

ISI ŞOK PROTEİNİ HSP 70'İN
STRES VE FARKLI
NÜKLEOTİTLER VARLIĞINDA
YAPISINDA MEYDANA
GELEN DEĞİŞİKLİKLERİN İNCELENMESİ

Derya ARSLAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
2008

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ISI ŞOK PROTEİNİ HSP 70'İN STRES VE FARKLI NÜKLEOTİTLER
VARLIĞINDA YAPISINDA MEYDANA GELEN DEĞİŞİKLİKLERİN
İNCELENMESİ

Derya ARSLAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
2008

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞ'NE

Bu çalışma, jürimiz tarafından, Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Nursevin ÖZTOP
Üye: Yrd. Doç.Dr. Yusuf TUTAR
Üye: Yrd. Doç. Dr Şeker DAĞ

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

11/09/2008

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Prof. Dr. Sezai ELAGÖZ

ISI ŞOK PROTEİNİ HSP 70'İN STRES VE FARKLI NÜKLEOTİTLER
VARLIĞINDA YAPISINDA MEYDANA GELEN DEĞİŞİKLİKLERİN
İNCELENMESİ

Derya ARSLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

2008

Danışman

Bölüm-Ünvan

İmza

Yrd. Doç. Dr. Yusuf TUTAR

Kimya Bölümü-Yrd. Doç. Dr

Bu tez, Cumhuriyet üniversitesi Senatosunun 05.01.1984 tarihli toplantısında kabul edilen ve daha sonra 30.12.1993 tarihinde C.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğünce hazırlanan ‘‘Yüksek Lisans ve Doktora tez yazım Kılavuzu’’ adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	iii
SUMMARY	iv
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Protein Katlanmaları (Folding)	2
1.2. HSP (Heat Shock Protein) Ailesi	4
1.3. HSP70 'in Yapısı	6
1.4. HSP70'in İzofomları	7
1.5. Mayadaki Hsp70 ve Prionlar	9
1.5.1. Hsp104 /Hsp70 ve Hsp40'ın Fonksiyonları	14
1.5.2. Hsp70/Hsp90 Substrat Döngüsü	17
1.6. Protein Ayrılması ve Tayini	19
1.6.1 Protein Tayinleri	20
1.6.2 Çözünürlüğe Dayanan Ayırmalar	20
1.6.3 Büyüklük Farkına Dayanan Ayırmalar	21
1.6.3.1 Diyaliz	21
1.6.3.2 Kromatografi	21
1.6.3.3 Elektroforez	22
1.7. FTIR ve Protein Uygulamaları	23
1.7.1. Kromoforlar	24
1.8. N-DSC III (Nano - Differential Scanning Calorimeter III)	
Diferansiyel Taramalı Kalorimetre	26
1.9. Fark Spektroskopisi	29
1.9.1. Çözücü Rahatsız Etme Metodu	29
1.10. Floresans Spektroskopisi	30
1.11. Amaç	33
2. MATERYAL ve YÖNTEM	35
2.1. Deneilerin Yapıldığı Yer ve Tarih	35
2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Sarf Malzemeler	35

2.3. Kullanılan Cihazlar	35
2.4. Protein oğaltılması	36
2.4.1. Petri Tabakalarında Hücre oğaltılması	36
2.4.2. YPD Kültürüyle Hücre oğaltılması	36
2.5. Maya Hücrelerinin Parçalanması (Homojenizasyon)	37
2.6. Maya Proteinlerinin Saflaştırılması	37
2.6.1. Poliakrilamid Jel Hazırlanması	38
2.6.2. rnek Hazırlanması	39
2.6.3. Elektroforez	40
2.7. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) ile Maya Proteinleri Ssa1, Hsp70 ve Hsc70'in Yapı Analizi	41
2.8. Ssa1, Hsp70 ve Hsc70 Proteinlerinin Florimetre Spektroskopisi ile Denetürasyon Deneyleri	41
2.9. Nano-DSC III	42
2.10. UV-VIS Spektroskopisi	44
2.10.1. Fark Spektroskopisi	44
2.10.2. Söndürme (Quenching)	45
3. BULGULAR	46
3.1. Hsp70 ve Prionlaşması	46
3.2. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) ile Ssa1, Hsc70 ve Hsp70'in ADP ve ATP Nükleotidleri Varlığında ve Yokluğunda İkincil Yapılarının Karşılaştırmaları	47
3.3. Ssa1, Hsc70 ve Hsp70 Proteinlerinin Florimetre Spektroskopisi ile İncelenmesi ve Denetürasyon Deneyleri	52
3.4. Söndürme Deneyleri	61
3.5. DSC Deneyleri	65
4. TARTIşMA ve SONUÇ	70
5. KAYNAKLAR	72
6. ZGEMİş	82

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ISI ŞOK PROTEİNİ HSP 70'İN STRES VE FARKLI NÜKLEOTİTLER
VARLIĞINDA YAPISINDA MEYDANA GELEN DEĞİŞİKLİKLERİN
İNCELENMESİ

Derya ARSLAN

Cumhuriyet Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Yusuf TUTAR

Hsp70 türleri arasında korunmuştur ve hücrelerin yaşamı için gereklidir. Hsp70lerin nükleotid dizisi hatta amino asit dizileri karşılaştırıldığında yüksek oranda benzerlik gösterirler. Bundan dolayı, laboratuvarımızda Hsp70 proteinlerinin yapı-fonksiyon ilişkileri incelendi. Maya strainlerinin manipülasyonu diğerlerine göre daha kolay olması itibarı ile sitozolik maya proteini Hsp70 (Ssa1) ve iki maymun homolog proteini S.Pombe' de karşılaştırıldı. Maymun proteinleri Hsc70 ve Hsp70 sırasıyla konstitif ve indüktif olarak eksprese edilirler.

Fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için proteinlerin doğru olarak katlanması gereklidir. Stres altında, proteinler üçüncül yapılarını ve dolayısı ile fonksiyonlarını kaybederler. Bundan dolayı Hsp70 substrat proteinlerin doğal haline katlanabilmelerine yardımcı olabilmeleri için göreceli yüksek sıcaklıklara dayanabilmelidirler.

Bu araştırmanın amacı, farklı nükleotitler varlığında ve yokluğunda ısı stresi altında Hsp70'in kararlılığının ve yapısının araştırılmasıdır.

Spektroskopik ve kalorimetrik deneyler tüm proteinlerin fizyolojik olarak yüksek sayılan sıcaklıklarda kararlı olduklarını ve farklı nükleotitler varlığında yapılarını koruduklarını gösterdi.

Literatürde ilk olarak, Hsp70 plazmitlerinin bütün maya hücreleri üzerine etkisini incelendi. Bu ilave deneyler, proteinlerin kararlılığa etkisi olma açısından, plazmitlerin hücreye kararlılık verdiğini gösterdi.

Anahtar Sözcükler: Isı şok proteini, indüktif ve konstitif protein ekspresyonu, S.Pombe, Ssa1.

SUMMARY

MsC Thesis

CONFORMATIONAL CHANGES OF HEAT SHOCK PROTEIN 70 IN THE
PRESENCE OF STRESS AND DIFFERENT NUCLEOTIDES

Derya ARSLAN

Cumhuriyet University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Dr. Yusuf TUTAR

Hsp70 is conserved among species and is essential for existence of the cell. Nucleotide sequence comparison and even amino acid sequence comparison of Hsp70s indicated high sequence similarity. In this end, our lab decided to examine-structure function relationship of Hsp70 proteins. Since manipulation of yeast strain is relatively easier, yeast stoplasmic Hsp70 (Ssa1) and two primate homolog were compared in *S. Pombe*. Primate proteins Hsc70 and Hsp70 are constitutively and inductively expressed respectively.

To elucidate their function, proteins must be correctly folded. Under stress, proteins lose their tertiary structure and as a consequence their function. Thus, Hsp70 must bear to relatively elevated temperatures so that it can help substrate proteins to fold their native state.

The purpose of this investigation was to investigate structure and stability of Hsp70 under heat stress in the presence and absence of different nucleotides.

Spectroscopic and calorimetric experiments showed that all proteins were stable at physiologically high temperatures and maintain their structure in the presence of different nucleotides. Also, nucleotides do not introduce significant structural changes and the proteins assume rigid body movement for signal transduction for their function.

For the first time in the literature we investigated the effects of Hsp70 plasmids on intact yeast cells. This additional experiment showed that the plasmids confer appreciable stability to the cells, another indication for the stability contribution of the proteins.

Key Words: Heat shock protein, inducible and constitutive protein expression, *S.Pombe*, Ssa1.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım ve çalışmalarımı yönlendiren Tez Danışman Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Yusuf TUTAR' a;

Çalışmalarım süresince gösterdiği ilgi ve yardımlarından ötürü tüm araştırma görevlisi hocalarıma özellikle Araştırma Görevlisi Serap ŞAHİN BAŞAK'a;

Tez çalışmalarım için gerekli olan kaynakların sağlandığı Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyon Başkanlığı (CÜBAB) ve Devlet Planlama Teşkilatı (DPT)'na ;

Her zaman ve her konuda desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili aileme en içten duygularıyla;

teşekkür ederim...

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Proteinlerin üç boyutlu yapıda katlanmaları	2
Şekil 1.2.	Eşzamanlı polipeptit katlanmalar	2
Şekil 1.3.	Moleküler şaperonlar yardımı ile protein katlanmaları	3
Şekil.1.2.1.	Önemli Hsp Aileleri	4
Şekil 1.3.1.	HSP70 'in ATPaz domain bölgesi	6
Şekil 1.3.2.	HSP70 'in Substrat bağlayıcı ve C – terminal bölgeleri	7
Şekil 1.4.1.	DnaK 'nın şaperon döngüsünün modeli.	8
Şekil 1.4.2.	Prokaryot hücrelerde Hsp70 şaperon ailesinin şematik döngüsü	8
Şekil 1.4.3.	Ökaryot hücrelerde Hsp70 şaperon ailesinin şematik döngüsü	9
Şekil 1.5.1.	[PSI ⁺] için prion modelinin şematik gösterimi	11
Şekil 1.5.2.	[PSI ⁺] ve Hsp104 ilişkisi. Sup35 in zamanla prion [PSI ⁺]’a dönüşmesi ve amiloid/fibril yapıların oluşumu (A). Hsp104 ün oluşan agregatları parçalaması ve Hsp70/40 proteinlerinin katılımı (B). Hsp104 inhibisyonu ile [PSI ⁺] prionunun engellenmesi (C)	12
Şekil 1.5.3.	Hsp70 /Hsp40 etkileşimi ve ATP ye bağlı olarak substrat değişimi	13
Şekil 1.5.1.1.	Hsp104/ Hsp70/ Hsp40 proteinleri için önerilen protein katlama mekanizması	15
Şekil 1.5.1.2.	Tau agregasyonu ve Hsp70 sistemleri	17
Şekil 1.5.2.1.	Hsp70/Hsp90 substrat döngüsü	18
Şekil 1.5.2.2.	Prionun büyük ve basamaklı toplanmaya sebep olması ve bu büyük toplulukların parçalanmasıyla prion çekirdeğinin sayısının artması	18
Şekil 1.8.1.	N-DSC III blok diyagramı.	27
Şekil 1.8.2.	N-DSC III kılcal hücre ölçüm birimleri. 6 ve 7 kılcal hücreler	28
Şekil 1.10.1.	Hsp70’in üre ile denaturasyon eğrisi	32
Şekil 2.9.1.	DSC kılcal hücrelerinin şematik gösterimi	42
Şekil 2.9.2.	DSC cihazından su geçirilmesi	43
Şekil 3.1.1.	Petri tabaklarındaki prionlaşma	46

Şekil 3.2.1. Ssa1 proteininin farklı nükleotidler varlığında Amid I bölgesi FTIR spektrumları	49
Şekil 3.2.2. Hsc70 proteininin farklı nükleotidler varlığında Amid I bölgesi FTIR spektrumları	50
Şekil 3.2.3. Hsp70 proteininin farklı nükleotidler varlığında Amid I bölgesi FTIR spektrumları	51
Şekil 3.3.1. Ssa1 proteininin 0,95M'lık ADP varlığındaki floresans spektrumu	53
Şekil 3.3.2. Ssa1 proteininin 6M'lık üre ve 0,95M'lık ADP varlığındaki floresans spektrumu	54
Şekil 3.3.3. Hsc70 proteininin 0,95M'lık ADP varlığındaki floresans spektrumu	55
Şekil 3.3.4. Hsc70 proteininin 6M'lık üre ve 0,95M'lık ADP varlığındaki floresans spektrumu	56
Şekil 3.3.5. Hsp70 proteininin 0,95M'lık ADP varlığındaki floresans spektrumu	57
Şekil 3.3.6. Hsp70 proteininin 6M'lık üre ve 0,95'lık ADP varlığındaki floresans spektrumu	58
Şekil 3.3.7. Hsp70 denaturasyon eğrisi	59
Şekil 3.3.8. Katlanmamış protein nükleotit yokluğunda serbest enerji değişiminin farklı üre derişimlerdeki serbest Gibbs enerjisine bağıllığı	60
Şekil 3.3.9. Katlanmamış protein nükleotit varlığında serbest enerji değişiminin farklı üre derişimlerdeki serbest Gibbs enerjisine bağıllığı	60
Şekil 3.4.1. Hsc70 yapısının ADP yokluğuna ve varlığında söndürme deneyleri	62
Şekil 3.4.2. Hsp70 yapısının ADP yokluğuna ve varlığında söndürme deneyleri	63
Şekil 3.4.3. Ssa1 yapısının ADP yokluğuna ve varlığında söndürme deneyleri	64
Şekil 3.5.1. Maya hüresine transforme edilen (genoma yerleştirilen) ısı şok proteinlerinin hücre kararlılığına etkisi	66
Şekil 3.5.2. Ssa1 yapısının ADP yokluğunda ve varlığında DSC kromatogramları	67
Şekil 3.5.3. Hsp70 yapısının ADP yokluğunda ve varlığında DSC kromatogramları	68
Şekil 3.5.4. Hsc70 yapısının ADP yokluğunda ve varlığında DSC kromatogramları	69

KISALTMALAR DİZİNİ

- **ADP** = Adenozin difosfat
- **APS** = Amonyum per sülfat
- **ATP** = Adenozin trifosfat
- **BSA** = Sığır serum albümini
- **ClpB** = *E.Coli* Hsp104 analogu
- **DEAE** = Dietilaminoetil
- **DNA** = Deoksiribo nükleik asid
- **DnaJ** = *E.Coli* Hsp40 analogu
- **DnaK** = *E.Coli* Hsp70 analogu
- **DTT** = Ditiotireitol
- ***E.Coli*** = *Escherichia coli*
- **EDTA** = Etilendiamin tetra asetik asit
- **FTIR** = Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
- **GroEL** = Ökoryat Hsp60 yapısının bakteri homologu
- **GroES** = Ökoryat Hsp10 yapısının bakteri homologu
- **GrpE** = Nükleotit değişim faktörü
- **GuHCl** = Guanidin hidroklorür
- **HCl** = Hidroklorik asit
- **Hsp27** = Heat shock (ısı şok) protein 27
- **Hsp40** = Heat shock (ısı şok) protein 40
- **Hsp60** = Heat shock (ısı şok) protein 60
- **Hsp70** = Heat shock (ısı şok) protein 70
- **Hsp104** = Heat shock (ısı şok) protein 104
- **IR** = Infrared Spektroskopisi
- **N- DSC** = Nano – (Differential Scanning Calorimeter) Diferansiyel taramalı kalorimetre
- **PSI+** = Sup35 proteinin prion hali
- **PSI-** = Sup35 proteinin prionlaşmamış hali
- **PMSF** = Fenilmetilsülfonilflorit
- **SDS-PAGE** = Sodyum dodesil sülfat- Poliakrilamit jel

- **Sup35** = Ökaryotlarda Sub45 ile translasyonu durduran protein
- **Sup45** = Ökaryotlarda Sub35 ile translasyonu durduran protein
- **TEMED** = N,N,N',N' – tetrametiletildiamin
- **tRNA** = Taşıyıcı Ribonükleik asit
- **UV-VİS** = Ultraviyole-görünür bölge spektroskopisi
- **YPD** = Yeast ekstrat-pepton-D-glukoz

1. GİRİŞ

Hücrede miktarı stresle artan ve moleküler şaperon olarak bilinen proteinlere genel olarak ‘‘ısı şok proteinleri’’ denir. Bu proteinler ‘‘stres proteinleri’’ olarak ta adlandırılırlar.

Moleküler şaperon olarak bilinen bu ısı şok proteinleri tüm canlıların hücreleri tarafından stres uyarıcılarına cevap olarak üretilen bir grup proteinlerdir. Oksidasyon ve toksik bileşenlerin parçalanması gibi pek çok stres faktörleri bütün hücrelerde cevap olarak şaperon proteinlerinin sentezine neden olur.

Stresin başladığı ilk zamanlarda ısı şok protein seviyeleri oldukça yüksektir. Hücre başlangıç şokundan sonra yüksek miktarda ısıyla etkileşse bile, ısı şok proteini seviyeleri düşmeye başlar ve sonuçta normal seviyelerine iner. Isı şok proteinleri büyüme, farklılaşma, bölünme, hatta hücre ölümü dahil hücre metabolizmasının tüm evrelerinde hayati önem taşır. Isı şok proteinlerinin diğer proteinlerle etkileşip onların görev ve yapılarını değiştirebilme özellikleri bu proteinlerin önemini yansıtır. Isı şok proteinlerinin ekspresyonunu artıran etmenler aşağıdaki gibi sıralayabilir.

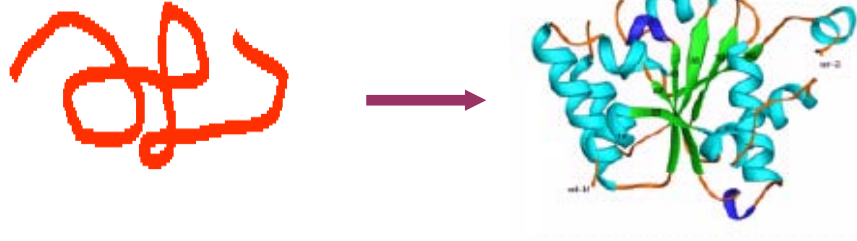
- Yüksek sıcaklık
- UV
- Ağır metaller
- Oksidanlar
- Enfeksiyon
- Oksidatif stres (iskemi)
- Ozmotik stres
- İltahaplanma

Isı şok proteinleri protein kümeleşmesini engellediği gibi yanlış katlanmış substrat proteinleri ya normal üç boyutlu haline getirir ya da degradasyona gitmesine yardım eder (Tutar L 2008, Tutar Y 2006).

Isı şok proteinleri türler arasında korunmuştur ve hücreyi stres kaynaklarından koruyup homeostaz halini sağlar (Tutar Y. 2006, Bukau B. 1999).

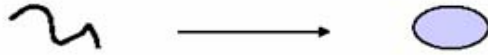
1.1. Protein Katlanmaları (Folding)

Proteinlerin fonksiyonlarını yapabilmeleri için öncelikle yapısal olarak uygun şekilde katlanmaları gerekir. Bu sayede yapısal görevlerini gerçekleştirebilmeleri için gereksinim duydukları üç boyutlu yapıyı kazanırlar.



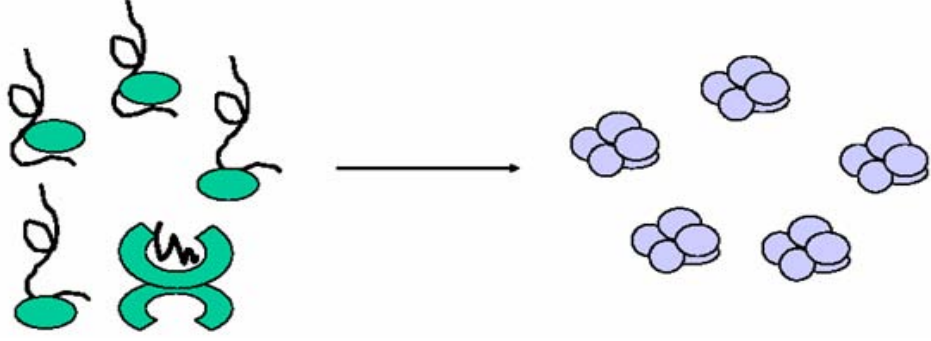
Şekil 1.1. Proteinlerin üç boyutlu yapıda katlanmaları (Tutar Y. 2006, Bukau B. 1999)

Küçük tek domain proteinler için eş zamanlı polipeptit katlanmalar düşük derişimlerde, düşük sıcaklıkla meydana gelir.



Şekil 1.2. Eşzamanlı polipeptit katlanmalar (Tutar Y. 2006, Bukau B. 1999)

Protein derişiminin yüksek olduğu sitozolde, ısı şok proteinleri protein katlanması için gereklidirler. Özellikle, yüksek sıcaklıklarda ve büyük multi-domain protein katlanmaları için gereklidir.



Şekil 1.3. Moleküler şaperonlar yardımı ile protein katlanmaları (Tutar Y. 2006, Bukau B. 1999)

Mutasyonlar veya çevresel stres, proteinlerde hasara neden olur. Eğer yanlış katlanmış veya zarar görmüş proteinler belli bir kritik noktanın üstünde birikirse, nörodejeneratif (sinir hücrelerinin tahrip olmasıyla oluşan) hastalıklara neden olur. Huntington, Parkinson, Alzheimer ve Lou Gehrig bu tip hastalıklara örnek verilebilir

1995 yılında insandaki ısı şok genini ilk defa klonlayan Profesör Morimoto “ısı şok tepkisinin dünyadaki bütün canlılarda ortak özellik” olduğunu ifade etmiştir.

Ritossa, 1962 yılında inkübatörde yüksek sıcaklığa tabi tutulan *Drosophila busckii* larvalarının tükürük bezlerindeki dev kromozomlarda artan bir gen ekspresyonu gözlemledi.

Drosophila dev kromozomlarında bir bölgede görülen şişkinlikler (puff), o bölgedeki yoğun bir gen aktivitesinin başlangıcını göstermektedir.

Ritossa tarafından, *Drosophila* larvalarının tükürük bezi hücrelerinde, ısı şoku sonrası, ısı şok protein genlerinin yerleşim bölgelerinde artan aktiviteye bağlı olarak şişkinlikler gözlemlenmiştir.

1.2. HSP (Heat Shock Protein) Ailesi

Isı şok proteinleri, molekül kütlelerine göre bazı alt gruplara ayrılırlar. Bir grubun üyeleri sadece büyüklük yönünden değil, başka özellikleriyle de benzerlik gösterirler. Örneğin; HSP 60 ve HSP 70 aileleri, ister bakteri, ister küf, ister bitki veya hayvan hücresinde bulunsun benzer fonksiyonlar görürler ve bunların amino asit sıralanmaları %50'nin üzerinde benzerlik gösterir. Ve ayrıca HSP60 ve HSP70 E.R (endoplazmik retikulum) içindeki kalneksin ve mitokondri içindeki karetikulum proteinlerinin katlanmalarına yardımcı olurlar. HSP 70 VE HSP40 katlanmamış proteinleri yakalayarak bozunmasını engellerken, HSP60 ise bozunmuş proteinleri yakalayıp bu proteinlerin kimyasal enerjileri yardımıyla parçalanmasını sağlar (www.biochem.wisc.edu). Önemli Hsp aileleri Şekil 1.2.1.'de özetlenmiştir.

Önemli Hsp Aileleri

Şaperon	Molekül topoloji	Fonksiyon	Yapı
Hsp100 (ClpB)		Bozulma için ATP 'ye bağımlı toplanmalar ve açılmalar	N-ter domain, Çözümlenen NBD1
Hsp90	proteinler için çoklu bağlayıcı yer	steroid hormon alıcılarının uygunmatürasyonu	Çözümlenen ATPaz domain
Hsp70(DnaK)		Genişletilen polipeptitlerin hidrofobik bölgelerinin ATP 'ye bağlı stabilizasyonu	Ayrı olarak çözümlenen ATPaz domain ve peptid bağlayıcı domain
Hsp60, Hsp10 (GroEL, GroES)		Doğal durumda ATP 'ye bağlı protein katlanması	Çözümlendi
Küçük Hsps	farklı oligomerler	Stabilizasyona karşı ısı şoku sırasında kümeleşme	Bazıları çözümlendi

Şekil.1.2.1. Önemli Hsp Aileleri (Tutar Y., 2003)

Isı şok proteinleri ailesinin en önemli özelliklerinden biri ökaryotlar ve prokaryotlarda evrim boyunca en iyi korunmuş protein olmalarıdır. En ilkel bakteriden, en karmaşık ökaryota kadar tüm canlılarda bulunur. (tek istisnai olgu *Hydra olygactaris*). Hücre içerisinde sürekli sentezlenen ve stres uyarımlı üyeleri bulunmaktadır.

Biyoloji ve tıpta önemli bir araştırma konusu olan ısı şok proteinlerinin yapısının evrim boyunca büyük bir özenle korunduğu ve ısı şok cevabının insandan bakteriye kadar tüm canlılarda bulunduğu artık bilinmektedir (De Maio A. 1999 ;..).

Isı şok proteinleri büyüme, farklılaşma, bölünme, hatta hücre ölümü dahil hücre metabolizmasının tüm evrelerinde hayati önem taşır. Isı şok proteinleri, pek çok mikrobik temsilcinin konakta immün cevap oluşturmasında rol oynayan antijenlerdendir. Isı şok proteinlerine karşı gelişen immün cevaplar çapraz reaksiyonlar vasıtasıyla hücrenin kendisine karşı da (anti-self) reaksiyon oluşmasına neden olabilmektedir. Sağlıklı bireylerin, enfeksiyon veya herhangi bir şekilde strese maruz kalmış kendi hücrelerinden arınmak için, kendi Isı şok proteinlerine karşı immün cevap verebilme yeteneklerinden yararlanabildikleri ileri sürülmektedir. İşte bu yeteneklerin düzenlenmesindeki bozukluklar bazı oto immün hastalıklara yol açabilir. Isı şok proteinleri, immün cevapta hedef olmanın yanı sıra, antijen sunulmasında da önemli rol oynarlar (Korber P ve ark.,2000).

Isı şok proteinlerin önemi, diğer proteinlerle etkileşip onların fonksiyon ve yapılarını değiştirebilme özelliklerine dayanır. Bu proteinlerin bazı fonksiyonel özellikleri belirlenmiştir. HSP60 ve HSP70 ailelerinin bireyleri, hücre içi polipeptidlerin katlanma, açılma ve translokasyonunda olduğu kadar, oligomerik protein komplekslerin toplanma, birleşme ve ayrılmalarında da önemli rol oynar. Bu grup stres proteinleri, sitoplazmik proteinleri açarak mitokondri, kloroplast veya endoplazmik retikuluma taşır ve bu organellerin içinde tekrar katlanmalarını ve gerekiyorsa oligomerik kompleksler halinde birleşmelerini sağlarlar.

Hsp 70 ailesinin hücredeki görevleri aşağıdaki gibi sıralayabilir:

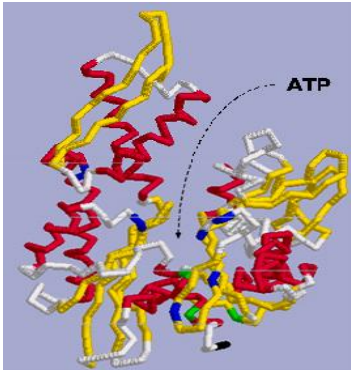
- Proteinlerin hücre içinde taşınmasına
- Sitozol, endoplazmik retikulum, mitokondrideki proteinlerin katlanmasına

- Kararsız proteinlerin yıkımına
- Protein komplekslerinin çözünmesine
- Protein agregasyonunun engellenmesine
- Bozuk katlı proteinlerin yeniden katlanmasına
- Apoptosise (programlı hücre ölümü) yardımcı olurlar (Clark JI ve ark. 2000).

1.3. HSP70 'in Yapısı

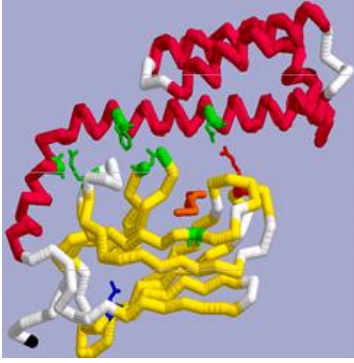
Hsp70, proteinlerin üç boyutlu yapıya erişmesini ve proteinlerin bu yapılarını korumasını sağlayan, türler arasında evrensel olarak bulunan önemli bir proteindir. Bu protein translasyon, membranlar arasında protein taşıma ve kltrin parçalanması gibi hücresel görevlerine ilaveten üçüncül yapılarına kısmi olarak erişmiş proteinlere bağlanıp agregasyonu önleyerek hücreleri stresten korur. Tüm bu farklı fonksiyonlar substratın proteine bağlanma ve salınmasına bağlı olarak düzenlenmiştir. Stresten koruma mekanizması deli dana, Creutzfeldt-Jacob, Gerstmann-Straussler-Schienker, insomnia, kuru gibi çeşitli ölümcül nörodejeneratif hastalıkların engellenmesi için önemlidir.

Hsp70'ler üç farklı domainden oluşur; 44 kDa'lık ATPaz domain, 18 kDa'lık substrat bağlanma domain ve 10 kDa'lık C-terminali. Substrat bağlanması ATP hidrolizi ve nükleotid değişimi ile düzenlenerek nükleotit bağlayıcı bölgeye tutturulur ve katlanması sağlanır.



→ 44 kDa'lık ATPaz domaini

Şekil 1.3.1. HSP70 'in ATPaz domain bölgesi (Tutar Y., 2006)



→ Şekilde ortadaki oyuk şeklindeki bölge 18 kDa'luk substrat bağlayıcı bölgesi ve yukarıda kalan bölge ise 10 kDa'luk C – terminal bölgesidir.

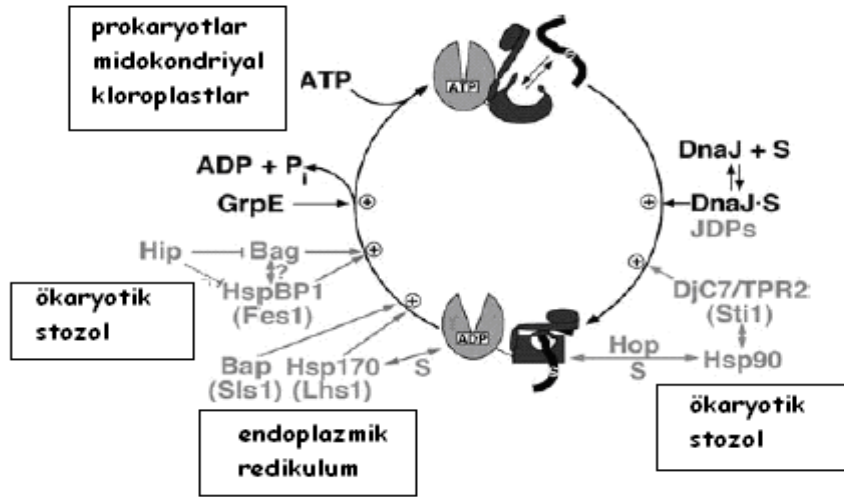
Şekil 1.3.2. HSP70 'in Substrat bağlayıcı ve C – terminal bölgeleri (Tutar Y., 2006)

1.4. HSP70'in İzofomları

Son dönemde yapılan çalışmalar Hsp70 şaperon sisteminin bağlanma ve ayrılma döngüsü mekanizmasının prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde belirgin bir biçimde farklı olduğunu göstermiştir.

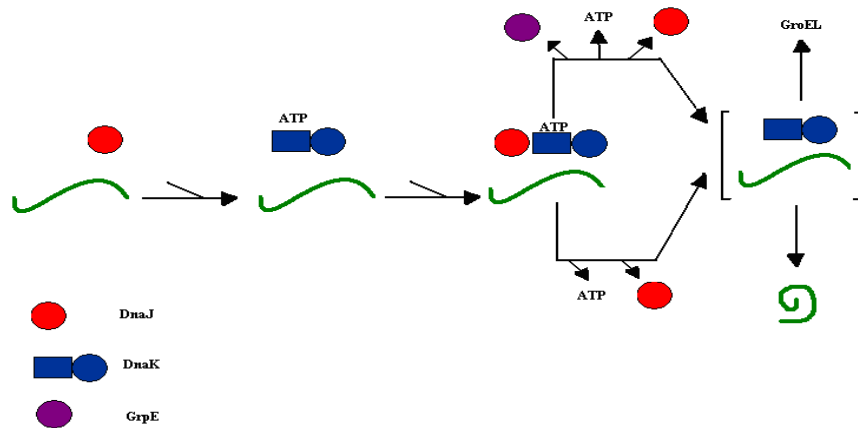
E.Coli mekanizması katlanmamış peptit ve onu DnaK molekülüne hedeflemekte DnaJ etkileşimi ile başlar. Sonra DnaJ DnaK ATPaz bölgesinin hidrolitik etkisini artırır ve geriye kalan peptitli DnaK ATPaz kompleksi kararsızdır. Daha kararlı ve daha uzun gelişmeye başlayan polipeptit zinciri olan parçalar açığa çıkararak çabuk bir biçimde ayrışır (M. P. Mayer and B. Bukau 2000).

Ökaryotik hücrelerde çeşitli Hsp70 izofomları vardır, bazıları sürekli/konstitif (Hsc70) bazıları hücre strese maruz kaldığında/indüktif (Hsp70) eksprese edilirler. Hsp70 fonksiyonu üzerine yoğun çalışmalara rağmen konstitif ve indüklenen izofomların olması ve bunların farklı fonksiyona sahip olup olmadığı açıklanamamıştır. İndüktif Hsp70 ortamdaki Hsp70 derişimi ve sitozoldaki stres önleyici fonksiyonunu artırmak için üretilmiş olabilir. Alternatif olarak benzer koşullarda indüktif Hsp70 in özel bir görevi de olabilir (Mantsch,H., H ve ark., 1993).



Şekil 1.4.1. DnaK 'nın şaperon döngüsünün modeli. Siyah renkle gösterilen E.coli deki DnaK sistemi için temel döngüdür. Gri renkle gösterilen ökaryotik stozol ve endoplazmik retikulumdaki değişimlerdir (M. P. Mayer and B. Bukau 2004).

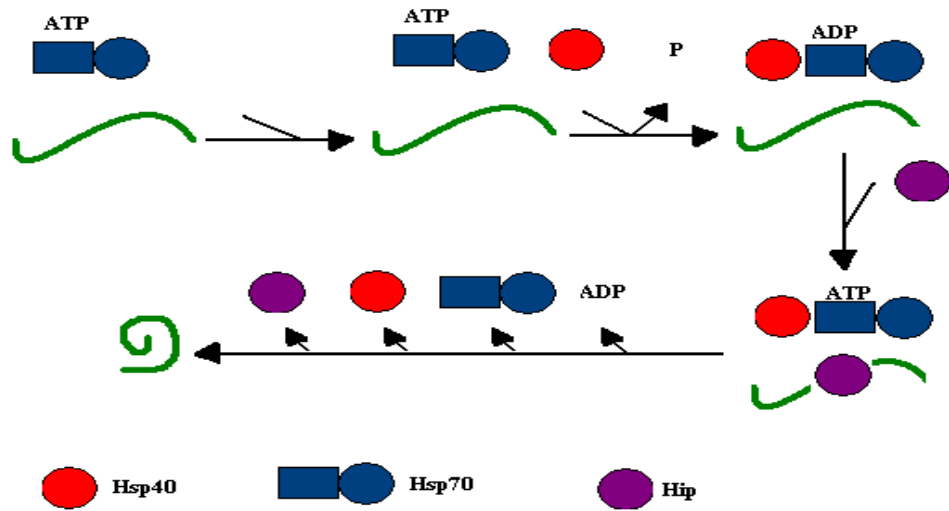
Protein katlanmasındaki yardım ayrıca katlanmamış peptitlerin şaperoninleri gibi diğer moleküler şaperon sistemlerine transferi ile uzatılabilir. Rhodanas katlanma üzerinde araştırmalar bu son işlemin muhtemelen GrpE tarafından yardım edildiğini ileri sürer. DnaJ katlanmamış proteini DnaK'nın da yardımıyla ATP hidrolizini kullanarak katlar. Şekil 1.4.2. tarif edilen bu döngüyü resmeder.



Şekil 1.4.2. Prokaryot hücrelerde Hsp70 şaperon ailesinin şematik döngüsü (Chappell, T. G ve ark.,1986)

Ökaryotik hücre döngülerindeki temel fark tepkimenin ilk aşamalarındaki Hip varlığına bağlıdır. Katlanmamış peptit Hsp70 ile direkt olarak tepkimeye girer fakat Hsp40 varlığı bağlanma sürecini belirgin bir biçimde kolaylaştırır. Bir sonraki aşamada Hsp40 peptit/Hsp70 kompleksine bağlanır, ATPaz aktivitesini tetikler ve Hsp70 kompleksi daha kararlı olan ADP-bağlı durumu benimser (Mayer MP ve ark., 2000).

Hip molekülünün bağlanması ayrıca bu durumu da dengeler. Döngü ADP 'nin yavaş bir biçimde ayrılmasıyla, bir sonraki ATP molekülü edinimi ve ATP-bağlı molekülünün 'açık' formunun ayrışmasıyla sona erer. Bu döngünün aşamaları Şekil 1.4.3 de belirtilmiştir.



Şekil 1.4.3. Ökaryot hücrelerde Hsp70 şaperon ailesinin şematik döngüsü (Cheng, M ve ark.,1989)

1.5. Mayadaki Hsp70 ve Prionlar

Genetik kod polipeptitlere çevrilirken tRNA'lar kullanılır. Ribozom stop kodonu ile karşılaştığında translasyon sona erdirilir. Bu kodonları tRNA'lar yerine eRF1 ve eRF2 proteinleri tanımlar ve ribozomu ayırır. *S.Pombe*' de bu iki protein sırası ile Sup45 ve Sup35'dir. Sup45 ve Sup35 etkileşerek translasyonu sona

erdirirler. Bu proteinlerdeki mutasyon stop kodonu tanısını zayıflatır ya da yok eder (Kryndushkin DS ve Ark.,2003).

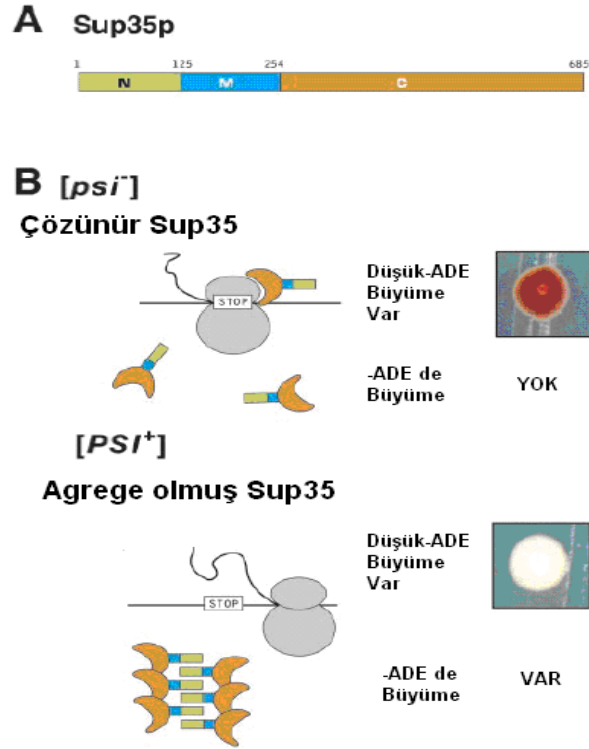
Sup35 in iki formu vardır; normal ve prion. Prion kısaca protein içeren ve bulaştırılabilen (enfeksiyöz) karakterde çok küçük partiküllerdir. Prionlar enfeksiyon hastalıklarına yol açan mikroorganizmalara yani bakteriler, virüsler, mantarlar ve parazitlere benzememektedir. Çünkü insan ve hayvanlarda olduğu gibi bakteri ve virüslerde de proteinlerin, enzimlerin yapısını belirleyen DNA prionlarda yoktur.

Nükleik asitlerden (DNA, RNA) yoksun olan prionlar en küçük virüslerden bile en az 100 kat daha küçüktür. Prionlar, Merkezi Sinir sisteminde zamanla birikimi sonunda hayvanlarda ve insanlarda hastalıklara neden olur. Bu grupta yer alan hastalıklar insan ve hayvanlarda merkezi sinir sistemini tutar ve beyni tahrip eder. Beyin, hastalığın ilerlemesi ile süngersi (spongiform) bir yapıya dönüşür (<http://www.odevbul.net>).

Sup35 in iki formundan biri olan Prion formu normal Sup35 proteinini prion formuna çevirir ve bu form *[PSI +]* şeklinde gösterilir. Prion formun oluşması için Sup35 in N-terminali gereklidir (Şekil 1.5.1.A). Çünkü Sup35 'in sadece C terminali fonksiyoneldir ve fonksiyonu olmayan N terminali hücreyi *[PSI +]* formuna çevirir.

Bu terminal diğer proteinlere bağlandığında veya sadece bu bölge eksprese edildiğinde prion formu elde edilir. Bu terminalin silinmesi *[PSI +]* formunun kaybolmasına ve hatta *[PSI +]* 'lı hücrelerin normale dönmesine sebep olur.

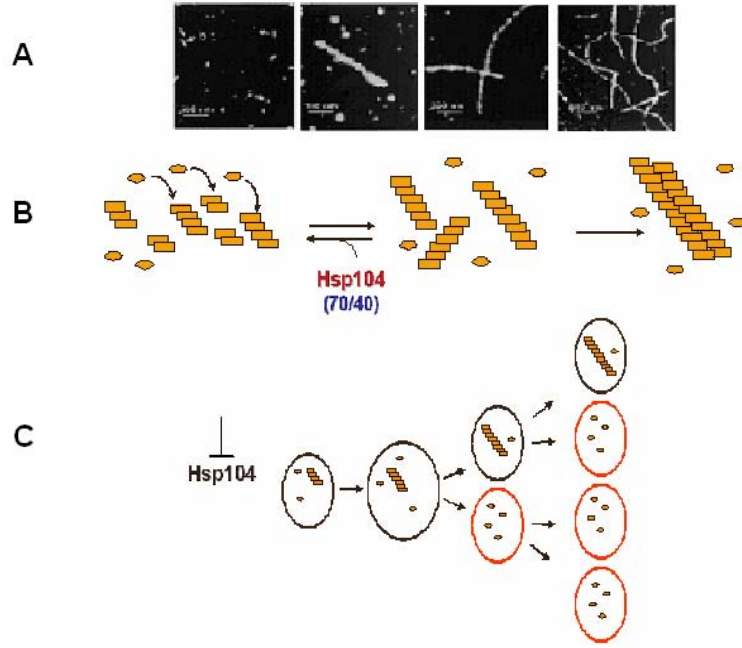
[PSI +] formunda stop kodonu geçilerek gen transle edildiği için bu fenotipi mayanın adenin okzotropu kullanılarak takip edilir. Bu fenotipte ADE I genini yarım bırakan prematüre bir stop kodonu vardır. *[PSI -]* olan maya etkin bir şekilde translasyonu prematüre kodonda sonlandırır. Bundan dolayı adenin üretmez veya adenin eksik olan ortamda büyümmezler. Bunun yerine zengin ortamda adenin biyosentezinin ara ürünü olan maddeyi biriktirirler ve hücreler kırmızı renk alırlar (Şekil 1.5.1.B üst kısım) (Jones G ve ark., 2004).



Şekil 1.5.1. [PSI⁺] için prion modelinin şematik gösterimi (Tutar Y ve ark., 2006)

[PSI⁺] genellikle ADE I de prematüre stop kodonu geçerek okur ve bu hücrelerin adeninsiz ortamda büyüebilmesini sağlar ve zengin ortamda beyaz veya pembe renktedirler (Şekil 1.5.1.B alt kısım).

[PSI⁺]/amiloid (Şekil 1.5.2.A) ile Hsp104 proteini arasındaki ilişki Yury Chernoff tarafından bulunmuştur (Chernoff YO ve ark., 1995). Stres anında Hsp104 ün ekspresyonu artar ve hücrelerin yaşaması için önemli rol oynar. Hsp104 ün aşırı ekspresyonu ile [PSI⁺] yok edilir ve hücreler [psi⁻] şeklini alır ve bu hücrelerden oluşan yeni hücrelerde [PSI⁺] prionu gözlemlenmez. Hücrelerde Hsp104 ortadan kaldırılırsa [PSI⁺]'ın stabilizesinin artacağı düşünülebilirse de tam tersi bir etki gözlemlenmiştir ve prion tam olarak ortadan kalkmıştır (Şekil 1.5.2. C). Hsp104 geni silinen hücreler [PSI⁺] içeren hücreler ile çiftleştirildiklerinde diploidin [PSI⁺] olduğu ve diploid sporlandığında oğul hücrelerin yarısının [PSI⁺] kalan yarısının WT HSP104 geni olduğu gözlemlenmiştir. Yani Hsp104 belli boyuta gelen agregatları parçalar ve henüz üçüncül yapıya erişememiş proteinleri Hsp70 ve Hsp40 proteinleri yardımı ile katlanmalarına yardım eder (Şekil 1.5.2.B). (Gokhale KC. ve ark., 2005).



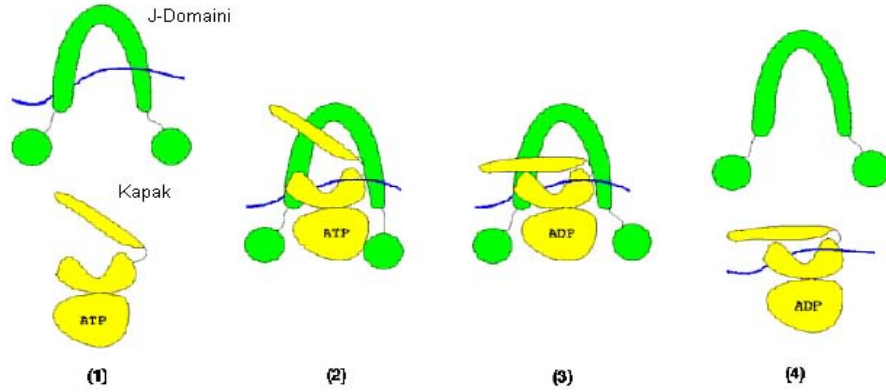
Şekil 1.5.2. [PSI +] ve Hsp104 ilişkisi. Sup35 in zamanla prion [PSI +]'a dönüşmesi ve amiloid/fibril yapıların oluşumu (A). Hsp104 ün oluşan agregatları parçalaması ve Hsp70/40 proteinlerinin katılımı (B). Hsp104 inhibisyonu ile [PSI +] prionunun engellenmesi (C) (Tutar Y, Masison D. C. 2006).

Hsp104 ve Hsp70 'in [PSI +] dengesindeki rolleri aşağıdaki gibi özetlenebilir;

- Hsp104 translasyonu direkt olarak etkilemediği çeşitli deneylerle gösterilmiştir. Fakat Hsp104 hücrelerde [PSI +] elementini ortadan kaldırır. Bu etki sadece N-terminali ile elde edilen [PSI +] hücrelerinde gözlenir.
- Hsp104 geni silinmesi şaşılacak bir şekilde [PSI +] elementini ortadan kaldırır.
- Hsp104 thermotoleransda yer alan tek protein değildir. Hsp70/Hsp40 gibi makro moleküllerde üç boyutlu yapıları denature olan proteinleri normal konformasyonlarına getirir.

Hsp70 proteinlerinin ısı şoku koruması, bazı proteinlerin organellere iletilmesi, sitozolde proteinlerin katlanmasına yardım gibi biyokimyasal fonksiyonları vardır. Bu işlemleri Hsp40 (ko-şaperon) ile etkileşimle gerçekleştirirler. Hsp70 in kristal yapısı bulunamamasına karşın domainleri ayrı ayrı kristallendirilmiş ve domainlerin oryantasyonunun Şekil 1.5.3. deki gibi olduğu tahmin edilmektedir (Jones GW ve Masison DC. 2003). ATP hidrolizi proteinin substrat bağlama kapağının açılıp

kapanmasını sağlar. Ayrıca Hsp40 proteini J-domaini vasıtasıyla substratı Hsp70 e sunar ve Hsp70 substratın katlanmasına yardımcı olur (Şekil 1.5.3. 1–4). ADP oluşumu döngüyü tekrar başlatır (Cyr DM ve ark.,1992).



Şekil 1.5.3. Hsp70 /Hsp40 etkileşimi ve ATP ye bağlı olarak substrat değişimi (Tutar Y ve ark.,2006)

Hsp70 proteinleri aynı zamanda polipeptitlerin kararlı konformasyona erişmesine de yardımcı olurlar. Hücre için hayati öneme sahip olan bu makro moleküller peptitlere bağlandıkları zaman ATP hidrolizlerini artırır ve peptitin üçüncül yapısını bulmasına yardım ederler. Aynı zamanda ATP hidrolizi de peptite bağlanmayı artırır. Hangi prosesin önce olduğu deneylerle kanıtlanmamıştır. Bu bağlanma peptitin yapısına bağlı olarak 10 μ M ile 1mM arasında gerçekleşir. Kısa peptitlerle yapılan çalışmalarda Hsp70'lerin minimum yedi amino asit uzunluğa bağlandığı ve dördüncü pozisyonda yer alan lösin amino asitlerini tercih ettiği gözlemlenmiştir. Hsp70lerin kristal yapısı henüz bulunmadığı için çoğu biyokimyasal özelliği tam olarak bilinmemektedir. Fakat homoloji yöntemi ile domainlerin fonksiyonları ve diğer proteinlerle etkileşimleri tespit edilmiştir. Ayrıca hücrenin farklı kompartımanlarında yer alan orijini aynı fakat muhtemelen farklı fonksiyonları olan Hsp70'ler (Hsp ve Hsc gibi) ve Hsp40'lar (Sis1 ve Ydj1 gibi) vardır. Farklı fonksiyonları olan Hsp70 ve Hsp40'ların aynı anda hücrenin aynı kompartımanında yer almasının nedeni tam olarak anlaşılamamıştır. Biyokimyasal ve genetik araştırmalar prionların kinetik ve mekanik oluşumunu ortaya çıkarmıştır fakat

hücrede oluşan metabolik bozulmaları önleyen Hsp70'lerin yapı ve fonksiyon ilişkileri açıklığa kavuşturamamıştır. En detaylı çalışmalar *E.coli* de yapılmış olmasına rağmen ökaryotlarda mekanizmanın daha kompleks olduğunu gösterir ve bu bilgi önümüzdeki yıllarda kompleks protein-protein etkileşimlerinin, kooperativitenin ve Hsp70'lerdeki yapısal bağlantılarının ortaya çıkarılma gereğini koymuştur (Newnam GP ve ark 1999).

1.5.1. Hsp104 /Hsp70 ve Hsp40'ın Fonksiyonları

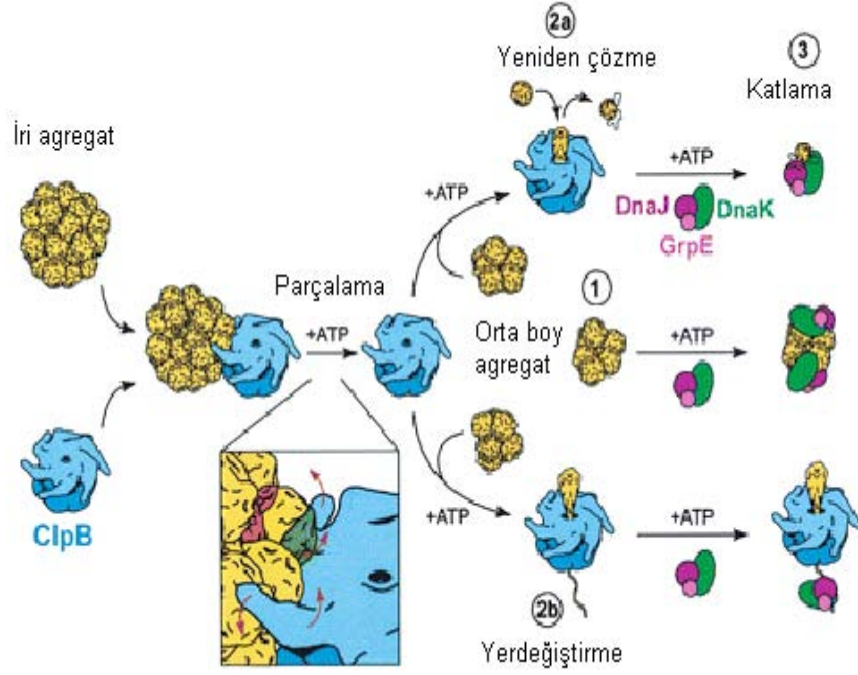
Hsp104: Hsp104 ATP hidrolizini kullanarak denature olmuş proteinlerin bağlanmalarına ve kümeleşmelerine engel olur. Hsp104, Hsp40/Hsp70 'in protein katlanma verimini büyük ölçüde artırır.

Hsp70: Hsp70, Hsp70 şaperon sisteminde temel kurallarla hareket eder. Hsp70 doğal durumda katlanmış ve genişletilmiş konformasyonlarda, doğal olmayan polipeptitlerin hidrofobik bölgelerindeki zincirlere bağlanır.

Hsp40:

- 1.) Hsp40'ın J-domaini tıpkı Hsp70'in düzenleyicisi gibi doğal olmayan polipeptitlerin yeniden katlanmaları için Hsp70 dizisinin ATPaz aktivitesini uyarır.
- 2.) Hsp40 doğrudan doğal olmayan polipeptitleri bağlayabilir ve onları katlanmaları için Hsp70'e gönderir (Song Y ve ark.,2005).

Özetle agregasyonların prion oluşturma mekanizması ve bunu önleyen proteinlerin birbiri ve prion/amiloid ile ilişkisi tam olarak ökaryotlarda tespit edilememiştir. Fakat bakteride agregasyonu önleme mekanizması için bir kaç yol önerilmiştir. Önerilen bu mekanizmalar şematik olarak Şekil 1.5.1.1 de verilmiştir.



Şekil 1.5.1.1. Hsp104/ Hsp70/ Hsp40 proteinleri için önerilen protein katlama mekanizması (Tutar Y 2006)

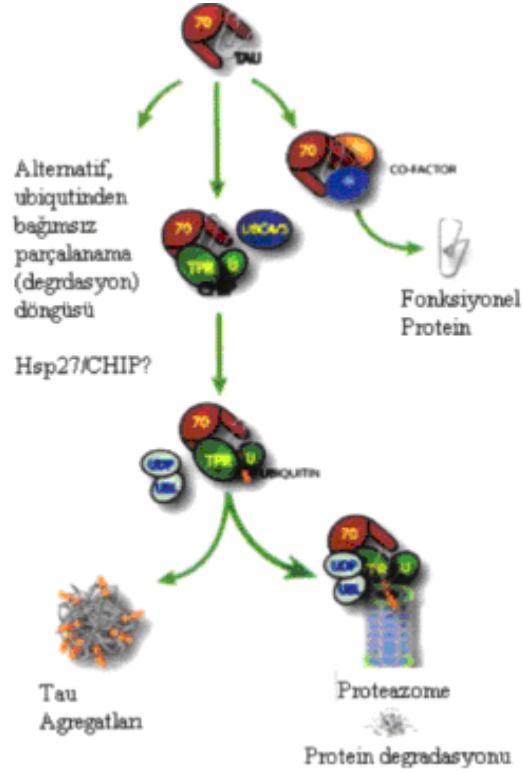
Yukarıda verilen mekanizmada ClpB, DnaJ ve DnaK ökaryotlarda sırasıyla Hsp104, Hsp40 ve Hsp70 e eş değerdir. GrpE ise nükleotid değişim faktörü olup, Fes1 proteinine homologdur. Bu mekanizmaya göre Hsp104 bir pervane gibi döner ve iki farklı yolu takip edebilir. Birinci yol iri agregatları parçalayıp Hsp70 / Hsp40 a verir ve bu kompleks ATP hidrolizi ile proteinin katlanıp üçüncül yapısını almasına yardım eder (Şekil 1.5.1.1 1.Yol). Takip edilecek diğer yol ise oluşan orta boy agregatları daha küçük hale getirmek ya da orta boy agregatlardan çekilen denature peptitlerin Hsp104 proteinin hidrofobik orta kısmından geçirilerek Hsp70 / Hsp40 kompleksine sunulmasıdır (Şekil 1.5.1.1 2a ve 2b). Laboratuarda mutant Hsp104 proteinleri ile yapılan deneylerde bakteride 2b'nin takip edileceği öngörülmüştür (Rudiger S ve ark., 2000; Mayer MP ve ark., 2000).

Henüz Hsp104 / Hsp70 / Hsp40 / ATP / ADP / substrat kompleksinin mekanizması açıklanamamıştır. Yukarıda öngörülen mekanizmayı özellikle ökaryotlarda zorlaştıran başka faktörlerde vardır. Ökaryotik hücrede birden fazla Hsp70 ve Hsp40 vardır. Bazı Hsp70'ler devamlı indüktif olarak eksprese edilirler

(Hsc ve Hsp). Mayada (*Saccharomyces cerevisiae*) sadece sitozolde dört farklı Ssa-Hsp70 ve iki farklı Ssb-Hsp70 vardır. (Bunlar Ssa1 Ssa2 Ssa3 ve Ssa4, Ssb1 ve Ssb2'dir). Ayrıca endoplazmik retikulum ve mitokondride de Hsp70 proteinleri vardır. Aynı şekilde 16 tane Hsp40 vardır. Genetik ve biyokimyasal deneyler Ydj1 ve Sis1 Hsp40 proteinlerinin önemli olduğunu göstermiş de agregatları çözme mekanizması henüz tanımlanamamıştır. Bu zorluklarla beraber bu döngüde yer alabilecek potansiyel proteinlerde saptanmıştır (Fes1, Hop, Cpr7, Hip gibi). Literatürde bu zamana kadar Hsp104-Ydj1, Hsp70-Ydj1, Hsp70-Sis1 etkileşimleri tanımlanabilmiş fakat mekanizmanın tam olarak nasıl çalıştığı hipotezden öte gidememiştir (Shorter J, Lindquist S. 2004; Newnam GP ve Ark., 1999).

İn vitro ve vivo çalışmalar HSP70 maddesinin artan faaliyetinin indirgenmiş sabit durum tau (virüs ile infekte hücrenin sitoplazmasında elektron mikroskobu ile görülen partiküller) seviyeleri ve indirgenmiş temizleyicide çözünmeyen (kümeleşmiş) tau seviyelerine sebep olduğunu ortaya çıkarmıştır. Belirgin bir biçimde HSP70 patolojik tau'yu seçici bir biçimde tanır ve bu türlerin bozunmasını hafifletir (Yunus.hacettepe.edu.tr).

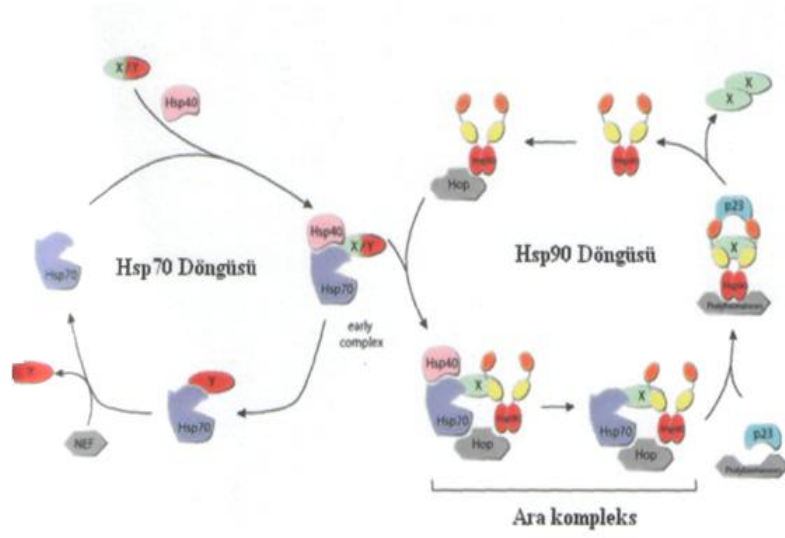
Hsp70'in ayrıca daha önceden daha fazla tau mikrotübül bağlanmasına sebep olan ATP' ye bağlı 'yeniden katlanma'' aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir. CHIP, bir E3 ubiquitin ligase, tau ile etkileşime girer ve onu ubiquitinleştirir. Yinede, artan CHIP faaliyeti ve ortaya çıkan taunun ubiquitinleşmesi Hsp70 yükselmesinin ters etkisiyle kültür hücrelerindeki tau toplanmasına neden olmuştur. Tau protein işlevinde öngörülen Hsp70/CHIP rolü şekil 1.5.1.2. de gösterilmiştir (Wild, J ve ark., 1992).



Şekil 1.5.1.2. Tau agregasyonu ve Hsp70 sistemleri (Wild, J ve ark., 1992).

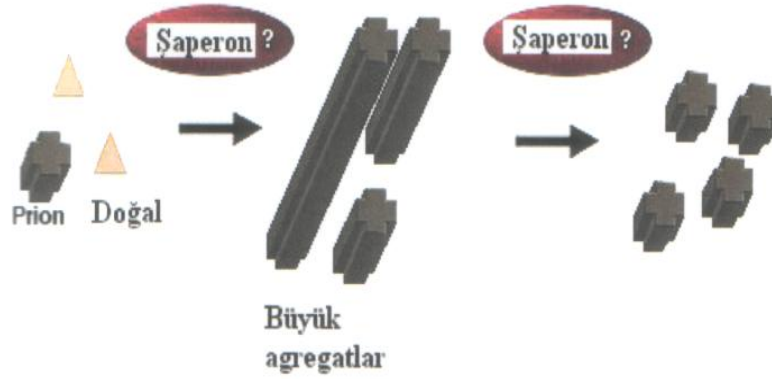
1.5.2. Hsp70/Hsp90 Substrat Döngüsü

Yeni sentezlenmiş ve / veya kısmen oluşmuş (x/y) proteinler Hsp40 aracılığıyla Hsp70 komplekslerine giderler. Bu “erken kompleksten” iki muhtemel yol şekli çoğu durumda Hsp70 substratı (y) kendi kendine işleme tabi tutulabilir. ATP hidrolizinin ardından nükleotid değişim faktörü (NDF) substrat ve ADP açığa çıkar ve Hsp70 döngüye yeniden girmeye hazırdır. Tam bir oluşum ve aktivasyon için Hsp90 ‘a ihtiyaç duyan bazı belirli substratlar (x) vardır. Bu durumda temel protein Hop Hsp70 ve Hsp90 unsurları ayırır ve aynı zamanda p23 ve prolizomerazlar komplekse girer. Bundan sonra bu “bu en son kompleksten” substratlar ortaya çıkar. Hsp90 bağlandıktan sonra Hsp90 döngüye yeniden girmeye hazırdır (Zegel U ve ark., 1999).



Şekil 1.5.2.1. Hsp70/Hsp90 substrat döngüsü (De Maio A.,1999)

Son yıllarda deli dana, alzmeir, Creutzfeldt-Jacob hastalığı, Gerstmann-Straussler-Schienker sendromu, familial insomnia, scrapie ve kuru hastalıklarında görülen protein agregasyonundan kaynaklanan bulaşıcı, sinir hücrelerinin yapısını bozan ölümcül hastalıklar için yoğun çalışmalar yapılmaktadır.



Şekil 1.5.2.2. Prionun büyük ve basamaklı toplanmaya sebep olması ve bu büyük toplulukların parçalanmasıyla prion çekirdeğinin sayısının artması (D'amore T ve ark 1989)

Şekil1.5.2.2. hastalıklı ve hastalıklı olmayan iki proteinin etkileşmesi sonrasında büyük agregatların oluştuğunu göstermektedir. Ve bu agregatlar hücre bölünürken kendiliğinden bölünerek çoğalır ve prion çekirdeğinin sayısı artar. Yani hastalıklı hücre sayısı artmış olur.

Mayada yapılan çalışmalar sonunda hücrelerde oluşan agregatların yeni nesillere geçtiği ve gözlemlenen bu kalıtımın proteinle (DNA ile değil) sağlandığı tespit edilmiştir (Şekil 1.5.2.2.). Bu tespit Mendelevin genetik kurallarından sapma göstermektedir. Çünkü Mendeleev hastalığın DNA ile yeni nesillere aktarıldığını savunmuştur. Oysa çalışmalarda hastalığın prionlaşmış proteinlerle yeni nesillere geçtiği bulunmuştur. Zamanla hücredeki bu agregatlar ısı şok proteinleri tarafından tekrar fonksiyonel hale getirilir. Bu mekanizmada yer alan proteinler, bu proteinlerin işlevleri, diğer proteinlerle etkileşimleri, kalıtım mekanizmasının detayları, bu mekanizmada yer alan proteinler halen açıklanmayı bekleyen konulardır. Detayları moleküler seviyede çözümlendiğinde pek çok hastalığın önlenmesine, tedavisine çözüm olacak bu mekanizmanın en önemli unsuru Hsp70 ve Hsp40 proteinleridir. Hsp70'lerin Hsp40'lar ile yapı ve fonksiyonunun anlaşılması, izoformlarının fonksiyonel farklılığının bulunması agregatların hücrede nasıl çözünür hale getirildiği bu mekanizmada başlangıç noktası olarak seçilmiştir (D'amore T ve ark 1989).

1.6. Protein Ayrılması ve Tayini

Proteinler hem hücre dışında, hem de hücrenin farklı bölümlerinden kompartımanlarında bulunan çok heterojik bir bileşik sınıftır. Saflaştırma için; protein, bulunduğu hücre fraksiyonundan çözeltiye alınır.

Sitoplazmik proteinler için hücre zarı lizisle açılır. Bu amaçla hipotonik çözeltiye konan hücreler, hücre içine çözücü girmesi sonucu şişer ve zar parçalanır. Bitki ve bakteri hücrelerinde, hücre duvarı olduğundan, hücre duvarının enzimatik olarak veya organik çözücülerle muamele edilerek parçalanması gerekir (DeLuca-Flaherty ve ark.,1990).

Protein bir organelde bulunuyorsa, bu organel fraksiyonunun parçalanmış hücre homojenatından ultra santrifüjle ayrılması gerekir. Daha sonra; proteinler

organelden konsantre tuz çözeltisi ile ekstrakte edilir. Bu işlemler sırasında, proteinin doğal yapısının bozulmaması için pH ve sıcaklık uygun şekilde ayarlanır.

1.6.1. Protein Tayinleri

Saflaştırma sırasında, bu işlemin ne oranda başarılı olduğunu izlemek için, protein miktarının hassas ve spesifik olarak belirlenmesi gerekir. Protein bir enzim ise, substrat veya ürün miktarı uygun bir yöntemle tayin edilerek, buradan enzim aktivliğine geçilir. Ürünün kolaylıkla belirlenemediği durumlarda eşlenme reaksiyonlarına başvurulur ve ürünün daha kolay ölçülebilen ikinci bir ürüne çevrilmesi sağlanır. Proteinlerin izole edilmesinde onların çeşitli özelliklerinden yararlanılır (<http://www.genomicsproteomics.com>).

1.6.2. Çözünürlüğe Dayanan Ayırmalar

Proteinlerin çözünürlüğü çözücünün polarlığı, pH'ı, sıcaklığa ve çözeltinin iyon şiddetine bağlıdır. Çözeltide bulunan çözünmüş tuzlar, proteinlerin çözünürlüğünü etkiler.

Düşük iyon şiddetlerinde proteinin çözünürlüğü tuz derişimi ile genellikle artar. Tuz, proteinin yükünü perdeleyerek çökmesine engel olur. İyon şiddeti arttıkça proteinlerin çözünürlüğü azalır. Çünkü tuz hidrolize olacağından, proteinin çözünürlüğü için gereken çözücü miktarı azalır. Proteinlerin çözünürlükleri çözeltinin pH'ı ile değişir. İzoelektrik noktada çözünürlük minimumdur. Çünkü bu pH'da proteinler net bir yük taşımadıkları için, hem polarlığın azalmasına bağlı olarak çözünürlük azalır; hem de komşu moleküller arasında yüke bağlı itmeler ortadan kalkacağından moleküller bir araya gelir ve çökme başlar. Bu pH'ın altında ve üstünde ise proteinlerin çözünürlüğü artar.

Proteinlerin amino asit bileşimleri farklı olduğundan her proteinin izoelektrik pH'ı farklıdır. Bundan yararlanarak çözeltinin pH'ı çöktürülmek istenen proteinin izoelektrik noktasına ayarlanır. Böylece, diğer proteinlerin çözeltide kalması ve ayrılmak istenen proteinin çökmesi sağlanır. Sıcaklık, çözünürlüğü etkilediği için iyi

bir çöktürme ancak uygun sıcaklık seçimiyle başarılabılır (<http://www.geneclinics.org>).

1.6.3. Büyüklük Farkına Dayanan Ayırmalar

1.6.3.1. Diyaliz

Büyüklük farkına dayanan en basit ayırma yöntemidir. Amaç, proteini ortamda bulunan iyon ve küçük moleküllerden ayırmaktır. Yarı geçirgen diyaliz zarları genellikle selüloz asetatından yapılmıştır ve gözenekleri 1–20 nm çapındadır. Diyaliz keseleri eşit büyüklükte bir gözenek büyüklüğü sağlamak ve ağır metal safsızlıklarını gidermek için bir ön işlemde geçirilmektedir. Çöktürmeyle ayrılan bir protein çökme sırasında ortamdaki iyonları absorplar. Bunları uzaklaştırmak için bir diyaliz torbasına konan protein çözeltisi, uygun bir tampon içerisine daldırılır. Osmotik basınç farkından dolayı küçük molekül ve iyonlar dıştaki tampon çözeltiye geçerler.

Tamponun zaman zaman yenilenmesi ile proteinin küçük molekül ve iyonlardan kurtarılması mümkün olur (<http://www.geneclinics.org/query?dz=xp>).

1.6.3.2. Kromatografi

Kromatografi; ayrılacak maddelerin uygun bir hareketli faz yardımıyla, sabit bir fazdan geçirilmesi sırasında, hareket hızlarının farklı olmasına dayanan bir ayırma yöntemidir. Ayrılacak maddelerin sabit fazla etkileşme tipine, hareketli fazın gaz veya sıvı olmasına ve deney tekniğine göre; Kromatografi çeşitli adlar altında uygulanan bir metottür.

Biyokimyada kolon kromatografisi çok kullanılır. Kolon ayrılacak maddelerin tutulmasını sağlayacak bir dolgu maddesiyle doldurulur. Uygun bir çözücüde çözülmüş olan maddeler kolondan geçirilir. Bu sırada dolgu maddesiyle etkileşmenin zayıf ya da kuvvetli olmasına bağlı olarak ayrılacak maddeler kolondan farklı hızlarla geçerler. Kolonda farklı noktalara sürüklenmiş olan maddeler uygun çözücülerle (tamponlarla) kolondan alınırlar. Kolondan tampon çözeltilerle alınan maddeler fraksiyonlar halinde ayrı tüplere toplanır ve böylece ayırma işlemi gerçekleşmiş olur (www.forumakademi.org).

1.6.3.3. Elektroforez

Elektroforez ortam pH'sına göre, pozitif (+) ya da negatif (-) olarak yüklenen kolloid taneciklerin, bir elektrik alanında, kendi net yüklerine zıt yük taşıyan anot veya katoda doğru farklı hızlarda sürüklenmeleridir.

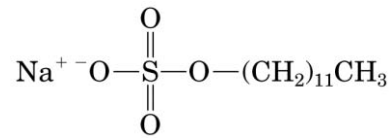
Proteinler; elektrik yükü, büyüklükleri (yük/kütle oranı), şekil gibi özelliklerine göre ayrılırlar. Elektroforez, genellikle poliakrilamid jel üzerinde yapılır. Proteinlerin saflaştırılmasında kullanılmaz.

Elektroforetik yöntemler;

- Karışım içinde bulunan protein sayısını tespit etmek (kağıt ve jel elektroforezi)
- Saflaştırılmış proteinin saflık derecesini belirlemek(SDS-PAGE)
- Saflaştırılmış proteinin molekül kütlelerini tayin etmek (SDS-PAGE) amacıyla kullanılır.

Poliakrilamid jel, çapraz bağlı akrilamid polimeridir. İçeriğindeki akrilamid ve N,N'-Metilenbisakrilamid eklenen amonyum persülfat tuzunun sülfatıyla birleşerek polimerleşir.

Poliakrilamid jel elektroforezinde SDS-PAGE kullanılır. Burada SDS; Sodyum Dodesil Sülfat-anyonik deterjandır. Ve PAGE ise poli akrilamid jel elektroforezinin kısaltılmış şeklidir.



negatif yüklü SDS, proteinlerin kuarterner, tersiyer ve sekonder yapılarını bozar, katları açılan peptid zincir, SDS ile sarılarak misel görünümü kazanır. Zincirde yer alan her iki amino asit artığına bir molekül SDS bağlanır ve proteinlerin hepsin negatif yüklenir.

SDS-PAGE ile proteinler, net yük ve şekillerine göre değil, sadece molekül büyüklüklerine göre birbirinden ayrılırlar.

SDS'in bağlanmasıyla, doğal yapısını kaybeden proteinler, aynı şekil ve yük/kütle oranına sahip olurlar. Ve elektriksel alan içinde proteinlerin hareketi sadece

mol kütlelerine bağlıdır. Daha küçük olanlar, daha hızlı sürüklenir ve proteinlerin alt üniteleri birbirinden ayrılır ([ttp://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com](http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com)).

1.7. FTIR ve Protein Uygulamaları

Infrared (IR) spektroskopisi ile moleküllerin elektromanyetik enerji ile etkileşimde bulunması sonucunda meydana gelen moleküler hareketleri belirlemektedir. Elektromanyetik spektrumun orta IR aralığı (4000 – 400 cm⁻¹), birçok işlevsel gruba ait titreşimlerden kaynaklanan absorpsiyon bantlarını içermektedir. IR spektrumundaki her bir absorpsiyon bandı, absorpsiyon maksimumunun dalga numarası, bant genişliği ve gücü ile tanımlanmaktadır. Bir absorpsiyon bantına ait dalga numarası, buna neden olan moleküler hareket, kimyasal bağda yer alan atomlar ve çevrelerinin konformasyonu için karakteristiktir. Diğer taraftan bant genişliği ve gücü moleküllerin hareket oranı ile doğru orantılıdır.

Fourier Dönüşümlü IR Spektroskopisi (Fourier Transformed IR Spectroscopy, FT-IR) yöntemi, spektral bilgilerin alışılmış IR spektroskopisine oranla çok daha iyi çözünürlük ile elde edilmesini, hızlı, hassas ve doğru analiz yapılmasını sağlamaktadır. Bu yöntemle çok bileşenli örneklerin çalışılması mümkündür. Bir absorpsiyon bantına ait dalga numarasının saptanma doğruluğu, FT-IR yöntemi ile 0.01 cm⁻¹ den fazla olmaktadır.

Mikrobiyoloji alanında, bir hücrenin FT-IR spektrumu o hücrenin biyokimyasal bileşenleri (proteinler, lipitler, DNA/RNA ve karbohidratlar) hakkında bilgi edinmemizi sağlayan parmak izi gibi tanımlayıcı bir bilgidir. Ölçümlerin yüksek hassasiyeti ve doğruluğundan dolayı mikroorganizmaları zincir seviyesine kadar tiplendirebilir (<http://www.geneclinics.org/>).

1.7.1. Kromoforlar

Peptit bağlarını içeren proteinlerin konformasyon çalışmalarında IR spektroskopisinden sıklıkla yararlanılmaktadır. Çalışmaların büyük çoğunluğu 1600 – 1700 cm^{-1} aralığındaki Amid-I bölgesinde yapılmaktadır.

Peptit bağlarının bu bölgedeki IR ışınların absorblaması CCN deformasyonu ile CN gerilmesinin küçük katkılarıyla birlikte esas olarak CO gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (Krimm, S. 1987 ve Bandekar, J. 1992).

Amid-II bölgesi (1500–1600 cm^{-1}) esas olarak N-H bükülme (ve daha az oranda C-N gerilmesinden) sinyallerini içermektedir. Daha yüksek ve daha düşük frekanslı Amid bandları (Amid-A ve B ve III- VI bandları) daha zayıf şiddetlidirler veya daha az tanımlanmışlardır ve daha az sıklıkla kullanılırlar. Ancak her biri, belirli durumlarla yararlanılacak önemli özelliklere sahiptirler.

Birçok durumda, Amid-I bandı protein katlanma / katlanmama çalışmalarının spektral özellikleri için çok büyük faydalar sağlamaktadır. 1600–1700 cm^{-1} aralığındaki absorpsiyon bandı veren farklı ikincil yapıların belirlenmesi, normal mode hesaplamaları sentetik polipeptidlerin farklı çevresel koşullardaki analizlerini ve ikincil yapıları bilinen proteinlerin detaylı çalışmalarının kombinezonuna dayanmaktadır (Byler, D.M. ve Susi, H. 1986).

Son zamanlarda kabul edilen sonuçlara göre α – helikse 1650 ve 1658 cm^{-1} aralığında absorpsiyon gösterirken, α – helikse ait bandlar 1650 cm^{-1} in aşağısındadır ve yeni hesaplamalar sinyallerin 1640 cm^{-1} in aşağısında bulunabileceğini önermektedir (Tori, H. ve Tasumi, M. 1992 ve Surewicz, W.K. ve ark., 1993).

Düz zincirler (β plakası) genellikle 1620 ve 1640 cm^{-1} (veya daha düşük) aralığında bir veya daha fazla absorpsiyon bandı vermekle birlikte 1670 ve 1680 cm^{-1} aralığında daha zayıf band verirler (Byler, D.M. ve Susi, H. 1986). Dönme ve bükülmeler 1660 cm^{-1} üzerinde bir seri pik oluşumuna neden olmaktadır. Model peptitlerdeki dönmeler üzerinde yapısal çalışmalarla mevcut bükülmelerin doğasıyla ilgili bilgiler sağlanmakla birlikte gerçek proteinlerin bu bölgedeki komplekslikleri daha kesin analizleri önlemektedir.

Amid-I bölgesindeki çalışmalardaki zorluklar daha rasgele tipteki yapılarla çok daha iyi anlaşılacaktır (Surewicz, W. K ve ark., 1993). Düzensiz polipeptitler genellikle 1640–1650 cm^{-1} bölgesinde absorpsiyon oluşturmaktadırlar (Byler, D.M. ve Susi, H. 1986). Ayrıca, α heliks yapısına sahip olmadığı bilinen proteinler 1650 ve 1660 cm^{-1} aralığında etkin absorpsiyon gösterirler; ki bunlar bu bölgede rasgele zincir konformasyonlarının belirlenmesine yol açarlar (Prestelski, S.j ve ark 1991, Middaugh, C.r ve ark., 1992).

Bu zorluklara rağmen, Amid-I bölgesi uygun çözünürlük zenginleştirmesinden sonra proteinlerin ikinci yapı içeriklerinin analizinde etkin biçimde kullanılmaktadır (Byler, D.M. ve Susi, H. 1986). Hem eğri uydurma hem de örnek tanıma prosedürlerinin kullanımları başarılı sonuçlar vermesine rağmen, her bir metodun eleştirildiği yönleri vardır. Bu analizlerden sağlanan bilgiler protein katlanma/katlanmama oldukça yararlı olmalarına rağmen, mutlak gerekli değildir. Bu tip analizlerle ilgili detaylı çalışmalar birçok yerde özetlenmiştir (Surewicz, W. K ve ark., 1993).

Amid-II bandının basit yapısal analizlerde kullanılması daha az kesinlikte bilgiler sağlar. Alfa heliks 1550 cm^{-1} e yakın band ve 1520 cm^{-1} de daha zayıf sinyal oluştururken β yapısı 1530 ve 1560 cm^{-1} etrafında güçlü ve zayıf sinyaller oluşmasına yol açmaktadır. Daha düzensiz yapılar genellikle 1535–1550 cm^{-1} yakınında absorpsiyon göstermektedirler.

Tüm kimyasal yapılar, titreşimsel absorpsiyon bandlarına sahip olan kovalent bağlar içermektedirler. Bu nedenle, diğer kromofomaların çeşitlilikleri, katlanma/katlanmama çalışmaları süresince proteinlerin, FTIR ile izlenmesine olanak sağlamaktadır. Bunlar, non-Amid bölgelerinde amino asit yan zincirlerinin zayıf sinyallerini fosfat atıkları, hem grupları, karbon monoksit ve oksijen içermektedir. Ayrıca karbon monoksit ve oksijen gibi IR sinyallerine sahip olan ligandlar hem gurupların bağlanırlar ve FTIR ile yaygın şekilde çalışılmaktadırlar (Maxwell, J.c ve Kalnin, N.N 1990). Bu bağların IR frekansları ve şiddetleri spektral olarak izole edilebildikleri, ölçülebildiklerinden ve bunların spektral özellikleri protein konformasyonu için duyarlı olduklarından proteinlerin katlanma durumlarının izlenmesinde kullanılabilirler. (Barone, R ve ark.,1990).

1.8. N-DSC III (Nano - Differential Scanning Calorimeter III) Diferansiyel Taramalı Kalorimetre

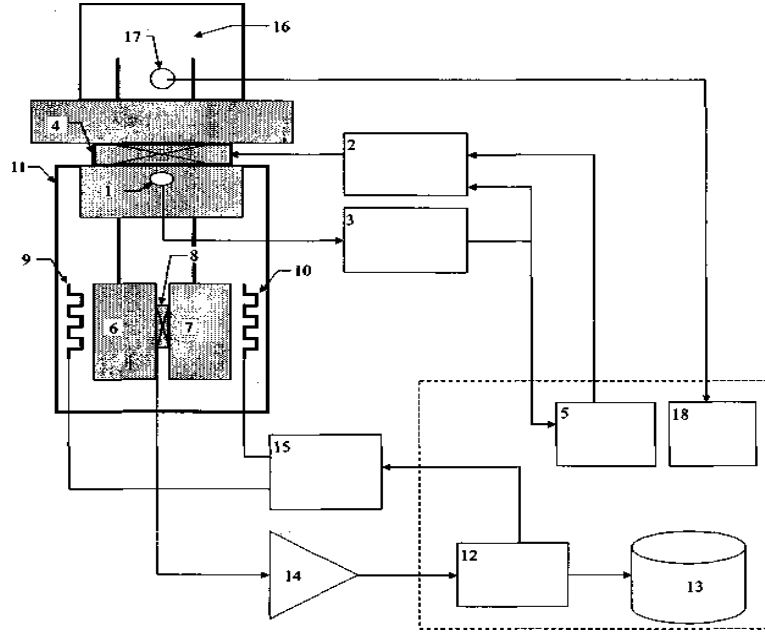
DSC biyolojik moleküllerde translasyonun termodinamik çalışması için teknik bir güç kaynağıdır. DSC ile proteinin termodinamik değerlerine bakılır (C_p , Δp , ΔH .vs.). Isıtılan bir maddede referans maddeye göre oluşan fiziksel değişimler nedeniyle ortaya çıkan ısı akış hızının sıcaklığın fonksiyonu olarak kaydeden cihazdır.

DSC ile şu ölçümler yapılabilir;

- Nitel analiz
 - Polimerler, killer ve minerallerin parmak izi
 - Erime noktası
- Isı kapasitesi, c_p
- Camsı geçiş sıcaklığı, T_g
- Kristallenme sıcaklığı, T_c
- Faz diyagramları

DSC endüstride; ilaç endüstrisinde saflık analizi için besin endüstrisinde yağların ve besinlerin karakterizasyonu ve polimer endüstrisinde sentetik karışımlar için kullanılmaktadır.

Laboratuvarımızda Nano-DSC III serisini kullanmaktadır. Sıradan bir DSC iki hücreden oluşur; biri örnek diğeri ise referans hücresidir.

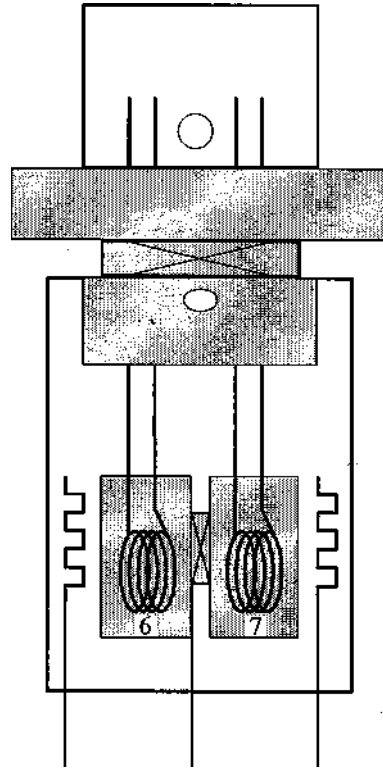


Şekil 1.8.1. N-DSC III blok diyagramı. Çizgili dikdörtgenle gösterilen bileşenlere uygulanan yazılımdır. 1- Platinyum termometre, 2- termometre kontrol bloğu, 3- sıcaklık ölçüm devresi, 4- ısıtma ve soğutma peltier elementleri, 5- termometre kontrol algoritma, 6,7- silindirik ölçüm hücreleri, 8- termosensör, 9,10- güç karşılaştırıcı ısıtıcılar, 11- ceket, 12- geri besleme kontrol algoritma, 13- data dosya, 14- sinyal yükseltici, 15- güç karşılaştırıcı köprü, 16- manostat, 17- basınç sensörü, 18- basınç ölçer (N-DSC Katalogu)

Şekil 1.8.1 'de N-DSC III dizaynındaki ısı ceketini (2) ısıtma ve soğutması sabit bir aralıktadır. Bilinen bir referans voltajı kullanılarak, bu ceketin sıcaklığı bilgisayar tarafından kontrol altına alınır. Sıcaklık kontrol devresi (3), kalorimetre bloğunun içindeki platinyum termometrenin (1) referans voltajını karşılaştırır. Bilgisayar bu karşılaştırma sırasında, ısıtma ve soğutma peltier elementleri (4) için gerekli gücü sağlar. Böylece bilgisayar, ceketin ısınımsını lineer değerler olarak DAC (digital to analog converter)'a gönderir. Böylece hücrelerin ısıtma ve soğutma için sabit bir oran olduğuna emin olunur (6/7). Pratik sonuçlara rağmen, N-DSC III 'ün ısıtma ve soğutma dereceleri $2^{\circ}\text{C}/\text{dakika}$ ile sınırlandırılmıştır. Minimum sıcaklık tarama hızı aslında $0^{\circ}\text{C}/\text{dakika}$ 'dır (izotermal).

N-DSC III 'ün bir diğer önemli özelliği, bir sensör gibi yarı iletken termoelektrik bateriler kullanmasıdır (8). Yarı iletken termoelektrik bateriler onların bi-metal benzerlerinden daha çok sıcaklık değerine sahiptirler. Bu problemleri

önlemek için, N-DSC III bir güç düzeltme dizaynı kullanılır. İki hücre arasındaki sıcaklık farklılığı yarı iletken termoelektrik batari (8) tarafından ölçülür ve sinyal yükseltici tarafından yükseltilir(14). Isıtıcılar direkt olarak hücreler içine eklenir ve geri besleme kontrol algoritması (12) ve güç düzeltmeli köprüler (15) tarafından kontrol edilir. Bu güç farklılıkları bir sinyal olarak bilgisayar taraması şeklinde kaydedilir (13).



Şekil 1.8.2. N-DSC III kılcal hücre ölçüm birimleri. 6 ve 7 kılcal hücreler.

Yarı iletken termometrelerin kullanımı tıpkı bir sensör gibi kalorimetrik hücrelerin yapısı için yeni bir dizayn gerektirir. N-DSC III hücreleri 24 karatlık altın ya da platinyumdan üretilir. Her iki tip de platinyum erişim borularıdır. Silindirik hücreler (Şekil 1.8.2. 6 ve 7) bir silindir olarak işlenmiş ve ikili küpçüklere yerleştirilmiştir. Kılcal hücreler kılcal borulara sarılarak oluşturulur. Bu hücrelere erişim sabit bir atık basıncın açılması ile olur. Sensörler ve dengeleyici ısıtıcılar hücrelerin yüzeylerine lehimlenmiştir (N-DSC Katalogu).

1.9. Fark Spektroskopisi

Proteinlerin UV bölgede (250-300nm) ışığı absorplamaları esas olarak tirozin ve triptofan amino asitlerinin aromatik yan zincirlerinin elektronik uyarılmalarından ve bir miktarda fenil alaninden kaynaklanmaktadır. Tirozin ve triptofan artıkları globülerde fazlaca bulduklarından, bu kromoforik artıkların absorpsiyon spektrumlarındaki rahatsızlıklardan çözüldükteki proteinlerin yapılarıyla ilgilenen protein kimyasının birçok sorusuna cevap vermek için doğal sonda olarak yararlanılabilir.

Aromatik yan zincirlerin yerleri ve çevreleriyle ilgili bilgileri ile pH, sıcaklık, çözücü kompozisyonu vb. değişimlerinin yol açtığı yapısal değişiklikler sonucunda bu atıkların çevrelerindeki değişimler spektrumlarındaki ve fark spektrumlarındaki değişimlerden elde edilebilmektedir. Fark spektral metotlar, enzim-substrat ve protein-protein etkileşimindeki doğal ve yapay kromoforik grupların yerleri ve içerikleriyle ilgili sorulara deneysel olarak önermektedir.

1.9.1. Çözücü Rahatsız Etme Metodu

Proteinlerdeki kromoforik amino asitlerin yerlerinin belirlenmesi çalışmalarında kullanılan fark spektroskopisindeki çözücü rahatsız etme tekniği şu temellere dayanmaktadır. Proteinlerin yüzeylerinde bulunan tirozin ve triptofan artıkların spektrumları genellikle bu kromoforların yakın çevrelerinde rahatsız olurlar (çözünün fiziksel özelliklerinin değişmesiyle) (refraktif indeks, dielektrik sabiti ve çözücü- çözünen etkileşimleri, H- bağı gibi (N.S. Bayliss and E.G. McRae.1954, M.Ito, K.Inuzuka and S.Imanishi 1960) v.b.).

Diğer yandan tirozinler ve triptofanlar proteinin iç kısımlarındaki katlanmaları güçlü bir şekilde gizlerler, çözücünün rahatsızlık etkisinden korurlar. Çünkü bunlar çözücü ile serbest olarak etkileşim kurmazlar.

Sonuç olarak onların spektrumları çözücü özelliklerinin değişimleri ile etkilenmez. Bu teknik, proteinin konformasyonunu değiştirmeyen ancak düşük derişimlerde (%10- 20) rahatsızlık olarak kullanılan ve tüm ölçülebilir spektrum

değişimler oluşturdukları bilinen ılımlı ve inert substratlar içindir (T. T. Herskovits and M.Laskowski 1960).

Bazı grupları gizli bazıları açık olan globüler proteinler söz konusu olduğunda, tamamen katlanmamış protein zincirleri veya protein birleşimini oluşturan amino asit karışımının vereceği rahatsızlık toplam spektral değişimin çok küçük bir parçasını oluşturacaktır. Toplam spektral değişimdeki bu fraksiyonlar çözücünün ulaşabildiğini veya maruz kaldığı kromofor gruplarla ölçülür. Uygulamada, bu ölçümlerle ilgili olan birçok deneysel problem fark spektral tekniklerin kullanımıyla büyük ölçüde kolaylaşmıştır.

Doğal proteinlerin spektral değişimlerini, katlanmamış durumdaki veya model bileşiklerle üretilen proteinlerdeki değişimleri karşılaştırmak yerine, bu türlerin fark spektralleri elde edilir ve karşılaştırılır. Fark spektroskopisi tekniği, protein veya model bileşiklerin test çözeltilerinin absorpsiyonlarının aynı derişimdeki referans çözeltiye karşı okunmasını içermektedir. Test çözeltilisinin pH, sıcaklık, elektrolit derişimi veya denatürasyon ajan derişimi gibi parametreleri değiştirilebilmektedir. Çözücü rahatsızlık tekniğinde bu koşulların tamamı sabit tutularak sukroz, gliserol, etilen glikol, dimetilsülfoksit v.b türler ilave edilerek yalnızca çözücünün kompozisyonu değiştirilir.

Bu tür ilaveler genellikle çözücünün polaritesini düşürdüğünden, aromatik amino asitlerin absorpsiyon maksimumlarını daha uzun dalga boyuna değiştirirler (kırmızı kayması). Bu değişiklik temel durum ve birinci uyarılmış durumlar arasındaki $\Pi - \Pi^*$ elektronik geçişlerinden kaynaklanmaktadır (T. T. Herskovits and M.Laskowski 1960).

1.10. Floresans Spektroskopisi

Proteinlerdeki amino asitlerin var olan floresans özellikleri, kimyasal denatüranlar, sıcaklık, pH değişimleri ve basıncın neden olduğu katlanma/katlanmama geçişlerinin izlenmesi amacıyla uzun zamandır kullanılmaktadır. Özellikle triptofan artıklarının floresan özellikleri protein yapısının bozulmasına etkin bir şekilde duyarlıyken, fenilalanin ve tirozinin düşük miktardaki ürünleri ve bunların problemleri bu tür çalışmalar için bir dereceye kadar daha az

duyarlıdırlar. Bu nedenle proteinlerde bulunan triptofanın var olan floresan özelliği nedeniyle protein katlanma çalışmalarında kullanılan floresan tekniklerinin uygulamaları sınırlanacak ve geçici floresan özellikleri taşıyan boyaların kullanımıyla ilgili birkaç örnek tartışılacaktır.

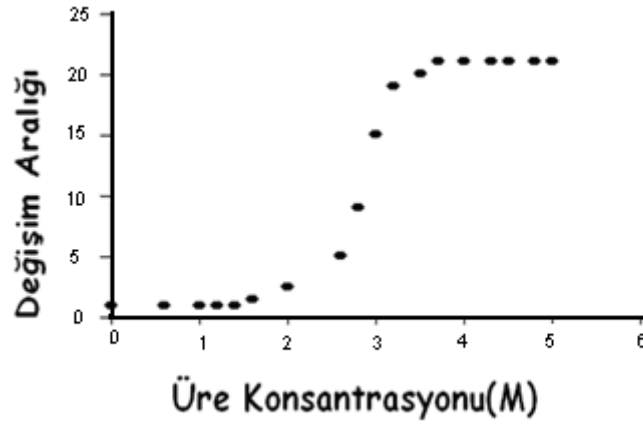
Floresans özelliklerdeki değişimler, protein katlanmış ve katlanmamış profillerinin kinetik ve denge düzenlemelerinde çok yaygın bir şekilde kullanılmasına rağmen bu değişimlerin fiziksel açıklamalarının detaylarına nadiren rastlanmaktadır.

Genel olarak proteinin katlanması iki basamaklı prosesle iyi bir şekilde anlatılmıştır ve floresans özelliğın izlenmesiyle elde edilen bilgiler (profiller), sirküler dikroizm ile elde edilenlerle uyumludur. Böyle durumlarda, floresans profilleri protein yapısındaki genel hasarların indikatörleri olarak alınırken, bunlar triptofan artıklarının yerlerinin değişmesinden kaynaklanmaktadır. Ancak bir çok çalışmada floresans katlanma/katlanmama profilleri, özellikle triptofan artıklarının yerindeki yapısal değişikliklerden kaynaklandığından, 2 basamaklı olmayan davranışla açıklanmaktadır (Banik, U ve ark.,1992, Mann, C ve ark., 1993). Bu nedenle bazı durumlarda floresans profilleri katlanma/katlanmama geçişlerinde geçici ve sabit ara ürünler hakkında bilgiler verilmektedir.

Son yıllarda bir ve iki triptofan içeren proteinlerin doğal durumlarında var olan floresansın tanımlamasında çok büyük ilerlemeler kaydedilmiştir (Szabo ,A.ve ark., 1985, Kim, S ve ark., 1993). Proteinlerin floresans özellikleri oldukça karakteristiktir. Proteinlerin hem doğal hem de denatüre durumları arasındaki farklılıklardan dolayı, proteinlerin doğal ve denatüre durumlarının rölatif ürün miktarı oranları arasında yaygın olarak değişkenlik göstermektedir (Kronman,M ve ark., 1971, Grinvald, A ve ark., 1976). Örneğın; bazı proteinlerde doğal durumda triptofan emisyonu yüksek oranda söndürölmektedir (Örnek; heme proteinleri (Janes, S ve ark., 1987)). Böyle katlanmamış floresans süresi ve şiddetinde büyük artışlara yol açmaktadır. Diğer yanda, diğer proteinlerde doğal durumda triptofan nispeten yüksek miktardaki ürün iken, katlanmamış durumda floresansı etkin şekilde söndürölmüştür. Yukarıdaki verilen referanslar, tek triptofan içeren proteinlerin floresans düşüşlerinin tek ekpononsiyel düşüşle nadiren açıklanabilir ve düşüş hızlarındaki bu heterojenliğın katlanmış yapılarıdaki konformasyonel durumların heterojenliğını yansıttığını göstermektedir.

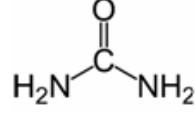
Şimdiye kadar, kararlı durum floresans şiddetlerinin tek dalga boyundaki emisyonlarındaki değişimlerinin ölçümleri yeterince bilgi verici değildir. Ancak izlenebilir olarak protein katlanmalarında floresans kullanımı genellikle basittir. Protein yapılarının indikatörleri olarak başlıca üç parametrenin izlenmesi gereklidir. Bu üç parametre; emisyonun şiddeti ortalama enerji veya emisyonun ortalama dalga boyu ve polarizasyondur. Daha detaylı ve iyi çözümlenmiş bilgiler elde edebilmek için bu parametrelerin kararlı durum modu gibi zaman çözümlemeye araştırılmadığıdır.

Hsp70 proteinde triptofan olmamasına rağmen altı tane tirozin kromoforu vardır. Floresans spektrumu ise bize bu kromoforik yapıları hakkında bilgi verir.



Şekil 1.10.1. Hsp70'in üre ile denaturasyon eğrisi (Arslan D., Tutar Y 2007)

Başta sabit bir şekilde devam eden eğrinin ilk kısmı, eklenen ürenin proteini denature etmeye başladığını, daha sonra yükseliş gösteren eğrinin ikinci kısmı ise denature olan proteinin kromoforik yapılarından kaynaklı bir sinyal artışının meydana geldiğini gösterir. Ve son olarak da yine sabit bir şekilde devam eden üçüncü kısmı ise artık proteinin tamamen denature olduğunu göstermektedir. Peki, üre neden proteini denature eder? Çünkü ürenin yapısı proteine oldukça benzerdir. Yapısındaki NH bağı ve CO bağı üreyi protein yapısına benzer kılar.



Proteinin üçüncül yapısını alabilmesi için gerçekleştireceği zayıf bağlanmaları engeller ve dipeptitlerin oluşmasına engel olur. Bundan dolayı protein gerekli yapıyı alamaz ve denature olur (Bardwell, J. C. A. ve Craig, E. A. 1987)

1.11. Amaç

Protein agregasyonuna dayalı metabolik bozuklukları gidermek ve agregat oluşum mekanizmasını moleküler seviyede önleyen proteinlerin yapılarının ve fonksiyonlarının saptanması çeşitli hastalıkları önleme açısından önemlidir (Song Y.ve ark., 2005). Ökaryotik hücrelerde bu mekanizmanın merkezinde yer alan Hsp70 ve Hsp40'ların yapı-fonksiyon ilişkisi hakkında henüz yeterli bilgi birikimi yoktur. Hücrede aynı bölgede niçin birden fazla Hsp70 ve Hsp40 olmasının ve bazılarının stres altında eksprese edilmesinin nedenleri anlaşılamamıştır. Laboratuarda yaptığımız öncül genetik çalışmalarda ATPaz domainin önemli bir görev üstlendiği saptanmıştır. (Tutar Y ve ark., 2006). Bu domainin diğerleri ile etkileşimi ve bu etkileşimin agregatlar üzerindeki etkisi bilinmemektedir. Bağlanma sabitlerinin kullanılan substrata göre değişmesi ve ATP hidrolizi sırasında meydana gelen konformasyon değişikliğinin bilinmemesi domainler arasındaki ilişkinin bulunmasını gerektirmektedir. Ayrıca bağlanmadaki bu farklılık niçin her protein agregat oluşturmayı priona sebep olmadığını yanıtı olabilir. Stres altında proteinler aktif konformasyonlarını koruyamazlar ve normal konformasyona tekrar katlanabilmeleri için Hsp70 proteininden yardım alırlar (Tutar Y a, b., 2006). Diğer proteinler gibi Hsp70'ler de stresten etkilenebilirler. Bunun için farklı stres ve nükleotid ortamında ikincil yapılarının nasıl bir değişim / dayanıklılık göstereceği oldukça önemlidir.

Bunlara ilaveten artan substrat derişiminin hidrolizi artırması, mekanizmayı daha ilginç hale getirmekte ve Hsp70 de hidrolizin mi yoksa bağlanmanın mı önce olduğunun bulunmasını gerekli kılmaktadır. Oluşturulan rekombinant proteinler ile yapı – fonksiyon ilişkisi belirlenmiştir. Ayrıca bu mekanizmadaki Hsp40'ların fonksiyonu Hsp40 mutantları ile tespit edilmiştir. Fonksiyon, lusiferazın agregasyonunu rekombinant proteinlerin önlemesi ile ölçülmüştür. Aynı zamanda farklı substrat (peptit ve denature olmuş protein) kullanılarak neden her proteinin priona sebep olmadığı araştırılmıştır. Şu ana kadar substrat olarak peptitlerin kullanılması ve Hsp70'lerin bir kerede yedi amino asidi işleme itibarı ile substrat olarak protein kullanmamızın gerekliliğini açığa çıkarmaktadır.

Agregasyon için ayrıca [*PSI* +] prionuna sebep olan *Sub35* proteininin değişik versiyonları kullanılmıştır.

Bu çalışmanın amacı; proteinlerdeki konformasyonel değişimleri anlayabilmektir. Bu amaç için FTIR ve UV-VIS spektroskopilerinden yararlanılarak yapıdaki değişiklikler gözlemlenmiştir.

Ayrıca bu çalışma, türler arasında aynı mekanizmadan kaynaklandığı düşünülen agregasyonun Hsp70/Hsp40'lar ile nasıl önlenebileceğini aydınlatmaya çalışacaktır. Bu deneyler ayrıca genel bir mekanizma bulunmasını ve hücrel faktörlerin bu mekanizmayı nasıl etkilediğini ortaya çıkaracaktır.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Deneylerin Yapıldığı Yer ve Tarih

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya A.B.D. Yrd. Doç. Dr. Yusuf TUTAR' ın laboratuvarlarında Haziran 2007 – Haziran 2008 tarihleri arasında yapılmıştır.

2.2. Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler; Pepton, maya ekstresi, D-Glukoz, amonyum per sülfat (APS), agar, adenin, akrilamid, bisakrilamid, N,N,N'N' – tetrametiletilediamin (TEMED), sodyum dodesil sülfat (SDS), potasyum iyodür (KI), hekzan, dietilaminoetil (DEAE) reçine, sığır bovine serum albümini (BSA), sodyum klorür (NaCl), sodyum hidroksit (NaOH) ve döteryum (D2O), HCl, asetik asit, tris, sodyum asetat, potasyum fosfat monobazik, potasyum fosfat dibazik, zeosin, potasyum klorür (KCl), ditiyo- treitol (DTT), potasyum bromür (KBr), magnezyum klorür, borik asit, agaroz, glisin, kazein, yükleme çözeltileri (Comassi Blue, Brilliant blue), zirconia/Silica beads, kolonlar ve ebatları, bütanol, merkaptolanol, metanol, etanol, filtreler ve diyaliz membranları, guanidine hydrochloride (GuHCl) sigma (St. Louis, USA) firmasından sağlandı. Ssa1, Hsp70 ve Hsc70 stok strainleri kullanıldı.

2.3. Kullanılan Cihazlar

Deneyde Spektroflorimetre (Shimadzu RF5301), Fourier Dönüşümlü IR Spektrofotometresi (FTIR) (Nicolet-520), çalkalamalı karıştırıcı (Selecta) , pH metre (Orion 250 A), manyetik karıştırıcı, mikrosantrifüj (sigma), santrifüj (eppendorf) analitik terazi (Gec avery), otomatik pipet (Gilson), özel cam kolonlar, fraksiyon toplayıcı, peristaltik pompalar (Pharmacia Biotech), otoklav (nüve), Nano DSC III

(Seteram), elektroforez cihazları (Labnet International, Inc. Edison, Nj, USA Model power station 300-220V), beat-beater (Hamilton Beach) ve vortexler (Fisons Whirlı Mixer) kullanıldı.

2.4. Proteinlerin oğaltılması

Hsp70 ve varyantları daha önce kullanılan protokole göre hazırlandı (Tutar Y,2006). Bu protokole göre strainler iki aşamada çoğaltıldı.

1. Petri tabaklarında hücre oğaltılması
2. YPD kültüründe (Yeast -Pepton -D-Glukoz) hücre oğaltılması

2.4.1. Petri Tabaklarında Hücre oğaltılması

Maya ekstresi (%1), pepton (%2), şeker (D-Glukoz) (%2) ve agar (%2) ilavesiyle oluşan çözelti otoklavda 120°C da 15 dakika steril edildikten sonra petri tabakları hazırlandı. Oluşan baloncuklar mavi alevle yok edildikten sonra tabaklar 30°C deki etüvde bir gün süre ile kurutulmaya bırakıldı. Çoğaltılacak stok strainler steril kürdan ucuyla kurumuş tabaklara besiyeri bozmadan sürüldü. Hücreler çoğalması için 30°C taki etüvde iki gün bekletildi. Bu süre sonunda çoğalan hücrelerin bulunduğu tabaklar parafilmle kaplanarak 4°C ta muhafaza edildi.

2.4.2. YPD Kültürüyle Hücre oğaltılması

Bu aşamada kullanılan YPD kültürü (%10 maya ekstresi, %20pepton ve %20 şeker) otoklavda 120°C ta 15 dakika otoklavlandı. Daha önce çoğaltılan hücrelerden (petri tabaklarındaki yada tüplerdeki) ya da stok strainlerden steril kürdanla hücreler alındı ve hazırlanan YPD çözeltisine (kültür) bırakıldı. Çözelti oda sıcaklığına geldiğinde hücre sürülmüş kürdan çözeltiye bırakıldı. YPD çözeltisi çalkalamalı inkübatörde 30°C ta 12 saat eksprese edildi. İnkübatörden alınan çözelti 5000 rpm de

10 dakika santrifüj edildi ve elde edilen çökelek 4°C de parçalama işlemi için saklandı.

2.5. Maya Hücrelerinin Parçalanması (Homojenizasyon)

Elde edilen çökelek parçalama işlemi için hazırlandı. Çökelek ‘‘Breaking Buffer’’(50mM Tris pH: 6,8, 1mM PMSF, 1mM EDTA ve %5 gliserol.) çözeltisi ile çözülerek mekanik parçalayıcı bead-beater’a yerleştirildi. Parçalayıcıya çözelti konulduktan sonra hücreleri parçalaması için 0,5mm’lik Zirconia/Silica Beads eklendi. Parçalayıcı 4°C de 3–5 dakika süresince 1 dakika ara verilerek hücreler parçalandı. Parçalama tamamlandıktan sonra elde edilen çözeltide proteinlerin yanı sıra hücre duvarı, hücre zarı, organeller, lipidler v.b. bulundurduğu için 14000 rpm de 4°Cde 10 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırıldı. Santrifüj sonrasında elde edilen çökelek atıldı (hücre duvarı, hücre zarı, organeller, lipidler v.b. içeren) ve çözelti (protein, DNA v.b içeren) saflaştırma işlemi için -24°C de saklandı. Bu işlem Ssa1, Hsp70 ve Hsc70 proteinleri için ayrı ayrı yapıldı.

2.6. Maya Proteinlerinin Saflaştırılması

Proteinler üç aşamalı saflaştırma işleminden geçirildi (DEAE, hidrofobik kolon ve jel filtrasyonu).

Alkole süspansiyon halindeki reçine santrifüj edilerek alkol uzaklaştırıldı ve su ile yıkanarak alkol ile suyun yer değiştirmesi sağlandı. Bu işlem iki kere daha tekrarlandı. Son olarak da reçine iki kere miktarının yaklaşık üç katı kadar tamponla yıkandı ve tekrar tamponla süspansiyon oluşturularak kolona yüklendi.

Parçalanmış protein çözeltisi kolona yüklendi. Reçinenin proteini tamamen tutması için protein çözeltisi iki kere kolona yüklendi. Fraksiyon toplayıcı ve Peristaltik pompa da düzeneğe yerleştirildi. Değişik derişimlerde tuz çözeltileri (100 mM–600 mM) hazırlanarak bir tuz gradienti oluşturmak için kolondan geçirildi. Bu şekilde proteinlerin ayrılması ve kolondan sıyırılması sağlandı. Fraksiyon toplayıcı ile kolondan örnekler toplandı. Birbirinden ayrılmış proteinler kolondan farklı

zamanlarda çıktığından karışım halinde bulunan proteinler birbirinden ayrılmış oldu. Fraksiyon toplayıcı ile ayrılmış olan protein örnekleri UV- spektroskopisinde 280nm dalga boyunda absorpsiyonları okundu. Yüksek değerli pikler veren fraksiyonlar poliakrilamid jele yüklendi (SDS-PAGE). Bu işlemler maya proteinleri Hsc70, Ssa1 ve Hsp70 için ayrı ayrı yapıldı.

2.6.1. Poliakrilamid Jelin Hazırlanması

SDS-PAGE jeli, ayırma (alt jel) ve derişim jeli (üst jel) olarak adlandırılan iki farklı jelden oluşmaktadır.

Ayırma Jeli (Alt Jel)

- ✓ 750 µl distile su
- ✓ 3750 µl 0,75 M Tris-HCl, pH 8,8/ %0,2 SDS
- ✓ 3 ml Akrlamid/ Bisakrilamid (19:1)
- ✓ 90 µl %10 APS
- ✓ 6 µl TEMED

Derişim Jeli (Üst Jel)

- ✓ 1050 µl distile su
- ✓ 1500 µl 0,25 M Tris-HCl, pH 6,8 / %0,2 SDS
- ✓ 390 µl Akrlamid / Bisakrilamid
- ✓ 60 µl %10 APS
- ✓ 3 µl TEMED

SDS-PAGE camları su ve deterjan yardımıyla temizlendi. Yüzeyinde herhangi bir partikül veya suyun kalmaması için % 70'lik alkol çözeltisiyle silindi. Daha sonra, SDS-PAGE için gereken düzenek kuruldu (BIORAD Miniprotean dikey elektroforez sistemi). Camların arasına ilk önce 3,2 ml ayırma jeli döküldü. Düz bir yüzey elde etmek ve jelin havayla temasını önlemek için bir enjektör yardımıyla jelin

yüzeyi izopropanol ile kapatıldı. Ayırma jeli polimerize olduktan sonra, izopropanol uzaklaştırıldı ve jel bu kez distile su ile yıkandı. Yıkama sonrasında kalan su, küçük parçalar halinde kesilmiş 3 MM Whatman kağıdıyla alındı. Bu işlemlerin ardından hazırlanmış olan derişim jeli ayırma jelinin üzerine döküldü ve tarak hızlıca yerleştirildi. Böylece yüklemenin yapılacağı kuyular açılmış oldu. Derişim jelinin polimerleşmesi ve kuyuların oluşumu için yeterli bir süre (yaklaşık olarak 20 dakika) bekledikten sonra tarak dikkatlice çıkarıldı. Kuyular, örneklerin jele girişinde sorun olabilecek her türlü kalıntının uzaklaştırılması için 1X SDS-PAGE yürütme tamponu ile yine bir enjektör yardımıyla yıkandı. Tampondan geriye kalanlar ucu çekilmiş bir pastör pipeti kullanılarak vakumla alındı. Örnekler jele yüklendi ve kuyuların üst kısımlarına 1X SDS-PAGE yürütme tamponu eklendi.

2.6.2. Örneklerin Hazırlanması

Eppendorf tüplerine SDS-PAGE için ayrılmış örnekler, 20 µl 2X yükleme tamponu ile çözüldü. Eppendorf tüplerindeki örnekler (protein çözeltisi), vorteksle karıştırılıp, kısa bir çöktürmenin ardından 5 dakika boyunca kaynar suda bekletildi. Kaynama sonrasında kısa bir santrifüj işlemi ile tüplerin dibinde toplanan örnekler, kuyucuklara otomatik pipet kullanılarak yerleştirildi.

Belirteç için: 5µl BSA + 15µl su + 20µl 2X yükleme tamponu

Örnekler için: 20µl. Protein çözeltisi + 20µl 2X yükleme tamponu

Yükleme Tamponu

- 50 mM Tris-HCl, pH: 6.8, % 1 SDS,
- 2 mM EDTA,
- % 1 β-merkaptoetanol,
- % 10 gliserol,
- % 0.002 Bromofenol mavisi

2.6.3. Elektroforez

Hazırlanan örnekler kuyucuklara yüklendikten sonra 1X SDS-PAGE yürütme tamponu ile doldurulmuş elektroforez tankı içine yerleştirildi. Örnekler, derişim jelindeyken 100 Voltta, ayırma jeline geçtikleri andan itibaren ise 200 Voltta yürütüldü. Yürütme, yükleme tamponunda bulunan bromofenol mavisi ayırma jelinden çıktıktan sonra 20 dakika daha sürdürüldükten sonra durduruldu.

Elektroforezin ardından, derişim jeli kesilip atıldı. Ayırma jeli, sol üst kenarından küçük bir parça kesilerek işaretlendi ve ardından jel boyama çözeltisi içinde çalkalanarak iyice boyanana kadar bekletildi. Boyama işleminin ardından jel, arıtma çözeltisine alındı ve boyanın açılması sağlandı. Bantların en iyi görüldüğü noktada jel, distile suyla ıslatılmış 3 MM Whatman kağıdı üzerinde, jelatin film ile kaplanarak 80 °C'ta 1,5 saat süreyle kurutuldu.

5X SDS-PAGE yürütme tamponu: 15 g Tris baz, 72 g Glisin ve 5 g SDS, distile su ile 1 litreye tamamlandı ve pH 8.3'e ayarlandı.

Boyama Çözeltisi: 100 ml % 10 asetik asit, 100 ml % 95'lik alkolde çözülmüş % 0.25 Coomassie mavisi ile hazırlandı.

Arıtma Çözeltisi: % 5 asetik asit, % 50 etanol ile hazırlandı.

Protein saflaştırılmasında kullandığımız diğer bir işlem ise diyalizdir. UV spektrumundan ve elektroforez sonuçlarından yola çıkarak eksprese olan protein örnekleri diyaliz işleminden geçirildi. Diyaliz torbaları damıtık su ile ısıtılarak membran aralarının açılması sağlandı. Torbanın bir ucu mandalla tutturuldu. Açık olan diğer ucundan bir pipet yardımıyla protein çözeltisi boşaltıldı. Bu uçta mandalla tutturuldu. Diyalize koyulan protein çözeltisi bir gün tampon çözelti içinde 4 oC ta bekletildi. Böylece proteinlerin küçük moleküllerden ayrılması sağlanmış oldu (tuz, v.s). Diyaliz işlemiyle konsantre edilen protein çözeltisi diyaliz torbasının bir ucu açılarak temiz bir tüpe alınıp -24°C de spektrofotometrik işlemler için saklandı.

2.7. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) ile Maya Proteinleri Ssa1, Hsp70 ve Hsc70'in Yapı Analizi

Elde edilen protein çözeltileri, hazırlanan peletlerin (0,1g Potasyum Bromür (KBr) havanda dövüldü uygun presleme kabına alınarak 10 bar'lık basınç altında preslendi) üzerine damlatılarak FTIR spektroskopisinde Amid-I bölgesinde (1600-1700 cm^{-1}) spektrumu alındı. Bu yolla Hcs70 ve Hsp70 proteinlerinin de Amid-I bölgesinde spektrumları alındı. Proteinlerin her üçü içinde 1,8M'lık ATP ve 0,95M'lık ADP varlığında bu deneyler tekrarlandı.

Bu proteinler tümü ile α -heliks, tümü ile β -sheet ve karma yapılardan oluşmaktadırlar. FTIR sinyali proteindeki kromofor bandlarının çakışması sonucunda tek bir absorpsiyon bandı verdiği için dolayı ikincil yapıların verdiği sinyaller nümerik analiz ile belirlendi ve proteinin apo ve holo halleri karşılaştırıldı (Tutar Y., 2003).

2.8. Ssa1, Hsp70 ve Hsc70 Proteinlerinin Florimetre Spektroskopisi ile Denetürasyon Deneyleri

Saflaştırılarak elde edilen proteine 6M'lık üre çözeltileri eklendi. Florimetrede 290nm'de uyarılarak 300–500 floresans aralığında ve 5–5 nm yarı aralığında emisyon spektrumu alındı. Daha sonra bu çözeltilere 1.8M'lık ATP (adenozin tri fosfat) ve 0.95M'lık ADP (adenozin di fosfat) eklenip aynı parametreler kullanılarak spektrumları alındı. Elde edilen bu spektrumlardan en yüksek floresans değerlerine karşılık gelen 343 nm tespit edildi. Farklı üre ve nükleotit derişimlerinde proteinler titre edilerek floresan değerleri elde edildi. Titrasyon eğrisinden katlanmış / katlanmamış protein oranları tespit edilerek serbest enerji değerleri hesaplandı. Bu değerler üre derişiminin sıfır olduğu "y" eksenine ekstrapole edilerek proteinin termodinamik kararlılığı hesaplandı. Grafikten 1 ve 2 numaralı eşitlikler kullanılarak proteinlerin kararlılıkları hesaplandı.

- $F_u = (YF - Y) / (YF - YU)$ (1)

- $FF = (Y - YU) / (YF - YU)$ (2)

- FF = Katlanmış (başlangıçtaki) protein oranı
- FU = Katlanmamış (denature olmuş) protein oranı
- YF = Katlanmış proteinden kaynaklanan maksimum floresans
- Y = Denaturasyon eğrisinde herhangi bir nokta
- YU = Katlanmış proteinden kaynaklanan minimum floresans

Bu değerlerden aşağıdaki K (denge sabiti) her bir üre derişimi için hesaplandı.

- $K = F_u / FF$ (3)

Son olarak da hesaplanan K değerlerinden ΔG değerleri hesaplandı.

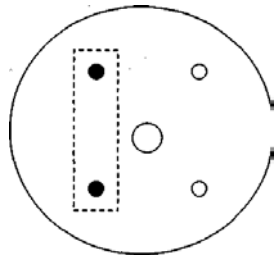
- $\Delta G = -RT \ln K$ (4)

Bu değerler $x = 0$ noktasına ekstrapole edilerek üresiz çözeltideki proteinin Gibbs serbest enerjisi hesaplandı.

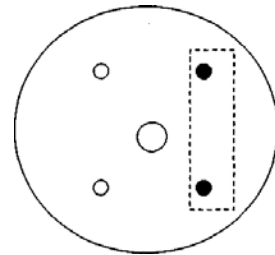
2.9. Nano-DSC III

Bölüm 1.8. anlatılana N-DSC III kılcal hücrelerinin şematik gösterimi aşağıdaki gibidir

Referans hücresi



Örnek hücresi

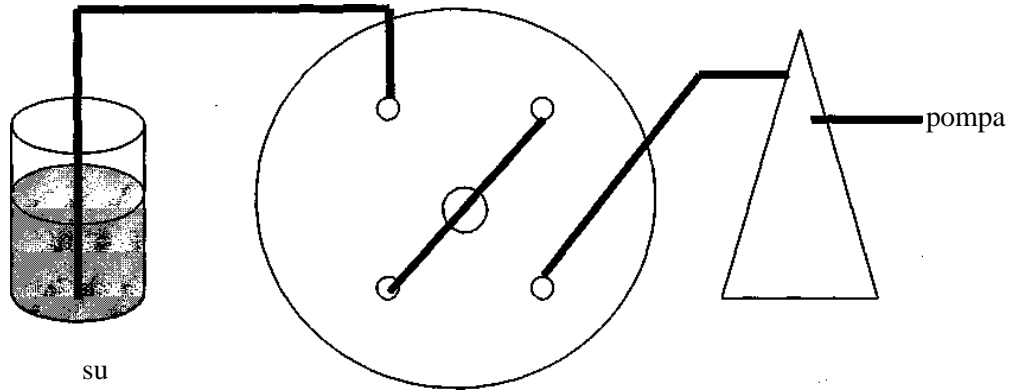


Şekil 2.9.1. DSC kılcal hücrelerinin şematik gösterimi (N-DCS Katalogu)

N-DSC 'de protein analizleri yapmadan önce cihaz şu aşamalardan geçirildi.

1) Durum Taraması

N-DSC cihazı ilk olarak durum taramasından geçirildi. Referans ve örnek hücrelerinin her ikisine de başta referans hücresi olmak üzere su yüklendi (yükleme yapılmadan önce suyun gazı alındı). Su kalıntıları uzaklaştırıldıktan sonra hücrelere uygun siyah kapakçıklarla hücreler kapatıldı ve basınç kapağı da kapatıldı. Cihaza basınç verildi ve çalıştırıldı. Cihazla 0–85 °C arasında 2 °C/dakika süre ile 2 tarama yapıldı ve tarama bittikten sonra basınç düşürülüp hücrelere yüklenen su vakum yardımıyla alındı ve sistemden bir litre distile su geçirildi. Bu işlem şekil 2.9.2.'de şematize edilmiştir.



Şekil 2.9.2. DSC cihazından su geçirilmesi (N-DCS Katalogu)

Şekilde çapraz çizgi ile simgelenen bağlantı ile bir ucu suya daldırılan silikon hortumun içinden geçen su tüm hücreleri dolaştı ve pompa yardımıyla sistemi terk etti.

2) Tampon - Tampon Baseline

Aynı durum taramasında anlatıldığı gibi her iki hücreye de tampon çözeltisi yüklendi (Yüklemeden önce gazı alındı). Artıklar temizlendi, kapakçıklar kapatıldı, basınç kapağı kapatıldı, sisteme basınç verildi ve yine aynı şekilde 0–85 °C arasında

2 °C/dakika süre ile 2 tarama yapıldı. Tarama bittikten sonra tampon vakum yardımıyla çekildi ve hücreler temizlenerek bir litre distile su geçirildi.

3) Tampon – Protein Test

Her iki aşamada da olduğu gibi bu aşamada da aynı yol izlendi. Ancak bu aşamada referans hücresine tampon (standart-I), örnek hücresine de protein çözeltisi mikro pipet yardımıyla yüklendi (yüklemeden önce her iki çözeltinin de gazı alındı). Kılcal hücrelerin kenarlarında kalan çözelti artıkları bir vakum yardımıyla çekildi ve kalan küçük damlacıklar uzaklaştırıldı. Son olarak ta kılcal hücrelerin arkada kalan kısımları (referans hücresinin arkada kalan kısmı ve örnek hücresinin arkada kalan kısmı) bu kılcal hücrelere uygun kapaklarla kapatıldı. Kalorimetrenin 25 °C'de sabit kalması beklendi. Program çalıştırılıp 0–100 °C arasında 2 °C/dak aralıklarla 2 tarama yapıldı. Son olarak cihaz basınç altında çalıştırıldı ve veriler kaydedildi. Bu işlem her bir protein (Ssa1, Hsc70 ve Hsp70) için tekrarlandı.

4) Formik Asitle Temizleme

Tüm işlemler bittikten sonra kalorimetri formik asitle yıkandı. Bunun için % 50'lik formik asit diğer aşamalarda anlatıldığı gibi yüklendi. Kalıntılar uzaklaştırıldı. Diğer aşamalardan farklı olarak basınç kapağı kapatılmadı. Bu nedenle sisteme basınç uygulanmadı. Cihazla 25–80 °C arasında 2 °C/dakika süre ile 2 tarama yapıldı. Tarama bittikten sonra vakum yardımıyla formik asit çekildi, sistemden bir litre distile su geçirildi, kalıntılar temizlendi ve kalorimetrenin kapakları kapatıldı.

2.10. UV-VIS Spektroskopisi

2.10.1. Fark spektroskopisi

Protein çözeltileri Ssa1, Hsc70 ve Hsp70, değişik derişimlerdeki (%20, %45 ve % 70) dimetil sülfoksit ile (DMSO) rahatsız edildi ve 240–320nm arasında spektrumu alındı. Daha sonra bu işlem bir de 1.8M'lık ATP ve 0.95M'lık ADP ile tekrarlandı ve spektrumlar karşılaştırıldı.

2.10.2. Söndürme (Quenching)

Hsp70 proteinde triptofan olmamasına rağmen altı tane tirozin kromoforu vardır. Akrilamid ve potasyum iyodür ile söndürme yapıp farklı bölgelerde yer alan bu kromoforların farklı koşullarda ne kadarının proteinin içine gömülüp ne kadarının yüzeye çıkacağı hesaplandı ve yapısal değişiklikler tespit edildi (Creighton T.E., 2002). Ksv (Stern-Volmer) değerleri olası konformasyonel değişikliklerde protein kromoforlarının çevresindeki değişimlerin bir göstergesidir.

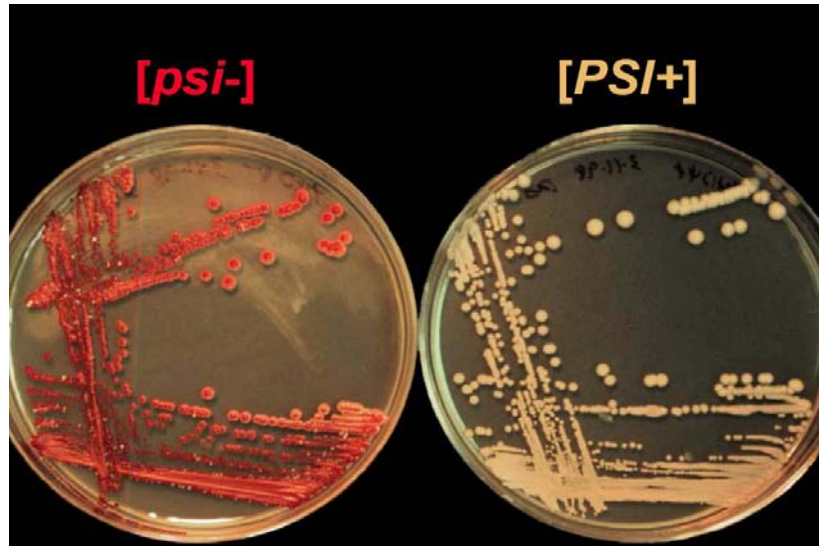
$$\bullet \quad F_0 / F = 1 + K_{sv} (Q) \quad (5)$$

- F_0 = Protein floresansı
- F = Söndürücü eklendikten sonraki floresansı
- K = Söndürme sabiti
- Q = Söndürücü derişimi

3. BULGULAR

3.1. Hsp70 ve Prionlaşma

Bölüm 2.4.1. de anlatıldığı gibi petri tabaklarında hazırlanan besi ortamında hücreler büyütülmüş, bu büyütme sırasında petri tabaklarında çoğaltılan hücrelerin renkleri arasında farklılıklar gözlenmiştir. Bu renk değişikliği bölüm 1.5. de anlatıldığı gibi *Sub35* 'in [*PSI* +] formundan kaynaklanmaktadır. Stop kodonunu geçen [*PSI* +] gen transle etmeye devam ettiği için bu fenotip mayanın okzotropu kullanılarak takip edilmiştir. [*PSI* -] olan maya etkin bir şekilde translasyonu prematüre kodonda sonlandırmıştır. Bundan dolayı adenin üretmemiş veya adenin eksik olan ortamda büyümemişlerdir. Bunun yerine zengin ortamda adenin biyosentezinin ara ürünü olan maddeyi biriktirmişlerdir ve hücreler kırmızı renk almışlardır.



Şekil 3.1.1. Petri tabaklarındaki prionlaşma

Şekil 3.1.1. petri tabaklarındaki besierelerde prionlaşmanın olup olmadığını gösterir. Görüldüğü gibi [*PSI* -] ile gösterilen tabakta kırmızı renk görülmektedir. Bu prionlaşmanın olmadığını yani *Sub35*'in küleşmediğini gösterir ve prionlaşmanın olabilmesi için ortama adenin eklenmesi gerektiği anlamına gelmektedir. Diğer

taraftaki $[PSI +]$ ile gösterilen tabak ise prionlaşmanın olduğunu ve bunun için adeninin gerekmediğini göstermektedir.

Çalışmalarımızda kullanacağımız strainler (Saa1, Hsp70 ve Hsc70) konu 2.4.1.'de anlatıldığı gibi çoğaltılması için hazırlanan petri tabaklarına sürülmüştür. Her üç strainde de şekil 3.1.1. deki $[PSI +]$ formu gözlemlenmiş ve prionlaşma gerçekleşmiştir. Bu gözlem ile strainlerin çoğalmış olduğu sonucuna varılarak kararlılıklarının hesaplanabilmesi için spektrofotometrik işlemlerden geçirilmiştir.

3.2. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) ile Ssa1, Hsc70 ve Hsp70'in ADP ve ATP Nükleotidleri Varlığında ve Yokluğunda İkincil Yapılarının Karşılaştırılmaları

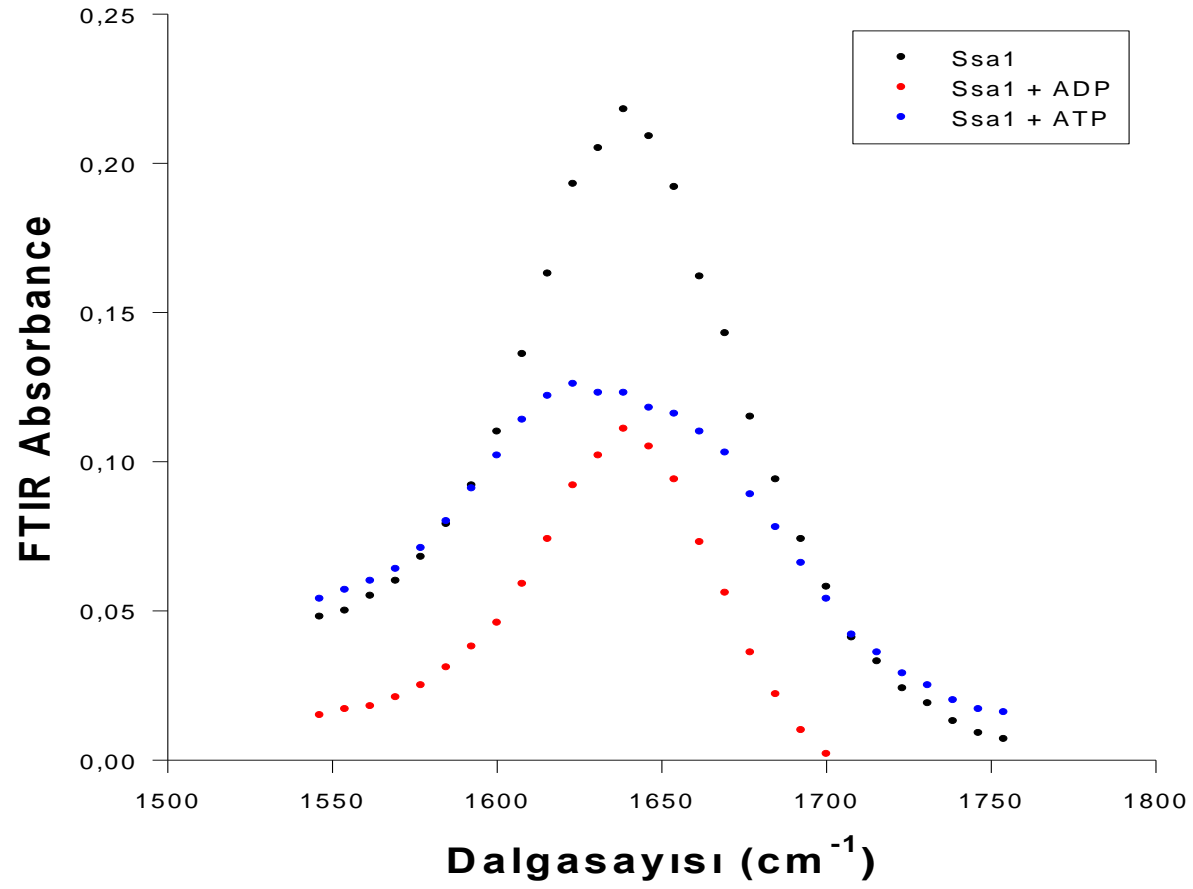
Proteinlerin ikincil yapılarının yüzdeleri konformasyonel değişimler için dairesel dikrosim (circular dichrosim) ile önemli analiz yöntemlerinden biridir. Nükleotidlerin aynı aileden olan üç farklı Hsp70 yapısına etkileri standart KBr metodu kullanılarak incelenmiştir. Bu amaçla proteinlerin amit I bölgesi ($1700-1600\text{ cm}^{-1}$) absorpsiyon spektroskopileri izlenmiştir (Şekil 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3). Absorpsiyon bandları örtüştüğü için ikincil yapıların analizi matematiksel dönüşümler kullanılarak incelenmiştir.

Analiz için konkanalin A, lizozom, hemoglobin, α -kimotripsin proteinleri referans proteinler olarak kullanılmıştır. Hemoglobin %76 α -heliks, %13 β -kangal, % 11 rasgele yapılardan oluşmuştur. Konkanalin A %3 α -heliks, %44 β -kangal, % 25 β -dönüş ve %28 rasgele yapılardan oluşmuştur. Lizozom ve kimotripsinin ikincil yapılarının yüzdeleri ise sırasıyla: %36-11 α -heliks, % 10-35 β -kangal , %36-25 β -dönüş ve %19-30 rasgele yapılardır (Tutar Y.,2003).

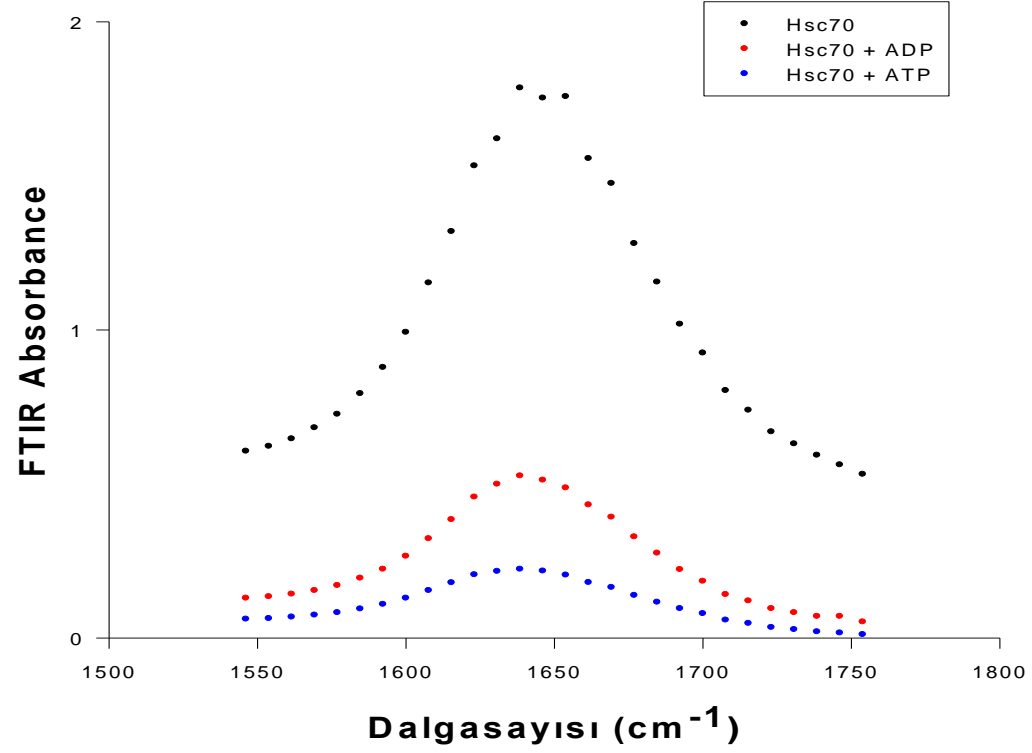
Analiz için bu referans proteinlerle belirlenen bandlar kullanılmıştır. β -kangal yapıları ($1620, 1631, 1640\text{ cm}^{-1}$); α -sarmal yapıları (1656 cm^{-1}), dönüşler ($1665, 1670, 1680, 1690\text{ cm}^{-1}$) ve rasgele yapılar 1648 cm^{-1} de absorpsiyon vermiştir.

Analizler nükleotid varlığında proteinlerin ikincil yapılarında oldukça düşük bir değişme olduğunu (%4 α -sarmal \rightarrow β -kangal) tespit etmiştir.

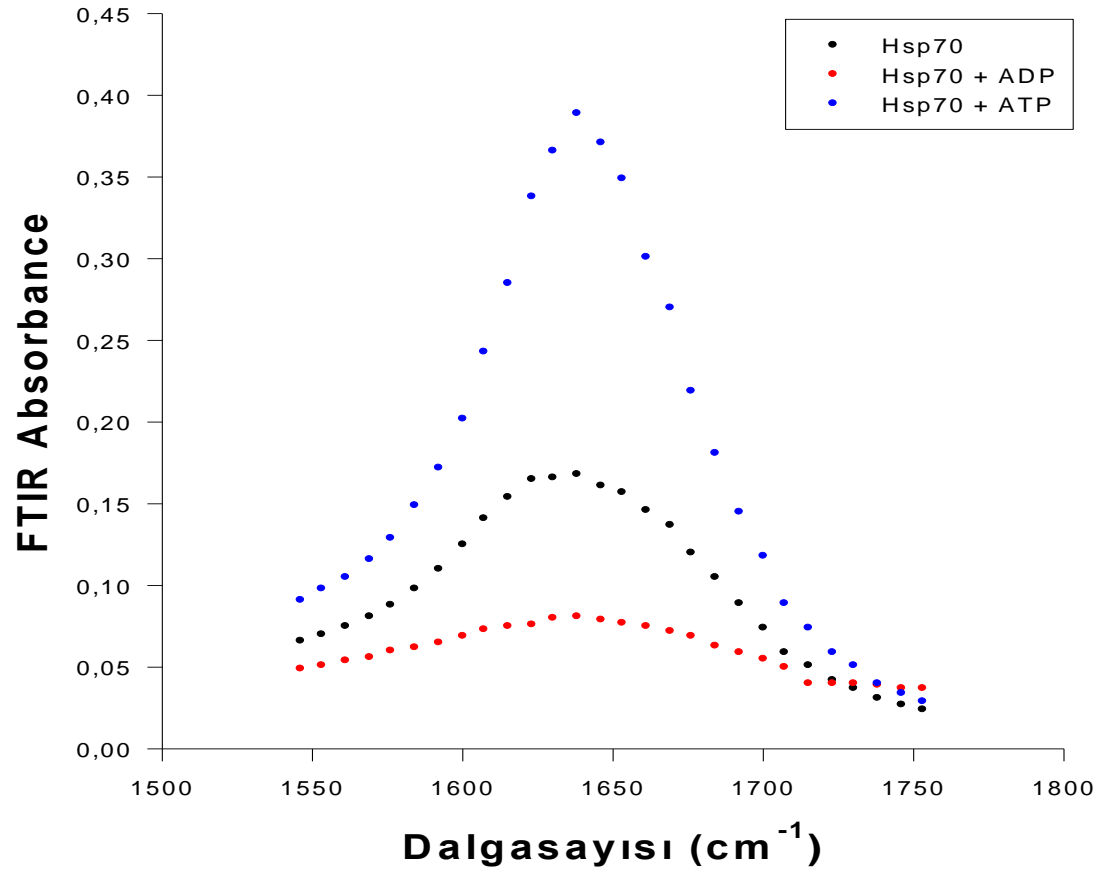
Elde edilen absorpsiyon spektrumları örtüştüğü için hesaplamalar grafik üzerinde ayrıca gösterilmemiştir. Nükleotit varlığında analizleri yapılan proteinlerin ikincil yapılarındaki değişimin çok az olması bizi nükleotidlerin proteinlerin üçüncül yapılarında ve/veya kararlılıklarında bir değişim gösterdiği sonucuna götürmüştür. Bu amaçla proteinler florimetrik ve kalorimetrik analizlere tabii tutulmuşlardır.



Şekil 3.2.1. Ssa1 proteininin farklı nükleotidler varlığında Amid I bölgesi FTIR spektrumları.



Şekil 3.2.2. Hsc70 proteininin farklı nükleotidler varlığında Amid I bölgesi FTIR spektrumları.



Şekil 3.2.3. Hsp70 proteininin farklı nükleotidler varlığında Amid I bölgesi FTIR spektrumları.

3.3. Ssa1,Hsc70 ve Hsp70 Proteinlerinin Florimetre Spektroskopisi ile İncelenmesi ve Denaturasyon Deneyleri

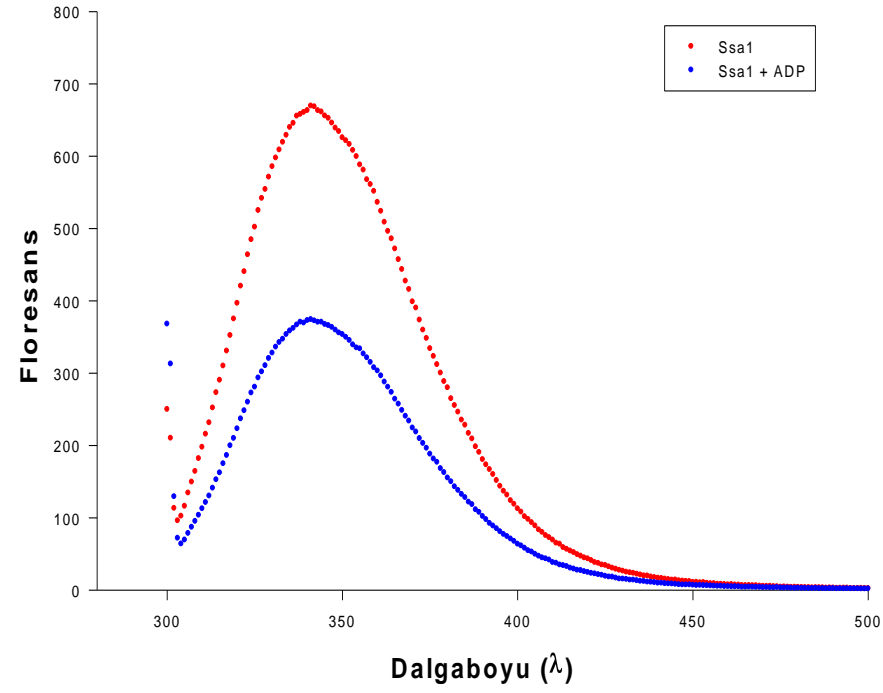
FTIR deneyleri verilerinin analizi proteinlerin ikincil yapılarında bir değişiklik gözlenmemesi olası değişimlerin üçüncül yapıda ve kararlılıkta olabileceği olasılığını öne sürmüştür. Bunun için proteinler florimetri ile incelenmiştir. İlk olarak proteinlerin uyarılma spektrumu alınarak uyarılmada maksimum dalga boyunun 290 nm olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç teorik olarak Ssa1 yapısında triptofan olmadığı için beklenen bir dalga boyudur. Uyarılan proteinler nükleotit varlığında 5–10 nm kırmızıya kayma vermiştir (Şekil 3.3.1; Şekil 3.3.3; Şekil 3.3.5). Bu kayma nükleotidlerin proteinde konformasyonel değişiklik meydana getirdiğinin bir göstergesidir. İkincil yapıda meydana gelen değişimin az olduğu düşünüldüğünde bu değişim proteinlerin üçüncül yapısından kaynaklanmaktadır.

Proteinler üre ile denature edilerek (Şekillerde 6M'lık spektrumlar verilmiştir; Şekil 3.3.2, Şekil 3.3.4 ve Şekil 3.3.6) kararlılıkları saptanmıştır. Elde edilen bu spektrumlardan en yüksek floresans şiddetinin 343 nm olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra bu dalga boyundaki floresans şiddetlerine karşın eklenen üre derişimleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 3.3.7). Aynı işlemler nükleotit varlığındaki spektrumları için de yapılmış ve aynı grafikte gösterilmiştir.

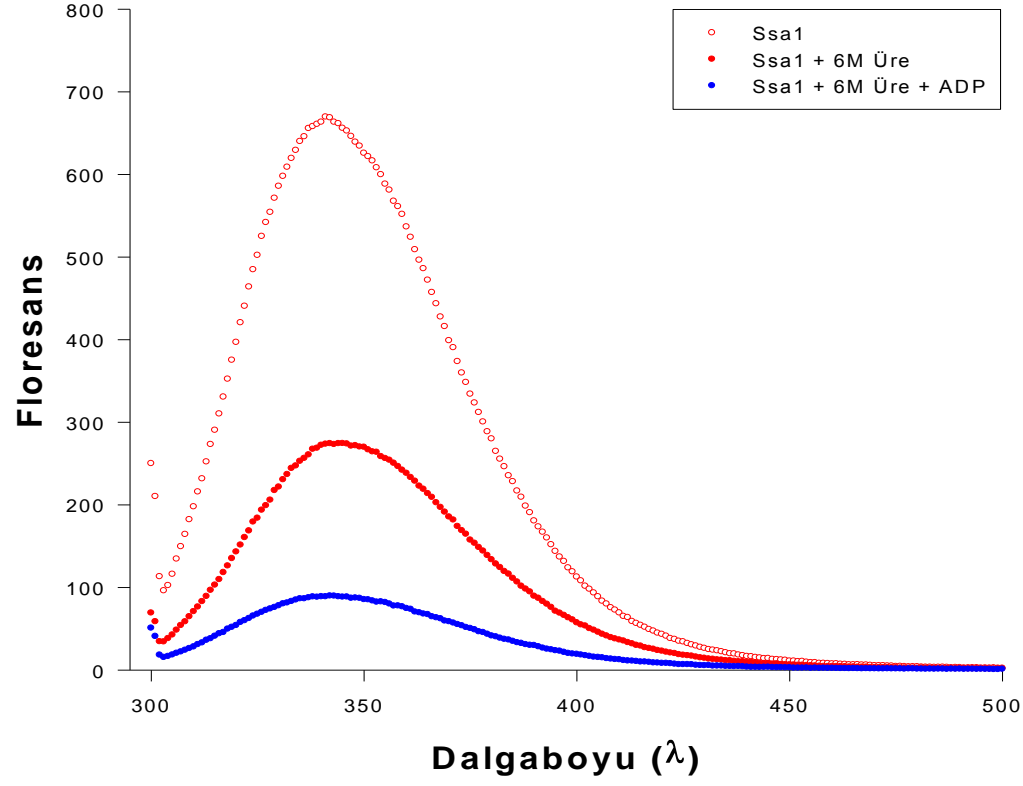
Bu grafikten konu 2.8 deki (1) ve (2) eşitlikleri kullanılarak bulunan değerler eşitlik (3) de yerine yazılarak eşitlik (4) de ki ΔG değeri nükleotit varlığında ve yokluğunda hesaplandı.

- Ssa1 'in nükleotit yokluğundaki ΔG değeri $29,86 \text{ kJ mol}^{-1}$
- Hsp70'in nükleotit yokluğundaki ΔG değeri $30,00 \text{ kJ mol}^{-1}$
- Hsc70'in nükleotit yokluğundaki ΔG değeri $29,97 \text{ kJ mol}^{-1}$
- Ssa1'innükleotit varlığındaki ΔG değeri $24,99 \text{ kJ mol}^{-1}$
- Hsp70'in nükleotit varlığındaki ΔG değeri $25,00 \text{ kJ mol}^{-1}$
- Hsc70'in nükleotit varlığındaki ΔG değeri $24,94 \text{ kJ mol}^{-1}$

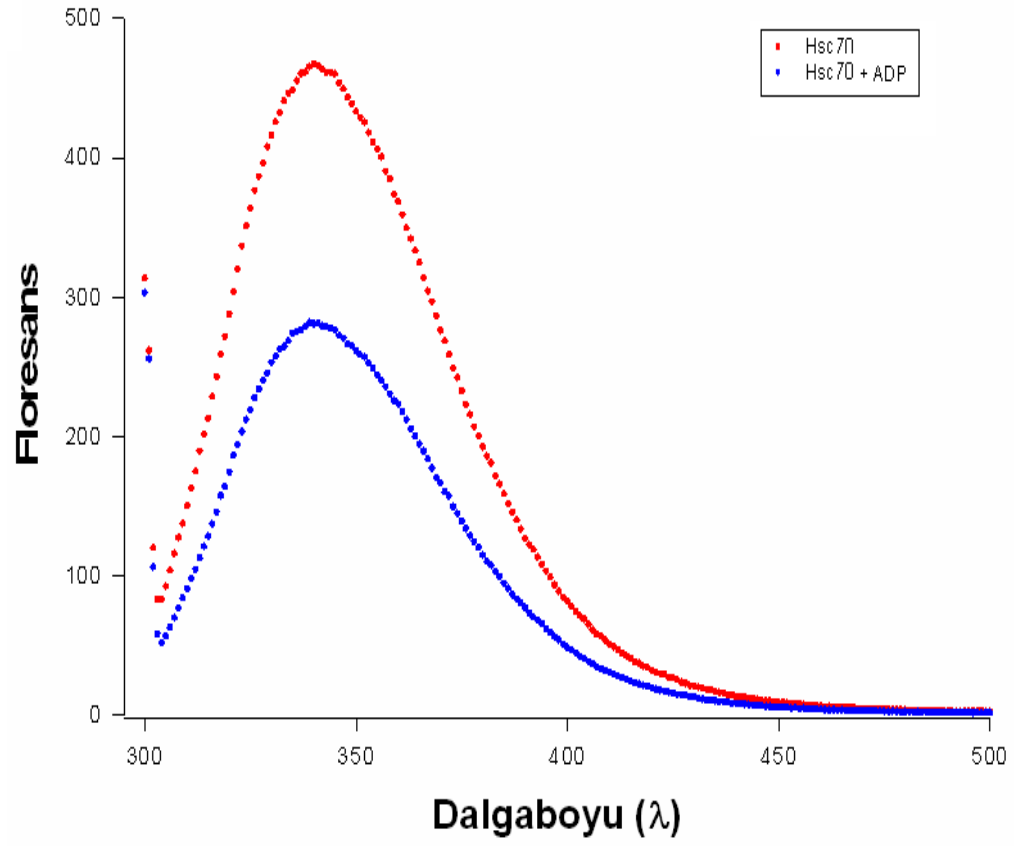
Bu sonuç kalorimetrik deneyler ile uyumlu olup denature edilen yapılar benzer sonuçlar vermiş ve proteinler yaklaşık 10 derece daha düşük sıcaklıkta denature olmuşlardır.



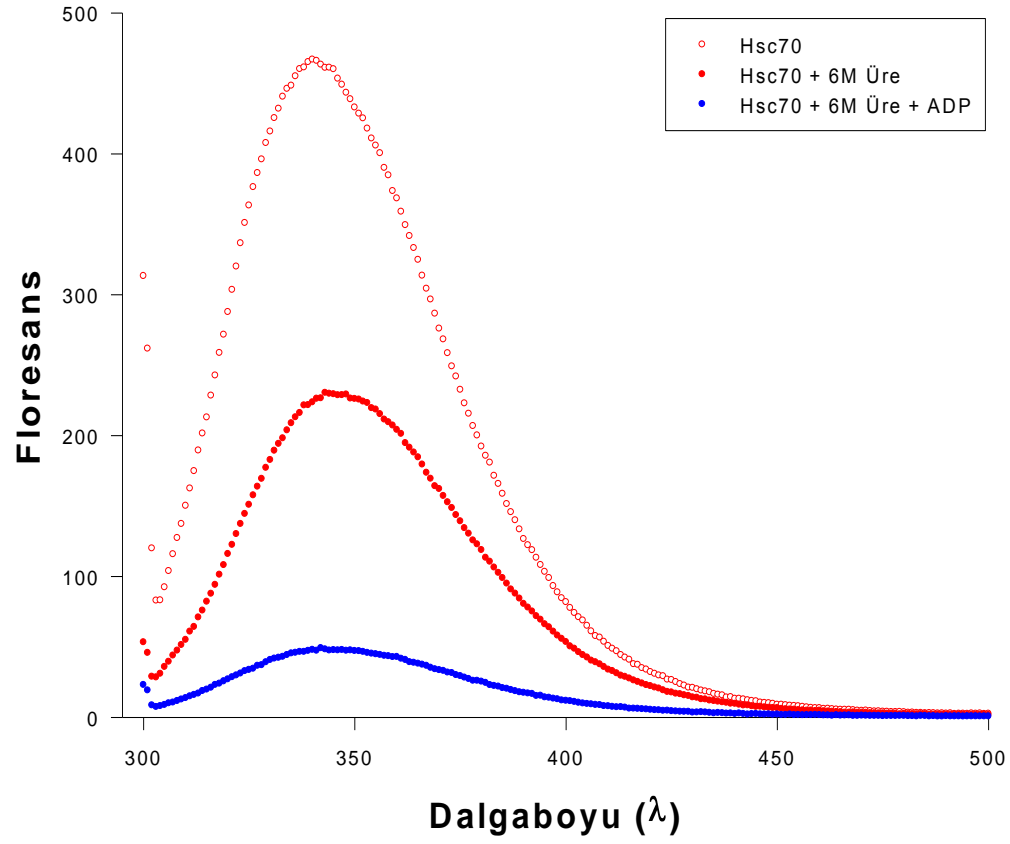
Şekil 3.3.1. Ssa1 proteininin 0,95M'lık ADP varlığındaki (300–500 nm dalga boyunda) floresans spektrumu.



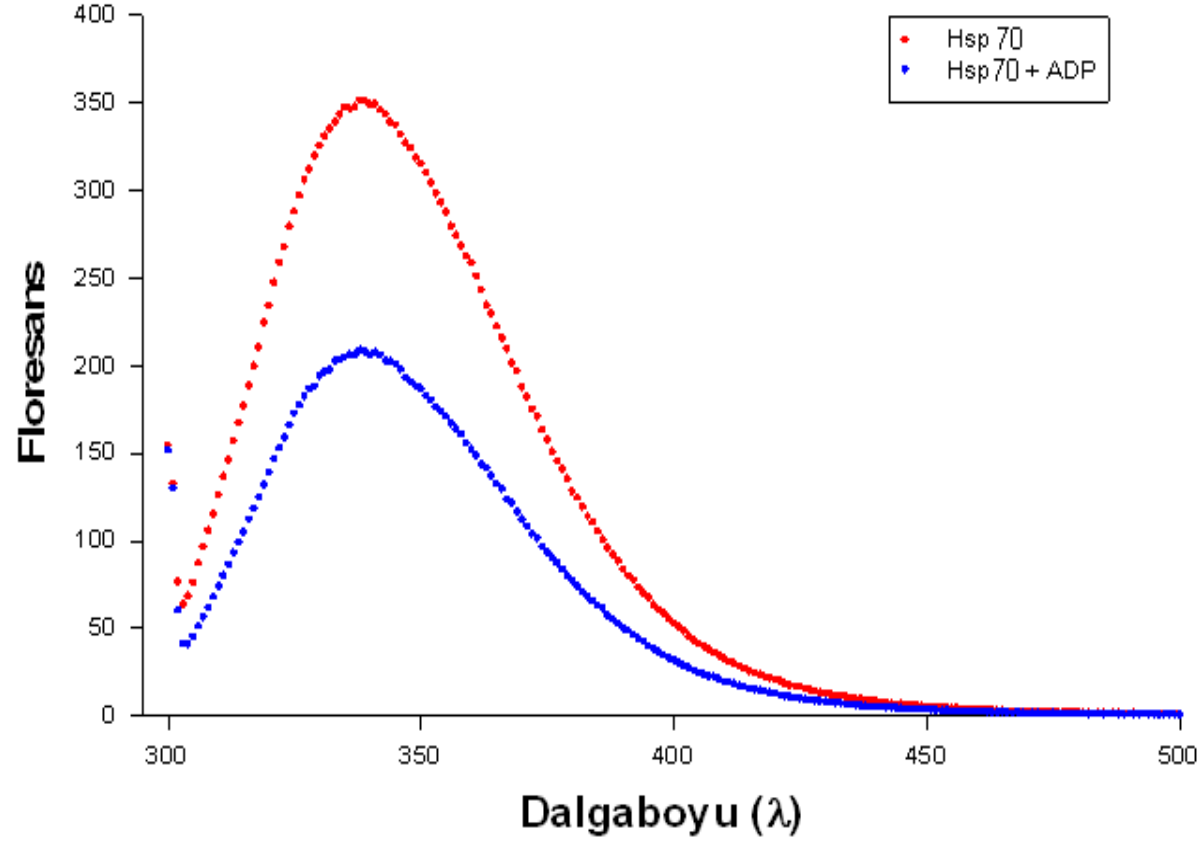
Şekil 3.3.2. Ssa1 proteininin 6M'lık üre ve 0,95M'lık ADP varlığındaki (300–500 nm dalga boyunda) floresans spektrumu.



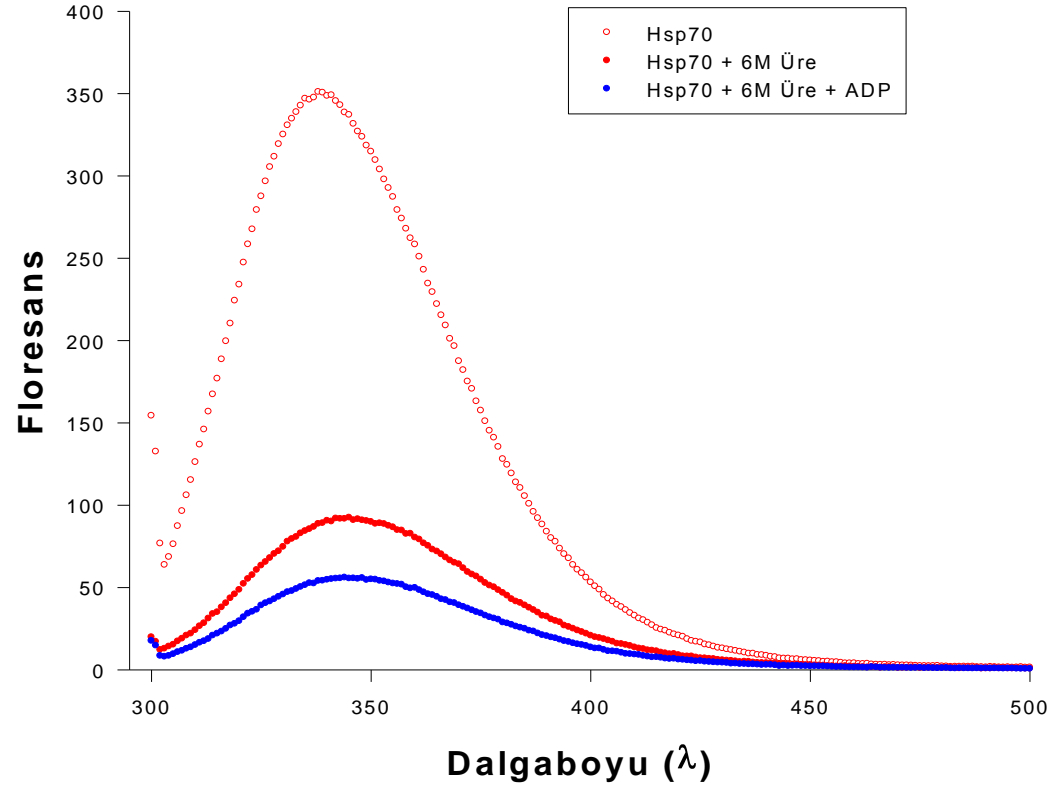
Şekil 3.3.3. Hsc70 proteininin 0,95M'lık ADP varlığındaki (300–500 nm dalga boyunda) floresans spektrumu.



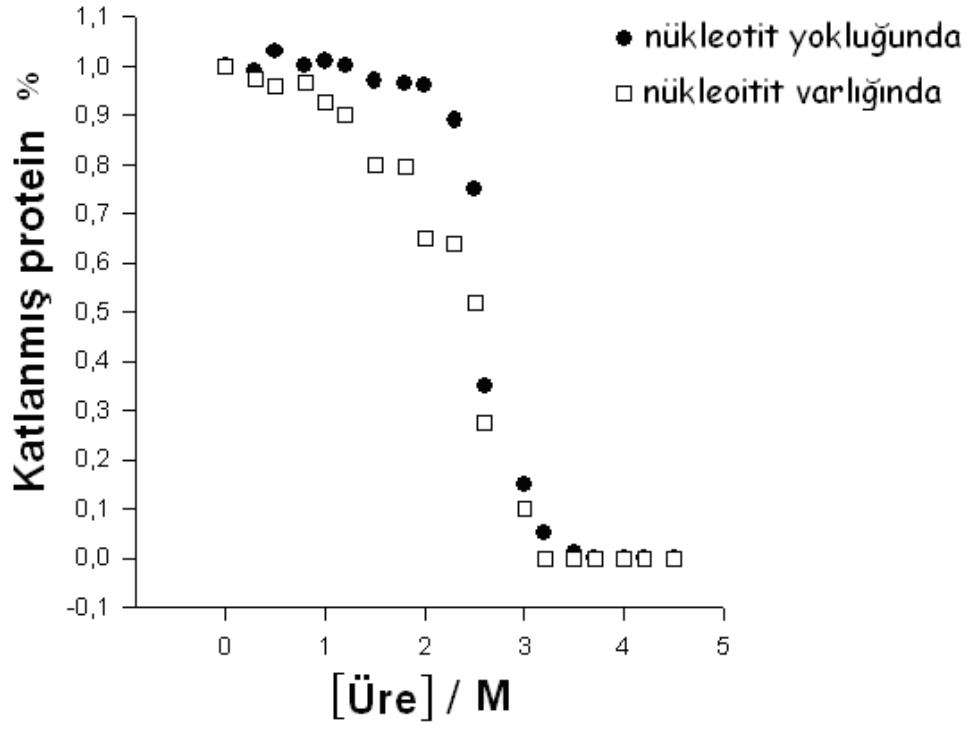
Şekil 3.3.4. Hsc70 proteininin 6M'lık üre ve 0,95M'lık ADP varlığındaki (300–500 nm dalga boyunda) floresans spektrumu.



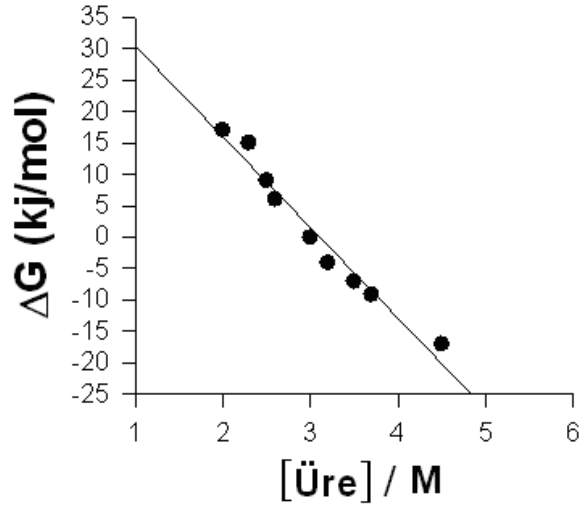
Şekil 3.3.5. Hsp70 proteininin 0,95M'lık ADP varlığındaki (300–500 nm dalga boyunda) floresans spektrumu.



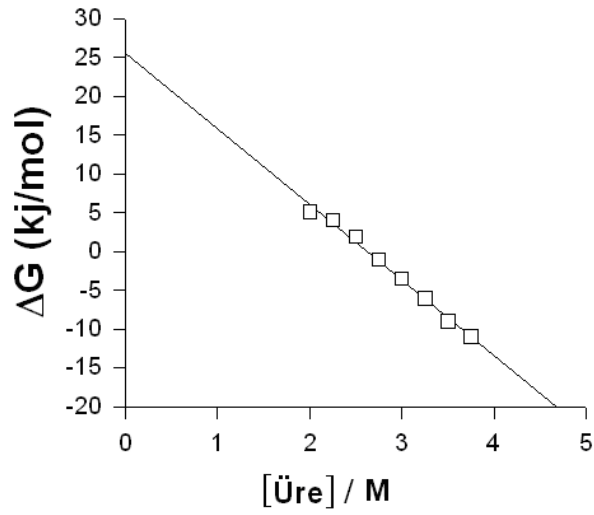
Şekil 3.3.6. Hsp70 proteininin 6M'lık üre ve 0,95'lık ADP varlığındaki (300–500 nm dalga boyunda) floresans spektrumu.



Şekil 3.3.7. Hsp70 denaturasyon eğrisi.



Şekil 3.3.8. Katlanmamış protein nükleotit yokluğunda serbest enerji değişiminin farklı üre derişimlerindeki serbest Gibbs enerjisine bağılılığı



Şekil 3.3.9. Katlanmamış protein nükleotit varlığındaki serbest enerji değişiminin farklı üre derişimlerindeki serbest Gibbs enerjisine bağılılığı

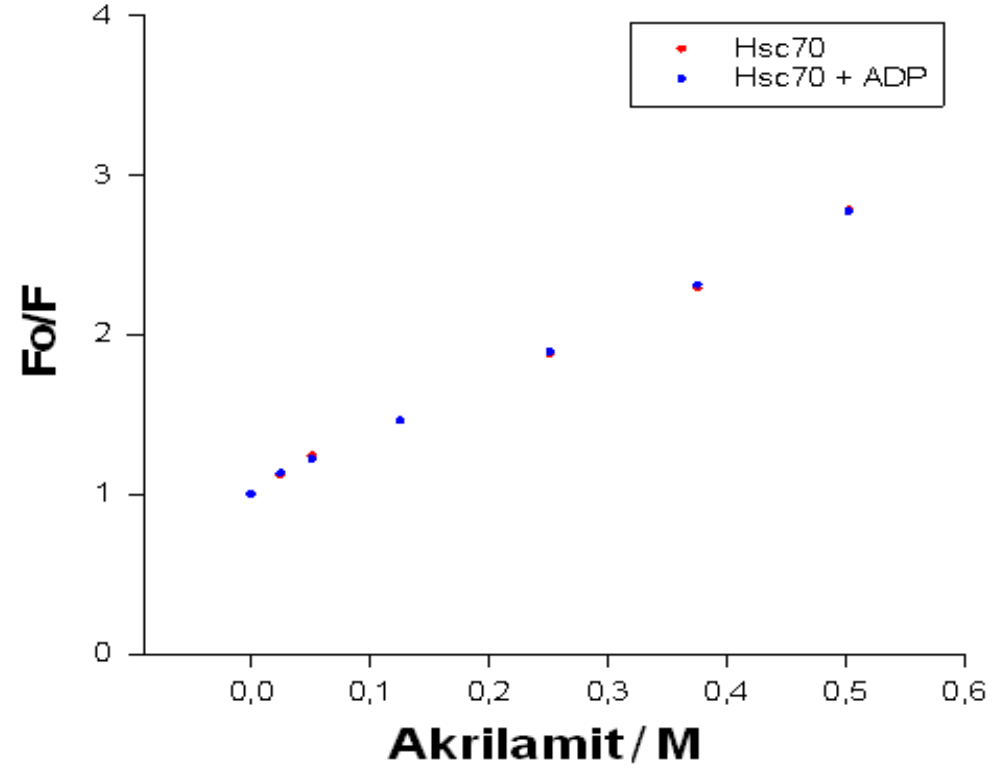
3.4. Söndürme Deneyleri

Protein kromoforlarının farklı ortamlarda farklı derecelerde ortaya çıkması proteindeki konformasyonel değişimler için önemli bir göstergedir. Denaturasyon deneylerinde farklı üre derişimlerinde alınan sinyal üre olmayan konsantrasyona ekstrapole edilerek protein kararlılığı bulunur. Söndürme deneylerinde ise kromoforlardaki yansıyan ışığı engelleyen bir madde kullanılarak protein kromoforlarının farklı ortamlarda ortaya çıkma dereceleri hesaplanmıştır.

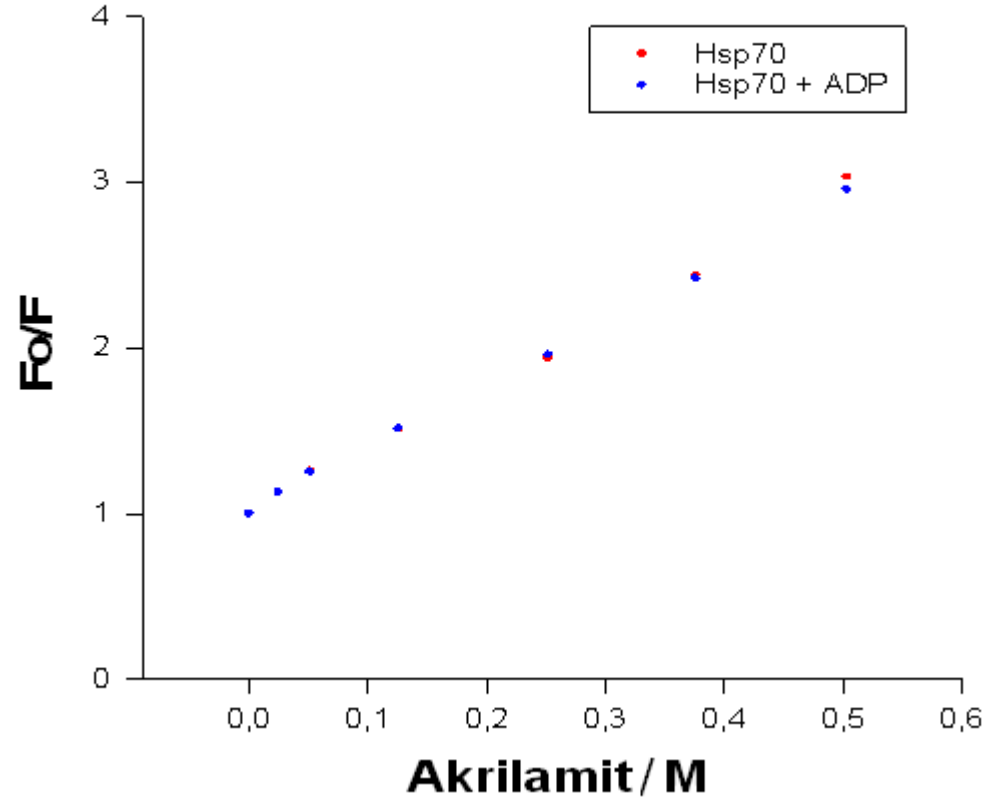
Söndürme, bir örneğin floresan şiddetini düşüren işleme denir. Söndürmede bir dizi moleküler etkileşim oluşur. Bu etkileşimler uyarılmış hal tepkimeleri, moleküler düzenlemeler, enerji transferi, en düşük enerji seviyesinde kompleks oluşumu ve çarpışmalı söndürmedir.

Proteinler nükleotid varlığında ve yokluğunda aynı tip söndürme grafiklerine sahiptirler. Bölüm 2.10.2. deki eşitlik 5 kullanılarak proteinlerin Ksv değerleri hesaplandı. Ksv değerleri Hsc70 için 3,44 Hsp70 için 3,89 ve Ssa1 için 3,36 M⁻¹dir. Yani akrilamid derişimleri sırasıyla 0,29; 0,26; 0,31 olduğunda %50 floresan söndürülmektedir. Doğrusal Stern-Volmer grafiği söndürücü ajanların ulaşabildiği tek tip kromofor olduğunun göstergesidir.

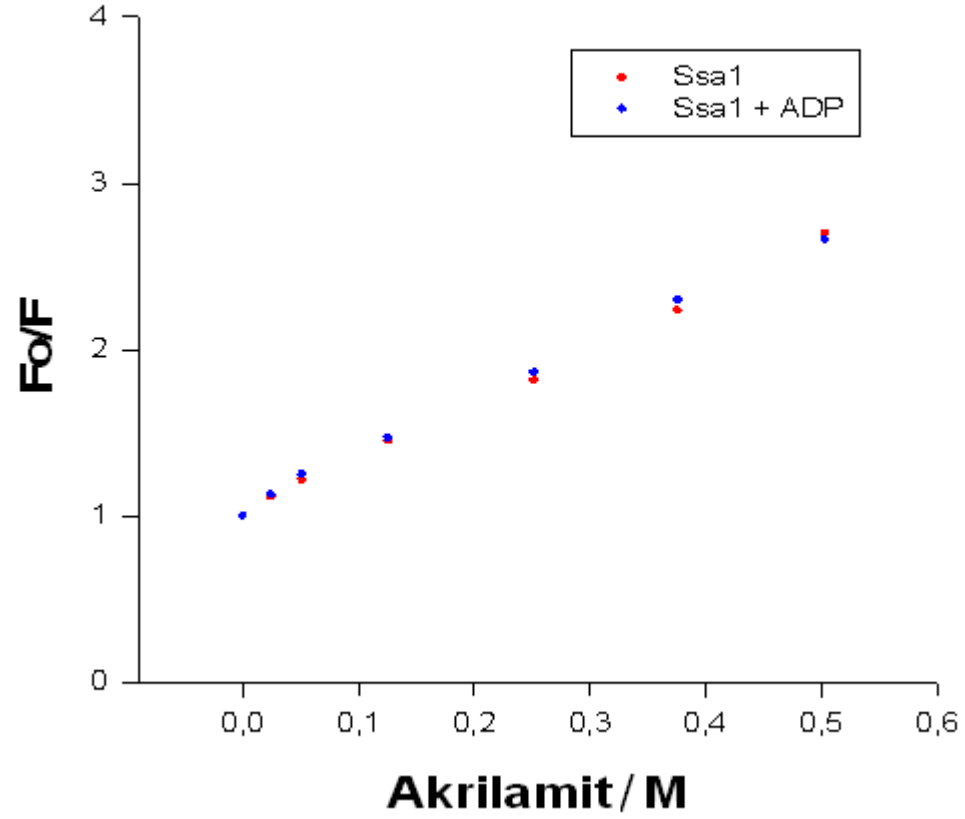
FTIR deneyleri proteinlerin ikincil yapılarında belirgin bir değişme olmadığını önermiştir. Yani konformasyonel değişimler globular yapıda gözlemlenebilir. Söndürme deneyleri nükleotit varlığında derişim göstermemesi proteinlerin “rigid body movement” katı yüzey hareketi yaptığının bir göstergesidir. Nükleotitler hidroliz sonrası sinyali substrat bağlanma ünitesine iletmesi her üç proteinde de belirgin konformasyonel değişim göstermeden oluşmaktadır.



Şekil 3.4.1. Hsc70 yapısının ADP yokluğuna ve varlığında söndürme deneyleri.



Şekil 3.4.2. Hsp70 yapısının ADP yokluğuna ve varlığında söndürme deneyleri.



Şekil 3.4.3. Ssa1 yapısının ADP yokluğuna ve varlığında söndürme deneyleri.

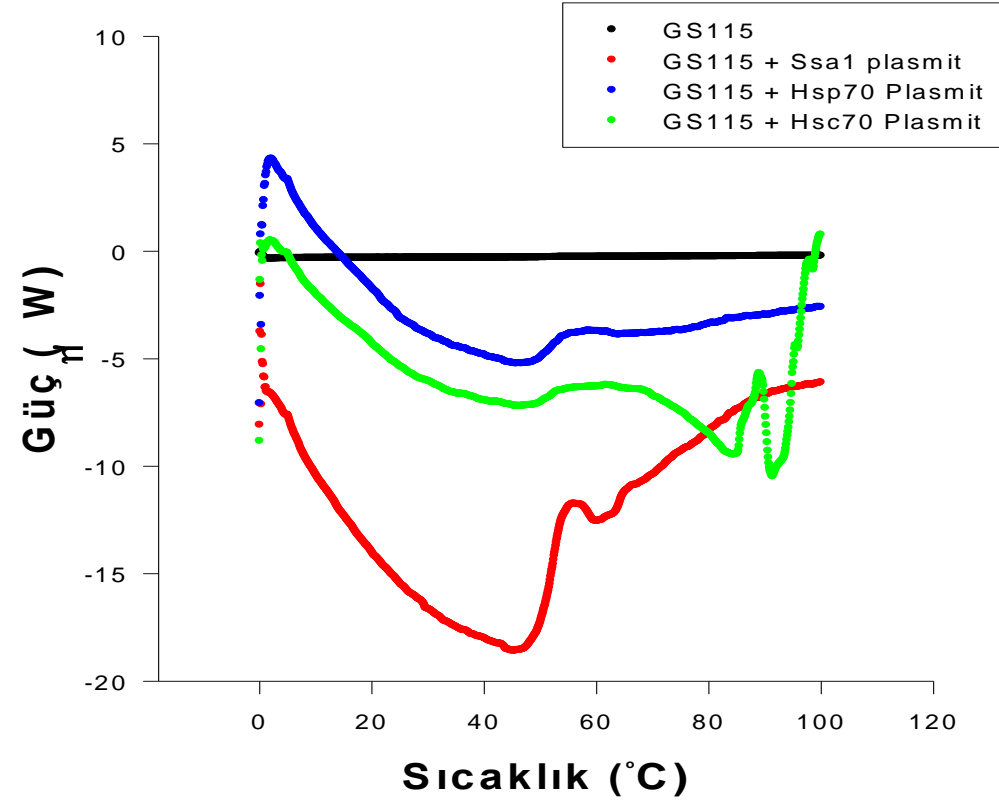
3.5. DSC Deneyleri

Protein kararlılıkları için enstrümantal yollardan biriside diferansiyel taramalı kalorimetredir (Differential Scanning Calorimetry). Bu yöntemde makromoleküllerin kararlılıkları tespit edilebilir. Proteinler için en önemli unsur proteinin renatüre olabilmesidir. Isıtılan protein soğuma esnasında agrege oluyorsa çok duyarlı sonuçlara varılamaz. Hsp70 proteinlerinde de bu durum gözlemlenmiştir. Bundan dolayı proteinler sadece birer kez 105 dereceye kadar ısıtılmış ve tahmini değerler florimetrik denaturasyon değerleri ile karşılaştırılmıştır.

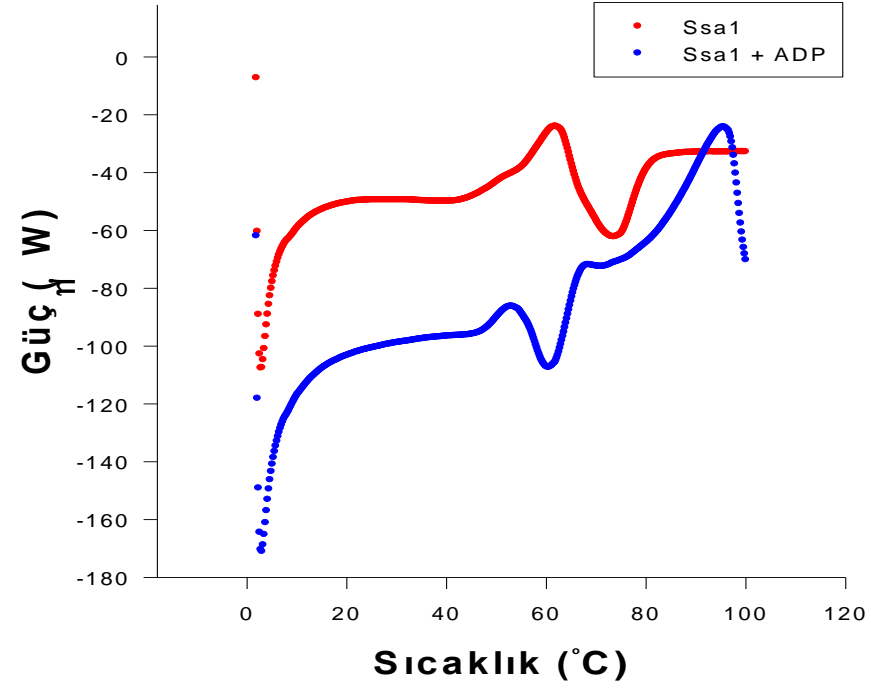
Isı şok proteinleri hücreleri stresten koruduğu için proteini kodlayan plazmitlerin bulunduğu maya hücreleri, plazmit olmayan maya hücresi (GS 115) ile kıyaslanmış ve proteinlerin koruyucu etkisi bu spektrumlarda da gözlemlenmiştir.

Şekil 3.5.1. de görüldüğü gibi Hsp70 plazmit varlığında maya hücrelerinin yaklaşık 60 dereceye kadar direnç gösterdiği ancak bundan sonraki sıcaklıklarda ise direncini kaybettiği gözlemlenmiştir. Plazmit içermeyen maya hücresi (GS 115) ile Hsp70 plazmiti içeren maya hücreleri (Ssa1, Hsp70 ve Hsc70) kıyaslanarak ısı şok proteininin hücreye kattığı kararlılığın 60 dereceye kadar ulaşabildiği gözlemlenmiştir. Normal vücut sıcaklığı göz önünde bulundurulacak olur ise bu dayanıklılık oldukça önemlidir. Fizyolojik olarak bu sıcaklık hücre nekrozunun gerçekleştiği değerdir. Hsp70 proteinleri hücredeki proteinlerin fonksiyonunu bu sıcaklığa kadar koruyabilirler. Aşırı stresde Hsp70 mekanizması etkisini kaybeder.

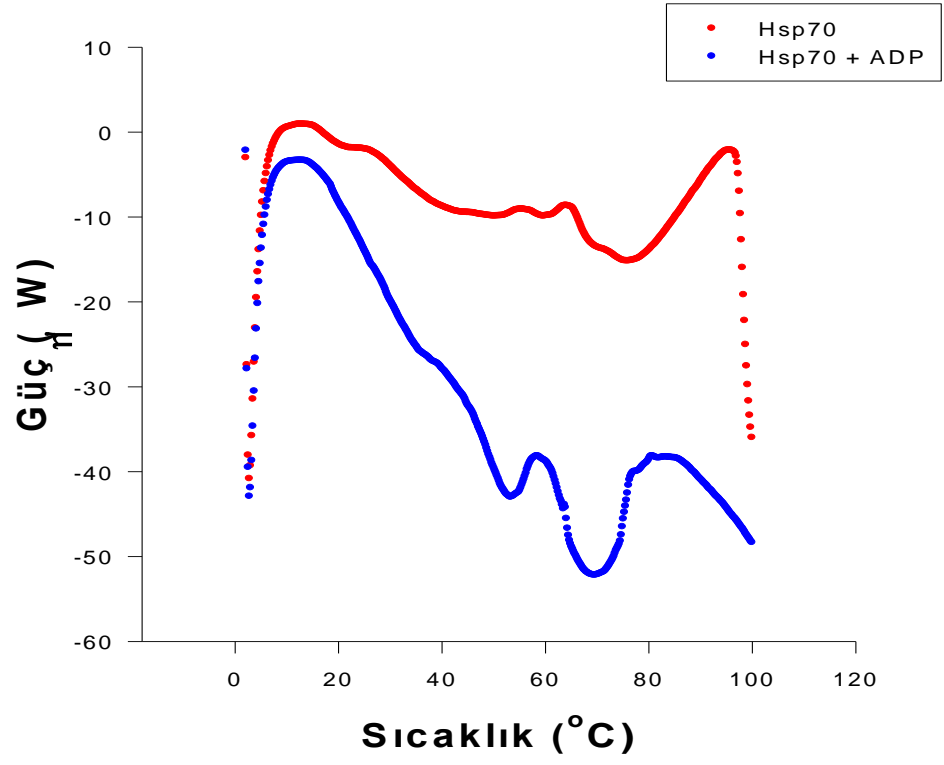
Saflaştırılmış Ssa1, Hsc70 ve Hsp70 proteinlerinin DSC kromatogramlarından üçünün de 60 dereceye kadar dayanıklılık gösterdiğini ve kararlılıklarının aynı olduğunu görüyoruz. Hücre ve protein deneyleri birbirleri ile örtüşmektedir (Şekil 3.5.1–4).



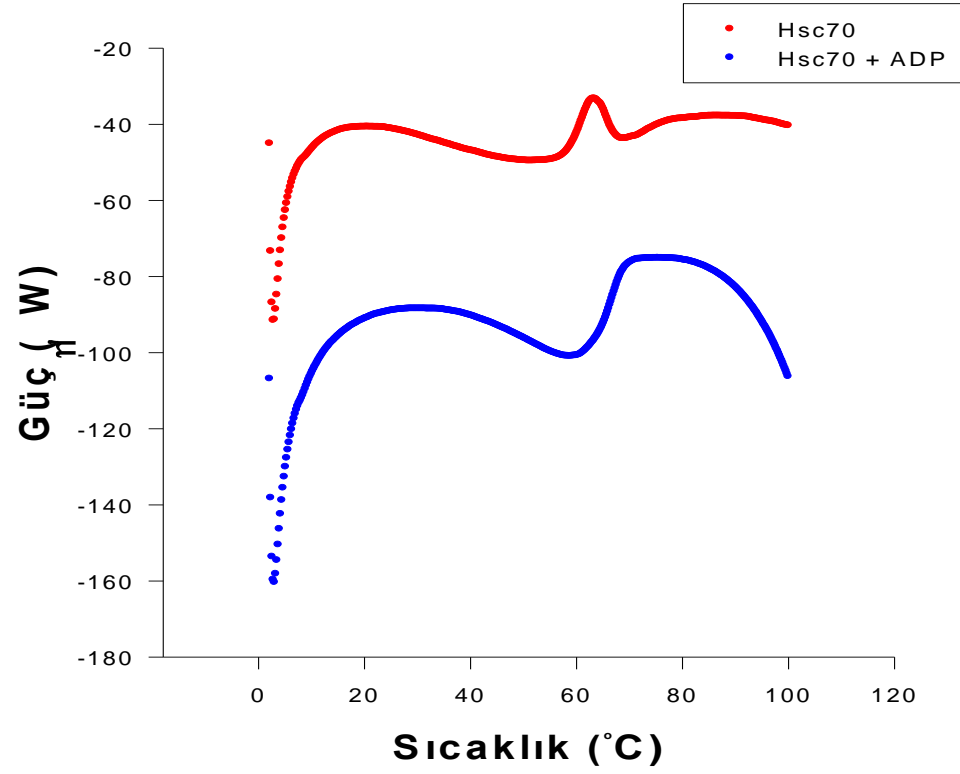
Şekil 3.5.1. Maya hücresine transforme edilen (genoma yerleştirilen) ısı şok proteinlerinin hücre kararlılığına etkisi.



Şekil 3.5.2. Ssa1 yapısının ADP yokluğunda ve varlığında DSC kromatogramları



Şekil 3.5.3. Hsp70 yapısının ADP yokluğunda ve varlığında DSC kromatogramları



Şekil 3.5.4. Hsc70 yapısının ADP yokluğunda ve varlığında DSC kromatogramları

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Proteinler organizmaların farklı fonksiyonları yerine getirmeleri için kullanılan yapılardır. Farklı organizmalar aynı fonksiyonu yerine getirebilmek için benzer yapıda proteinler kullanırlar. Proteinler fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için üç boyutlu yapılarını korumaları gerekmektedir. Hücre strese maruz kaldığı zaman proteinin üç boyutlu yapısı kısmi veya tamamen bozulur ve protein normal fonksiyonunu kısmen ya da tamamen yerine getiremez. Organizmalarda strese karşı koyma ve yapısı bozulan proteinlerin ortamdaki kaldırılması için ısı şok proteinleri kullanılmaktadır.

Isı şok proteinleri türler arasında korunmuştur ve amino asit dizileri karşılaştırıldığında dahi %60'dan daha fazla bir benzerlik göstermektedir. Bu amaçla maya ısı şok proteini Ssa1, maymun ısı şok proteinleri (S. Oedipus; the New World monkey cotton-top tamarin) Hsc70 ve Hsp70 ile biyokimyasal ve biyofiziksel yöntemler kullanılarak yapı-fonksiyon ilişkileri incelenmiştir. Bu proteinlerin amino asit dizileri %75 benzerlik göstermektedir. Maymun Hsc70 ve Hsp70 proteinleri sırasıyla normal ve stresli ortamda ifade edilirler.

Bu çalışma proteinlerin olası konformasyonel değişikliklerinin incelenmesi ile başlamıştır. Nükleotid varlığında proteinlerin floresans ışınları karşılaştırılmış ve konformasyonel değişikliğin ikincil yapıların değişiminden çok üç boyutlu yapıda globular olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuç FTIR deneyleri ile desteklenmiştir. Isı şok proteinlerindeki ATPaz ünitesi nükleotide bağlanması ile oluşan sinyal üniteler arası iletim kullanılarak substrat bağlanma ünitesine iletilmekte ve substratın katlanabileceği hidrofobik bir ortam oluşturulmaktadır. Kromoforların konformasyonel veya benzer bir etki ile sulu ortama çıkması ya da proteinin içine gömülmesi protein yüzeyindeki değişimi anlamak için önemli bir değişimdir. Bu amaçla yapılan söndürme deneyleri floresan ve FTIR deneylerini desteklemiştir. Kromoforlara nükleotid etkisi oldukça küçüktür. Dolayısı ile konformasyonel değişim proteinlerin yüzeyinden ziyade üniteler arası etkileşim teorisini desteklemektedir. Nükleotidler spektroskopik sinyale duyarlı olmalarına rağmen ATPaz ünitesinin içerisine girmeleri, sinyalin sadece proteinden kaynaklanmasını sağlamaktadır. Bu avantaja rağmen çözücü rahatsız edici metotlar (solvent

perturbation method) için bir dezavantaj oluşturmuştur. Bu sebeple farklı rahatsız edici kimyasallarla yapılan denemeler sinyalin büyük bir kısmının bu kimyasallardan gelmesi sonucunda gerçekleştirilememiştir.

Protein denaturasyon deneyleri nükleotid varlığında kırmızıya kayma oluşturması proteinlerin yapısındaki değişimi göstermektedir. Bu DSC deneyleri ile de gözlemlenmiş ve nükleotid varlığında proteinlerin on dereceye varan farklılıkta denature olduğu bulunmuştur. DSC deneylerindeki en büyük sorun çalışılan proteinlerin renature olamamasıdır. Dolayısı ile termodinamik veriler üre denaturasyon deneylerinden elde edilmiştir.

Rekombinant proteinler maya hücresinde ifade edilmiştir. Bu hücreler DSC ile analiz edilmiş ve bu hücrelerin ısıya karşı hücreye dayanıklılık verdiği gözlemlenmiştir.

Maymun ısı şok proteinleri ile maya ısı şok proteinleri arasındaki bu ilişki önemli bir soruyu gündeme getirmektedir. Isı şok proteinleri yapı-fonksiyon ilişkisi bu derece benzer ise niçin aynı organizmanın hatta aynı organelinde birden fazla tipte bulunmaktadır. Hsp70 proteinleri farklı makromoleküllerle etkileşerek farklı fonksiyonları yerine getirmektedir. Bu konuda laboratuvarımızda yapılmış ve yapılmakta olan çalışmalar vardır. Örneğin mayada Hsc70 proteini Hsp70 proteinine göre koşaperon Ydj1 ile daha kuvvetli etkileşmekte fakat Sis1 ile göreceli olarak daha az etkileşmektedir. Yine aynı şekilde mayadaki farklı prion türlerini farklı ısı şok komplekslerini çözmektedir.

Hsp70 plazmit varlığında maya hücrelerinin yaklaşık 60 dereceye kadar direnç gösterdiği ancak bundan sonraki sıcaklıklarda ise direncini kaybettiği gözlemlenmiştir. Plazmit içermeyen maya hücresi (GS 115) ile Hsp70 plazmiti içeren maya hücreleri (Ssa1, Hsp70 ve Hsc70) kıyaslanarak ısı şok proteininin hücreye kattığı kararlılığın 60 dereceye kadar ulaşabildiği gözlemlenmiştir. Normal vücut sıcaklığı göz önünde bulundurulacak olur ise bu dayanıklılık oldukça önemlidir. Fizyolojik olarak bu sıcaklık hücre nekrozunun gerçekleştiği değerdir. Hsp70 proteinleri hücredeki proteinlerin fonksiyonunu bu sıcaklığa kadar koruyabilirler. Aşırı stresde Hsp70 mekanizması etkisini kaybeder.

FTIR deneyleri proteinlerin ikincil yapılarında belirgin bir değişme olmadığını önermiştir. Yani konformasyonel değişimler globüler yapıda gözlemlenebilir. Söndürme deneyleri nükleotid varlığında derişim göstermemesi proteinlerin “rigid body movement” katı yüzey hareketi yaptığının bir göstergesidir. Nükleotidler hidroliz sonrası sinyali substrat bağlanma ünitesine iletmesi her üç proteinde de belirgin konformasyonel değişim göstermeden oluşmaktadır.

Isı şok proteinlerinin karmaşık fonksiyonlarının çözülmesi için Hsp70 proteinleri merkez alınmış ve biyokimyasal-biyofiziksel karakterizasyon bu çalışma ile başlatılmıştır. Bu çalışma, karmaşık protein-protein etkileşimlerine moleküler seviyede açıklık getirme açısından önem taşımaktadır. Laboratuvarımızda Hsp70 moleküllerinin diğer ısı şok proteinleri ile etkileşimi moleküler simülasyonlar ile desteklenerek yapılacaktır.

5. KAYNAKLAR

Axelsson, P.H., Bajzer, Z., Prendergast, F.C., Cottam, P.F., and Ho, C. (1991) *Biophys. J.* 60, 650-659

Baler, R., Welch, W. J. & Voellmy, R. (1992) Heat shock gene regulation by nascent polypeptides and denatured proteins: hsp70 as a potential auto regulatory factor, *J. Cell Biol.* 117, 1151-1159.

Bandekar, J. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1120, 123-143

Bardwell, J. C. A. & Craig, E. A. (1987) Eucaryotic *M*, 83000 heat shock protein has a homologue in *Escherichia coli*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 81, 848-852.

Banik, U., Saha R.j Mandal, N.C, Bhattacharyya, B., and Roy, S. (1992) *Eur. J. Biochem.* 206, 15-21

Barone, R., Briante, R., D'auria, S., Febbraio, F., Vaccaro, C., Guidice, L.D., Borelli, G.M., Fonzo, N.D., Nucini, R., 1990. Purification and Characterization of Lipoxygenase Enzyme from Durum Wheat Semolina. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47:1924-1931.

Beckmann, R. P., Mizzen, L. & Welch, W. (1990) Interaction of Hsp70 with newly synthesized proteins: Implications for protein folding and assembly, *Science* 248, 850-856.

Beechem, J.M. and Brand, L (1985) *Ann. Rev. Biochem.* 54, 43-71

Bertolini, M. C., Ernandes, J. R., and Laluece, C., 1991. New Yeast Strains for Alcoholic Fermentation at Higher Sugar Concentration. *Biotechnology Letters*. 13 (3), 197-202.

Bertsch, U., Soll, J., Seetharam, R. & Viitanen, P. V. (1992) Identification, characterization, and DNA sequence of a functional "double" groES-like chaperonin from chloroplasts of higher plants, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89, 8696-8700.

Blackman, R. K. & Meselson, M. (1986) Interspecific nucleotide sequence comparisons used to identify regulatory and structural features of the *Drosophila* hsp82 gene, *J. Mol. Biol.* 188, 499-515.

Blumberg, H. & Silver, P. A. (1991) A homologue of the bacterial heat-shock gene DnaJ that alters protein sorting in yeast, *Nature* 349, 627 – 630.

Bienz, M. & Pelham, H. R. B. (1987) Mechanisms of heat-shock gene activation in higher eucaryotes, *Adv. Genet.* 24, 31 -72.

Bochkareva, E. S., Lissin, N. M. & Girshovich, A. S. (1988) Transient association of newly synthesized unfolded proteins with the heat-shock GroEL protein, *Nature* 336, 254-257.

Bochkareva, E. S., Lissin, N. M., Flynn, G. C., Rothman, J. E. & Girshovich, A. S. (1992) Positive cooperativity in the functioning of molecular chaperone GroEL, *J. Biol. Chem.* 267, 6796–6800.

Bollag, D.M. And Edelstein, S.J. 1991. Protein Methods. Viley-Liss Press., USA, 180p.

Bole, D. G., Hendershot, L. M. & Kearney, J. F. (1986) Posttranslational association of immunoglobulin heavy chain binding protein with nascent heavy chains in nonsecreting and secreting hybridomas, *J. Cell Biol.* 102, 1558–1566.

Borkovich, K., Farrelly, F., Finkelstein, D., Taulien, J., and Lindquist, S., 1989. Hsp82 is an Essential Protein that is Required in Higher Concentrations for Growth of Cells at Higher Temperature. *Mol. Cell. Biol.*, 9: 3919-3930

Bork, P., Sander, C. & Valencia, A. (1992) An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat-shock proteins, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89,7290–7294.

Borkovich, K., Farrelly, F., Finkelstein, D., Taulien, J. & Lindquist, S. (1 989) hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperature, *Mol. Cell. Biol.* 9, 3910–3930.

Boorstein, W. R., Ziegelhoffer, T. & Craig, E. A. (1993) Molecular evolution of the HSP70 multigene family, *J. Mol. Evol.*, in the press.

Braell, W., Schlossman, D., Schmid, S. & Rothmann, J. (1984) Dissociation of clathrin coats coupled to the hydrolysis of ATP: role of an uncoating ATPase, *J. Cell. Biol.* 99, 734–741.

Bresnick, E., Dalman, F. C., Sanchez, E. R. & Pratt, W. B. (1989) Evidence that the 90-kDa heat shock protein is necessary for the steroid binding conformation of the L cell glucocorticoid receptor, *J. Biol. Chem.* 264,4992–4997.

Brodsky, J. L., Hamamoto, S., Feldheim, D. & Schekman, R. (1993) Reconstitution of protein translocation from solubilized yeast membranes reveals topologically distinct roles for BiP and cytosolic Hsc70, *J. Cell Biol.* 120, 95–102.

Brown, C. R., Martin, R. L., Hansen, W. J., Beckmann, R. P. & Welch, W. J. (1993) The constitutive and stress inducible forms of hsp70 exhibit functional similarities and interact with one another in an ATP-dependent fashion, *J. Cell Biol.* 120, 1101–1112.

Buchner, J., Schmidt, M., Fuchs, M., Jaenicke, R., Rudolph, R., Schmid, F. X. & Kiefhaber, T. (1991) GroE facilitates refolding of citrate synthase by suppressing aggregation, *Biochemistry* 30, 1586-1 591. Byler, D.M. and susi, H.(1986) *Biopolymers* 25, 469-487

Caplan, A. & Douglas, M. (1991) Characterization of *YDJ1*: A yeast homologue of the bacterial *dnaJ* protein, *J. Cell Biol.* 114, 609–621.

Carmona F.G.Gilabert M.P., 2002. Chromatographic analysis of lipoxygenase products. *Analytica Chimica Acta* 465:319-335.

Catherine N.S.P. Suurmeijer, Manuela Perez-Gilabert, Harry T.W.M. Van Der Hijden, Gerrit A. Veldink, Joannes F.G.Vliegenthart, 1998. Purification, Product Characterization and Kinetic Properties of Soluble Tomato Lipoxygenase. *Plant Physiol.Biochem.*, 36(9):657-663.

Chaffin, W.L., Ribot, J.L.L, Casanova, M., Gozabo, D., And Martinez, J.P., 1998. Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function and Expression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62 (1), 130-180.

Chappell, T. G., Welch, W. J., Schlossman, D. M., Palter, K. B., Schlesinger, M. J. & Rothman, J. E. (1986) Uncoating ATPase is a member of the 70 kilodalton family of stress proteins, *Cell* 45, 3-13.

Chappell, T. G., Konforti, B. B., Schmid, S. L. & Rothman, J. E. (1987) The ATPase core of a clathrin uncoating protein, *J. Biol. Chem.* 262,746–751.

Cheetham, M. E., Brion, J. P. & Anderton, B. H. (1992) Human homologues of the bacterial heat-shock protein DnaJ are preferentially expressed in neurons, *Biochem. J.* 284, 469–476.

Chernoff YO, Lindquist SL, Ono B, Inge-Vechtomov SG, Liebman SW. Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi+]. *Science*. 1995 268(5212):880–4.

Cheng, M. Y., Hartl, F. U., Martin, J., Pollock, R. A., Kalousek, F., Neupert, W., Hallberg, E. M., Hallberg, R. L. & Horwich, A. L. (1989) Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria, *Nature* 337, 620-625.

Chiang, H.-L. & Dice, J. F. (1988) Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal, *J. Biol. Chem.* 263, 6797–6805.

Chiang, H.-L., Terlecky, S. R., Plant, C. P. & Dice, J. F. (1989) A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins, *Science* 246, 382-385.

Chiang, H. L. & Schekman, R. (1991) Regulated import and degradation of a cytosolic protein in the yeast vacuole, *Nature* 50, 313–318.

Chirico, W., Waters, M. G. & Blobel, G. (1988) 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes, *Nature* 332, 805-810.

Chadli A, Ladjimi MM, Baulieu EE, Catelli MG. Heat-induced oligomerization of the molecular chaperone HSP70.

Christopher, J., Pistorius, E., Axelrod, B., 1970. Isolation Of An Isozyme Of Soybean Lipoygenase. *Biochim. Biophys. Acta* 198:12-19.

Clark JI, Muchowski PJ. Small heat shock proteins and their potential role human disease. *Curr Opin Biol* 2000

C.Reid ‘Excited states in Chemistry and Biology ‘ Butterworth,London,1957

Dalman, F. C., Bresnick, E. H., Patel, P. D., Perdew, G. H., Watson, S. Jr & Pratt, W. B. (1989) Direct evidence that the glucocorticoid receptor binds to hsp90 at or near the termination of Receptor translation *in vitro*, *J. Biol. Chem.* 264, 19815–19821.

De Maio A. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock* 1999 ; Clark JI.

D’amore, T., Celotto, G., Russell, I., And Stewart, G.G., 1989. Selection and Optimization of Yeast Suitable for Ethanol Production at 40 °C. *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 411-416.

DeLuca-Flaherty, C., McKdy, B. B., Parham, P. & Hill, B. L. (1990) Uncoating Protein (hsc70) binds a conformationally labile domain of clathrin light chain LCa to stimulate ATP hydrolysis, *Cell* 62, 875-887.

Deshaies, R., Koch, B., Werner-Washburne, M., Craig, E. & Schekman, R. (1988) A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides, *Nature* 332, 800-805.

Deshaies, R., Sanders, S., Feldheim, D. & Schekman, R. (1991) Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex, *Nature* 349, 806-808.

Ellis, R. J., van der Vies, S. M. & Hemmingsen, S. M. (1989) The molecular chaperone concept, *Biochem. SOC. Symp.* 55, 145–153.

Garvey, E.P. and Matthews, C.R. (1989) *Biochemistry* 28, 2083

Gokhale KC, Newnam GP, Sherman MY, Chernoff YO. Modulation of prion-dependent polyglutamine aggregation and toxicity by chaperone proteins in the yeast model. *J Biol Chem.* 2005 280(24):22809–18.

Guthrie, C., Fink, G.R., 1991. *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology.* Academic Press, Inc. San Diego, California, 933p.

Hall, B. G., 1983. Yeast Thermotolerance Does Not Require Protein Synthesis. *Journal of Bacteriology*, 156 (3), 1363–1365.

H.C Longuet-Higgins and J.A.Pople, *J.Chem.Phys.*27, 192(1957)

Haris, P.J. and Chapman, D.(1992) *Trends biochem. Sci.*17, 328–333

Hashimoto, M. And Arakawa, S.(1967) *Bull. Chem. Soc. Japan* 40, 1698-1701

Harris, D.L. and Hudson, B.S.(1990) *Biochemistry* 29,5275–5284

Ida, H., and Yahara, I., 1984. Durable Synthesis Of High Molecular Weight Heat-Shock Proteins in GO Cells of the Yeast and Other Eucaryotes. *J. Cell Biol.*, 99, 199-207.

J.W. Donovan, M. Laskowski, Jr., and H. A. Scheraga, *J. Am. Chem. Soc.* 83, 2686 (1961)

James, D.R., Demmer, D.R., Steer, R.P., and Verrall, R.e (1985) *Biochemistry* 24, 5517-5526

Jones G, Song Y, Chung S, Masison DC. Propagation of *Saccharomyces cerevisiae* [PSI⁺] prion is impaired by factors that regulate Hsp70 substrate binding. *Mol Cell Biol.* 2004 24(9):3928–37.

Jones GW, Masison DC. *Saccharomyces cerevisiae* Hsp70 mutations affect [PSI⁺] prion propagation and cell growth differently and implicate Hsp40 and tetra-tricopeptide repeat cochaperones in impairment of [PSI⁺]. *Genetics.* 2003

Kaiser, C., Michaelis, S., Mitchell, A., 1994. *Methods in Yeast Genetics.* Cold Spring Harbor-Laboratory Press, New York, 234p

Keskin, H., 1982. *Besin Kimyası.* İstanbul Üniversitesi Kimya Fak., 4. Baskı, Cilt 2, İstanbul, 558s.

Krimm,S.(1987) *Vib.Spectra Struct.*16,1-72

Kryndushkin DS, Alexandrov IM, Ter-Avanesyan MD, Kushnirov VV. Yeast [PSI⁺] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104. *J Biol Chem.* 2003 278(49):49636–43.

Korber P, Stahl JM, Nierhaus KH. A ribosome associated heat shock protein. *EMBO J* 2000 163(2):495–506.

Laluce, C., Abud, C.L., Greenhalf, W., And Sanches, P.M.F., 1993. Thermotolerance Behavior in Sugar Cane Syrup Fermentations of Wild Type Yeast Strains Selected Under Pressures of Temperature, High Sugar and Added Ethanol. *Biotechnology Letters,* 15 (6), 609–614.

Lee, B.H., 1996. *Fundamentals of Food Biotechnology,* VCH Publishers, USA, 431p.

Lu Z, Cyr DM. Protein folding activity of Hsp70 is modified differentially by the hsp40 co-chaperones Sis1 and Ydj1. *J Biol Chem.* 1998 273(43):27824-30.

Mager, W. H., And Moradas-Ferreira, P. 1993. Stress Response of Yeast. *Biochem. J.,* 290, 1-13

Mantsch,H.,H., Perczel,A., Hollosi, M., and Fasman, G.D. (1993) *Biopolymers* 33, 201-207

Mann, C.J.Rayer, C.A., and malthews, C.R.(1993) *Prot. Sci.*2, 1853–1861

Masison DC. Cell biology: designer prions. *Nature.* 2004 429(6987):37–8

Mayer MP, Schroder H, Rudiger S, Paal K, Laufen T, Bukau B. Multistep mechanism of substrate binding determines chaperone activity of Hsp70. *Nat Struct Biol.* 2000 (7):586–93.

Middaugh, C. R. Thomson, J. A., Burke, C.J., Mach, H., Naylor, A. M., Bogusky, M.J., Ryan,J.A., Pitzenberger, S.M., Ji,H., and Cordingley, J.S. (1993) *Prot.sci.*2, 900-207

Middaugh, C.r., Mach, h., Burke, C.J., Volkin, D.B., dabara,J.M., Tsai,P.K., Bruner, M.W., Ryan,J.A., and Marfia,K.E.(1992) *Biochemistry* 29, 9185-9193

Molto,K.Inuzuka, and s. Imanishi, *j.am.Chem.soc.*82, 1317(1960)

Prestelski,S.J., Byler, D.M., and iebman,M.N.(1991) *Biochemistry* 30,133-143

Rudiger S, Mayer MP, Schneider-Mergener J, Bukau B. Modulation of substrate specificity of the DnaK chaperone by alteration of a hydrophobic arch. *J Mol Biol.* 2000 304(3):245-51.

Shorter J, Lindquist S. Hsp104 catalyzes formation and elimination of self-replicating Sup35 prion conformers. *Science.* 2004 304(5678):1793–7.

Song Y, Wu YX, Jung G, Tutar Y, Eisenberg E, Greene LE, Masison DC. Role for Hsp70 chaperone in *Saccharomyces cerevisiae* prion seed replication. *Eukaryot Cell.* 2005:289–97.

Spencer, J.F.T., And Spencer, D.M., 1983. Genetic Improvement of Industrial Yeasts, *Ann. Rev. Microbiol*, 37, 121–142.

Szabo, A.G., Stepanik, T.M., Wayner, D.M., and Young, N.m. (1985) *Biophys.J.*41,233-244

Tutar Y, Song Y, Masison DC. Primate chaperones Hsc70 (constitutive) and Hsp70 (induced) differ functionally in supporting growth and prion propagation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 2006 Feb;172(2):851–61.

Tutar Y Heat shock proteins, substrate specificity and modulation of function. *Protein Pept Lett.* 2006;13(7):699–705.

Tutar Y Key residues involved in Hsp70 regulatory activity and affect of co-chaperones on mechanism of action. *Protein Pept Lett.* 2006;13(7):693-8.

Tutar Y., 2003 Structure function studies with the cAMP Receptor Protein of *E. Coli*. Lubbock, TX., Doktora tezi.

Ungewickell, E. (1985) The 70 KD mammalian heat-shock proteins are structurally and functionally related to the uncoating protein that releases clathrin triskelions from coated vesicles, *EMBO J.* 4, 3385–3391.

Ursic, D. & Ganetzky, B. (1988) A *Drosophila melanogaster* gene encodes a protein homologous to the mouse t complex polypeptide 1, *Gene* 68, 267-274.

Werner-Washburne, M., Stone, D. E. & Craig, E. A. (1987) Complex interactions among members of an essential subfamily of hsp70 genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 7, 2568–2577.

Werner-Washburne, M., Becker, J., Kosics-Smithers, J. & Craig, E. A. (1989) Yeast Hsp70 RNA levels change in response to the physiological status of the cell, *J. Bacteriol.* 171, 2680–2688.

Wickner, S., Hoskins, J. & McKenney, K. (1991) Monomerization of RepA dimers by heat-shock proteins activates binding to DNA replication origin, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 7903–7907.

Wickner, S., Skowyra, D., Hoskins, J. & McKenney, K. (1992) DnaJ, DnaK, and GrpE heat-shock proteins are required in oriPl DNA replication solely at the RepA monomerization step, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89, 10345–10349.

Wilhelmsson, A., Cuthill, S., Denis, M., Wikstrijm, A. C., Gustafsson, J. A. & Poellinger, L. (1990) The specific DNA binding activity of the dioxin receptor is modulated by the 90 kd heatshock protein, *EMBO J.* 9, 69-76.

Willison, K. R., Dudley, K. & Potter, J. (1986) Molecular cloning and sequence analysis of a haploid expressed gene encoding t complex polypeptide 1, *Cell* 44, 727-738.

Zhong, T. & Arndt, K. T. (1993) The yeast SIS1 protein, a *dnaJ* homologue, is required for the initiation of translation, *Cell* 73, 1175 – 1186.

Zimmerman, R., Sagstetter, M., Lewis, M. J. & Pelham, H. R. B. (1988) Seventy-kilodalton heat-shock proteins and an additional component from reticulocyte lysate stimulate import of MI3 procoat protein into microsomes, *EMBO J.* 7, 2875-2880.

Yunus.hacettepe.edu.tr/~sozeri/prion/1.htm
http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/full_text-tr_1706.html
<http://www.genomicsproteomics.com/>
www.forumakademi.org
<http://www.ekimya.com/article.php?artid=92&action=part1>
<http://www.geneclinics.org/query?dz=xp>
<http://www.odevbul.net>
<http://www.biochem.wisc.edu/craig>
<http://www-personal.umich.edu/~zuidewe/>
<http://pps98.man.poznan.pl/assignments/projects/mak/action.htm>
http://mayoresearch.mayo.edu/mayo/research/hutton_lab/hsp70.cfm

6. ÖZGEÇMİŞ

30.05.1984 yılında Sivas'ta doğmuştur. İlk, orta ve lise öğrenimini Sivas'ta tamamladıktan sonra 2001 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü kazanmıştır. Bu bölümden 2006 yılında mezun olmuştur. Aynı yıl Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Biyokimya Ana Bilim Dalında yüksek lisans yapmaya başlamıştır ve halen devam etmektedir.