



TC
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN FAKÜLTESİ
BİYOMÜHENDİSLİK BÖLÜMÜ

***Toxoplasma Gondii*'den HSP70'in İZOLASYONU**

ve

BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

DANIŞMAN

Doç. Dr. YUSUF TUTAR

HAZIRLAYAN

SAHİL DİLMEÇ

2010FEY075

SİVAS

2013

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. SEMA SALGIN _____

Üye: Doç. Dr. UĞUR SALGIN _____

Üye (Danışman): Doç. Dr. YUSUF TUTAR _____

ONAY

Bu tez çalışması 27/12/2012 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mustafa DEĞİRMENCİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24.09.2008 tarihli ve 009 sayılı toplantısında kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

ÖZET

TOXOPLASMA GONDII'DEN HSP70'İN İZOLASYONU ve BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU SAHİL DİLMEÇ

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Yusuf Tutar

2013, 85 sayfa

Miktarı genellikle stres altında artan ve moleküler şaperon olarak da adlandırılan proteinlere ısı şok proteinleri ya da Hsp (heat shock protein) denir. Isı şok proteinleri yeni sentezlenen proteinlerin doğru katlanmasını, membranlar arası protein translokasyonunu, proteinlerin agregasyonunun önlenmesini ve zarar görmüş proteinlerin degradasyon için hedeflenmesini sağlarlar. Organizmalar arasında yüksek oranda korunmuşlardır. Hsp'ler molekül ağırlıklarına göre adlandırılırlar ve hücrel strese yanıtta Hsp70 biyokimyasal mekanizmanın kalbidir.

Toxoplasma gondii insanlarda ve hayvanlarda yaygın parazitik enfeksiyonlara sebep olan bir canlıdır. Parazit ve konakçı etkileşimleri sırasında konakçı strese girmekte ve bu stresle baş edebilmek için kendi Hsp'lerini kullanmaktadır. TgHsp70 konakçı-parazit ilişkisi sırasında çok önemlidir. TgHsp70'in özelliklerinin bilinmesi, bu parazitin fonksiyonelliğinin azaltılması ve konakçının immun sistemini modifiye etmek açısından önemlidir.

Yaptığımız çalışmada *T.gondii* veri tabanından yararlanarak ve moleküler biyoloji teknikleri ile tgHsp70 rekombinant proteini elde edildi ve elde edilen tgHsp70 proteini saflaştırılarak, tgHsp70'in fonksiyonunu belirlemeye yönelik, hidrofobik özellikleri, farklı nükleotidler ve peptitler varlığında davranışları, farklı pH ve sıcaklıktaki çözünürlüğü, Gibbs serbest enerjisinin belirlenmesi, ATP hidrolizi ve sıcaklık stresi altında diğer Hsp'ler ile etkileşimi incelendi. Bu çalışmanın sonunda nükleotid bağlanmasının TgHsp70 proteininin ikincil yapısında fazla bir değişime sebep olmadığı, ayrıca sinyal iletiminin proteinlerin katı cisim hareketi yaptıklarından dolayı, yüzeylerinden ziyade üniteler arası etkileşimlerle gerçekleştiği bulundu.

Anahtar kelimeler: Isı şok proteini (Hsp), *Toxoplasma gondii*, TgHsp70

ABSTRACT

INSULATION OF HSP70 FROM *TOXOPLASMA GONDII* AND ITS BIOCHEMICAL CHARECTERIZATION

Sahil DİLMEÇ

Master of Science Thesis, Depatment of Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Yusuf Tutar

2013, 85 pages

Proteins whose amount augement by stress and which are called molecular chaperons are Heat Shock Preteins (HSP). Heat shock proteins facilitate the proper folding of the newly synthesized proteins, the transmembrane protein translocation, the inhibition of the aggregation of the proteins and the targeting the damaged proteins for degradation. They are highly protected among the organisms. Chaperons are named in terms of their molecular weight and Hsp70 is at the core of folding mechanism in response to cellular stress.

Toxoplasma Gondii is an organism which causes prevalent parasitic infections both in human beings and animals. During the interaction of host and parasite it is exposed to stress and to cope with the that it uses its own heat and shock proteins. During the relationship of host-parasite TgHsp70 is highly important. Knowing the features of TgHsp70 is important in terms of decreasing the affects of this parasite and modifying the immune system of the host.

In our study by utilizing from the *T. gondii* data base we obtained TgHsp70 recombinant protein, through purifying this, the features to specify the functions of TgHsp70: hydrophobic features, behaviour in the existence of different nucleotids and peptides, solubility in different pH and heat, specifying the free energy of Gibbs, under heat stress such as ATP hydrolysis were examined. This study leads us to conclude that nucleotide birding did not cause significant secondary structure change in TgHsp70 structure, rather this signal transduction causes rigid body movement, as a result the interactions occur between subunits of the protein.

Keywords: Heat Shock Proteins (HSP), *Toxoplasma gondii*, TgHsp70

TEŞEKKÜR

Çalışmam boyunca bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, emeğini esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. Yusuf TUTAR'a teşekkür ederim. Beni her zaman destekleyen sevgili babam Ahmet Yılmaz'a, annem Hatice Yılmaz'a, eşim Erdiñ Dilmeç'e yanımda oldukları için teşekkür ederim. Ayrıca çalışmalarım da bana yardımları dokunan çalışma arkadaşlarım Aykut Özgür ve Kübra Coşkun'a, CUTFAM'da ki çalışmalarım da beni her zaman destekleyen arkadaşlarım Meral Yılmaz'a, Nevin Çetin Tuzcu'ya ve Gülderen Karakuş'a da desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	2
2.1.1 <i>Toxoplasma gondii</i> 'nin Sınıflandırması	3
2.1.2 <i>T. Gondii</i> 'nin Bulaşma Yolları	3
2.1.3 <i>Toxoplasma Gondii</i> 'nin İnfektif Evreleri	4
2.1.3.1 Trofozoitler (Takizoitler-Endozoitler)	4
2.1.3.2 Bradizoitler.....	5
2.1.3.3 Ookistler.....	6
2.1.4 <i>Toxoplasma Gondii</i> 'nin Genomu	7
2.1.5 <i>T. Gondii</i> Organeller.....	8
2.1.6 Epidemiyoloji	9
2.1.7 <i>Toxoplasma Gondii</i> 'de Isı Şok Proteinlerinin Araştırılmasının Gerekliliği.....	10
2.2 Isı Şok Proteinleri.....	12
2.2.1 Protein katlanmaları.....	12
2.2.2 Isı Şok Proteinlerinin Yapı ve Görevleri	13
2.2.3 Isı Şok Proteinlerinin Artışına Sebep Olan Faktörler	16
2.2.4 Isı Şok Proteinlerinin Hücre Dışındaki Görevleri	16
2.2.5 Isı Şok Proteinleri ve Bağışıklık	17
2.2.6 Önemli Hsp Aileleri.....	17

2.2.6.1 Hsp40 Ailesi.....	18
2.2.6.2 Hsp60 Ailesi.....	19
2.2.6.3 Hsp90	20
2.2.6.4 Hsp100 Ailesi.....	22
2.2.6.5 Küçük Hsp'ler	22
2.2.6.6 Hsp70 Ailesi.....	22
2.2.6.6.1 Hsp70'in Domain Yapısı	23
2.2.7 Hip, Hop ve CHIP	27
2.2.8 Prionlar	28
2.2.9 Hsp70 – Kanser - Apoptozis.....	29
2.3 Protein Saflaştırma	30
2.3.1 Kromatografi	31
2.3.2 Elektroforez	31
2.3.2.1 SDS-Gel Elektroforezi	32
2.3.3 Floresan Spektroskopisi.....	33
2.3.4 FTIR ve Protein Uygulamaları	38
2.3.4.1 Kromoforlar.....	38
3. AMAÇ.....	41
4. MATERYAL-METOD	43
4.1 Deneylerin Yapıldığı Yer ve Tarih	43
4.2 Kullanılan Malzemeler.....	43
4.3 Kullanılan Cihazlar	43
4.4 <i>Toxoplasma Gondii</i> Suşunun Eldesi	43
4.5 <i>T. Gondii</i> 'den Total RNA Eldesi	44
4.6 cDNA Sentezi.....	45
4.7 Primer Dizaynı	47

4.8 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	47
4.9 Amplifiye Edilen DNA'nın Tespiti.....	51
4.10 Çoğaltılan DNA'nın pET 161 Ekspresyon Vektörüne Aktarımı	51
4.11 Ekspresyon Vektörünün Kompedan <i>E.coli</i> Hücrelerine Aktarımı.....	53
4.12 LB Besiyeri ve Plate Hazırlanması	53
4.13 Protein Saflaştırılması ve Yapı Tayinleri.....	54
4.13.1 Küçük ve Büyük Hacimde Kültür Hazırlanması	54
4.13.2 Hücrelerin Parçalanması	55
4.13.3 SDS PAGE Analizi.....	55
Jelin hazırlanması:.....	55
Proteinlerin jel üzerinde görünür hale gelmesi-jelin boyanması:	56
4.13.4 Hücrelerin Parçalanması	57
4.13.5 Hsp70 Proteininin Saflaştırılması	57
4.13.6 Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) ile <i>T. gondii</i> Hsp70'inin Yapı Analizi	58
4.13.7 TgHsp70 Proteinlerinin Florimetre Spektroskopisi ile Denetürasyon Deneyleri	58
4.13.8 Söndürme (Quenching).....	59
4.13.9 Lusiferaz Katlanma ve Termal Agregasyon Deneyleri	59
5. BULGULAR.....	61
5.1 TgHsp70 Proteininin Klonlama Çalışmaları ve Saflaştırılması	61
5.2 TgHsp70 Proteininin Diğer Türlerle Karşılaştırılması.....	64
5.3 TgHsp70 FTIR Deneyleri	67
5.4 Denaturasyon.....	69
5.5 Floresan Deneyleri	70
5.6 Söndürme	72

5.7 Agregasyon	73
5.8 TgHsp70 fonksiyon tayini-I	73
5.9 Hsp70 ve Hsp40'ların Fonksiyon Tayini-II	75
6. TARTIŞMA ve SONUÇ	76
7. KAYNAKLAR	78
ÖZGEÇMİŞ	85

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	2
Şekil 2.2 <i>T. gondii</i> hayat döngüsü	4
Şekil 2.3 Endodiyojeni ile takizoitlerin çoğalması	5
Şekil 2.4 <i>T.gondii</i> takizoitinde organeller	8
Şekil 2.5 Parazitin konak hücredeki protein trafiği	9
Şekil 2.6 Protein katlanması	12
Şekil 2.7 Proteinlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıları	13
Şekil 2.8 Stres cevabında ısı şok proteinleri (Hsp) ve şaperon ağı	15
Şekil 2.9 Hsp40'ın J domaini sayesinde Hsp70'e substratı sunması	19
Şekil 2.10 Hsp60'ın prokaryotlarda Hsp10 ile protein katlama mekanizması	20
Şekil 2.11 Hsp70 / Hsp90 substrat döngüsü	21
Şekil 2.12 Hsp70 şaperonunun yapısı ve onunla etkileşime giren koşaperon ve substratlar.	25
Şekil 2.13 Hsp40'ın Hsp70'e substratı sunması	27
Şekil 2.14 Proteindeki triptofan kromofor	34
Şekil 2.15 Hsp70'in üre ile denaturasyon eğrisi	37
Şekil 4.1 cDNA sentezi	46
Şekil 4.2 PCR stratejisi	49
Şekil 4.3 Topoizomeraz'ın çalışma prensibi	52
Şekil 4.4 pET 161 vektör haritası	52
Şekil 5.1 TgHsp70 RH suşu dizisi	62
Şekil 5.2 Hsp70 primerleri	63
Şekil 5.3 Hsp70 agaroz jel görüntüsü	63
Şekil 5.4 TgHsp70 SDS-PAGE jel görüntüsü	64

Şekil 5.5 TgHsp70'in diğer türlerdeki homologları ile karşılaştırılması	66
Şekil 5.6 Hsp70 proteininin (AYK1) modelleme ile bulunan üçüncül yapısı	67
Şekil 5.7 Hsp70-Ayk1'in apo, ADP ve ATP varlığında FTIR spektrumları	69
Şekil 5.8 TgHsp70 denaturasyon eğrisi	70
Şekil 5.9 TgHsp70 proteininin ADP varlığındaki (300-500 nm dalga boyunda) floresan spektrumu	71
Şekil 5.10 TgHsp70 yapısının ADP yokluğuna ve varlığında söndürme deneyleri.	72
Şekil 5.11 TgHsp70 agregasyon deneyi.....	73
Şekil 5.12 Lusiferaz çalışma prensibi	74
Şekil 5.13 Kimyasal olarak denature olmuş Lüsiferazın farklı koşullarda tekrar katlanması ve Hsp40 ile Hsp70 proteinlerinin ATP içeren ortamda lüsiferazı tekrar katlaması.....	74
Şekil 5.14 Farklı ortamlarda ATP hidrolizi.....	76

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Dünyada ve ülkemizde toxoplasma prevelansı.....	10
Çizelge 2.2 Isı şok proteinlerini artıran sebepler	16
Çizelge 2.3 Önemli Hsp aileleri	18
Çizelge 4.1 PCR karışımları.....	50
Çizelge 4.2 Klonlama protokolü.....	53
Çizelge 4.3 Jellerin hazırlanması.....	56

KISALTMALAR DİZİNİ

ClpB	: <i>Escherichia coli</i> Hsp104 analogu
DEAE	: Dietilaminoetil
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DnaJ	: <i>Escherichia coli</i> Hsp40 analogu
DnaK	: <i>Escherichia coli</i> Hsp70 analogu
DTT	: Ditiotireitol
<i>E.Coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
FTIR	: Fourier dönüşümü infrared spektroskopisi
GroEL	: Ökaryot Hsp60 yapısının bakteri homologu
GroES	: Ökaryot Hsp10 yapısının bakteri homologu
GrpE	: Nükleotit değişim faktörü
HCl	: Hidroklorik asit
Hsp27	: Isı şok protein 27
Hsp40	: Isı şok protein 40
Hsp60	: Isı şok protein 60
Hsp70	: Isı şok protein 70
Hsp104	: Isı şok protein 104
IR	: Infrared spektroskopisi
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-vis	: Ultraviyole-görünür bölge spektroskopisi

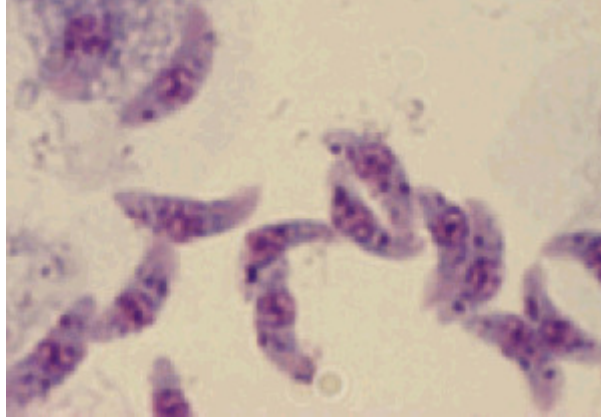
1. GİRİŞ

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) tüm dünyada yaygın olarak bulunan zorunlu hücre içi parazit olup, insanları, kuşları ve memeli canlıları enfekte eder ve toxoplasmosis denen rahatsızlığa sebep olur [1]. Bu enfeksiyon, bağışıklık sistemi sağlam olanlarda primer ve kronik enfeksiyon şeklinde ve genelde belirtisiz seyreder. Bağışıklık yetmezliği gösteren konaklarda ölümcül olabilmekte ve ansefalit (beyin dokusu yangını), hamilelerde fetüste koriyoid ve retina tabakalarının iltihabı ile sonuçlanabilir. Günümüzde AIDS hastalığının yaygınlaşması, organ nakillerinin artması *T. gondii*'nin önemini artırmıştır [2]. Proteinler organizmaların metabolik fonksiyonlarını yerine getirebilmek için gerekli yapılardır. Fakat bu fonksiyonları yerine getirebilmeleri için üç boyutlu yapılarına katlanmaları ve bu yapıyı korumaları gerekir. Sitozoldeki moleküler kalabalık, enfeksiyonlar ya da başka faktörlerin etkisi ile hücresel stres meydana gelir ve bu proteinlerin katlanma prosesini güçlendirir. Isı şok proteinleri yeni sentezlenen proteinlerin doğru katlanmasını, membranlar arası protein translokasyonunu, protein agregasyonunun önlenmesini, zarar görmüş proteinlerin degradasyon için hedeflenmesini sağlarlar. Toxoplasmosis gibi enfeksiyon durumunda hücresel stres oluşur ve bu durum hem yeni oluşan proteinlerin katlanmasını hem de var olan proteinlerin üç boyutlu yapılarını korumalarını olumsuz etkiler. Katlama mekanizmasının kalbi olan Hsp70'in biyokimyasal karakterizasyonu, hem toxoplasmosis hem de diğer hücresel stres durumunda, hücrelerdeki proteinlerin korunmasını dolayısıyla canlılığın sürdürülebilmesini sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 *Toxoplasma gondii*

T. gondii zorunlu hücre içi parazit olup, ilk kez 1908 yılında Tunus Pastör Enstitüsünde C. Nicole ve L. Mancaeaux tarafından, Kuzey Afrika da yaşayan *Citenodactylus gundii*'den izole edilmiştir. Türkiye de ilk kez 1950 yılında Akçay ve arkadaşları tarafından bir köpekte belirlenmiştir. Tüm dünyada yaygın olan, insanları, memelileri ve kuşları enfekte eden Apicomplexa üyesi bir parazittir. Yay şeklinde olduğu için Porez tarafından Toxoplasma olarak adlandırılmıştır. Bugüne kadar 25 alt tipi bulunmuş olup, bunlar arasında önemli bir fark bulunmadığı, parazitin konağın türüne ve tuttuğu organa göre biraz şekil değiştirdiği anlaşılmıştır [1, 2].



Şekil 2.1 *Toxoplasma gondii* [3]

T. gondii toxoplasmosis adı verilen enfeksiyona sebep olur. Bu enfeksiyon, bağışıklık sistemi sağlam olanlarda, primer ve kronik enfeksiyon şeklinde ve genelde belirtisiz seyreder, bağışıklık yetmezliği gösteren konaklarda ölümcül olabilmektedir, ansefalit (beyin dokusu yangını), hamilelerde fetüste koriyoid ve retina tabakalarının iltihabı ile sonuçlanabilir [4]. İnfecte gebeden fetüse transplasental yolla geçerek, abortus ve anomalili fetüs oluşumuyla sonuçlanan klinik tablolara sebep olur. Bu

hastalık retiküloendotel sisteme ait organlarda, kas, göz ve beyin dokusu başta olmak üzere birçok dokuda kistler oluşturur veya akut enfeksiyon tablolarıyla kendisini gösterir [1,2,4].

2.1.1 *Toxoplasma gondii*'nin Sınıflandırması

T. gondii'nin sınıflandırılması şu şekildedir: [1]

Alem: Protista

Şube : Apicomplexa

Sınıf: Conoidasida

Alt sınıf: Coccidia

Takım: Eucoccidiorida

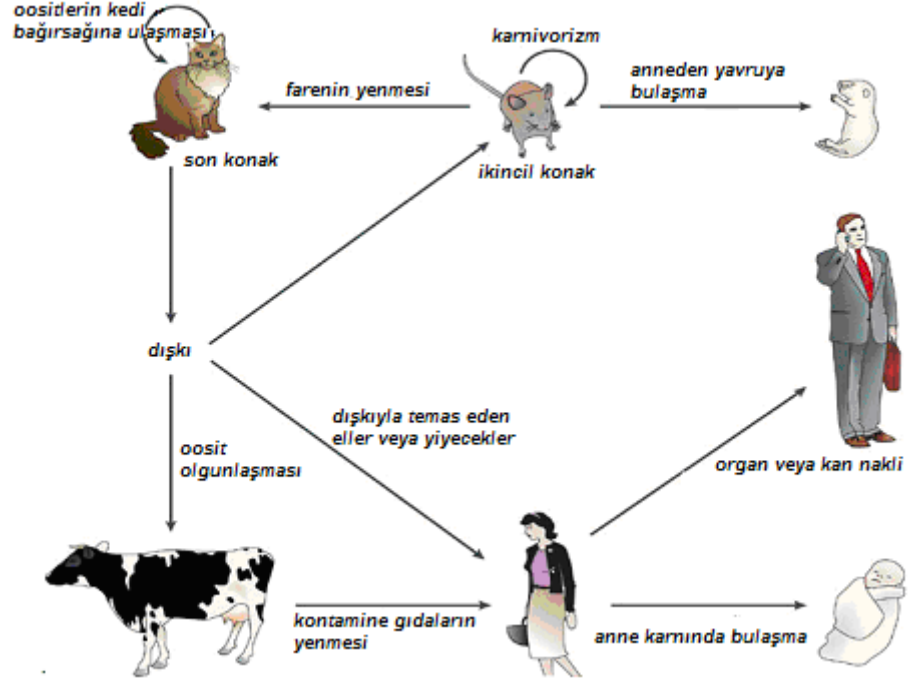
Aile: Sarcocystidae

Cins: Toxoplasma

Tür: *Toxoplasma gondii*

2.1.2 *T. Gondii*'nin Bulaşma Yolları

T. gondii üreme zincirini kedilerde ve kedigillerde sürdürebilir. Parazit taşıyıcı ilişkisinde son konak kedidir. Bu hayat döngüsü paraziti taşıyan bir kemirgenin kedi tarafından yenmesiyle başlar. Parazit kedilerin sindirim sisteminde gelişerek, kedi dışkısı yoluyla çevreye dağılır [5]. Diğer sıcakkanlı canlılara ağız yolundan alındığında bulaşır. Kedi dışkısının bulaştığı otlarla beslenen otçul hayvanların etlerinin çiğ veya az pişmiş olarak yenmesi, parazit içeren suyun içilmesi, kedi dışkısı bulaşmış toprakla temastan sonra ellerin iyi yıkanmaması veya yine kedi dışkısının temas ettiği meyve ve sebzelerin iyi yıkanmadan yenmesiyle insana geçer. Normalde insandan insana bulaşabilen bir parazit değildir. Ancak seronegatif gebe bir kadın, hamilelik sırasında enfeksiyon etkenini alırsa, konjenital yolla bebeğe geçmektedir. Ayrıca organ nakli ve kan nakli yoluyla da insandan insana geçtiği bilinmektedir. Bu parazit üzerinde çalışan laboratuvar görevlilerine de kontamine iğne yoluyla da bulaşmaktadır [1, 4, 6].



Şekil 2.2 *T. gondii* hayat döngüsü [7]

2.1.3 *Toxoplasma Gondii*'nin İnfektif Evreleri

Bu parazitin yaşam döngüsüne bakıldığında 3 infektif evresinin olduğu görülmektedir:

Trofozoit (takizoit, endozoit); hızlı çoğalan form (hastalığın akut fazında enfeksiyonun yayılmasından sorumludur)

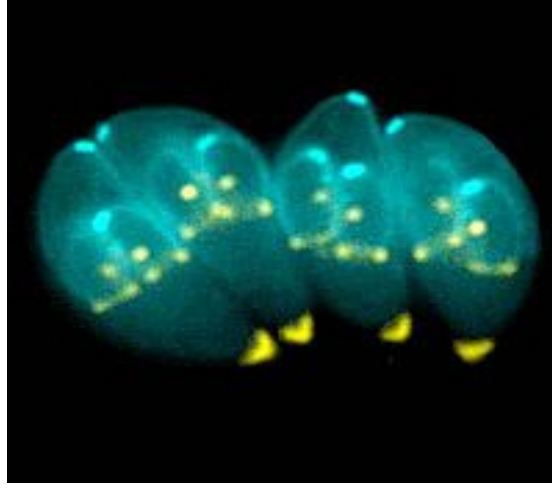
Bradizoit (kistizoit); yavaş çoğalan form (parazitin doku kisti oluşturarak, uyku durumuna geçtiği evre)

Ookist; yalnızca kedi dışkısında bulunan form [8, 9].

2.1.3.1 Trofozoitler (Takizoitler-Endozoitler)

Takizoit, 1908 yılında *Citenodactylus gundii*'de bulunan formdur. Bu terim ara konağın herhangi bir hücresinde ve son konağın bağırsağında hızla çoğalan safha için kullanılmaktadır. Hastalığın akut döneminde görülürler, konak hücreye aktif

penetrasyon veya fagositozla girerler. İnsanın nazal, vajinal, göz salgılarından, süt, tükürük, idrar, sperm ve dışkıdan izole edilebildiği ve bulaşabildiği tespit edilmiştir. Bu parazitin kendi DNA, RNA'larını sentezlemesine ve mitokondriyal enzimlerinin tam olmasına rağmen neden zorunlu hücre içi parazit olduğu anlaşılamamıştır. Ortalama bir kan hücresi (2-6 μ) boyutundadırlar. Takizoit eşeysiz olarak her 4-6 saatte bir tekrarlanan endodiyojeni ile çoğalarak, ortalama 64-128 sayısına ulaşınca bulunduğu hücreyi patlatarak çevre hücrelere yayılır [9, 10].



Şekil 2.3 Endodiyojeni ile takizoitlerin çoğalması [11]

Hastalığın patogenezi bu hücre tahribatına bağlı olarak gelişir. Ağır enfeksiyonlarda miyokard, akciğer, karaciğer, beyin gibi yaşamsal değeri yüksek olan organ ve dokularda nekrotik alanlar oluşur. Ateş yükselir, lenf yumruları şişer. Bu dönem akut toxoplasmosis olarak adlandırılır [12].

2.1.3.2 Bradizoitler

Bu kavram dokuda ki kistik safhayı tanımlamak amacıyla kullanılır. Canlıda enfeksiyonun 8. günü oluşabileceği gibi, büyük olasılıkla konağın hayatı boyunca canlı kalabileceği, her organa yerleşebildikleri ama genelde beyin, iskelet ve kalp kasını tercih ettikleri tespit edilmiştir. Takizoitlerin aksine, pepsin + HCl sindirimine

oldukça dayanıklıdır. Takizoitler bu durumda derhal yıkılırlar. Ortalama büyüklükleri $7 \times 1,5 \mu$ dur. Bir kistin içerisinde bir kaç taneden, 10 bin taneye kadar bradizoit bulunmaktadır. Bunlarda endodiyojeni ile bölünürler fakat bu bölünme takizoitlere göre çok daha yavaştır. Takizoitler hücreye girdikten sonra belli bir süre hızla çoğalırlar ve daha sonra bölünmeleri yavaşlayarak bradizoitlere dönüşürler. Yavaşça çoğalan bradizoitlerin etrafı bir duvarla kaplıdır ve bu şekilde kisti meydana getirirler. Bradizoitleri saran bu kist immun sistemin etkilerinden bradizoitleri korur. Bradizoitlerin kist oluşturmasıyla hücre tahribatının olmaması, klinik belirtilerinde olmamasını sağlar. Bu döneme kronik toxoplasmosis denir. Kistler konakta immun yanıtın devamlılığını sağlar [9, 12, 13].

Toxoplasmosisle mücadelede interferon gama (IFN- γ), tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) önemli sitokinlerdir. IFN- γ , T lenfositleri vasıtasıyla üretilir ve hastalığın tekrarlamasının önlenmesi açısından önemlidir [14]. İmmun sistem herhangi bir sebepten dolayı baskılanırsa kistler açılır, içindeki bradizoitler takizoitlere dönüşerek hastalığın nüks etmesini sağlar. Bu durum genelde öldürücüdür. Takizoit-bradizoit dönüşümleri ilk olarak farede gözlemlenmiştir. Takizoit bradizoit dönüşümleri, asıl enfeksiyonun gerçekleşmesini sağladığı gibi, hastalığın nüks etmesinde de önemlidirler. Bu dönüşümlerde Hsp70 şaperonunun önemli yere sahip olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Bu prosesin iyi anlaşılması doku kistlerinin yok edilmesinde kullanılacak kemoteropatik ajanların yapılmasına yardım edebilir. Ayrıca yüksek-düşük pH, mitokondriyal inhibisyon, nitrik oksit, ısı şoku, T hücrelerinin eksikliği, interferon eksikliği gibi etkenlerde takizoit-bradizoit dönüşümlerini etkilemektedir [15, 16].

2.1.3.3 Ookistler

Sadece kedilerin bağırsağında bulunan bir formdur. Parazitin herhangi bir formu kedi tarafından alındığı zaman doğruca kedinin ince bağırsağına gider. Bağırsak epitel hücrelerine girerek, şizogoni (eşeysiz) ile çoğalarak merozoitleri oluştururlar. Bir süre devam eden eşeysiz çoğalmadan sonra merozoitler gametositogenezis ile makrogametosit ve mikrogametositleri oluştururlar. Bunlarda olgunlaşarak makrogamet ve mikrogametleri meydana getirirler. Makrogamet ile

mikrogamet birleşerek zigotu oluşturur ve zigotta gelişerek ookistleri meydana getirir. Bu ookistler kedi dışkılarıyla beraber dışarı atılır fakat henüz enfektif değildirler. Enfektif olabilmeleri için ookistin olgunlaşması (sporulasyon) gereklidir. Sporulasyon süresi ortamın ısı, nem ve oksijenine göre değişir. Sıcaklık 24 °C olduğunda 2-3 günde olgunlaşma gerçekleşirken, 15 °C de 8 gün sürer, 11 °C de ise 14-21 güne kadar uzayabilir. Sıcaklık 4 °C'nin altında veya 37 °C nin üstünde ise sporulasyon gerçekleşmez. Ookistlerin yok edilebilmesi için kaynar suda 5 dakikaikada, % 7 amonyum ile muamele yeterlidir. Merozoitler, gametler ve ookistler sadece kedide bulunurken, takizoit ve bradizoitler ara konaklarda bulunur [1, 9, 12].

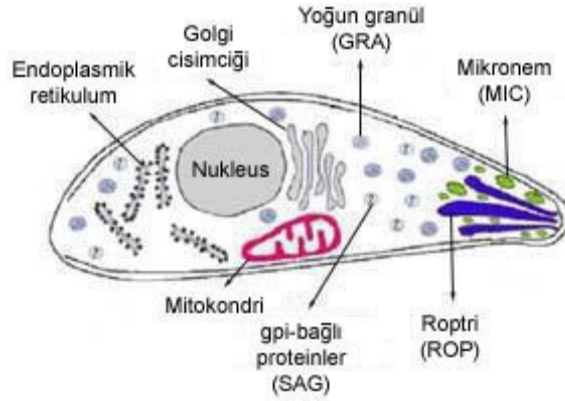
Kediler *T. gondii*'nin herhangi bir formunu yedikleri zaman dışkılarıyla ookist atarlar. Prepatent süre ve ookist çıkarma sıklığı, parazitin yendiği sırada bulunduğu safhaya bağlıdır. Eğer kedi paraziti doku kisti olarak yemiş ise, prepatent süre 3-10 gün arasında değişmektedir, eğer takizoit veya ookist durumunda aldıysa bu süre 19 güne kadar çıkmaktadır [1, 9].

2.1.4 *Toxoplasma Gondii*'nin Genomu

T. gondii genomunun kedilerde gözlenen seksüel döngü hariç haploit yapıda olduğu belirlenmiştir. Nükleer genomun ortalama 80 milyon nükleotid içerdiği ve suşlar arasında çok az fark gösteren 11 kromozomun bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca bunun dışında ekstra kromozomal 35 Kb büyüklüğünde, sınırlı protein ekspresyon kapasitesine sahip sirküler DNA'ya da sahip olduğu araştırmalar sonucunda görülmüştür. *T.gondii*'nin patolojik özellikleri nükleer genom tarafından kodlanan proteinler sayesinde olmaktadır. ToxoDB (*T.gondii* veritabanı), *T.gondii*'nin RH ve ME49-B7 adlı suşlarının tüm genomik verilerini araştırmacıların kullanımına açmıştır. Bazı genlerin ekspresyonunun, parazitin gelişim dönemlerine bağlı olarak düzenlendiği, parazitin farklılaştığı her döneme özgü farklı proteinlerin eksprese edildiği ve bazı genlerin ise patrazitin tüm yaşam döngüsü boyunca üretildiği de gözlemlenmiştir [1, 6, 17].

2.1.5 *T. Gondii* Organeller

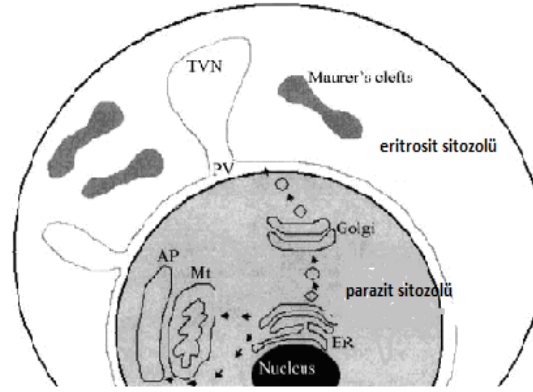
T.gondii takizoit formunda, konak hücreye tutunma, konağın istilası gibi önemli olaylar için farklı yapılar bulunmaktadır. Bu yapılar Şekil 2.4’de görselleştirilmiştir.



Şekil 2.4 *T.gondii* takizoitinde organeller [17]. (MIC: parazitin hareketli evrelerinde ön kısımda yığınlar halinde bulunan mikronem antijeni salgılayan yapı, SAG: Glikosilfosfatidilinositol (gpi) bağlı antijen salgılayan yapı, ROP Apikompleksanlarda bulunan, parazitik vakuol oluşumunda görev alan uzun elektron yoğun yapı).

Konak hücrenin istilası sırasında takizoit içeriği parazitofor vakuol (PV) içine ve aynı zamanda PV dış çevresine serbestlenmektedir. Konak hücre istilasında başlıca rolü takizoitin şimdiye kadar tanımlanmış 21 yüzey antijeni (SAG’lar), mikronemler, roptriler ve yoğun granüllerin oynadığı belirlenmiştir. SAG’lar ve mikronemlerden salgılanan 12 çeşit mikronem antijeni (MIC) parazitin konak hücreye tutunmasında rol alırken, roptrilerden salgılanan 9 çeşit roptri antijeninin (ROP) ise hücre işgali ve PV oluşumu sırasında görev aldığı düşünülmektedir. Yoğun granüllerden salgılanan 8 çeşit yoğun granül antijeni (GRA’lar) ise tüm konak hücreye yayılmakta ve yoğun granüllerin içeriğinden PV içine salgılandığı, PV içinde çözünmüş şekilde, PV ağı üzerinde veya PV membran üzerinde saptandığı

bildirilmiştir. Takizoitin içinde bulunduğu PV, paraziti lizozomal füzyon ve sonucunda gelişen konak hücre asidifikasyonundan korumaktadır [18,17]. Parazitin enfekte hücreyi istilasında oldukça önemli olan protein trafiğinde (şekil 2.5), maurer'in benekleri (maurer's clefts) denen yapıdan da söz edilmelidir. Bu yapı sayesinde PV'e transfer edilen proteinler enfekte hücre yüzeyine taşınmaktadır. Bu vakuoller içerisinde protein taşınımı konağın immun sistemini pasif bırakmaktadır [19].



Şekil 2.5 Parazitin konak hücredeki protein trafiği [19]. (PV: parazitik vakuol, TVN: tubulovesikular ağ, Mt: mitokondri, AP: apikoplast)

2.1.6 Epidemiyoloji

T. gondii, sıcak ve nemli iklime sahip olan bölgelerde, soğuk ve kuru iklime sahip olan bölgelere göre daha yüksek oranlarda bulunmaktadır. Genellikle enfeksiyonun insidansı, populasyon gruplarına, coğrafi özelliklere, yaşam tarzına alışkanlıklar ve geleneklere göre değişiklikler göstermektedir. Şehirlere göre kırsal kesimlerde ve hayvanlarla ilgili işlerle uğraşan kişilerde daha fazla görülmektedir. Ayrıca enfeksiyonun hem bayanlarda hem de erkeklerde eşit olarak görüldüğü, populasyonlarda yaş arttıkça seropozitivitenin de arttığı bildirilmektedir [13, 20].

2004 yılındaki verilere göre uluslararası alanda Toxoplasmosis'den ölümlerde Amerika ikinci sırada yer almaktadır. Amerika'da hastalıklardan ölümlerin % 9'u toxoplasmosis'den kaynaklanmaktadır. Birinci sırada ise Brezilya yer almakta ve burada hastalıklardan ölümlerin % 46,2'si toxoplasmosis'den olmaktadır [4]. Paris de çiğ ve az pişmiş et yeme alışkanlığı fazla olduğundan kadınlarda % 93 Toxoplasma prevelansı söz konusudur. Çin'de ise yiyecekler çok iyi pişirildiği için ve kedi sayısı az olduğu için Toxoplasma prevelansı çok düşüktür (% 0,7). Ülkemizde toxoplasmosis prevelansı % 17,3-78 arasında değişmektedir. Diğer bazı ülkelere ve kendi ülkemize baktığımızda toxoplasma prevelansını Çizelge 2.1'de görülmektedir [13, 20, 21]:

Çizelge 2.1 Dünyada ve ülkemizde Toxoplasma prevelansı

ÜLKE	PREVELANS ORANI	ŞEHİR	PREVELANS ORANI
Fransa	% 87	Edirne	% 33
Orta Afrika	% 81	Bursa	% 63
Türkiye	% 65	İzmir	% 52
Yunanistan	% 52	Adana	% 48
Almanya	% 36	Ankara	% 34
İngiltere	% 22	Sivas	% 51
Tayvan	% 9	Batman	% 78

2.1.7 Toxoplasma Gondii'de Isı Şok Proteinlerinin Araştırılmasının Gerekliliği

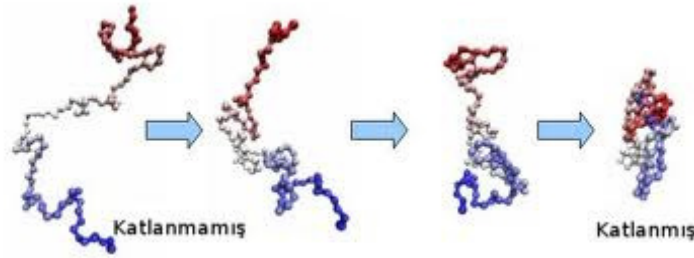
T. gondii hem dünya ülkelerini hem de ülkemizi çok yüksek oranlarda etkileyen bir parazittir. Dünyada çok yaygın olarak görülmesi, AIDS hastalığının yaygınlaşması, malign tümör tedavilerinde immün sistemi baskılayıcı ilaçların kullanılması ve organ nakli ameliyatlarının yaygınlaşması toxoplasmosis enfeksiyonuna dikkatleri çekmiş ve önemini artırmıştır [1, 17]. Toxoplasmosis

rahatsızlığına yakalanan AIDS'li hastaların % 94'ü ölmektedir. Toxoplasmosis'e maruz kalmış kişilerin tedavisi için yılda 7,7 milyar dolar para harcanmaktadır. Ayrıca *T. gondii* besin ve su kaynaklarını tehdit ettiğinden dolayı B biyoterörizm ajanı olarak kabul edilmektedir. Bu sınıflamanın başlıca sebeplerinden birisi Kanada İngiliz Columbia'sında 7718 insanın etkilendiği Toxoplasmosis salgınıdır. Bu enfeksiyon sadece insanlarda sağlık problemlerine ve ekonomik kayıplara sebep olmayıp, hayvanlarda da ciddi kayıplara sebep olmaktadır. Bu parazitin tüm formlarına karşı henüz % 100 etkili ilaç bulunmamaktadır. Şuan kullanılmakta olan ilaçların yan etkileri çok fazladır. Isı şok proteinleri, proteinlerin aktif hale gelebilmeleri için üç boyutlu yapılarına katlanmalarını sağlayan şaperon proteinlerdir. *T. gondii*'deki Hsp70'lerin yapısal olarak incelenmesi ve bunlar kullanılarak aşı geliştirilmesi durumunda, parazitin konak hücreye tutunmasında rol alan, konak hücrenin işgali ve PV oluşumu sırasında görev alan yani parazite patojenite katan proteinlerin doğru konformasyona erişmeleri engellenecek ve bu rahatsızlığa sebep olan parazit yok edilebilecektir. Yine parazitin Hsp70'i, enfekte olmuş hücrenin NO üretimini inhibe ederek baskılar, böylece konakçının *T. gondii*'yi öldürürken kullandığı en önemli mekanizmanın etkisini zayıflatır, parazitin vektör canlıdan memeli canlıya geçişinde çevresel olarak karşılaştığı değişimlere tolerans göstermesini de sağlayarak hastalığın yayılmasını kolaylaştırır. Parazite ait Hsp70'in yapısal olarak konakçının Hsp'lerine de oldukça benzerlik gösterdiğine dair hipotezlerde mevcuttur. Bu benzerlik ev sahibi hücrenin immun yanıtta eksik kalmasını sağlamaktadır. Hsp'lerin iyi bir şekilde incelenmesi bu parazit ile mücadelenin büyük oranda gerçekleştirilmesini sağlayacaktır. Ayrıca bir patojene ait stres proteinine sürekli maruz kalış, konakçının kendi savunma mekanizmasını kırarak, otoimmun rahatsızlıklara da neden olabilmektedir. Bugüne kadar yapılan aşı geliştirme çalışmalarında Hsp70 kullanılan aşılar, diğerlerine nazaran çok daha etkili sonuçlar vermiştir [22, 17, 19].

2.2 Isı Şok Proteinleri

2.2.1 Protein katlanmaları

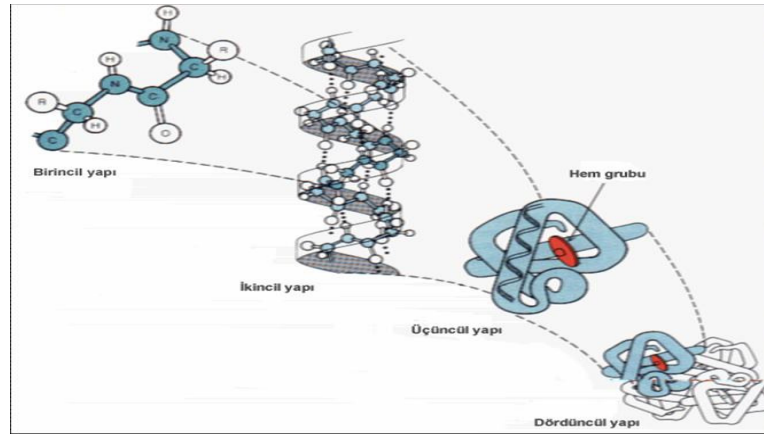
Proteinler organizmaların metabolik fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için oldukça önemli yapılardır. Bu fonksiyonları yerine getirebilmeleri için üç boyutlu yapılarına katlanmaları ve bu doğal hallerini korumaları gerekmektedir.



Şekil 2.6 Protein katlanması [23]

Üç boyutlu yapılarına katlanabilmeleri için gerekli bilgi proteinin birincil yapısında şifrelenmiştir [24]. Proteinlerin yapısında dört düzey vardır: birincil, ikincil, üçüncül ve bazen dördüncül yapıdır. Proteinde birincil yapı peptid bağlarıyla birbirine bağlanmış amino asitlerin doğrusal dizisidir. Polipeptid zinciri bölgelerinin düzenli katlanmasıyla ikincil yapı meydana gelir. Protein katlanmasında en yakın ikincil yapı tipi α -sarmal ve β - kıvrımlı tabakadır. Çubuk benzeri α -sarmalda amino asitler kendilerini düzenli sarmal bir konformasyona uyarlarlar. β - kıvrımlı tabaka ise farklı polipeptid zincirlerinde veya aynı polipeptid zincirinin farklı bölgelerindeki peptid bağları arasında oluşan hidrojen bağları ile meydana gelir. Üçüncül yapı, birincil yapıda birbiri ile bitişik ya da çok uzakta bulunan amino asitlerin uzaysal düzenlenmesiyle ilgilidir. Protein üç boyutlu yapıya bir defa katlandığında, bu konformasyon sadece hidrofobik etkileşimlerle değil, elektrostatik kuvvetler, hidrojen bağları ve eğer varsa disülfid bağları tarafından da sürdürülür. Dördüncül yapıdaki proteinlerde ise birden fazla polipeptid zinciri bir araya gelmesi söz konusudur [23]. Uygun fizyolojik koşullar altında, küçük proteinler doğal

konformasyonlarına kendiliğinden katlanırlar ancak büyük proteinler katlanması için yardıma ihtiyaç duyarlar. Moleküler kalabalığın fazla olduğu sitozolde ve strese maruz kalmış hücrelerde proteinlerin katlanma prosesi güçleşir. Yanlış katlanmış veya zarar görmüş proteinler belli bir kritik noktanın üzerinde birikirse Alzheimer, Parkinson, Huntington, Creutzfeldt-Jacob, kistik fibrosis ve Gaucher hastalığı gibi hastalıklara sebep olmaktadır [24, 25, 26].



Şekil 2.7 Proteinlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıları [27]

2.2.2 Isı Şok Proteinlerinin Yapı ve Görevleri

Bir canlının fizyolojik ve biyokimyasal dengesinin bozulmasına sebep olan iç ve dış faktörlere “stres faktörleri” denir ve bu faktörlere hücrelerin verdiği tepkiye “hücre stres yanıtı” denir [28, 29]. Hücrede miktarı stresle artan ve moleküler şaperon olarak adlandırılan proteinlere “ısı şok proteinleri (Hsp)” denir. Bu proteinler stres proteinleri olarak da adlandırılırlar. Hücrede protein katlanmasına yardım ederek, uygunsuz katlanmaları ve protein agregasyonunu önlerler. Ayrıca membranlar arası protein translokasyonunu, zarar görmüş proteinlerin degradasyon için hedeflenmesini, düzeltilebilecek proteinlerin tekrar yapılanmasını da sağlarlar ve bu fonksiyonları yerine getirirken koşaperon ve/veya partner şaperonlarla çalışırlar [26, 29].

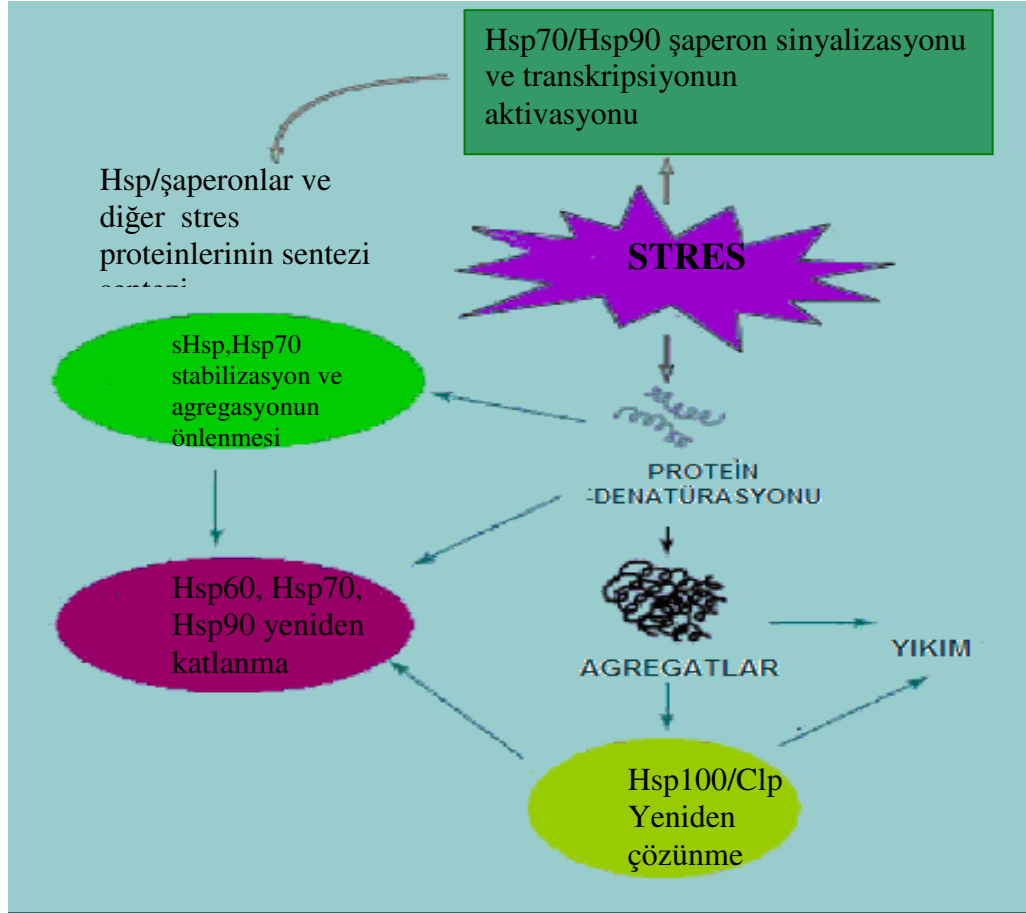
Stres, proteinlerin hidrofobik bölgelerinin açığa çıkmasını sağlar, bu da ısı şok proteinlerinin daha fazla etkileşebileceği yüzey alanı oluşturur. Fakat stresin fazla olması proteinlerin şaperonlarla etkileşim yüzeyini artırdığı gibi aynı zamanda protein-protein etkileşimlerine de olanak sağlar. Bu etkileşimler agregat oluşturur ve agregat oluşumu organizmaya zarar verir. Özellikle hayati işlevleri olan proteinlerdeki agregasyon, büyük sorunlar ortaya çıkarabilir. Örneğin mayada transkripsiyon faktöründe meydana gelen agregasyon prion oluşumunu tetikler. Bu sebeple hücrelerde yeterli sayıda şaperon bulunması ve bunların işlevlerini eksiksiz yapması organizmanın yaşamını sürdürmesi açısından oldukça önemlidir [30].

Isı şok proteinleri ilk defa 1962 yılında, F. Ritossa tarafından, *Drosophila busckii* larvasının inkübatörde yüksek ısıya maruz bırakılmış tükrük bezi hücrelerinde, şişkinleşip kabarmış kromozomların tespit edilmesiyle bulunmuştur. Yüksek ısıya maruz kalarak strese giren hücrelerdeki bu kromozomal şişkinliklerin, ısı şok proteinini kodlayan gen bölgeleri olduğu ve bu proteinlerin aşırı ekspresyonuna bağlı olarak şişkinleştikleri ortaya çıkmış ve ilk defa 1974 yılında “ısı şok proteini” ismi verilmiştir [28].

Bu proteinlerin molekül ağırlıkları 15 kDa ile 110 kDa arasında değişir ve isimlendirilmeleri de molekül ağırlıklarına göre olmaktadır [31]. Bu proteinler normal koşullar altındaki hücrelerde de bulunurlar fakat miktarları azdır, ani ısı değişimleri ve diğer stres faktörleri ile karşılaştıklarında miktarları hızla artar. Isı şok proteinleri hücrenin strese karşı direncini güçlendirirler. Kuvvetli hidrojen bağları, güçlü hidrofobik etkileşimleri sayesinde kolay denatüre olmazlar. Büyüme, farklılaşma, bölünme, hücre ölümü dahil, hücre metabolizmasının tüm evrelerinde hayati önem taşırlar [26, 28].

Isı şok proteinleri hücredeki fonksiyonlarına göre sürekli sentezlenenler ve stres uyarımlılar (Hsc-Hsp) olmak üzere iki guruba ayrılırlar [32]. Sürekli eksprese olanlar normal hücre şartlarında henüz katlanmamış polipeptitlere bağlanırlar ve bunların düzgün şekilde hedef organellere taşınmasını sağlarlar. Stres uyarımlılar ise stres koşullarına bağlı olarak ortaya çıkan hücre hasarını sınırlandırmak, proteinlerin

agregasyonunu önlemek, bozulan proteinlerin uzaklaştırılmasını sağlamak ve stres uyarımlı hücre ölümüne engel olmak gibi görevlere sahiptirler [33, 29].



Şekil 2.8 Stres cevabında ısı şok proteinleri (Hsp) ve şaperon ağı [28]

Hsp'leri kodlayan genlerin bulunduğu gen ailelerinin, evrim sürecinde fonksiyon ve yapı bakımından en fazla korunmuş gen ailesi olduğu bilinmektedir. Çünkü evrim sürecinde hücreler bir stres ile karşılaştıkları zaman canlı kalabilmelerini sağlayacak, stres sinyalini saptayan, izleyen ve yanıt verebilen bir mekanizma geliştirmişlerdir. Bu sayede stres durumunda hücreler ve dokular hasar görmekten ve apoptozisten korunmuş olurlar [29].

Isı şok proteinlerinin gen transkripsiyonu, ısı şok transkripsiyon faktörü ile Hsp gen promotor bölgelerindeki ısı şok elementlerinin etkileşimi aracılığıyla

sağlanır. Normal koşullar altında ısı şok faktör 1 (HSF1) stoplazma içerisinde DNA'ya bağlı olmayan bir monomer molekül gibi bulunur. Stres koşulları altında DNA'ya bağlanma kapasitesine sahip olmak için üç fosfatlı forma dönüşür ve stoplazmadan çekirdeğe geçer. Çekirdekte ısı şok protein geninin promotor bölgesine bağlanarak, Hsp transkripsiyonunu sağlar ve Hsp sentezini artırır [28].

2.2.3 Isı Şok Proteinlerinin Artışına Sebep Olan Faktörler

Isı şok proteinlerinin artışı sadece ısıya bağlı olarak değil, pek çok farklı sebeplerle de artabilir. Bunlardan bazıları şunlardır [28, 34]:

Çizelge 2.2 Isı Şok Proteinlerini Artıran Sebepler

Çevresel Faktörler	Hastalıklar	Hücre Etkileşimi
Isı Şoku	Ateş	Hücre Döngüsü
Ağır Metal Geçişleri	Yangı	Büyüme Faktörleri
Enerji Metabolizması İnhibitörleri	İskemi	Gelişme ve Farklılaşma
Kemoterapotik Ajanlar	Hipertrofi	
	Hücre Hasarı	
	Malignensi	

2.2.4 Isı Şok Proteinlerinin Hücre Dışındaki Görevleri

Hsp'ler normalde hücre içerisinde bulunurlar. Hücre dışında ise hücrelerin öldüğü ve içeriklerinin dışarı atıldığı durumlarda bulunurlar. Bu dağıntı hücrelerin planlanmamış ölümü nekroz olarak adlandırılır ve hücrede sadece hatalı eylemler meydana getirir. Hücrenin dışındaki Hsp'ler hastalık veya enfeksiyona karşı bağışıklık sistemini uyarmak için çok güçlü bir indükleyici etkide bulunurlar [33, 34].

2.2.5 Isı Şok Proteinleri ve Bağışıklık

Hücre dışındaki Hsp'ler hastalık veya enfeksiyona karşı bağışıklık sistemini uyarmak için çok güçlü tehlike sinyalleri gönderirler. Pek çok patolojik ajanın konakta immun cevap oluşturmada rol oynayan antijenik ajanlardır. Farklı parazitlerde Hsp'lerin strese karşı toleransları, antijenik özellikleri farklıdır [35, 36]. Stres proteinlerine karşı gelişen immun cevaplar çapraz reaksiyonlar vasıtasıyla hücrenin kendisine karşıda (anti-self) reaksiyon gelişimine sebep olabilmektedir [33]. Sağlıklı bireylerin enfeksiyon veya herhangi bir şekilde strese maruz kalmış kendi hücrelerinden arınmak için, kendi stres proteinlerine karşı immun cevap verebilme yeteneklerinden yararlanabildikleri ileri sürülmektedir [37]. İşte bu yeteneklerin düzenlenmesinde meydana gelen aksaklıklar bazı otoimmun rahatsızlıklara neden olabilmektedir. Stres proteinleri immun cevapta hedef olmanın yanı sıra, antijen sunulmasında da önemli rol oynarlar [35, 34].

2.2.6 Önemli Hsp Aileleri

Stres proteinleri, moleköl ağırlıklarına göre bazı alt guruplara ayrılırlar. Bu gurubun üyeleri sadece büyüklük yönünden değil, başka özellikleriyle de benzerlik gösterirler. Örneğin Hsp70 ve Hsp60 aileleri benzer fonksiyonlar görürler ve bunların amino asit sıralanmaları % 50'nin üzerinde benzerlik gösterir. Ayrıca moleküler ağırlıkları büyük olan Hsp100, Hsp90 ve Hsp70 proteinlerinin sekansları bitkiler aleminde büyük benzerlik gösterir [38].

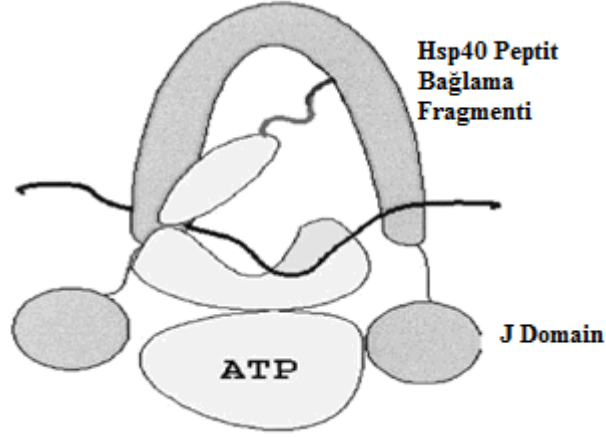
Çizelge 2.3 Önemli Hsp aileleri [39]

AİLE	ORGANİZMA	ŞAPERON	YER	ŞEKİL	FONKSİYON
Hsp100	E. coli S. cerevisiae	ClpA,B Hsp104	Sitozol Sitozol	 6-7 mer	Agregattan protein çekilmesi ve yeniden katlama
Hsp90	E. coli S. cerevisiae İnsan	Htp6 Hsp83 Hsp90 GRP94 TRAP1	Sitozol Sitozol Sitozol Çekirdek ER	 Dimer	Sinyal transdüksiyonu, ısı şok yanıtının düzenlenmesi, hücre döngüsü ve proliferasyon
Hsc/Hsp70	E. coli S. cerevisiae İnsan	DNaK Ssa1-4 Ssb1,2 Kar2, Ssc1 Hsc70,Hsp70 BIP, mHsp70	Sitozol Sitozol ER Mitokondri Sitozol Çekirdek ER Mitokondri	 monomer	Isı şok yanıtının düzenlenmesi, yanlış katlanmış proteinlerin doğru konformasyona erişimi, apoptozisin önlenmesi, membranlar arası protein translokasyonu
Hsp60	E. coli S. cerevisiae Bitkiler İnsanlar	GroEL/ES Hsp60 Cpn60 Hsp60	Sitozol Mitokondri Kloroplast Mitokondri	 14 mer	Katlama ve denature protein stabilizasyonu
Hsp40	E. coli S. cerevisiae İnsan	Dnaj Ydj1 Hdj1,2	Sitozol Sitozol Çekirdek	 monomer	Hsp70'in ATPase aktivitesi için gerekli koşaparon
Küçük Hsp'ler	E. coli İnsan	IbpA,B Hsp27 crystallin	Sitozol Sitozol Sitozol	 8-24 mer	Proteinlerin kümeleşmesinin önlenmesi, Hücrelerin ısı stresine dayanıklılık göstermeleri ve anti-apoptotik fonksiyon

2.2.6.1 Hsp40 Ailesi

Ökaryot organizmalarda Hsp70'in fonksiyonlarına yardımcı olurlar, enzim gibi davranırlar. Bir organizmada birden fazla tip Hsp40 bulunmaktadır [21]. Hsp40'ın mayada 20 tane, *E. coli*'de 6 tane, *D. melanogaster*'de 34 tane insanda ise 44 tane J domain proteini olduğu tahmin edilmektedir. Hsp40 varlığında Hsp70'in substrata ilgisi artar. Hsp40, substrat protein katlanmasında proteinleri gerginleştirip,

Hsp70'e sunarak, Hsp70'in işlevini artırır. Tüm Hsp40'lar J domainine sahiptirler ve bu domain Hsp70'in ATPase domaini ile temas ederek, onu etkinleştirir ve böylece katlama prosesi gerçekleşir [40].

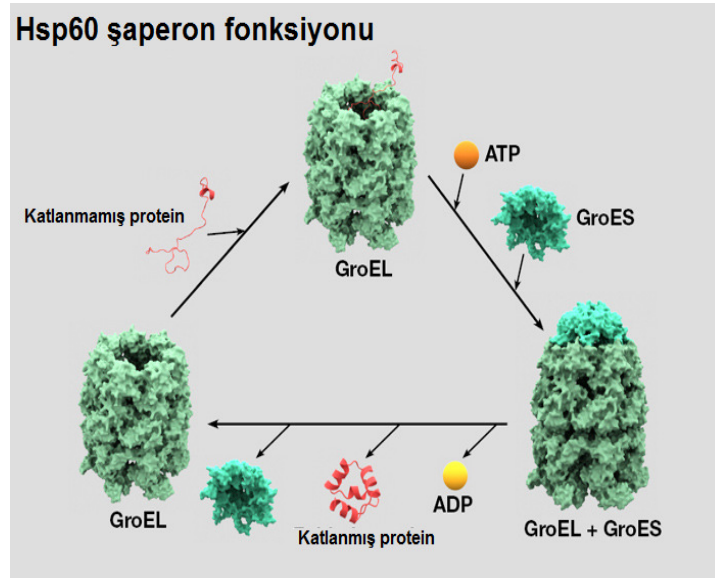


Şekil 2.9 Hsp40'ın J domaini sayesinde Hsp70'e substratı sunması [40]

2.2.6.2 Hsp60 Ailesi

Hsp70 ve Hsp60 ister bakteri, ister küf veya hayvan hücresinde olsun benzer fonksiyonlar gösterirler ve bunların aminoasit sıralanmaları %50'nin üzerinde benzerdir. ER içinde kalnexin, mitokondri içerisinde karetikulum proteinlerinin katlanmalarını sağlarlar. Hsp60, bozunmuş proteinleri yakalayıp bu proteinleri kimyasal enerjileri yardımıyla parçalar. Bu protein 60 kDa'luk bir protein olup fıçıya benzer bir yapıya sahiptir ve katlanmamış proteinin bu fıçının ortasındakikai oyuğa alarak, hidrofobik etkileşimlerle proteinin katlanmasını sağlar. Proteinlerin stoplazmadan mitokondriyal matrikse taşınmasında ve aminoasit zincirlerinin işlevsel formlarına düzgün katlanmasında görev yaparlar. Aynı zamanda apoptozisi önlemede anahtar rol oynarlar. Sadece moleküler şaperon olarak değil, aynı zamanda stres tepkisinde de görev yaparlar. Normal şartlar altında Hsp60 enzimlerin toplanmasında ve bağlanmasında işlev görür ve enerji metabolizmasıyla ilgilidir. Hsp70 ve Hsp60 ailesi intraselüler bölgelerde proteinlerin katlanma, bir araya gelme

ve yer değiştirmelerine yardımcı olurlar. Diğer Hsp'ler ise yanlış katlanan proteinleri düzeltirler. Hsp60 en iyi *E. coli*'de araştırılmıştır ve bu da Şekil 2.10'da gösterilen GroEL mekanizması olarak tanımlanmıştır. Hsp60, prokaryotlarda Hsp10 (GroES) ile beraber çalışır. Hsp10 Hsp60'ın üzerini bir kapak gibi kapatarak, katlanma olayına yardım eder [41].



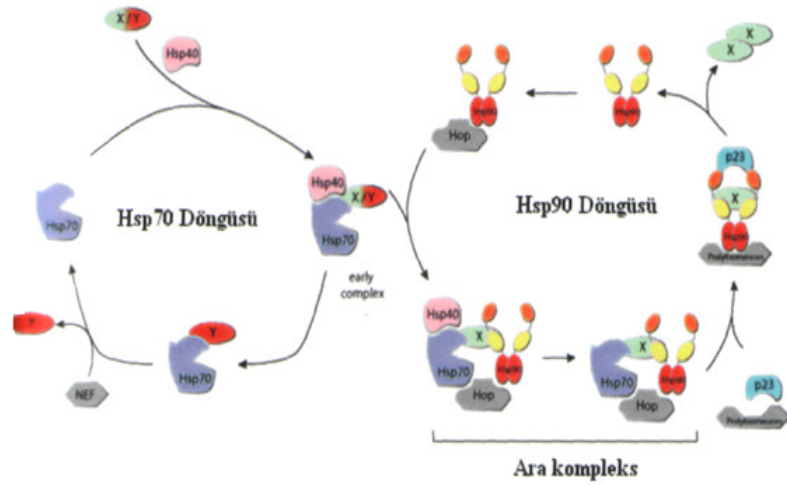
Şekil 2.10 Hsp60'ın prokaryotlarda Hsp10 ile protein katlama mekanizması [42]

2.2.6.3 Hsp90

Hsp90 moleküler bir şaperon olup, proteinlerin katlanmasında, sinyal yollarında, tümörlerin yayılmasının önlenmesinde ve yanlış katlanmış proteinlerin kümeleşmesinin önlenmesinde görev almaktadır. Hücre döngüsünün kontrolünde, transkripsiyonel düzenlemede, protein yıkımında ve taşınmasında da rol oynarlar. Hücrede en fazla fonksiyonu olan proteindir. Normal hücrelerde % 1-2 oranında bulunurken stres durumunda bu oran ikiye katlanmaktadır. Ligand yokluğunda hormon bağlayıcı etki gösterirler. Bu moleküller steroid reseptörlerine bağlanarak steroid hormonlar bağlanana kadar, steroid reseptörlerin nükleer DNA'ya bağlanmalarını engellerler. Böylece steroid reseptörler ile DNA arasında zamanından

önce oluşacak etkileşimleri önlemiş olurlar. Stoplazma ve endoplazmik retikulumda bulunurlar. Endoplazmik retikulumda en fazla bulunan ısı şok proteinidir. Hsp90 aynı zamanda HSF1'in fizyolojik koşullarda durumunun dengelenmesini de sağlar [43].

Hsp90 bir dimerik proteindir ve yüksek korunumlu ökaryotlarda α ve β adında iki izomerik formda bulunur. Hsp70 gibi protein katlanmasında görev alır. Bazen Hsp70 bir substratın tam oluşum ve aktivasyonunu sağlayamaz. Bu durumda Hsp90 ile beraber, Hop (Hsp organizing protein), p23 koşaperonu ve peptidil-prolyl cis/trans izomerazlar bir kompleks oluşturarak substratı olmaları gereken konformasyona getirirler (Şekil 2.11). Bu en son kompleksden substratlar ortaya çıkar. Yeniden Hop'a bağlanan Hsp90 yeni bir döngüye girmeye hazırdır [26, 41].



Şekil 2.11 Hsp70 / Hsp90 substrat döngüsü [44]

Hsp90 mRNA'sı *T.gondii*'de takizoitden bradyzoit oluşumunun ilk 24 saatinde artar. Bu sebeple erken bradyzoit işaretçisi olarak düşünülebilir [45].

2.2.6.4 Hsp100 Ailesi

Bu gruptaki proteinler daha çok proteinlerin yığılmasını ve/veya protein degradasyonunun önlenmesini sağlamaktadır [30]. Yüksek molekül kütlesine sahip olan ısı şok proteinleridir. Termotoleransın geliştirilmesinde rol oynadıkları öngörülmektedir. Hsp100, protein kümelerini ayırmak için onları eritir. Özellikle Hsp100 ailesi içerisinde yer alan Hsp104 yeni toplanan proteinleri kurtarma yeteneğine sahiptir [26, 41]. Hsp100'ün ortası delik döner bıçak şeklinde olduğu düşünülmektedir, agregattaki substrat proteinlerini agregattan çekerek ortasındaki delikten geçirir, gerginleştirip düzelterek, deliğin uç kısmında bulunan Hsp70 ve Hsp40 kompleksine sunar ve substratın tekrar katlanmasını sağlarlar [30, 46].

2.2.6.5 Küçük Hsp'ler

Futbol topu görünümünde proteinlerdir. Bunlar 15 ile 40 kDa'luk kütleler halinde, stoplazma ve çekirdekte bulunurlar. Antioksidan özellikleri vardır. Bunlar Hsp60 ve Hsp70'den farklı olarak proteinlerin düzgün katlanmasında kullanılmazlar [47]. Bunun yerine hücrel stres yanıtı esasında kısmi katlanmış proteinler ile etkileşime girerek, bu proteinleri stabilize ederler ve bunlara yapışarak küme olmalarını engellerler [46]. Diğer ısı şok proteinlerinin aksine yüksek korunumlu değildirler ve türler arasında oldukça çeşitlilik gösterirler. Küçük Hsp'lerin protein yapışması ve çökmesiyle karakterize Alzheimer, Creutzfeldt Jakob Sendromu gibi hastalıklarda ekspresyonu artar. Ubiquitin tüm ökaryotlarda görülen yüksek oranda korunmuş bir proteindir. Hsp8 olarak da adlandırılan bu protein, degradasyonda görev alır [47].

2.2.6.6 Hsp70 Ailesi

Hsp70, 70 kDa'luk bir protein olup, katlama prosesinde oldukça önemli bir yere sahiptir. Hsp70 yeni sentezlenmiş proteinlerin katlanmasını, stoplazma, mitokondri, endoplazmik retikulum gibi yapılara protein taşınmasını sağlamaktadır. Peptitlerin hidrofobik bölgelerine bağlanarak proteinlerin kümeleşmelerini önlemekte ve böylece strese maruz kalmış proteinlerin üç boyutlu yapılarını

korumalarını sağlamaktadırlar[32].Yanlış katlanmış proteinlerin düzeltilmesi, düzeltilemeyenlerin yıkım için hedeflenmesi, peptitlerin birbirine bağlanması, HSF1'in çalışmasının düzenlenmesi gibi görevleri de vardır ve ATPaz aktivitesi gösterirler. Hsp70'ler tüm bu fonksiyonları koşaperonlarla ve/veya partner şaperonlarla birlikte yaparlar [48].

2.2.6.6.1 Hsp70'in Domain Yapısı

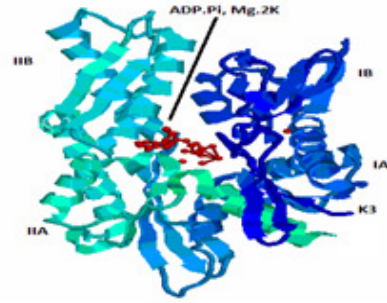
Hsp70 üç domaine sahiptir. Birincisi proteinin N terminali yani ATPaz domaini olup, molekül kütlesi 44 kDa'dur. ATPase domaini iki büyük globüler domainden oluşur, her bir domain de iki küçük subdomainden oluşur. Bu domainler ortada bir yarık oluşturacak şekilde bulunurlar ve dip kısma bir nükleotid bağlanır. Sığır Hsc70 ATPase domaininin X ışını kullanılarak yapısına bakıldığında, iki β ve γ fosfat bağlama lobu ile hidrofobik fosfat bağlama lobunun etkileşimleri ile adenosin nükleotidin aktif bölgeye bağlandığı görülmüştür. Nükleer manyetik rezonans (NMR) çalışmalarında ise ATPase domaininin yüksek esneklikte olduğu ve farklı subdomainlerde biri diğerini etkileyecek şekilde gerçekleşen eğme ve kırpm hareketleri sayesinde nükleotid bağlanma yarığının açılıp kapanmasının yönetildiği tespit edilmiştir. Bu açılıp kapanmalar nükleotidin bağlanıp serbest kalmasını sağlar. Burada ATP hidrolizi gerçekleşir ve substrat bağlanma domainine sinyal gönderilir. Bu sinyalin gönderilmesiyle substrata zayıf olarak bağlanmış olan Hsp70, substratı sıkıca kavrar. Bu ADP+P salınımında NEF (nükleotid exchange factor) adı verilen bir protein ailesinden bahsedilmelidir. NEF ailesi çok çeşitli ve tam tanımlanmamış protein sınıfından oluşmuş olup, prokaryotlarda GrpE olarak, ökaryotlarda ise Bag1, Fes1p ve Hsp110 olarak adlandırılır. NEF bir kısıkaç gibi davranarak NBD'ni (nükleotid bağlanma domaini) sıkar ve ADP salınımını kolaylaştırır. Bu sonraki ATP'nin domaine bağlanmasını ve yeni Hsp70 katlama prosesinin başlamasını sağlar [47, 48]. Adenin nükleotidinin hidrolizi sadece Hsp70 tarafından sağlanırsa katlama oranı düşük olur, fakat hidrolizi bir koşaperon olan Hsp40'ın J domaini indüklerse, katlama oranı 1000 katına çıkar. Yapılan çalışmalarda peptitlerin hidrofobikliğinin ATP hidroliz oranını etkilediği de tespit edilmiştir. Hidrofobiklik açısından güçlü

olan peptit, daha zayıf olan peptide göre Hsp70'in ATP hidrolizini çok daha iyi uyarır [32, 47].

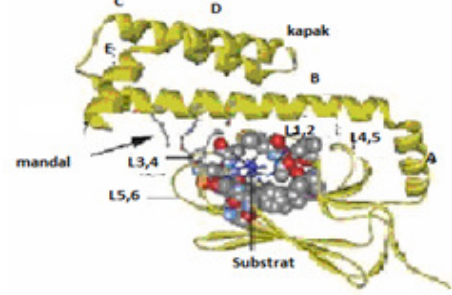
İkinci domain yapısı ise orta (middle) domainidir. Hsp70 ailesi içerisinde oldukça yüksek oranda korunmuştur ve substrat bağlanma domaini (SBD) olarak adlandırılır. Bu domain hakkındaki pek çok bilgiye *Escherichia coli* DnaK (HSP70 homoloğu) üzerinde yapılan çalışmalarla ulaşılmıştır. SBD 25 kDa β yaprak subdomaininden ve 10 kDa helikal subdomainden oluşur. Peptit bağlama bölgesi sandviç benzeri bir oluşum gösterir. Burada iki tane 4 zincirli β -yaprakla beraber, ikisi içte ikisi dışta olmak üzere yukarı doğru çıkıntı yapmış 4 tane lob yer alır. Ayrıca birde helikal subdomain vardır, bu da 5 tane heliksten (A,B,C,D,E) oluşur. Heliks B bir kapak meydana getirir ve bu kapak dıştaki loblarla iki hidrojen bağıyla bağlanan tuz köprüsü oluşturur ve katlanacak olan substrat, substrat bağlanma domainine bağlanınca kapanarak, Hsp70'in substrata olan affinitesinin artmasını sağlar. Kapağın kapanması ATPase domaininden ADP+P oluşumuna bağlı olarak gelen sinyal ile indüklenir, kapak dönme hareketi yaparak SBD'i kapatır [40,48]. SBD içerisindeki oyuk hidrofobik bir merkez olup, substrat ile merkez arasındaki hidrofobik etkileşimlerle substrat olması gereken konformasyona erişir [25]. ATPase domainine yeni bir ATP'nin bağlanmasıyla kapak açılır ve substrat serbest bırakılır, Hsp70 yeni bir döngüye girmeye hazır hale gelir [32].

Üçüncü yapı ise C terminalidir ve 18 kDa'luk bir domainidir ve substrat bağlama domaininin bir kısmıyla beraber kapak görevi görür. Birçok ökaryotik sitozolik Hsp70'in C terminali, yüksek korunumlu bir oktapeptit içerir. Bu oktapeptit çeşitli koşaperonlarla Hsp'nin etkileşime girmesine aracılık eder. İçerisinde Hsp40'ında bulunduğu pek çok koşaperon, tetratrikopeptit (TPR) tekrarlarından oluşan protein etkileşim motifleri içerirler. Bu TPR ile şaperonun oktapeptit kısmı etkileşime girer ve maya sitozolik Hsp70'in ATPase domainini uyarıcı etkide bulunur [48, 49].

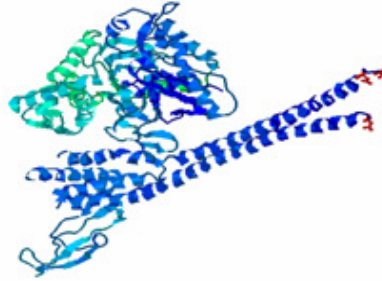
a) ATPase domaini



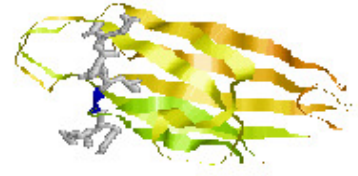
d) substrat bağlama domaini



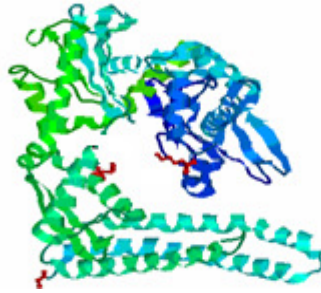
b) DnaK-GrpE



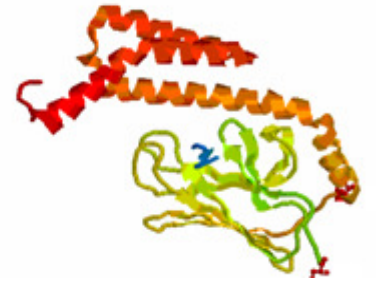
e) DnaK



c) Hsc70-Bag1



f) HscA

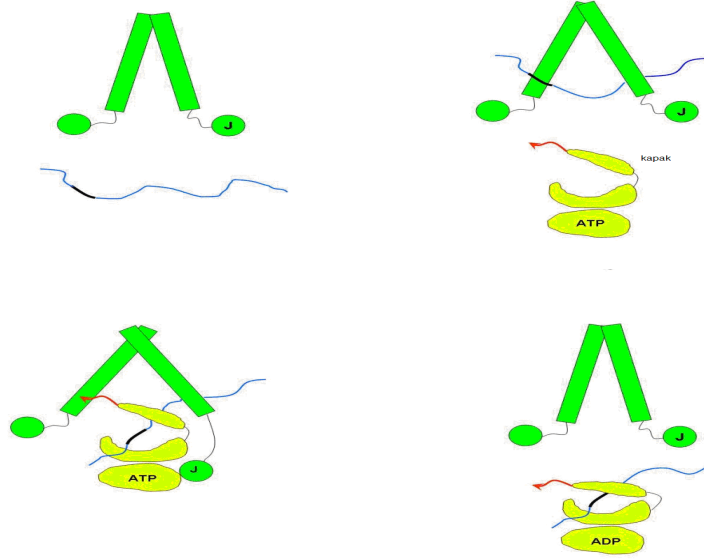


Şekil 2.12 Hsp70 şaperonunun yapısı ve onunla etkileşime giren koşaperon ve substratlar [48]. a) Sığır Hsc70'inin ATPase domaini, ADP, inorganik fosfat ve iki potasyum iyonu (PDB kodu 1BUP). b) DnaK ATPase domaininin GrpE ile etkileşimi (PDB kodu 1DKG). c) Hsc70 ATPase domaininin Bag domain fragmenti Bag 1 ile etkileşimi (PDB kodu 1HX1). d) *E. coli* DnaK'nın substrat bağlama domaini (PDB kodu 1DKX). e) *E. Coli* DnaK peptit substratla beraber (PDB kodu 1DKX). f) *E. coli* HscA'nın peptit substratla ilişkisi (PDB kodu 1U00).

Yapılan pek çok çalışmada, Hsp70'lerin hücrede farklı veya aynı kompartmanda bulunmalarına rağmen, aynı kompartmanda bulunanlar arasında bile fonksiyonel olarak farklılıklar tespit edilmiştir. Maya üzerinde yapılan çalışmalarda Hsp70 ve Hsc70'in domain yapıları karşılaştırılarak, aralarındaki benzerlik ve farklılıklar bulunmaya çalışılmıştır. Hsc70'in hücrede normal durumda bulunduğu, Hsp70'in ise hücre bir stresle karşılaştığı zaman eksprese edildiği gözlemlenmiştir. Domainlerin karşılaştırılmasında ise büyük oranda benzerlikler görülmüş fakat tamamen aynı olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca farklı türler arasında domain değiş tokuşu yapıldığında Hsp70'lerin işlevsel olduğu, ancak değiş tokuşun Hsp70-Hsc70 ile yapıldığı durumda ise işlevselliğin ortadan kalktığı görülmüştür. Özellikle insan Hsp70'i ile Hsc70'inin SBD'leri maya Hsp70'leri ile değiş tokuş yapıldığında oluşan proteinin yapısında ciddi farklılıklar görülmezken, ATPase domain değiş tokuşunda önemli farklılıklar ortaya çıkmıştır. Bu durum Hsp70 ile Hsc70 ATPase domain fonksiyonlarının farklı olduğunu ortaya koymuştur. Yapılan ayrıntılı çalışmalarda bu farklılığın sadece ATPase domaininden kaynaklanmadığı, domainler arası etkileşimin ve protein-protein etkileşimlerinin de Hsp70 ve Hsc70 fonksiyonları için hayati derecede önemli olduğu belirlenmiştir [32,50]. Hücrede bu kadar farklı Hsp izoformunun bulunması, bunların substratlarla/koşaperonlarla etkileşimi, aynı kompartmanda bulunan formların farklı farklı işlevler yapması sırasındaki mekanizmalar tam aydınlatılamamıştır [51].

Maya sitozolde Ssa ve Ssb olmak üzere iki farklı tip Hsp70'e sahiptir. Ssa dört, Ssb ise 2 farklı izoforma sahiptir. Sitozolik Hsp'ler çekirdeğe ve diğer organellere protein taşınımını sağlarlar ve denature proteinleri yıkım için hedeflerler. Maya sitozolünde birkaç tane koşaperon bulunur ve bunlardan en iyi tanımlanmış olan Hsp40'lar, Ydj1 ve Sis1'dir [47, 50]. Şekil 2.13'te görüldüğü üzere Hsp40 sahip olduğu J domaini sayesinde substratı tutarak Hsp70'e getirir ve bu J domaini Hsp70'in ATPase domainini uyarır. Bu uyarım kapak bölmesinin kapanmasına ve Hsp70'in substratı sıkıca kavramasına yarar. Ardından da Hsp70 substratı uygun konformasyona getirir [52].

Isı şok proteini 70'in fonksiyonel farklılıklarının, etkileştikleri spesifik Hsp40'dan ve substrat sınıfından kaynaklandığı sanılmaktadır [21].



Şekil 2.13 Hsp40'ın Hsp70'e substratı sunması [52]

2.2.7 Hip, Hop ve CHIP

Hip, insan Hsc70'nin ATPase domaini ile etkileşime giren 43 kDa'luk bir proteindir. Hip Hsp70'i ADP durumunda stabilize ederek, Hsp70'in şaperon aktivitesine devam etmesini sağlar ve böylece premature substratların salınımını önler [48]. Hip *T. gondii*'nin takizoit ve bradyzoit safhalarında, stoplazmada yer alır. Takizoit-bradyzoit dönüşümlerinde etkili bir şaperondur [45].

Hop 60 kDa büyüklüğünde bir protein olup, ilk kez mayada ısı şok proteinlerinin (yeast Sti1) yanıtlarının düzenlenmesinde görev alan proteinler için yapılan genetik taramada tespit edilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda progesteron reseptör kompleksinin bir bileşeni olduğu tespit edilmiştir. Hop, Hsp70 ve Hsp90 ile etkileşime girer. In vitro deneylerde progesteron reseptörlerinin olgunlaşma oranlarını hızlandırdığı tespit edilmiştir. Mayada Sti1'in maya Ssa1'in ATPase aktivitesini stimule ettiği tespit edilmişse de, memelilerde böyle bir özellik gözlenememiştir.

CHIP 35 kDa olup, Hsp70 ve Hsp90'ın C terminaline bağlanmak için Hop ile rekabete girer. Ubiquitin, ligaz gibi davranarak Hsc70 substratlarının proteozomlar tarafından yıkımını sağlar [48].

2.2.8 Prionlar

Hasarlı, mutant ve yanlış katlanmış proteinler agregat olma eğilimindedirler. Bazı protein agregatları normal proteinleri enfekte eder ve hücre bölünmesi sırasında yavru hücrelere geçer. Prion kısaca protein içeren ve bulaştırılabilen (enfeksiyöz) karakterde çok küçük partiküllerdir. Prion oluşumu en fazla mayada araştırılmıştır [53]. Prionlar viruslerden çok daha küçük proteinler olup, hücrelerde birikimleri sonucu nörodejeneratif rahatsızlıklara sebep olurlar ve nesilden nesile aktarılabilirler. Bu enfeksiyon ajanlarının nesilden nesile aktarımlarının DNA yolu ile olmaması, proteinler yoluyla da bazı rahatsızlıklara yeni kuşaklara geçeceğini göstermiştir [32, 48].

Sup45 ve Sup35 translasyonu sona erdiren ve ribozomu proteinden ayıran moleküllerdir. Sup35'in normal ve prion formu olmak üzere iki formu bulunur. 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. Çünkü Sup35'in sadece C terminali fonksiyoneldir ve fonksiyonu olmayan N terminali hücreyi $[PSI^+]$ formuna çevirir [54]. Bu terminal diğer proteinlere bağlandığında veya sadece bu bölge eksprese edildiğinde prion formu elde edilir. Bu terminalin silinmesi ya da zarar görmesi $[PSI^+]$ 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. $[PSI^+]$ genellikle ADE I de prematüre stop kodonu geçerek okur ve bu hücrelerin adeninsiz ortamda büyüebilmesini sağlar ve zengin ortamda beyaz veya pembe renktedirler [53].

Hsp104 prion oluşumunu önleyen bir şaperondur, ancak bu fonksiyonu yerine getirebilmesi için muhakkak Hsp70'in yardımı gerekir. Prion oluşumunun en çok araştırıldığı mayada Hsp70 sayısındaki artış prion oluşumunu azaltır [40, 55].

2.2.9 Hsp70 – Kanser - Apoptozis

Hsp'ler ilk olarak yaklaşık 30 yıl önce tümör hücrelerinden izole edilmişlerdir. CD8+ ve CD4+ lenfositlerini, doğal katil hücrelerini (natural killer) harekete geçirirler, aynı zamanda sitokinezlerin salgılanmasını ve dendritik hücrelerin indüklenmesini sağlarlar. Dendritik hücreler primer immün yanıtta antijen sunucu hücrelerdir ve T hücrelerini uyarırlar. Natural killer denen doğal katil hücreleri ise aslında beyaz kan hücreleridir ve immün sistemin oldukça önemli elemanlarıdır. Tümör hücrelerinde Hsp70 membrana bağlanarak, immün sistem için tümör hücrelerini hedef haline getirir. Doğal katil hücreleri, membrana bağlı Hsp70'lere CD94 reseptörleriyle bağlanırlar. Bağlandıkları hücreler granzim B salgılar ve bu enzim sayesinde tümör hücresi apoptosis için indüklenmiş olur. Bu aktivasyon mekanizması, anti kanser ilaç geliştirme çalışmalarında dikkat çekmektedir [56].

Apoptozis, organizma tarafından düzenlenen enerji bağımlı hücre ölümüdür. Programlı hücre ölümü olarak da adlandırılan bu süreç, doku homeostazının korunmasında kritik bir role sahip olduğu gibi, fetal gelişim ve erişkin dokulardaki pek çok fizyolojik olayda da önemli rollere sahiptir [57].

Protein denaturasyonu ve agregasyonu apoptozisi tetikler. Kaspazlar apoptotik hücre ölümü esasında önemli rol oynayan multigen ailesinden oluşan sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Kelime olarak "Cysteine Aspartate Specific ProteASEs" dan "CASPASE" olarak türetilmiştir. Kaspaz aracılı apoptozisin aktivasyonu hücre yüzey reseptörleri aracılığıyla, ER aracılığıyla olabildiği gibi, mitokondrideki sitokrom c aracılığıyla da olabilir. Stresin neden olduğu apoptozisi Hsp70, sitokrom c ile etkileşime girebilme yeteneği sayesinde önler. Ekstrinsik ve intrinsik yollardan kaynaklanan apoptozisi Hsp70, Hsp27 ile birlikte bloke eder [57]. Kanserde de Hsp70 seviyesi çok artar, bu sayede özofagus, böbrek ve pankreas kanserlerinde, melanoma da iyi bir prognoz sağlar. Fakat diğer tip kanserlerde

prognoz ya çok azdır ya da yoktur. Hsp ailesi kanser tedavisinde önemli bir kapı açar, çünkü hücrenin yaşam mücadelesinde anahtar role sahiptir. Tümör gelişiminde ve metastazında Hsp seviyesi çok artar. Bu sebeple immunoterapide ilaç hedeflenmesinde kullanılabilir. İmmun yanıtın artmasında ve hücrelere antijen sunumunun aktivasyonunda Hsp70 kullanılır. Aşı üretiminde kullanılabilirler. Bu da kanserin ve enfeksiyon hastalıklarının önlenmesini sağlar [49, 58].

2.3 Protein Saflaştırma

Proteinin moleküler yapısı, fiziksel ve kimyasal özellikleri ekstraselüler veya intraselüler olması ve hücre içinde bulunduğu yerin bilinmesi saflaştırma prosesinin belirlenmesinde çok yardımcı olur. Saflaştırma sırasında, bu işlemin ne oranda başarıldığını izlemek için, protein miktarının hassas ve spesifik olarak belirlenmesi gerekir [59]. Saflaştırmanın ilk adımlarında daha çok deriştirmeye yönelik (yüksek kapasiteli) teknikler kullanılır. Böylece ortamdaki suyun büyük kısmı uzaklaştırılmış olur. Çöktürme, ekstraksiyon ve absorpsiyon kromatoğrafi teknikleri bu amaçla kullanılabilir.

Ayrıca gücü açısından çöktürme ve ekstraksiyon teknikleri etkin değilken kromatoğrafik teknikler özellikle afinite kromatoğrafisi çok etkindir ve 1000 kattan fazla saflaştırma sağlar. Afinite-ultrafiltrasyon kombinasyonu gibi yüksek ayırma güçlü tekniklerin kullanılması saflaştırma prosesindeki adım sayısını çok düşürür. Fakat afinite tekniklerinin çok pahalı olduğu, bu nedenle çöktürme gibi ucuz teknikler ile kontaminantların önemli oranda uzaklaştırılmasından sonra uygulanmaları gerektiği unutulmamalıdır. Protein saflaştırmada uygulanacak teknikler genel olarak aşağıdaki sırayı izler:

- a) Homojenizasyon
- b) Çöktürme
- c) İyon değişim kromatoğrafisi
- d) Afinite kromatoğrafisi
- e) Jel Geçirgenlik kromatoğrafisi

Saflaştırmanın verimi protein tayini ile kaç kat saflaştırma gerçekleştirildiği ise birim protein kütlesi başına fonksiyonel aktivitenin ölçülmesi ile bulunur. Protein saflık testi ve kaç yabancı protein içerdiği jel elektroforezi ile belirlenir. Safsızlıkların molekül kütleleri SDS-PAGE ile tayin edilir ve safsızlıklar jel geçirgenlik kromatografisi ile uzaklaştırılır.

2.3.1 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 metottur.

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 çözeltiyle alınan maddeler fraksiyonlar halinde ayrı tüplere toplanır ve böylece ayırma işlemi gerçekleşmiş olur [60].

2.3.2 Elektroforez

Sulu bir çözelti içinde, süspansiyon ya da çözünmüş küçük elektrik **yüklü** parçacıkların, uygulanan bir elektrik alanının etkisi ile göç etmesi sürecine **elektroforez** denir. Bu küçük parçacıklar; bakteri hücreleri, virüsler, protein molekülleri veya sentetik parçacıklar olabilir. Doğal olarak bu parçacıkların çoğu elektrik yükü taşırlar [61]. Diğer bir deyişle elektroforez, ortam pH'ına 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. Elektroforez yönteminin değişik biçimleri vardır:

- Kağıt elektroforez
- Serbest veya hareketli cephe elektroforez
- Kuşak (zone) elektroforezi
- Disc elektroforezi
- İzoelektrik odakikalama
- SDS-gel elektrofororezi

Elektroforetik yöntemler ile, karışım içinde bulunan protein sayısını tespit etmek (kağıt ve jel elektroforezi), saflaştırılmış proteinin saflık derecesini belirlemek (SDS-PAGE) ve saflaştırılmış proteinin molekül kütlelerini tayin etmek (SDS-PAGE) mümkündür [62].

2.3.2.1 SDS-Gel Elektroforezi

Başarılı bir elektroforez yapılabilmesi için analizi yapılacak örnek onunla reaksiyon vermeyen ve örneğin elektrik alanda ilerlemesini engellemeyen bir zemin kullanmakla mümkün olur. Böyle bir kimyasal zemin polimerlerin özellikleri çalışılırken keşfedilmiş ve poliakrilamid olarak nitelendirilmiştir. Poliakrilamid yapabilmek için akrilamid, N,N'-metilen-bis (akrilamid), tetrametilendiamin (TEMED) ve amonyum persülfata ihtiyaç vardır. Ammonyum persülfat suda çözüldüğünde serbest radikal iyonları oluşturur. Eğer bu radikal iyonları akrilamid ile bir araya getirilirse serbest radikal akrilamid molekülü üzerine taşınır. Aktive edilmiş bu akrilamid molekülü çevresindeki diğer akrilamid molekülleri ile etkileşerek uzunca bir polimer oluşturur. Bu polimerlerin oluşturduğu çözelti hali hazırda her ne kadar yoğunca ise de jeli oluşturmaz. Jel oluşumu bu polimer parçalarının çapraz bağlanmasını gerektirir. Bu işlem N,N' -metilen-bis (akrilamid) tarafından sağlanır. Bu madde iki akrilamid molekülünün reaktif olmayan uçlarının kafa kafaya verdiği bir molekül olarak düşünülebilir.

Oluşan ağın içerisindeki boşlukların büyüklüğünü iki parametre belirler:

- Kullanılan akrilamid miktarı
- Çapraz bağlanmanın derecesi

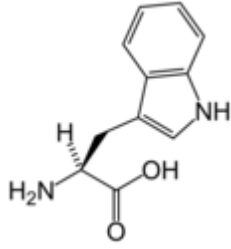
Toplam akrilamid miktarına ve bis akrilamid miktarına bağlı olarak jel üzerindeki boşlukların büyüklüğü ayarlanabilir.

Bu yüzden birçok jel formülasyonunda bis akrilamid konsantrasyonu % 5'e ayarlanıp sabit tutulurken jel üzerindeki boşlukların büyüklüğü akrilamid konsantrasyonu ile oynanarak belirlenir. TEMED'in jel karışımına eklenme nedeni onun katalizör görevi görmesindendir. Genelde % 0.4 oranında eklenen TEMED polimerleşme reaksiyonunu hızlandırır.

Polimerleşmenin doğasını anlamada tartışılacak son bir konuda polimerleşmenin içerisinde gerçekleştiği tampon sistemidir. Tampon sistemi ortamın pH'sını hem jel üzerinde hem de jel yürütme sistemi içerisinde korumada ve ayrıca akımın jel içerisinde geçmesi için gerekli elektrolit miktarını sağlamada kullanılır. Bu yüzden uygun bir tampon seçebilmek jel elektroforezinin sonuçları açısından önemlidir. Proteinlerin jel üzerinde uygun şekilde hareket edebilmeleri için SDS ile muamele edilmeleri gerekir. SDS globüler yapıdaki proteinleri açarak, onların düz bir zincir haline gelmelerini sağlar ve hepsini negatif yükler. Negatif yüklenen proteinler elektroforezde negatif kutuptan pozitif kutba doğru, molekül ağırlıklarına göre hareket ederler [63, 64].

2.3.3 Floresan Spektroskopisi

Triptofan, proteinler içindeki en yüksek floresans özelliğine sahip olan amino asittir. Triptofan o kadar yaygın bir şekilde kullanılır ki, "doğal protein floresans" terimi çoğu zaman triptofan floresansı olarak adlandırılır.



Şekil 2.14 Proteindeki triptofan kromoforu [65]

Sulu çözeltilerde triptofan, yaklaşık 350 nm boyutuna ve yaklaşık 60 nm enine sahip geniş bir floresans bandı sergilemektedir. Farklı araçlar kullanılarak fakat aynı koşullar altında hesaplanan triptofan floresans spektrumunun, spektrum ölçümlerindeki farklılıklar yüzünden düşük seviyelerde olmak kaydıyla farklı şekiller ve genişlikler (348-353 nm) kazandığını belirtmek gerekmektedir. Maalesef, yakın-ultraviyole bölgelerindeki aletlerin spektrum ölçümleri için günümüzde henüz genel geçerliliği olan standartlar bulunmamaktadır. Dipolar anlardaki (yaklaşık 4D) büyük artışın nedeni uyarım olduğundan dolayı, emisyonundaki değişiklikler daha kuvvetlidir. Bu değişiklik, kromofor dipolünü ve çözücü dipolleri içeren yönelim gevşeme süreçlerinden kaynaklanmaktadır. Triptofanın emisyonunun çevrenin hareketliliğine ve kutuplaşmasına karşı olan bu duyarlılığı, protein yapıları ve dinamikleri çalışmalarında triptofan floresansını önemli bir araç haline getirmektedir.

Hemen hemen bütün kutuplu protein grupları bir ölçüde triptofan floresansını söndürebilir. Fotoiyonlaşma, sistem arası çaprazlaşma, uyarılmış yapılanma, uyarılmış alan protonu ve uyarılmış alan elektron transferi muhtemel ışımasız süreçler arasında bulunmaktadır. Aspartik ve glutamik asit amino asitinin nötr halde bulunduklarında çok etkili dinamik söndürücülerdir. Lizin ve arginin de dinamik söndürücülerdir, fakat bunlar yüklü halde bulunduklarında daha etkilidirler. Düşük pH değerine sahip histidin, indol halkasıyla karmaşık dizilimli bir yapı oluşturarak söndürücü etkiye sahip olabilmektedir. Daha düşük etkinlikte olmak kaydıyla, protona sahip olmayan histidin de triptofan floresansını söndürebilmektedir. Tek sistemin de etkili bir söndürücü olmasına rağmen, disülfür de triptofan floresansının en güçlü söndürücülerinden biridir. Bunlara ek olarak, amit ve peptit gruplarının da dinamik söndürücüler olarak hareket ettikleri gösterilmiştir. Triptofan emisyonunun

ve hem emiliminin spektrum örtüşümünden dolayı, hem-içeren proteinlerde uzun-dizilimli enerji transferi sönümü çok önemlidir. Bu gibi etkiler protein floresansı analizlerini karmaşık hale getirse bile, bunlar çok önemli yapısal bilgilerin elde edilmesi süreçlerinde kullanılmaktadır. Örneğin, membrana bağlı sitokromda (b₅) bulunan Trp-109 hem-söndürücü iki protein alanı arasındaki mesafe dağılımının hesaplanmasında kullanılmaktadır.

Triptofan; oksijen, hidrojen peroksit, iyadür, bromür, akrilamit, süksinimit, dikloroasetamit, piridinyum hidroklorid, NO₃⁻, Cs²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺, Cd²⁺ ve Mn²⁺ gibi birçok madde tarafından meydana gelen söndürmelere karşı gerçekten çok duyarlıdır. Söndürücülere karşı olan bu duyarlılık, söndürme ölçümleri yardımıyla proteinlerdeki triptofan amino asitlerinin ulaşılabilirliğini ve erişilebilirliğinin belirlenmesini sağlamaktadır.

En yüksek floresans özelliğine sahip olan ikinci amino asit ise, tirozindir. Fakat tirozinin uygulanması çoğu zaman triptofan içermeyen proteinlerle sınırlıdır. Fenilalanin floresansı çok zayıftır ve protein çalışmalarında hemen hemen hiç kullanılmamaktadır. Diğer bir doğal floresans sınıfı, en bilindikleri NADH'e (indirgenmiş β -nikotinamid adenin dinükleotid) olan kofaktörleri içermektedir.

NADH'nin floresans özellikleri birçok çalışmanın konusu olmuştur. Sulu çözeltilerde, floresansın kuantum verimi çok düşüktür ve molekülün konformasyonundan dolayı floresansın yaşam süresi subnanosaniye dizini içerisindedir. Karaciğere bağlı olan alkol dehidrojenazı, floresansta ve emilimdeki maviye kayan bir spektruma neden olurken kuantum verimindeki artışında sebebidir. Substrat analog izobütiramit ile üçlü bir bileşik oluşumu bu etkinin boyutlarını daha da artırmaktadır. NADH'lerin yaşam süresi dağılımları, nanosaniye dizilim içinde değişiklik göstermektedir. NADH'lerin yaşam süresi dağılımları, ikili ve üçlü bileşiklerde uyarılmış bir alan reaksiyonunu ifade eden karmaşık bir değişime maruz kalmaktadır.

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 duyarlıdır.

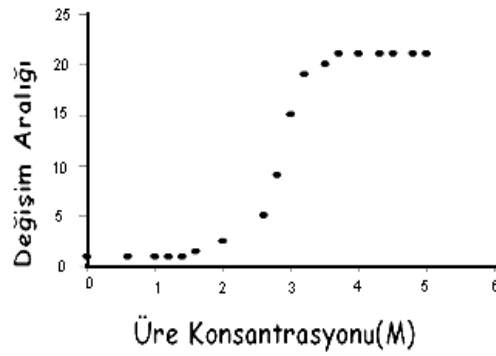
Floresans özelliklerdeki değişimler, protein katlanmış ve katlanmamış profillerinin kinetik ve denge düzenlemelerinde çok yaygın bir şekilde kullanılmasına rağmen bu değişimlerin fiziksel açıklamalarının detaylarına nadiren rastlanmaktadır.

Genel olarak proteinin katlanması iki basamaklı prosesle iyi bir şekilde anlatılmıştır ve floresans özelliğinin 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 birçok çalışmada floresans katlanma/katlanmama profilleri, özellikle triptofan artıklarının yerlerindeki yapısal değişikliklerden kaynaklandığından, iki basamaklı olmayan davranışla açıklanmaktadır [66]. 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 [67]. 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 [68]. Örneğin; bazı proteinlerde doğal durumda triptofan emisyonu yüksek oranda söndürülmektedir. Böylece katlanmamış floresans süresi ve şiddetinde büyük artışlara yol açmaktadır. Diğer yandan, diğer proteinlerde doğal durumda triptofan nispeten yüksek miktardaki ürün iken, katlanmamış durumda floresansı etkin şekilde söndürülmüştür. Yukarıdaki verilen referanslar, tek triptofan içeren proteinlerin floresans düşüşlerinin tek ekpononsiyel düşüşle nadiren açıklanabilir ve düşüş hızlarındaki bu heterojenliğin katlanmış yapılardaki konformasyonel durumların heterojenliğini 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 araştırılmadır.

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



Şekil 2.15 Hsp70'ün üre ile denaturasyon eğrisi [25]

Şekil 2.15'te görüldüğü üzere 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. 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 [69].

2.3.4 FTIR ve Protein Uygulamaları

Infrared (IR) spektroskopisi ile moleküllerin elektromanyetik enerji ile etkileşimde bulunulması sonucunda meydana gelen moleküler hareketleri belirlemektedir. Elektromanyetik spektrumun orta IR aralığı ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$), birçok işlevsel gruba ait titreşimlerden kaynaklanan absorpsiyon bantlarını içermektedir. IR spektrumundaki her bir absorpsiyon bandı, absorpsiyon dalga numarası, bant genişliği ve gücü ile tanımlanmaktadır. Bir absorbansa 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 Dönüştümlü 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 absorbansa 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 karbonhidratlar) hakkında bilgi edinmemizi sağlayan parmak izi gibi tanımlayıcı bir bilgidir. Ölçümlerin yüksek hassasiyeti ve doğruluğundan dolayı mikroorganizmaları zincir seviyesine kadar tiplendirebilir [70].

2.3.4.1 Kromoforlar

Peptit bağlarını içeren proteinlerin konformasyon çalışmalarında IR spektroskopisinden sıklıkla yararlanılmaktadır. Çalışmaların büyük çoğunluğu $1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ 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 [71, 72].

Amid-II bölgesi ($1500\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$) esas olarak N-H eğilme (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. $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ 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 [73].

Son zamanlarda kabul edilen sonuçlara göre α – heliks 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 [74,75]. 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 [73]. 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 [75]. Düzensiz polipeptitler genellikle $1640\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde absorpsiyon oluşturmaktadırlar [73]. 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 [76].

Bu zorluklara rağmen, Amid-I bölgesi uygun çözünürlük zenginleştirmesinden sonra proteinlerin ikinci yapı içeriklerinin analizinde etkin biçimde kullanılmaktadır [73]. 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 [76]. Amid-II bandının basit yapısal analizlerde kullanılması daha az kesinlikte bilgiler sağlar. Alfa heliks 1550 cm^{-1} e yakın bant 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 $1535\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$ yakınında absorpsiyon göstermektedirler.

Tüm kimyasal yapılar, titreşimsel absorpsiyon bantlarına 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 [77]. Bu bağların IR frekansları ve şiddetleri spektral olarak izole edilebildikleri, ölçülebildiklerinden ve bunların spektral özellikleri protein konformasyonu için duyarlı olduklarından proteinlerin katlanma durumlarının izlenmesinde kullanılabilmektedirler [78].

3. AMAÇ

Toxoplasma hem dünya ülkelerini hem de ülkemizi çok yüksek oranlarda etkileyen bir parazittir. Dünyada çok yaygın olarak görülmesi, AIDS hastalığının yaygınlaşması malign tümör tedavilerinde immun sistemi baskılayıcı ilaçların kullanılması ve organ nakli ameliyatlarının yaygınlaşması toxoplasmosis enfeksiyonuna dikkatleri çekmiş ve önemini artırmıştır [1,17]. Ayrıca *T. gondii* besin ve su kaynaklarını tehdit ettiğinden dolayı B biyoterörizm ajanı olarak kabul edilmektedir. Hsp70, proteinlerin üç boyutlu yapıya erişmesini ve proteinlerin bu yapılarını korumasını sağlayan, türler arasında evrensel olarak bulunan önemli bir proteindir [79]. Stres durumunda proteinlerin doğal yapısının korunmasını sağlar. *T. gondii* konak hücreyle etkileşime girdiğinde her iki organizma da (hem konak hem de parazit) strese girer. Bu stresle baş edebilmek için de Hsp70'lerden yararlanırlar ve bu adaptasyon sürecinde Hsp70'in hayati denecek kadar önemli rolü vardır. *T. gondii* Hsp70'in özelliklerinin bilinmesi bu parazitin fonksiyonelliğinin azaltılmasını, bu organizmanın sebep olduğu enfeksiyondan kaynaklanan can kayıplarının, sakatlıkların ve maddi hasarların yok edilmesini sağlayacaktır. Konakçı hücrelerin enfeksiyona karşı kendi Hsp70'lerini eksprese etmeleri ve *T.gondii*'nin bu metabolik strese kendi Hsp70'leri ile nasıl karşılık vereceğinin belirlenmesi, terapi ve immunizasyon için önemli bilgiler oluşturacaktır.

Bu amaçla bu çalışmada öncelikle *T. gondii*'nin RH suşundan Hsp70'in izolasyonu yapılacaktır. TgHsp70'in primer yapısı tespit edilip, önce cDNA eldesi, daha sonra PCR ile çoğaltma yapılarak, klonlama işlemleri sonrasında ekspresyon vektörüne yerleştirilecektir. Laboratuarda bulunan reçinelerle protein saflaştırılacak, proteinlerin farkı stres ve nükleotid ortamında ikincil yapılarında nasıl bir değişim/dayanıklılık gösterecekleri incelenecektir. Lusiferaz substrat protein olarak kullanılıp, Hsp70'in agregatları çözme dereceleri lüminesans sinyal ile hesaplanacaktır. Saflaştırılan protein çözeltileri ATPaz aktivitesini belirlemek amacıyla ATPaz reaksiyonu sonucunda substrat olan ATP'nin, ADP ve inorganik fosfata (Pi) parçalanmasıyla açığa çıkan Pi kolorimetrik olarak molibdat çöktürmesiyle belirlenecektir. Daha sonra saflaştırılan protein çözeltilerinin ADP

varlığında ve yokluğunda florimetrik deneylerle denatürasyon eğrileri oluşturulup Gibbs enerjileri hesaplanacaktır. Ayrıca FTIR ile Hsp70'in farklı nükleotidler ve ikincil yapı tayinleri yapılacaktır.

4. MATERİYAL-METOD

4.1 Deneylerin Yapıldığı Yer ve Tarih

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesinde Doç. Dr. Yusuf Tutar'ın laboratuvarında Şubat 2012- Aralık 2012 tarihleri arasında yapılmıştır.

4.2 Kullanılan Malzemeler

Total RNA izolasyon kiti, cDNA izolasyon kiti, 50 örneklik suş (*T. gondii*) PCR purification kiti (50), Agaroz jel ekstraksiyon kiti (50), Tag polimeraz 20 adet, dNTP 4 adet, DNA ladder, agaroz, PCR tüpü, 1,5 mL lik eppendorf, etanol, Ekspresyon vektörü, subklonlama vektörü, DH5 α ve BL21DE3 kompedan hücre, EtBr.

4.3 Kullanılan Cihazlar

Deneyde gradient PCR (Thermo Scientific), FPLC (ÄKTA FPLC), spektrofotometre (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), elektroforez cihazları (Labnet Inter national, Inc. Edison, Nj, USA Model power station 300-220V), beat-beater (Hamilton Beach) ve vortexler (Fisons Whırlı Mixer) kullanıldı.

4.4 *Toxoplasma Gondii* Suşunun Eldesi

T. gondii RH suşu Ankara Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezinden alındı. *T. gondii* trofozoitleri Ankara Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezinde sürekli olarak fare pasajı ile canlı tutulmaktadır. Suş olarak istendiğinde parazit sayısı 10^7 / 1 mL olacak şekilde 1 mL verilmektedir. Bu suş Pazartesi, Çarşamba ve Cuma günleri randevu ile temin edilmekte ve temin edilen suşun 24 saat içinde, karanlıkta ve soğuk zincir (+4 °C) kurallarına uyularak taşınması gerekmektedir.

4.5 *T. Gondii*'den Total RNA Eldesi

Total RNA bir organizmada bulunan tüm RNA'ların izole edilmesidir. Total RNA eldesinden sonra cDNA elde edebilmek için mRNA'ların ayrıştırılması gerekir. Ökaryotlarda mRNA'ların izolasyonu için poliA kuyruğu kullanılır. RNA izolasyonu 4 aşamada gerçekleştirilir:

1. Hücrelerin parçalanması
2. Nükleoproteinlerin denatürasyonu
3. Hücre kaynaklı ribonükleazların inaktivasyonu
4. RNA'nın ortamdaki DNA ve proteinlerden ayrılması

Ribonükleazların inaktivasyonu zordur. En önemli ribonükleaz kaynakları havadaki küfler ve kullanıcının elleridir. Bu nedenle izolasyon sırasında sterilizasyona çok dikkat edilmeli, izolasyondan hemen sonra RNA'lar hızlı şekilde -80 °C'de derin dondurucuya kaldırılmalıdır.

Total RNA eldesi için Roch firmasının High Pure Total RNA izolasyon kiti kullanıldı. İzolasyon basamakları şunlardır:

-*Toxoplasma gondii* suşundan 200 µL alınarak, üzerine 200 µL PBS ve 400 µL parçalama tamponu eklendi ve vortex yapıldı.

-Filtre tüpü toplama tüpüne takılarak, örnek üzerine maksimum 700 µL olacak şekilde pipetle eklendi.

-10.000 rpm de 15 s santrifüj yapıldı. Alttaki toplama tüpü atıldı, yeni toplama tüpü takıldı.

-Ayrı bir steril 1.5 mL tüpe 90 µL DNA parçalama kiti ve 10 µL DNase 1 eklendi ve güzelce karıştırıldı. Bu yeni karışım filtre tüpünün üzerine eklendi ve 15 dakika oda ısısında bekletildi.

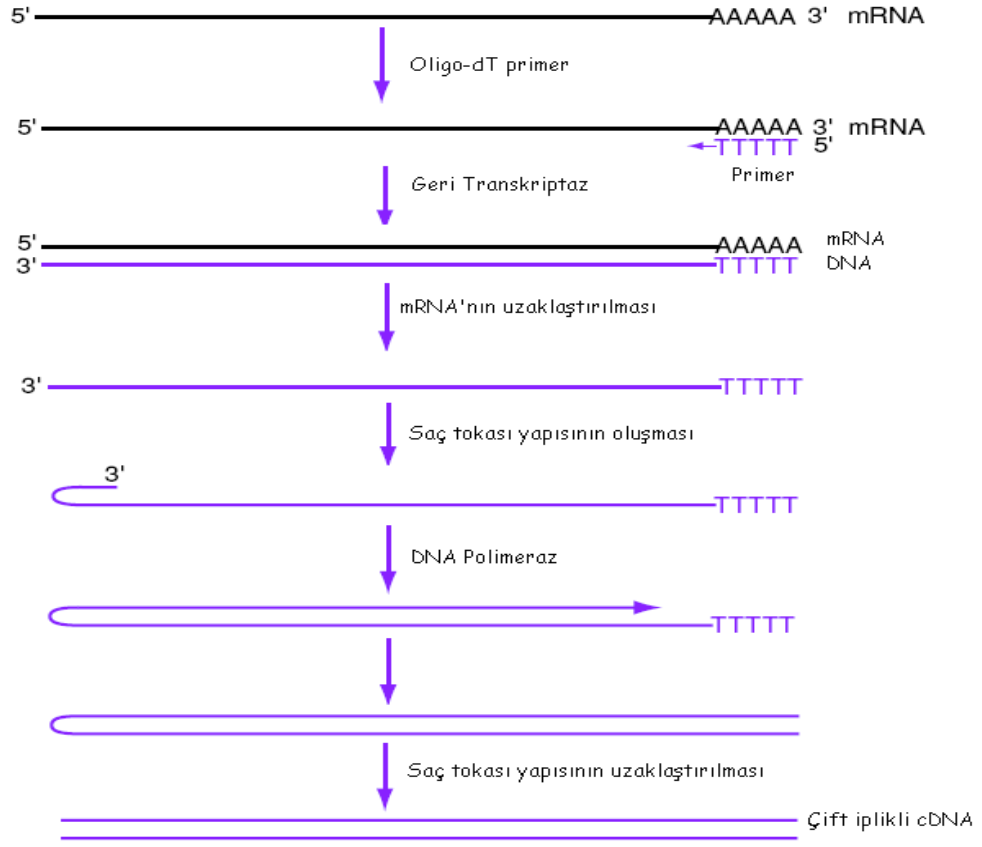
- Üzerine 500 µL yıkama tamponu 1 eklendi. 10.000 rpm de 15 s santrifüjlendi. Alttaki toplama tüpü atıldı, yeni toplama tüpü takıldı.

-Bunun üzerine 500 µL yıkama tamponu 2 eklenerek, 10.000 rpm de 15 s santrifüjlendi. Tekrar yeni toplama tüpü takılarak, 200 µL yıkama tamponu 2 eklendi ve maksimum hızda 2 dakika santrifüjlendi.

-Toplama tüpü atılarak, yeni toplama tüpü takıldı ve RNA'yı elde etmek için 75 µL Elüsyon Buffer eklenerek 10.000 rpm de 1dakika santrifüjlendi. Alttaki çözelti RNA'dır. RNA çabuk bozulan bir molekül olduğu için hızlı bir şekilde -80 °C'ye kaldırıldı.

4.6 cDNA Sentezi

Bir önceki basamakta elde ettiğimiz mRNA stabil olmadığından, DNA'ya çevrilmesi gerekir. mRNA'nın, cDNA'ya çevrilmesine ters transkripsiyon (Reverse Transcription) veya cDNA sentezi (cDNA Synthesis) adı verilir. Bu işlemi gerçekleştiren enzim ise ters transkriptaz (Reverse Transcriptase) olarak tanımlanır. Ters transkriptaz RNA viruslarında bulunmuştur. Ters transkriptaz mRNA'nın, poli-T kuyruğu olan bir primer kullanarak DNA kopyasını çıkarır. Bu kopya, cDNA'nın ilk zinciridir. Reaksiyon sonucu ortamda RNA-DNA melez molekülü bulunur. Ters transkriptaz enzimlerinin RNAaz aktivitesi ile mRNA zinciri uzaklaştırılır. Tek iplikli DNA molekülü 3' ucundan kendi üzerine katlanarak "Loop" primer oluşturur. Saç tokası "Hairpin" yapısının 3' ucundan ikinci zincir sentezlenir. S1 nukleaz saç tokası yapısını ortadan kaldırır. Şematik gösterimi Şekil 4.1'de verilmiştir: [80]



Şekil 4.1 cDNA sentezi

mRNA'dan cDNA elde etmek için Transcriptor First Strand cDNA sentez kiti kullanıldı. İzlenen basamaklar aşağıdaki gibidir:

_ 5 µL total RNA, 1 µL oligo-dT ve 7 µL su alınarak ependorf tüpüne kondu. Toplam hacim 13 µL olmalıdır. Bu karışım PCR cihazına konularak 65 °C de 15 dakika bekletildi.

- PCR'dan çıkan örnek hemen buza kondu. Ayrı bir ependorf alınarak 4 µL 5X reaksiyon tamponu, 0,5 µL RNase inhibitör, 2 µL dNTP miks ve 0,5 µL enzim alındı, hafif santrifüj yapıp bir önceki basamakta hazırlanan çözeltinin üzerine eklenerek çok hızlı bir şekilde PCR'a konuldu. PCR'da 55 °C de 30 dakika, 85 °C' de 5 dakika daha bekletildikten sonra cDNA sentezi tamamlanmış oldu. PCR'dan çıkan örneğimiz hemen buza konarak tepkime durduruldu. Örnek +4 °C' ye kaldırıldı. (+4

°C’de 1-2 hafta güvenle saklanabilir, uzun süre saklanacaksa -20 °C’ye kaldırılmalıdır, reaksiyon tüplerinde karışımlar hazırlanırken en son enzimler konulmalıdır.)

4.7 Primer Dizaynı

Elde ettiğimiz cDNA’lardan Hsp70’in gen bölgesinin çoğaltılması için uygun primerlerin dizayn edilmesi gereklidir. Bunun için *T. gondii*’nin genom veri tabanından (<http://www.ToxoDB.org/>) daha önce belirlenen protein dizilerinden biyoinformatik teknikler kullanılarak Hsp70’e ait gen bölgeleri karşılaştırıldı ve primerler belirlendi:

İleri (forward) Primer

5’ CACCATGGCGGACTCTCCTGCTGTG 3’

Geri (reverse) Primer

5’ ATCAACTTCCTCCACGGT 3’

Primerlerin dizaynında pET161 vektörü için, forward primerin 5’ ucuna CACC bazları eklendi, reverse primerde ise stop kodonu çıkarılarak tersten yazıldı, reverse primerin 5’ ucu CACC bazlarına komplementer olmamasına dikkat edildi. Primer dizayn edilirken Invitrogen firmasına ait Champion™ Pet Directional Topo Expression Kit kullanıcı kataloğundan yararlanıldı. Primerin bu şekilde tasarlanması, Hsp70 gen bölgesinin çoğaltılarak, vektöre başarılı bir şekilde aktarılmasını sağladı.

4.8 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

İlk kez 1985’de bilim dünyasına sunulduğundan itibaren polimeraz zincir reaksiyonu (PCR); hem araştırmada hem de klinik laboratuvarlarda tanıda yeni bir çıkış açmıştır. ABD’de Cetus şirketin’de çalışan Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilmiştir. DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir. Metod basitçe tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılmasıdır.

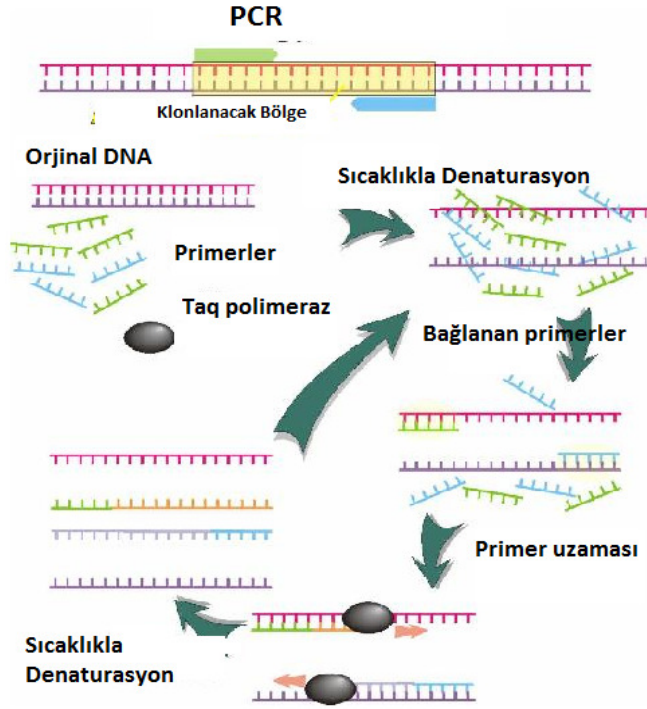
PCR yönteminin gelişmesinde en büyük katkısı Taq Polimeraz enziminin bulunması yapmıştır, çünkü bu enzim yüksek sıcaklıklara dayanabilen tek enzimdir. Bu enzim ilk olarak Yellowstone Milli Parkında bir kaplıcada yaşayan termofilik bir bakteriden izole edilmiştir. PCR temelde üç aşamadan oluşmuştur:

1- DNA Zincirinin Açılması (Denaturasyon): Kalıp DNA (template DNA), 92-95 °C’de 1-2 dakika tutularak çift sarmal yapıdaki DNA iplikçikleri birbirlerinden ayrılmaktadır.

2- Primerlerin Açılan DNA Zincirine Bağlanması (Annealing): Reaksiyon sıcaklığının, 37-65 °C’ye düşürülerek oligonükleotid primerlerinin açılan DNA zincirlerinin kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgeye yapışması işlemidir. Bu işlem, üretilecek baz uzunluğuna bağlı olarak 30-60 saniyede gerçekleşmektedir.

3- Primer Uzaması (Primer Extension): DNA zincirleri üzerine yapışan primerlerin DNA polimeraz enzimi (Taq DNA polymerase) vasıtasıyla uzatılmasıdır. Taq DNA polymerase 72 °C sıcaklıkta daha iyi çalıştığı için genel olarak tüm çoğaltma işlemleri bu sıcaklıkta yapılmaktadır.

Bu üç basamaktan oluşan işlem 25 ile 40 defa tekrar edilerek milyonlarca yeni DNA parçasığı çoğaltılır. Bu işlemler Şekil 4.2’de görselleştirilmiştir [80,81].



Şekil 4.2 PCR stratejisi [81]

PCR'ın geliştirilmesi, moleküler teknolojinin ve kullanım alanının genişlemesine yol açmıştır. Moleküler bir test olan PCR, yaygın olarak tıbbi ve biyolojik araştırma laboratuvarlarında kullanılmaktadır ve başlıca kullanım alanları şu şekilde sıralanabilir:

- Kalıtsal hastalıkların tanısı
- Prenatal tanı
- Klinik örneklerde patojen mikroorganizmaların tespiti
- Adli tıpta örneklerin genetik tiplendirilmesi
- Onkogenezin araştırılması
- Prob'ların oluşturulması, klonlama, gen ekspresyon araştırmaları,
- DNA dizi analizi ve DNA haritalaması, fazla miktarda DNA örneklerinin oluşturulması

- Bilinmeyen dizilerin tayini
- Geçmişte çok eski yıllara ait DNA'nın incelenmesi ve evrimin aydınlanması
- Restriksiyon Fragment Length Polimorfizm (RFLP) analizi
- DNA protein interaksiyonunun araştırılması (footprinting)

PCR reaksiyon karışımı (master mix) için gerekli olan malzemeler; kalıp DNA, deoksiniükleotid trifosfatlar (dNTP), primer çifti, Taq DNA polimeraz, magnezyum klorür ($MgCl_2$) , PCR buffer (tampon) ve distile sudur. PCR reaksiyon karışımı için gerekli olan malzemeler $-20\text{ }^{\circ}C$ 'de saklanmaktadır [82].

PCR, Fermantas kiti ile yapılmış olup, Çizelge 4.1'e göre karışımlar oluşturulmuştur.

Çizelge 4.1 PCR Karışımları

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Template DNA (50-100 ng/ μL)	5 μL
10X Buffer	2,5 μL
d NTP miks (her biri 2,5 M)	2,5 μL
$MgCl_2$ (25mM)	1,5 μL
Forward primer (10 pmol)	1 μL
Reverse primer (10 pmol)	1 μL
Taq polimeraz (5 u/ μL)	0.5 μL
dd H_2O	11 μL
	Total 25 μL

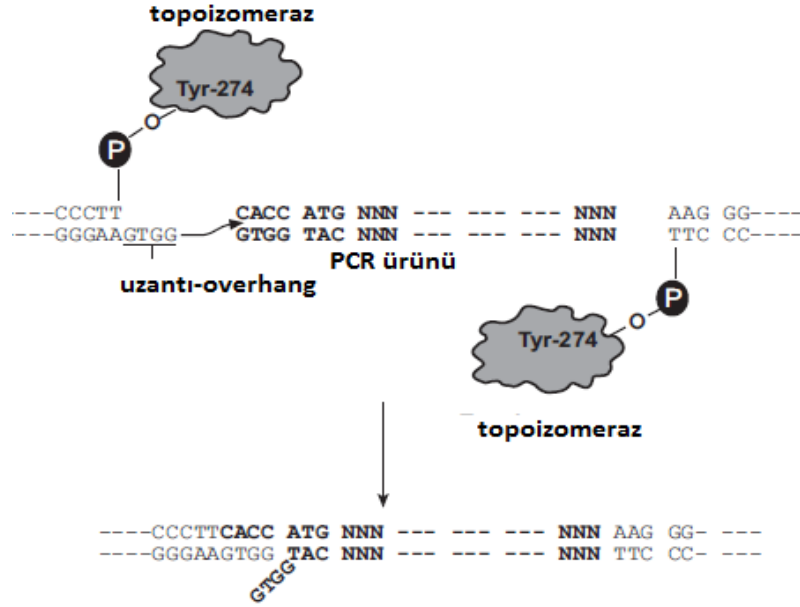
Sıcaklık/Süre	Safha	Döngü Sayısı
95 °C 5 dakika	Ön Denaturasyon	-
95 °C 30 s	Denaturasyon	-
57-60°C 45 s	Primerlerin Bağlanması	35 döngü
72 °C 42 s	Uzama	-
72 °C 7 dakika	Son Uzama	-

4.9 Amplifiye Edilen DNA'nın Tespiti

PCR sonrası amplifiye işleminin gerçekleşip gerçekleşmediğinin anlaşılması için jel elektroforez yapıldı. Bunun için 50 mL 1X TAE (Tris, Asetat, EDTA) içerisine 0,5 gr agaroz eklenerek, mikrodalga fırında misel görüntüsü kalmayana kadar ısıtıldı, daha sonra soğumaya bırakıldı, hafifçe soğuyan jelin içerisine 15 µL ethidium bromid eklenerek, tarakları yerleştirilmiş olan tanka döküldü. Yarım saat donması beklendikten sonra taraklar çıkarılarak, 6X yükleme tamponundan 1 µL alındı ve üzerine 5 µL PCR ürünü konarak kuyucuklara yüklendi. Ayrıca bir kuyucuğa da marker yüklenerek, 120 voltda 1 saat yürütüldü.

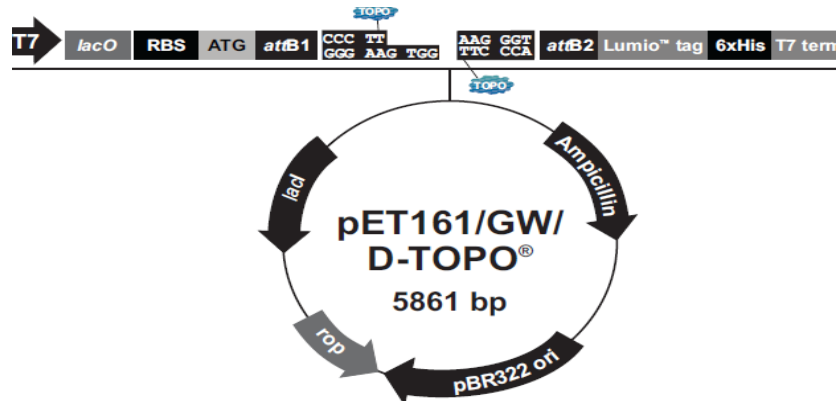
4.10 Çoğaltılan DNA'nın pET 161 Ekspresyon Vektörüne Aktarımı

Klonlamada ekspresyon vektörünün kullanılması, klonlamanın doğrudan yapılmasını sağlamaktadır. Diğer vektör tiplerinde olduğu gibi restriksiyon enzimlerine, ligazlara gerek kalmaz. Klonlama, topoizomerazın DNA çift sarmalını aşırı torsiyondan korumak amacıyla CCCTT nükleotid dizisinden kesmesi ve tekrar birleştirmesi esasına dayanır. Şekil 4.3'te bu durum görselleştirilmiştir:



Şekil 4.3 Topoizomeraz'ın çalışma prensibi [83]

CCCTT nükleotid bölgesinden vektörü kesen topoizomeraz, 5' ucuna CACC nükleotidi eklenmiş PCR ürününü vektöre bağlayarak, herhangi bir ekstra restriksiyon ya da ligasyon işlemine gerek kalmadan klonlanacak geni vektöre aktarır. Vektör 5861 bp taşır ve üzerinde klonlamadan sonra rekombinant olan vektörlerin seçilimine izin verecek ampisilin direnç geni ve yine klonlanan genin ekspresyonunun gerçekleşmesini sağlayacak T7 promoter bölgeleri taşır.



Şekil 4.4 pET 161 vektör haritası [83]

PCR’da çoğaltılan ve jel elektroforezi ile doğrulanan gen bölgesinin vektöre aktarımı için pET161 ekspresyon vektörü kullanıldı. Aktarım yapılırken öncelikle TOPO klonlama reaksiyon karışımı hazırlandı. Bu karışımda PCR ürünü ile vektörün 0.5:1 ile 2:1 oranında bulunmasına dikkat edildi. Reaksiyon, aşağıdaki protokole göre hazırlanarak, hafifçe karıştırılıp, 5 dakika oda sıcaklığında inkube edildi. Böylece PCR ürünü vektöre klonlanmış oldu.

Çizelge 4.2 Klonlama protokolü

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Taze PCR ürünü	0,5-4 µl
Tuz solüsyonu	1 µl
Steril su	5 µl
TOPO vektör	1 µl
Total hacim	6 µl

4.11 Ekspresyon Vektörünün Kompedan *E.coli* Hücrelerine Aktarımı

Transformasyon işlemi için 42 °C su banyosu, 37 °C inkübatör, LB plate (100 µg/mL amfisilin), oda sıcaklığına getirilmiş S.O.C ve kompedan *E.coli* hücrelerinin buzda çözündürülmesi gerekmektedir. Hazırlıklar tamamlandıktan sonra 3 µL Topo klonlama reaksiyon karışımı ve bir tüp *E.coli* karıştırıldı. Buzda 5-10 dakika inkübe edildikten sonra 42 °C su banyosunda 30 s bekletildi ve hemen buza kondu. Buzdayken üzerine 250 µL SOC eklenip, 37 °C de 1 saat 200 rpm çalkalamalı inkübatöre yatay şekilde kondu. Bir saatin sonunda 100-200 µL alınıp LB plate’e yayılarak bir gece 37 °C’de inkübasyona bırakıldı.

4.12 LB Besiyeri ve Plate Hazırlanması

Kompedan *E.coli* hücrelerinin çoğaltılması için LB besiyeri hazırlandı. Her 1 L için 10 g tripton, 5 g maya ve 10 g NaCl, 950 mL suda çözündürüldü ve pH’ı NaOH ile 7.0 ayarlandı ve üzerine 15 g agar eklenerek 1L’ye tamamlandı. Otoklavda 20

dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda otoklavdan çıkarılarak sıcaklığın yaklaşık 55 °C'ye ulaşması beklendi ve içerisine 100 µg/mL amfisilin eklenerek platelelere döküldü. İnkübatörde bir gece bekletildi.

4.13 Protein Saflaştırılması ve Yapı Tayinleri

Protein saflaştırması, karmaşık bir karışımdan tek bir tip proteini izole etmek için izlenen bir seri süreçtir. İlgi duyulan bir proteinin işlevi, yapısı ve diğer proteinlerle etkileşiminin karakterizasyonu için protein saflaştırması şarttır. Başlangıç malzemesi genelde bir biyolojik doku veya mikrobiyal kültürdür. Saflaştırma sürecinin çeşitli adımları sonucunda, protein içinde bulunduğu ortamdan kurtarılır, karışımda bulunan protein ve protein olmayan kısımlar birbirinden ayrılır ve sonunda istenen protein tüm diğer proteinlerden ayrıştırılır. Bir proteinin diğer tüm proteinlerden ayırtmak, protein saflaştırmasının en zahmetli yanıdır. Ayırıştırma adımlarında proteinlerdeki büyüklük, fizikokimyasal özellikler, bağlanma affinitesi ve biyolojik etkinlik gibi unsurlardaki farklılıklardan yararlanılır.

4.13.1 Küçük ve Büyük Hacimde Kültür Hazırlanması

10 mL LB hazırlanıp otoklavlandı. Yaklaşık 55 °C'ye kadar sıcaklığın düşmesi beklendikten sonra 10 µL amfisilin (50 mg/mL) eklenip, içine bir miktar daha önce platelelere ekilen transformat hücre, steril kürdan yardımıyla konulduktan sonra 37 °C'de bir gece çalkalandı. Ertesi gün şişede bulanma görüldü. Bulanma bize hücrelerin uygun şekilde çoğaldığını gösterdi. Aynı bir kapta 1L LB hazırlanıp, otoklava kondu. Biraz soğuduktan sonra 1 mL amfisilin (50 mg/mL) eklendi ve küçük kültürde büyüyen hücreler üzerine eklendi. $O.D_{550} = 0.6-0.7$ olana kadar 37 °C de çalkalandı. Optik dansitede 0.6-0.7 değerinin yakalanması hücrelerin ölüm fazına geçmeden, en yüksek verimde üredikleri dönemin yakalanması açısından önemlidir. Aksi halde kültür biraz daha bekletilirse hücreler ölüm fazına geçecek bu da istediğimiz proteinin verimini düşürecektir. Bu değere ulaşıldığı zaman 1L için 2 mL IPTG (0.1 M) eklenip 37 °C de 4-5 saat daha çalkalandı. Büyüyen hücreler 5000 rpm de 10 dakika 4 °C de santrifüjlendi. Santrifüj sonunda dipte kalan pelet plazmiti taşıyan hücrelerdir. Bu hücreler -20 °C de donduruldu.

4.13.2 Hücrelerin Parçalanması

Donmuş haldeki hücrelerin çözülmesi için üzerlerine 1 mL NSB (no salt buffer-100 mL 0,5M Na₃PO₄, 4 mL EDTA, 50 mL gliserol, 1L su, pH 7) eklenerek, pipetajla hücrelerin tamamen çözülmesi sağlandı. Bu karışımdan 50 µL alınıp ependorf tüpüne konarak, 15000 rpm de 5 dakika santrifüjlendi. Sıvı kısım atılarak üzerine 200 µL SDS konuldu ve vortekslendi. Sıcaklığı 70 °C olan su banyosunda 10 dakika bekletildi. Tekrar maksimum hızda 10 dakika santrifüjlendi ve SDS PAGE analizi için hazırlandı. (Amaç kolondan saflaştırma yapılmadan önce proteinin doğrulanmasıdır).

4.13.3 SDS PAGE Analizi

Jelin hazırlanması:

SDS-PAGE jeli hazırlanmadan önce, camları su ve deterjan yardımıyla temizlendi. Yüzeyinde hiçbir kalıntı kalmaması için % 70'lik alkol ile silindi. Daha sonra BIORAD Miniprotein dikey elektroforez sistemi kuruldu. Ayırma jeli (% 10'luk separating gel) hazırlanarak camların arasına 1 mL'lik pipet aracılığıyla, yukarıdan 2 cm boşluk kalacak şekilde döküldü ve herhangi bir kabarcık oluşumunun önlenmesi ve düz bir zemin elde edilebilmesi için üzerine bir miktar suya doymuş bütanol eklendi. Ayırma jelinin polimerize olması için yaklaşık yarım saat beklendikten sonra üst jel (% 4'lük stacking gel) hazırlandı. Suya doymuş bütanol distile su ile yıkandıktan sonra, camların arasındaki su kalıntıları kurutma kağıdı kullanılarak alındı ve üst jel camların arasına döküldü. Hemen taraklar yerleştirildi ve yaklaşık yarım saat jelin donması beklendi. Taraklar dikkatlice çıkarıldı.

Kuyucuklar distile su ile yıkanarak temizlendi. Cam tabakalar içerisinde polimerize olmuş jel tank içerisine yerleştirildi ve tank yaklaşık 3 cm yüksekliğe kadar 1X SDS-PAGE yürütme tamponu (6 gr Tris, 28.8 gr Glisin, 0.2 gr SDS ve 2 L'ye kadar su) ile dolduruldu

Çizelge 4.3 Jellerin hazırlanması

Alt Jel (Ayırma Jeli)	Üst Jel (Sıkılaştırma Jeli)
4 mL distile su	3 mL distile su
2.50 mL 1,5 M Tris pH 8.8	1.25 mL 0.5M Tris pH 6.8
3.34 mL % 30 Akrilamid	650 µL % 30 Akrilamid
100 µL % 10 SDS	25 µL % 10 APS
50 µL % 10 APS	50 µL % 10 SDS
10 µL TEMED	12 µL TEMED

Örneklerin yüklenmesi:

Eppendorf tüplerine SDS-PAGE için ayrılmış protein örnekleri,

50 µL örnek + 50 µL 2X yükleme tamponu

50 µL BSA + 50 µL 2X yükleme tamponu

olacak şekilde hazırlanıp kuyucuklara yüklendi. Yükleme tamponu, 1 mL 0.5 M Tris, 1 mL % 10 SDS, 0.5 mL β-merkaptoetanol, 1mL gliserol, 0.0065 gr EDTA, 0.0004 gr bromfenol mavisi ve 10 mL'ye ulaşacak kadar su içermektedir.

Örnekler kuyucuklara yerleştirildikten sonra jel 150-180 volt arasında bir voltaj seçilerek yaklaşık 45 dakika yürütüldü.

Proteinlerin jel üzerinde görünür hale gelmesi-jelin boyanması:

Elektroforez bittikten sonra jel sistem üzerinden dikkatlice çıkarıldı. Ardından jel boyama çözeltisinin içerisine konularak, çalkalayıcıda iyice boyanana kadar bekletildi. Boyama işleminden sonra jel arıtma çözeltisinde bir süre bekletildi ve bantların en iyi görüldüğü noktada distile su ile ıslatılmış Whatman kağıdı üzerinde, jelatin film ile sarılarak 80 °C'ta 1,5 saat süreyle kurutuldu.

Boyama çözeltisi: 200 mL Metanol, 50 mL Asetik asit, 0.5 gr % 0.25'lik Coomassie blue ve 250 mL distile su

Aritma çözeltisi: 200 mL Metanol, 50 mL Asetik asit ve 250 mL distile su

4.13.4 Hücrelerin Parçalanması

LB besiyerinde büyütülen hücreler 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edidi ve elde edilen çökelek parçalama işlemi için hazırlandı. Çökelek "Breaking Buffer" (50 mM Tris pH: 6,8, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA ve %5 gliserol.) çözeltisi ile çözülerek mekanik parçalayıcı'ya yerleştirildi. Parçalayıcıya çözelti konulduktan sonra hücreleri parçalaması için 0,5 mm'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.

4.13.5 Hsp70 Proteininin Saflaştırılması

Proteinler üç aşamalı saflaştırma işleminden geçirildi (DEAE, hidrofobik kolon ve jel filtrasyonu). Alkolle 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 kolana 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 sıyrılması 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 280 nm

dalga boyunda absorpsiyonları okundu. Yüksek değerli pikler veren fraksiyonlar poliakrilamid jele yüklendi (SDS-PAGE).

4.13.6 Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) ile *T. gondii* Hsp70'inin Yapı Analizi

Elde edilen protein çözeltisi, hazırlanan peletlerin (0,1 g Potasyum Bromür (KBr) havanda dövüldü uygun presleme kabına alınarak 10 bar'lık basınç altında preslendi) üzerine damlatılarak FTIR spektroskopisinde Amid-I bölgesinde (1700-1600 cm⁻¹) spektrumu alındı. Bu yolla Hsp70 proteininin Amid-I bölgesinde spektrumları alındı. Protein için 1,8 M'lık ATP ve 0,95 M'lık ADP varlığında bu deneyler tekrarlandı.

Referans proteinler tümü ile α -heliks, tümü ile β -yaprak 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 [25].

4.13.7 TgHsp70 Proteinlerinin Florimetre Spektroskopisi ile Denetürasyon Deneyleri

Saflaştırılarak elde edilen proteine 6 M'lık üre çözeltisi eklendi. Florimetrede 290 nm'de uyarılarak 300–500 floresans aralığında ve 5–5 nm yarık aralığında emisyon spektrumu alındı. Daha sonra bu çözeltilere 1.8 M'lık ATP (adenozin tri fosfat) ve 0.95 M'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.

$$F_u = (Y_F - Y) / (Y_F - Y_U) \quad F_F = (Y - Y_U) / (Y_F - Y_U)$$

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.

$$K = FU / FF$$

Son olarak da hesaplanan K değerlerinden ΔG değerleri hesaplandı.

$$\Delta G = -RT \ln K$$

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

4.13.8 Söndürme (Quenching)

Hsp70 proteininde 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 gömölüp ne kadarının yüzeye çıkacağı hesaplandı ve yapısal değişiklikler tespit edildi. Ksv (Stern-Volmer) değerleri olası konformasyonel değişikliklerde protein kromoforlarının çevresindeki değişimlerin bir göstergesidir.

$$F_0 / F = 1 + K_{sv} (Q)$$

- F_0 = Protein floresansı
- F = Söndürücü eklendikten sonraki floresansı
- K = Söndürme sabiti
- Q = Söndürücü derişimi [25]

4.13.9 Lusiferaz Katlanma ve Termal Agregasyon Deneyleri

TgHsp70'in farklı sıcaklıklardaki agregasyon deneyleri yapıldı. Deneyler FPLC ile 321 nm de jel filtrasyon kolonu kullanılarak yapılmıştır. Sonrasında, 5 M'lık üre çözeltisi hazırlandı. Üre ile denatüre edilen lusiferaz, ekstrakte edilen ve

DEAE iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan Hsp70'ler ile seyreltilerek lüsiferaz test çözeltisinde renaturasyonu hesaplanmıştır. Kör olarak Bovine Serum Albumin (BSA) kullanılmıştır. Lüsiferaz kemilüminesans özelliği olduğu için katlanma oranı lüminometre (Biofix lumi-10 Macherey–Nagel luminometer) ile takip edildi [32].

5. BULGULAR

5.1 TgHsp70 Proteininin Klonlama Çalışmaları ve Saflaştırılması

T. gondii strese bağlı Hsp70 dizisi daha önce belirlenmiş ve NCBI veri tabanına yüklenmiştir. Stres olmayan ortamda Hsp70 transcripti (cognate form) elde edilmesi için *T. Gondii* RH suşu total RNA'sı elde edildikten sonra cDNA'sı elde edilmiştir (Roche). Daha sonra dizayn edilen dejenere primerler ile PCR yapılarak Hsp70 elde edilmiştir:

```
ATGGCGGACTCTCCTGCTGTGGGTATTGACCTTGGCACCACCTATTCT
TGCGTAGGTGTGTGGAAGAACGATGCTGTGGAAATCATCGCGAACGA
CCAGGTCCACAGGACGACCCCGTCCTACGTCGCGTTCACCGACACGG
AGAGACTTGTCGGTGATGCTGCGAAGAACCAAGTCGCACGCAACCCG
GAAAACACCATTTTTCGATGCCAAGCGCCTAATCGGTCGCAAGTTTGAT
GATCCCTCGGTCCAGTCGGACATGAAGCATTGGCCATTCAAGGTCATT
GCTGGTCCGGGAGACAAGCCCCTCATTGAAGTCACGTACCAGGGAGA
GAAGAAGACGTTCCACCCTGAAGAGGTTTCCGCCATGGTTTTGGGCA
AAATGAAGGAAATCGCGGAGGCTTACCTCGGCAAGGAAGTGAAGGA
GGCCGTCATTACCGTTCCTGCGTACTTCAACGATTCGCAGCGTCAGGC
TACCAAGGATGCTGGTACTATTGCCGGCCTCAGCGTCCTCCGCATTAT
CAACGAGCCCACAGCGGCTGCCATTGCTTATGGTCTGGACAAGAAGG
GCTGCGGTGAGATGAACGTCCTCATCTTCGACATGGGTGGCGGTACGT
TCGATGTGTCGCTGCTTACAATCGAAGACGGTATCTTTGAAGTCAAGG
CCACCGCTGGTGACACCCATCTTGGTGGTGAAGATTTGACAACCGTT
TGGTGGACTTCTGCGTCCAGGACTTCAAGCGCAAGAACCGCGGAAAG
GACATCAGCACCAACAGCCGTGCCCTTCGTCGCCTGCGTACTCAGTGC
TGGCGCACCAAGAGAACTCTCTTAGCAGCACTCAGGCAACCATCGA
AATTGACTCTCTTTTGGAGGGCATTGACTACTCTGTGTCTATCTCTCGT
GCGCGCTTTGAGGAGCTTTGCATGGACTACTTCCGCAACTCCCTGTTG
CCCGTCGAGAAGGTCCTCAAGGACTCTGGTATTGACAAGCGCTCGGT
CAGCGAAGTTGTGTTGGTTGGTGGATCTACCCGTATCCCCAAGATTCA
```

GCAGCTCATCACTGACTTCTTCAACGGAAAGGAGCCGTGCAGGTCGA
TCAACCCCGATGAGGCCGTTGCGTACGGTGCTGCTGTCCAGGCACCG
ATCTTGAAGGGAGTTACCAGCTCTCAGGTGCAGGATTTGCTTCTTCTG
GATGTTGCGCCTCTCTCTCTCGGTCTGGAGACAGCTGGTGGTGTTCATG
ACCAAGCTGATTGAAAGAAACACAACGATCCCGACCAAGAAGTCTCA
GACCTTCACCACGTACGCGGACAACCAGCCAGGAGTGCTGATTCAGG
TGTACGAAGGTGAGCGTGCGATGACCAAAGACAACAACCTCCTGGGC
AAATTCCACCTGGATGGTATCCCCCCCCGCCCCCGTGGTGTCCCCAA
ATCGAAGTCACTTTCGATATCGACGCTAACGGTATCATGAACGTCACA
GCGCAAGACAAGTCCACCGGAAAGAGCAACCAAATCACCATCACGTA
CGACAAGGGCCGCCTCAGTGCGTCCGAAATCGACCGCATGGTGCAAG
AGGCAGAGAAGTACAAAGCCGAAGACGAACAGAACAAGCACCGTGT
GGAGGCGAAGAATGGCCTGCTAACTACTGCTACCACATGAGACAGA
CCTTGGATGACGAGAAGCTTAAGGACAAGATCTCCTCTGAGGACAGA
GACACTGCCAACAAGGCCATCCAGGAGGCCCTTGACTGGCTGGACAA
GAACCAACTAGCAGAGAAGGAGGAATTCGAGGCGAAGCAGAAGGAA
GTTGAGTCCGTCTGCACACCAATCATCACCAAGCTGTACCAGGCAGGT
GCGGCTGCAGGTGGCATGCCTGCCGGTATGGGCGGTATGCCTGGTGG
TATGGGCGGTATGCCTGGTGGTATGGGCGGTATGCCCCGGCGGGATGG
GCGGTATGCTCGGTGCAGGCATGGGAGGCTCTGGCGGCCCCACCGTG
GAGGAAGTTGATTAA

Şekil 5.1 TgHsp70 RH suşu dizisi

Elde edilen diziden yola çıkılarak Hsp70'e uygun primerler dizayn edilmiştir:

İleri primer **5'-CACC ATGGCGGACTCTCCTGCTGTG-3'**

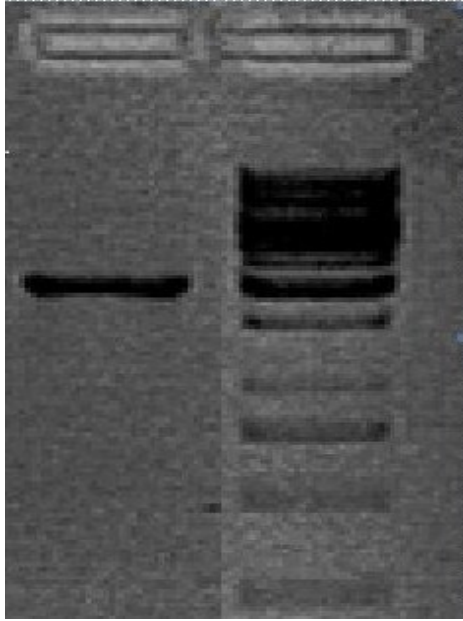
Geri primer **5'- ATCAACTTCCTCCACGGT-3'**

İleri primer **5'- CCIGCITA[T/C]TT[T/C]AA[T/C]GA -3'**

Geri primer **5'- GCIACIGC[T/C]TC[A/G]TCIGG -3'**

Şekil 5.2 Hsp70 primerleri

Primer dizaynından sonra PCR yapılarak TgHsp70 PCR ürünü elde edildi. PCR ürünü pET161 ekspresyon vektörüne aktarıldı ve vektör kompedan *E. coli* hücrelerine transforme edildi. Transformasyon yapılan *Escherichia coli* hücreleri LB kültürde çoğaltıldı. Yeterince çoğalan hücreler uygun şekilde parçalandı ve üç aşamalı (DEAE, hidrofobik kolon ve jel filtrasyonu) saflaştırma işleminden geçirildi. Elde edilen protein örneklerinin UV-spektroskopisinde 280 nm dalga boyunda absorpsiyonları okunarak, yüksek değerli pikler veren fraksiyonların son kez SDS-PAGE ile saflıkları kontrol edilip, sonraki biyokimyasal deneylere geçildi. Elde edilen jel görüntüsü Şekil 5.3'te görülmektedir:



Şekil 5.3 Hsp70 agaroz jel görüntüsü



Şekil 5.4 TgHsp70 SDS-PAGE jel görüntüsü

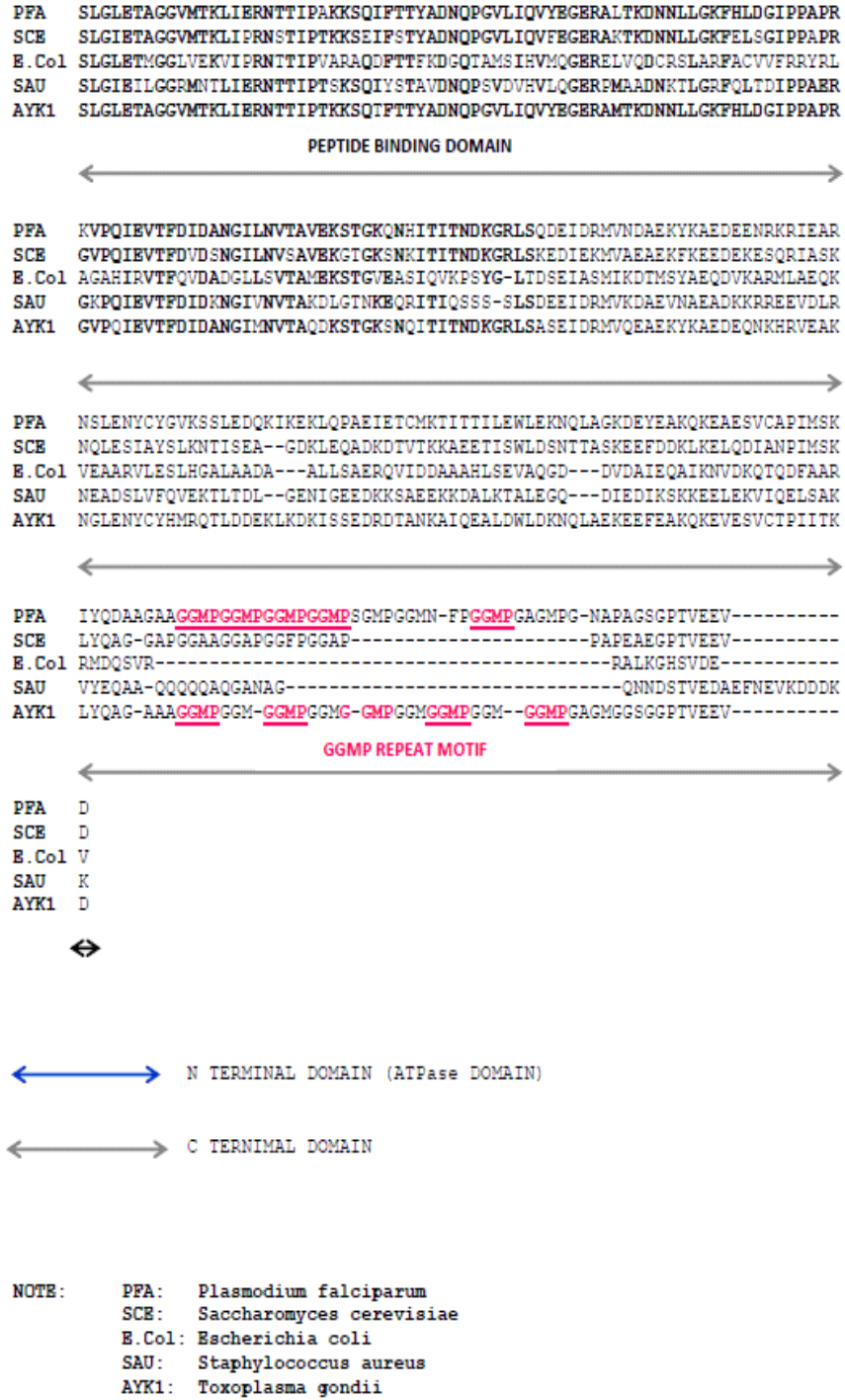
5.2 TgHsp70 Proteininin Diğer Türlerle Karşılaştırılması

TgHsp70 proteini (AYK1), *Saccharomyces cerevisiae*, *Plasmodium falciparum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureas* türlerinde bulunan homologları ile karşılaştırıldı ve motiflerinin ve domainlerinin büyük oranda korunduğu belirlendi. Evrim boyunca Hsp'lerdeki korunmuşluk oranı çok yüksekliği Şekil 5.5'te gösterilmiştir:

HSP 70 DİZİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

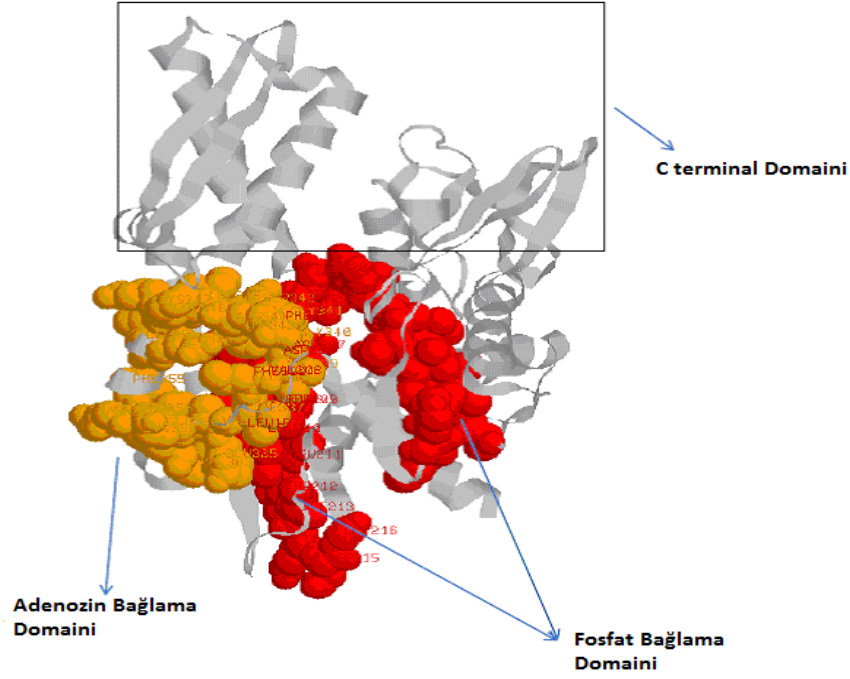


Şekil 5.5 TgHsp70'in diğer türlerdeki homologları ile karşılaştırılması



Şekil 5.6 TgHsp70'in diğer türlerdeki homologları ile karşılaştırılması

Farklı türlerle yapılan karşılaştırmalar sonucu, TgHsp70'inin modelleme yapılarak üçüncül yapısı (Şekil 5.6) belirlendi.



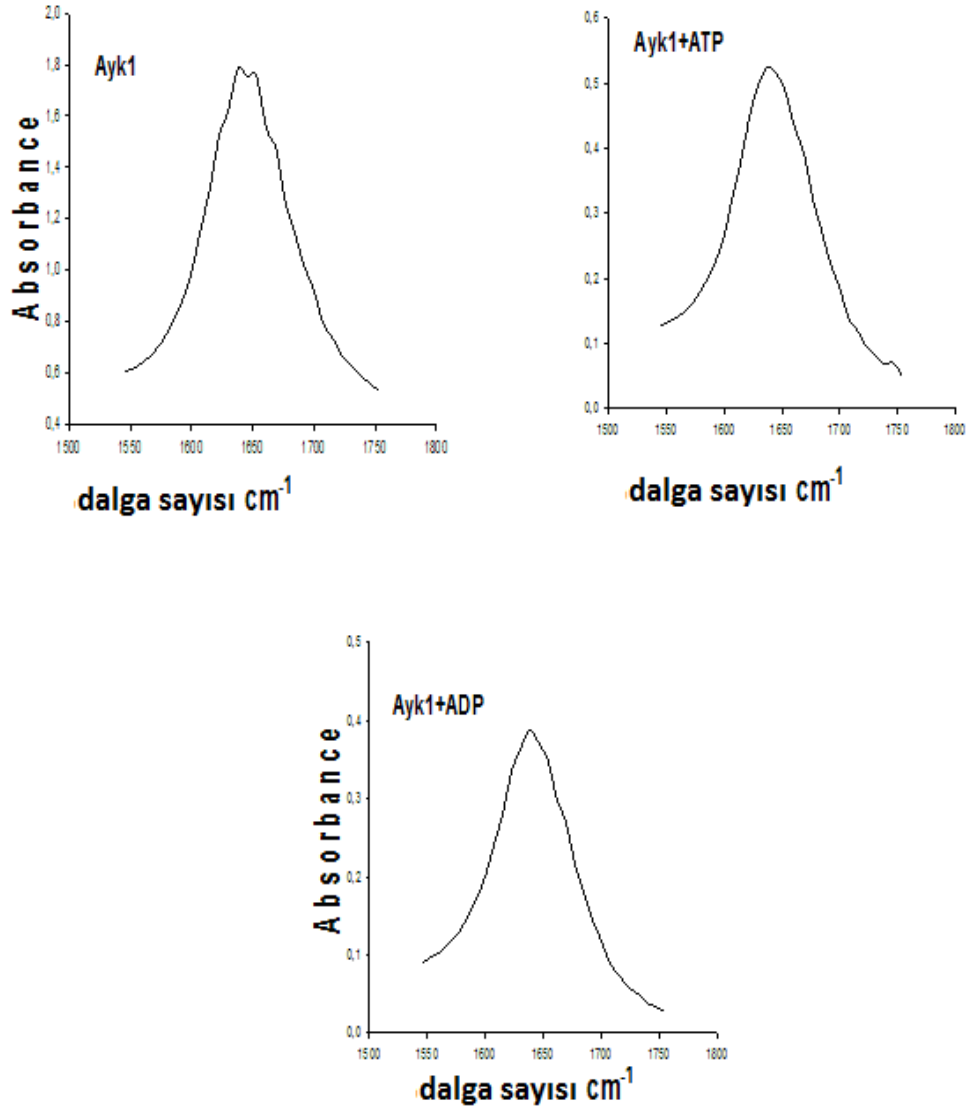
Şekil 5.7 Hsp70 proteininin (AYK1) modelleme ile bulunan üçüncül yapısı

5.3 TgHsp70 FTIR Deneyleri

Proteinin ikincil yapıları amid bölgesinde ışığı absorbe ederler. Amid I bölgesi ($1690-1600\text{ cm}^{-1}$) C=O gerilimi ve Amid II ($1575-1480\text{ cm}^{-1}$) CN gerilimi, NH eğilimi ile absorpsiyona katkı sağlarlar. Proteinin ikincil yapılarının absorbans bantları birbirleri ile örtüştüğü için tek bir band oluştursa da, matematiksel hesaplarla absorpsiyon spektrumu komponentlerine ayrılabilir. Proteinin ikincil yapısına yapılan herhangi bir pertürbasyon etki öncesi ve sonrası ikincil yapı yüzdeleri karşılaştırılarak FTIR ile gösterilebilir. TgHsp70 proteinine ATP ve ADP nükleotitleri bağlandığı için Amid I bantları çalışılarak konformasyonel değişimler gözlenmiştir. ATP bağlanması ile Hsp proteinlerinde β -tabakaların α -sarmal ve coil yapılarına çevrildikleri ve ikincil yapıların yüzdelерinin değişimi hesaplanmıştır. Bu yüzdelер ADP bağlanması ile apo yapısına yakın ikincil yapı yüzdeleri vermektedirler.

Spektrumlar Perkin-Elmer FTIR spektroskopi cihazı ile 1 cm^{-1} rezolüsyonda ve KBr peletlerinin üzerinde amid I bölgesinde oda sıcaklığında çalışılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda proteinler ile spektrumlar alınmış ve proteinler döteryumlu su ile diyaliz edilmiştir. Tampon çözelti olarak pH: 7.4, 30 mM fosfat tamponu kullanılmıştır. Döteryum proteinlerin su bandından gelen girişimleri önlemesini sağlamıştır. ATP ve ADP konsantrasyonları 2 mM'a ayarlanmıştır. Spektrumlar cihazın yazılımı ile smooth edilmiş fakat normalize edilmemiştir. İkincil yapı tayini için referans protein olarak Hemoglobin (% 76 α -sarmal, % 13 β -tabaka, % 11 rasgele, % 0 β -dönüşü), Concanavalin A (% 3 α -sarmal, % 44 β -tabaka, % 28 rasgele, % 25 β -dönüşü), Lizozim (%36 α -sarmal, % 10 β -tabaka, % 19 rasgele, % 36 β -dönüşü), Kimotripsin (% 11 α -sarmal, % 35 β -tabaka, % 30 rasgele, % 25 β -dönüşü) kullanılmıştır.

Analizler nükleotid varlığında proteinlerin ikincil yapılarında değişimler olduğunu göstermiştir.



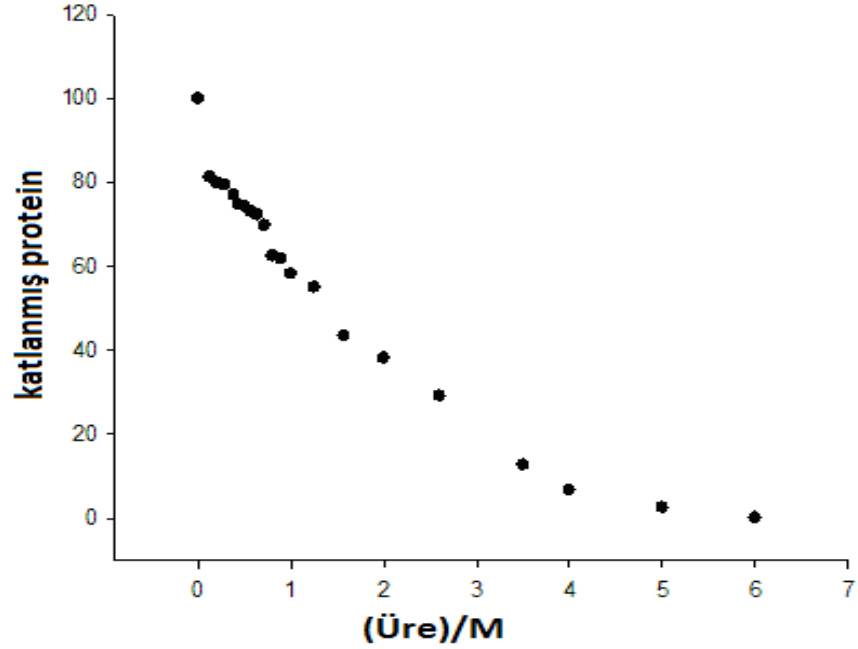
Şekil 5.8 Hsp70-Ayk1'in apo, ADP ve ATP varlığında FTIR spektrumları

5.4 Denaturasyon

Protein kararlılığı bir perturbant ile muamele edilip deney verileri perturbant olmadığı hale ekstrapole edilerek bulunur. Bu perturbant kimyasal ve sıcaklık olarak proteinin yapısını kademeli olarak denature eder. Lineer kısımlarda yapılan bu etki sadece renature olabilen proteinler için geçerlidir. Denaturasyon çalışmaları laboratuarda üre ile yapıp proteinin içsel floresanı kullanılmıştır. Hsp70 proteinini genelde renature olmadığı için kararlılığı hesaplanamamıştır. Hsp70 proteininin

oldukça hidrofobik yapılarla etkileşen kısımları olduğu için muhtemelen denature olan bu hidrofobik kısımlar renaturasyon işleminde katlanma yolunda farklı yollara saptıkları için renaturasyona devam edemezler.

Hsp70-Ayk1 renature olmadığı için tipik sigmoidal denaturasyon eğrisi vermemiştir. Benzer şekilde termal denaturasyon deneylerinde de renaturasyon olmadığı için Gibbs serbest enerjisi hesaplanamamıştır.



Şekil 5.9 TgHsp70 denaturasyon eğrisi

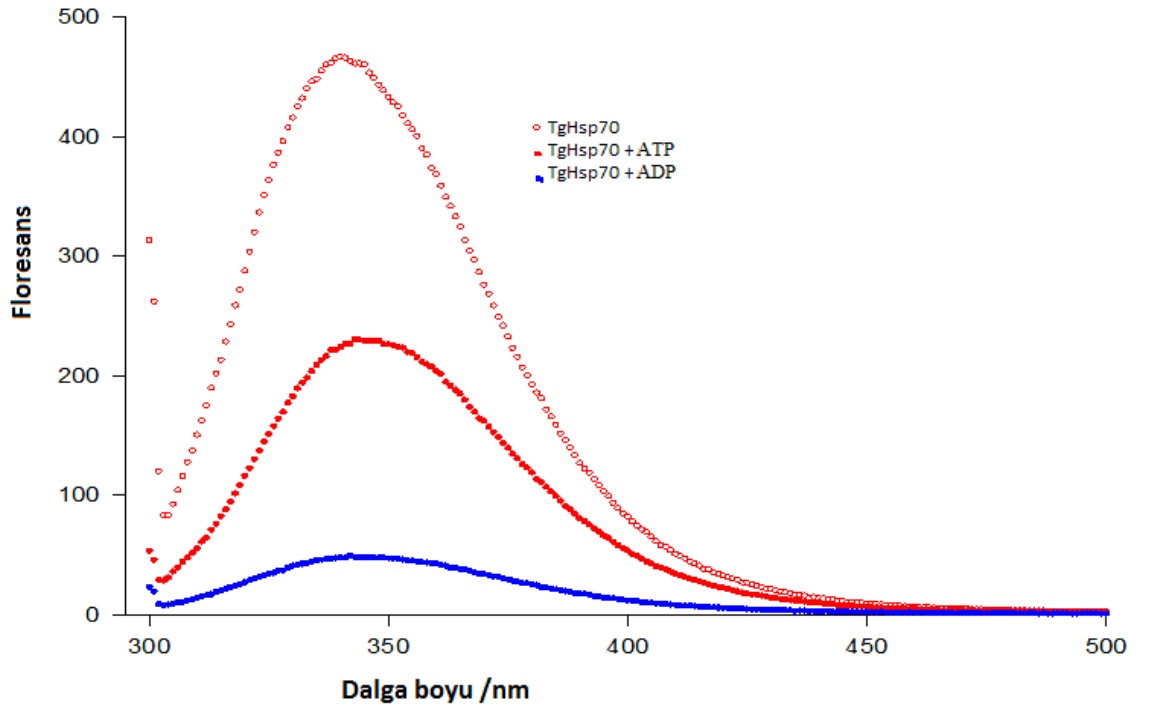
5.5 Floresan Deneyleri

Floresan spektrumları ile proteinlerin konformasyonel değişimleri intrinsic içsel kromoforları kullanılarak nükleotit varlıklarında ve yokluklarında takip edilmiştir. FTIR absorpsiyonundan farklı olarak ligand bağlanması mavi ve kırmızıya kayma ile konformasyonel değişimi gösterir. Hsp'lerde ATP ve ADP bağlanması 10-15 nm maviye kayma vermiştir. Bu kayma konformasyonel değişimin varlığını göstermektedir.

Proteinler 290 nm’de uyarılıp 300-500 nm’de emisyon spektrumları alınmıştır. Uyarma ve emisyon ışığı için kullanılan yarık aralığı 5 nm olup farklı protein konsantrasyonları denenmiş ve benzer maviye kaymalar gözlenmiştir. Emisyon spektrumları normalize edilmediği için nükleotit varlığında farklı floresan şiddeti vermektedirler. Fakat bu durum spektrumlardaki maviye kaymaya etkileri olmadıkları için önemsizdir.

ATP/ADP ile 10 dakika inkübe edilen Hsp’lerin spektrumları bu süre sonunda alınmış, apo yapının spektrumunda bağıl hata olmaması için benzer şekilde 10 dakika sonunda alınmıştır.

Nükleotit bağlı floresan değişimler konformasyonel değişimler için bir belirteçdir. Literatürde de farklı organizmalarda izole edilen Hsp’lerde nükleotit bağlı değişimler olduğu öne sürülmüştür. Laboratuvarında yapılan FTIR ve Floresan deneyleri bu gözlemleri desteklemektedir.

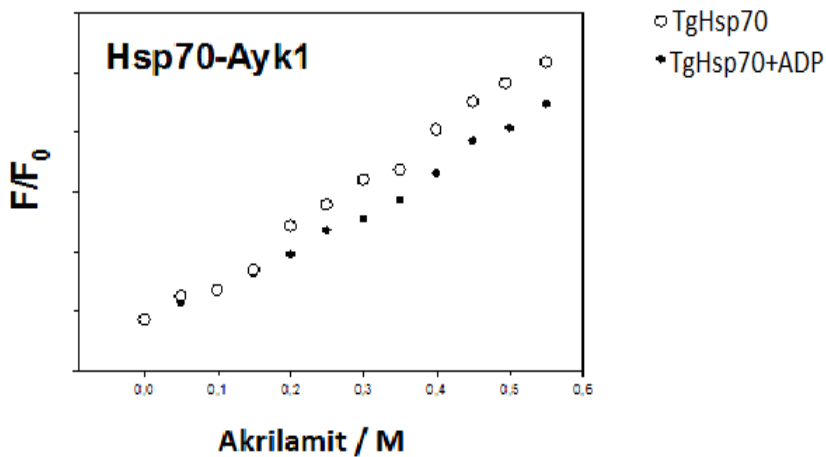


Şekil 5.10 TgHsp70 proteininin ADP varlığındaki (300-500 nm dalga boyunda) floresan spektrumu

5.6 Söndürme

Söndürme (quenching), 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. Söndürmede yansıyan ışığı engelleyen bir madde kullanılarak protein kromoforlarının farklı ortamlarda ortaya çıkma dereceleri hesaplanır. Protein üzerindeki kromoforların çevresi değişirse uyarıldıklarında emisyon şiddetleri kromoforun açığa çıkma-protein içine hapsolmasına göre artar veya azalır. Spektroskopik çalışmalarda yaygın olan önemli yöntemlerden biri kromoforların emisyon şiddetlerinin quenching-söndürme metodu ile azaltılmasıdır. Kromoforlarda meydana gelen değişimler (sıcaklık-ligand bağlı değişim) bu metotla belirlenebilir.

FTIR ve Floresan deneylerine ilave yapılan bu deneyler ile protein yüzeyindeki kromoforların konformasyonel değişim ile nasıl değiştiğini belirlemektir. Üçüncül yapısı tahmini olarak bilinen proteinler ile hangi ikincil yapının ya da kromofor çevresinin değiştiği belirlenebilmektedir. Nükleotit varlığında tüm proteinlerin yapısında bir değişim olduğu belirlenmiştir. Apo ve ADP'li hallerde hesaplanan K_{sv} değeri Ayk1 için 0.375, 0.250; M^{-1} dir.

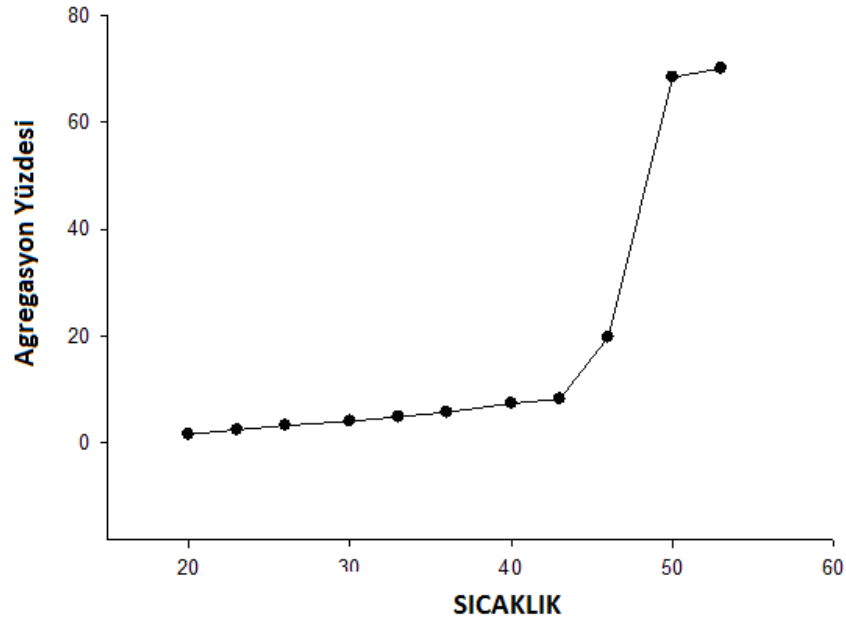


Şekil 5.11 TgHsp70 yapısının ADP yokluğuna ve varlığında söndürme deneyleri.

FTIR deneyleri proteinlerin ikincil yapılarında belirgin bir değişme olmadığını önermiştir. Yani konformasyonel değişimler globular yapıda gözlemlenebilir. Söndürme deneylerinde nükleotit varlığında değişimin görülmemesi proteinlerin katı yüzey hareketi yaptığının bir göstergesidir. Nükleotitler hidroliz sonrası sinyali substrat bağlanma ünitesine iletmesi proteinde belirgin konformasyonel değişim göstermeden oluşmaktadır.

5.7 Agregasyon

TgHsp70'in farklı sıcaklıklardaki agregasyon deneyleri yapıldı. Deneyler FPLC ile 321 nm de jel filtrasyon kolonu kullanılarak yapılmıştır.

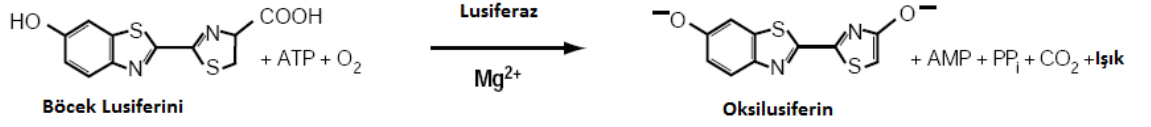


Şekil 5.12 TgHsp70 agregasyon deneyi

5.8 TgHsp70 fonksiyon tayini-I

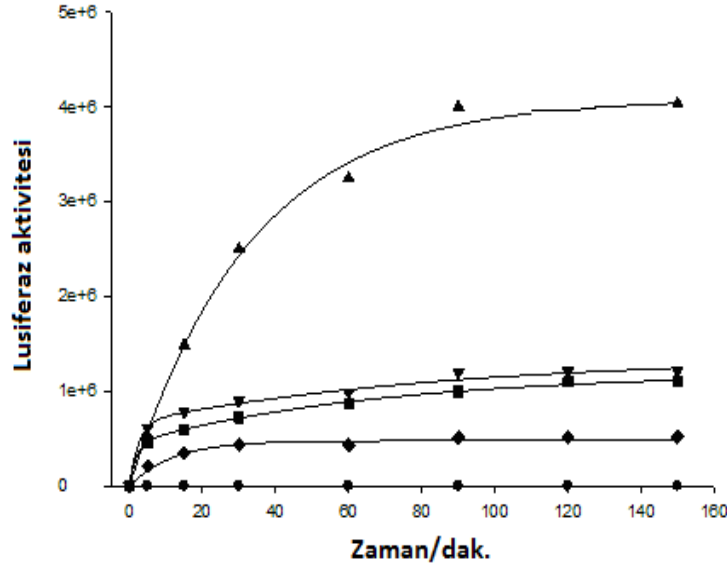
Hsp proteinlerinin en önemli fonksiyonlarından birisi substrat proteinlerin katlanmasına yardımcı olmaktır. Bu amaçla ateş böceği proteini olan lüsiferazı denature edip katlanmasına Hsp'lerin etkisi çalışılmıştır. Lüsiferaz ATP hidrolizi ile

ışıma vermektedir (Şekil 5.12). Bu özellik kullanılarak Hsp proteinlerinin protein katlama derecesi indirekt olarak tayin edilmektedir.



Şekil 5.13 Lusiferaz çalışma prensibi

Asitle denatüre edilen lusiferaz (Promega), lusiferaz tamponu (Promega) içerisinde seyreltilip Hsp proteinleri varlığında katlanmaları incelenmiştir. Lüsiferaz kaynaklı lüminesans Biofix lumi-10 Macherey–Nagel luminometre ile ölçülmüştür.

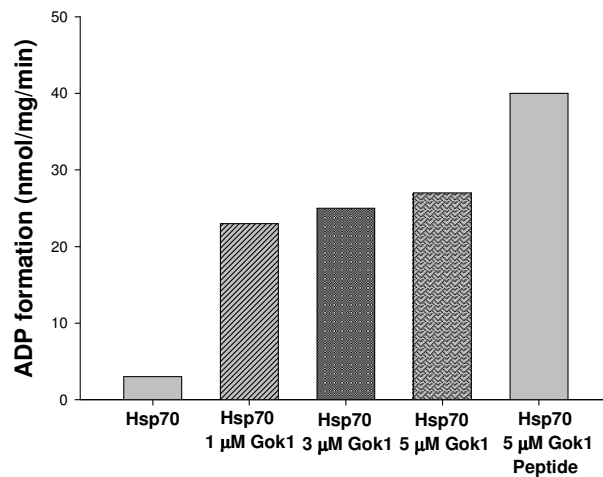


Şekil 5.14 Kimyasal olarak denature olmuş Lüsiferazın farklı koşullarda tekrar katlanması ve Hsp40 ile Hsp70 proteinlerinin ATP içeren ortamda lüsiferazı tekrar katlaması. Denature edilmemiş lüsiferazın lüminesansı 100, denature edilmiş lusiferazın lüminesansı “0” olarak alınmıştır. Kör; ●, 1 µM Ayk1-Hsp70; ■, Hsp40-Gok1; ◆, Ayk1-Hsp70 + Hsp40 Gok1 ▼, Ayk1-Hsp70 + Hsp40 Gok1 + ATP ▲.

Denature olmuş lüsiferazın verdiği lüminesans göreceli az olduğu için Hsp70 ve Hsp40 lüsiferazın katlanmasına yardımcı olmuş ve zaman içerisinde doğru katlanmaya müteakip lüminesansı artmış ve bir platoya erişmiştir. Sinyalin artması Hsp70 ve Hsp40'ın koordineli çalışmasında en fazla olmuştur. Sinyal artımı lüsiferazın doğru konformasyonu bulduğunun indirek göstergesi olduğu için Hsp70-Hsp40 kompleksinin ATP varlığında substrat proteinlerin doğru konformasyonu bulmasına yardımcı olduğu söylenebilir. Hsp proteinlerinin ayrı ayrı katlanmaya yardımına bakıldığında koordineli olduğu komplekse göre daha az katlanmaya yardım ettiği gözlemlenmektedir.

5.9 Hsp70 ve Hsp40'ların Fonksiyon Tayini-II

Hsp40 ve peptit Hsp70'in aktivitesini artırmaktadır. Bu amaçla Hsp70'in substrat protein katlama ölçüsünün indirek göstergesi olan ATP hidrolizi rejeneratif bir sistem ile ölçülmüştür (2 mM fosfoenol piruvat, 0.2 mM NADH, 2 unite/mL piruvat kinaz ve 10 unite/mL L-laktat dehidrojenaz, tavşan kasından, Roche). Hidrolize ATP piruvat kinaz ve fosfoenol piruvat tarafından rejenere edilir. Piruvat laktata, laktat dehidrojenaz ve NADH ile indirgenir. Bu reaksiyon 340 nm de spektrofotometre ile takip edilmiştir. Tampon çözelti olarak 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH: 7.5 kullanılmıştır.



Şekil 5.15 Farklı ortamlarda ATP hidrolizi. Peptit ve Hsp40'lar Hsp70 ATP hidrolizini artırmaktadır. Hsp40 5 μ M olduğunda Hsp70 hidrolizi en fazladır.

Hsp40 Hsp70'e J domaini ile bağlanarak substrat proteinleri sunar. Bu Hsp70'in aktivitesini artırmaktadır. Şekil 5.14 'te görüldüğü üzere Hsp40 miktarı artışı Hsp70 fonksiyonunu artırmaktadır.

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hsp70'ler yeni sentezlenen ve denatüre olmuş proteinlerin doğal hale erişmesine, proteinleri agrege olmalarını engellemeye, agregatların çözünürlüğüne ve hücrede doğru katlanmayan proteinlerin degradasyonuna yardımcı olmaktadır. Hsp70 korunmuş büyük bir şaperon ailesini oluşturmakla birlikte çeşitli hücresel fonksiyonlarının yanında, polipeptitlerin kararlı konformasyona erişmesine yardımcı olmaktadır. Hücre için hayati öneme sahip bu makromoleküller peptitlere

bağlandıkları zaman ATP hidrolizlerini artırır ve peptidin üçüncül yapısını bulmasına yardım ederler. Aynı zamanda ATP hidrolizide peptide bağlanmayı artırır.

Bu çalışmaya TgHsp70 proteininin saflaştırılmasıyla başlanmıştır. Saflaştırmadan önce yapılan biyoinformatik çalışmalar türler arasında TgHsp70'in evrim süresince büyük oranda korunduğunu göstermektedir. Bu da canlıların yaşam şansını artıran faktörleri uzun süreler muhafaza ettiğini göstermektedir.

Protein yeterince saflaştırıldıktan sonra FT-IR deneyleri yapılarak proteinin ikincil yapıları analiz edilmeye çalışılmıştır. İkincil yapı tayini için kullanılan referans proteinler de dikkate alındığında, FT-IR deneyleri sonucunda nükleotid varlığında proteinlerin ikincil yapılarında değişimler olduğu, fakat bu değişimlerin çok az oranda olduğu tespit edildi. Bu da bizi konformasyonel değişimlerin ikincil yapıdan ziyade globüler yapıda gözlemlendiği sonucuna götürdü.

TgHsp70 deki ATPaz ünitesine nükleotidin bağlanması ile bir sinyal oluşmakta ve bu sinyal substrat bağlama domainine ulaşarak, substratın katlanması için hidrofobik ortam oluşmaktadır. Kromoforların sulu ortama çıkması ya da proteinin içine gömülmesi katlama mekanizmasının işleyişi sırasında protein yüzeyindeki değişimlerin belirlenmesi açısından önemlidir. Bu amaçla söndürme deneyleri, floresan ve FTIR deneylerini desteklemiştir. Kromoforlara nükleotidin etkisi oldukça küçüktür. Konformasyonel değişim proteinlerin yüzeyinden ziyade üniteler arası etkileşimle olmaktadır. Yani konformasyonel değişimler globüler yapıda gözlemlenebilir. Söndürme deneylerinde nükleotid varlığında değişim görülmemesi proteinlerin “rigid body movement” katı yüzey hareketi yaptığının bir göstergesidir. Nükleotid hidrolizi sonrası, sinyalin substrat bağlama ünitesine iletilmesi proteinde belirgin konformasyonel değişim göstermeden oluşmaktadır.

Denaturasyon deneylerinde üre ile denature edilen TgHsp70 proteini, tekrar renature olmadığı için kararlılığı hesaplanamamıştır. Renature olmama sebebi, proteinimizin oldukça fazla oranda hidrofobik yapılarla etkileşime sahip olan kısımlar içermesidir. Bu da renature olma yolunda farklı yollara sapmasına sebep olabilmektedir.

Termal agregasyon deneylerinde ise TgHsp70'in 39-40 °C'ye kadar agregat olma oranı düşükken, bu derecelerden daha yükseğe çıkıldığında hızlı bir şekilde agregasyonun arttığı gözlenmiştir. Lusiferaz katlama deneylerinde ise, TgHsp70'in tek başınayken katlama oranının düşük olduğu, katlamaya Hsp40 ve ATP eklendiğinde ise katlama oranının çok fazla arttığı görüldü. Bu da bizi koşaperonların ve ATP'nin varlığında yanlış katlanmış proteinlerin çok daha hızlı doğru konformasyona ulaştıkları sonucuna götürdü.

7. KAYNAKLAR

- [1] Altıntaş, N. ve Doęanay, M. (2009). Zoonozlar, (Hayvanlardan İnsanlara Bulařan Enfeksiyonlar), Bilimsel Tıp Yayınevi, ISBN:978-975-6058-53 4,75s, Ankara.
- [2] zdemir, B. (2006). Toxoplazmoz, Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi, Sağlık Bilimleri, Mikrobiyoloji, Gaziantep, 3s.
- [3] http://www.marvistavet.com/html/body_toxoplasmosis.html

- [4] Kinsey, V. <http://pathologyproject.wordpress.com/2011/02/07/toxoplasmosis/>
- [5] Johnson, A. (1999). Is there more than One Species in the Genus *Toxoplasma*? Tokai J Exp Clin Med., Vol.23, No.6, pp.383-389
- [6] Weiss, M.L. and Elsevier, K. K. (2007). *Toxoplasma gondii: the model Apicomplexan: Perspectives and Methods*, Elsevier Ltd, London, ISBN-13:978-012-369
- [7] Aliberti, J. (2005). Host persistence: exploitation of anti inflammatory pathways By *Toxoplasma Gondii*, Nature Reviews Immunology 5,162-170 doi.10.1038/nri1547 <http://www.nature.com/scitable/content/toxoplasma-gondii-life-cycle-14465566>
- [8] Russell, E. L., Mcleod, R. and Roberts, C.W. (2002). *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion, Trends in Parasitology, Vol.18, Issue.5 pages. 198-2
- [9] Yıldız, K. (2009). Bir asırlık bilgi ışığında Tokoplazmoz Sempozyumu, Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji AD. 09-10 Nisan 2009, s. 32, Ankara
- [10] Kuman, H.A. and Altıntaş, N. (1996). Protozoon Hastalıkları, Ege Üniversitesi Basım Evi, Bornova-İzmir 1996: 112
- [11] www.wikipedia.org/wiki/Toxoplazma
- [12] <http://penvet.gov.tr/lab2.asp?ido=makale&id=537>
- [13] Yaman, O. (2006). *Toxoplasmosis Ön tanılı Hastalarda Gözyaşı ve Serumda Toxoplazma Antijen ve Antikorlarının Araştırılması*, Tıpta Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji ABD. Kayseri 15-55s
- [14] Miller, C.D., Akrotos, C., Johnson, A.M. and Smith, N.C. (2000). The production of a 70kDa heat shock protein by *Toxoplasma gondii* RH strain in immunocompromised mice, International Journal for Parasitology 30, 1467-1473
- [15] Silva, M.N., Gazzinelli, T.R., Silva, O., Ferro, E., Kasper, H.L. and Mineo, R.J. (1998). Expression of *Toxoplasma gondii*-Specific Heat Shock Protein 70 during In Vivo Conversion of Bradyzoites to Tachyzoites, Infection and Immunity, Aug.1998, p.3959-3963

- [16] Weiss, L.M., Ma Fen, Y., Takvorian, P.M., Tanowitz, H.B. and Wittner, M. (1998). Bradyzoite Deveopment in *Toxoplasma gondii* and the Hsp70 Stress Response, *Infection and Immunity*, Vol.66, No.7, p.3295-3302
- [17] Döşkaya, M.(2006). *Toxoplasma gondii* GRA1 Proteininin Tanımlanması: Aşı Çalışmalarında ki Yeri, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [18] Yaman, K., Akarsu, G., Güngör, Ç., Ataoğlu, H. (2011). *Toxoplasma gondii*'nin çeşitli suşlarının proteinlerinin karekterizasyonu, *Türkiye parazitoloji Dergisi*, 35: 133-6.
- [19] Shonhai, A. and Boshiff, A. and Blatch, L.G. (2007). The Structural and Functional Diversity of Hsp70 Proteins from Plasmodium Falciparum, *Protein Science*, 2007, 16:1803-1818
- [20] Çelik, S. (2007). 2000-2005 Yılları Arasında Gata Haydarpaşa Eğitim ve Araştırma Hastanesinde Doğum Yapan Gebelerde Hepatit B-C, HIV ve Toxoplazma - Rubella Prevelansının Araştırılması, Tıpta Uzmanlık Tezi, GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Kadın Doğum Servisi Şefliği, İstanbul, s. 56
- [21] İnci, M. (2009). Kayseri'de ki Kadınlarda *Toxoplazma gondii* Seropozitifliğinin Araştırılması, *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 33(3):191-194 2009.
- [22] Louw, A.C., Ludewig, H.M., Mayer, J., Blatch, L.G. (2010). The Hsp70 chaperones of the Tritryps are charecterized by unusual features and novel members, *Parasitology International* 59 (2010), 497-505
- [23] [http:// biyorss.com.201007](http://biyorss.com.201007) protein katlanma sanatı
- [24] Hames, D. And Hooper, N. (2010). Biyokimya, Tutar, Y. and Geçgil, H. and Karataş, M. (Ed.), Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 45-47s. ISBN 978-605- 395-288-6
- [25] Tutar,Y., Arslan, D., Tutar, L. (2010). Heat, pH Induced Agregation and Surface Hydrophobicity of *S.cerevisiae* Ssa1 Protein, *Protein J*, DOI 10.1007/s10930-010-9280-2
- [26] Tutar, L. and Tutar, Y. (2010). Heat Shock Proteins; An Overview, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2010,11,216-222
- [27] <http://biyorss.com/2010/07/protein-katlama-sanati-foldit/>

- [28] Konaş, A.T. vd. (2007). Isı Şok Proteinleri ve Fizyolojik Roller, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Biyokimya ABD. Hatay. 13(1):109-114
- [29] Kayhan, E.F., Atasayar, Z. (2010). Sucul Organizmalarda Isı Şok Proteinlerinin Önemi ve Termotolerans, Journal of Fisheries Sciences, (2010), 4(3):246-253
- [30] Tutar, Y.(2011). Ssa1p function in the presence of nucleotide and Ssa1poligomeric properties, Cumhuriyet Medical Journal, 33:26-32
- [31] Fen Ma, Y., Zhang, Y. and Weiss, L.M. (2004). Identification and charecterisation of a regulatory region in the *Toxoplasma gondii* hsp70 genomiclocus, Int J Parasitol. 2004 March 9; 34(3):333-346
- [32] Tutar, Y. (2006). Heat Shock Proteins, Substrate Specificity and Modulation of Function, Protein&Peptide Letters, 2006, 13, 699-705
- [33] Laad A.D, Thomas M.L, Fakih A.R, Chiplunkar Sv. (1999). Human gamma delta Tcells recognize heat shock protein-60 on oral tumor cells, Int J Cancer. 80(5):709-14
- [34] Baykal, Y., Gök, F. ve Kocabalkan, F. (2000). Isı şok proteinleri ve hastalıklardaki rolü, Klin Tıp Bilimleri GATA İç Hastalıkları Ankara, 20:187-195.
- [35] Mresca, B. and Kobayashi, G.S. (1994). Hsp70 in parasites: as an inducible protective protein and as an antigen, Experienta 50 (1994), Birkhauser Verlag, CH-4010 Basel/Switzerland.
- [36] Nagasawa, H., Oka, M., Maeda, K., Jian-Guo, C., Hısaeda, H., Ito, Y., Good, R.A. and Himeno, H. (1992). Induction of Heat Shock Protein Closely Correlates With Protection Against *Toxoplasma Gondii* Infection, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.89, pp.3155-3158, April 1992
- [37] Chen, M., Aosai, F., Norose, K., Mun, H.S., Ishikura, H. et al. (2004). *Toxoplasma gondii* infection inhibits the development of lupus-like syndrome in autoimmune (New Zealand Black xNew Zealand White) F1 mice, Internal Immunology, Vol.16, No.7, pp.937-946

- [38] Üzümcü, Z.(2009). *Pseudomonas* sp. Suşlarında Cold Shock Protein İzolasyonu ve SDS-PAGE Analizi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji AD., Adana. 7-12s
- [39] Zorzi, E. and Bonvini, P. (2011) Inducible Hsp70 in the Regulation of Cancer Cell Survival: Analysis of Chaperone Induction. Expression and Activity in cancers, 2011, 3, 3921-3956, doi:10.3390/cancers3043921
- [40] Qian, X. (2002). Direct interactions Between Molecular Chaperones Hsp70 and Hsp40: yeast Hsp70 Ssa1 binds the extreme C terminal Region of Yeast Hsp40 Great Britain, Biochem.J. 361,27-34
- [41] Mayer, MP. (2010). Gymnastics of Molecular Chaperones, Molecular Cell,39(3) : 321-31
- [42] [http:// www.pdbj.org/eprints/index-en.cgi?PBD%3A3C7N](http://www.pdbj.org/eprints/index-en.cgi?PBD%3A3C7N)
- [43] Makarow, M., Braakman, I. (2005). Chaperones, Springer-Verlag Berlin, Germany 162-189s
- [44] De Maio, A. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. Shock 1999 ; Clark JJ.
- [45] Echeverria, C.P., Figueras, M.J., Vogler, M. et.al. (2010). The Hs90 co-chaperone p23 of *Toxoplasma gondii*: Identification, functional analysis and dynamic interactome determination, Mol Biochem Parasitol.2010 August; 172(2): 129-140.
- [46] Tutar, Y., Okan, Ş. (2011). Heat shock protein 70 purification and Characterization from *Cprinion macrastomus* and *Garra rufa obtusa*, Journal of Thermal Biology, 37 (2012) 95-99.
- [47] Yeğenoğlu, E.D. (2007). Etlik piliçlerde sıcaklık stresine alıştırma uygulamalarının beyin Hsp70 Düzeyine Etkisinin Araştırılması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, FBE. Bornova İzmir.35s
- [48] Mayer, M.P. and Bukau, B. (2005). Review Hsp70 Chaperones: Cellular Function and Molecular Mechanism, Cell. Mol. Life Sci.62 670-684
- [49] Tutar, Y. (2007). Therapeutic Use of Hsp70, Recent Patent on DNA Gen Sequences Cumhuriyet Üniversitesi, Kimya Bölümü, Sivas, 1, 125-127

- [50] Tutar, Y. (2006.) Key Residues Involved in Hsp70 Regulatory Activity and Affect of Co Chaperones on Mechanism of Action, Protein&Peptide Letters,13,693-698
- [51] Tutar, Y., Song, Y. and Masison, C.D. (2005). Primate Chaperones Hsc 70 and Hsp70 Differ Functionally in Supporting Growth and Prion Propagation in *Saccharomyces cerevisiae*, Genetics 172:851-861
- [52] Junbin, H., Yunkun, W. vd. (2008). The Crystal Structure of The Putative Peptid Binding Fragment From The Human Hsp40 Protein Ydj1, BMC Structural Biology, 2008, 8-3 Doi:10.1186/1472-6807-8-3
- [53] Tutar, Y. (2010). Yeast Prions, Basic Clin Sci 2010; 1:45-51, ISS:1309-5102
- [54] Song, Y., Wu, Yx., Jung, G., Tutar, Y., Eisenberg, E., Greene, L.E. And Massison, Dc. (2005). Role for Hsp70 Chaperone in *S.cerevisiae* Prion Seed Replication, Eukaryotic Cell, Feb.2005, p.289-297
- [55] Jones, G., Song, Y., Chung, S., Masison, D.C. (2004). Propagation of *Saccharomyces cerevisiae* [PSI⁺] prion is impaired by factors that regulate Hsp70 substrate binding. Mol Cell Biol. 2004 24(9):3928–37
- [56] Tutar, Y. (2011). Hsp70 in Oncology, Recent Patents on DNA and Gene Sequences (2011), 5, 000-000
- [57] Yüksel, B., Kılıç, H.S., Taşdemir, N., Batıoğlu, S. (2009). Apoptosis and Caspase System, Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ankara.
http://dergi.ztb.gov.tr/index.php?option=com_content&view=article&id=82&Itemid
- [58] Mun, H., Norose, K., Aosai, F., Chen, M. and Yano, A. (2000). A role of carboxy-terminal region of *Toxoplasma gondii*-heat shock protein 70 in enhancement of *T.gondii* in mice, The Korean Journal of Parasitology, Vol.38, No.2, 107-110, June 2000
- [59] **(Hata! Köprü başvurusu geçerli değil.)**.
- [60] www.forumakademi.org
- [61] Yıldırım, H. (1985). Biyofizik, Anadolu Üniversitesi Basımevi, Eskişehir, 431-433, 1985
- [62] ([ttp://tipbilimLeri.turkiyeklinikleri.com](http://tipbilimLeri.turkiyeklinikleri.com)).

- [63] <http://www.biriyilik.com/odevler-kaynaklar/fen-bilimLeri/protein-izolasyonu-ve-karakterizasyonu-akrilamid-j&el-elektroforezi-sds-page-7147.html>
- [64] Ausable, F.M. et al. eds.(1989). SDS/PAGE Mini Protein Gel, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Pres, N.Y.1989
- [65] <http://www.metafizikbilgiler.com/html/mb7.html>
- [66] Banik, U., Saha, R., Mandal, N.C., Bhattacharyya, B. and Roy, S. (1992) Multiphasic denaturation of the lambda repressor by urea and its implications for the repressor structure. *Eur J Biochem*, 206, 15-21.
- [67] <http://www.scribd.com/doc/41817800/40117-040-Protein-Stability-and-Folding>
- [68] Grinvald ,A., Fine, A., Farber, I.C., Hildesheim, R. (1983). Fluorescence monitoring of electrical responses from small neurons and their processes. *Biophys. J.* 42:195-198.
- [69] Bardwell, J. C. A. and Craig, E. A. (1987). Eucaryotic Mr- 83000 heat shock protein has a homologue in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*84: 84:5177-5181
- [70] (<http://www.geneclinics.org/>).
- [71] Bandekar, J.(1992).Amide modes and protein conformation, *Biochim. Biophys. Acta*.Apr. 8; 1120 (2): 123–143
- [72] Krimm, S.(1987). Spectra and Structure of polypeptides, During J.R.ed., *Vib. Spectra Struct.* Vol.16, pp.1-72, Amsterdam
- [73] Byler, D.M. and Susi, H.(1986). Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra, *Biopolymers*, 25, 469-487
- [74] Torii, H. and Tasumi, M. (1992). Model calculations on the amide-I infrared Bands of globular proteins, *J.Chem. Phys.* 96,3379-3387
- [75] Surewicz, W.K., Mantsch, H.H. and Chapman, D. (1993). Determination of Protein Secondary Structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy: A Critical Assesment. *Biochemistry*,32(2): 389-393
- [76] 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). Nature of the interaction of growth factors with suramin, *Biochemistry*, 31, 9016-24

- [77] Kalnin, N. N., Baikalov, I. A., and Venyaminov, S. Y. (1990). Biopolymers, 30, 1273- 1280.
- [78] Barone, R., Briante, R., D'auria, S., Febbraio, F., Vaccaro, C., Guidice, L.D., Borelli, G.M., Fonzo, N.D., Nucci, R. (1990). Purification and Characterization of Lipxygenase Enzyme from Durum Wheat Semolina. Journal of Agricultural Food Chemistry, 47:1924-1931.
- [79] Wang W, Basia Sho seyov VO, Altman A, (2004). Role of plant heatshock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *TRENDS in Plant Science*, 9 (5): 244-252.
- [80] <http://www.burclab.com/tr/genetik/bolumLerimiz/molekuler-genetik>
- [81] Dale, W.J. and Schatz, M. (2002). From Genes to Genomes: Concepts and Applications of DNA Technology, 2002, 99-119, ISBN-10: 0471497835
- [82] Barlet, M. S. J. and Stirling, D. (2000). Methods in Molecular Biology: PCR Protokolleri, Vol.226, pages 3-20
- [83] Champion™ pET Directional TOPO Expression Kits with Lumio™ fusion proteins in E.coli, Katalog No:K160-01 ve K161-01

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Sahil Dilmeç
Doğum Yeri ve Tarihi	Sivas, 25/08/1980
Medeni Hali	Evli
Yabancı Dil	İngilizce
E-posta Adresi	sahildilmec@hotmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Cumhuriyet Lisesi Sivas 1995-1998
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2002
Y. Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik ABD 2010-2013