerlendirildi.

Araştırma, "Saanen keçilerinde HSP 60 ve HSP 70 genlerinin kantitatif analizi" isimli ve VTF-14026 kodlu proje olarak, Adnan Menderes Üniversitesi BAP komisyonu tarafından desteklenerek gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|---|-------|
| KABUL VE ONAY | i |
| ÖNSÖZ | ii |
| | |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | v |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | vi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | vii |
| RESİMLER DİZİNİ..... | viii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1. Isı Şok Proteinleri | 1 |
| 1.2. Isı Şok Proteinlerinin Görevleri | 3 |
| 1.2.1. Isı Şok Proteinlerin Hücre Dışı Görevleri..... | 3 |
| 1.2.2. Isı Şok Proteinlerin Hücre İçi Görevleri | 3 |
| 1.3. Isı Şok Proteinlerinin Sınıflandırılması ve Fizyolojik Özellikleri | 5 |
| 1.3.1. HSP 100 | 6 |
| 1.3.2. HSP 90 | 6 |
| 1.3.3. HSP70 | 7 |
| 1.3.4. HSP 60 | 9 |
| 1.3.5. Küçük Isı Şok Proteinleri (sHSP) | 11 |
| 1.3.6. Ubikuitin | 12 |
| 1.4. Isı Şok Faktörleri ve Isı Şok Yanıtın Gen Düzenlemesi | 12 |
| 1.5. Isı Şok Proteinleri ve Apoptozis | 15 |
| 1.6. Mitokondriyal Düzeyde Isı Şok Proteinin Hedefleri | 15 |
| 1.7. Post Mitokondriyal Düzeyde Isı Şok Proteinleri Hedefleri | 16 |
| 1.8. Isı Şok Proteinleri ve Homeostazis | 17 |
| 1.9. Isı Şok Proteinleri ve Hastalıklardaki Rolü | 18 |
| 1.9.1. İmmun Sistem Hastalıklarında Isı Şok Proteinleri..... | 18 |
| 1.9.2. İskemi ve Kalp Hastalıklarında Isı Şok Proteinleri..... | 19 |
| 1.9.3. Oksidatif Streste Isı Şok Proteinleri..... | 20 |
| 1.9.4. Viral enfeksiyonlarda Isı Şok Proteinleri..... | 21 |
| 1.9.5. Kanserde Isı Şok Proteinleri | 22 |
| 1.9.5.1. Kanser Tedavisinde Isı Şok Proteinleri | 22 |

| | |
|--|----|
| 1.10. Isı Şok Proteinlerinin Teşhis Yöntemleri..... | 23 |
| 1.10.1. ELİSA | 23 |
| 1.10.2. Western Blotting ve Elektroforez | 24 |
| 1.10.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) | 25 |
| 1.11. Keçi yetiştiriciliği..... | 26 |
| 1.11.1 Saanen keçisi..... | 27 |
| 2. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 29 |
| 2.1. Gereç | 29 |
| 2.1.1. Kullanılan Cihazlar | 29 |
| 2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler | 30 |
| 2.1.3. Primerler | 30 |
| 2.2. Yöntem..... | 31 |
| 2.2.1. Total Kan RNA İzolasyonu | 31 |
| 2.2.2. cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması | 33 |
| 2.2.3. Real Time PCR ile Telomeraz mRNA Ekspresyonunun Kantitatif Olarak Belirlenmesi .. | 33 |
| 2.2.4. PCR Ürününün Agaroz Jel Elektroforezinde Kontrolü | 35 |
| 3. BULGULAR..... | 36 |
| 3.1. Grupların $\Delta\Delta Cq$ Değerleri | 36 |
| 3.2. HSP 60 ve HSP70 genlerinin mRNA Ekspresyonu..... | 38 |
| 3.3. Melting Point (Tm) Analizi | 42 |
| 3.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelinde Kontrolü..... | 44 |
| 3.5. RNA'nın Kantitatif Tayini | 47 |
| 4. TARTIŞMA | 49 |
| 5.SONUÇ | 54 |
| ÖZET | 55 |
| ABSTRACT..... | 56 |
| KAYNAKLAR | 57 |
| ÖZGEÇMİŞ | 74 |
| TEŞEKKÜR..... | 75 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|--------------|-----------------------------------|
| Bax | Apoptotik protein |
| Bcl-2 | B hücreli lenfoma 2 |
| Cdc37 | Hücre bölünmesi döngü protein |
| cDNA | Komplementer DNA |
| dNTP | Deoksiribonükleozid Trifosfat |
| FAO | Dünya Gıda ve Tarım Örgütü |
| G0/G1 | Hücre Döngüsü Fazları |
| HSP | Isı Şok Proteini |
| sHSP | Küçük Isı Şok Proteinleri |
| HSE | Isı Şok Elementi |
| HSBP | Isı Şok Faktörü Bağlanma Proteini |
| HSF | Isı Şok Faktör |
| MCF-7 | İnsan meme hücresi serileri |
| MMP-2 | Matrix metalloproteinaz-2 |
| MMP-9 | Matrix metalloproteinaz-9 |
| NF-Y | Nükleer Faktör Y |
| OPD | O-fenilendiamin dihidroklorid |
| PDGF | Trombosit kökenli büyüme faktörü |
| p23 | Tümör Protein 23 |
| p53 | Tümör Protein 53 |
| p63 | Tümör Protein 63 |
| Smac | Apoptozisi aktive eden protein |
| TNF α | Tümör Nekrozis Faktör α |
| TUİK | Türkiye İstatistik Kurumu |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | Sayfa |
|--|--------------|
| Çizelge 1.1. Isı şok proteinlerinin sınıflandırılması..... | 5 |
| Çizelge 1.2. Isı şok proteinlerinin artışına sebep olan faktörler | 18 |
| Çizelge 2.1.Primer dizilimi tablo | 31 |
| Çizelge 2.2.PCR karışımı (Fast Start Essential DNA Green Master)..... | 34 |
| Çizelge 2.3. Real Time PCR döngü koşulları | 34 |
| Çizelge 3.1. RNA'nın kantitatif tayini | 47 |
| Çizelge 3.2. Grup I ve grup II'deki keçilerin RNA yoğunluklarının ortalamaları | 48 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

| | |
|---|----|
| Şekil 1.1. Isı şok proteinlerinin protein katlanmasını düzenlemesi | 2 |
| Şekil 1.2. Isı şok proteini genlerinin ısı şok faktörü ile transkripsiyonun düzenlenmesi | 14 |
| Şekil 3.1. Grup I (4-6 yaşlı anaç keçiler) ve grup II (1-8 aylık çepiçler)'deki bazı keçilere ait qRT-PCR'den alınan HSP 60 ekspresyon değerlerinin grafiği | 37 |
| Şekil 3.2. Grup I (4-6 yaşlı anaç keçiler) ve grup II (1-8 aylık çepiçler)'deki bazı keçilere ait qRT-PCR'den alınan HSP 70 ekspresyon değerlerinin grafiği | 37 |
| Şekil 3.3. HSP 60 için grup I (1-15) ve grup 2 (16-30)'deki keçilere ait $2^{-\Delta\Delta Cq}$ | 39 |
| Şekil 3.4. HSP 70 için grup I (1-15) ve grup 2(16-30)'deki keçilere ait $2^{-\Delta\Delta Cq}$ değerleri | 39 |
| Şekil 3.5. Grup I ve grup II'deki keçilere ait HSP 60 ekspresyon düzeylerinin grafiksel karşılaştırılması | 40 |
| Şekil 3.6. Grup I ve grup II'deki keçilere ait HSP 70 ekspresyon düzeylerinin grafiksel karşılaştırılması | 40 |
| Şekil 3.7. Grup I ve grup II'deki bazı keçilere ait HSP 60, HSP 70 ve β actin'in qRT-PCR'de elde edilen amplifikasyonun eş zamanlı ekspresyon görüntüsü | 41 |
| Şekil 3.8. Grup I ve grup II'deki bazı keçilere ait HSP 60, HSP 70 ve β actin'in qRT-PCR'de elde edilen amplifikasyonun eş zamanlı ekspresyon görüntüsü | 41 |
| Şekil 3.9. Grup I ve grup II'deki bazı keçilere ait HSP 60 mRNA ekspresyonunun melting point (Tm) grafikleri | 42 |
| Şekil 3.10. Grup I ve grup II'deki bazı keçilere ait HSP 70 mRNA ekspresyonunun melting point (Tm) grafikleri | 43 |
| Şekil 3.11. Grup I ve grup II'deki bazı keçilere ait β actin mRNA ekspresyonunun melting point (Tm) grafikleri | 43 |
| Şekil 3.12. Grup I ve grup II'deki keçilerde RNA'nın kantitatif ölçümünün grafiksel gösterimi. 47 | |

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa

| | |
|---|----|
| Resim 1.1. Saanen keçisi-erkek (A), saanen keçisi-dişi (B)..... | 28 |
| Resim 3.1. Grup I ve Grup II'den rastgele seçilmiş HSP 60 PCR ürünlerinin %1,5'lik agaroz jel görüntüleri. G1 : grup I G II : grup II'yi temsil etmektedir. | 44 |
| Resim 3.2. Grup I ve Grup II'den rastgele seçilmiş HSP 70 PCR ürünlerinin %1,5'lik agaroz jel görüntüleri. G1 : grup I GII : grup II'yi temsil etmektedir. | 45 |
| Resim 3.3. Grup I ve Grup II'den rastgele seçilmiş β actin, HSP 60 ve HSP 70 PCR ürünlerinin %1,5'lik agaroz jel görüntüleri. G 1 : grupI G II : grupII'yi temsil etmektedir..... | 46 |

1.GİRİŞ

1.1. Isı Şok Proteinleri

Artan çevre sıcaklığıyla oluşan ısı şoku yanıtının varlığı, ilk kez Ritossa (1962) tarafından bulunmuştur. İnkübatörde tutulan *Drosophila melanogaster* olarak adlandırılan meyve sineği larvalarının tükürük bezi hücrelerinin politen kromozomlarında artan gen ifadesi sonucu meydana gelen ve puff (şişkinlik) adı verilen yapılar gözlemlenmiş, uygulanan bu kısa süreli yüksek sıcaklığa bağlı olarak normal koşullarda hücre çekirdeğinde bulunan bazı aktif transkripsiyon alanlarının kaybolduğu, buna karşın yeni transkripsiyon alanlarının ortaya çıktığı gözlemlenmiştir.

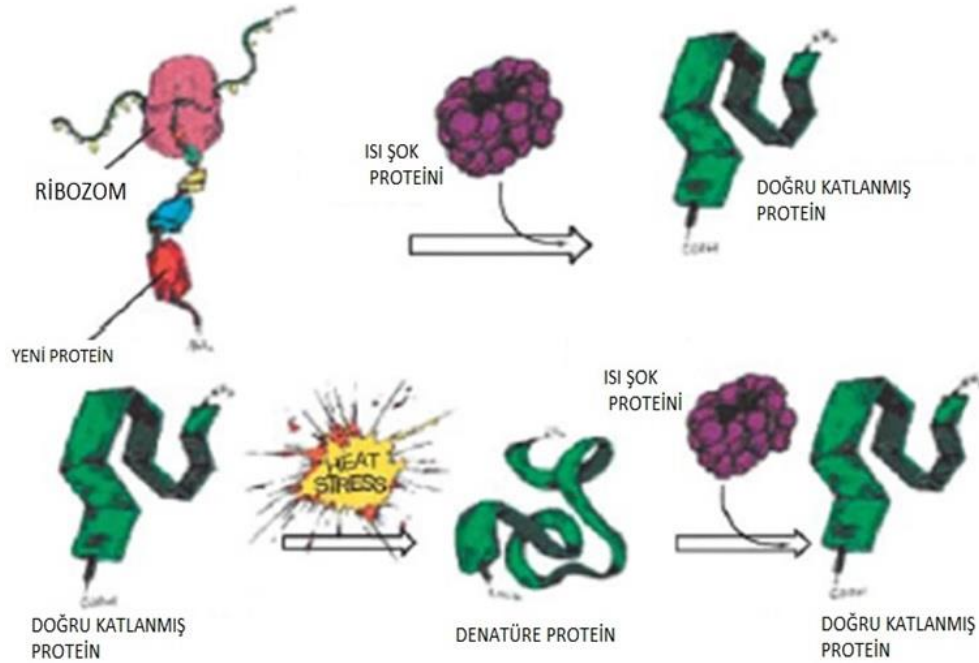
Drosophila kromozomlarının puff bölgelerinde kodlanan proteinler, ilk kez Tissieres ve arkadaşları (1974) tarafından tanımlanmış ve çevre sıcaklığındaki ani artışa bağlı olarak sentezlerinin artması nedeniyle “ısı şok proteinleri” olarak adlandırılmıştır. Sonraki çalışmalar ısı şok proteininin tüm türlerde varlığını göstermiştir.

Daha sonraki yıllarda bu protein grubunun sadece yüksek ateşe bağlı olarak değil anoksi, viral enfeksiyonlar, ağır metaller, kimyasal maddeler, pestisitler, oksijen yetersizliği, glukoz yetersizliği gibi stres faktörlerinde de arttığı saptanmıştır. Bu nedenle bu protein grubu genel olarak stres proteinleri olarak adlandırılmaktadır (Morimoto ve Santoro 1998, Petrof ve ark 2004, Aufrecht 2005).

Proteinlerin 3 boyutlu yapısının nasıl olacağı bilgisi temel olarak proteinlerin aminoasit diziliminde gizlidir. Proteinleri oluşturan aminoasitler protein katlanmaları ile kendi aralarında ve kendilerini çevreleyen ortamla etkileşim halindedir ve bu etkileşimlerin denge halinde olması gerekir (Liberek ve ark 2008). Fizyolojik koşullarda, ısı şok proteinleri protein katlanmasının doğru yürütülmesinden sorumludurlar (Mayer ve Bukau 2005, Bukau ve ark 2006). Hücrede yeni üretilen proteinlerin doğru bir şekilde katlanmasına yardımcı olan maddelere “moleküler şaperon” denilmektedir (Ellis ve van der Vies 1991, Deocaris ve ark 2006).

Şaperonlar tüm canlı organizmalarda bulunur. Protein sentezi sırasında ya da sentezden hemen sonra proteinlerin işlevsel 3 boyutlu yapılarını almalarını sağlarlar. Ancak şaperonların görevi sadece protein senteziyle sınırlı değildir. Çünkü proteinler sentezlendikten sonra 3 boyutlu yapılarını kaybetme riski taşıyabilirler (Voisine ve ark 2010).

Proteinlerin 3 boyutlu yapıları değişen olumsuz çevre koşullarına karşı esneklik gösterebilir. Bu esnekliğin amacı proteinlerin farklı ortamlarda görevlerini en üst düzeyde gösterebilmelerini sağlamaktır. Sıcaklık artışı gibi çok sayıda olumsuz çevresel faktör proteinlerin 3 boyutlu yapısını bozar ve proteinin bulunduğu ortamda çökmesine (agresyonuna) neden olur. Çöken proteinler şaperon gruplarının yardımıyla tekrar eski haline dönüştürülebilir. Bunun için farklı şaperon grupları ortak bir çalışma içinde çalışır. Proteinler önce çözünür duruma getirilir, daha sonra istenilen üç boyutlu yapıya dönüştürülür (Liberek ve ark 2008, Luheshi ve ark 2008, Jellinger 2009) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Isı şok proteinlerinin protein katlanmasını düzenlemesi (William ve ark 2002).

Proteinlerin normal biyolojik faaliyetlerini sürdürürken şaperonlara ihtiyaç duymadığı ancak stres faktörleri ile karşılaştıklarında kendilerini bu stres faktörüne karşı koruyarak faaliyetlerini sürdürmelerinde şaperonların yardımcı olduğu bildirilmektedir (Liberek ve ark 2008).

1.2. Isı Şok Proteinlerinin Görevleri

Isı şok proteinleri hücre içi veya hücre dışında bulunabilir.

1.2.1. Isı Şok Proteinlerin Hücre Dışı Görevleri

Isı şok proteinleri normal olarak hücre içerisinde bulunurlar. Hücrelerin öldüğü ve içeriği dışarı atıldığı durumlarda ise hücre dışında bulunurlar. Bu dağılık hücrelerin planlanmamış ölümü nekroz olarak adlandırılır ve hücrede sadece hatalı olaylar meydana getirir (Pockley 2001). Hücre dışındaki ısı şok proteinleri hastalık veya enfeksiyona karşı bağışıklık sistemini uyarmada çok önemli rol üstlenirler (Laad ve ark 1999).

1.2.2. Isı Şok Proteinlerin Hücre İçi Görevleri

Isı şok proteinlerinin normal görevleri hücre içerisinde (proteinlerin katlanmasına yardım ederek ve proteinlerin hazırlanmasını düzenleyerek) her proteinin bağlayıcı olmasını sağlamaktadır. Isı şok proteinleri hücre içerisindeki peptidleri kuşatarak sınırlandırılmalarını sağlar. Peptitler hücre içine ısı şok proteinleri ile alınır. Bu proteinler hücreşel şaperonlar gibi işlev görürler, protein sentezinde ve taşınmasında görev alırlar. Çünkü bu proteinler benzersiz hücreşel yerleşime sahiptir (Pockley 2001).

Stres sırasında çok sayıdaki enzim ve yapısal proteinde zararlı yapısal ve fonksiyonel değişim meydana gelmektedir. Bu nedenle stres altında bulunan hücrelerin yaşamlarını

sürdürebilmesinde, proteinlerin kendi fonksiyonel konformasyonlarını sürdürmek, doğal olmayan proteinlerin toplanmasını önlemek, denatüre proteinlerin yeniden yapılanması ile tekrar fonksiyonel yapılarına dönmeleri ve fonksiyonel olmayan ama zararlı olabilecek peptidlerin ortadan kaldırılması önemlidir. Böylece, ısı şok proteinleri/şaperonlar hücrel korumada tamamlayıcı rol oynarlar ve bazen de bir arada çalışarak proteinleri streten korurlar (Wang ve ark 2004).

1.3. Isı Şok Proteinlerinin Sınıflandırılması ve Fizyolojik Özellikleri

Farklı araştırmacılar farklı sınıflandırmalar yapsa da ısı şok proteinleri fonksiyonları yapıları ve molekül ağırlıklarına göre; HSP 100, HSP 90, HSP 70, HSP 60, küçük ısı şok proteinleri ve ubikuitin olarak 6 sınıfa ayrılır (Henle ve ark 1998).

Çizelge 1.1. Isı şok proteinlerinin sınıflandırılması (Öztürk ve ark 2009)

| | HSP | Molekül ağırlığı | Fizyolojik yerleşim | Streste yerleşim | Fonksiyon |
|---------------|---------------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|----------------------|
| HSP 90 | HSP100 | 100 | Endoplazmik Retikulum | Endoplazmik Retikulum | Glukoz metabolizması |
| | HSP90α | 86 | Sitoplazma | Sitoplazma | Steroid reseptör |
| | HSP90β | 84 | Sitoplazma | Sitoplazma | Aktin koruyucu etki |
| HSP 70 | HSP80 | 80 | Endoplazmik Retikulum | Endoplazmik Retikulum | İmmunoglobulin |
| | HSP75 | 75 | Mitokondri | Mitokondri | Glukoz metabolizması |
| | HSP73 | 73 | Sitoplazma | Çekirdek | Protein katlanması |
| | HSP72 | 72 | Sitoplazma, Çekirdek | Çekirdek | Protein katlanması |
| HSP 60 | HSP60 | 58,60 | Sitoplazma, mitokondri | Mitokondri | Protein katlanması |
| HSPs | HSP47 | 47 | Mitokondri, Sitoplazma | Mitokondri, Sitoplazma | Kollajene özgü |
| | HSP32 | 32 | Sitoplazma | Sitoplazma, Nucleus | Heme oksijenaz-1 |
| | HSP25 | 25 | Sitoplazma | Sitoplazma | α kristallin |
| | HSP8 | 8 | Sitoplazma, Membran | Sitoplazma, Membran | PDGF |

1.3.1. HSP 100

Ağırlığı 100-110 kDa arası değişen en büyük molekül ağırlığına sahip ısı şok proteindir. Canlı, stres durumunda bulunsun yada bulunmasın, hücrelerinde sürekli olarak HSP 100 sentezlenir. Fizyolojik koşullarda proteinlerin düzenlenmesinde rol alan şaperonlar gibi rol alırlar (Feder ve Hofmann, 1999, Aşkar ark 2007). Özellikle bu aile içinde bulunan HSP 104 yeni denatüre olmuş proteinleri kurtarma yeteneğindedir. Ayrıca vücudun ısı düzenlenmesi, ısı toleransı kazanılması, hücresel düzeyde hipertermiye toleransın geliştirilmesi gibi görevleri olduğu da düşünülmektedir (Feder ve Hofmann 1999, Pockley 2001).

1.3.2. HSP 90

Moleküler şaperon olan HSP 90, stres altında olmayan hücrelerde özellikle mitokondri ve endoplazmik retikulumda yaygın bulunan proteinlerden biridir (Saibil 2008). Sinyal yollarında, proteinlerin katlanmasında ve tümör yayılımının engellenmesinde görev almaktadır. HSP 90'nın DNA dizi analizleri bu proteinin evrim sürecinde en yüksek oranda korunmuş bir gen dizisine sahip olduğunu göstermiştir (Lindquist ve Craig 1988).

Bu ailedeki HSP90α'nın bugün en iyi bilinen özelliği tümörögenез ile olan ilişkisidir (Neckers ve Percy 2003). HSP 90 genellikle HSP70, HSP 40 ve HSP organize edici protein ile birlikte çoklu şaperon yapısı şeklinde bulunur (Pearl ve Prodromou 2000). Hücrelerin iletişimi ve normal morfolojik yapılarının korunmasında önemli görevler üstlenir. HSF 1 ile transkripsiyonu düzenlenir (Westerheide ve Morimoto 2005). Isı artışı ve hipoksi tümöral hücrelerde HSP 90 artışına bağlı olarak tümör direncini arttırır. Bloklanması hücre ölümünü hızlandırır (Fukuyo ve ark 2010).

HSP 90β'nın HSP100 ile benzer etkiler gösterdiği hatta beraber etkinlik gösterdiklerine dair çalışmalar mevcuttur. En iyi bilinen etkileri kalsiyum haberci sisteminde görevli kalmodulini bağlayıcılıklarıdır (Koyasu ve ark 1989). Yüksek konsantrasyonda ise aktin filamentleri ile etkileşime girerler. Etkilerini gösterebilmeleri için Ca⁺² ihtiyaç duyarlar. Ayrıca HSP 90β'nın glukoz metabolizmasında rol aldığı düşünülmekte ve bununla ilgili çalışmalar yapılmaktadır.

Yapılan bir çalışmada diyabetiklerde HSF 1 ve HSP 72'nin azaldığı fakat HSP 90β'da bir artış olduğu gözlemlenmiştir (Atalay ve ark 2004).

Son çalışmalar HSP 90'ın hücre taşıma, hücre döngüsü ve hücre bölünmesinde de rol oynadığını göstermiştir (Saibil 2008).

HSP 90 kanser hücrelerinde normal hücrelere göre 2-10 kat fazla eksprese olur. HSP 90 ile ilişkili proteinler arasında büyüme uyarıcı proteinler kötü huylu değişimi destekleyen kinazlar da bulunmaktadır. HSP inhibisyonu kansere sebep olan çeşitli proteinleri baskılayabilir. Bu yüzden HSP 90 önemli bir tedavi edici hedef kabul edilir (Fukuyo ve ark 2010).

HSP 90 kanserli hücrelerde mutasyona uğramış proteinlerin kararlı hale gelmesine olanak sağlayarak ikili rol oynayabilir. Ayrıca HSP 90'ın mutasyona uğrayan proteinleri tamponlaması tümör gelişimini destekleyebileceği bildirilmiştir (Sherman ve Multhoff 2007).

1.3.3. HSP 70

HSP 70 evrim süresince korunmuş ve üzerinde en çok çalışma yapılmış en önemli ısı şok proteindir (Petrof ve ark 2004, Aufrecht 2005, Mayer ve Bukau 2005, Ojima 2005, Otaka ve ark 2006). Yapılan çalışmalar HSP 70'in hücrede ısı stresi uyarımlı (HSP70) ve kognat (HSC70) olmak üzere iki çeşit protein ailesi üyesi bulunduğu bildirilmiştir (Clark ve Peck, 2009). Sitoplazmada iki temel formu bulunur. HSP 70 olarak bilinen HSP 72 stres durumunda artarken, HSP 73 sürekli üretilir (Otaka ve ark 2006). Yine bu aile içinde yer alan HSP 75 mitokondride, HSP 78 endoplazmik retikulumda bulunur.

Stresin olumsuz etkilerine karşı hücreyi koruyan ve protein katlanmasında rol alan ısı şok proteindir (Ojima 2005). Stres esnasında hücrelerde ısı şok proteinlerinin görevleri yaygın olarak araştırılması sonucu, HSP 70 proteininin moleküler şaperon göreviyle denatüre proteinlerin çökmesini engellediği ve bu proteinlerin yeniden düzgün bir biçimde katlanmasında yardımcı olduğu saptanmıştır (Georgopoulos ve Welch 1993, Baler ve ark 1996). Yapılan çalışmalarda çöken proteinlerin HSP 70-HSP 100 işbirliği ile çözülebilir hale getirildiği ve daha sonra tekrar katlanmaya uğradıkları görülmüştür (Petrof ve ark 2004).

Yapılan son çalışmalar HSP 70'in ökaryotlarda düzenleyici proteinlerinin biyolojik aktivitelerinin düzenlenmesinde de rol aldığını göstermiştir. Bunlar arasında steroid hormon reseptörleri gibi nükleer reseptörler, kinazlar ve transkripsiyon faktörleri bulunur. Bu görevlerinde HSP 70'lere HSP 90, Cdc37 ve p23 gibi proteinler eşlik etmektedirler (Mayer ve Bukau 2005). Bu sayede HSP 70'ler sinyal iletimi, hücre siklusu regülasyonu, differensiasyon ve apoptozda önemli roller üstlenerek onkogenез, nörodejeneratif ve otoimmün hastalıklar, viral infeksiyonlar ve yaşlanma gibi konularda önemli görev üstlenirler (Jäättelä 1999, Kregel 2002).

HSP 70 özellikle HSP 90 ile birlikte hücre ölümü, differensiasyon, proliferasyon ve hücre homeostasisinin korunmasında görev alır (Mayer ve Bukau 2005). HSP 70 apoptozda önemli rol oynayan sistein-proteaz grubu bir enzim olan kaspaz üzerinden apoptozu inaktive eder. HSP 70 düzeyinin artmasıyla TNF α gibi apoptotik faktörlerin işlevleri azalır (Jäättelä 1999). Tersine HSP 70 azalması da apoptozu kolaylaştırır.

Gastrointestinal sistemde strese bağlı olarak HSP 70 artışı gözlemlenmesine rağmen koruyucu bir etki sağlamadığı görülmüştür (Otake ve ark 2006). Başka bir çalışmada (Sakamoto ve ark 2005) gastrointestinal sistemde koruyucu bir etki için HSP 70'in HSP 32'yi ko-şaperon olarak kullandığı öne sürülmüş HSP 70'in kolonda koruyucu etkisi bildirilmiştir (Otake ve ark 2006).

HSP 70'in renal iskemide olumlu etkileri olduğu ve böbrek nakilleri sonrası iyileşme sürecine olumlu katkı sağladığı bilinmektedir (Aufrecht 2005). Bu etkinin detayları tam olarak aydınlatılamamış olsa da bu etkide hücre iskelet yapısının korunmasının önemli görev oynadığı düşünülmektedir (Vicencio ve ark 2003).

HSP 70 ekspresyonu ağız hastalıklarıyla ilgili durumlarda sadece biyolojik stresin bir belirteci olarak değil, aynı zamanda ağız kanserlerinin patogeneğinde de önemli rol oynar. Son zamanlarda iskemi reperfüzyona bağlı olarak HSF 1'in inhibe edilmesinin HSP 70 ve HSP 90 birikimini uyardığı gösterilmiştir. Serbest oksijen radikallerinin iskemik-reperfüze kalpte HSF 1 inaktivasyonu ve HSP 70 ve HSP 90 birikimini de uyardığı gösterilmiştir. Bu aktivasyon allopurinol ve katalaz verilmesiyle önlenabilir (Kaufman 1998).

Yaşla ilgili yapılan bir çalışmada HSP 70 üretiminin yaş artışıyla azaldığı fakat ilginç olarak 100 yaş üzerinde HSP 70 üretiminin tekrar arttığı görülmüştür (Mayer ve Bukau 2005). HSP 70 ailesi konusunda kesin olarak bilinen farklı ko-şaperonlarla etkileşerek farklı etkiler

gösterdikleridir. Fakat hangi ko-şaperonların hangi HSP 70 üyesini nasıl seçtikleri ve sonuçta hangi etkilere neden oldukları henüz net olarak aydınlatılamamıştır.

Birkaç hücre türünde HSP70'in fazla üretilmesi ile ilgili çalışmalar, tümör gelişimine doğru giden hücrelerde HSP 70'in arttığı fikrini desteklemektedir (Volloch ve Sherman 1999). İnsan meme kanseri MCF-7 hücre kültürlerinde HSP 70'in aşırı ekspresyonunun G0/G1 fazının kısılması ile hücre çoğalmasının hızlanmasına neden olduğu bildirilmektedir (Barnes ve ark 2001). Bu etki, HSP 70'in fazla üretimi ile hücre siklus regülatörü olan D1 siklinin stabilizasyonunun sağlanmasına bağlı olabilir (Diehl ve ark 2003, Sherman ve Multhoff 2007).

Tümörlerde HSP 70 ile yapılan çalışmalarda HSP 70'deki azalma çeşitli tümörlerde apoptoz benzeri hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir (Kaur ve Ralhan 2000). HSP 70'deki azalma kanser hücre kültürlerinde hızlı erken yaşlanmaya neden olmaktadır (Yaglom ve ark 2007).

1.3.4. HSP 60

En önemli özelliği mitokondride yer alması ve buradaki en önemli protein katlayıcı molekül olmasıdır (Möbius ve ark 1997, Parcellier ve ark 2003, Deocaris ve ark 2006, Otake ve ark 2006). Bunun dışında hücre zarında da saptanmıştır. HSP 70'e benzer etkiler göstererek bir çok hücrede koruyucu etki gösterir. Ama bu özelliklerini farklı mekanizmalarla gerçekleştirirler (Deocaris ve ark 2006).

Çevre koşullarındaki değişikliğe bağlı olarak HSP 60 sentezi artar ve protein agregasyonlarını önlenerek biyolojik aktivitenin devamlılığı sağlanır. Bu işlevi gören proteinler HSP 60 ailesine aittir ve moleküler şaperonlar olarak adlandırılırlar (Choi ark 2008). Mitokondrial şaperon olarak da isimlendirilen bu ısı şok proteininin temel görevi proteinlerin sitoplazmadan mitokondrial matrikse taşınmasını ve amino asit zincirlerinin doğru bir şekilde işlevsel formlarına katlanmasını sağlamaktır (Johnson ve ark 2003). Bunların dışında hücrede sıcaklık şoku sırasında HSP 60 ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir. Bu da HSP 60'ın sadece moleküler şaperon olarak değil, stres yanıtında da görev aldığı göstergesidir (Gonzalez-Riopadre 2007).

Genetik mutasyonlar ciddi mitokondriyal hastalıklara yol açar (Deocaris ve ark 2006). Mitokondrinin hücrel strese tolerans göstermesi HSP 60 ile olur (Zhao ve ark 2002).

HSP 60'ın prokaryotlardaki homoloğu GroES proteindir ve bu protein ile yapılan çalışmalar mitokondriyal proteinlerin sentezi ve mitokondriyal matrikse taşınmasında HSP 60'ın önemli rolü olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalar HSP 60'ın apoptozisi önlemede de önemli görevleri olduğunu ortaya koymuştur. HSP 60 apoptoziste görevli proteinlerle kompleks bir yapı oluşturarak bu proteinlerin fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Itoh ve ark 2002).

HSP 60 mitokondri yanı sıra, hücre zarından sitosole kadar diğer alt-hücrel kompartımanlarda bulunabilir (Cechetto ve ark 2000, Soltys ve Gupta 1996, Merendino ve ark 2010). Bu bağlamda araştırma için en ilginç konulardan biri de genel olarak kabul edilen mitokondri içi yerlerden farklı yerlerde bu şaperonin yapısı ve fonksiyonudur. Örneğin bazı veriler monomerik ve heptamerik formları (Levy-Rimler ve ark 2001) arasındaki dengeyi işaret ederken, diğer sonuçlar sitosolik HSP 60'ın apoptozis aktivasyonuna katıldığını (Chandra ve ark 2007), bazen de monomerik formda olduğunu (Taguchi ve ark 1994) göstermektedir. Her iki durumunda birbirini dışlamadığı görülmektedir.

HSP 60 tümörlü hücrelerin veya normal hücrelerin membranında da bulunur. Buradaki HSP 60'ların fazla miktarda bulunması immüno sistem için bir tehlike sinyali oluşturduğu ve böylece dendritik hücrelerin aktivasyonu ve anti-tümör T hücrelerin cevabının oluşmasında önemlidir (Thomas ve ark 2005).

HSP 60'ları bazı büyüyen tümör hücreler için esansiyel olduğu bile düşünülmektedir. Ayrıca in vitro araştırmalar göstermiş ki HSP 60 eksikliği osteosarkoma büyümesini engellemektedir (Thomas ve ark 2005).

Kalp yetmezliğinde, HSP 60 durumun izlenmesi için klinik bir belirteç olarak önem kazanmaktadır (Gupta ve Knowlton 2007, Lin ve ark 2007, Latif ve ark 1999). HSP 60 sitozol içinde aşırı şekilde eksprese edilir, hücre zarında lokalize olur ve aynı zamanda stres miyokardiositleri tarafından salgılanabilir (Gupta ve Knowlton 2007, Lin ve ark 2007).

Deneyisel olarak subaraknoid hemoroji oluşturulan ratlarda muhtemelen koruyucu bir mekanizma olarak HSP 60'ın aşırı ekspresyonu gözlenmiştir (Satoh ve ark 2003).

1.3.5. Küçük Isı Şok Proteinleri (sHSP)

Ağırlığı 15-40 kDa arası değişen en küçük molekül ağırlığına sahip ısı şok proteindir. Birçok molekül bu gruba dahil edilse de ortak olarak 100 aminoasitlik bir yapı içerirler (Sun ve McRae 2005). Sitoplazma ve çekirdekte bulunur. HSP 60 ve HSP 70 den farklı olarak protein katlanmasında görevleri yoktur. Bunun yerine hücresel denge, hücre hasarına karşı cevap ve çeşitli hastalıklarda önemli görevleri vardır (Wang 2004, Pantzartzi ve ark 2009).

Hücre zarını ve hücre yapısını koruyucu etki yaparlar (Sun ve McRae 2005). HSP 60, HSP 70, HSP 90 ve HSP 110 ile birlikte çalışarak yeni üretilen proteinlerin çökmesini engellerler (MacRae 2000). Yüksek yapılı organizmalarda (ökaryotlarda) hücre iskelet sistemi yapılarını oksidatif stres, ısı ve kimyasal ajanlara karşı korur (Mounier ve Arrigo 2002, Sun ve Mcrae 2005).

Büyük molekül ağırlıklı HSP'ler çok sayıda organizmada bulunurken kristal yapıdaki sHSP'ler türlere spesifik olarak bulunur ve tanı amacıyla kullanılmaktadır. Örneğin sHSP'lerden olan HSP 40 balıklarda, midye ve salyangoz gibi deniz canlılarında tespit edilmiştir (Lyons ve ark 2003, Tomanek 2005).

HSP 27 küçük HSP'lerin majör üyesidir. Kanseri hücrelerinde fazla miktarda bulunurlar ve tümör oluşumunda majör olarak görev alırlar. HSP 27'nin yüksek ifadenişi apoptozu engeller. Diğer yandan HSP 27'nin yüksek ekspresyonu gen toksik ilaçlar ve oksidanlarca senesensin (yaşlanmanın) baskılanmasıyla sonuçlanır. Burada HSP 27' nin rolü HSP 70'e benzemektedir. HSP 27'nin antiapoptotik ve antisenesentik etkilerinin yanında bu şaperon metastaz ve hücre göçünde de majör olarak görev alır. HSP 27' nin hücre göçündeki görevi aktin hücre iskeletiyle etkileşimiyle açıklanır. HSP 27 fosforlayıcısının yeni bir inhibitörü tümör hücre göçünü ve invazyonu baskılar. Diğer taraftan HSP 27 metastaz için esansiyel metalloproteazlar MMP 2 ve MMP 9'un ifadenmesi için kritiktir. Ayrıca HSP 27'nin yakın homoloğu α crystallinin çok ifadenmesi memeli epitelyum hücrelerini ölümsüzleştirir (Sherman ve Multhoff 2007).

1.3.6. Ubikuitin

Isı şok proteinleri içinde yer alan ve HSP 8 olarak adlandırılan bir protein daha vardır. HSP 8 evrim sürecinde yüksek oranda korunmuştur ve tüm ökaryotlarda yaygın olarak bulunur. Bu ısı şok proteini, proteolizis adı verilen protein yıkımına (degradasyonu) işleminde rol almaktadır. Protein yıkımındaki görevi nedeniyle hücre stres yanıtı mekanizmasının bir parçası olan bu proteinin ısı şoku karşısında hücre içerisindeki düzeyinin arttığı belirlenmiştir. Hem maya hem de tavuklarda ubikuitin proteininin ısı şoku uyarımlı olduğu saptanmıştır (Lindquist 1986).

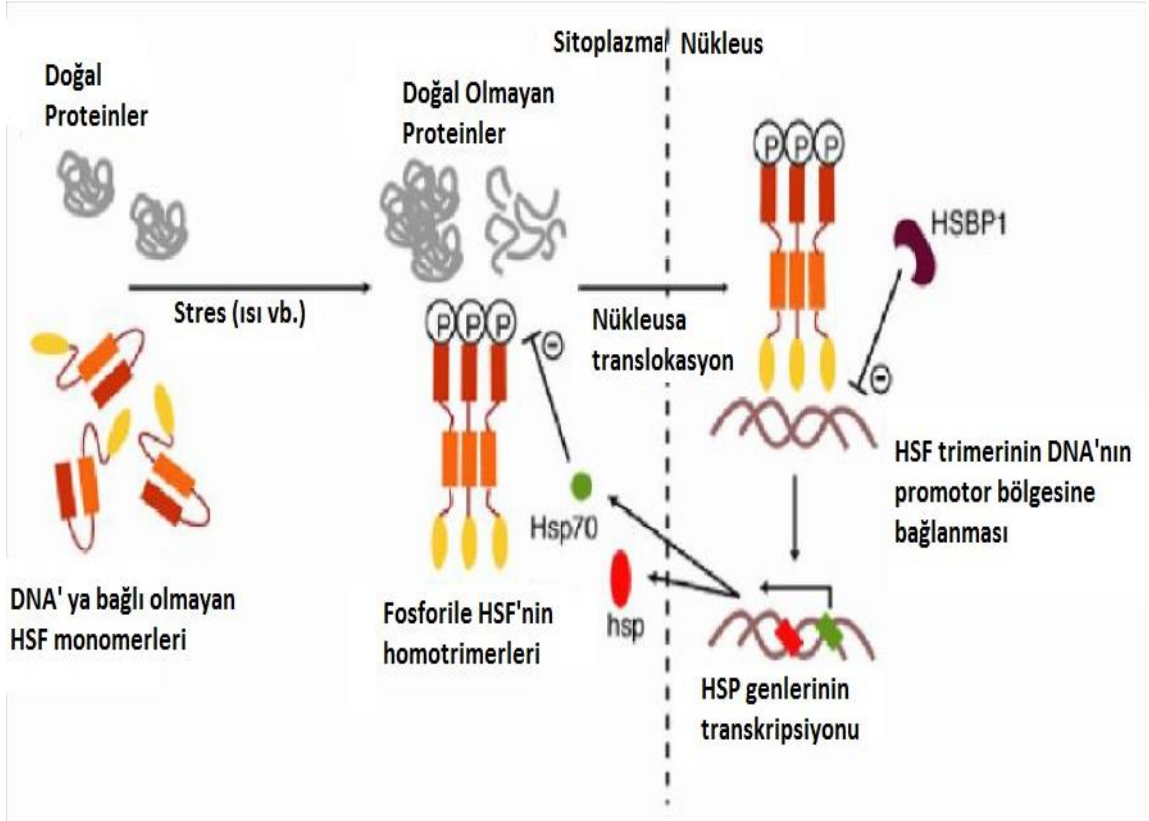
1.4. Isı Şok Faktörleri ve Isı Şok Yanıtın Gen Düzenlemesi

Strese karşı hücrel yanıt mekanizmasında ısı şok faktörleri (HSF) görev almaktadır (Pirkkala ve ark 2001). Omurgalılarda saptanan HSF'lerden HSF 1, HSF 2 ve HSF 4 yaygın iken, HSF 3 yalnızca kanatlılarda görülmektedir. HSF 1 ve HSF 2 genlerinin memeli genleriyle homolog oldukları ancak HSF 3 geninin yeni bir ısı şok faktör geni olduğu saptanmıştır (Nakai ve Morimoto 1993). Stres uyarımlı genlerin transkripsiyonun başlaması ve diğer hücrel proteinlerin sentezinin durdurulması için HSF'lerin aktivasyonu gerekmektedir. HSF'ler, ısı şok genlerinin karakteristik pentanükleotid 5'-nGAAn-3' dizisini taşıyan ısı şok elementi (HSE) bölgesine bağlanarak stres uyarımlı gen ekspresyonunu başlatmaktadırlar. Isı şok faktörlerinin yapısının, helix-turn-helix DNA bağlanma domaini, trimer yapısının oluşturulması için gerekli bitişik 80 rezidüel hidrofobik tekrar bölgesi ve C- karboksil ucu transaktivasyon domaininden oluştuğu saptanmıştır (Wishniewski ve ark 1996, Morimoto1998).

HSF 1'in çalışması; ısı şoku, oksidatif stres ya da amino asit analogları gibi doğal olmayan proteinlerin, hücrede sentezine izin veren tüm stres durumlarında uyarılmaktadır. Isı şoku, protein sentezinin engellenmesine, yeni oluşan polipeptid zincirlerinin yanlış katlanmasına sebep olmaktadır. HSF 1, doğal olmayan proteinlerin varlığında gösterilen hücrel tepkide önemli görevi olan bir transkripsiyon faktörüdür (Morimoto 1998).

HSF 1 ve HSF 3 kanatlı hücrelerinde kimyasal ve fiziksel stres altında aktive olmaktadır. Yalnızca kanatlı hücrelerinde bulunan HSF 3'ün stres altında HSF 1 ile beraber eksprese olmasına rağmen düzenleme mekanizmasının bağımsız olduğu saptanmıştır (Nakai ve Morimoto, 1993, Nakai ve ark 1997). Tanabe ve ark (1998) HSF 3 faktörünce eksik hücrelerde HSF 1'in DNA'ya bağlanma işlevini gerçekleştirmesine rağmen ısı şoku yanıtının belirgin şekilde azaldığı saptanmıştır. Hücelere yeniden HSF 3 geni yerleştirildiğinde ısı şoku yanıtının düzeldiğini bildirmişlerdir. Bu da HSF 3'ün kanatlı ısı şoku mekanizmasında önemli görevinin olduğunu göstermektedir. Isı şok yanıtı, doğal olmayan proteinlerin hücrede belirmesi ve HSF 1 proteininin aktivasyonu ile bağlantılıdır ve proteinlerin yanlış katlanmalarının önlenmesi amacıyla moleküler şaperon özelliği gösteren ısı şok proteinlerine ihtiyaç duymaktadır (HSP 90, HSP 70 vb.). Isı şoku gibi stres durumlarında HSF 1 üzerindeki baskı ortadan kalkmakta ve transkripsiyonel olarak aktif trimerler oluşturmaktadır. HSP 70 geninin transkripsiyonu, genin kodlama bölgesinin upstream kısmında yer alanısı şok elementi (HSE) dizisine ısı şokfaktörünün (HSF) bağlanmasıyla başlamaktadır. HSP genlerinin transkripsiyonu adım adım ilerleyen bir süreçtir (Morimoto 1998). Bu aşamalar aşağıdaki gibi sıralanabilir.

1. HSF monomerlerinin sitoplazmadan çekirdeğe taşınır.
2. Monomerik HSF ünitelerinin trimerik forma dönüşür.
3. HSF trimerinin ısı şok genlerinin promoter bölgesindeki HSE'ye (heat shock element) bağlanır.
4. HSF trimerinin fosforilasyonu ile genin transkripsiyonel aktivasyonunun başlar ve ısı şok proteini miktarının artar.



Şekil 1.2. Isı şok proteini genlerinin ısı şok faktörü ile transkripsiyonun düzenlenmesi (Aşkar ve ark 2007)

HSF hidrofobik bölgeleriyle etkileşime giren ve düzenlemede görev alan HSBP1 (ısı şok faktörü bağlanma proteini) Satyal ve ark (1998) tarafından saptanmıştır. Bu protein HSF1 proteininin trimerik yapısıyla ve HSP70 geni ile etkileşime girerek stres yanıtı mekanizmasında rol almaktadır. Isı şoku yanıtı azalmaya başladığında ise HSF1'in transkripsiyonel aktivitesi doğrudan HSP 70'in bağlanmasıyla azalır, HSBP1 aracılığıyla negatif olarak düzenlenmektedir. HSBP1 hem HSF1 hem de HSP70 proteininin hidrofobik altı tekrar bölgelerine bağlanarak kontrol edilmektedir. Bu şekilde trimerik formun yeniden monomerik inert forma çözülmesi aşaması tetiklenmektedir.

1.5. Isı Şok Proteinleri ve Apoptozis

Isı şok proteinleri kaspaz aktivasyonunu engelleyerek apoptozisi bloke edebilirler. HSP 27, HSP 60, HSP 70 ve HSP 90'ın aşırı sentezlenmesi apoptozisi inhibe edebilir (Arrigo 1998). 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 (Csermely 2001, Soti ve ark 2003). Bunun karşın HSP 27, HSP 60, HSP 70 ve HSP 90'ın yeterli düzeyde sentezlenmemesi hücrelerin apoptotik uyarılara duyarlılığını artırır. Bazı hücrelerde HSP 70 kaybı başka herhangi bir stres faktörü olmaksızın kaspaz-3 aktivasyonu ile başlatılan apoptotik süreç için yeterlidir (Yamagishi ve ark 2002). Böylece HSP'ler doğrudan ya da dolaylı olarak kaspaz aktivasyonunun modülasyonu ile apoptozisde görev almaktadır. HSP'ler üç noktada önemli proteinlerle tepkimeye girerek intrinsik ve ekstrinsik apoptotik yolları 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 ve ark 2008).

1.6. Mitokondriyal Düzeyde Isı Şok Proteinin Hedefleri

Hücre kültürlerinde HSP 27'nin sitokalsin D ya da staurosporin etkisinde hücre iskeletinin bozulmasını ve mitokondriden sitokrom c salınımını engellediği belirlenmiştir (Paul ve ark 2002). HSP 27 aynı zamanda mitokondriden Smac (apoptozisi aktive eden protein) salınımını da inhibe edebilir (Chauhan ve ark 2003). HSP 70 HSP 40 ile eşleşerek Bax gibi apoptotik proteinlerin mitokondri dış membranına lokalizasyonunu engeller ve mitokondri dış membran geçirgenliğini korur (Stankiewicz ve ark 2005). HSP 60 ile Bax proteinleri kompleks oluşturarak apoptozisi inhibe edebilmektedir (Ruchalski ve ark 2006). HSP 60'ın Bax'dan ayrılması bu proteinin mitokondriye bağlanmasına neden olur ve apoptozis indüklenebilir (Kirchhoff ve ark 2002). Tümör hücrelerinde HSP 90 mitokondride TRAP molekülü ile birlikte

bulunur. Mitokondride bulunan HSP 90 mitokondri membran geçirgenliğini ve sitokrom c salınımını kontrol eder. HSP 90'ın çeşitli ajanlarla inhibisyonu mitokondri membranında depolarizasyona neden olur ve doza bağımlı sitokrom c salınımı gözlenir. Bu durum HSP 90'ın normal hücre mitokondrilerinde değil de tümör hücrelerindeki mitokondrilerde şaperon işlevlerinin kanser tedavisinde kullanılması açısından önemli olabilir (Kang ve ark 2007). Bazı araştırmalar mast hücrelerinde Bcl2/HSP 90 kompleksinin mitokondrilerden sitokrom c salınımını inhibe ederek kaspaz-3 aktivasyonunu engellediğini göstermiştir (Cohen-Saidon ve ark 2006).

1.7. Post Mitokondriyal Düzeyde Isı Şok Proteinleri Hedefleri

HSP 27'nin mitokondriden sitosole sitokrom c salınımını engelleyerek kaspaz aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Bruey ve ark 2000). İnsan monositlerinde apoptozis sırasında HSP 27'nin aktif kaspaz-3'ü bloke ettiği belirtilmiştir (Voss ve ark 2007). HSP 27 aynı zamanda hücrede serbest radikal miktarını azaltarak ve okside proteinlerin toksik etkilerini nötralize ederek antioksidan savunmayı artırır (Rogalla ve ark 1999). HSP 27 apoptozisin son aşamalarında meydana gelen membran şişmesi gibi morfolojik değişimleri de etkileyebilir (Coleman ve ark 2001). Aktin-miyozin sistemi membran şişmesinde kontraktıl gücü sağlar, burada HSP 27 f-aktin'nin reorganizasyonunda görev alır (Pivovarova ve ark 2007).

HSP 70'in sitokrom c salınımını inhibe ederek kaspaz-3 aktivasyonunu engellediği ve böylece apoptozisi inhibe ettiği belirlenmiştir (Li ve ark 2000). Buna ek olarak HSP 70'in Apaf-1 molekülüne doğrudan bağlanarak prokaspaz-9 ile apoptozom oluşumunu engellediği belirtilmiştir (Beere ve ark 2000). HSP 70'in ATPaz bağlanan bölgesi bu etkileşim için gereklidir (Saleh ve ark 2000). TNF indüklü apoptozisde HSP 70 kaspaz-3 aktivasyonuna engel olmaz, fakat fosfolipaz A2'nin aktivasyonu gibi hücre ölümünün karakteristiği olan morfolojik değişimlerden korur (Jäättelä ve ark 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 HSP 70 tarafından HSP 40 ve ICAD'ın ko-şaperon etkisiyle düzenlenir. ICAD CAD'ın inhibitörüdür (Sakahira ve Nagata 2002).

HSP 90 Apaf-1'in işlevini negatif yönde etkiler. HSP 90 Apaf-1'e doğrudan bağlanır ve prokaspaz-9 ile oligomerizasyonunu engeller (Pandey ve ark 2000). Ara filamentlerin en önemli bileşeni olan vimentin apoptotik uyarılara yanıt olarak parçalanır. HSP 90 vimentine bağlanır ve apoptotik parçalanmayı engeller (Zhang ve ark 2006). HSP 60 ve HSP 10'un proapoptotik rollerinin olduğu gösterilmiştir. HeLa ve Jurkat hücrelerinde camptothecin ya da staurosporin ile kaspaz-3 aktivasyonu mitokondriden HSP 60 ve HSP 10'un salınımı ile birlikte meydana gelir. Çalışmalar in vivo ve in vitro ATP bağımlı süreçte prokaspaz-3'ün sitokrom c ile aktivasyonunun HSP 60 ve HSP 10 ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Samali ve ark 1999).

1.8. Isı Şok Proteinleri ve Homeostazis

Isı şok proteinleri yalnızca proteinlerin tekrar katlanması ya da yanlış katlanmış, denatüre olmuş proteinlerin uzaklaştırılmasına yardımcı olmaz, aynı zamanda birçok açıdan hücrel yaşamda kritik rolü olan çok sayıda hücrel proteinin sentezlenmesini sağlar. Hücrel homeostazın sağlanmasında HSP'lerin çok sayıda rolü bulunmaktadır (Sreedhar ve Csermely, 2004). Oksidatif stres apoptotik süreç için önemli bir sinyaldir. Hücrel 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 ve ark 2002).

HSP'ler hücrel redoks durumunun korunmasında antioksidan olarak görev yaparlar. Hem oksijenaz, bilirubin ve biliverdin antioksidantların üretiminden sorumlu bir HSP'dir. HSP 70'in oksidatif stres koşullarında peptid kompleks stabilitesi ve peptid bağlanma yeteneğinin artırılmasını sağladığı bilinmektedir. Hücrede redoks durumu HSP 70 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'inaktivasyonuna neden olurken, redoks homeostazında büyük değişimler HSF 1'i inhibe etmektedir (Sreedhar ve Csermely 2004).

1.9. Isı Şok Proteinleri ve Hastalıklardaki Rolü

Stres yanıtının önemi açıklanmasına rağmen, son zamanlarda yapılan araştırmalar sadece ısı şok proteinlerinin hücrenin hayatta kalması ve patojenik hastalıkların kontrolü üzerindeki rolüne odaklanmıştır (Clark ve Muchowski 2000).

Çizelge 1.2. Isı şok proteinlerinin artışına sebep olan faktörler (Aşkar ve ark 2007)

| Çevresel faktörler | Hastalık durumu | Normal hücre etkileşimi |
|--|-----------------|-------------------------|
| Yüksek ve düşük sıcaklık gibi ısı şoku | Ateş | Normal hücre döngüsü |
| Ağır metal geçişleri | Yangı | Büyüme faktörleri |
| Enerji metabolizması inhibitörleri | İskemi | Gelişme ve farklılaşma |
| Kemoterapötik ajanlar | Hipertrofi | |
| | Hücre Hasarı | |
| | Malignensi | |

1.9.1. İmmün Sistem Hastalıklarında Isı Şok Proteinleri

Isı şok proteinleri, pek çok patojenik ajanın konakta immün yanıtı sebep olan başlıca antijenlerdendir (Andersen ve ark 1990, Young 1990). Isı şok proteinlerine karşı gelişen immün yanıtlar ileri derecede kros-reaktif olup anti-self reaksiyona bile neden olabilir. Bir tür T hücre tipinin hem yabancı hem kendi HSP'lerini tanıyabildiği gösterilmiştir. Sağlıklı bireylerin, enfekte, transforme veya bir şekilde strese maruz kalmış kendi hücrelerini uzaklaştırmak için self stres protein determinantlarına karşı immün cevap oluşturma kapasitelerini kullanabilecekleri ileri sürülmektedir. (Lydyard ve van Eden 1990, Young 1990). İşte bu anti-self kapasiteyi düzenlemedeki bozuklukların, bazı otoimmün hastalıklara neden olabileceği düşünülmektedir.

Stress proteinleri immün cevap hedefi olmak yanısıra antijen sunulmasında da önemli rol üstlenebilirler (Young 1990, Margulis ve ark 1991).

Bazı otoimmün hastalıklarda, ısı şok proteinlerine karşı yüksek düzeyde oto antikorlar saptanmışsa da önemleri henüz net olarak ortaya konamamıştır. (Bahr ve ark 1990, Win row ve ark 1990, Young 1990). Isı şok proteinlerinin genel olarak hücre içinde bulunduğu düşünülse de, stres altında kalan bazı hücrelerin zarlarında da ısı şok proteinlerinin olabileceğine dair kanıtlar vardır. Bu hücreler, anti-stres protein antikorları için hedef teşkil ederek diğer otoimmün reaksiyonları tetikleyebilirler (Gill ve ark 1998). Isı şok proteinlerinin hem eksojen patojenlerde, hem de endojen memeli organizmasında bulunması ve inflamasyon gibi stres hallerinde düzeyinin artması ısı şok proteinlerinin otoimmünitenin tetiklenmesinde görevi olabileceğini düşündürmektedir (Kuroda ve ark 1998).

1.9.2. İskemi ve Kalp Hastalıklarında Isı Şok Proteinleri

İskemiye uyarılabilir HSP 70 yanıtı takip eder. Kısa bir süre önce yapılan çalışmalarda köpek kalbindeki iskemiye bağlı olarak mRNA ve protein düzeyinde HSP 70'te belirgin bir artış görülmüştür (Dillmann ve ark 1986, Mchta ve ark 1988). Bu bulgular iskemik yaralanmalarda HSP 70 ekspresyonunun koruyucu etkisinin olup olamayacağı sorusunu gündeme getirmiştir. Bu konun araştırması için rat kalbinden üretilmiş H9C2 hücre kültürü ile yapılan çalışmada HSP 70'in aşırı ekspresyonuyla iskemik strese karşı dirençte önemli bir artış bulunmuştur (Mestril ve ark 1994).

Daha sonra bu koruyucu etki in vivo ortamda da gösterilmek istendi. Bunun için ilk çalışmalarda HSP 70'in koruyucu etkisini araştırmak için izole fare periosteum kalp modeli kullanılmıştır. Çalışma sonunda belirgin şekilde iskemik yaralanmalara karşı koruyucu etkinin varlığı görülmüştür (Marber ve ark 1995).

Çalışmalar daha sonra genişletilerek Kaliforniya San Francisco Üniversitesinden Dr Wolfe'nin de katılımıyla in vivo ortamda farelerde enfarktüs üzerinde çalışılmıştır (Huter ve ark 1996). Farelerin sol coroner arteri 30 dakika süre ile kapatılıp ardından 120 dakika reperfüzyon sağlanarak enfarktüs oluşturulmuştur. Enfarktüsün boyutu farelerin ötenazisinden sonra belirlenmiş ve HSP 70 pozitif transgenik farelerde enfarktüste % 50 oranında azalma bulunmuştur.

HSP 60 ve HSP 10'in koruyucu etkisi ile ilgili yapılan çalışmalarda izole neonatal miyositler virus ile enfekte edilerek iskemi oluşturulmuştur. Bu çalışmanın sonunda ilginç sonuçlar elde edilmiştir. HSP 60 ve HSP 10'in sadece ko-ekspresyonu iskemiye karşı koruyucu etki gösterdiği, bunun aksine ayrı ayrı HSP 60 ve HSP 10'in koruyucu etkilerinin olmadığı görülmüştür (Mestril ve ark 1996).

1.9.3. Oksidatif Streste Isı Şok Proteinleri

Isı şoku, oksidatif stres, ozmotik stres, ağır metaller gibi birçok stres faktörü normal hücrel faaliyetler için olumsuz etki yaratırlar. Canlılar bu ve diğer çevresel ve psikolojik strese karşı hayatta kalabilmek için özel savuna mekanizmalarına sahiptirler. Aerobic canlılar sürekli olarak oksijenden türetilen serbest radikallerin etkisine maruz kalmaktadır. Oksidatif strese büyük ölçüde redox reaksiyonları, kimyasallar, enfeksiyonlar ve normal fizyolojik faaliyetlerinin ara ürünü olan süperoksit anyon (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve radikal hidroksil (OH^\cdot) aracılık eder (Halliwell ve Gutteridge 1984). Bu serbest radikaller yağlar, nükleik asitler, proteinler gibi önemli hücrel makromoleküllere zarar verebilir. Süperoksit dismutazlar ve katalazlar oluşan serbest radikalleri daha zararsız ürünlere dönüşmesine aracılık etmesi bakımından oksidatif stresten korunmada önemli rol oynarlar (Halliwell 1994).

Oksidatif stres HSP ekspresyonuna sebep olur. Stres altında ratlarda vasküler endotelial hücrelerde HSP düzeylerinin arttığı görülmüştür. Kan basıncındaki ani artış bu yanıtlara bağlanmıştır (Landry 1998). Isı şok proteinlerin hücre döngüsü ve hücre ölüm düzenleyicileri gibi çok sayıda sinyal molekülleri ile ilişkili olarak, hücrel sinyal ağında anahtar rol oynadığı belirlenmiştir. Bu konuda yapılan çok sayıda çalışma, bitkiler ve diğer canlılarda etkileşim mekanizmalarının benzer olduğunu ortaya koymuştur (Wang ve ark 2004). Memeli hücrelerinde, sHSP'ler antioksidan özellikleri ile sadece oksidatif strese karşı korunmada değil , aynı zamanda diğer hücrel fonksiyonların (apoptozis ve farklılaşma gibi) modülasyonunda görev aldığı bilinmektedir (Arrigo 1998).

1.9.4. Viral enfeksiyonlarda Isı Şok Proteinleri

Isı şok proteinlerinin ekspresyon düzeyi yüksek ateş gibi fizyolojik uyarıcılarla yüksek ölçüde değişiklik gösterir (Su ve ark 1999). Ateşli hastalıklarda beyin de dahil olmak üzere birçok doku ve organda HSP 70 düzeyi artar (Morrison-Bogorad 1995).

Virus enfeksiyonlarında virusa karşı ateşli tepkinin bir sonucu olarak HSP 70'in direkt ya da indirekt ekspresyonunda da artış olur. Örneğin vücut sıcaklığını yüksek seyrettiği kızamık virüsü enfeksiyonunda HSP 70 düzeyinde artış görülmektedir (Oglesbee ve Krakowka 1993, Morrison-Bogorad 1995, Hutchins ve ark 2004, Mayer 2005).

Virüs kaynaklı enflamatuvar sitokinler indirekt HSP 70 uyarımına aracılık etmektedirler. HSP 70 indüksiyonu viral antijen (-) astrositlerin yanısıra viral antijen (+) astrositlerde de gözlenmiş ve bu bulgular köpek gençlik hastalığında beyindeki bulgularla desteklenmiştir (Oglesbee ve Krakowka 1993).

HSP 70'in direkt virus uyarımı yanlış katlanmış proteinlere yanıt olarak gerçekleşebilir. Yanlış katlanma sonucu hücre homeostazisi bozulur ve HSP üretimi artar. HSP 70, proteinlerin doğru bir şekilde katlanabilmesine aracılık eder ve hücre homeostazisinin korunmasına yardımcı olur. Oluşan viral proteinler ya da yanlış katlanmış proteinler, HSF'lere bağlanmak için HSP 70 ile yarış içine girerler. Böylece hücrede serbest ve aktif HSF seviyesi artar (Morimoto ve ark 1994).

Proteinlerin yanlış katlanmasına sadece HSP 70 yanıtı gerçekleşmez. Hepatit C enfeksiyonunda endoplazmik retikulumda bulunan Grp78/Bip (HSP 70-5) ve Grp94 (HSP 90) ile viral yanlış katlanmış proteinler golgi cisimciğinde tutulur (Lieberman ve ark 1999).

HSP 70 ailesine bir bütün olarak bakıldığında hücrede protein katlanmalarına aracılık etmek yanında virus replikasyonuna da destek olmaktadır (Erbse ve ark 2004). Destek mekanizması her bir HSP 70 üyesi için farklılık göstermektedir ve mekanizma en iyi DNA viruslarında anlaşılmaktadır (Mayer 2005).

1.9.5. Kanserde Isı Şok Proteinleri

Tümör hücreleri bir hücrenin şekil değiştirmesiyle oluşur. Bu tümör hücrelerinde; büyüme sinyallerinde yeterlilik, büyüme inhibisyonuna duyarsızlık, programlı hücre ölümünden kaçınma, sınırsız replikatif potansiyeli, devamlı damar büyümesi (anjyogenezis), doku istilası ve metastaz gibi değişimler görülür (Sherman ve Multhoff 2007).

Isı şok proteinlerinin kanser gelişimindeki etkilerini apoptoz, hücre yaşlanması gibi antikanser mekanizmaların baskılanması, immün sistem aktivasyonu ve metastatik genlerin ekspresyonlarının hızlandırılması gibi mekanizmalarla sağlanmaktadır. Isı şok protein inhibitörleri kansere özgü proteinleri hedef alması ve otonom büyümeyi inhibe etmesi nedeni ile kanser tedavisinde önemli bir yer tutmaya başlamıştır (Öncel 2012).

Kanserde HSP genlerinin artmış transkripsiyonu birkaç mekanizma ile açıklanabilir. Normal hücrelerde HSP regülasyonu için temel mekanizma; tümör hücrelerindeki supresör p53 ve bununla ilişkili p63 proteinleri, HSP geninin protomer bölgelerinde bulunan NF-Y transkripsiyon faktörüne bağlanarak HSP genlerinin transkripsiyonunu baskılar (Taira ve ark 1998, Sen ve ark 2011). p53 mutasyonu, transformasyon boyunca genetik değişikliğe neden olur. Bu değişiklikler HSP 70'in artmış transkripsiyonuna neden olur (Agoff ve ark 1993, Tsutsumi-Ishii ve ark 1995).

1.9.5.1. Kanser Tedavisinde Isı Şok Proteinleri

Başlangıçta HSP'lerinin kanser tedavisi için hedef alınması pek mümkün görünmüyordu. Yakın zamanlarda HSP 90'ın ATPaz domaininin antikanser tedavisi için kullanılan oldukça etkili ve benzersiz bir hedef olduğu tesbit edildi (Workman, 2004). HSP 90'ı hedef alan ilaçların hem normal hem de kanser hücrelerini hedef alması beklenirken, özellikle kanser hücrelerini etkilediği görüldü ve ilginç olarak bu antikanser ilaçlar normal hücreleri koruyucu özellik gösterdiği fark edildi. (Vishal ve ark 2011)

HSP 90'ı hedef alan inhibitör ilaçlar, onkogenler ve kanserden üretilen mutant proteinlerin gen ifadesinin artmasına sebep olurlar. Bu inhibitörler kanserin özgün proteinlerini hedef almaları ve kanserin otonom büyümesini inhibe etmesi dolayısı ile kanser tedavisinde ümit

verici gözükmektedirler (Neckers 2002, Smith ve Workman 2007, Marissa ve ark 2008). Bu ilaçlara karşı muhtemel yan etki dirençli vakaların ortaya çıkması ile oluşur (Calderwood 2010).

Kanserde HSP'lerinin artması, bunların biyolojik adjuvan özelliğinden dolayı kanser immunterapisinde kullanılmasına olanak sağlamıştır (Calderwood 2005). Örneğin HSP 70 ve HSP 110 tümör antijenleri ile ilişkili olup, kolayca ekstrakte edilerek otolog aşı olarak kullanılabilir (Srivastava 2002, Manjili ve ark 2003). HSP'leri kanser hücrelerinde nekrotik mekanizmalar aracılığı ile yıkıma uğrattılırken uzak bölgedeki hücreler, primer hücreden salınan HSP'lerinin artmasına bağlı olarak spesifik immun yanıt tarafından yıkıma uğrattılırlar (Calderwood 2005).

1.10. Isı Şok Proteinlerinin Teşhis Yöntemleri

- Elektroforez
- PCR (özellikle küçük ısı şok proteinlerinin teşhisinde tercih edilmektedir)
- ELİSA
- Western Blotting

1.10.1. ELİSA

Protein düzeyinde HSP tayini ELİSA ile yapılabilir. Anti-HSP monoklonal antikor ile HSP'nin oluşturduğu immun komplekse sekonder antikor olarak kullanılan ve peroksidaz bağlı bulunan anti-mouse IgM bağlanır. Antikor mouse IgM'ye bağlı peoksidazın o-fenilendiamin dihidroklorid (OPD) ile tepkisi sonucu ortaya çıkan sarı renkli ürün ile stop solüsyonun tepkimesi sonucu oluşan turuncu renkli ürünün absorbansının 492 nm'de ölçülmesi esasına dayanır (Piner 2009).

1.10.2. Western Blotting ve Elektroforez

Isı şok proteinlerinin belirlenmesi amacıyla en yaygın kullanılan metot blotlama metodudur (Hodinka 1998, Kricka, 1999). Bu metot elektriksel ortamda jel üzerinde yürütülen ve fraksiyonlarına ayrılan proteinlerin bir destek tabakaya aktarıldıktan sonra özgül olarak belirlenmelerini ifade etmektedir (Stoler ve ark 1995).

Blotlama metotları üç teknikle gerçekleştirilir. Bunlardan ilk geliştirileni DNA' nın tespitinde kullanılan Southern Blotlama'dır. Sonraki yıllarda geliştirilen ve RNA' nın tespitinde kullanılan metot, ilkinin ismine gönderme yapılarak, Northern Blotlama olarak isimlendirilmiştir (Alwine ve ark 1979). Proteinlerin belirlenmesinde en son geliştirilen blotlama metodu ise Western Blotlama olarak adlandırılmıştır (Towbin 1979, Burnette 1981).

Southern Blot herhangi bir kaynaktan elde edilen DNA'nın analizi için kullanılan membran blotlama ve görüntüleme tekniğidir (Burlison ve ark 1992, Stoler ve ark 1995). Öncelikle çalışılan DNA'nın izolasyonu ve restriksiyon enzimleri tarafından kesimi gerçekleştirilmektedir. Bu işlemi takiben, oluşan DNA parçaları, elektriksel ortamda agaroz jel üzerinde yürütülür. Bu işleme elektroforez denir. Bir sonraki adımda jeldeki DNA' nın destek membrana aktarılması gerçekleştirilir (Sambrook ve ark 1989).

Northern Blot ise; RNA parçalarının elektroforezle jelde yürütülmesini, destek membrana aktarılmasını ve bu membrandaki özgül RNA dizilimlerinin belirlenmesini ifade etmektedir (Stoler ve ark 1995). RNA yapısının değişken olması ve toplam RNA içinde özgül RNA miktarının azlığı gibi sebeplerden dolayı bu metodun duyarlılığı Southern Blotlama'ya göre daha düşüktür (Sambrook ve ark 1989, Stoler ve ark 1995, Novak ve ark 1996). Bu metot dört aşamada gerçekleşir. Bunlar: RNA' nın izolasyonu, elektroforezi, membrana aktarılması ve saptanmasıdır (Sambrook ve ark 1989, Stoler ve ark 1995).

Protein blotlama yöntemi olan Western Blot; elektroforez işlemi ile poliakrilamid jelde yürütülen proteinlerin, destek membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immünolojik metotlarla gösterilmesidir. Western Blot tekniği, denatüre edilen DNA' nın nitroselüloz membrana transfer edildikten sonra hibridizasyonla tespit edildiği Southern Blot tekniğinin modifikasyonudur (Burnette 1981, Harlow ve ark 1988). Blotlamadan önce çalışılan numunedeki proteinler elektroforezde yürütülür ve bu işlemle proteinler moleküler ağırlıklarıyla orantılı olarak (+) kutba doğru göç etmekte ve jelde buldukları yerde bantlar halinde yığılım

göstermektedir (Harlow ve ark 1988). Elektroforez işleminden sonra, jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana aktarılır ve proteinlerin görüntülenmesiyle işlem tamamlanır (Burnette 1981, Harlow ve ark 1988, Harper ve ark 1996).

1.10.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

1980'li yılların ortalarında Cetus firması araştırmacıları tarafından geliştirilen Polimeraz zincir reaksiyonu spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentelenmesi şeklinde tanımlanan *in vitro* bir yöntemdir. PCR ile kompleks DNA kalıplarından spesifik DNA parçalarının sentezinin birkaç saat içinde gerçekleşebilir hale gelmesi bu teknolojinin yaygınlaşmasında başlıca neden olmuştur. Temel bileşenleri kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tampon ve MgCl₂ olan polimeraz zincir reaksiyonu çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. Oligonükleotid primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecesinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülü üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle melezlenir. Primerlerin spesifik olarak hedef dizilere bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) varlığında 3' hidroksik ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur. PCR'da kalıp olarak tek ya da çift iplikli DNA'nın yanı sıra RNA'da kullanılabilir. Kalıp olarak RNA kullanılacaksa total RNA yada poli (A)⁺ RNA'dan önce klasik yolla cDNA elde edilir (Arı 2008).

1.11. Keçi yetiştiriciliği

Keçi yetiştiriciliği, dünyada az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde önemli yeri olan bir yetiştiricilik türüdür (Koyuncu ve ark 2005). Özellikle ekonomik seviyesi düşük aileler için önemli bir besin ve geçim kaynağı olan keçi yetiştiriciliği ülkemizde orman kenarları ve dağ köylerinde yaygın olarak yapılmaktadır (Şengonca ve Kaymakçı 1982, Kaymakçı ve ark 2005a,b, Paksoy ve Özçelik 2008). Keçi, diğer çiftlik hayvanlarına göre kötü bakım ve beslenme koşullarına karşı daha dayanıklı olması, doğal kaynakları daha iyi değerlendirmesi, bunların yanında canlı ağırlığına oranla diğer çiftlik hayvanlarına göre süt veriminin yüksek olması nedeniyle önemli hayvansal ürün kaynaklarından biridir (Arslanbaş ve Bodur 2010).

Dünya Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) verilerine göre 1980’de dünyada yaklaşık 464 milyon baş olan keçi varlığı 2012’de yaklaşık 997 milyon başa yükselmiştir. Türkiye’de 2009 yılına kadar azalma eğilimi gösteren keçi varlığı son yıllarda artışa geçmiştir. TÜİK verilerine göre 2012 yılında Türkiye’deki keçi varlığı 8.357.286 baştır.

Türkiye keçi varlığının %96’sı kıl keçisinden oluşur. Bunu, Ankara, Malta / Malta melezleri ve Kilis keçileri takip eder. Bunların yanında Batı Anadolu’da Ziraat Fakültelerinin çalışmaları sonucu yaygınlaştırılan Saanen/Saanen melezlerinin varlığı da söz konusudur (Kaymakçı ve ark 2005a).

Ülkemize 1960’lı yıllarda yurtdışından Saanen süt keçilerinin getirilmesi ile birlikte süt keçisi yetiştiriciliği hareketlilik kazanmıştır. Fakat, ülkemizde keçi yetiştiriciliği ile uğraşan yetiştiricilerin ekonomik seviyelerinin genellikle düşük olması, süt keçiciliğinde beklenen şekilde hızlı bir ilerleme sağlayamamıştır. Ancak son yıllarda keçi sütü ve ürünlerine ilgi artmış bu da süt keçiciliğine olan talebi arttırarak damızlıkçı nitelikte işletmelerin kurulmasını teşvik etmiştir (Şengonca ve ark 1998).

Son yıllarda keçi yetiştiriciliğine olan ilginin artmasıyla ilgili bir çok neden gösterilmektedir. Bunların başında keçi sütünün inek sütüne olan üstünlükleri gelmektedir. Keçi sütü ve inek sütünün protein yapısı birbirlerine benzerlik göstermesine rağmen, keçi sütünde α -S1 kazeinin daha az bulunması β -laktoglobulinin daha etkin sindirilmesine yardımcı olmaktadır. Keçi sütünde yağ damlacıklarının daha küçük olması sindirimini daha kolay olmasını sağlar.

Keçi sütünde inek sütüne göre daha fazla kalsiyum, potasyum, magnezyum, fosfor, klor ve manganez bulunur. Ayrıca vitamin A bakımından da zengindir (Coşkun ve Öndül 2004).

Bunların yanında keçi sütü, bazı ülkelerde özel peynirlerin yapımında da kullanılmaktadır. Örneğin iklim özellikleri bakımından Türkiye ile benzerlik gösteren Fransa, İtalya, Portekiz, Yunanistan gibi ülkelerde özel keçi peynirlerinin üretimi önemli bir yere sahiptir (İşleten ve Yüceer 2005). Ülkemizde ise küçük çiftçi aileleri tarafından elde edilen keçi sütleri peynir, yoğurt, tereyağı yapımında kullanılmakta ve bu ürünler halk pazarlarında satılmaktadır (Yetişmeyen 2009). Yine Bolu'da kurulan özel bir çiftlikte Saanen keçi yetiştiriciliği yapılmakta ve keçilerden elde edilen sütler, pastörize içme sütü olarak emziren anneler için pazarlanmaktadır. Aynı şekilde Kahramanmaraş'ta da bir dondurma fabrikası, ürünlerinde keçi sütü kullanma fikrini yatırım planları arasında yer vermiştir (Yetişmeyen 2009).

1.11.1. Saanen keçisi

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de süt verimi denildiğinde akla ilk olarak Saanen keçisi gelmektedir. Saanen keçisinin ana vatanı İsviçre'nin Saanen vadisidir. Saanen keçileri yüksek adaptasyon kabiliyetine sahiplerdir, bu özellikleri sayesinde bugün dünyanın birçok bölgesinde Saanen keçilerini görebilmekteyiz. Süt ve döl verimi yüksek olan bu ırkın fiziksel özelliklerine bakıldığında Saanen keçisi erkeklerinin boynuzlu, dişilerinin boynuzsuz, beyaz renkli ve kısa kıllı, bazen boyunlarının altında küpesi olan, sağlam kondüsyonlu bir ırktır (Şengonca 1989, Özder 2006).



Resim 1.1. Saanen keçisi-erkek (A), saanen keçisi-dişi (B)

Keçi sütü diğer türlerin sütleriyle karşılaştırıldığında bileşimi ve içeriğinin farklı olduğu görülmektedir (Arslanbaş ve Bodur 2010). Saanen keçileriyle yapılan çalışmalarda süttteki kuru madde oranı %11.87 ile %14.99 arasında değişkenlik gösterdiği görülmüştür (Fehr ve Flamant 1983, Kesenkaş ve ark 2010). Süte tat, lezzet, dayanıklılık kazandırması yanında esansiyel yağ asitleri ve yağda eriyen vitaminler için de önemli bir kaynak olan süt yağı keçilerde yapılan çalışmalarda %3.60 ile %5.5 arasında değişen değerler bulunurken Saanen keçilerinde yapılan bir çalışmada süt yağı oranı ortalama %3.24 olarak bulunmuştur (Konar ve Akın 1992, Kesenkaş ve ark 2010, Vázquez ve ark 1999). Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği'ne göre (2006/38) keçi sütlerinde protein oranı en az %2.8 düzeyinde olması gerektiği bildirilmiştir. Doğada sadece sütte bulunan ve süt ürünleri üretimi ile insan beslenmesi için önemli bir yeri olan laktoz süt çeşidine göre farklı düzeylerde olabilir. Yapılan çalışmalarda keçi sütlerinde laktoz oranı yaklaşık %4.32 olarak bulunmuştur. Keçi sütünün insan sağlığı ve beslenmesi üzerine olumlu etkileri düşünüldüğünde Saanen keçisi sütünden üretilen süt ürünlerinin de değerli olduğu açıktır (Kesenkaş ve ark 2010).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Çalışma Ziraat Fakültesi yakınlarındaki özel bir Saanen keçi işletmesinde, aynı yetiştirme koşullarına tabi tutulan, sağlıklı 15 çepiç (1-8 aylık) ve 15 anaç (4-6 yaş) olmak üzere 30 Saanen keçisi ile yapıldı. Çepişler grup I, anaçlar grup II olarak adlandırıldı. Aydın ilinde yaz aylarında görülen yüksek sıcaklıklar (36 °C) havanın nispi nemi (ortalama % 62) ile de birleştiğinde keçiler üzerinde olumsuz etkilere neden olabileceği düşünülerek çalışma Ağustos ayında gerçekleştirildi. Çalışmaya başlamadan önce Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik kurulundan 23/07/2013 tarih ve 2013/041 sayılı etik kurul kararı ile onay alınmıştır.

Kan örnekleri çalışmaya dahil edilen keçilerin boyun bölgesinde seyreden *Vena Jugularis*'den EDTA'lı tüplere alındı. Analizler Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

2.1.1. Kullanılan Cihazlar

Analizler sırasında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim dalı laboratuvarlarında bulunan PCR kabini, Mikrodalga fırın (Altes), Elektroforez tankları (Biorad) ve güç kaynağı (Biorad), Lightcycler Nano Real Time PCR (Roche) cihazı, analitik terazi (Denver Instrument), distile su cihazı (Nüve), spektrofotometre (Thermo scientific multiscan go microdrop), etüv (Memmert), pH metre (Hanna Instrument), soğutmalı santrifüj (Nüve), mini santrifüj (VWR mini star silverline), manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica), su banyosu (Nüve), -80°C derin dondurucu (Nuair), 4°C buzdolabı (Indesit), görüntüleme sistemi (UVP EC3 Imaging System Chemi HR 410), otomatik pipetler ve çeşitli cam malzemeler kullanıldı.

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Analizler sırasında kimyasal madde olarak; Glasiyel asetik asit (Merck, K41429056), agaroz (Sigma, A5093), tris base (Sigma, T1503), etilendiamintetraasetik asit (EDTA, Merck, K43782018), fosfat tamponu (Invitrogen, 003002), etanol absolute (Sigma, 32221), hücre lizis tamponu (Red Blood Cell Lysis buffer, Roche, Version 8, 11814389 001), RNA izolasyon kiti (High Pure RNA Isolation Kit, Roche, Version 12, 11828 665001), cDNA sentez kiti (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthese kit, Roche, Version 8, 05091284 001), PCR kiti (Fast Start Essential DNA Green Master kit, Roche, version 2, 06402712 001), DNA Ladder 25bp (Invitrogen, 10597-011), 6x Loading Dye solution (Intron Biotechnology, 21161), SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, S33102), RNase-ZAP (Ambion, AM9782) kullanıldı.

2.1.3. Primerler

Gen materyali olarak RNA, primer olarak ise keçi HSP 60, HSP 70 genleri ve keçi β actin spesifik primerleri kullanıldı. İnternet ortamındaki gen bankasından (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) keçilere ait HSP60, HSP70 ve β actin genlerine ait sırasıyla NM_001166609.1, FJ975769.1 ve NM_001009784.1 kod numaralı mRNA verileri ışığında baz dizilimleri değerlendirmeye alındı ve oluşturulan primerlerin ilgili bölgeye spesifiklikleri (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) kullanılarak kontrol edildi.

Çizelge 2.1. Primer dizilimi tablo

| | |
|------------------|-------------------------------|
| HSP60-F | 5'-ACTGGCTCCTCATCTCACTC -3' |
| HSP60-R | 5'-TGTTCAATAATCACTGTCCTTCC-3' |
| HSP70-F | 5'-GACGACGGCATCTTCAAG -3' |
| HSP70-R | 5'-GTTCTGGCTGATGTCCTTC-3' |
| B actin-F | 5'-AGTTCGCCATGGATGATGA-3 |
| B actin-R | 5'-TGCCGGAGCCGTTGT-3' |

2.2. Yöntem

2.2.1. Total Kan RNA İzolasyonu

Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon özelliği gösterir. Bu nedenle 260 nm'de ölçülen absorpsiyon değerleri oldukça saf olarak izole edilen nükleik asitlerin ng/μL veya μg/mL düzeyinde miktarlarının belirlenmesinde kullanılır. RNA'nın konsantrasyonunun saptanmasında kullanılan spektrofotometrik yöntemler DNA'nın spektral analizi ile tamamen aynıdır. Sadece tek zincirli RNA'nın miktarının belirlenmesinde kullanılan formül farklıdır.

$$\text{Total RNA (ng/}\mu\text{l)} = 260 \text{ nm'deki absorpsiyon} \times 40 \times \text{Dilüsyon Faktörü}$$

RNA molekülleri için 1 optik dansitenin 40 μg/mL'ye karşılık geldiği bilinmektedir. Yukardaki formülde 40 sayısında buradan gelmektedir. Bununla beraber 260 ve 280 nm dalga boylarında okunan değerler arasındaki oran nükleik asitlerin saflığı hakkında bilgi vermektedir. Proteinler bilindiği gibi 280 nm'de absorpsiyon özelliği gösterirler. Bu nedenle 280 nm'de ölçülen bir değerdeki artış A260/A280 oranında düşmeye neden olur. İzole edilen total RNA

örneklerinin saflığından bahsetmek için bu oran 1.8-2.00 arasında olmalıdır. Ölçümlerde kesinlikle UV geçirgen kuvvet kullanılmalıdır.

Bu amaçla üretilmiş olan UV geçirgen 96'lık plak kullanılarak 5 µl total RNA 95 µl elüsyon tamponu kullanılarak 20 kat seyreltildi. UV microdrop spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbansları ölçüldü. Örneklerin RNA konsantrasyonu yukarıda bahsedilen formüle göre hesaplandı. Ayrıca A260/A280 oranının 1,8-2,00 olup olmadığı kontrol edildi.

EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri Red Blood Cell Lysis Buffer kullanılarak santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra, tam kan RNA izolasyon ticari kiti (High Pure RNA Isolation Kit) kullanılarak RNA izolasyonları yapıldı ve elde edilen RNA'lar -80°C'de saklandı.

Total RNA izolasyonu PCR için özel yapılmış kabinde yapıldı. İzolasyon işlemine başlamadan önce pudrasız eldiven giyildi. Tek kullanımlık filtreli RNasefreepipet uçları kullanıldı. Deneye başlamadan önce RNA'yı kesen enzimleri inhibe etmek için RNA izolasyon aşamasında kullanılacak ependorf tüpler otoklavlandı yada ticari olarak satılan DNase/RNase free olan tüpler kullanıldı.

Analiz prosedürü:

Ependorf tüplere 500 µl kan örneklerinden ve 1ml Red Blood Cell Lysis Buffer eklendi ve iyice pipetaj yapıldı. 10 dakika karıştırıldı (vorteks yapılmamalı), süpernatant kısmı atıldı. Aynı işlemler bir set daha gerçekleştirildi. Pellete 200 µl PBS eklenerek, pelletin tamponda çözünmesi sağlandı. Daha sonra 400 µl Lysis-Binding Buffer eklendi ve 15 saniye vorteks yapıldı ve örnekler filtreli tüplere aktararak 9230 rpm'de 15 s santrifüj edildi. Daha sonra 90 µl DNase inkübasyon buffer + 10 µl DNase karışımı eklendikten sonra 15 dk. inkübe edildi. Üzerine 500 µl 1. yıkama solüsyonu eklendi ve 9230 rpm'de 15 s santrifüjlendi. Santrifüj sonrası tüpteki sıvı atıldı ve filtreye 500 µl 2. yıkama solüsyonu eklenerek 9230 rpm'de 15s santrifüjlendi. Tüpteki sıvıyı attık ve filtreli tüpün üzerine tekrar 200 µl 2. yıkama solüsyonu eklendi ve 11770 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Filtreler steril ependorf tüplere alındı ve 50 µl elüsyon buffer eklenerek 9230 rpm'de 1 dk santrifüjlendi. Elüsyon buffer da çözülmüş RNA örnekleri -80°C'de saklandı.

2.2.2. cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması

Genler etkilerini mRNA üretimi ile ortaya çıkarırlar. RNAz enzimlerinin aktivitesi ile normal koşullarda çok çabuk parçalandıklarından, mRNA'lar ile laboratuvar şartlarında çalışılması oldukça güçtür. Bu nedenle, mRNA örnekleri mRNA'nın DNA karşılığı olan cDNA'ya çevrilirler ve bu halde kullanılır. Elde edilen RNA'ları kullanarak cDNA sentez kiti (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthese kit, Roche) prosedürüne uygun olarak Light Cycler Nano Real Time PCR cihazında cDNA'lar elde edildi.

Analiz prosedürü:

9,4 µl RNA ve 2 µl random heksamer 65 °C'de 10 dakika qRT-PCR cihazında inkübe edildi. Reaksiyon tamponu (8mM) 4 µl, Protector RNase Inhibitor (20U) 0,5 µl, dNTP (1mM) 2 µl, DTT (5mM) 1 µl, Revers Transkriptaz enzim (10U) 1.1 µl kullanılarak bir karışım hazırlandı. 10 dakika RT'de inkübe edildi. Daha sonra qRT-PCR; 60 dakika 55 °C'de,5 dakika 85 °C olacak şekilde programlandı. Elde edilen cDNA'lar 4°C'de saklandı.

2.2.3. Real Time PCR ile Telomeraz mRNA Ekspresyonunun Kantitatif Olarak Belirlenmesi

H₂O, PCR Primer (10x), master mix (2x), cDNA karışımı (Çizelge 2.2) hazırlandı. PCR ürünleri çizelge 2.3.teki prosedüre uygun olarak qRT-PCR kullanılarak elde edildi. HSP60 ve HSP70 genlerinin ekspresyon analizinde kantifikasyon yapabilmek için referans gen olarak β actin geni seçildi.

Çizelge 2.2.PCR karışımı (Fast Start Essential DNA Green Master)

| | Konsantrasyon | Hacim |
|-------------------------|----------------------|--------------|
| H₂O | - | 6 µl |
| Pcr Primer (10x) | 10x | 2 µl |
| Master Mix (2x) | 2x | 10 µl |
| cDNA | - | 2 µl |

Çizelge 2.3 Real Time PCR döngü koşulları

| Sıcaklık (°C) | Ramp Oranı(°C/s) | Süre(s) |
|-----------------------------|--------------------------|----------------|
| Hold | | |
| 95 | 5 | 600 |
| 3-Adım Amplifikasyon | | |
| 95 | 5 | 10 |
| 60 | 4 | 10 |
| 72 | 5 | 10 |
| Erime | | |
| 58 | 4 | 20 |
| 99 | 0,1 | 20 |

2.2.4. PCR Ürününün Agaroz Jel Elektroforezinde Kontrolü

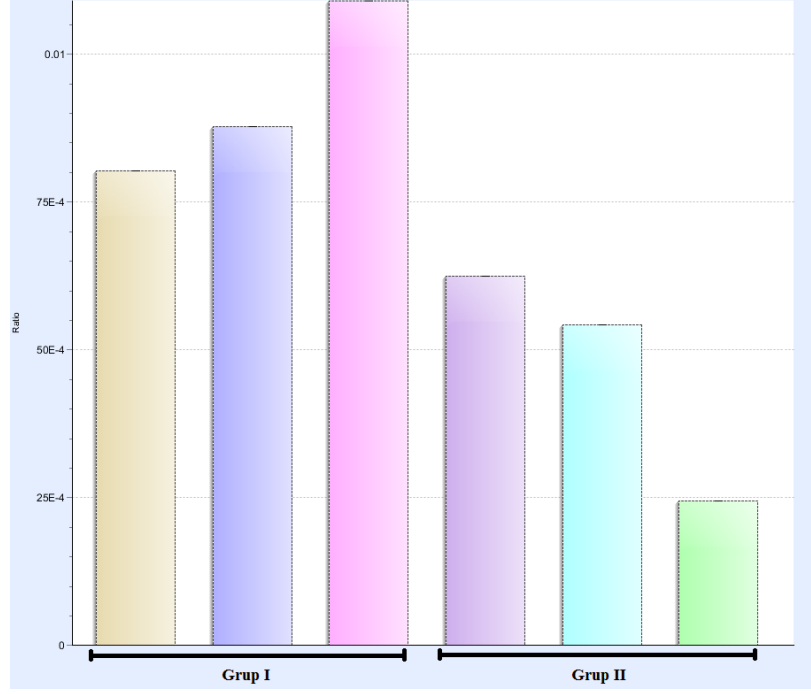
PCR ürününün kontrolünde % 1.5'lik agaroz jeli hazırlandı. Bu amaçla 0,525 g agaroz ve 35 ml 1x Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tamponu (10x TAE; 24.2 g Tris Baz, 5.7 ml asetik asit ve 1.85 g EDTA 1 litre saf suda çözdürülerek hazırlandı.) mikrodalga fırında kaynatıldıktan sonra biraz soğutuldu ve görüntüleme amaçlı olarak 1 µl SYBR Safe DNA Gel Stain (10 mg/ml) eklendi. Daha sonra elektroforez küveti içerisine döküldü. Agaroz donduktan sonra tarak çıkarılarak örnekler kuyucuklara eklendi. DNA işaretleyiciden 5 µL ilk kuyucuğa yüklendi. Her bir örneğe ait PCR ürününe 5 µl yükleme boya solüsyonu eklendi ve PCR ürünleri her bir kuyucuğa 20'şer µl olacak şekilde yüklendi. 100V'da ~90 dakika yürütüldü. UV görüntüleme sistemi kullanarak jel elektroforez görüntülendi.

3. BULGULAR

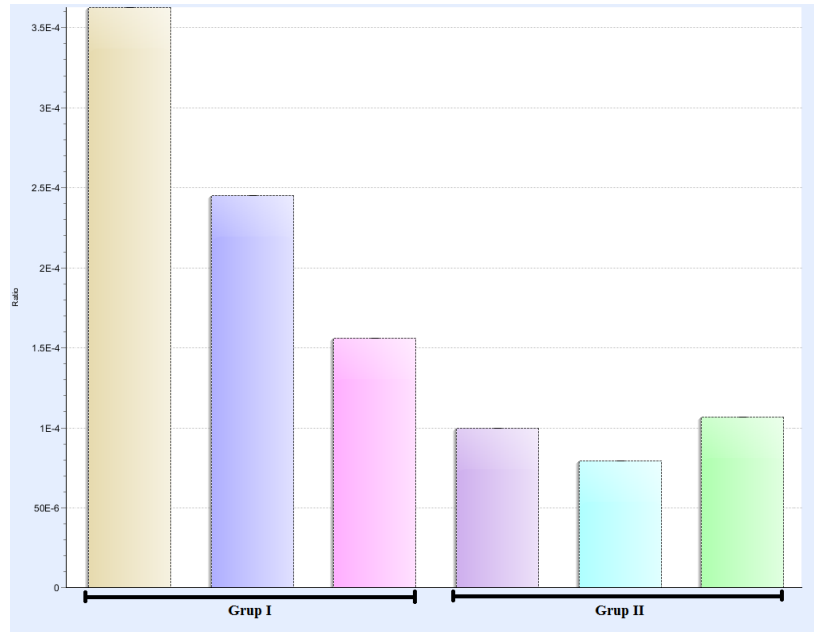
3.1. Grupların $\Delta\Delta Cq$ Değerleri

Grupların $\Delta\Delta Cq$ sonuçları kendi içlerinde değerlendirildiğinde HSP 60 ve HSP 70 mRNA ekspresyonlarında 1.5-2 kat arasında değişen farklılıklar belirlendi.

Çalışmaya dahil edilen grup I ve grup II'deki bazı keçilere ait HSP 60 mRNA ekspresyon değerleri Şekil 3.1'de, HSP 70 mRNA ekspresyon değerleri Şekil 3.2'de grafiksel olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Grup I (1-8 aylık çepiçler) ve grup II (4-6 yaşlı anaç keçiler)'deki bazı keçilere ait qRT-PCR'den alınan HSP 60 ekspresyon değerlerinin grafiği



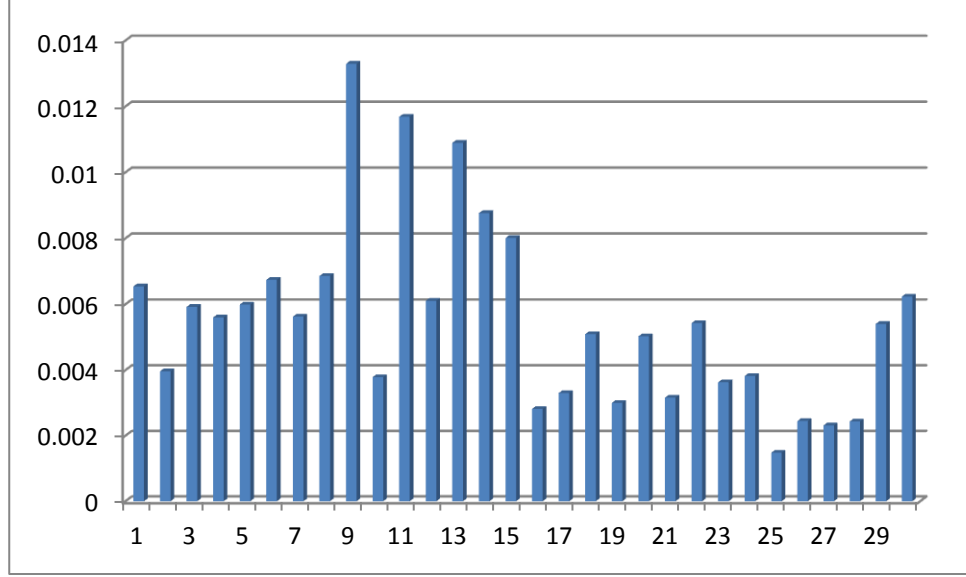
Şekil 3.2. Grup I (1-8 aylık çepiçler) ve grup II (4-6 yaşlı anaç keçiler)'deki bazı keçilere ait qRT-PCR'den alınan HSP 70 ekspresyon değerlerinin grafiği

3.2. HSP 60 ve HSP 70 genlerinin mRNA Ekspresyonu

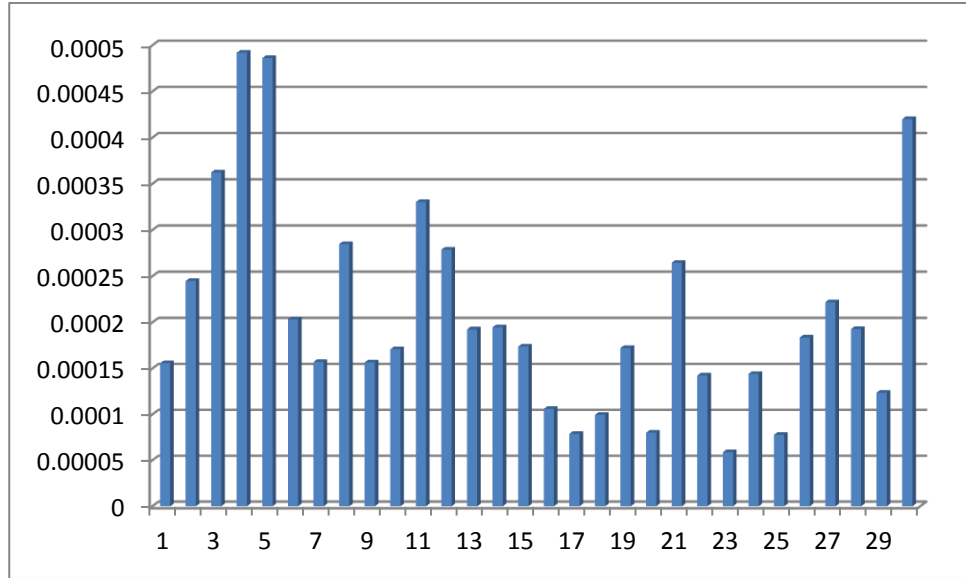
Çalışmada HSP 60 ve HSP 70 genlerinin mRNA ekspresyonunun kantifikasyonu Light Cyclers Real Time cihazıyla yapıldı.

Referans gen olan β actin'e göre HSP 60 ve HSP 70 genlerinin ekspresyonu Cq değerleri kullanılarak $2^{-\Delta\Delta Cq}$ değeri hesaplandı. Çalışmadaki tüm keçilere ait HSP 60 için ekspresyon değerleri Şekil 3.3'de ve çalışmadaki tüm keçilere ait HSP 70 için ekspresyon değerleri Şekil 3.4'de grafiksel olarak gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar gruplar arasında değerlendirilip ortalamaları birbirlerine oranlandığında grup I'deki keçilerin HSP 60 mRNA ekspresyonlarının, grup II'deki keçilerin HSP 60 ekspresyonlarının yaklaşık 2 katı olduğu (Şekil 3.5), yine grup I'deki keçilerin HSP 70 mRNA ekspresyonlarının, grup II'deki keçilerin HSP 70 ekspresyonlarının yaklaşık 1.7 katı olduğu görüldü (Şekil 3.6).

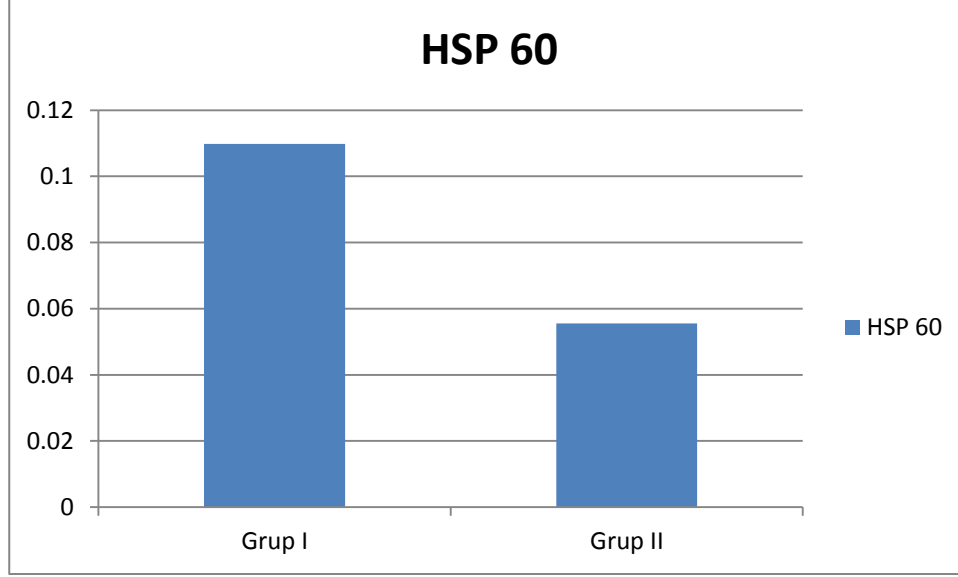
Grup I ve grup II'deki bazı keçilere ait HSP 60 ve HSP 70 mRNA ekspresyonlarının eş zamanlı grafiği Şekil 3.7 ve Şekil 3.8'te gösterildi.



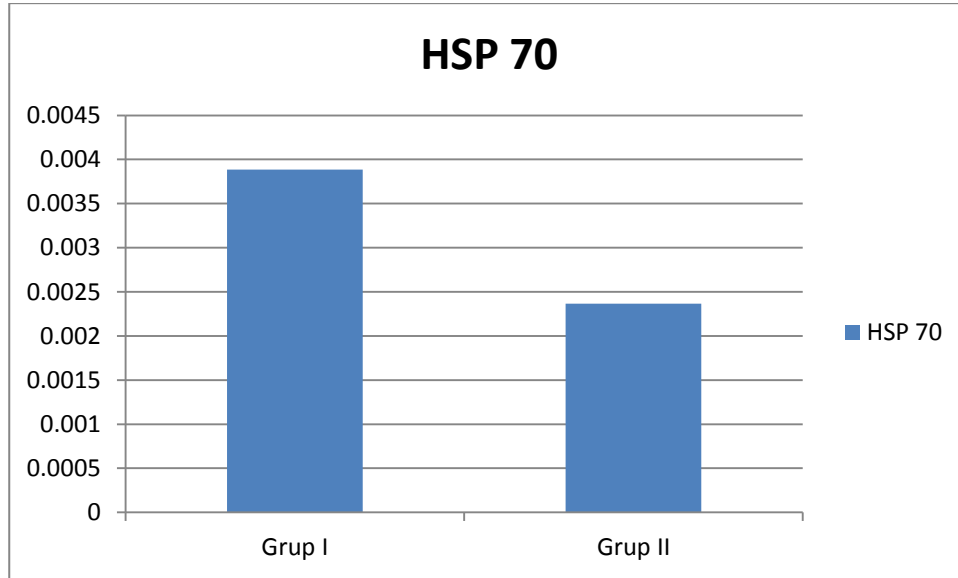
Şekil 3.3. HSP 60 için grup I (1-15) ve grup II (16-30)'deki keçilere ait $2^{-\Delta\Delta Cq}$ değerleri



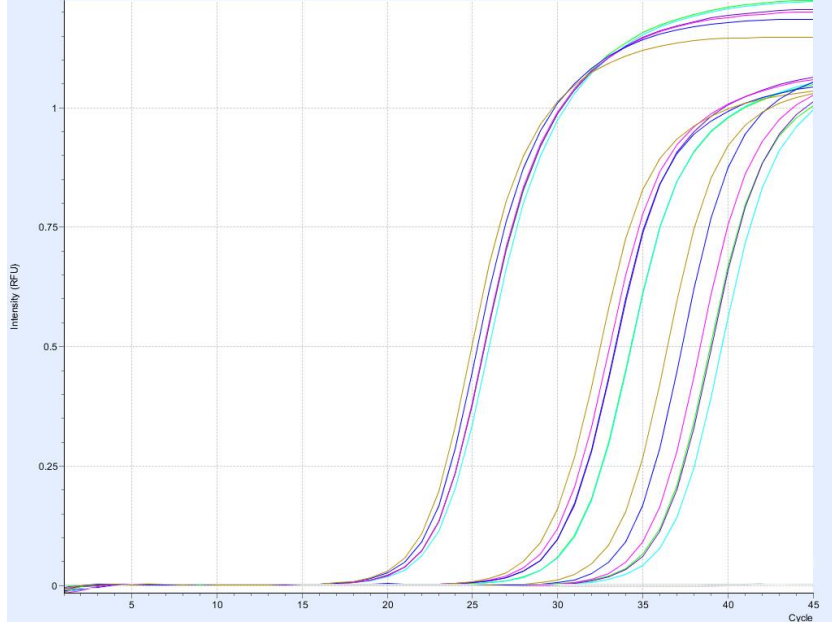
Şekil 3.4. HSP 70 için grup I (1-15) ve grup II (16-30)'deki keçilere ait $2^{-\Delta\Delta Cq}$ değerleri



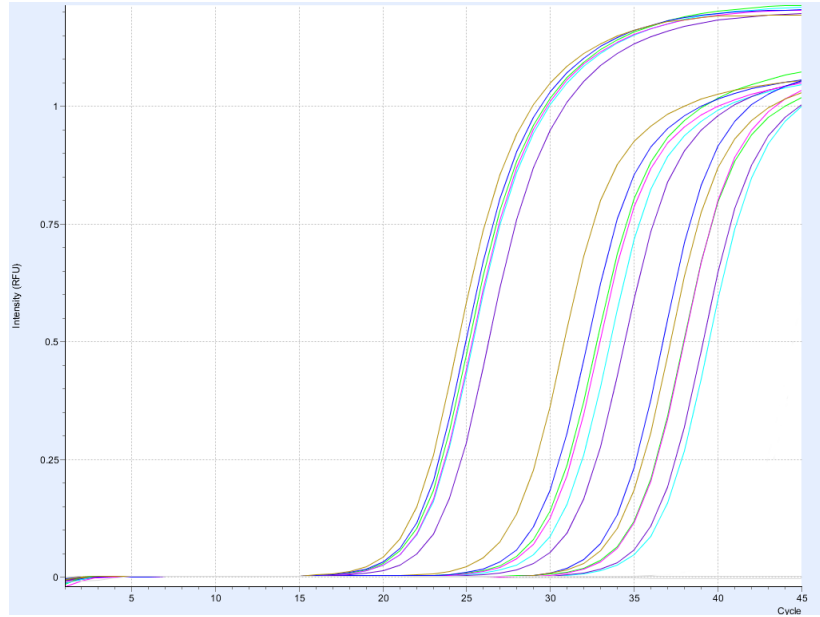
Şekil 3.5. Grup I (1-8 aylık çepiçler) ve grup II (4-6 yaşlı anaç keçiler)'deki keçilere ait HSP 60 ekspresyon düzeylerinin grafiksel karşılaştırılması



Şekil 3.6. Grup I (1-8 aylık çepiçler) ve grup II (4-6 yaşlı anaç keçiler)'deki keçilere ait HSP 70 ekspresyon düzeylerinin grafiksel karşılaştırılması



Şekil 3.7. Grup I (1-8 aylık çepiçler) ve grup II (4-6 yaşlı anaç keçiler)'deki bazı keçilere ait HSP 60, HSP 70 ve β actin'in qRT-PCR'de elde edilen amplifikasyonun eş zamanlı ekspresyon görüntüsü

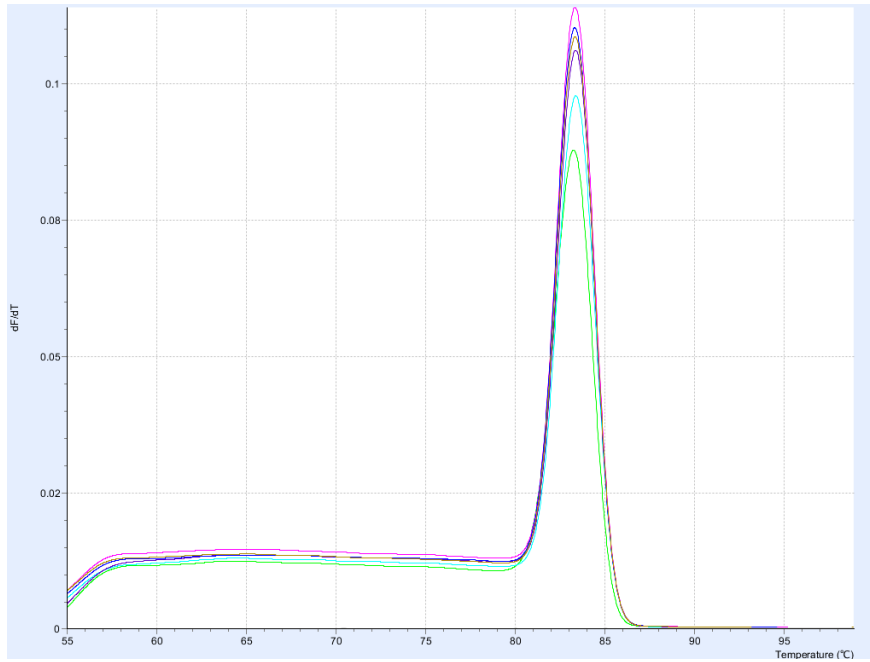


Şekil 3.8. Grup I (1-8 aylık çepiçler) ve grup II (4-6 yaşlı anaç keçiler)'deki bazı keçilere ait HSP 60, HSP 70 ve β actin'in qRT-PCR'de elde edilen amplifikasyonun eş zamanlı ekspresyon görüntüsü

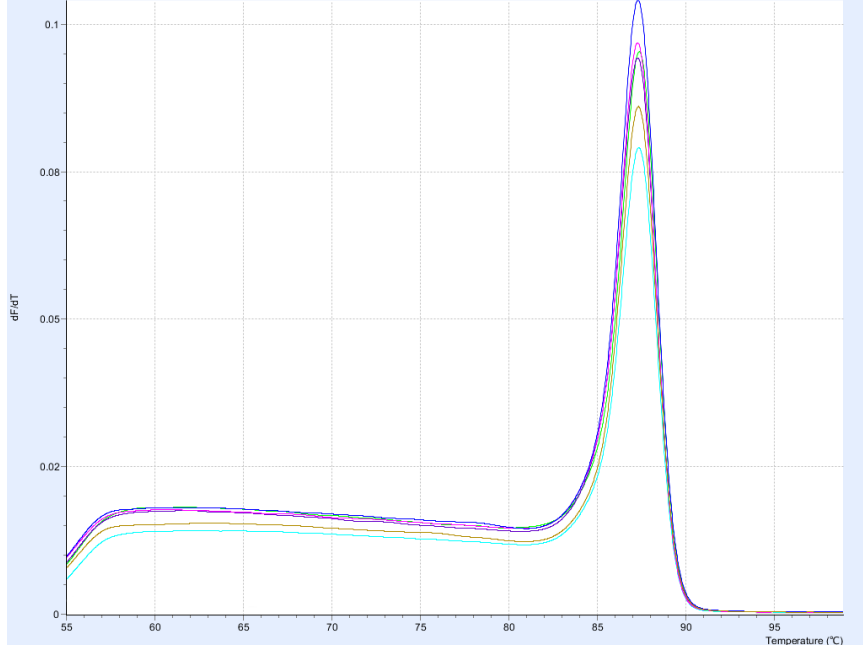
3.3. Melting Point (Tm) Analizi

Melting point analizi ile eksprese edilen örneklerin saflıklarını, girişim yapan maddelerin olup olmadığı, farklı örneklerde aynı gen bölgesinin analiz edilip edilmediği, primer dimeri oluşturup oluşturmadığı saptanmaktadır. Şekil 3.9 ve Şekil 3.10'da görüldüğü gibi piklerin aynı yerde üst üste çıkmaları örneklerde herhangi bir girişim, primer dimeri olmadığını göstermektedir. Sadece bazı piklerin daha küçük olması o örnekte HSP 60 ve ya HSP 70 mRNA ekspresyonlarının diğerlerine göre daha az olduğunu göstermektedir.

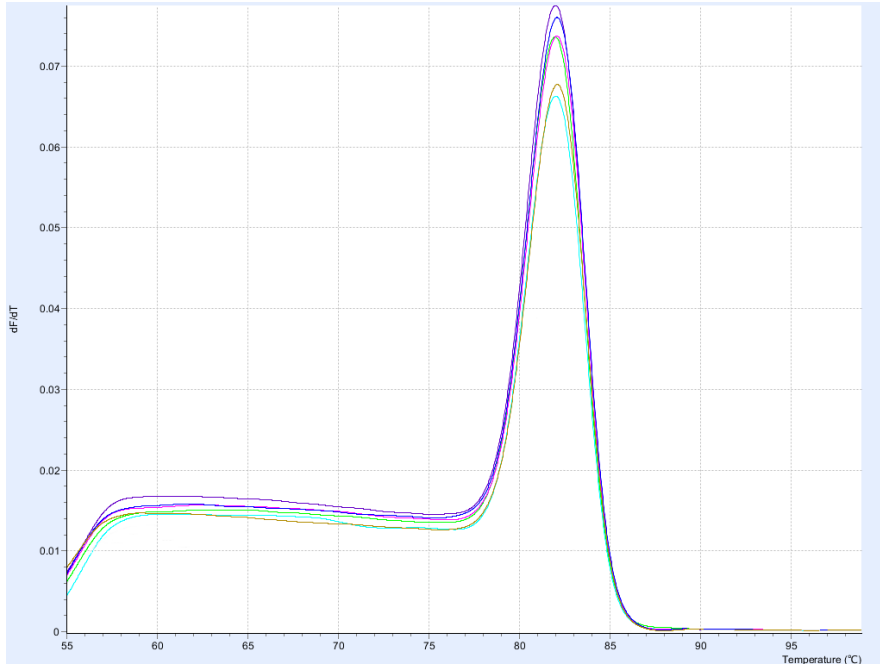
Aynı durum referans gen olarak kullanılan β actin için de geçerlidir. Yine Şekil 3.11'de görüldüğü gibi referans gende herhangi bir girişim, primer dimeri söz konusu değildir.



Şekil 3.9. Grup I (1-8 aylık çepiçler) ve grup II (4-6 yaşlı anaç keçiler)'deki bazı keçilere ait HSP 60 mRNA ekspresyonunun melting point (Tm) grafikleri



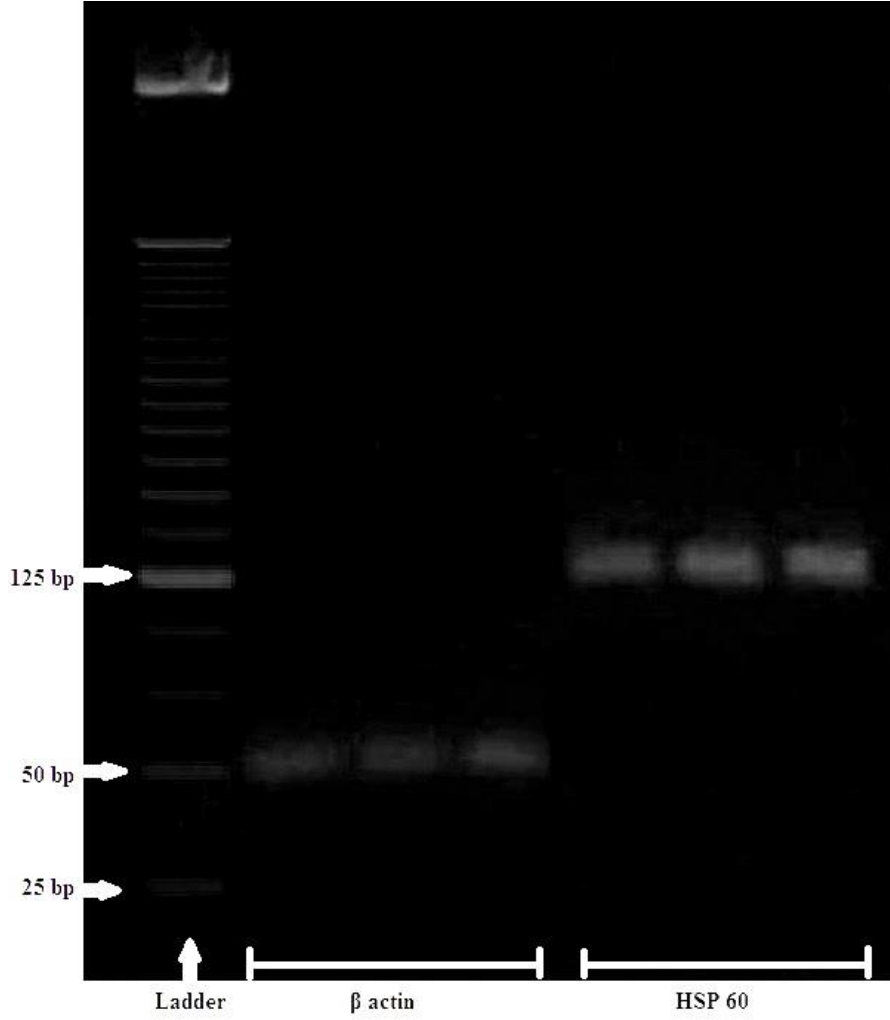
Şekil 3.10. Grup I (1-8 aylık çepiçler) ve grup II (4-6 yaşlı anaç keçiler)'deki bazı keçilere ait HSP 70 mRNA ekspresyonunun melting point (Tm) grafikleri



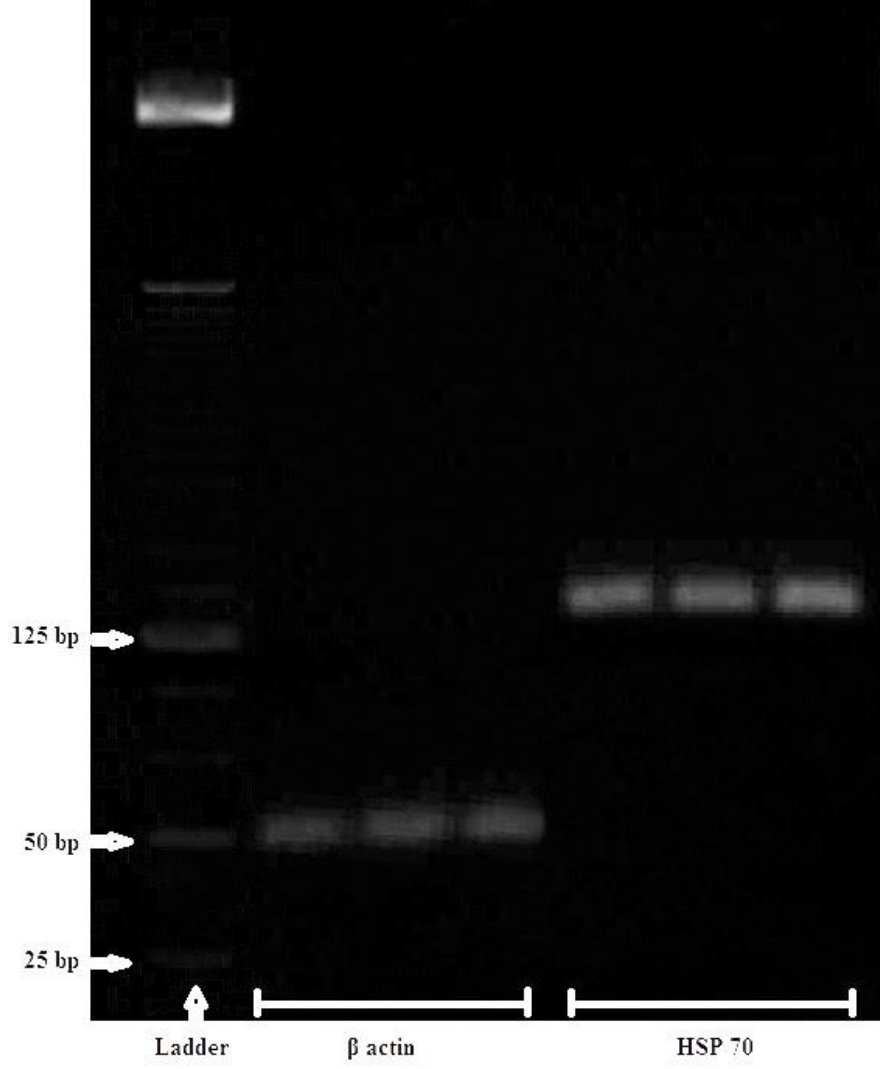
Şekil 3.11. Grup I (1-8 aylık çepiçler) ve grup II (4-6 yaşlı anaç keçiler)'deki bazı keçilere ait β actin mRNA ekspresyonunun melting point (Tm) grafikleri

3.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelinde Kontrolü

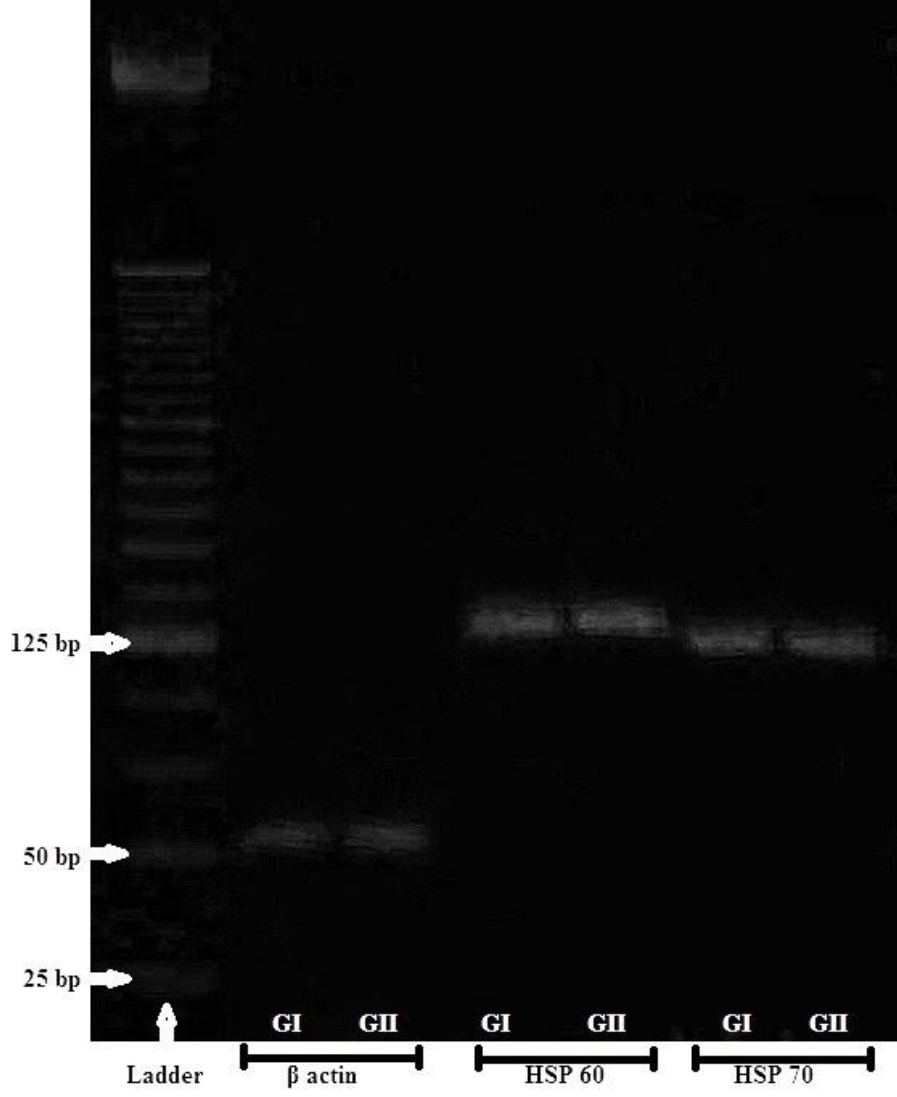
PCR ürününün %1.5'lik agaroz jel elektroforezdeki görüntüleri Resim 3.1, Resim 3.2 ve Resim 3.3'te verildi.



Resim 3.1. Grup I (1-8 aylık çepiçler) ve grup II (4-6 yaşlı anaç keçiler)'den rastgele seçilmiş HSP 60 PCR ürünlerinin %1,5'lik agaroz jel görüntüleri.



Resim 3.2. Grup I (1-8 aylık çepiçler) ve grup II (4-6 yaşlı anaç keçiler)'den rastgele seçilmiş HSP 70 PCR ürünlerinin %1,5'lik agaroz jel görüntüleri.



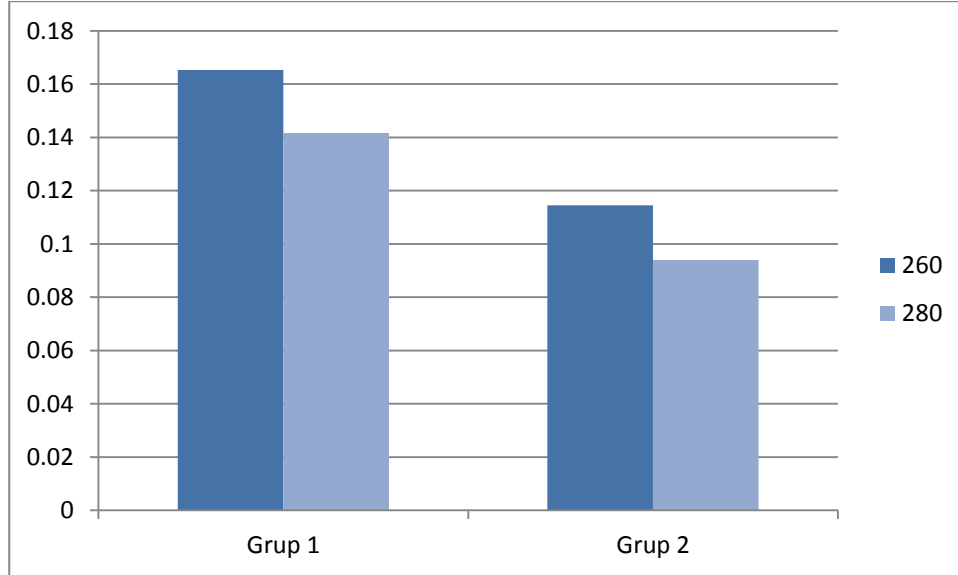
Resim 3.3. Grup I (1-8 aylık çepiçler) ve grup II (4-6 yaşlı anaç keçiler)'den rastgele seçilmiş β actin, HSP 60 ve HSP 70 PCR ürünlerinin %1,5'lik agaroz jel görüntüleri.

3.5. RNA'nın Kantitatif Tayini

İzole edilen RNA'ların yoğunlukları spektrofotometre (Thermo microdrop) ile 3 kez tekrar edilerek ölçülmüştür. Bu üç tekrardan elde edilen değerlerin ortalaması alınarak seyreltme faktörü ile çarpıldı ve her grup için tek tek RNA yoğunluğu hesaplandı (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. RNA'nın kantitatif tayini

| Absorbans/yaş | Grup 1 | Grup 2 |
|----------------|----------|----------|
| 260 | 0.165253 | 0.11448 |
| 280 | 0.141667 | 0.093953 |
| 260/280 | 1,166489 | 1,218481 |



Şekil 3.12. Grup I (1-8 aylık çepiçler) ve grup II (4-6 yaşlı anaç keçiler)'deki keçilerde RNA'nın kantitatif ölçümünün grafiksel gösterimi

Çizelge 3.2. Grup I (1-8 aylık çepiçler) ve grup II (4-6 yaşlı anaç keçiler)'deki keçilerin RNA yoğunluklarının ortalamaları

| RNA Kalitesi (µg/ml) | | |
|-----------------------------|---------------|----------------|
| | Grup I | Grup II |
| Ort. | 132.2024 | 91.584 |

4. TARTIŞMA

Isı şok proteinleri (HSP), hücrelerin yüksek ısıya (42-46°C) maruz kalmasıyla üretimi artan bir protein grubudur (Aufrecht 2005). HSP'lerin dramatik artışına yol açan olay çoğunlukla ısı şok faktörü (HSF) tarafından düzenlenir ve ısı şok cevabı olarak adlandırılır (Morimoto ve Santoro 1998, Christians ve ark 2002, Sarge ve ark 2009). HSP artışına ısı dışında yol açan başka faktörlerde vardır (Zulkifli ve ark 2010). Bunlar enfeksiyon, inflamasyon, etanol, arsenik, eser metaller ve ultraviyole ışık gibi birçok toksin, açlık, hipoksi, nitrojensizlik (bitkilerde) ve dehidratasyondur (Liu ve ark 1994). Bu stres proteinlerinin ekspresyonu birçok psikolojik, patolojik ve yaş gibi faktörlerle değişim gösterebilmektedir (Murtha ve ark 2003).

Yaşlanma, bir sistemin fiziksel, kimyasal veya biyolojik ajanlardan kaynaklanan eksojen ve endojen streslere karşı cevap verme yetisinde ve homeostasinin korunmasında organizmanın yeteneğinin azalması ile karakterize çok yönlü ve zamana bağımlı kompleks bir olaydır (Toussaint ve ark 1995, Pawelec ve ark 1997).

Genel olarak hücreler homeostazisin bozulması durumunda hücreyi normal yaşam koşullarına tekrar döndürebilmek için stres proteinlerinin ekspresyonlarını artırır. Ancak her hücrel stres durumunda aynı stres proteinleri aynı düzeyde aktif olmamaktadır. Farklı patolojik durumlar kendine özgül farklı sinyal yollarının tetiklenmesini sağlamaktadır. Bu durum özellikle hücrelerin varlığını sürdürebilmesi ve doku mimarinin korunabilmesinde son derece önemlidir (Gündeşli ve Dinçer 2008).

Isı şok proteinleri kaspaz aktivasyonunu engelleyerek apoptozisi bloke edebilir. HSP 27, HSP 60, HSP 70 ve HSP 90'ın aşırı sentezlenmesi apoptozisi inhibe edebilir. Farklı hücre modellerinde HSP'lerin yanlış katlanmış proteinlerin birikmesini engellediği ve serbest radikaller ile DNA hasarına neden olan hücrel stres durumlarında apoptozisi inhibe ettikleri gösterilmiştir (Arrigo 1998). HSP 27, HSP 60, HSP 70 ve HSP 90'ın yeterli düzeyde sentezlenmemesi hücrelerin apoptotik uyarılara duyarlılığını artırır (Sreedhar ve Csermely 2004).

Yaşın ilerlemesiyle beraber çapraz bağlanan proteinler birikir ya da reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hasarlar birikerek hücrelerin ve sonuç olarak organların fonksiyonu yavaşlar. Genetik mutasyonlar yaşla birlikte artar ve hücrelerin bozulmasına yol açar. Özellikle mitokondriyel DNA'da oluşan hasar mitokondriyel dış fonksiyona neden olur.

Yaşlanma ile ilişkili hastalıkların başlangıcı ve ilerlemesine ilişkin HSP 60 seviyeleri ve anti-şaperonin oto-antikorların varlığının incelendiği çok sayıda çalışma vardır. Örneğin atriyal fibrilasyon (Schäfler ve ark 2002, Yang ve ark 2007, Cao ve ark 2011), glokom (Wax ve ark 1998, Wax ve ark 2008), periodontit (Chung ve ark 2003, Choi ve ark 2011), osteoporoz (Meghji ve ark 2003, Kim ve ark 2009), tip II diyabet (Mostafazadeh ve ark 2005), ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı (Cappello ve ark 2006, Carter ve ark 2011). Bugüne kadar yapılan çalışmalar HSP 60'ın homeostaz ve hücrenin hayatta kalması için önemli bir faktör olduğunu ve bu şaperonin yaşlanma ile ilişkili hastalıkların başlangıcı ve ilerlemesinde çeşitli şekillerde dahil olduğunu ama kesin moleküler mekanizmasının henüz tam olarak aydınlatılmadığını göstermektedir.

Dangi ve ark (2012) farklı mevsimlerde keçilere ait HSP gen profilini araştırdıkları çalışmalarında HSP 60 mRNA ekspresyonunu kış sezonunda farklı yaş gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulmazken yaz sezonunda yaş artışıyla birlikte HSP 60 ekspresyon seviyesinde artış tespit etmişlerdir. Benzer şekilde erkek Fischer 344 x Brown Norway ratlarda yaş artışıyla birlikte HSP 60 ekspresyonun arttığı gösterilmiştir. Yaşlı hücrelerde apoptozisin arttığı HSP 60'ın anti-apoptotik bir rol oynayabileceği, bundan dolayı da yaşın artışıyla HSP 60 ekspresyonu artışının olabileceği sonucuna varılmıştır (Chung ve Ng 2006).

Rea ve ark (2001) 20 ile 96 yaş arasındaki bireylerde serum HSP 60 ve HSP 70 düzeylerini araştırdıkları çalışmalarında HSP 60 ve HSP 70 seviyelerinin yaşa bağlı olarak azaldığını göstermişler ve strese karşı direnç kabiliyetinde yaşla ilişkili olarak bir azalma olduğu sonucuna varmışlardır.

Çalışmamızda aynı yetiştirme şartlarına tabi tutulan farklı iki yaş grubundaki (1-8 aylık ve 4-6 yaşlı) Saanen keçilerinde periferik kandaki lökositlerden izole edilen HSP 60 mRNA ekspresyonunun yaş artıkça azaldığı görülmüştür (Şekil 3.3). Bu azalma yaşlanma süresince lenfosit proliferasyonu, lenfokin ekspresyonu, antikor üretimi gibi çeşitli immunolojik fonksiyonlarda değişimlere bağlı olabilir.

HSP 70 ekspresyonunun regülasyonu canlı organizmaları, hipertermi ve diğer streslerden koruyan hücresel proseslere en iyi örnektir. Genç ve yaşlı donörlerin lenfositlerinin kullanıldığı yaşla ilgili çalışmaların çoğu HSP'lerin transkripsiyonel kontrolü üzerinde yoğunlaşmış ve neredeyse sadece HSP 70 çalışılmıştır (Broome ve ark 2006, Gade ve ark 2010, Concha ve ark 2012). HSP ekspresyonunda ısı şokuna cevapta yaş farklılıklarının olabileceği belirtilmiş (Murtha ve ark 2003) ve mevsimlerin de etkili olabileceği nitekim yaz ve kış aylarında karaciğerde HSP 70 seviyesinin yüksek, ilkbaharda (mayıs) ise bu seviyenin düştüğü belirtilmiştir. HSP 70 dışındaki diğer ısı şok proteinlerinin yaşlı organizmalarda strese bağlı olarak bir azalma olup olmadığı yada HSP 70 sentezindeki düşüşü kompanze etmek için bir artış olup olmadığı henüz bilinmemektedir.

Deguchi ve ark (1988) insanlar üzerine yaptıkları çalışmalarında yaşlı insanların periferik kan lenfositlerinin genç insanlardan elde edilen örneklerle karşılaştırıldığında ısı şoku ile HSP 70 mRNA transkripsiyonunun uyarılmasının daha az olduğunu bildirmişlerdir.

Faassen ve ark (1989) ise insanlardan elde edilen periferik kan lenfositlerinde mitojenler tarafından HSP 70 sentezinin uyarımının yaşa bağlı olarak azaldığını göstermişlerdir. Benzer şekilde, yaşlanmış T lenfositlerinde HSP 70 mRNA uyarımının azaldığı bildirilmiştir (Effros ve ark 1994).

Muramatsu ve ark (1996) insan derisinin kronolojik yaşlanma üzerine HSP 72'nin etkisini araştırdıkları çalışmalarında 17 ile 86 yaş aralığında 30 bireyde deri dokularını sıcak stresine karşı maruz bırakmışlar ve HSP 72 ekspresyonunun yaşlı grupta gençlere oranla daha düşük olduğu sonucuna varmışlardır. Bu da normal insan derisinde ısı şokuna karşı yaşa bağlı bir disfonksiyon oluştuğunu göstermiştir.

Njemini ve ark (2011) insanlar üzerinde farklı yaş gruplarında yaptıkları çalışmada yaşa bağlı olarak serum HSP 70 düzeyinin azaldığını göstermişlerdir. Normal popülasyonda yaşla serum konsantrasyonu azaldığı sonucuna varmışlardır.

Fargnoli ve ark (1990) genç (5 aylık) ve yaşlı (24 aylık) erkek Wistar ratlarda yaptıkları çalışmada deri ve akciğer hücrelerinde sıcak stresinden sonra HSP 70 ekspresyonunun yaşa bağlı olarak azaldığını göstermişlerdir. Yaşla beraber HSP 70 induksiyonunun bozulduğu sonucuna varmışlardır.

Heydari ve ark (1993) 30 dakika boyunca 42.5 °C'de sıcaklık stresine maruz bıraktıkları genç (4-7 aylık) ve yaşlı (22-28 aylık) fareler üzerindeki çalışmalarında, HSP 70 mRNA ekspresyonunu yaşlılarda genç farelere göre %40-50 daha az bulmuşlardır.

Isı şoku tarafından HSP 70 ekspresyonunun uyarılmasında yaşa bağlı olarak diğer dokularda da örneğin rat karaciğer (Wu ve ark 1993), beyin (Blake ve ark 1991, Pardue ve ark 1992) azalma olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir.

Pahlavani ve ark (1995) ısı şokundan sonra farklı yaşlardaki rat ve maymunların lenfositlerinde HSP 70 ekspresyonunu araştırdıkları çalışmalarında yaşlı rat (24-26 aylık) ve maymundan izole edilen lenfositlerde genç hayvanlara (4-6 aylık) oranla HSP 70 uyarım seviyelerinde ciddi bir düşüş olduğunu göstermişlerdir.

T hücreleri ve fibroblastlarda, replikatif yaşlanmada HSP 70 ekspresyonunda azalma saptanmıştır. Böylece yaşlı hücrelerde ısıya karşı hücre fonksiyonlarının devamlılığında azalma olduğu gösterilmiştir (Bree ve ark 2002).

İnsan hücre hatlarının kültürlerinde, ısı şokunda son pasaj fibroblastlarda HSP 70 mRNA'nın indüklenmesinin ilk pasaj fibroblastlara göre bir azalma olduğu bildirilmiştir (Liu ve ark 1989, Liu ve ark 1991, Luce ve Cristofalo 1992).

Kristensen ve ark (2004) Holshein-Friesian süt ineklerini Grup 1 (235 günlükten küçük), Grup 2 (235-305 gün arası), Grup 3 (305-565 gün arası), Grup 4 (Erken laktasyon), ve Grup 5 (Geç laktasyon) olmak üzere 5 gruba ayırmışlardır. Yaşlı süt ineklerinde (305-565 günlük) HSP 72 düzeylerini en yüksek bulmuşlardır. Geç laktasyonda HSP 72 seviyeleri düşük bulunurken erken laktasyonda yüksek bulunmuştur.

Gaughan ve ark (2013) 110 gün boyunca 60 angus sığırında barınma beslenme ve iklim koşulları gibi kronik stres kaynaklarının etkileri üzerine plazma HSP 70 konsantrasyonu araştırdıkları çalışmalarında 0. günde en düşükken 30. günde arttığını ve 110. güne kadar kademeli olarak azaldığını göstermişler ve sonuç olarak HSP 70 konsantrasyonunun tek başına çoklu kronik stres faktörlerine maruz kalan hayvanlarda yeterli bir stres indikatörü olamayacağı sonucuna varmışlardır.

Çalışmamızdan elde edilen veriler ışığında HSP 70 mRNA ekspresyonunda yaşa bağlı olarak transkripsiyon seviyesinde bir azalmanın gerçekleştiği gözlenmiştir (Şekil 3.4). Bulgularımız diğer literatürler ile uyumludur. HSP 70 transkripsiyonunun uyarılmasında yaşa bağlı azalmanın transkripsiyon faktörü HSF'nin HSE'ye bağlanmasındaki azalmaya bağlı paralel olduğu düşünülmektedir. HSP 70 transkripsiyonunun regülasyonu hakkında mevcut bilgiye dayanarak HSE'ye HSF'nin bağlanmasındaki düşüşün en az iki mekanizma ile gerçekleştiği tahmin edilmektedir: HSF'nin ekspresyonunda azalma yada ısı şoku ile HSF'nin post-translasyonel aktivasyonunda azalma (oligomerizasyon).

Heydari ve ark (1994) yaptıkları çalışmada ısı şoku ile HSF'nin HSE'ye bağlanma aktivitesinin uyarılmasında yaşlı rat hepatositlerinde genç rat hepatositlerine oranla önemli ölçüde azalma olduğu gösterilmiştir.

Li ve ark (1991) HSF bağlanma aktivitesi üzerine hücrel yaşlanmanın etkilerini çalışmış ve hücrel yaşlanma ile HSP 70 transkripsiyonundaki azalmanın HSF bağlanma aktivitesindeki azalma ile kolerasyonlu olduğunu bulmuştur.

5. SONUÇ

Yaşlanma multifaktöryel ve çok değişken bir süreçtir. Gen ekspresyonlarındaki değişikliklerin risk faktörü mü yoksa bir sonuç mu olduğuna dair çalışmaların artırılması gerekmektedir. Yaşlanma ve stres ile ilişkili çoğu genin bir anda çalışabildiği array sistemleri kullanılarak mekanizmalar daha net olarak aydınlatılabilir.

Bu çalışmada klinik olarak sağlıklı aynı yetiştirme şartlarına tabi tutulan farklı iki yaş grubundaki (1-8 aylık ve 4-6 yaşlı) Saanen keçilerinde kan örnekleri alınarak kantitatif olarak HSP 60 ve HSP 70 mRNA gen ekspresyon düzeyleri qRT-PCR SYBR Green metodu kullanılarak ölçüldü. İki grup arasındaki mRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında nispeten daha yaşlı olan grupta daha genç olan gruba göre HSP 60 ekspresyon seviyeleri yaklaşık 2 kat HSP70 ekspresyon seviyeleri yaklaşık 1.7 kat daha az olarak saptandı.

Yetiştiricilikte strese girme durumlarının önüne geçilebilirse verilen yemin daha etkin değerlendirilmesi sağlanıp ekonomiklik yani minimum masrafla maksimum kar ilkesi korunmuş olur. Çalışmamız yaz aylarında sıcaklığın ve nemin yüksek olduğu Aydın iklim koşullarında yetiştirilen Saanen keçisi verim özellikleri ve adaptasyon yeteneklerinin belirlenmesinde HSP 60 ve HSP 70 gen ekspresyonlarının yaşa bağlı değişimlerinin de göz önünde bulundurularak yetiştiriciler için pratik öneriler geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

ÖZET

Isı şok proteinleri (HSP) çeşitli fonksiyonları olan bir protein ailesi olup, ortak özellikleri ani sıcaklık değişiklikleri, anoksi, reaktif oksijen metabolitleri ve glukoz düzeylerinde değişiklik, yaşlanma daha bir çok stres durumunda üretilmeleridir. Bu ailedeki proteinler molekül ağırlıklarına göre HSP 100, HSP 90, HSP 70, HSP 60, küçük ısı şok proteinleri ve ubikuitin olmak üzere 6 genel aile olarak sınıflandırılır.

HSP 60 mitokondri ve sitoplazmada, HSP 70 sitoplazma, çekirdek, endoplazmik retikulum ve mitokondride bulunur. Canlının stresten korunması ve protein katlanması için gerekli olan bu ısı şok proteinleri aynı zamanda katlanmamış ve yanlış katlanmış proteinler arasındaki dengeyi sağlar.

Bu çalışmada HSP 60 ve HSP 70 mRNA ekspresyonunun kantitatif belirlenmesi, HSP 60 ve HSP 70 mRNA ekspresyon seviyelerinin farklı yaşlardaki keçilerde, korelasyonlarının analiz edilmesi amaçlandı. Bunun için farklı yaşlardaki 30 Saanen keçisi kullanarak HSP 60 ve HSP 70 mRNA seviyelerini Light Cycler Real-Time PCR (qRT-PCR) ile analiz edildi.

Sonuçta HSP 60 mRNA ekspresyonu grup I (1-8 aylık çepiçler)'de grup II (4-6 yaşlı anaç keçiler)'nin yaklaşık 2 katı, HSP 70 mRNA ekspresyonunun ise grup I (1-8 aylık çepiçler)'de grup II (4-6 yaşlı anaç keçiler)'nin yaklaşık 1.7 katı eksprese olduğu belirlendi.

İlerdeki çalışmalarda, daha fazla sayıda keçi kullanılması gerektiği, bulgular üzerine farklı stres parametrelerinin de etkilerinin olabileceği ve bunlarında göz önüne alınması gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Isı şok proteinleri, HSP, qRT-PCR, keçi.

ABSTRACT

Heat shock proteins (HSPs) has various functions and their common features are that they are produced in sudden changes of temperature, anoxia, reactive oxygen metabolites and changes in glucose levels, aging, and lots of other stress events. According to their molecular weights these proteins are classified as HSP 100, HSP 90, HSP 70, HSP 60, sHSP and ubiquitin.

HSP 60, is localized in mitochondria and cytosol, HSP 70, is localized in cytoplasm, nucleus, endoplasmic reticulum and mitochondria. These heat shock proteins which are needed for the protection of the organism from stress also provides the balance between the folded and misfolded proteins.

In this study, we aimed to evaluate the quantitative determination of HSP 60 and HSP 70 mRNA expressions and to analyze the correlation between the expression levels of HSP 60 and HSP 70 mRNA in different age Saanen goats. In order to pursue this study the levels of HSP 60 and HSP 70 mRNA was analyzed in 30 different age Saanen goats by Real-Time quantitative RT-PCR.

As a result, levels of HSP 60 and HSP 70 mRNA expressions in group I (1-8 months old) Saanen goats were significantly higher than group II (4-6 years old) Saanen goats.

In conclusion, a further study with long-term follow up of larger goat populations by considering the effects of the different stress parameters is required to confirm the clinical application of this molecular marker.

Key words: Heat shock proteins, HSP, qRT-PCR, goat.

KAYNAKLAR

- Agoff SN, Hou J, Linzer DI, Wu B. Regulation of the human hsp70 promoter by p53. *Science* 1993;259(5091):84-87.
- Alwine JC, Kemp DJ, Parker BA, Reisser J, Stark GR, Walh GM. Detection of specific RNA's or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzyloxymethyl paper. *Methods in Enzymology* 1979;68:220-242.
- Andersen JS, Jensen JS, Uldun SA, Lind K. Heat shock protein in mycoplasma pneumoniae shown by immunoblotting to be related to the bacterial Common Antigen. *J Infect Dis* 1990; 161:1039-40.
- Arı Ş. DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması. In: Temizkan G, Arda N. (Eds). *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. İstanbul:Nobel Tıp Kitapevleri; 2008 p.101-108
- Arrigo AP. Small stress proteins: chaperones that act as regulators of intracellular redox state and programmed cell death. *The Journal of Biological Chemistry* 1998;379:19-26.
- Arslanbaş E, Bodur AE. Türkiye'de süt keçi yetiştiriciliği ve modern süt bilimi bakış açısıyla keçi sütünün değerlendirilmesi. *Ulusal Keçicilik Kongresi*. 24-26 Haziran 2010, Çanakkale;2010. p. 365-368
- Aşkar TK, Ergün N, Turunç V. Isı şok proteinleri ve fizyolojik rolleri. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2007;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* 2004; 97: 605–611.
- Aufricht C. Heat–shock protein 70: molecular supertool? *Pediatric Nephrology* 2005;20:707–713.
- Bahr GM, Yousof AM, Majeed HAM, Behbehani K, Lubani M, Parekh RB, Dwek RA, Rademacher TW, Young DB, Mehlert A, Steele J, Rook GAW. Agalactosyl IgG, antibodies to the heat shock proteins, and acute rheumatic fever. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1990;49(6):383-386..
- Baler R, Zou J, Voellmy R. Evidence for a role of HSP 70 in the regulation of the heat shock response in mammalian cells. *Cell Stress & Chaperones* 1996;1:33-39.
- Barnes JA, Dix DJ, Collins BW, Luft C, Allen JW. Expression of inducible Hsp70 enhances the proliferation of MCF-7 breast cancer cells and protects against the cytotoxic effects of hyperthermia. *Cell Stress & Chaperones* 2001;6(4):316–32.

- Beere HM, Wolf BB, Taylor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR. Heat-Shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature Cell Biology* 2000;2:469-475.
- Blake MJ, Fargnoli J, Gershon D, Holbrook NJ. Concomitant decline in heat-induced hyperthermia and HSP70 mRNA expression in aged rats. *American Journal of Physiology* 1991;260(4):663-667.
- Bree RT, Stenson-Cox C, Grealy M, Byrnes L, Gorman AM, Samali A. Cellular longevity: role of apoptosis and replicative senescence. *Biogerontology* 2002;3:195-206.
- Broome CS, Kayani AN, Palomero J, Dillmann WH, Mestril R, Jackson MJ, McArdle A. Effect of lifelong overexpression of HSP 70 in skeletal muscle on age-related oxidative stress and adaptation after nondamaging contractile activity. *The FASEB Journal*. 2006;20:855-860
- Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E, Garrido C. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nature Cell Biology* 2000;2:645-652.
- Bukau B, Weissman J, Horwich A. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 2006;125: 443–451.
- Burleson FG, Chambers TM, Wiedhrauk DL. *Virology: A Laboratory Manual*. San Diego: Academic Press. 1992. p.169-203.
- Burnette WN. Western Blotting; “Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry* 1981;112:195-203.
- Calderwood SK. Chaperones and slow death--a recipe for tumor immunotherapy. *Trends in Biotechnology* 2005; 23(2):57.
- Calderwood SK. Heat shock proteins in breast cancer progression- a suitable case for treatment? *International Journal of Hyperthermia* 2010; 26(7): 681–685.
- Cao H, Xue L, Xu X, Wu Y, Zhu J, Chen L, Chen D, Chen Y. Heat shock proteins in stabilization of spontaneously restored sinus rhythm in permanent atrial fibrillation patients after mitral valve surgery. *Cell Stress Chaperones* 2011;16(5):517-528
- Cappello F, Di Stefano A, David S, Rappa F, Anzalone R, La Rocca G, D'Anna SE, Magno F, Donner CF, Balbi B, Zummo G. Hsp60 and Hsp10 down-regulation predicts bronchial epithelial carcinogenesis in smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Cancer* 2006;107:2417-2424.

- Carter CA, Misra M, Pelech S. Proteomic analyses of lung lysates from short-term exposure of Fischer 344 rats to cigarette smoke. *Journal of Proteome Research* 2011;10(8):3720-3731.
- Cechetto JD, Soltys BJ, Gupta GS. Localization of mitochondrial 60-kD heat shock chaperonin protein (Hsp60) in pituitary growth hormone secretory granules and pancreatic zymogen granules. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2000;48:45-56.
- Chandra D, Choy G, Tang DG. Cytosolic accumulation of HSP60 during apoptosis with or without apparent mitochondrial release: evidence that its pro-apoptotic or pro-survival functions involve differential interactions with caspase-3. *The Journal of Biological Chemistry* 2007;282:31289-31301.
- Chauhan D, Li G, Hideshima T, Podar K, Mitsades C, Mitsiades N, Catley L, Tai YT, Hayashi T, Shringarpure R, Burger R, Munshi N, Ohtake Y, Saxena S, Anderson KC. Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance. *Blood* 2003;102:3379-3386.
- Christians ES, Yan LJ, Benjamin IJ. Heat shock factor 1 and heat shock proteins: Critical partners in protection against acute cell injury. *Crit Care Med* 2002; 30: 43–50.
- Choi CK, Jo PG, Choi CY. Cadmium affects the expression of Hsp90 and metallothionein mRNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 2008;147: 286-292.
- Choi J, Lee SY, Kim K, Choi BK. Identification of immunoreactive epitopes of the *Porphyromonas gingivalis* heat shock protein in periodontitis and atherosclerosis. *Journal of Periodontal Research* 2011;46:240-245
- Chung L, Ng YC. Age-related alterations in expression of apoptosis regulatory proteins and heat shock protein. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006;1762:103-109.
- Chung SW, Kang HS, Park, Kim SJ, Choi JI. Immune responses to heat shock protein in *Porphyromonas gingivalis*-infected periodontitis and atherosclerosis patients. *Journal of Periodontal Research* 2003;38:388-393
- Clark JI, Muchowski PJ. Small heat shock proteins and their potential role in human disease. *Current Opinion in Chemical Biology* 2000;10(1):52-59.
- Clark SM, Peck LS. HSP70 heat shock proteins and environmental stress in Antarctic marine organisms: A mini-review. *Marine Genomics* 2009;2:11-18
- Cohen-Saidon C, Carmi I, Keren A, Razin E. Antiapoptotic function of Bcl-2 in mast cells is dependent on its association with heat shock protein 90beta. *Blood* 2006;107:1413-1420.
- Coleman ML, Sahal EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis result from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nature Cell Biology* 2001;3:339-345.

- Concha C, Edman RM, Belikoff EJ, Schiemann AH, Carey B, Scott MJ. Organization and expression of the Australian sheep blowfly (*Lucilia cuprina*) hsp23, hsp24, hsp70 and hsp 83 genes. *Insect molecular biology* :2012;21(2):169-180.
- Coşkun H, Öndül E. 2004. Keçi Sütü ve İnsan Beslenmesindeki Önemi. *Gıda* 2004;29(6):411-418.
- Csermely P. Chaperone overload as a possible contributor to civilization diseases. *Trends in Genetic* 2001;17:701-704.
- Dangi SS, Gupta M, Maurya D, Yadav VP, Panda RP, Singh G, Mohan NH, Bhure SK, Das BC, Bag S, Mahapatra R, Sharma GT, Sarkar M. Expression profile of HSP genes during different seasons in goats (*Capra Hircus*). *Tropical Animal Health and Production* 2012;44:1905-1912.
- Deocaris CC, Kaul SC, Wadhwa R. On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein60. *Cell Stress Chaperones*. 2006;11:116–128
- Deguchi Y, Negoro S, Kishimoto S. Age-related changes of heat shock protein gene transcription in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1988;157(2):580–584.
- Diehl JA, Yang W, Ronald A, Xiao RH, Emili A. Hsc70 Regulates Accumulation of Cyclin D1 and Cyclin D1- Dependent Protein Kinase. *Molecular and Cellular Biology* 2003;23(5):1764- 74.
- Dillmann WH, Mehta HB, Barrieux A, Guth BD, NeeIcy WE, Ross J. Ischemia of the dog heart induces the appearance of a cardiac mRNA coding for a protein with migration characteristics similar to heat shock/stress protein 71. *Circulation Research* 1986;59:110-114.
- Effros RB, Zhu X, Walford RL. Stress response of senescent T lymphocytes: reduced hsp70 is independent of the proliferative block. *The Journals of Gerontology* 1994;49:65–70.
- Ellis RJ, van der Vies SM. Molecular chaperones. *Annual Review of Biochemistry* 1991; 60:321–347.
- Erbse A, Mayer MP, Bukau B. Mechanism of substrate recognition by hsp70 chaperones. *Biochemical Society Transactions* 2004;32:617-621.
- Faassen AE, O’Leary JJ, Rodysill KJ, Bergh N, Hallgren HM. Diminished heat-shock protein synthesis following mitogen stimulation of lymphocytes from aged donors. *Experimental Cell Research* 1989;183:326–334.
- Fargnoli J, Kunisada T, Fornace AJ, Schneider EL, Holbrook NJ. Decreased expression of heat shock protein 70 mRNA and protein after heat treatment in cells of aged rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1990;87:846-850.

- Feder ME, Hofmann GE. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology* 1999;61:243-282.
- Fehr PM, Flamant JC. Koyun ve Keçi Sütünün Nitelikleri. Avrupa Zootekni Federasyonu Sempozyum Bildirisi. 17-21 Ekim 1983, Ankara. p.191-212.
- Fukuyo Y, Hunt CR, Horikoshi N. Geldanamisin and its anti-cancer activities. *Cancer Letters* 2010;290(1):24-35
- Gade N, Mahapatra RK, Sonawane A, Singh VK, Doreswamy R, Saini M. *Molecular characterization of heat shock protein 70-1 gene of goat (capra hircus)*. *Molecular Biology International* [Electronic Journal], 2010: Erişim: <http://www.hindawi.com/journals/mbi/2010/108429> Erişim tarihi: 04.04.2014
- Gaughan JB, Bonner SL, Loxton I, Mader TL. Effects of chronic heat stress on plasma concentration of secreted heat shock protein 70 in growing feedlot cattle. *Journal of Animal Science* 2013;91:120-129
- Georgopoulos C, Wech WJ. Role of major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annual Review of Cell Biology* 1993;9:601-635.
- Gill RR, Gbur CJ Jr, Fisher BJ, Hess ML, Fowler AA 3rd, Kukreja RC, Sholley MM. Heat shock provides delayed protection against oxidative injury in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1998; 30(12):2739-49.
- Gonzales-Riopedre M, Nova A, Dobano E, Ramos-Martinez JI, Barcia R. Effect of thermal stress on protein expression in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 2007;147(3):531-540.
- Gupta S, Knowlton AA. HSP60 trafficking in adult cardiac myocytes: role of the exosomal pathway. *American Journal and Physiology Heart and Circulatory Physiology* 2007;292:H3052-3056
- Gündeşli H, Dinçer P. Endoplazmik retikulum stresinin moleküler mekanizması ve kas patolojisi arasındaki ilişki. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2008;38:109-114.
- Halliwell B. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews* 1994;52:253-265.
- Halliwell B, Gutteridge MC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal* 1984;219:1-14.
- Harlow E, Lane D. *Antibodies: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1988. p.471-656.
- Harper DR, Coles BF. Western (immuno) blotting and radioimmunoprecipitation. In: Mohy BWJ, Kangro HC(eds) *Virology Methods Manual*. San Diego: Academic. Press. 1996. p.261-266.

- Henle KJ, Jethmanlani SM, Nagle WA. Stress proteins and glycoproteins. *International Journal of Molecular Medicine* 1998;1(1):25-32.
- Heydari AR, Takahashi R, Gutschmann A, You S, Richardson A. HSP 70 and aging. Birkhauser verlag basel 1994;50:1092-1098.
- Heydari AR, Wu B, Takahashi R, Strong R, Richardson A. Expression of heat shock protein 70 is altered by age and diet the level of transcription. *Molecular and cellular biology* 1993;13(5):2909-2918.
- Hodinka RL. The clinical utility of viral quantitation using molecular methods. *Clinical and Diagnostic Virology* 1998;10(1):25-47.
- <http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor> Erişim: 04.03.2014
- <http://www.tuik.gov.tr/UstMenu.do?metod=temelist> Erişim: 04.03.2014
- Hutchins SS, Papania MJ, Amler R, Maes EF, Grabowsky M, Bromberg K, Glasglow V, Speed T, Bellini WJ, Orenstein WA. Evaluation of the measles clinical case definition. *The Journal of Infectious Diseases* 2004;189:153-159.
- Huter JJ, Mestril R, Tam EKW, Sievers RE, Dillmann WH, Wolfe CL. Overexpression of heat shock protein 72 in transgenic mice decreases infarct size in vivo. *Circulation* 1996;94:1408-411.
- Itoh H., Kobayashi R, Wakui H, Komatsuda A., Ohtani H, Miura AB, Otaka M, Masamune O, Andoh H, Koyama K, Sato Y, Tashima Y. Mammalian 60-kDa Stress Protein. *FEBS Journal* 2002;269(23):5931 - 5938.
- İşleten M, Yüceer YK, 2005. Keçi Sütü Kullanılarak Üretilen Ürünler. Süt Keçiciliği Ulusal Kongresi 26-27 Mayıs 2005, İzmir; 2005. p. 177-180.
- Jäättelä M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Experimental Cell Research* 1999;248: 30–43.
- Jäättelä M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *The EMBO Journal* 1998;17:6124-6134.
- Jellinger KA. Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *Journal of Neural Transmission* 2009;116:1111-62.
- Johnson RB, Fearon K, Mason T, Jindal S. Cloning and characterization of the yeast chaperonin HSP60 gene. *Gene* 2003;84: 295- 302.
- Kang BH, Plescia J, Dohi T, Rosa J, Doxsey SJ, Altieri DC. Regulation of tumor cell mitochondrial homeostasis by an organelle-specific hsp90 chaperone network. *Cell* 2007;131:257-270.

- Kaufman RJ. Molecular chaperones and the heat shock response. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998;1423(1):13-27.
- Kaur J, Ralhan R. Induction of apoptosis by abrogation of HSP70 expression in human oral cancer cells. *International Journal of Cancer* 2000; 85(1):1-5.
- Kaymakçı M, Tuncel E, Güney O. Türkiye’de Süt Keçisi Islahı Çalışmaları. Süt Keçiciliği Ulusal Kongresi. 26-27 Mayıs 2005, Bornova-İzmir; 2005a
- Kaymakçı M, Eliçin A, Işın F, Taşkın T, Karaca O, Tuncel E, Ertuğrul M, Özder M, Güney O, Gürsoy O, Torun O, Altın T, Emsen H, Seymen S, Geren H, Odabaşı A, Sönmez R. Türkiye Küçükbaş Hayvan Yetiştiriciliği Üzerine Teknik ve Ekonomik Yaklaşımlar. Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongresi. 3-7 Ocak 2005, Ankara; 2005b. p.707-726.
- Kesenkaş H, Dinkçi N, Kınık Ö, Gönç S, Ender G. Saanen keçisi sütünün genel özellikleri. *Akademik Gıda* 2010;8(2):45-48
- Kim YS, Koh JM, Lee YS, Kim BJ, Lee SH, Lee KU, Kim GS. Increased circulating heat shock protein 60 induced by menopause, stimulates apoptosis of osteoblast-lineage cells via up-regulation of toll-like receptors. *Bone* 2009;45:68-76.
- Kirchhoff SR, Gupta S, Knowlton AA. Cytosolic heat shock protein 60, apoptosis, and myocardial injury. *Circulation* 2002;105:2899-2904
- Konar A, Akın MS. İnek, Keçi ve Koyun Sütlerinden Üretilen Dondurmaların Kimyasal, Fiziksel ve Duyusal Bazı Özelliklerinin Saptanması Üzerine Karşılaştırmalı Bir Araştırma. *Doğa-Türk Tarım ve Ormancılık Dergisi* 1992;16:711-720.
- 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. *The Journal of Biological Chemistry* 1989;264:15083-15087.
- Koyuncu M, Uzun SK, Özis S. Süt Keçisi ve Keçi Sütü. Süt Keçiciliği Ulusal Kongresi. 26- 27 Mayıs 2005, İzmir; 2005. P. 154- 159.
- Kregel KC. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of Applied Physiology* 2002;92:2177-2186.
- Kricka LJ. Nucleic acid detection technologies labels, strategies and formats. *Clinical Chemistry* 1999;45:453-458.
- Kristensen TN, Lovendahl P, Berg P, Loeschke V. Hsp 72 is present in plasma from Holstein-Friesian dairy cattle, and the concentration level is repeatable across days and age classes. *Cell Stress & chaperones* 2004;9(2):143-149

- Kuroda K, Tsukifuji R, Shinkai H. Increased expression of heat-shock protein 47 is associated with overproduction of type I procollagen in systemic sclerosis. *Journal of Investigative Dermatology* 1998;111(6):1023-1028.
- Laad AD, Thomas ML, Fakih AR, Chiplunkar SV. Human gamma delta T cells recognize heat shock protein-60. *International Journal of Cancer* 1999;80(5):709-714.
- Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *Journal of cellular and Molecular Medicine* 2008;12:743-761.
- Latif N, Taylor PM, Khan MA, Yacoub MH, Dunn MJ. The expression of heat shock protein 60 in patients with dilated cardiomyopathy. *Basic Research in Cardiology* 1999;94:112-119.
- Levy-Rimler G, Viitanen P, Weiss C, Sharkia R, Greenberg A, Niv A, Lustig A, Delarea Y, Azem A. The effect of nucleotides and mitochondrial chaperonin 10 on the structure and chaperone activity of mitochondrial chaperonin 60. *European Journal of Biochemistry* 2001;268:3465-3472.
- Liberek K, Lewandowska A, Zietkiewicz S. "Chaperones in Control of Protein Disaggregation", *The EMBO Journal* 2008;27:328-335.
- Liberman E, Fong YL, Selby MJ, Choo QL, Cousens L, Houghton M, Yen TS. Activation of the grp78 and grp94 promoters by hepatitis c virus e2 envelope protein. *Journal of Virology* 1999;73:3718-3722.
- Li CY, Lee JS, Ko YG, Kim JI, Seo JS. 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 GC, Li LG, Liu YK, Mak JY, Chen LL, Lee WM. Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with the human 70-kDa heat shock protein-encoding gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1991;88:1681-1685.
- Lin L, Kim SC, Wang Y, Gupta S, Davis B, Simon SI, Torre-Amione G, Knowlton AA. HSP60 in heart failure: abnormal distribution and role in cardiac myocyte apoptosis. *American Journal and Physiology Heart and Circulatory Physiology* 2007;293:H2238-H2247 ()
- Liu RY, Corry PM, Lee YJ. Regulation of chemical stress-induced HSP 70 gene expression in murine L929 cells. *Journal of cell science* 1994;107:2209-2214.
- Liu AY, Choi HS, Lee YK, Chen KY. Molecular events involved in transcriptional activation of heat shock genes become progressively refractory to heat stimulation during aging of human diploid fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology* 1991;149:560-566.
- Liu AY, Lin Z, Choi HS, Sorhage F, Li B. Attenuated induction of heat shock gene expression in aging diploid fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry* 1989;264:12037-12045.

- Lindquist SL. The heat shock response. *Annual Review of Biochemistry* 1986;55:1151-1191.
- Lindquist S, Craig EA. The Heat shock proteins. *Annual Review of Genetics* 1988;22:631-677.
- Luce MC, Cristofalo VJ. Reduction in heat shock gene expression correlates with increased thermosensitivity in senescent human fibroblasts. *Experimental Cell Research* 1992;202:9-16.
- Luheshi LM, Crowther DC, Dobson CM. Protein misfolding and disease: from the test tube to the organism. *Current Opinion in Chemical Biology* 2008;12:25-31.
- Lydyard PM, van Eden W. Heat shock proteins: immunity and immunopathology. *Immunology Today* 1990; 11:228-30.
- Landry J. Protein Interactions and molecular chaperones, <http://www.tulane.edu/~biochem/med/hsp.htm> Erişim Tarihi: 05.04.2014
- Lyons C, Dowling V, Tedengren M, Gardestrom J, Hartl MJ, O'Brien N, Van Pelt F, O'Halloran J, Sheehan D. Variability of heat shock proteins and glutathione S-transferase in gill and digestive gland of blue mussel, *Mytilus edulis*, *Marine Environmental Research* 2003;56(5):585-597.
- MacRae TH. Structure and function of small heat shock/a-crystallin proteins: established concepts and emerging ideas. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2000;57:899-913.
- Manjili MH, Wang XY, Chen X, Martin T, Repasky EA, Henderson R, Subject JR. HSP110-HER2/neu Chaperone Complex Vaccine Induces Protective Immunity Against Spontaneous Mammary Tumors in HER-2/neu Transgenic Mice. *The Journal of Immunology* 2003;171:4054-4061.
- Marber MS, McStril R, Chi SH, Sayen MR, Yellon DM, Dillmann WH. Overexpression of the rat inducible 70- kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *The Journal of Clinical Investigation* 1995;95:1446-1456.
- Margulis BA, Zhivotovski BD, Pospelova TV, Smagina LV. Patterns of protein synthesis in various cells after extreme heat shock. *Experimental Cell Research* 1991;219-22.
- Marissa V, Powers, Clarke PA, Workman P. Dual Targeting of HSC70 and HSP72 Inhibits HSP90 Function and Induces Tumor-Specific Apoptosis. *Cancer Cell* 2008;14:250-262.
- Mayer MP. Recruitment of hsp70 chaperones: A crucial part of viral survival strategies. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 2005;153:1-46.
- Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2005; 62:670-684.

- Mchta HB, Popovich BK, Dillmann WH. Ischemia induces changes in the level of mRNAs coding for stress protein 71 and creatine kinases M. *Circulation Research* 1988;63:512-517.
- Meghji S, Lillicrap M, Maguire M, Tabona P, Gaston JS, Poole S, Henderson B. Human chaperonin 60 (Hsp60) stimulates bone resorption: structure/function relationships. *Bone* 2003;33:419-425.
- Merendino AM, Bucchieri F, Campanella C, Marcianò V, Ribbene A, David S, Zummo G, Burgio G, Corona DF, Conway de Macario E, Macario AJL, Cappello F. Hsp60 is actively secreted by human tumor cells. *PLoS One* 2010;5(2):e9247
- Mestrl R, Chi SH, Sayen MR, O'Rcilly K, Dillmann WH. Expression of inducible stress protein 70 in rat heart myogenic cells confers protection against stimulated ischemia induced injury. *Journal of Clinical Investigation* 1994;93:759-767.
- Mestrl R, Giordano RJ, Condo AG, Dillmann WH. Adenovirus mediated gene transfer of a heat shock protein 70 (hsp70i) protects against simulated ischemia. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1996;26:2351-2358.
- Morimoto RI. Regulation of the heat shock transcriptional response: Cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes & Development* 1998;12:3788-3796.
- Morimoto RI, Tissières A, Georgopoulos C. *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Plainview, NY, USA, 1994; Volume vii, pp. 610.
- Morimoto RI, Santoro MG. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nature Biotechnology* 1998;16:833-838.
- Morrison-Bogorad M, Zimmerman AL, Pardue S. Heat-shock 70 messenger rna levels in human brain: Correlation with agonal fever. *Journal of Neurochemistry* 1995;64:235-246.
- Mostafazadeh A, Herder C, Haastert B, Hanifi-Moghaddam P, Schloot N, Koenig W, Illig T, Thorand B, Holle R, Eslami MB, Kolb H, KORA Group. Association of humoral immunity to human Hsp60 with the IL-6 gene polymorphism C-174G in patients with type 2 diabetes and controls. *Hormone and Metabolic Research* 2005;37:257-263.
- Mounier N, Arrigo AP. Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? *Cell Stress Chaperones* 2002;7:167-176.
- Möbius J, Groos S, Meinhardt A, Seitz J. Differential distribution of the mitochondrial heat-shock protein 60 in rat gastrointestinal tract. *Cell and Tissue Research* 1997;287:343-350.

- Muramatsu T, Hatoko M, Tada H, Shirai T, Ohnishi T. Age-related decrease in the inductability of heat shock protein 72 in normal human skin. *British journal of dermatology* 1996;134:1035-1038.
- Murtha JM, Keller ET. Characterization of the heat shock response in mature zebrafish (*Danio rerio*). *Experimental Gerontology*, 2003;38(6):683-91.
- Nakai A, Morimoto RI. Characterization of a novel chicken heat shock transcription factor, HSF3, suggests a new regulatory pathway. *Molecular and Cellular Biology* 1993;13:1983-1997.
- Nakai A, Tanabe M, Kawazoe Y, Inazawa J, Morimoto RI, Nagata K. HSF4, a new member of the human heat shock factor family which lacks properties of a transcriptional activator. *Molecular and Cellular Biology* 1997;17:469-481.
- Neckers L. Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Trends in Molecular Medicine* 2002;8:55-61.
- Neckers L, Percy SI. Heat shock protein 90. *Current Opinion in Oncology* 2003;15:419-424.
- Njemini R, Bautmans I, Onyema OO, Puyvelde KV, Demanet C, Mets T. Circulating heat shock protein 70 in healthy, aging and disease. *BMC immunology* 2011;12:24.
- Novak JE, Jarvis TC, Kirkegaard K. RNA: transcription, transfection and quantitation. In: Mohy BWJ, Kangro HC (eds). *Virology Methods Manual*. San Diego: Academic Press. 1996. p.165-190.
- Oglesbee M, Krakowka S. Cellular stress response induces selective intranuclear trafficking and accumulation of morbillivirus major core protein. *Laboratory Investigation* 1993;68:109-117.
- Ojima N. Rainbow trout hspb1 (hsp27): Identification of two mRNA splice variants that show predominant expression in muscle tissues, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 2005;148(3):277-285.
- Otaka M, Odashima M, Watanabe S. Role of heat shock proteins (molecular chaperones) in intestinal mucosal protection. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006;348:1-5.
- Öncel M. Isı şok proteinleri ve kanser. *European Journal of Basic Medical Sciences* 2012;2(1):16-23.
- Özder M. Keçi Irkları. M. Kaymakçı. (Eds). *Keçi Yetiştiriciliği*. Ege Üniversitesi Yayınları. Bornova. İzmir. 2006. p.17-18
- Öztürk E, Kahveci N, Özlük K, Yılmazlar T. Isı şok proteinleri. *Ulusal Cerrahi Dergisi* 2009;25(4):131-136

- Pahlavani MA, Harris MD, Moore SA, Weindruch R, Richardson A. The expression of heat shock protein 70 decreases with age in lymphocytes from rats and rhesus monkey. *Experimental cell research* 1995;218:310-318.
- Paksoy M, Özçelik A. Kahramanmaraş ilinde süt üretimine yönelik keçi yetiştiriciliğine yer veren tarım işletmelerinin ekonomik analizi. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 2008;14(4): 420-427.
- Pandey P, Seleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, Kumar V, Weichselbaum R, Nalin C, Alnemri ES, Kufe D, Kharbanda S. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *The EMBO Journal* 2000;19:4310-4322.
- Pantartzis CN, Kourtidis A, Drosopoulou E, Yiangou M, Scouras ZG. Isolation and characterization of two cytoplasmic hsp90s from *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca Bivalvia) that contain a complex promoter with a p53 binding site. *Gene* 2009;431(1-2):47-54.
- Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, Solary E, Garrido C. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003;304:505–512.
- Pardue S, Groshan K, Raese JD, Morrison-Bogorad M. Hsp70 mRNA induction is reduced in neurons of aged rat hippocampus after thermal stress. *Neurobiology of Aging* 1992;3(6):661-672.
- Paul C, Manero F, Gonin S, Kretz-Remy C, Viot S, Arrigo AP. HSP 27 as a negative regulator of cytochrome c release. *Molecular and Cellular Biology* 2002;22:816-834
- Pawelec G, Rehbein A, Haehnel K, Merl A, Adibzadeh M. Human T cell clones as a model for immunosenescence. *Immunological Reviews* 1997;160:31–43
- Pearl LH, Prodromou C. Structure and in vivo function of Hsp90. *Current Opinion in Structural Biology* 2000;10:46–51.
- Petrof EO, Ciancio M, Chang EB. Role and regulation of intestinal epithelial heat shock proteins in health and disease. *Chinese Journal of Digestive Diseases* 2004;5:45–50.
- Piner P. Lambda cyhalotrinin *Oreochromis niloticus*'da karaciğerde piperonil bütoksit modülatörlüğünde oksidatif stres potansiyelinin belirlenmesi, stres proteinleri ve apoptozis üzerine etkileri. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, Türkiye. 2009.
- Pirkkala L, Nykanen P, Sistonen L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *The FASEB Journal* 2001;15:1118–1131.

- Pivovarova AV, Chebotareva NA, Chernik IS, Gusev NB, Levitsky DI. Small heat shock protein Hsp27 prevents heat-induced aggregation of F-actin by forming soluble complexes with denatured actin. *FEBS Journal* 2007;274:5937-5948.
- Pockley AG. Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2001;3(23):1-21
- Rea IM, McNerlan S, Poncley AG. Serum heat shock protein and anti-heat shock protein antibody levels in aging. *Experimental Gerontology* 2001;36:341-352
- Ritossa FM. A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 1962;18:571-573
- Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C, Paul C, Wieske M, Arrigo AP, Buchner J, Gaestel M. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* 1999;274:18947-18956.
- Ruchalski K, Mao H, Li Z, Wang Z, Gillers S, Wang Y, Mosser DD, Gabal V, Schwartz JH, Borkan SC. Distinct hsp70 domains mediate apoptosis-inducing factor release and nuclear accumulation. *The Journal of Biological Chemistry* 2006;281:7873-7880
- Saibil HR. Chaperone machines in action. *Current Opinion in Structural Biology* 2008;18(1):35-42
- Sakahira H, Nagata S. Co-translation folding of caspase-activated DNase with Hsp70, Hsp40, and inhibitor of caspase-activated DNase. *The journal of Biological Chemistry* 2002;277:3364-3370.
- Sakamoto N, Kokura S, Okuda T, Hattori T, Katada K, Isozaki Y, Nakabe N, Handa O, Takagi T, Ishikawa T, Naito Y, Yoshida N, Yoshikawa T. Heme oxygenase-1 (Hsp32) is involved in the protection of small intestine by whole body mild hyperthermia from ischemia/reperfusion injury in rat. *International Journal of Hyperthermia* 2005;21:603-614.
- Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nature Cell Biology* 2000;2:476-483.
- Samali A, Cal J, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of Jurkat cells. *The EMBO Journal* 1999;18:2040-2048.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- Sarge KD, Murphy SP, Morimoto RI. Activation of heat shock gene transcription by Heat Shock Factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Mol Cell Biol* 2009; 13: 1392-1407.

- Satoh M, Tang J, Nanda A, Zhang JH. Heat shock proteins expression in brain stem after subarachnoid hemorrhage in rats. *Acta Neurochirurgica Supplement* 2003;86:477-482
- Satyal SH, Chen D, Fox SG, Kramer JM, Morimoto RI. Negative regulation of heat shock transcriptional response by HSBP1. *Genes & Development* 1998;12:1962–1974.
- Schäfler AE, Kirmanoglou K, Balbach J, Pecher P, Hannekum A, Schumacher B. The expression of heat shock protein 60 in myocardium of patients with chronic atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol* 2002;97:258-261
- Sen T, Sen N, Brait M, Begum S, Chatterjee A, Hoque MO, Ratovitski E, Sidransky D. DNp63a confers tumor cell resistance to cisplatin through the AKT1 transcriptional regulation. *Cancer Research* 2011;71(3):1167-1176.
- Sherman M, Multhoff G. Heat shock proteins in cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007;1113:192-201
- Smith JR, Workman P. Targeting the cancer chaperone HSP90. *Cancer* 2007;4(4):219-27.
- Soltys BJ, Gupta RS. Immunoelectron microscopic localization of the 60-kDa heat shock chaperonin protein (Hsp60) in mammalian cells. *Experimental Cell Research* 1996;222(1):16-27.
- Soti C, Sreedhar AS, Csermely P. Apoptosis, necrosis and cellular senescence: chaperone occupancy as a potential switch. *Aging Cell* 2003;2:39-45.
- Sreedhar AS, Csermely P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: A comprehensive review. *Pharmacology and Therapeutics* 2004;101:227-257.
- Srivastava P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annual Review of Immunology* 2002;20:395–425.
- Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, Mosser DD. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax Translocation. *The Journal of Biological Chemistry* 2005;280:38729-38739.
- Stoler DL, Michael NL. Nucleic acid blotting techniques for virus detection. In: Wiedbrauk DL, Farkas DH (eds). *Molecular methods for virus detection*. Academic Press Inc 2005. p.39-71.
- Su CY, Chong KY, Chen J, Ryter S, Khardori R, Lai CC. A physiologically relevant hyperthermia selectively activates constitutive hsp70 in h9c2 cardiac myoblasts and confers oxidative protection. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1999;31:845:855.

- Sun Y, McRae TH. The small heat shock proteins and their role in human disease. *FEBS Journal* 2005;272:2613–2627.
- Şengonca M. Küçükbaş hayvan yetiştirme bölüm 1 (keçi yetiştiriciliği). Uludağ Üniversitesi Basımevi 1989. p.47-51
- Şengonca M, Kaymakçı M. Orman bölgeleri açısından kıl keçi varlığının ıslahı. *Ege Üniversitesi. Ziraat Fakülteleri Dergisi* 1982;19(1):189-192.
- Şengonca M, Kaymakçı M, Kızılay E, Taşkın T. Türkiye’de kıl keçi ıslahı için çok amaçlı bir proje modeli. II. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi. 22-25 Eylül 1998, Bursa; 1998. p. 320-328.
- Taguchi H, Makino Y, Yoshida M. Monomeric chaperonin-60 and its 50-kDa fragment possess the ability to interact with non-native proteins, to suppress aggregation, and to promote protein folding. *The Journal of Biological Chemistry* 1994;269:8529-8534.
- Taira T, Sawai M, Ikeda M, Tamai K, Iguchi-Arigo SM, Arigo H. Cell cycle-dependent switch of up-and-down-regulation of human hsp70 gene expression by interaction between c-Myc and CBF/NF-Y. *The Journal of Biological Chemistry* 1999;274(34):24270-24279.
- Tanabe M, Kawazoe Y, Takeda S, Morimoto RI, Nagata K, Nakai A. Disruption of the HSF3 gene results in the severe reduction of heat shock gene expression and loss of thermotolerance. *The EMBO Journal* 1998;17:1750–1758.
- Thomas X, Campos L, Le QH, Guyotat D. Heat shock proteins and acute leukemias. *Hematology* 2005;10(3):225-235.
- Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology* 1974;85:389–398.
- Tomanek L. The Heat-Shock Response: Its Variation, Regulation and Ecological Importance in Intertidal Gastropods (Genus *Tegula*). *Integrative and Comparative Biology* 2005;42(4):797-807.
- Toussaint O, Michiels C, Raes M, Remacle J. Cellular aging and the importance of energetic factors. *Experimental Gerontology* 1995;30:1-22.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. *National Academy of Sciences*. 1979;76(9):4350-4354.
- Türk Gıda Kodeksi Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği (2006/38), Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Ankara, <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2006/08/20060822-4.htm>. Erişim Tarihi: 20.03.2014

- Tsutsumi-Ishii Y, Tadokoro K, Hanaoka F, Tsuchida N, response of heat shock element within the human HSP70 promotor to mutated p53 genes. *Cell Growth Differ* 1995;6(1):1-8.
- Vázquez JAT, Valencia-Posadas M, Castillo- Juárez H, Montaldo HH. Genetic and phenotypic parameters of milk yield, milk composition and age at first kidding in Saanen goats from Mexico. *Livestock Science* 1999;126:147-153.
- Vicencio A, Bidmon B, Ryu J, Reidy K, Thulin G, Mann A, Gaudio KM, Kashgarian M, Siegel NJ. Development expression of HSP-72 and ischemic tolerance of the immature kidney. *Pediatric Nephrology* 2003;18:85-91
- Vishal C, Kumar JU, Swamy CVB, Nandini R, Srinivas G, Kumaresan R, Shashi S, Sreedhar AS. Repercussion of Mitochondria Deformity Induced by Anti- Hsp90 Drug 17AAG in Human Tumor Cells. *Journal of Drug Target Insights* 2011;5:11–32.
- Voisine C, Pedersen JS, Morimoto RI. Chaperone networks: Tipping the balance in protein folding diseases. *Neurobiology of Disease* 2010;40(1):12-20.
- Volloch VZ, Sherman MY. Oncogenic potential of Hsp72. *Oncogene* 1999;18: 3648 -51.
- Voss OH, Batra S, Kolattukudy SJ, Gonzalez-Riopedre Mejia ME, Smith JB, Doseff AI. Binding of caspase-3 prodomain to heat shock protein 27 regulates monocyte apoptosis by inhibiting caspase-3 proteolytic activation. *The Journal of Biological Chemistry* 2007;282:25088-99
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A. Role of plant heat shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 2004;9(5):244-252.
- Wax MB, Tezel G, Saito I, Gupta RS, Harley JB, Li Z, Romano C. Anti-Ro/SS-A positivity and heat shock protein antibodies in patients with normal-pressure glaucoma. *American Journal of Ophthalmology* 1998;125:145-157
- Wax MB, Tezel G, Yang J, Peng G, Patil RV, Agarwal N, Sappington RM, Calkins DJ. Induced autoimmunity to heat shock proteins elicits glaucomatous loss of retinal ganglion cell neurons via activated T-cell-derived fas-ligand. *The Journal of Neuroscience* 2008;28:12085-12096
- Westerheide SD, Morimoto RI. Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. *The Journal of Biological Chemistry* 2005;280:33097–33100.
- William S. Klug, Michael R. Cummings. *Genetik Kavramlar*, Palme Yayıncılık, Altıncı Baskıdan Çeviri, 2002. p.401
- Win row VR, Mclean L, Morris CJ, Blake DR. The heat shock protein response and its role in inflammatory disease. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1990;49:128-32.

- Wishniewski M, Close TJ, Artlip T, Arora R. Seasonal patterns of dehydrins and 70-kDa heat-shock proteins in bark tissues of eight species of woody plants. *Physiologia Plantarum* 1996;96:496–505.
- Workman P. Altered states: selectively drugging the Hsp90 cancer chaperone. *Trends in Molecular Medicine* 2004;10:47–51.
- Wu B, Gu MJ, Heydari AR, Richardson A. The effect of age on the synthesis of two heat shock proteins in the HSP 70 family. *The Journals of Gerontology* 1993;48:50-56.
- Yaglom JA, Gabai VL, Sherman MY. High Levels of Heat Shock Protein Hsp72 in Cancer Cells Suppress Default Senescence Pathways. *Cancer Research* 2007;67:2373-2381.
- Yamagishi N, Saito Y, Ishihara K, Hatayama T. Enhancement of oxidative stress-induced apoptosis by Hsp105alpha in mouse embryonal F9 cells. *European Journal of Biochemistry* 2002;269:4143-4151.
- Yan LJ, Christians ES, Liu L, Xiao X, Sohal RS, Benjamin LJ. Mouse heat shock transcription factor 1 deficiency alters cardiac redox homeostasis and increases mitochondrial oxidative damage. *The Journal of EMBO* 2002;21:5164-5172.
- Yang M, Tan H, Cheng L, He M, Wei Q, Tanguay RM, Wu T. Expression of heat shock proteins in myocardium of patients with atrial fibrillation. *Cell Stress Chaperones* 2007;12:142-150
- Yetişmeyen A. Türkiye’de Keçi Sütü Üretimi ve Keçi Sütünün Değerlendirilmesi. *Akademik Gıda* 2009;7(1):58-60.
- Young RA. Stress proteins and immunology. *Annual Review of Immunology* 1990;8:401-20.
- Zhang MH, Lee JS, Kim HJ, Jin DI, Kim JL, Lee KJ, Seo JS. HSP90 protects apoptotic cleavage of vimentin in geldanamycin-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2006;281:111-121.
- Zhao Q, Wang J, Levichkin IV, Stasinopoulos S, Ryan MT, Hoogenraad NJ. A mitochondrial specific stress response in mammalian cell. *EMBO Journal* 2002;21:4411-4419.
- Zulkifli I, Norbaiyah B, Cheah YW, Soleimani AF, Sazili AQ, Goh YM, Rajion MA. A note on heat shock protein 70 expression in goats subjected to road transportation under hot, humid tropical conditions. *Animal* 2010;4(6):973 975

ÖZGEÇMİŞ

30.10.1989 tarihinde Aydın'da doğan Selçuk Ertürk Adıyaman ilk ve orta öğrenimini Cumhuriyet İlköğretim Okulu'nda lise öğrenimini Aydın Lisesi'nde tamamladı. 2007 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesini kazandı ve 2012 yılında mezun oldu. Aynı yıl Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Veteriner) Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam boyunca desteğini her zaman hissettiğim, maddi ve manevi hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, bilgisi ve birikimiyle bana yol gösteren çok kıymetli danışman hocam sayın Prof. Dr. Funda KIRAL'a çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalıőmalarım süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK'e, Doç. Dr. Pınar Alkım ULUTAŐ'a ve Yard. Doç. Dr. Serap ÜNÜBOL AYPAK'a çok teşekkür ederim.

Gerek laboratuvar çalıőmalarımda, gerekse de tez yazım aşamasında bıkmadan usanmadan yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Araő. Gör. Gamze Sevri EKREN'e ve yüksek lisans öğrencisi Nurten KURT'a ve sonsuz teőekkürler ederim.

Yüksek lisans eęitimim boyunca maddi manevi beni her zaman destekleyen canım aileme sonsuz teőekkürler ederim.