

Yaşlanma Sürecinde Isı Şok Proteinlerinin Oksidatif Protein Modifikasyonlarındaki Rolü

Program Kodu: COST

Proje No: 110S281

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. Betül KARADEMİR

Araştırmacı:

Prof. Dr. Nesrin KARTAL ÖZER

Bursiyer(ler):

Ahmet Erdi Sözen

Aslı Ece

Perinur Bozaykut

HAZİRAN 2014

İSTANBUL

ÖNSÖZ

Proteinler hücrede yüksek oranda bulunan ve birçok önemli metabolik olayda rol oynayan makromoleküllerdir. Protein döngüsü, sentez ve yıkım arasındaki dengeyi yansıtan ve hücresel protein havuzunun dengeli bir şekilde sürdürülmesine katkısı olan bir prosestir. Vücutta meydana gelen çeşitli hastalıklar ve ayrıca yaşlanma sürecinde proteinlerin yapısında meydana gelen hasarlanmalar ve protein yıkımındaki dengenin bozulması, birçok yolağın sekteye uğramasına ve hücresel hasarın ilerlemesine yol açmaktadır.

Protein sentezi, mRNA'dan translasyon ile başlayıp proteinin işlevine göre sitoplazmada ya da endoplazmik retikulumda şekillendirilmesiyle ve hedefe ulaştırılmasıyla son bulan bir prosedürdür. Sentez aşamasından sonra proteinlerin aktif hale gelebilmeleri için doğru üç boyutlu yapıyı kazanmak üzere katlanmaları gerekmektedir.

Bu projede amaç, proteinlerin katlanmasında büyük rol oynayan ısı şok proteinlerinin, yaşlanma sürecinde ortaya çıkan protein oksidasyonu ve bu oksidasyon sonrası savunma mekanizması olarak devreye giren proteazomal degradasyon üzerindeki etkisinin araştırılması idi. Hedef; yaşlanma ve yaşlılıkla bağlantılı birçok hastalığın ilerlemesinde önemli rol oynayan protein oksidasyonu ve proteazomal inhibisyonun, ısı şok proteinlerinin farklı ekspresyonlarında ve/veya inhibisyonlarında, ne oranda etkilendiğini tayin etmektir. Çalışmada, tüm ısı şok proteinleri ele alınarak ilk olarak yaşlı ve genç hücrelerdeki farklar tayin edildi. Bu proteinlerin protein katlanması yanında stres durumunda savunma mekanizması olarak ta rol oynamalarından dolayı yaşlı hücrelerde genç hücrelere oranla daha farklı yanıt verdikleri gözlemlendi. Bu farklılıklar baz alınarak ısı şok proteinlerinin gen susturma (siRNA) yöntemi ve inhibitör kullanımı gibi yaklaşımlar ile, genç ve yaşlı hücrelerdeki etkileri doğrulandı.

Bu projede ayrıntılı olarak elde edilen sonuçlarla ısı şok proteinlerinin birçok açıdan mekanizması hakkında bilgi edinildi. Isı şok proteinleri ile modifikasyonların Türkiye'de ve ayrıca dünya çapında sınırlı sayıda çalışılıyor oluşu, çalışmayı özgün hale getirerek sonuçlar laboratuvarımızda birçok yeni çalışmanın başlatılmasına ışık tuttu.

TÜBİTAK 'a 3 yıl boyunca projemize verdiği destekten dolayı teşekkür ederiz.

Proje TÜBİTAK SBAG tarafından COST-CM1001 aksiyonu kapsamında 110S281 olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	viii
2. ABSTRACT	x
3. GİRİŞ	1
4. LİTERATÜR ÖZETİ	3
5. GEREÇ VE YÖNTEM	6
5.1 Hücre Kültürü	6
5.2 MTT Testi ile Canlılık Tayini	7
5.3 Kantitatif PCR ile Isı Şok Proteinleri mRNA Ekspresyonları Tayini	7
5.3.1 RNA İzolasyonu	7
5.3.2 Total RNA'dan Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	7
5.3.3 cDNA Örneklerinin HSP27, HSP40, HSP47, HSP60, HSP70 ve HSP90 Primerleri için Kantitatif Realtime PCR (RT-PCR) ile Çoğaltılması ve Oluşan Ürünlerin Agaroz Jel ile Kontrolü	8
5.4 Isı Şok Proteinleri Ekspresyonları Tayini	9
5.4.1 Protein Konsantrasyonunun Hesaplanması	9
5.4.2 SDS-PAGE ve Western Blot Yöntemi ile HSP Proteinlerinin Tayin Edilmesi	9
5.5 Protein Karbonil Tayini	10
5.5.1 ELISA Yöntemi ile Protein Karbonil Tayini	10
5.5.2 Oxy-blot Yöntemi ile Protein Karbonil Tayini	10
5.6 Isı Stresi Sonrası Genç ve Yaşlı Hücrelerde Protein Karbonilasyonunun LC-MS ile Analizi	11
5.7 ELISA Yöntemi ile Nitrotirozin Tayini	12
5.8 Proteomik Analiz	12
5.8.1 İki Boyutlu Jel Elektrofrez	12
5.8.2 Jelden Protein İzolasyonu	12
5.8.3 Kütle Spektrometri Analizleri	13
5.9 siRNA ile HSP70 Ekspresyonunun Susturulması	13
5.10 KNK437 ile HSP70 İnhibisyonu	13
5.11 Sıvı Sintilasyon Metodu ile Protein Döngüsü Tayini	14
5.11.1 Genç ve Yaşlı Hücrelerde Sıvı Sintilasyon Metodu ile Protein Döngüsü Tayini	14
5.11.2 Isı Stresi Uygulanan Genç Hücrelerde Sıvı Sintilasyon Metodu ile Protein Döngüsü Tayini	14

5.11.3 siRNA ile HSP70 Ekspresyonu Susturulan Genç Hücrelerde Sıvı Sintilasyon Metodu ile Protein Döngüsü Tayini	14
5.11.4 KNK437 ile HSP70 İnhibisyonu Yapılan Genç Hücrelerde Sıvı Sintilasyon Metodu ile Protein Döngüsü Tayini	14
5.12 Proteazom Aktivite Tayini	15
5.12.1 Isı Stresi Uygulanan Genç ve Yaşlı Hücrelerde Proteazom Aktivite Tayini	15
5.12.2 siRNA ile HSP70 Ekspresyonu Susturulan Genç Hücrelerde Proteazom Aktivite Tayini	15
5.12.3 KNK437 ile HSP70 İnhibisyonu Yapılan Genç ve Yaşlı Hücrelerde Proteazom Aktivite Tayini	16
5.13 HSP40 İmmünpresipitasyonu	16
6. BULGULAR	18
6.1 Isı Stresi Sonrası Hücrelerin Mikroskop Görüntüleri	18
6.2 MTT testi ile canlılık tayini	18
6.3 Kantitatif realtime PCR (RT-PCR) ile tayin edilen mRNA ekspresyonu sonuçları	19
6.3.1 HSP27 mRNA Ekspresyonu	19
6.3.2 HSP40 mRNA Ekspresyonu	20
6.3.3 HSP47 mRNA Ekspresyonu	21
6.3.4 HSP60 mRNA Ekspresyonu	22
6.3.5 HSP70 mRNA Ekspresyonu	23
6.3.6 HSP90 mRNA Ekspresyonu	24
6.4 SDS-PAGE ve Western Blot ile tayin edilen protein ekspresyonu sonuçları	25
6.4.1 HSP27 Protein Ekspresyonu	25
6.4.2 HSP40 Protein Ekspresyonu	26
6.4.3 HSP47 Protein Ekspresyonu	27
6.4.4 HSP60 Protein Ekspresyonu	28
6.4.5 HSP70 Protein Ekspresyonu	29
6.4.6 HSP90 Protein Ekspresyonu	30
6.5 Protein Karbonil Tayini Sonuçları	31
6.5.1 ELISA yöntemiyle Protein Karbonil Tayini Sonuçları	31
6.5.2 Oxy-Blot Yöntemi İle Protein Karbonil Tayini Sonuçları	32
6.6 Karbonile Proteinlerin LC-MS/MS ile Tayini	33
6.7 ELISA Yöntemi ile Nitrotirozin Tayini Sonuçları	43
6.8 Proteomik Analiz	43

6.8.1 İki Boyutlu jel elektroforezi	43
6.8.2 Kütle Spektrometri Analizleri	43
6.9 siRNA ile HSP70 susturulması	47
6.10 KNK437 ile HSP70 İnhibisyonunun Isı Şoku ile Etkisi	48
6.10.1 Genç Fibroblast Hücrelerinde KNK437 ile HSP70 İnhibisyonu	48
6.10.2 Yaşlı Fibroblast Hücrelerinde KNK437 ile HSP70 İnhibisyonu	48
6.11 Sıvı Sintilasyon Metodu ile Protein Döngüsü Tayini	49
6.11.1 Genç ve Yaşlı Hücrelerde Sıvı Sintilasyon Metodu ile Protein Döngüsü Tayini	49
6.11.2 Isı Stresi Uygulanan Genç Hücrelerde Sıvı Sintilasyon Metodu ile Protein Döngüsü Tayini	50
6.11.3 siRNA ile HSP70 Ekspresyonunu Susturulan Genç Hücrelerde Sıvı Sintilasyon Metodu ile Protein Döngüsü Tayini	51
6.11.4 KNK437 ile HSP70 İnhibisyonu Yapılan Genç Hücrelerde Sıvı Sintilasyon Metodu ile Protein Döngüsü Tayini	52
6.12 Proteazom Aktivite Tayini	53
6.12.1 Isı Stresi Uygulanan Genç ve Yaşlı Hücrelerde Proteazom Aktivite Tayini	53
6.12.2 siRNA ile HSP70 Ekspresyonu Susturulan Genç Hücrelerde Proteazom Aktivite Tayini	54
6.12.3 KNK437 ile HSP70 İnhibisyonu Yapılan Genç ve Yaşlı Hücrelerde Proteazom Aktivite Tayini	55
6.13 HSP40 İmmünpresipitasyonu	57
7. TARTIŞMA/SONUÇ	58
8. KAYNAKLAR	64

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Deneylerde kullanılan grupların sınıflandırılması	6
Tablo 2. Genç ve yaşlı fibroblastlarda karbonile proteinlerin LC-MS/MS ile analizi	33
Tablo 3. Genç ve yaşlı fibroblastlarda karbonile proteinlerin MALDI TOF MS ile analizi	42
Tablo 4. Kütle spektrometrisi analizleri ile belirlenen proteinler	47

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Yaşlanma ve ısı stresinin fibroblast hücrelerine morfolojik açıdan etkileri	18
Şekil 2. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücreleri canlılığına etkileri	18
Şekil 3. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde HSP27 mRNA ekspresyonuna etkileri	19
Şekil 4. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde HSP40 mRNA ekspresyonuna etkileri	20
Şekil 5. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde HSP47 mRNA ekspresyonuna etkileri	21
Şekil 6. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde HSP60 mRNA ekspresyonuna etkileri	22
Şekil 7. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde HSP70 mRNA ekspresyonuna etkileri	23
Şekil 8. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde HSP90 mRNA ekspresyonuna etkileri	24
Şekil 9. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde HSP27 protein ekspresyonuna etkileri	25
Şekil 10. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde HSP40 protein ekspresyonuna etkileri	26
Şekil 11. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde HSP47 protein ekspresyonuna etkileri	27
Şekil 12. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde HSP60 protein ekspresyonuna etkileri	28
Şekil 13. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde HSP70 protein ekspresyonuna etkileri	29
Şekil 14. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde HSP90 protein ekspresyonuna etkileri	30
Şekil 15. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde protein karbonil miktarlarına etkileri (ELISA)	31
Şekil 16. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde protein karbonil miktarlarına etkileri (OXY-BLOT)	32
Şekil 17. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde protein nitrotirozin miktarlarına etkileri	43
Şekil 18. Her bir gruba ait total proteinlerin 2D-jel ile gösterimi	45
Şekil 19. Ekspresyonu değişen proteinlerin dansitometrik analizleri	46

Şekil 20. Kütle spektrometrisi ile tanımlanan proteinlerin 2D-jelde gösterimi	46
Şekil 21. Pozitif kontrol siRNA (GAPDH), negatif kontrol siRNA (non targeting) ve hedef siRNA transfeksiyonlarının kontrol örnekleri ile kıyaslanması	47
Şekil 22. PD25 olan genç hücrelerde HSP70 inhibitörü KNK437'nin HSP70 ekspresyonuna ve ısı şoku ile indüklenmesine etkisi	48
Şekil 23. PD58 olan yaşlı hücrelerde HSP70 inhibitörü KNK437'nin HSP70 ekspresyonuna ve ısı şoku ile indüklenmesine etkisi	48
Şekil 24. Hücresel yaşlanmanın protein döngüsü ve protein agregat oluşumu üzerine etkileri	49
Şekil 25. PD25 olan genç hücrelerde ısı uygulamasının protein döngüsü, çözümlü protein ve protein agregat miktarına etkisi	50
Şekil 26. PD25 olan genç hücrelerde siRNA ile HSP70 susturulmasının ardından ısı uygulamasının protein döngüsü, çözümlü protein ve protein agregat miktarına etkisi	51
Şekil 27. PD25 olan genç hücrelerde KNK437 ile HSP70 İnhibisyonunun ardından ısı uygulamasının protein döngüsü, çözümlü protein ve protein agregat miktarına etkisi	52
Şekil 28. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde proteazom aktivitesi üzerine etkileri	53
Şekil 29. PD25 olan genç hücrelerde siRNA ile HSP70 susturulmasının ardından ısı uygulamasının proteazom aktivitesi üzerine etkisi	54
Şekil 30. PD25 olan genç hücrelerde HSP70 inhibitörü KNK437'nin 20S proteazom aktivitesi üzerine etkileri	55
Şekil 31. PD25 olan genç hücrelerde HSP70 inhibitörü KNK437'nin 26S proteazom aktivitesi üzerine etkileri	55
Şekil 32. PD58 olan yaşlı hücrelerde HSP70 inhibitörü KNK437'nin 20S proteazom aktivitesi üzerine etkileri	56
Şekil 33. PD58 olan yaşlı hücrelerde HSP70 inhibitörü KNK437'nin 20S proteazom aktivitesi üzerine etkileri	56
Şekil 34. PD:25 olan genç hücrelerde HSP40 immünpresipitasyonu	57

1. ÖZET

Proteinler organizmada birçok yaşamsal olayda önemli rol oynamaktadır ve protein modifikasyonları bu fonksiyonları etkilemeleri açısından önem arz etmektedir. Özellikle posttranslasyonel modifikasyonlar ile proteinler çok farklı fonksiyonda yapılara dönüştürülür. Bu dönüşüm enzimatik olarak kontrol ve regüle edilebileceği gibi, non-enzimatik reaksiyonlarla da ortaya çıkabilir. Çeşitli proteinlerin depolanmasıyla bağlantılı olan dejeneratif hastalıklarda non-enzimatik protein modifikasyonlarının önemli rol oynadığına dair birçok kanıt mevcuttur.

Isı şok proteinleri (HSP), protein sentezinin ardından aktif üç boyutlu protein yapısının oluşumunda önemli basamak olan protein katlanmasında rol oynamaktadır. HSP'leri organizmada lokalizasyonlarına ve molekül ağırlıklarına göre farklı yapılara ayrılmışlardır ve protein katlanması yanında birçok metabolik olayda da direkt olarak yer almaktadırlar.

Protein modifikasyonları içerisinde protein oksidasyonu sıklıkla meydana gelen bir sonuçtur. Protein oksidasyonu, protein ana yapısında meydana gelebileceği gibi amino asit yan zincirlerinde de hasara neden olabilir. Amino asit yan zincirlerde meydana gelen modifikasyonlar sonucu birçok farklı ürün oluşmaktadır. Yapısında sülfür içeren metiyonin ve sistein gibi amino asitler modifikasyon için oldukça hassastır. Lizin, arjinin, prolin ve treonin oksidasyonu ise karbonil türevlerinin oluşumuyla sonuçlanır. Protein karbonilleri, okside protein tayini için en sık kullanılan ürünlerdir. Protein oksidasyonunun diğer bir başlıca sonucu, birikimiyle hücrede toksik etkiye yol açan protein agregatlarının oluşumudur. Özellikle hücrede ve tüm organizmada olan yaşlılık sürecinde proteinlerin çapraz bağlanması çözünmeyen, floroforesan özellikte bir agregat olan lipofusin oluşumu ile sonuçlanır.

Hücrede, protein oksidasyonu sonrası hasarlı polipeptidlerin düzenlenmesi için birçok tamir ve uzaklaştırma mekanizmaları devreye girer. Tamir mekanizmaları içerisinde en sık meydana gelen disülfid bağları ve metiyonin sülfoksit oluşumu gibi modifikasyonların tamiri söz konusudur. Bunun yanı sıra oksidatif olarak modifiye olmuş proteinlerin birçoğu proteolitik degradasyon ile uzaklaştırılır ve bu nedenle hücreler birçok proteolitik sistem geliştirmişlerdir. Diğerlerinin yanında, proteazomal sistem okside proteinlerin degradasyonundan sorumlu başlıca proteolitik sistemdir. Proteazomal sistem, hücre sitoplazması ve çekirdeğinde 20S merkez proteazom ve 19S, 11S gibi regülatörlerden oluşmaktadır. Isı şok proteinlerinin

protein oksidasyonu sonrası hücre düzenlenmesinde ise hem hasar ile açılan proteinlerin tekrar katlanması hem de hasarlı proteinlerin yıkımının hızlandırılması gibi yönlerden etkili olabileceği düşünülmektedir.

Literatürde, özellikle son yıllarda, ısı şok proteinlerinin çeşitli hastalıklarda ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler ve ayrıca protein yıkımındaki etkileri üzerine çalışmalar mevcuttur. Fakat ısı şok proteinlerinin yaşlanma ile bağlantılı olarak protein modifikasyonları üzerindeki rolü üzerinde detaylı veri mevcut değildir. Çalışmamızda genç ve yaşlı hücrelerde ısı şok proteinleri 27, 40, 47, 60, 70 ve 90'ın düzeyleri ısı stresi sonrası değerlendirilmiştir. Ayrıca elde edilen sonuçlar doğrultusunda özellikle HSP70'in etkisi ayrıntılı olarak incelenmiştir. Bu kapsamda devam edilerek birçok farklı çalışma başlatılmıştır. Elde edilen sonuçların literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler:

Isı şok proteinleri, protein modifikasyonu, oksidasyon, yaşlanma

2. ABSTRACT

Proteins play significant roles in many important process in the organisms and protein modifications are important since they affect the functions of the proteins. These proteins are converted into an array of different functional entities Especially by posttranslational modifications. Interestingly, this conversion can either be enzymatically controlled and regulated, or may have an apparently random aspect due to non-enzymatic reactions. There is increasing evidence that non-enzymatic protein modifications might be a key event in degenerative diseases which are related to protein storage.

Heat shock proteins (HSP) play role in protein folding which is an important step for the active three dimensional structure of proteins following synthesis. HSPs are divided into different structures according to their molecular weights and localizations in the organism, and are involved in several metabolic processes besides protein folding.

Protein oxidation is an abundant outcome of protein modifications. Protein oxidation reactions are separated into those that modify protein backbone and those that modify amino acid side chains. Many different products are formed following the modifications of side chains. The sulfur-containing amino acids cysteine and methionine are highly susceptible to side chain modifications. Lysine, arginine, proline, or threonine oxidation might result in carbonyl derivatives. Such protein-bound carbonyls are among the most frequently used products for determination of oxidized proteins. Another major consequence of protein oxidation is the formation of large protein aggregates, which are often toxic to cells, if allowed to accumulate. Within aged cells, cross-linking of proteins results in an insoluble, fluorescent material, called lipofuscin.

After oxidation of proteins, living cells try to rescue defect polypeptides and therefore many repair and removal systems are activated. Repair mechanisms evolved only for the most frequent and easy repairable protein modifications such as disulfide bonds and methionine sulfoxides. Additionally oxidatively modified proteins are removed by proteolytic degradation and therefore, cells have developed highly regulated intracellular proteolytic systems. Besides all proteolytic systems, the major proteolytic system responsible for the removal of oxidized proteins is the proteasomal system. The proteasomal system in the cytosol and nucleus is composed of 20S core proteasome and several regulatory components such as

19s and 11S. Cells also contain a number of proteins, such as heat shock or stress proteins, with the ability to reconstitute the native structure of proteins or protein domains after oxidative unfolding.

Recently there are distinct studies on the different expressions of heat shock proteins in several diseases and also the effects on protein degradation. But there is no detailed data on the roles of heat shock proteins in age related oxidative protein modifications. Therefore in the present study HSPs 27, 40, 47, 60, 70 and 90 have been determined following heat stress. In addition, the effects of HSP70 has been tested in the direction of obtained data. Other recent studies have been planned and started in this extent. We believe that the results will bring new aspects for the literature.

Keywords:

Heat shock proteins, protein modification, oxidation, aging

3. GİRİŞ

Isı şok proteinleri (HSP), farklı metabolik koşullarda ekspresyonları artan ve hücre için önemli fonksiyonları olan proteinlerdir. Hücre içerisinde proteinlerin katlanması ve sentezini artırıcı moleküler şaperon olarak rol oynamaları en önemli özelliklerindendir. Ayrıca ısı şok proteinleri, proteinlerin üç boyutlu yapılarının kazanılmasında, protein degradasyonunda, transkripsiyon faktörlerinin ve protein kinazların regülasyonunda yer almaktadırlar. Çeşitli stres durumları sonrası ısı şok proteinleri düzeylerindeki artış hücresel homeostazın sağlanmasında önemli rol oynamaktadır (Bukau vd., 2006; Niforou vd., 2014).

Isı şok proteinlerinin ekspresyonundaki değişiklikler, ısı şok faktörleri olarak bilinen bir seri transkripsiyon faktörleri tarafından kontrol edilir. Isı şok proteinlerinin artışı ve birikimi stresli hücreye koruma sağlarken hücre yaşamının devamını sağlamaktadır (Ciocca ve Calderwood, 2005).

Farklı ısı şok proteinleri, farklı hücresel proteinlerin katlanmasını ve bütünlüğünü sağlar. Bu süreç hakkında tam bilgi bulunmamasına rağmen, moleküler şaperonların polipeptidleri stabilize ettikleri ve ayrıca hatalı katlanmaları ile birlikte agregasyonlarını azaltarak etki ettikleri düşünülmektedir (Arawaka vd., 2010; Doyle vd., 2013).

Hücresel homeostazdaki etkilerine ilaveten stres cevap proteinleri olarak ta bilinen ısı şok proteinleri hastalıklarda da önemli yer tutmaktadır. Hastalıkta, etkilenen doku ya da organın stres cevabı oluşturmamasının, iyileşmesinde önemli olduğu düşünülmekte, yapıları ve fonksiyonları daha ayrıntılı incelendiğinde hastalıkların teşhisinde ve tedavisinde önemli yaklaşımlar olabilecekleri düşünülmektedir (Arrigo vd., 2007; Ghayour-Mobarhan vd., 2009; Witt, 2010; Dreiza vd., 2010; Koren vd., 2009; Ferreira ve Carlos, 2002).

Isı şok proteinleri memelilerde lokalizasyonlarına göre başlıca altı sınıfta değerlendirilmektedir. Şaperonin olarak bilinen sınıf mitokondride mtHSP60, mitokondriyel proteinlerin katlanmasında rol oynar, HSP40 sitozolde HSP70'in ATPaz aktivitesini ve protein yüklenmesini kontrol eder, HSP70 sitozolde proteinlerin mitokondri, nükleus ve endoplazmik retikulum gibi organellere taşınmasına yardım eder, mtHSP70 protein katlanması ve mitokondride translokasyonunda etkilidir, HSP90 geldanamisin gibi anti kanser ilaçların hedefi olarak bilinir ve sitozolde sinyal proteinlerinin konformasyonel regülasyonu, steroid hormon reseptörlerinin ve kinazların regülasyonundan sorumludur, Grp94 (HSP90'in

endoplazmik retikulumdaki şaperonu) salgılayıcı proteinlerin katlanması ve bütünlüğünden sorumludur, küçük ısı şok proteini (sHSP) olarak bilinen HSP27 sitozolde ısı denatüre protein agregasyonunu önler, HSP47 endoplazmik retikulumda glikolize proteinlerin katlanmasını, kollajen biyosentezini ve disülfid bağ oluşumunu kontrol etmektedir (Li ve Srivastava, 2004).

4. LİTERATÜR ÖZETİ

Isı şok ya da stres proteinleri molekül ağırlıklarına dayanarak çeşitli gruplara ayrılır ve filogenetik olarak en çok korunmuş proteinler arasındadır. Yeni sentezlenen proteinlerin doğru bir şekilde katlanması ve stabilizasyonu olmak üzere birçok intraselüler fonksiyona sahiptirler. Ayrıca stres proteinleri biyolojik (enfeksiyon, sitokinler) ve fizikokimyasal (ısı, toksik bileşikler) faktörlere cevaben indüklenirler (Rea vd., 2001).

Yaşlanma hücresel fonksiyonlarda değişiklik ve çeşitli tamir sistemlerinde meydana gelen azalmalar ile karakterize olan oldukça karmaşık bir süreçtir. Hücrelerin stres cevabı ve ısı şok proteinleri (HSP) sentezleme kapasiteleri yaşla azalmaktadır (Pahlavani vd., 1996; Heydari vd., 1995; Fagnoli vd., 1990; Faassen vd., 1989). *Caenorhabditis elegans*'da yapılan çalışmalarda HSP'lerin yaşam süresini artırdığı ve yaşlanma ile bağlantılı olan proteotoksisteyi azalttığı gözlenmiştir (Murshid vd., 2013). Rea ve arkadaşları (2001); 20 ve 96 yaşları arasındaki bireylerin serumlarını karşılaştırdığında yaşla birlikte HSP60 ve HSP70 düzeylerinde azalma saptamışlardır (Rea vd., 2001). Liu ve arkadaşları (1989) ise IMR-90 insan diploid fibroblast hücrelerinde ısı şoku sonrasında HSP proteinlerin sentezini tayin etmişler ve en çok Hsp89 ve 72'de değişiklik gözlemlemişlerdir. Bu HSP'lerdeki indüksiyonun gençlerde (popülasyon katlanması, PDL 18 olan hücreler) yaklaşık 10 kat olduğu görülürken, yaşlı hücrelerde (PDL 51) 2-4 kat arası olduğu gözlenmiştir (Liu vd., 1989). Başka bir çalışmada, ısı şokuna cevabı başlatan transkripsiyon faktörü olan ısı şok faktör 1'in (HSF-1), ısı ile indüklenen aktivasyonu trimerizasyon ve ısı şok elementi dizisine bağlanma kapasitesi ile ölçüldüğünde, yaşla ters orantılı olarak değiştiği gözlenmiştir (Lee vd., 1996). Erken yaşlanma hastalığı olan Werner sendromunda ısı şok cevabının fibroblastlarda baskılandığı doğrulanmıştır (Kim vd., 2012). Verbeke ve vd. (2002); insan cilt fibroblast hücrelerini tekrarlı hafif ısı şokuna maruz bıraktıklarında, replikatif yaşlanma ile oluşan protein karbonillerin azaldığını gözlemlemişlerdir (Verbeke vd., 2002). Katalaz ve glutatyon redüktaz gibi enzimlerin ısı şok proteinleri ile oksidatif hasardan korundukları gösterilmiştir (Hook ve Harding, 1997). HSP90 ekspresyonunun en uzun yaşayan hayvan türü olduğu bilinen *Arctica islandica* kalbinde artan yaşla birlikte azaldığı gözlenmiştir (Sosnowska vd., 2013).

Yaşlanmanın mekanizmasını aydınlatmak üzere birçok teori öne sürülmüştür ve 1956 yılında Harman (1956) tarafından hipotez edilen yaşlanmada serbest radikal teorisi literatürde geniş yer tutmaktadır. Bu hipotez sonrasında bu doğrultuda yapılmış olan çeşitli çalışmalar, yaşlılık

ve yaşıllıkla bağlantılı hastalıklarda oksidatif stresin rolünü birçok farklı yöntem ve saptanan belirteçlerle doğrulamıştır. Genellikle reaktif oksijen ve nitrojen türleri olarak sınıflandırılan serbest radikaller son yörüngelerinde ortaklanmamış elektron bulundurmaları nedeniyle oldukça reaktif ürünlerdir ve organizmada DNA, lipid ve proteinlerle reaksiyona girerek organizma için zararlı farklı ürünlerin oluşmasına neden olurlar. Oksidatif stres, organizmada serbest radikal oluşumu ile savunma mekanizmaları olarak bilinen antioksidan sistemlerin arasındaki dengenin serbest radikaller yönünde bozulması sonucu oluşan bir durumdur (Halliwell ve Gutteridge, 2007).

Protein oksidasyonu, proteinlerin organizmada diğer makromoleküllere göre fazla oranda bulunması ve birçok biyokimyasal olayda önemli yer tutmasından dolayı oldukça önemlidir. Posttranslasyonel modifikasyon olarak kabul edilen protein oksidasyonu karboniller gibi modifiye amino asitleri oluşturur ve bu modifikasyonlar hatalı katlanmalara, aktivite kaybına, çapraz bağ oluşumuna veya proteinlerin kırılmasına yol açar (Catalgol ve Grune, 2009). Birçok araştırmacı yaşıllık ve yaşlanma ile ilgili hastalıklarda protein oksidasyonunun önemli yer tuttuğunu göstermiştir. Proteinlerin oksidatif hasarı sonrasında hücreler organizmayı hasarlı polipeptidlerden kurtarmak ve proteinlerin normal yapılarına geri dönmelerini sağlamak için çeşitli tamir ve proteoliz mekanizmaları içerir. Tamir mekanizmaları sadece birkaç ürüne yönelik olmak üzere oldukça sınırlıdır. Proteoliz sistemlerinden proteazomal sistem okside proteinlerin degradasyonunda rol oynayan başlıca enzim sistemidir (Mehlase ve Grune, 2002). Proteazomal sistem başlıca 20S, 26S proteazom ve immünoproteazom yapılarından oluşmaktadır. 20S proteazom, proteazomal sistemde merkezi yapı olarak bilinmektedir ve ATP ve ubikütin bağımsız degradasyondan sorumludur. 19S ve 11S gibi çeşitli regülatörlerin 20S proteazoma bağlanması ile 26S proteazom ve immünoproteazom yapıları oluşmakta, fonksiyon ve aktivitede değişiklikler gözlenmektedir. 26S proteazom ATP ve ubikütin bağımlı degradasyondan sorumludur. İmmünoproteazom immün cevapta önemli rol oynamaktadır ve degradasyon ürünleri hücre yüzeyinde majör histokompabilite kompleksi 1 tarafından sunulmak üzere optimize edilmiştir (Jung vd., 2009). Bu farklı proteazom yapıları birçok stres durumlarında farklı yanıtlar vermektedir. Örneğin şiddetli strese 26S proteazom aktivitesinde azalma gözlenirken, 20S proteazomda artış gözlenebilir (Reinheckel vd., 1998). Ayrıca hücresel sistemler proteinleri hasara ve hatalı katlanmaya karşı ısı şok proteinleri içeren ısı şok cevabını aktive ederek koruyabilirler (Verbeke vd., 2000).

Yapılan çalışmalar yaşlanma ile protein oksidasyonu ürünlerinin yüksek oranda arttığını ve protein agregat yapılarının oluştuğunu göstermiştir (Catalgol vd., 2009). Ayrıca proteazomal degradasyonun da yaş ile orantılı olarak inhibe olduğu bilinmektedir (Jung vd., 2009; Ott ve

Grune, 2014). Hücrelerde yaşlanma sürecinde gerçekleştirilen protein kalite kontrolünde yıkım ya da tekrar katlanma kararının verilmesinde ısı şok proteinleri ve şaperonlar önemli yer tutmaktadır (Kastle ve Grune, 2012). Conconi ve arkadaşları (1996) yaşlanma ile proteazom aktivitesinde azalma meydana geldiğini saptamış ve ısı şok proteini 90 varlığında bu oksidatif inaktivasyonun korunduğunu gözlemişlerdir (Conconi vd., 1996). Tekrarlanan hafif ısı stresinin in vitro olarak yaşlandırılan insan fibroblast hücrelerinde çeşitli yaşla bağlantılı değişiklikleri önlediği gözlenmiştir (Verbeke vd., 2000; Rattan, 1998). Isı ve intraselüler redox dengesindeki değişikliklerin proteazom aktivitesini etkilediği gösterilmiştir (Andersson vd., 1999).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1 Hücre Kültürü

Proje süresince gerçekleştirilen tüm deneylerde cilt fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Hücreler, Prof. Tilman Grune'nin laboratuvarında elde edilmiş ve ardından karakterize edilmiştir. Pasaj numarası 15 olan hücreler, deneylere adı genç hücreler olarak geçen hücreler için pasaj 18'e kadar pasajlanmış ve optimize edilmiş, pasaj numarası 31 olan hücreler deneylere adı yaşlı hücreler olarak geçen hücrelerin eldesi için pasaj 38'e kadar pasajlanmış ve optimize edilmiştir. Yaşlı hücrelerin eldesi her pasaj numarasının iki haftalık bir süreyle artmasından ötürü yaklaşık 2 aylık bir süre almıştır. Bu işlemlere projenin kabulü ardından yürütülmekte olan yazışmalar aşamasında başlanması bu aşamada zaman kazandırmıştır. Hücrelerin beslenme koşulları; sodyum pirüvat, glutamin, yüksek D-glukoz ve sodyum bikarbonat içeren DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) besiyeri ile sağlanmıştır.

Genç ve yaşlı hücrelerde ısı stresi oluşturmak için hücreler DMEM besiyeri içerisinde 1 saat boyunca 42 °C'ye ayarlanmış inkübatörde tutulmuşlardır. Hücreler ısı stresi için 100 mm'lik petrilere ekilmiş ve 3 genç ve 3 yaşlı olmak üzere gruplara ayrılmıştır.

Tablo 1. Deneylerde kullanılan grupların sınıflandırılması. PD25-A, PD58-A, PD25-B, PD58-B, PD25-C ve PD58-C grup kodları olarak kullanılmıştır. PD: population doubling, kümülatif popülasyon artışı

GRUP	37 °C (1 saat)	42 °C (1 saat)	42 °C (1 saat) + 37 °C (3 saat)
GENÇ (PASAJ NO:18, PD: 25)	PD25-A	PD25-B	PD25-C
YAŞLI (PASAJ NO:38, PD: 58)	PD58-A	PD58-B	PD58-C

Verilen ısı uygulamasının ardından genç ve yaşlı hücreler ışık mikroskopisi altında morfolojik olarak incelenmiştir.

5.2 MTT Testi ile Canlılık Tayini

Western blot ve PCR deneylerine başlanmadan önce ilk olarak MTT testi ile canlılık tayini yapıldı. Bu test için; hücreler ısı şoku uygulaması sonrasında 20 cm² petri kabında 3 ml besiyerine 100 µl MTT çözeltisi konularak 2 saat boyunca 37 °C'de ve %5 CO₂ içeren hücre inkübatöründe inkübe edildi. İnkübasyon sonrası besiyeri alınarak hücrelere 1 ml çözündürme karışımı ilave edildi. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 96 kuyulu mikroyuvarlağa 3'er defa 50 µl alınarak 590 nm filtre ve 660 nm referans filtre ile absorbans mikroyuvarlak okuyucuda ölçüldü. Kontrol örneklerinin verdiği absorbans değeri %100 canlı olarak kabul edilirken, diğer örnekler bu değere göre hesaplandı.

5.3 Kantitatif PCR ile Isı Şok Proteinleri mRNA Ekspresyonları Tayini

5.3.1 RNA İzolasyonu

Hücrelerden RNA izolasyonu Qiagen marka hazır kit kullanılarak üretici firmanın tarifine göre yapıldı. 2 ml RLT tamponuna 20 µl β-merkaptöetanol eklendi. Hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra iki defa fosfat tamponu ile yıkandı. Her petriye 350 µl RLT + β-merkaptöetanol çözeltisinden eklendi. Hücre süspansiyonları eppendorf tüplere alındı. 350 µl %70 etanol eklendi ve pipetleme ile iyice karıştırıldı. 700 µl hücre süspansiyonu ve etanol karışımı 2 ml'lik tüpe takılı olan spin kolona aktarıldı. 13.000 rpm 1 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve kolona 700 µl RW1 tamponu eklendi. 13.000 rpm 1 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve kolona 700 µl RPE tamponu eklendi. 13.000 rpm 1 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve kolona 700 µl RPE tamponu eklendi. 13.000 rpm 1 dk santrifüj edildi. Kolon temiz bir tüpe alındı ve 13.000 rpm 1 dk santrifüj edildi. Kolon temiz 1,5 ml'lik eppendorf tüpe alındı, üzerine elüsyon için 50 µl Rnase içermeyen su eklendi, 13.000 rpm 1 dk santrifüj edildi. RNA konsantrasyonunu tayin için 1/40 konversiyon faktörü ile 260 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı.

5.3.2 Total RNA'dan Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Total RNA'dan cDNA sentezi Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis kit (Roche) kullanılarak yapıldı. Her bir örnek 100 ng olacak şekilde hesaplanarak uygun hacimlerde alındı. Random hexamer primerden 60 µM eklendi. Toplam hacim 11.4 µl olacak şekilde PCR kalite su ile tamamlandı. Örnekler, 65°C'de 10 dakika, 4°C'de 5 dakika olacak şekilde "Thermal Cycler" cihazına konuldu. Program bittikten sonra örneklerin üzerine 8 mM MgCl₂, 20 U RNase inhibitör, 1 mM dNTP, 5 mM dithiothreitol, 10 U reverse transcriptase eklendi.

Örnekler “Thermal Cycler” cihazına yerleştirildi. 50°C’de 30 dakika, 85°C’de 5 dakika, 4°C’de 5 dakika tutulduktan sonra işlem tamamlandı.

5.3.3 cDNA Örneklerinin HSP27, HSP40, HSP47, HSP60, HSP70 ve HSP90 Primerleri için Kantitatif Realtime PCR (RT-PCR) ile Çoğaltılması ve Oluşan Ürünlerin Agaroz Jel ile Kontrolü

Tayin edilecek genler için, Homo sapiens HSP27, HSP40, HSP47, HSP60, HSP70 ve HSP90 Entrez Pubmed Nucleotid programında Fasta formatları (mRNA tüm dizisi) saptandı. Sonrasında bu Fasta formatı primer dizaynı için Primer 3 Output programında yerleştirilerek uygun primer dizileri elde edildi.

HSP27 için	sol primer	ACGAGCATGGCTACATCTCC
	sağ primer	CTTTACTTGGCGGCAGTCTC
HSP40 için	sol primer	TCCCAGACCCTGTACACTCC
	sağ primer	TTGCTGGAGTCACTCACTGG
HSP47 için	sol primer	CCCTGAAAGTCCCAGATCAA
	sağ primer	GGGAGAGGTTGGGATAGAGC
HSP60 için	sol primer	CATTCCAGCCTTGGACTCAT
	sağ primer	TCACAACCTTTGTTGGGTCA
HSP70 için	sol primer	AGCCAAGAAGGCAAAAGTGA
	sağ primer	CCACTGCGTTCTTAGCATCA
HSP90 için	sol primer	CGCATGAAGGAGACACAGAA
	sağ primer	TCCCATCAAATTCCTTGAGC

Sentezlenen cDNA örneklerinin çoğaltılması için Biorad, Qiagen ve Finnzyme Sybr Green kitleri denendi. En uygun kitin Qiagen Sybr Green olduğu bulunarak optimizasyonu yapıldı. Reaksiyon, her bir örnek için 25 µl Sybr green, 1.5 µl forward primer, 1.5 µl reverse primer, 5 µl cDNA ve 17 µl Rnase,Dnase free su eklenerek total hacmi 50 µl olarak optimize edildi ve primerler için en uygun annealing sıcaklık 60° C olarak bulundu. Ürünlerin aranan büyüklükte olduğunu kontrol etmek amacıyla, agaroz jel elektroforezi yapıldı. Doğru ürün bulunduğu için bantlar jelden kesildi ve standart curve yapmak amacıyla Qiagen QIAquick Gel Extraction kiti ile jel ekstraksiyonu yapıldı. Elde edilen çift zincirli DNA’nın konsantrasyonu Qubit fluorometre ile ölçüldü ve standart eğri çalışmaları için 10⁹ – 10¹ dilue edildi.

PCR reaksiyon koşulları ilk denatürasyon 95 °C’de 3 dk, 40 döngü olarak 95 °C’de 10 saniye, 60 °C’de 15 saniye ve 72 °C’de 20 saniyedir. Her PCR reaksiyonu sonrasında 65-95

°C arasında erime grafiği analizi yapılarak oluşan ürün kontrol edildi. Ayrıca ürünün kalitesi agaroz jel elektroforeziyle de kontrol edilerek primer dimerlerin oluşmadığı doğrulandı.

5.4 Isı Şok Proteinleri Ekspresyonları Tayini

5.4.1 Protein Konsantrasyonunun Hesaplanması

Elde edilen örneklerdeki Total protein konsantrasyonu Bradford protein tayini (BioRad Protein Assay) ile ölçüldü. Öncelikle Bovine Serum Albümin (BSA) kullanılarak 0 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.8 mg/ml, 1.0 mg/ml, 1.2 mg/ml konsantrasyonlarında standartlar hazırlandı. 96 kuyuluk plakların her bir kuyusuna 4 µl standart veya bilinmeyen örnek ve 200 µl çalışma ayırıcı (protein assay – biorad) eklendi. Daha sonrasında karanlık ortamda 5 dk olmak üzere inkübasyona bırakıldı. Oluşan mavi renk gözlemlenerek 595 nm’de ölçüldü. Oluşturulan standart eğriye göre örneklerdeki protein miktarları hesaplandı.

5.4.2 SDS-PAGE ve Western Blot Yöntemi ile HSP Proteinlerinin Tayin Edilmesi

Hücreler için 30 µg protein içeren homojenatlar 1 mM Tris-HCl, % 40 gliserol, % 8 SDS, % 20 2-β-merkaptoetanol, % 0.03 bromfenol mavisi içeren jel yükleme tamponu ile 1’e 4 oranında sulandırıldı ve 95°C’de 4 dakika ısıtılarak denatüre edildi. Sonrasında ise % 5 yükleme (1 M Tris-HCl, % 30 (w/v) Akrilamid, % 10 (w/v) SDS, % 0,05 (w/v) APS ve % 0,05 (w/v) TEMED eklenerek pH 6.8’de hazırlandı) ve % 12 ayırma (1.5 M Tris-HCl, % 30 (w/v) Akrilamid, % 10 (w/v) SDS, % 0.05 (w/v) APS, % 0.05 (w/v) TEMED eklenerek pH 8.8’de hazırlandı) jeline yüklendi. 2 L, elektroforez yürütme tamponu içinde 100 volt sabit akımda 1 saat sürede proteinler ayrıştırıldı (Biorad, Mini-PROTEAN 3 Cell). Protein molekül ağırlığı belirleyicisi olarak “Precision Plus Protein Standards” (Biorad) kullanıldı.

Ayrıştırılan proteinler, immunoblotting ile ortam sıcaklığında 15 volt sabit akımda, 25 mM Tris-baz, 192 mM glisin ve % 20 v/v metanol içeren, pH 8.3’lük transfer tamponunda 1 saat sürede 0.2 µm kalınlıktaki nitrosellüloz membrana aktarıldı (Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (BioRad)). Daha sonra membran ponceau S boyası ile muamele edilip proteinlerin transfer edildiği konfirme edildi, membran antikor ile tayin edilene kadar PBS içerisinde +4 de bırakıldı.

Antikor ile tayin için ilk aşama olarak membrandaki bağlanmamış yerler % 5 süt tozu-TBST ile 1 saat bloke edildikten sonra membran % 1 süt tozu-TBST ile spesifik primer antikor ile ortam sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Bağlanmamış antikorların TBST ile yıkanmasından sonra membran, 1/5000 oranında sulandırılmış tavşanlara karşı geliştirilmiş amplifiye horseradish peroksidaz (HRP) işaretli keçi sekonder antikor (BioRad) ile 1 saat inkübe edildi ve yıkandıktan sonra kemiluminesans kit ile (20X LumiGLO ve 20X Peroxide, Cell Signaling) kemiluminesans bir reaksiyon gerçekleştirildi ve oluşan ışımaya x-ray filmine geçirilerek

bantların görünmesi sağlandı. X-ray film ile 1,5,10 dk sürelerle membran ile film bekletildi. Kırmızı ışık altında 2 dk developer ve 1 dk fixer solusyonunda bekletildi. Bant yoğunlukları Vilber Lourmat Görüntüleme cihazı kullanılarak TIFF formatında saklandı. Tüm görüntülerdeki bantların piksel yoğunluğu 'Image Programı' ile eşit büyüklükte alanlarda sayıldı.

5.5 Protein Karbonil Tayini

5.5.1 ELISA Yöntemi ile Protein Karbonil Tayini

Protein karbonil tayininde, ilk olarak tüm örneklerin protein konsantrasyonları Lowry yöntemiyle tayin edildi ve tüm örnekler 10 µg/ml protein miktarı olacak şekilde fosfat tamponu ile seyreltilti. Standart redükte ve okside BSA örneklerinin de protein miktarları 10 µg/ml şekilde seyreltilti. Örnekler ve standartlar 100'er µl olarak Nunc Maxisorb 96 kuyulu mikropatlara 3'er tekrarlı olacak şekilde pipetlendi ve gece boyunca 4 °C'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, plaktaki çözeltiler dökülerek kuyular 1 defa soğuk fosfat tamponu ile yıkandı. Derivatizasyon için dinitrofenilhidrazin çözeltisinden 100'er µl pipetlendi ve 45 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Bloklama için her kuyuya, multikanal pipetle 250 µl bloklama çözeltisi eklendi ve karanlıkta oda sıcaklığında 1,5 saat inkübe edildi. Inkübasyon sonrası, plaktakiler döküldü, her kuyuya multikanal pipetle 200 µl Anti-DNP-antikoru eklendi ve 1 saat 37 °C'de inkübe edildi. Plaktakiler dökülerek kuyular 3'er defa % 0,1 Tween 20 içeren fosfat tamponu ile yıkandı. Her kuyuya multikanal pipetle 200 µl Anti-tavşan-IgG-POD-antikoru eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. Plaktakiler dökülerek kuyular 3'er defa % 0,1 Tween 20 içeren fosfat tamponu ile yıkandı. Her kuyuya multikanal pipetle 200 µl substrat çözeltisi eklendi ve 15 dakika 37 °C'de inkübe edildi. Plaktakileri dökmeden her kuyuya multikanal pipetle 200 µl reaksiyon sonlandırıcı çözelti eklendi. Absorbans mikropalak okuyucuda 492 nm filtre ve 750 nm referans filtre kullanılarak ölçüldü (Buss vd., 1997).

5.5.2 Oxy-blot Yöntemi ile Protein Karbonil Tayini

SDS-PAGE ve immunoblotting aşamasını takiben nitroselüloz membran %20 MetOH içeren TBS solüsyonunda 5 dakika, 2N HCl ile 5 dakika, 10 mM DNPH'de 5 dakika, 2N HCl ile 3x5 dakika ve %50 MetOH solüsyonunda 5x5 dakika boyunca yıkandı.

Daha sonra antikor ile tayin için ilk aşama olarak membrandaki bağlanmamış yerler % 5 süt tozu-TBST ile 1 saat bloke edildikten sonra membran % 1 süt tozu-TBST ile spesifik primer antikor (DNP) ile ortam sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Bağlanmamış antikorların TBST ile yıkanmasından sonra membran, 1/5000 oranında sulandırılmış tavşanlara karşı geliştirilmiş amplifiye horseradish peroksidaz (HRP) işaretli keçi sekonder antikor (BioRad) ile 1 saat

inkübe edildi ve yıkandıktan sonra kemiluminesans kit ile (20X LumiGLO ve 20X Peroxide, Cell Signaling) kemiluminesans bir reaksiyon gerçekleştirildi ve oluşan ışıma x-ray filmine geçirilerek bantların görünmesi sağlandı. X-ray film ile 1,5,10 dk sürelerle membran ile film bekletildi. Kırmızı ışık altında 2 dk developer ve 1 dk fixer solusyonunda bekletildi. Bant yoğunlukları Vilber Lourmat Görüntüleme cihazı kullanılarak TIFF formatında saklandı. Tüm görüntülerdeki bantların piksel yoğunluğu 'Image Programı' ile eşit büyüklükte alanlarda sayıldı.

5.6 Isı Stresi Sonrası Genç ve Yaşlı Hücrelerde Protein Karbonilasyonunun LC-MS ile Analizi

Isı stresi sonrası elde edilen hücre ekstraktları bir boyutlu jel elektroforezi sonrası, protein karbonilasyon tayini için analiz edildi. Protein karbonilde değişiklik gözlenen bantlar kesilerek LC-MS/MS ve MALDI-TOF ile analiz edildi.

SDS-PAGE ve immunoblotting aşamasını takiben nitroselüloz membran %20 MetOH içeren TBS solüsyonunda 5 dakika, 2N HCl ile 5 dakika, 10 mM DNPH'de 5 dakika, 2N HCl ile 3x5 dakika ve %50 MetOH solüsyonunda 5x5 dakika boyunca yıkandı. Daha sonra antikor ile tayin için ilk aşama olarak membrandaki bağlanmamış yerler % 5 süt tozu-TBST ile 1 saat bloke edildikten sonra membran % 1 süt tozu-TBST ile spesifik primer antikor (DNP) ile ortam sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Bağlanmamış antikorların TBST ile yıkanmasından sonra membran, 1/5000 oranında sulandırılmış tavşanlara karşı geliştirilmiş amplifiye horseradish peroksidaz (HRP) işaretli keçi sekonder antikor (BioRad) ile 1 saat inkübe edildi ve yıkandıktan sonra kemiluminesans kit ile (20X LumiGLO ve 20X Peroxide, Cell Signaling) kemiluminesans bir reaksiyon gerçekleştirildi ve oluşan ışıma x-ray filmine geçirilerek bantların görünmesi sağlandı. X-ray film ile 1,5,10 dk sürelerle membran ile film bekletildi. Kırmızı ışık altında 2 dk developer ve 1 dk fixer solusyonunda bekletildi. Bant yoğunlukları PDQuest™8.0.1 (Bio-Rad) cihazı kullanılarak TIFF formatında saklandı. Tüm görüntülerdeki bantların piksel yoğunluğu eşit büyüklükte alanlarda sayıldı.

Jellerin parçalanması, tripsinle gerçekleştirildi. 0.6 µl 1:1 hacimde matriks solüsyonu (α -siyano-4-hidroksisinnamik asid) ile karıştırılarak MALDI plakasına uygulandı ve bu şekilde MALDI TOF MS analizi yapıldı. Kütle spektrometre analizleri BrukerUltraflex II. Spectra program kullanılarak yapıldı. Spektrumlar mMass program ve manuel olarak PMF araştırması ile analiz edildi. Analizler 60-100 ppm hata seviyesinde "insane" SwissProt kullanılarak yapıldı.

Daha ayrıntılı parçalama StageTips kullanılarak yapıldı ve elde edilne ekstraktlar LC-MS/MS ile tekrar analiz edildi. Bunun için peptidler 60 dakika boyunca 5-65 % asetonitril/0.1 formik asid ile elüe edildi. Mascot 2.2 ve UniProt/Swissprot ile analiz yapıldı.

MALDI-TOF ve LC-MS/MS analizleri kısmı diğerk bir COST CM1001 üyesi olan Jonas Bergquist'in laboratuvarında (Analytical Chemistry, Department of Chemistry – BMC and Science for Life Laboratory, Uppsala University, P.O. Box 599, SE-751 24 Uppsala, Sweden) birlikte gerçekleştirildi. Sonuçlar makale haline dönüştürüldü ve Journal of Proteomics dergisinde yayınlandı (Bozaykut vd., 2013).

5.7 ELISA Yöntemi ile Nitrotirozin Tayini

Nitrotirozin tayininde yarışmalı ELISA metodu kullanıldı ve ilk olarak tüm örneklerin protein konsantrasyonları Lowry yöntemiyle tayin edildi ve tüm örnekler 10 µg/ml protein miktarı olacak şekilde fosfat tamponu ile seyreltildi. 0-8000 nm konsantrasyonları arasında standart solüsyonları hazırlandı. Protein örnekleri ve standartlar plaka 50'şer µl pipetlendi ve 10 dk inkübe edildi. Ardından bir saat boyunca anti-nitrotirozin antikoru eklenerek inkübe edildi. 3 defa yıkamanın sonrasında bir saat boyunca sekonder antikor ile inkübe edildi. Tekrar kuyular yıkanarak substrat ve sonrasında sonlandırıcı solüsyon ile inkübe edildi. 450 nm'de absorbansı ölçüldü. Yarışmalı ELISA olduğu için, ne kadar az absorbans göstermesi o kadar çok nitrotirozin miktarı olduğunun göstergesidir. Elde edilen absorbans değerleri, standartların absorbans değerleri ile kıyaslanarak miktar tayini hesaplaması yapıldı.

5.8 Proteomik Analiz

5.8.1 İki Boyutlu Jel Elektrofrez

Fibroblast hücreleri, total protein ekstraksiyon kiti kullanılarak (Bio-Rad) parçalandı. Protein konsantrasyonlarının belirlenmesinin ardından, proteinleri izoelektrik noktalarına göre ayırmak için İzoelektrik fokuslama (Protean IEF sytem (Biorad)) işlemi pH 4-7 aralığında gerçekleştirildi. İzoelektrik fokuslama için IPG strip (pI 4-7,11 cm (Biorad)) kullanıldı. Proteinleri izoelektrik noktalarına göre ayırma işleminden sonra IPG strip, %4-12'lik poliakrilamid jel (PROTEAN lxi electrophoresis cell (Biorad)) üzerine yüklendi ve proteinlerin moleköl ağırlıklarına göre ayrılmaları sağlandı (MW: 10-250 kDa). Elde edilen jeller SYPRO RUBY boya kullanılarak, floresan boyama yöntemi ile boyandı. "Infinity-capt software Vilber Lourmat- Molecular Imager" ile görüntüleme işlemi gerçekleştirildi. Bio 2D-Software (Vilber Lourmat) ile protein spot analizleri yapıldı.

5.8.2 Jelden Protein İzolasyonu

İki boyutlu jel elektrofrez sonrası jelden kesilmiş olan spotlar, 10 mM DTT (ditiyotreitöl) ile redüklendi ve 55 mM iyodoasetamit ile alkillendi. Yıkama işlemi sonrasında jel parçaları asetonitril ile dehidrate edildi. Bunu takiben amonyum bikarbonat tamponu ile rehidrate edildi.

Jel parçaları tekrar asetonitril ile dehidrate edilerek vakum santrifüjde kurutuldu. Bu işlemi takiben jel parçaları, 0,5 µM tripsin ve 250 µM kalsiyum klorid içeren, 50 mM amonyum bikarbonat tamponunda +4°C'de 40 dakika boyunca rehidrate edildi. Rehidratasyon basamağı sonrası örnekler, 37°C de bir gece inkübasyona bırakıldı ve test tüpüne aktarıldı.

5.8.3 Kütle Spektrometri Analizleri

MALDI TOF MS analizleri için, peptitlerine parçalanmış örneklerden 0,6 µl alındı, MALDI hedef plaka üzerine (çelik zemin 24 x 16 noktalar) uygulandı ve 1:1 (v/v) oranında doymuş matriks solüsyonu (30% asetonitril/0.1% trifloro asetik asit içeren α-siyano-4-hidroksisinnamik asit) ile karıştırıldı. Kütle spektrometresi analizi "BrukerUltraflex II" kullanılarak gerçekleştirildi. Spektrumlar "mMass" programı kullanılarak analiz edildi. Manual PMF taramaları başlatıldı ve taramalar genellikle 60–100 ppm hata düzeyleri kullanılarak "human, SwissProt (2013–01)" veritabanı ile gerçekleştirildi.

5.9 siRNA ile HSP70 Ekspresyonunun Susturulması

Yaklaşık 2 milyon PD 25 olan fibroblast hücreleri ekildi ve hücreler çoğalınca deney için tripsinize edilerek sayıldı. Hücreler 6 well plate'e ekildi ve 37°C'de, 5% CO₂ ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün complete medium kaldırıldı ve siRNA uygulaması yapıldı. siRNA hazırlığı için, 20 µM stok kontrol, pozitif kontrol siRNA (GAPDH), negatif kontrol siRNA (non targeting) ve hedef siRNA olan Hsp70 RNase-free su ile 5 µM'a dilue edildi. Daha sonra ayrı tüplerde serum içermeyen medium ile siRNA dilue edildi ve dharmafect transfeksiyon solüsyonu hazırlandı, 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra her kuyu için 100 µl siRNA solüsyonu ve 100 µl transfeksiyon solüsyonu karıştırılarak 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Hazırlanan bu 200 µM siRNA transfeksiyon solüsyonu üzerine 1800 µl antibiyotiksiz medium eklendi ve kuyulardaki complete medium kaldırılarak siRNA solüsyonu eklendi. siRNA'ların son konsantrasyonu 25 nM olacak şekilde hazırlandı. Protein analizi için 24 saat 37 derecede 5% CO₂ de inkübe edildi. 24 saat sonra transfeksiyon mediumu, complete medium ile değiştirildi ve 48 saatin ardından protein izolasyonu yapıldı. Bu hücrelere ısı stresi uygulamasının ardından sıvı sentilasyon ve proteazom aktivite tayini deneyleri yapıldı.

5.10 KNK437 ile HSP70 İnhibisyonu

HSP70 inhibitörü olan KNK437, dimetilsülfoksit içerisinde çözülerek hücrelere 100 µM konsantrasyonda ve ısı şokundan önce 1 saat boyunca uygulandı. Sonrasında western blot analizi ile inhibitörün etkisi hem genç hem de yaşlı hücrelerde üç tekrarlı olarak tayin edildi.

5.11 Sıvı Sintilasyon Metodu ile Protein Döngüsü Tayini

Hücreler 100 µCi/ml aktivitede 35S metiyonin/sistein ile 37 °C'de 16 saat boyunca inkübe edildi. Proteoliz analizi için besiyeri eşit hacimde %20 trikloroasetik asit ile karıştırılarak asidde çözünür fraksiyon 14.000 g santrifüj sonrası sıvı sintilasyon sayacı (bu proje kapsamında satın alınan) ile sayıldı. Asidde çözünür sayım (aside çözünür örnek sayını / inkorpore olan sayım)x100 olarak hesaplandı. Protein agregat ölçümü için deterjanda çözünürlük deneyi kullanıldı. Hücreler hücre kaldırıcı ile kaldırıldıktan sonra pelletler %1 Triton X-100,%0.5 sodyum deoksikolat, %0.1 SDS içeren 10mM Tris-HCl tamponu içerisinde resüspande edildi. 15 dakika 4 °C'de gerçekleştirilen hücre lizis sonrası 13.000 g'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar deterjanda çözünür proteinler olarak sayılırken, pelletler deterjanda çözünmeyen protein olarak sayıldı. Pelletlerin sayılabilmesi için 1N NaOH içerisinde çözündürme işlemi gerçekleştirildi (Catalgol ve Grune, 2009).

5.11.1 Genç ve Yaşlı Hücrelerde Sıvı Sintilasyon Metodu ile Protein Döngüsü Tayini

PD 25 ve PD58 olan fibroblast hücrelerinde ilk olarak hiçbir uygulama yapılmadan protein döngüsü tayini yapıldı. Buradaki amaç yaşlanma ile proteoliz ve protein agregat oluşumunun hücresel yaşlanma ile değişimlerini gözlemlemektir.

5.11.2 Isı Stresi Uygulanan Genç Hücrelerde Sıvı Sintilasyon Metodu ile Protein Döngüsü Tayini

PD 25 olan fibroblast hücrelerinde 1 saat ısı stresi uygulamanın ardından hemen ve 3 saat normal inkubasyonun ardından protein döngüsü tayini yapıldı. Buradaki amaç uygulanan ısı stresinin proteoliz ve protein agregat oluşumu üzerindeki etkilerini gözlemlemektir.

5.11.3 siRNA ile HSP70 Ekspresyonu Susturulan Genç Hücrelerde Sıvı Sintilasyon Metodu ile Protein Döngüsü Tayini

PD 25 olan fibroblast hücrelerinde siRNA ile HSP70 ekspresyonunun susturulmasının ardından protein döngüsü tayini yapıldı. Buradaki amaç HSP70'in proteoliz ve protein agregat oluşumu üzerindeki etkilerini doğrulamaktır.

5.11.4 KNK437 ile HSP70 İnhibisyonu Yapılan Genç Hücrelerde Sıvı Sintilasyon Metodu ile Protein Döngüsü Tayini

PD 25 olan fibroblast hücrelerinde KNK437 ile HSP70 ekspresyonunun inhibe edilmesinin ardından protein döngüsü tayini yapıldı. Buradaki amaç HSP70'in proteoliz ve protein agregat oluşumu üzerindeki etkilerini doğrulamaktır.

5.12 Proteazom Aktivite Tayini

Proteazom enzim aktivitesi, hem merkez kısmı olan 20S proteazom ve hem de 19S regülör bağlı hali olan 26S enzim aktivitesi olarak iki şekilde ölçülmüştür. 20S aktivite tayini için ortamdaki ATP'yi azaltan ve 26S aktiviteyi inhibe eden hekzokinaz ve deoksiglukoz kullanılmıştır. Aktivite tayini suc-LLVY-MCA substratının proteazom ile degrade olarak floresan özallikte olan MCA ürününün floresan okuyucu ile tayinine dayanmaktadır (Catalgol vd., 2009).

Proteazom aktivitesini tayin için ilk olarak, hücre membranları lizis tamponu ile parçalandı. Hücreler fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra 1×10^6 hücre için 300 µl lizis tamponu ve 0,5 µl DTT karışımından oluşan çözelti kullanıldı. Hücreler hücre kazıyıcı ile kaldırıldıktan sonra eppendorf tüplere alındı ve 10 defa 20G iğne ucu ve şırıngadan geçirilerek membranlar parçalandı. Sıvı nitrojen ve 40 °C su banyosunda dondurma ve çözme şeklinde 3 kez tekrarlanarak sitozolik enzimin daha iyi şekilde açığa çıkarılması sağlandı. 13.400 rpm, 4 °C'de 30 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir eppendorf tüpe aktarıldı ve aktivite tayininde kullanıldı. Proteazom aktivite tayininin gerçekleştirileceği 96 kuyulu mikropakta bir kuyunun dizaynında; Hücre lizatı 10 µl, Proteoliz tamponu 33,3 µl, DTT 0,2 µl, H₂O 66,5 µl, Laktasistin 4,5 µl olacak şekilde ayarlandı, ardından 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır ve 10 µl Suc-LLVY-MCA ilavesiyle son hacim 120 µl'ye tamamlandı. Reaksiyon 37 °C'de, 30 dakika boyunca yürütüldü. Bu reaksiyon sonucu olarak 20S proteazoma ait kimotripsin benzeri aktivite ölçüldü. Reaksiyon sonucunda açığa çıkan metilkumarin peptidin floresansı 365 nm eksitasyon ve 460 nm emisyon dalga boylarında ölçüldü. Metilkumarin standart çözeltilerinin floresanslarının direkt ölçümüyle hazırlanan standart eğriye göre proteazom aktivitesi dakika ve mg protein başına nmol MCA açığa çıkışı olarak hesaplandı. Hesaplama için örneklerin protein miktarları Bradford yöntemi ile tayin edildi.

5.12.1 Isı Stresi Uygulanan Genç ve Yaşlı Hücrelerde Proteazom Aktivite Tayini

PD 25 ve 58 olan fibroblast hücrelerinde 1 saat ısı stresi uygulamanın ardından hemen ve 3 saat normal inkübasyonun ardından proteazom aktivite tayini yapıldı.

5.12.2 siRNA ile HSP70 Ekspresyonu Susturulan Genç Hücrelerde Proteazom Aktivite Tayini

PD 25 olan fibroblast hücrelerinde siRNA ile HSP70 ekspresyonunun susturulmasının ardından proteazom aktivite tayini yapıldı.

5.12.3 KNK437 ile HSP70 İnhibisyonu Yapılan Genç ve Yaşlı Hücrelerde Proteazom Aktivite Tayini

PD 25 ve 58 olan fibroblast hücrelerinde KNK437 ile HSP70 ekspresyonunun inhibe edilmesinin ardından proteazom aktivite tayini yapıldı.

5.13 HSP40 İmmünpresipitasyonu

İlk olarak solusyonlar şu şekilde hazırlandı: 20X PBS, 1X olacak şekilde distile su ile dilue edildi. 20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodyum pirofosfat, 1 mM β -gliserolfosfat, 1 mM Na₃VO₄, 1 μ g/ml leupeptin içeren 10X hücre liziz tamponu, 1X olarak dilue edildi ve kullanmadan hemen önce 1mM PMSF eklendi. 187.5 mM Tris-HCl (pH 6.8 at 25°C), 6% w/v SDS, 30% gliserol, 150 mM DTT, 0.03% w/v bromfenol mavisi içeren 3X SDS örnek tamponu hazırlandı.

Daha sonra hücre lizatları hazırlandı. Confluent olan hücrelerin medium'u kaldırıldı ve buzda bekletilmiş PBS ile 1 kere yıkandı. 10 cm'lik petri için 0.5 ml buzda bekletilmiş 1X hücre liziz tamponu eklendi ve 5 dakika buz üzerinde bekletildi. Hücreler scrape ile kaldırılarak temiz bir eppendorf'a alındı. 4 kere olmak üzere 5 saniye sonikasyon uygulandı ve aralarda 1 dakika buz üzerinde bekletildi. 14,000 X g'de 4°C'de 10 dakika santrifüj yapıldı ve ardından elde edilen süpernatant -80°C'e kaldırıldı. Protein miktarı Lowry methodu ile belirlendi ve immünpresipitasyon için 1000-3000 μ g protein kullanıldı.

İmmünpresipitasyon için bir eppendorfta 40 μ l bead üzerine 500 μ l 1X liziz tamponu eklendi, kısa vorteks sonrası eppendorflar "Magnetic Separation Rack" üzerine yerleştirilerek 10-15 sn beklendi. Supernatantlar alındı ve geriye kalan pellet ile deneye "Pre-Washed" beadler üzerinden devam edildi.

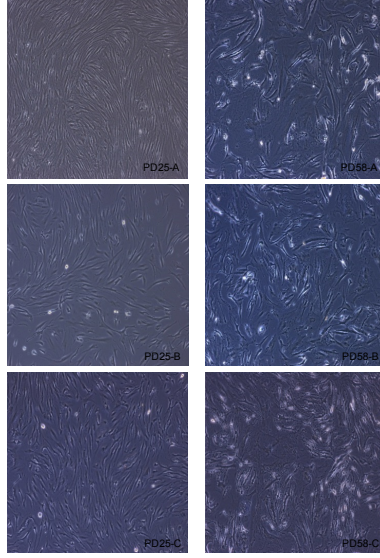
"Pre-Clean" lizatı şu şekilde hazırlandı: 1000-3000 μ g arası lizata 40 μ l "Pre-Washed" bead eklendi ve 4°C'de 2 saat bekletildi, manyetik rack üzerinde 10-15 saniye tutuldu ve supernatant ayrı bir eppendorfa alındı. Lizat pre-clean uygulaması sonrası beadler liziz tampondan geçirilerek -20 °C'de saklandı ve ertesi gün negatif kontrol için kullanıldı.

Negatif Kontrol (Bead+Lizat) için şu şekilde hazırlandı: Bir önceki günden hazırlanan ve -20 °C'de saklanan beadler 3 defa 500 μ l 1X liziz tamponu ile yıkandı. Son yıkamanın ardından pellet 50 μ l sample (Laemmli) buffer içinde resuspende edilerek vortekslendi ve 95°C'de 5 dakika inkübe edildi. Sonrasında 14,000 X g'de 1 dakika santrifüj yapıldı ve ayrılan süpernatant bir eppendorf'a alınarak western blotting uygulandı.

1000-3000 µg arası pre-clean uygulanmış lizata 1/1000 dilusyonda Hsp40 primer antikor ile overnight bekletildi. Ertesi gün magnetik bead stock eppendorfunu kullanmadan önce kısa bir vorteks yapıldı. Overnight inkübe edilmiş lizat-antikor kompleksi “Pre Washed” manyetik bead içeren eppendorfa aktarıldı. 30 dakika hafif çalkalamada oda sıcaklığında inkübe edildi. Lizat-antikor-bead içeren eppendorf manyetik rack’a yerleştirildi, 10-15 saniye bekletildi ve dikkatlice süpernantı ayrıldı. Ayrılan bu süpernatant -20 °C’ye kaldırıldı. Geri kalan pellet, 3 defa 500 µl 1X lysis buffer ile yıkandı. Son yıkamanın ardından antikor-antijen-bead içeren pellet 50µl sample (Laemmli) buffer içinde resuspende edilerek vortekslendi. Sample buffer içeren örnekler 95°C’de 5 dakika ısıtılarak beadler kopartıldı ve 14,000 X g 1 dakika santrifüj sonrası supernatant temiz bir eppendorfa alındı. Elde edilen 50 µl’lik supernatant’ın 25 µl’si western blotting için kullanıldı. 1 mg protein HSP40 antikor (Cell signaling, cat no : 4868) ile overnight inkübe edilen (1:50 dilusyon) nitroseluloz membranda immunpresitasyonun başarılı olduğunu gözlemlendi. Bead ve protein lizatı içeren negatif kontrol örneklerinde ise herhangi bir bant oluşmaması ile deney confirme edildi.

6. BULGULAR

6.1 Isı Stresi Sonrası Hücrelerin Mikroskop Görüntüleri

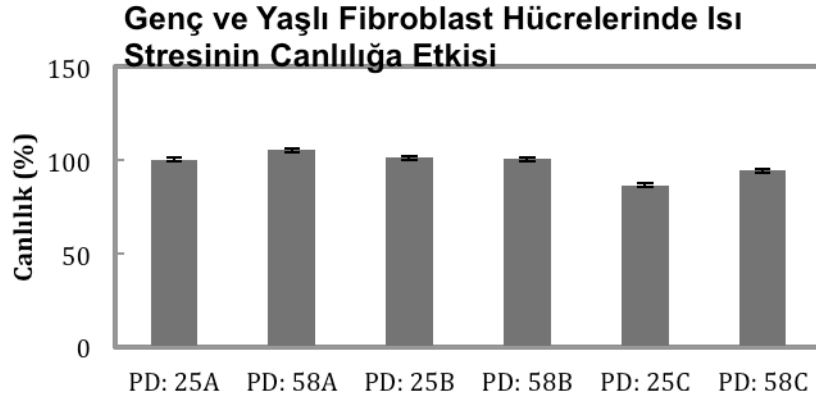


Şekil 1. Yaşlanma ve ısı stresinin fibroblast hücrelerine morfolojik açıdan etkileri

*A: 37 °C'de 1 saat, B: 42 °C'de 1 saat, C: 42 °C'de 1 saat + 37 °C'de 3 saat

PD58 olan yaşlı hücrelerde morfolojik olarak gözle görülür değişiklik gözlenmektedir. Isı stresi ile mikroskobik görüntülerinde ısı uygulanmayan hücreler ile kıyaslandığında değişiklik gözlenmemektedir.

6.2 MTT testi ile canlılık tayini



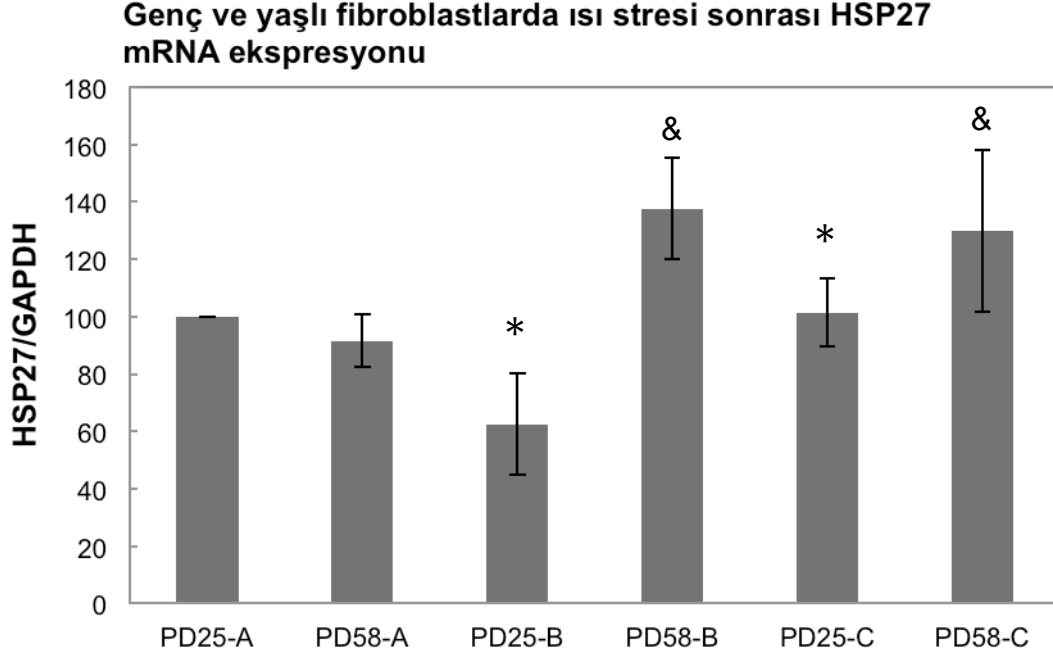
Şekil 2. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücreleri canlılığına etkileri

*A: 37 °C'de 1 saat, B: 42 °C'de 1 saat, C: 42 °C'de 1 saat + 37 °C'de 3 saat

Oluşturulan ısı stresinin genç ve yaşlı hücrelerde canlılığı önemli ölçüde etkilemediği gözlenmektedir.

6.3 Kantitatif realtime PCR (RT-PCR) ile tayin edilen mRNA ekspresyonu sonuçları

6.3.1 HSP27 mRNA Ekspresyonu



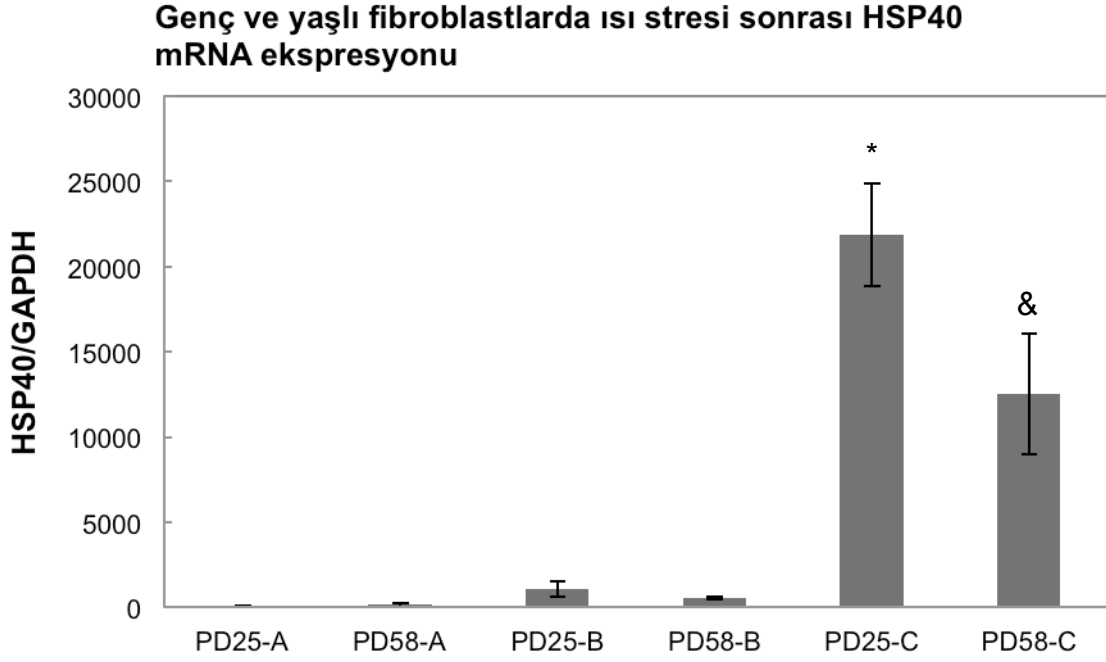
Şekil 3. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde HSP27 mRNA ekspresyonuna etkileri

*A: 37 °C'de 1 saat, B: 42 °C'de 1 saat, C: 42 °C'de 1 saat + 37 °C'de 3 saat

Kontrol örnekleri kıyaslandığında HSP27 ekspresyonunun yaşlı hücrelerde önemli değişiklik göstermediği gözlenmektedir. Uygulanan ısı stresinin, hemen tayin edildiğinde, HSP27 ekspresyonlarında genç hücrelerde azalmaya neden olurken yaşlı hücrelerde artışa neden olduğu gözlenmektedir. Hücrelerin ısı stresi sonrasında 3 saat normal koşullarda tutulmasının ardından tayin edildiğinde HSP27 ekspresyonlarında hem genç hem de yaşlı hücrelerde artış gözlenmektedir.

*p<0.05 PD25-A'ya kıyasla; &p<0.05 PD58-A'ya kıyasla.

6.3.2 HSP40 mRNA Ekspresyonu



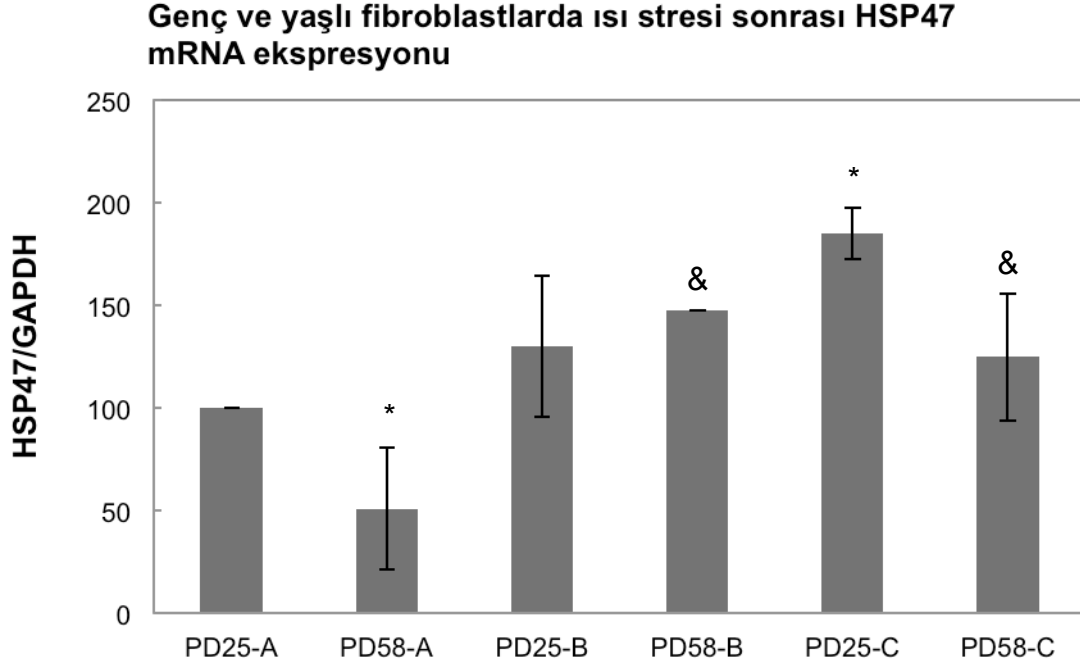
Şekil 4. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde HSP40 mRNA ekspresyonuna etkileri

*A: 37 °C'de 1 saat, B: 42 °C'de 1 saat, C: 42 °C'de 1 saat + 37 °C'de 3 saat

Kontrol örnekleri kıyaslandığında HSP40 ekspresyonunun yaşlı hücrelerde önemli değişiklik göstermediği gözlenmektedir. Uygulanan ısı stresinin hemen tayin edildiğinde HSP40 ekspresyonlarında hem genç hem de yaşlı hücrelerde artışa neden olduğu gözlenmektedir. Fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Hücrelerin ısı stresi sonrasında 3 saat normal koşullarda tutulmasının ardından tayin edildiğinde HSP40 ekspresyonlarında hem genç hem de yaşlı hücrelerde yüksek miktarda bir artış gözlenmektedir.

*p<0.05 PD25-A'ya kıyasla; &p<0.05 PD58-A'ya kıyasla.

6.3.3 HSP47 mRNA Ekspresyonu



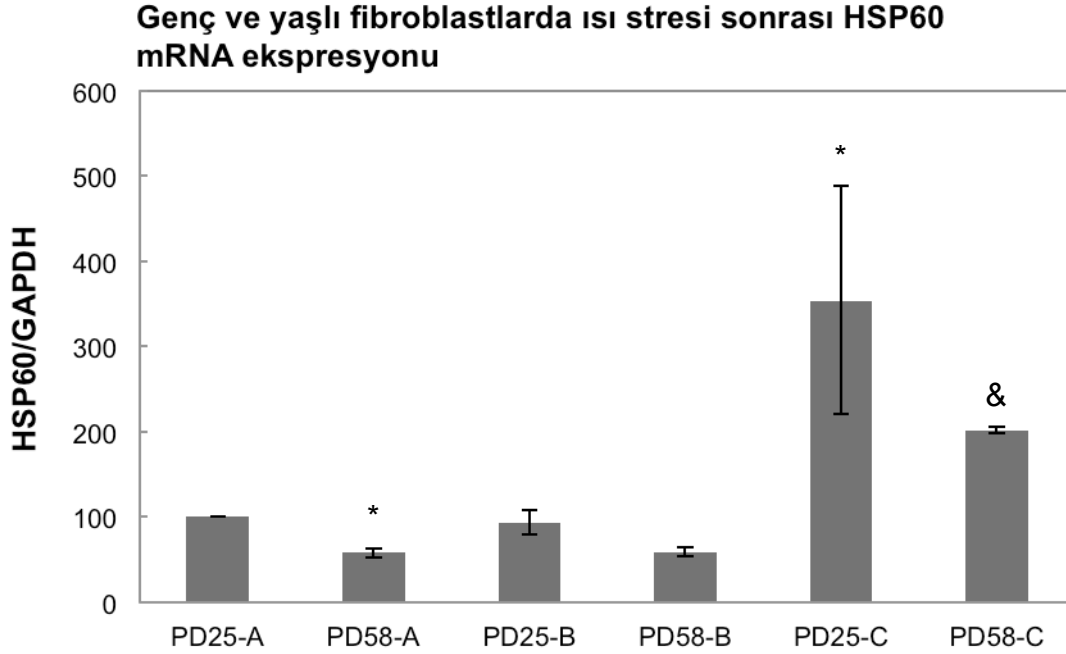
Şekil 5. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde HSP47 mRNA ekspresyonuna etkileri

*A: 37 °C'de 1 saat, B: 42 °C'de 1 saat, C: 42 °C'de 1 saat + 37 °C'de 3 saat

Kontrol örnekleri kıyaslandığında HSP47 ekspresyonunun yaşlı hücrelerde azalma gösterdiği gözlenmektedir. Uygulanan ısı stresinin hemen tayin edildiğinde HSP47 ekspresyonlarında hem genç hem de yaşlı hücrelerde kontrole kıyasla artışa neden olduğu fakat genç hücrelerde elde edilen sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmektedir. Hücrelerin ısı stresi sonrasında 3 saat normal koşullarda tutulmasının ardından tayin edildiğinde HSP47 ekspresyonlarında hem genç hem de yaşlı hücrelerde kontrole kıyasla artış gözlenmektedir.

*p<0.05 PD25-A'ya kıyasla; &p<0.05 PD58-A'ya kıyasla.

6.3.4 HSP60 mRNA Ekspresyonu



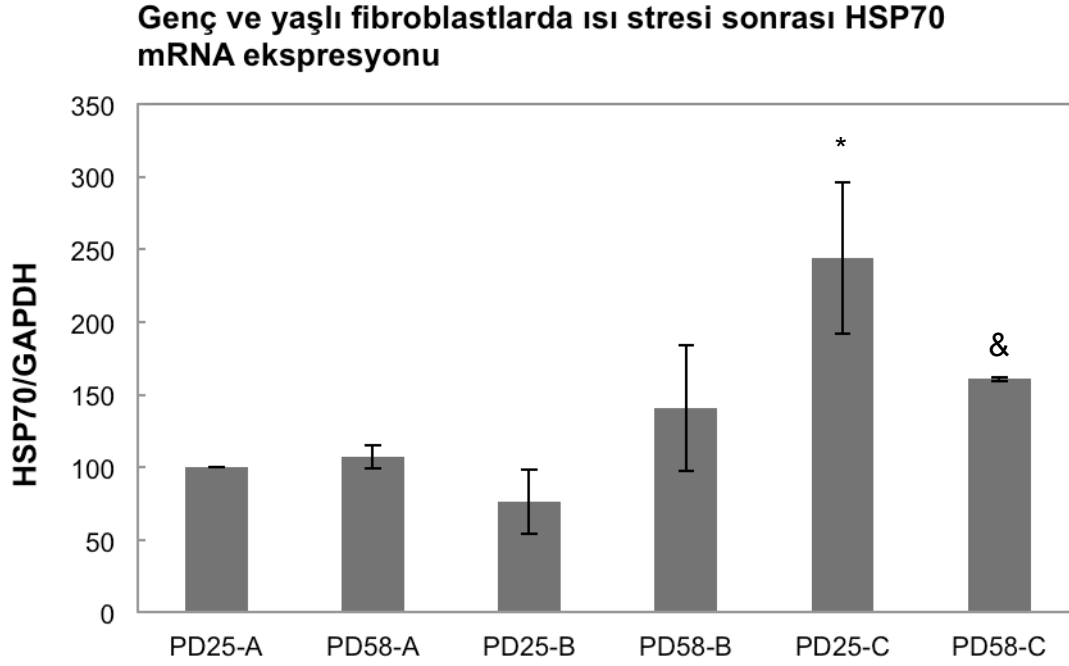
Şekil 6. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde HSP60 mRNA ekspresyonuna etkileri

*A: 37 °C'de 1 saat, B: 42 °C'de 1 saat, C: 42 °C'de 1 saat + 37 °C'de 3 saat

Kontrol örnekleri kıyaslandığında HSP60 ekspresyonunun yaşlı hücrelerde azalma gösterdiği gözlenmektedir. Uygulanan ısı stresinin hemen tayin edildiğinde HSP60 ekspresyonlarında hem genç hem de yaşlı hücrelerde kontrole kıyasla değişiklik göstermediği gözlenmektedir. Hücrelerin ısı stresi sonrasında 3 saat normal koşullarda tutulmasının ardından tayin edildiğinde HSP60 ekspresyonlarında hem genç hem de yaşlı hücrelerde kontrole kıyasla artış gözlenmektedir.

*p<0.05 PD25-A'ya kıyasla; &p<0.05 PD58-A'ya kıyasla.

6.3.5 HSP70 mRNA Ekspresyonu



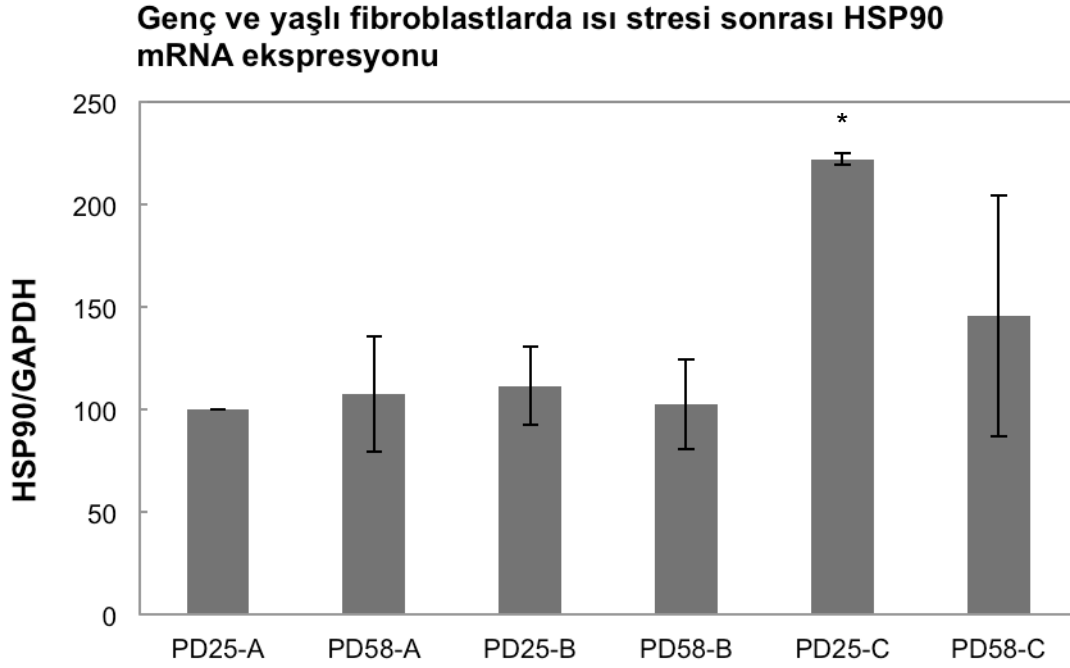
Şekil 7. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde HSP70 mRNA ekspresyonuna etkileri

*A: 37 °C'de 1 saat, B: 42 °C'de 1 saat, C: 42 °C'de 1 saat + 37 °C'de 3 saat

Kontrol örnekleri kıyaslandığında HSP70 ekspresyonunun yaşlı hücrelerde önemli değişiklik göstermediği gözlenmektedir. Uygulanan ısı stresinin hemen tayin edildiğinde HSP70 ekspresyonlarında kontrole kıyasla genç hücrelerde azalmaya yaşlı hücrelerde ise artışa neden olduğu fakat elde edilen sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmektedir. Hücrelerin ısı stresi sonrasında 3 saat normal koşullarda tutulmasının ardından tayin edildiğinde HSP70 ekspresyonlarında hem genç hem de yaşlı hücrelerde kontrole kıyasla artış gözlenmektedir.

*p<0.05 PD25-A'ya kıyasla; &p<0.05 PD58-A'ya kıyasla.

6.3.6 HSP90 mRNA Ekspresyonu



Şekil 8. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde HSP90 mRNA ekspresyonuna etkileri

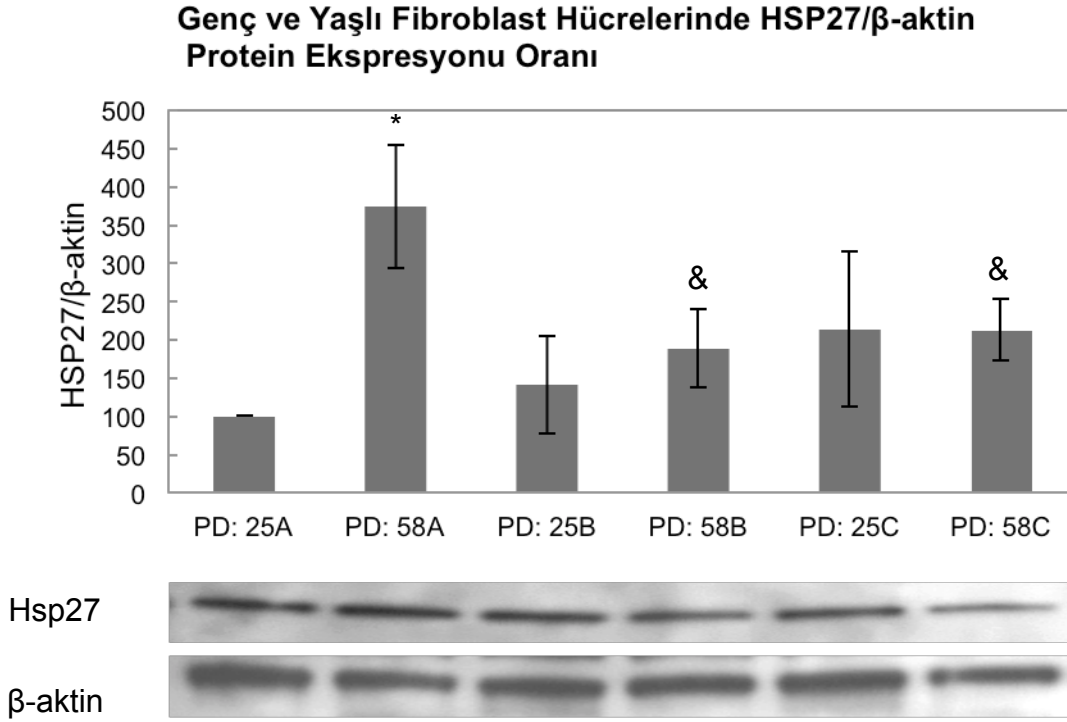
*A: 37 °C'de 1 saat, B: 42 °C'de 1 saat, C: 42 °C'de 1 saat + 37 °C'de 3 saat

Kontrol örnekleri kıyaslandığında HSP90 ekspresyonunun yaşlı hücrelerde önemli değişiklik göstermediği gözlenmektedir. Uygulanan ısı stresinin hemen tayin edildiğinde HSP90 ekspresyonlarında hem genç hem de yaşlı hücrelerde önemli değişiklik göstermediği gözlenmektedir. Hücrelerin ısı stresi sonrasında 3 saat normal koşullarda tutulmasının ardından tayin edildiğinde HSP90 ekspresyonlarında kontrole kıyasla genç hücrelerde artış, yaşlı hücrelerde kontrole kıyasla önemli değişiklik olmadığı gözlenmektedir.

*p<0.05 PD25-A'ya kıyasla.

6.4 SDS-PAGE ve Western Blot ile Tayin Edilen Protein Ekspresyonu Sonuçları

6.4.1 HSP27 Protein Ekspresyonu



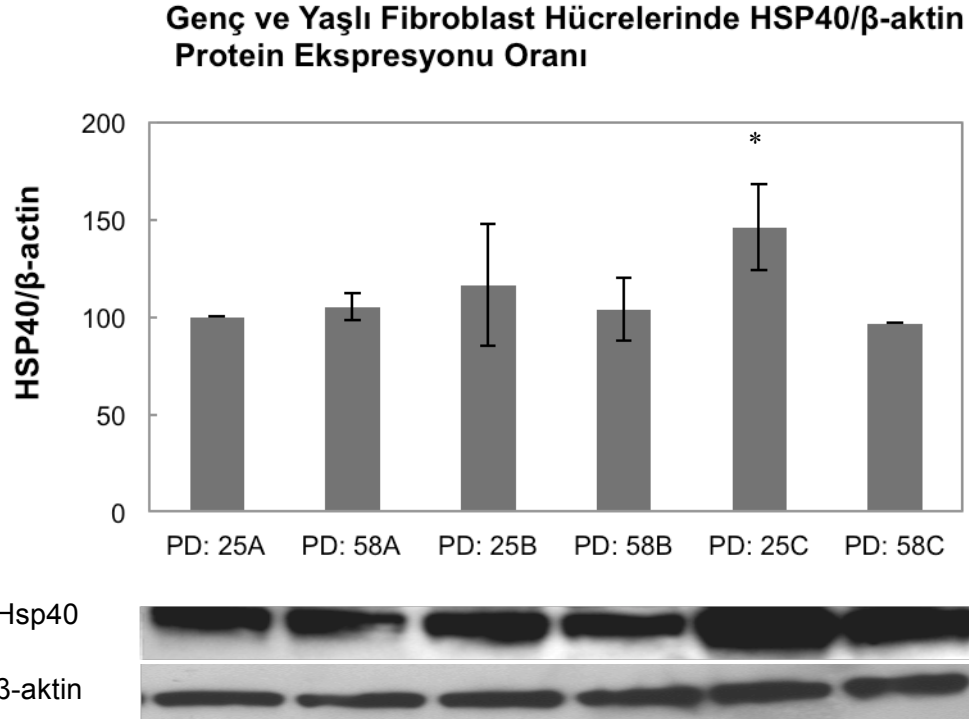
Şekil 9. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde HSP27 protein ekspresyonuna etkileri

*A: 37 °C'de 1 saat, B: 42 °C'de 1 saat, C: 42 °C'de 1 saat + 37 °C'de 3 saat

Kontrol örnekleri kıyaslandığında HSP27 ekspresyonunun yaşlı hücrelerde artış gösterdiği gözlenmektedir. Uygulanan ısı stresinin hemen tayin edildiğinde HSP27 ekspresyonlarında genç hücrelerde önemli bir değişikliğe neden olmazken, yaşlı hücrelerde kontrole kıyasla azalmaya neden olduğu gözlenmektedir. Hücrelerin ısı stresi sonrasında 3 saat normal koşullarda tutulmasının ardından tayin edildiğinde HSP27 ekspresyonlarında genç hücrelerde önemli bir değişikliğe neden olmazken yaşlı hücrelerde azalmaya neden olduğu gözlenmektedir.

* $p < 0.05$ PD25-A'ya kıyasla; & $p < 0.05$ PD58-A'ya kıyasla.

6.4.2 HSP40 Protein Ekspresyonu



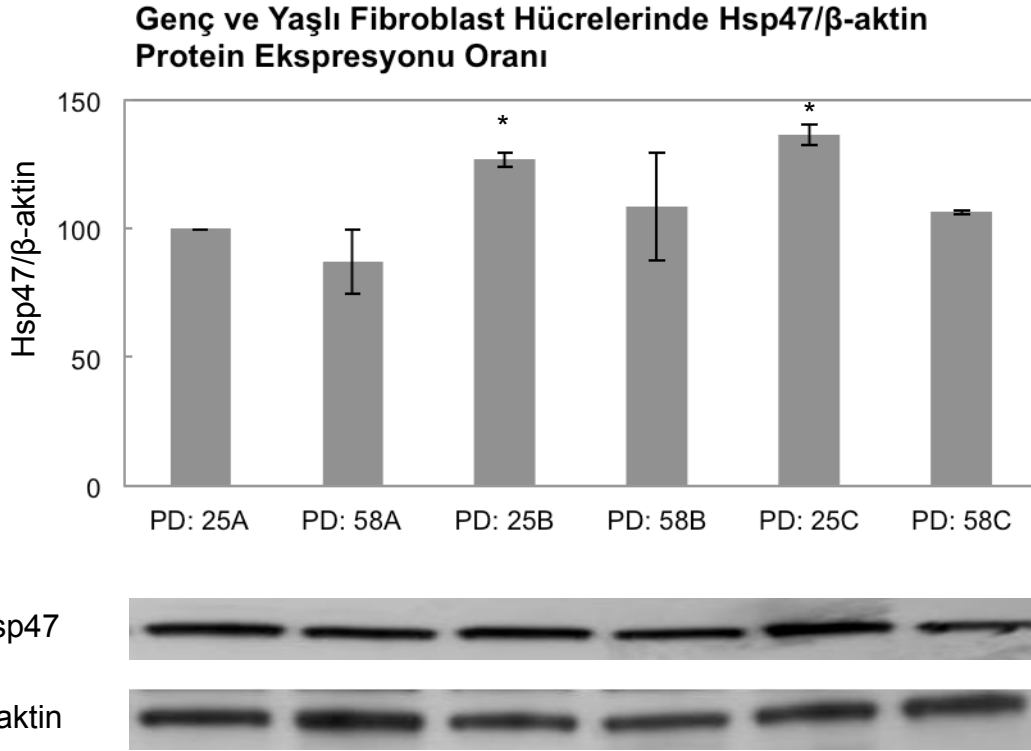
Şekil 10. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde HSP40 protein ekspresyonuna etkileri

*A: 37 °C'de 1 saat, B: 42 °C'de 1 saat, C: 42 °C'de 1 saat + 37 °C'de 3 saat

Kontrol örnekleri kıyaslandığında HSP40 ekspresyonunun yaşlı hücrelerde önemli değişiklik göstermediği gözlenmektedir. Uygulanan ısı stresinin hemen tayin edildiğinde genç ve yaşlı hücrelerin kontrole kıyasla HSP40 ekspresyonlarında değişikliğe neden olmadığı gözlenmektedir. Hücrelerin ısı stresi sonrasında 3 saat normal koşullarda tutulmasının ardından tayin edildiğinde HSP40 ekspresyonlarında kontrole kıyasla genç hücrelerde artış gözlenirken yaşlı hücrelerde değişiklik göstermediği gözlenmektedir.

*p<0.05 PD25-A'ya kıyasla.

6.4.3 HSP47 Protein Ekspresyonu



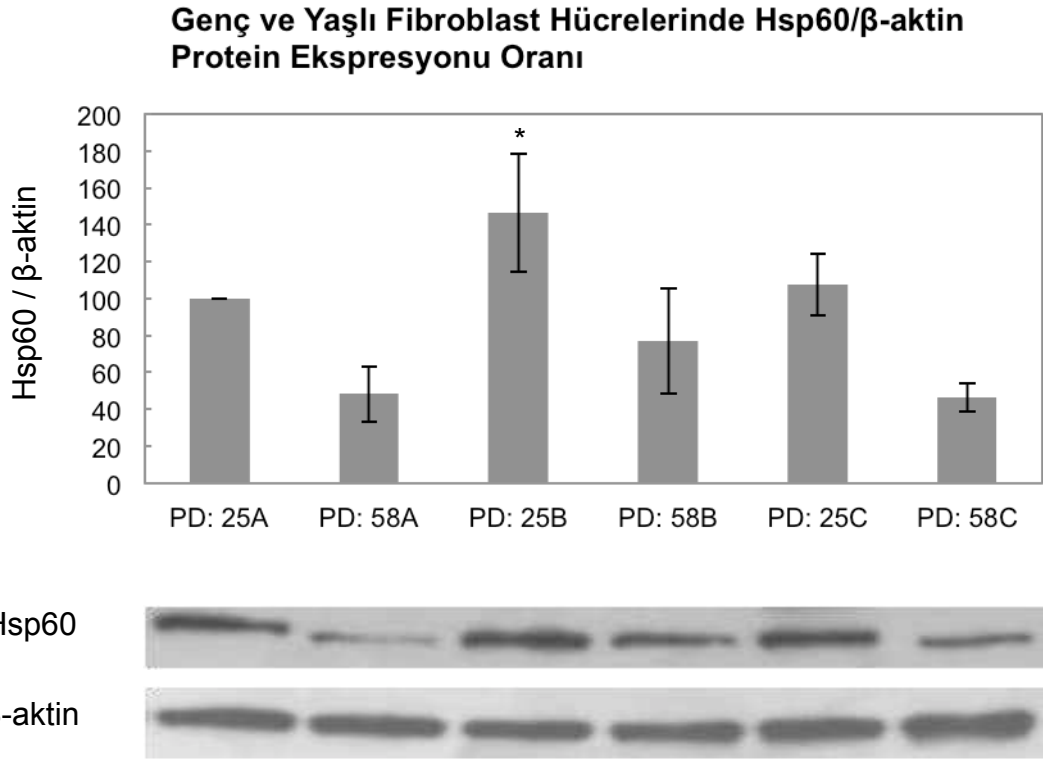
Şekil 11. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde HSP47 protein ekspresyonuna etkileri

*A: 37 °C'de 1 saat, B: 42 °C'de 1 saat, C: 42 °C'de 1 saat + 37 °C'de 3 saat

Kontrol örnekleri kıyaslandığında HSP47 ekspresyonunun yaşlı hücrelerde değişikliğe neden olmadığı gözlenmektedir. Uygulanan ısı stresinin hemen tayin edildiğinde genç hücrelerin HSP47 ekspresyonlarında artışa neden olduğu yaşlı hücrelerin HSP47 ekspresyonlarında önemli değişikliğe neden olmadığı gözlenmektedir. Hücrelerin ısı stresi sonrasında 3 saat normal koşullarda tutulmasının ardından tayin edildiğinde HSP47 ekspresyonlarında genç ve yaşlı hücrelerde kontrollere oranla artışa neden olduğu fakat yaşlı hücrelerde istatistiksel olarak anlamlılık olmadığı gözlenmektedir.

*p<0.05 PD25-A'ya kıyasla.

6.4.4 HSP60 Protein Ekspresyonu



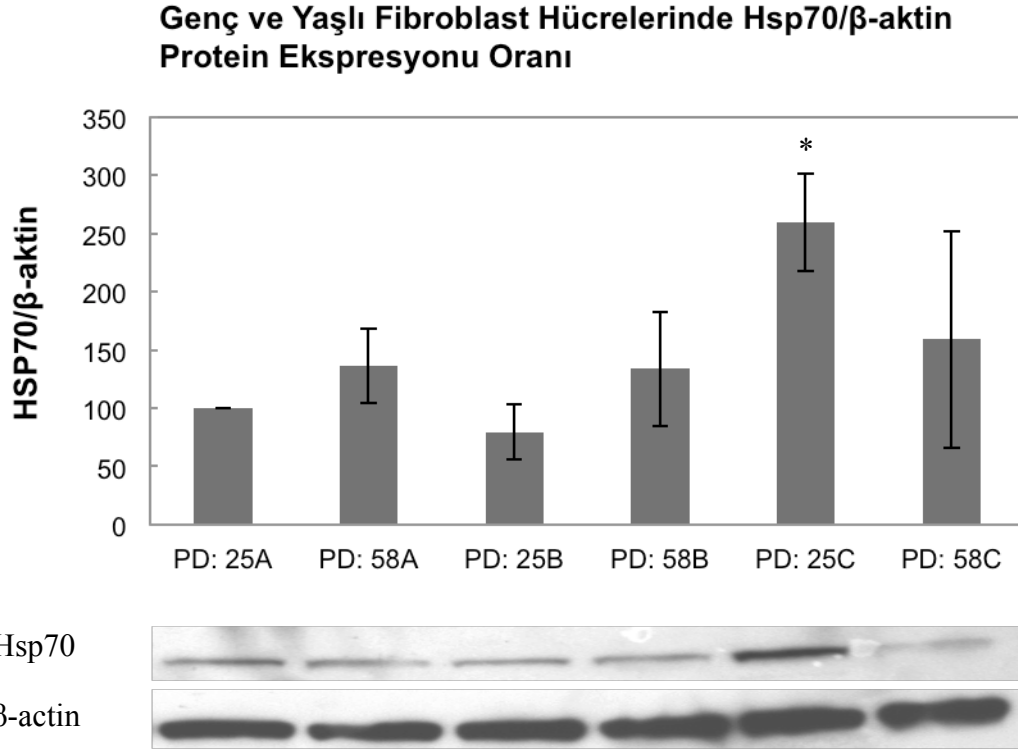
Şekil 12. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde HSP60 protein ekspresyonuna etkileri

*A: 37 °C'de 1 saat, B: 42 °C'de 1 saat, C: 42 °C'de 1 saat + 37 °C'de 3 saat

Kontrol örnekleri kıyaslandığında HSP60 ekspresyonunun yaşlı hücrelerde genç hücrelere kıyasla azalma gösterdiği gözlenmektedir. Uygulanan ısı stresinin hemen tayin edildiğinde genç ve yaşlı hücrelerin HSP60 ekspresyonlarında artışa neden olduğu gözlenmektedir. Hücrelerin ısı stresi sonrasında 3 saat normal koşullarda tutulmasının ardından tayin edildiğinde HSP60 ekspresyonlarında genç ve yaşlı hücrelerde kontrole kıyasla değişiklik gözlenmemektedir.

*p<0.05 PD25-A'ya kıyasla.

6.4.5 HSP70 Protein Ekspresyonu



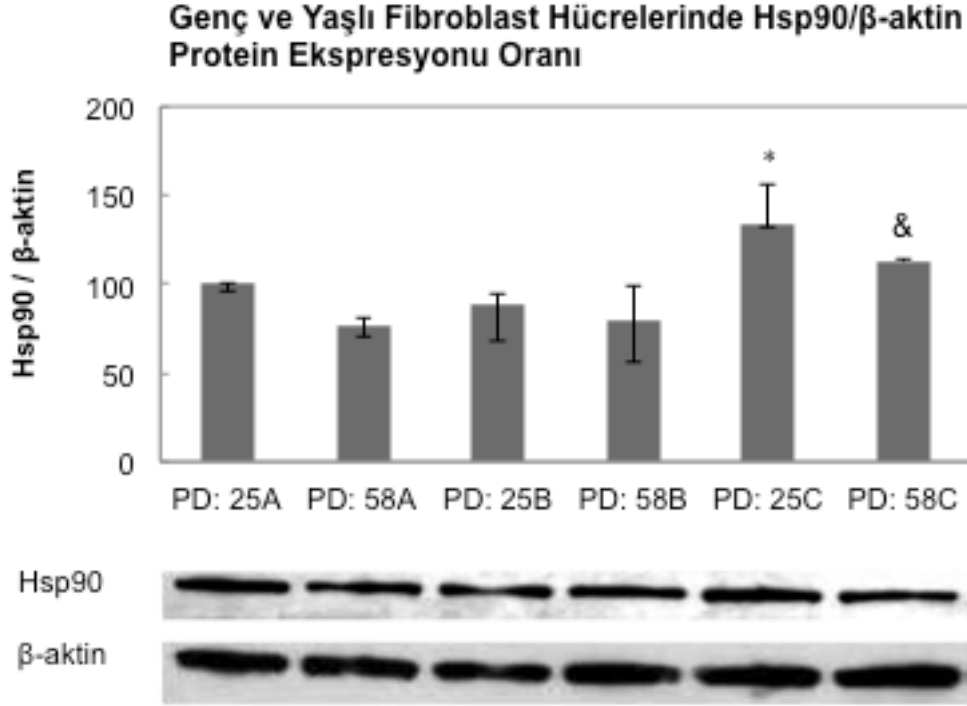
Şekil 13. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde HSP70 protein ekspresyonuna etkileri

*A: 37 °C'de 1 saat, B: 42 °C'de 1 saat, C: 42 °C'de 1 saat + 37 °C'de 3 saat

Kontrol örnekleri kıyaslandığında HSP70 ekspresyonunun yaşlı hücrelerde genç hücrelere kıyasla arttığı gözlenmektedir. Uygulanan ısı stresinin hemen tayin edildiğinde genç ve yaşlı hücrelerin HSP70 ekspresyonlarında değişikliğe neden olmadıkları gözlenmektedir. Hücrelerin ısı stresi sonrasında 3 saat normal koşullarda tutulmasının ardından tayin edildiğinde HSP70 ekspresyonlarında genç ve yaşlı hücrelerde kontrole kıyasla artış olduğu fakat yaşlı hücrelerde bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmektedir.

*p<0.05 PD25-A'ya kıyasla.

6.4.6 HSP90 Protein Ekspresyonu



Şekil 14. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde HSP90 protein ekspresyonuna etkileri

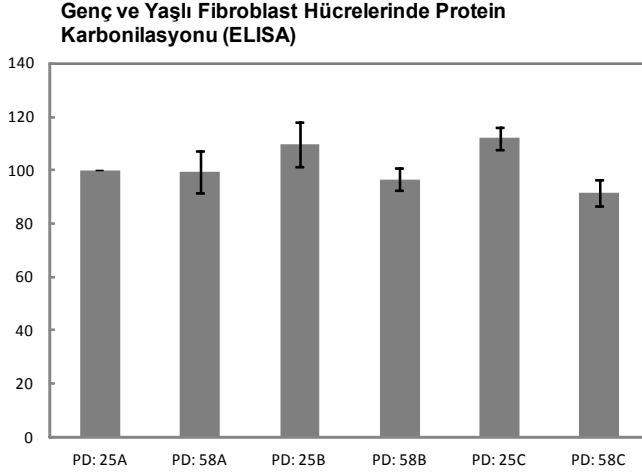
*A: 37 °C'de 1 saat, B: 42 °C'de 1 saat, C: 42 °C'de 1 saat + 37 °C'de 3 saat

Kontrol örnekleri kıyaslandığında HSP90 ekspresyonunun yaşlı hücrelerde genç hücrelere kıyasla değişiklik gözlenmemektedir. Uygulanan ısı stresinin hemen tayin edildiğinde genç ve yaşlı hücrelerin HSP90 ekspresyonlarında değişikliğe neden olmadığı gözlenmektedir. Hücrelerin ısı stresi sonrasında 3 saat normal koşullarda tutulmasının ardından tayin edildiğinde HSP90 ekspresyonlarında genç ve yaşlı hücrelerde kontrole kıyasla artış gözlenmektedir.

* $p < 0.05$ PD25-A'ya kıyasla; & $p < 0.05$ PD58-A'ya kıyasla.

6.5 Protein Karbonil Tayini Sonuçları

6.5.1 ELISA yöntemiyle Protein Karbonil Tayini Sonuçları

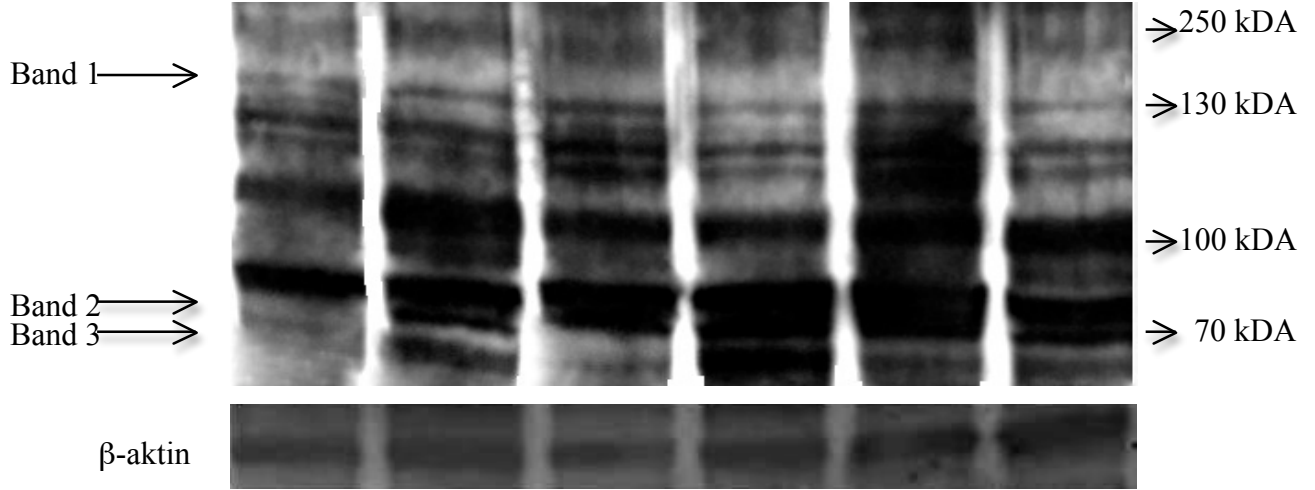
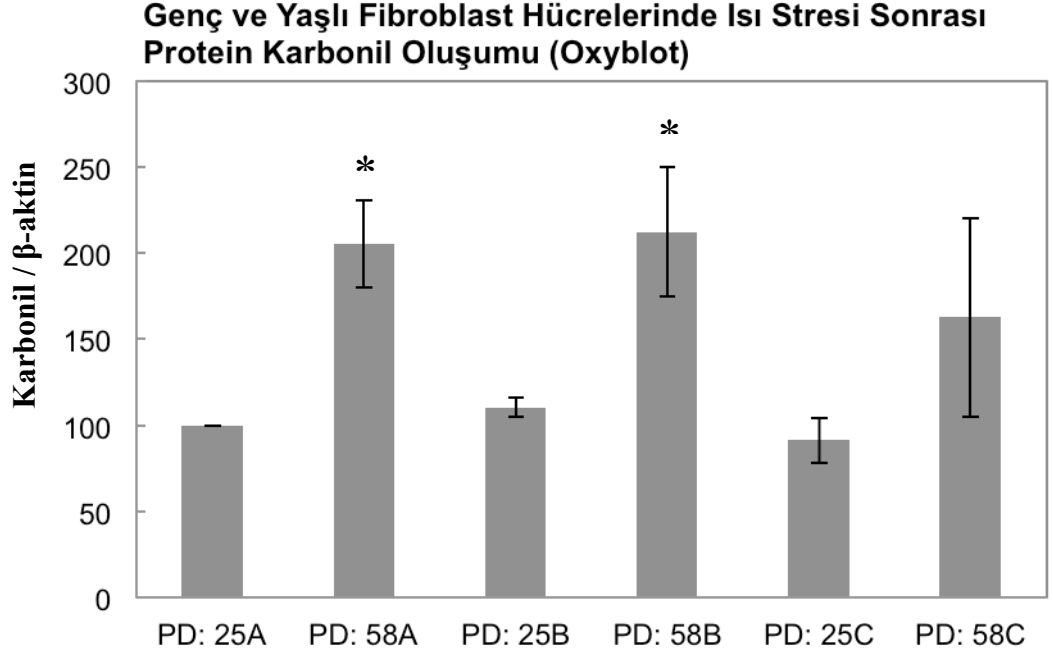


Şekil 15. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde protein karbonil miktarlarına etkileri (ELISA)

*A: 37 °C'de 1 saat, B: 42 °C'de 1 saat, C: 42 °C'de 1 saat + 37 °C'de 3 saat

Kontrol örnekleri kıyaslandığında protein karbonil miktarlarının yaşlı hücrelerde genç hücrelere kıyasla değişmediği gözlenmektedir. Uygulanan ısı stresinin, hemen tayin edildiğinde protein karbonil miktarlarında genç hücrelerde az miktarda artışa neden olurken yaşlı hücrelerde anlamlı değişikliğe neden olmadığı gözlenmektedir. Hücrelerin ısı stresi sonrasında 3 saat normal koşullarda tutulmasının ardından tayin edildiğinde protein karbonil miktarlarının genç hücrelerde kontrole kıyasla arttığı ve yaşlı hücrelerde kontrole kıyasla az miktarda azaldığı gözlenmektedir. ELISA sonuçları ile oxy-blot sonuçları tam olarak uyuşmamaktadır. Oxy-blot yönteminde sonuçlar daha anlamlı çıkmıştır. Nedeni ise, oxy-blot yönteminde ön plana çıkan bantlar analiz edilmiştir ki bu bizim planladığımız çalışma açısından daha önem arz etmektedir. Bu şekilde karbonillenen proteinler spesifik olarak tayin edilmiştir.

6.5.2 Oxy-Blot Yöntemi İle Protein Karbonil Tayini Sonuçları



Şekil 16. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde protein karbonil miktarlarına etkileri (OXY-BLOT)

*A: 37 °C'de 1 saat, B: 42 °C'de 1 saat, C: 42 °C'de 1 saat + 37 °C'de 3 saat

Kontrol örnekleri kıyaslandığında protein karbonil miktarlarının yaşlı hücrelerde genç hücrelere kıyasla arttığı gözlenmektedir. Uygulanan ısı stresinin, hemen tayin edildiğinde protein karbonil miktarlarında genç ve yaşlı hücrelerde kontrole kıyasla

anlamli değişikliğe neden olmadığı gözlenmektedir. Hücrelerin ısı stresi sonrasında 3 saat normal koşullarda tutulmasının ardından tayin edildiğinde protein karbonil miktarlarının genç ve yaşı hücrelerde kontollere kıyasla anlamli değişikliğe neden olmadığı gözlenmektedir.

*p<0.05 PD25-A'ya kıyasla PD58-A; *p<0.05 PD25-B'ya kıyasla PD58-B.

6.6 Karbonile Proteinlerin LC-MS/MS ile Tayini

Tablo 2. Genç ve yaşı fibroblastlarda karbonile proteinlerin LC-MS/MS ile analizi (*data yok). Elde edilen skorlara göre değerlendirildiler. Tartışma kısmında kullanılmak üzere planlananlar ayrıca işaretlendi.

BAND 1															
				PD: 25A		PD: 58A		PD: 25B		PD: 58B		PD: 25C		PD: 58C	
Access code	Protein ID	m W (Da)	p l	Sc or e	em PA l	Sc or e	em PA l	Sc or e	em PA l	Sc or e	em PA l	Sc or e	em PA l	Sc or e	em PA l
SEP11_HUMAN	Septin-11	50791	65	293	0.34	*	*	872	0.66	281	0.66	125	0.24	60	0.34
SERA_HUMAN	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	56483	63	148	0.21	*	*	504	0.37	44	0.06	253	0.46	156	0.29
STT3A_HUMAN	Dolichyl-diphospho oligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A	80477	83	25	0.05	24	0.05	185	0.25	43	0.09	30	0.05	106	0.05
SYDC_HUMAN	Aspartyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	57100	61	264	0.65	144	0.37	336	0.76	156	0.55	123	0.46	437	0.29
SYHC_HUMAN	Histidyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	57243	57	154	0.37	125	0.21	314	0.45	*	*	113	0.21	76	0.21
SYWC_HUMAN	Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	53001	58	50	0.07	*	*	40	0.22	115	0.14	132	0.22	99	0.22
TBA1A_HUMAN	Tubulin alpha-1A chain	50104	49	3029	6.8	1019	3.53	1998	5.31	2367	6.80	2719	7.38	2267	6.27
TBA1B_HUMAN	Tubulin alpha-1B chain	50120	49	3163	6.8	1098	3.51	1981	5.31	2703	6.80	2965	7.38	2391	6.27
TBA4A_HUMAN	Tubulin alpha-4A chain	49892	49	1214	2.60	556	2.18	1052	2.86	1149	3.15	1087	2.60	920	3.15
TBA4B_HUMAN	Putative tubulin-like protein alpha-4B	27534	77	519	0.47	204	0.68	255	0.67	673	0.67	607	0.67	*	*
TBB2A_HUMAN	Tubulin beta-2A chain	49875	48	2965	7.57	918	0.44	2854	5.44	2435	6.43	2704	4.99	3262	4.99
TBB3_HUMAN	Tubulin beta-3 chain	50400	48	3467	5.77	829	0.24	2878	4.10	2696	5.31	3167	5.31	3332	4.10
TBB5_HUMAN	Tubulin beta chain	49639	4	4199	7.65	1192	0.66	3442	8.30	3088	6.49	3841	5.97	3652	5.97

			8												
TBB6_HUMAN	Tubulin beta-6 chain	49825	4	21	3.5	83	0.2	23	0.2	15	3.8	2.9	3.1	21	3.1
			8	15	0	4	4	59	4	12	3	0	9	49	9
TCPA_HUMAN	T-complex protein subunit alpha	60306	5	30	0.0	*	*	11	0.1	26	0.4	24	0.4	21	0.2
			8		6			5	3	3	3	6	3	3	7
TCPB_HUMAN	T-complex protein subunit beta	57321	6	30	0.4	64	0.1	44	0.5	11	0.2	48	1.1	68	1.8
			0	7	5		3	7	5	8	1	3	1	5	9
TCPD_HUMAN	T-complex protein subunit delta	57757	8	45	0.2	*	*	13	0.2	53	0.1	24	0.3	95	0.1
			1		0			7	0		3	4	6		3
TCPZ_HUMAN	T-complex protein subunit zeta	57857	6	10	0.2	36	0.0	23	0.3	11	0.2	26	0.2	16	0.2
			3	4	0		6	0	6	3	0	0	8	9	8
TRAP1_HUMAN	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	73500	6	72	0.0	68	0.0	16	0.0	15	0.0	12	0.0	11	0.0
			1		5		5	6	5	8	5	7	5	4	5
TXND5_HUMAN	Thioredoxin domain-containing protein 5	44432	5	19	0.5	73	0.1	18	0.4	14	0.2	10	0.2	86	0.2
			4	4	6		6	4	5	4	5	1	5		5
TYPH_HUMAN	Thymidine phosphorylase	48994	5	27	0.3	50	0.1	27	0.2	26	0.3	17	0.2	17	0.2
			4	5	3		6	8	4	8	3	1	4	4	4
UGPA_HUMAN	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	56774	8	13	0.2	12	0.3	24	0.2	29	0.4	44	0.8	48	0.7
			2	9	1	2	7	0	9	9	6	6	8	3	7
VIME_HUMAN	Vimentin	53488	5	41	39.	22	11.	94	77.	84	12	73	10	10	11
			1	68	06	24	87	75	36	82	4.3	18	1.4	63	6.2
XPP3_HUMAN	Probable Xaa-Pro aminopeptidase 3	56997	6	28	0.0	19	0.0	45	0.0	35	0.0	62	0.0	50	0.0
			4		6		7		6		6		6		6
2ABA_HUMAN	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B alpha isoform	51528	5	20	0.1	*	*	87	0.1	90	0.0	65	0.0	88	0.0
			9	1	5				5		7		7		7
ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1	41710	5	19	0.6	*	*	14	0.5	14	0.4	25	0.8	22	0.5
			3	0	7			09	3	7	1	3	2	6	3
ACTBL_HUMAN	Beta-actin-like protein 2	41976	5	63	0.1	*	*	15	0.1	77	0.1	79	0.1	12	0.1
			4		9			5	9		9		9	9	9
HNRH1_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	49198	5	38	1.0	76	0.1	30	0.5	12	0.2	15	0.3	*	*
			9	0	7		6	6	5	8	4	3	4		
HNRPQ_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	69429	8	91	0.1	*	*	34	0.2	74	0.0	60	0.0	52	0.0
			7		1			0	3		5		5		5
HS90A_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-alpha	84476	4	13	0.1	79	0.1	52	0.1	24	0.2	21	0.1	16	0.1
			5	1	9		4	2	9	9	4	0	9	1	9
HS90B_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-beta	83081	5	10	0.1	*	*	48	0.1	19	0.1	13	0.0	11	0.0
			0	5	4			0	9	4	4	7	9	4	9
IF5_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 5	49192	5	13	0.2	21	0.0	16	0.2	*	*	27	0.4	33	0.1
			4	8	4		8	9	4			4	4		6
K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10	58792	5	95	2.1	17	4.9	16	2.4	42	0.8	11	3.6	78	1.2
			1	7	9	16	3	99	0	0	4	57	1	8	1
K1C16_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 16	51105	4	11	0.1	37	0.6	52	0.6			17	0.3	81	0.2
			5	6	5	2	4	7	3			6	2		3

K1C9_H UMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9	620 27	5 1	94 5	1.5 3	10 15	1.8 5	29 32	2.3 8	12 1	0.1 9	46 9	1.1 3	72	0.1 2
K22E_H UMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	653 93	8 1	42 1	0.7 3	10 31	2.1 9	25 62	1.1 6	11 3	0.1 2	44 8	0.7 3	19 2	0.3 2
K2C1_H UMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1	658 68	8 2	20 13	2.5 1	19 79	6.5 8	24 94	4.1 5	31 4	0.4 7	11 67	2.1 5	77 2	0.9 3
K2C5_H UMAN	Keratin, type II cytoskeletal 5	623 40	7 6	21 2	0.2 6	48 8	0.5 0	10 25	0.5 0	85	0.1 2	24 6	0.1 9	15 1	0.1 2
K2C6B_ HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 6B	598 99	8 1	35 7	0.4 3	50 2	0.5 2	14 21	0.4 3	*	*	29 5	0.2 7	19 9	0.2 0
K2C7_H UMAN	Keratin, type II cytoskeletal 7	512 23	5 4	13 7	0.2 3	19 2	0.4 2	17 75	0.5 2	45 9	0.2 3	*	*	43 8	0.4 2
KPYM_ HUMAN	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	577 69	7 4	66 7	1.5 2	53 3	0.7 5	21 49	3.6 8	18 65	5.3 7	18 34	5.7 7	25 25	6.2 0
KRT81_ HUMAN	Keratin, type II cuticular Hb1	548 93	5 4	*	*	32	0.0 7	54 1	0.0 7	33	0.0 7	52	0.0 7	71	0.0 7
LMNA_H UMAN	Lamin-A/C	721 81	6 4	78	0.1 6	35	0.1 0	51 6	0.2 8	19 8	0.3 4	30 7	0.7 9	42 0	0.6 3
MYH14_ HUMAN	Myosin-14	227 601	5 5	*	*	61	0.0 3	65	0.0 3	26 1	0.0 5	22 8	0.0 7	14 2	0.0 3
MYH9_H UMAN	Myosin-9	226 261	5 5	*	*	61	0.0 3	14 2	0.0 5	29 7	0.0 8	31 5	0.1 2	62 3	0.1 2
NUCB2_ HUMAN	Nucleobindin- 2	472 99	4 5	54	0.0 7	35	0.0 7	44	0.1 5	43	0.0 7	28	0.0 7	38	0.0 7
ODO2_ HUMAN	Dihydrolipoylly sine-residue succinyltransfe rase component of 2-oxoglutarate dehydrogenas e complex, mitochondrial	413 64	5 9	13 1	0.3 4	41	0.1 6	18 6	0.5 5	52	0.2 5	18 1	0.2 5	19 8	0.2 5
PDIA1_ HUMAN	Protein disulfide- isomerase	552 60	4 7	29 1	0.7 6	74	0.3 7	39 7	1.4 1	63 0	2.0 9	50 0	1.9 1	*	*
PDIA3_ HUMAN	Protein disulfide- isomerase A3	542 31	5 6	64 4	1.5 8	23 6	0.6 6	37 5	0.7 6	51 6	1.1 3	12 76	4.1 6	13 37	3.2 7
PDIA6_ HUMAN	Protein disulfide- isomerase A6	461 42	5 0	15 77	2.2 8	44 4	0.9 6	18 76	2.2 8	11 19	1.8 3	81 8	1.6 2	11 73	1.2 6
PLD3_H UMAN	Phospholipase D3	546 71	6 0	82	0.1 4	*	*	35	0.0 7	59	0.1 4	58	0.1 4	38	0.0 7
PSD12_ HUMAN	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	527 40	7 7	43 4	0.4 0	*	*	30 6	0.4 0	13 3	0.2 3	16 8	0.1 4	14 0	0.2 3
PSMD2_ HUMAN	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	100 136	5 1	18	0.0 4	*	*	46	0.0 4	22	0.0 4	69	0.1 1	*	*
PSMD4_ HUMAN	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4	405 80	4 7	16 6	0.4 2	*	*	26 1	0.4 2	52	0.0 9	71	0.0 9	19	0.0 9
PTBP1_ HUMAN	Polypyrimidine tract-binding	571 86	9 .	36	0.1 3	*	*	61	0.2 1	32	0.1 3	65	0.2 1	49	0.2 1

	protein 1		2												
PTBP2_HUMAN	Polypyrimidine tract-binding protein 2	57455	87	26	0.06	*	*	20	0.06	25	0.06	37	0.06	25	0.06
PTRF_HUMAN	Polymerase I and transcript release factor	43450	57	31	0.64	376	0.94	770	0.11	372	1.11	240	0.94	1162	4.23
RHG01_HUMAN	Rho GTPase-activating protein 1	50404	59	45	0.77	657	0.07	80	0.07	127	0.15	101	0.24	346	0.24
RUVB1_HUMAN	RuvB-like 1	50196	60	17	0.28	*	*	294	0.53	43	0.15	155	0.35	763	0.24
SBP1_HUMAN	Selenium-binding protein 1	52358	59	44	0.07	104	0.32	105	0.15	170	0.23	50	0.07	53	0.15
SCRN1_HUMAN	Secernin-1	46353	47	23	0.78	731	0.17	277	0.58	369	0.71	40	0.17	123	0.36
SEP11_HUMAN	Septin-11	50791	65	29	0.33	*	*	872	0.66	281	0.66	125	0.24	60	0.34
2ABA_HUMAN	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B alpha isoform	51529	58	20	0.15	*	*	87	0.15	90	0.07	65	0.07	88	0.07
ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1	41710	53	19	0.67	*	*	1409	0.53	147	0.41	253	0.82	226	0.53
ACTBL_HUMAN	Beta-actin-like protein 2	41976	54	63	0.19	*	*	155	0.19	77	0.19	79	0.19	129	0.19
AL1A1_HUMAN	Retinal dehydrogenase 1	54696	63	25	0.69	418	1.06	809	0.68	671	2.02	*	*	770	2.67
AL9A1_HUMAN	4-trimethylamino butyraldehyde dehydrogenase	53636	57	23	0.23	372	0.07	173	0.30	88	0.22	*	*	41	0.07
ALBU_HUMAN	Serum albumin	66429	57	24	0.17	210	0.11	595	0.16	309	0.23	606	0.23	1148	0.23
AMPL_HUMAN	Cytosol aminopeptidase	56131	81	19	0.15	884	0.14	99	0.29	165	0.21	268	0.47	*	*
ANX11_HUMAN	Annexin A11	54356	76	17	0.23	862	0.14	190	0.22	60	0.07	246	0.39	51	0.07
AP2M1_HUMAN	AP-2 complex subunit mu	49623	96	87	0.24	574	0.34	258	0.43	92	0.33	37	0.16	83	0.24
ARSA_HUMAN	Arylsulfatase A	51878	56	67	0.07	70	0.07	*	*	76	0.14	112	0.14	170	0.22
ATPA_HUMAN	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	55176	83	10	3.01	539	1.48	2009	4.10	1223	3.01	808	1.96	1106	2.77
ATPB_HUMAN	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	51737	50	21	5.37	261	0.56	2250	2.82	865	1.02	966	1.96	*	*
CALR_HUMAN	Calreticulin	46438	43	55	0.56	270	0.25	426	0.45	868	0.56	909	1.45	1125	1.45
CNDP2_HUMAN	Cytosolic non-specific dipeptidase	52714	57	59	0.15	60	0.15	110	0.31	38	0.15	66	0.15	120	0.15
COR1C_HUMAN	Coronin-1C	53215	67	*	*	269	0.23	543	0.71	192	0.49	46	0.22	47	0.22
DCTN2_HUMAN	Dynactin subunit 2	44073	57	61	0.40	126	0.18	229	0.38	145	0.08	87	0.18	550	0.28

			1												
DDX39_HUMAN	ATP-dependent RNA helicase DDX39	48967	5	301	0.44	42	0.08	396	1.07	170	0.16	*	*	108	0.08
DESM_HUMAN	Desmin	53372	5	439	0.83	435	0.71	1859	0.71	764	0.71	692	0.71	1354	0.83
DHE3_HUMAN	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	55973	6	369	0.69	16	0.06	166	0.34	131	0.34	55	0.12	67	0.19
DPYL2_HUMAN	Dihydropyrimidine-related protein 2	62255	5	*	*	35	0.06	103	0.06	60	0.12	102	0.26	169	0.33
EF1A1_HUMAN	Elongation factor 1-alpha	50109	9	70	0.15	63	0.07	271	0.58	89	0.15	137	0.15	79	0.15
ENOA_HUMAN	Alpha-enolase	47009	7	4022	27.00	922	2.66	4449	31.57	2408	13.16	1962	7.33	1894	11.17
ENOB_HUMAN	Beta-enolase	46826	7	537	0.36	277	0.17	667	0.26	259	0.16	334	0.16	320	0.26
ENOG_HUMAN	Gamma-enolase	47108	4	673	0.57	313	0.26	922	0.57	708	0.97	377	0.25	436	0.25
ENPL_HUMAN	Endoplasmic	90122	4	42	0.04	37	0.04	71	0.12	330	0.26	208	0.08	45	0.04
ERF1_HUMAN	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1	48869	5	297	0.44	88	0.16	459	0.67	66	0.25	50	0.16	61	0.25
F10A1_HUMAN	Hsc70-interacting protein	41306	5	4147	0.41	43	0.09	346	0.41	33	0.19	181	0.30	*	*
FSCN1_HUMAN	Fascin	54365	6	213	0.69	96	0.30	488	1.05	94	0.22	80	0.39	46	0.14
G6PD_HUMAN	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	59088	6	63	0.13	*	*	126	0.27	46	0.06	162	0.44	234	0.53
G6PI_HUMAN	Glucose-6-phosphate isomerase	62976	8	353	0.33	59	0.06	249	0.26	570	0.49	480	0.49	607	0.77
GSHB_HUMAN	Glutathione synthetase	52221	5	309	0.32	72	0.15	479	0.51	290	0.51	94	0.15	*	*
GSHR_HUMAN	Glutathione reductase, mitochondrial	51667	7	48	0.07	87	0.07	*	*	71	0.14	48	0.07	50	0.07
HBB_HUMAN	Hemoglobin subunit beta	15857	6	44	0.24	44	0.24	64	0.24	32	0.24	59	0.24	*	*
HNRH1_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	49199	5	380	1.07	76	0.16	306	0.55	128	0.24	153	0.34	*	*
HNRPQ_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	69429	8	91	0.11	*	*	340	0.23	74	0.05	60	0.05	52	0.05
HS90A_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-alpha	84476	4	131	0.19	79	0.14	522	0.19	249	0.24	210	0.19	161	0.19
HS90B_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-beta	83081	5	105	0.14	*	*	480	0.19	194	0.14	137	0.09	114	0.09
BAND 2															
ACAP2_HUMAN	Arf-GAP with coiled-coil, ANK repeat	87973	6	27	0.04	29	0.04	21	0.04	29	0.04	22	0.04	*	*

	and domain- containing protein 2	PH														
AL1A1_HUMAN	Retinal dehydrogenase 1	546 96	6 30	80 7	1.4 8	20 19	2.9 1	18 1	0.2 2	19 25	3.4 6	49 0	0.5 8	*	*	
ALBU_HUMAN	Serum albumin	664 29	5 7	33 4	0.2 3	50 6	0.2 3	51	0.0 5	46 5	0.2 3	56 3	0.2 3	*	*	
AMPL_HUMAN	Cytosol aminopeptidase	561 31	8 0	22 8	0.3 8	96 9	1.4 4	34	0.0 7	64 4	1.1 5	71 5	0.5 6	*	*	
CALR_HUMAN	Calreticulin	464 38	4 3	86 6	1.6 4	71 0	1.1 1	*	*	63 9	1.1 1	13 92	2.0 6	80	0.0 8	
CH60_HUMAN	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	579 27	5 3	30 6	0.7 6	41 2	0.6 0	51	0.1 3	57 7	0.9 1	82 1	1.1 5	49	0.1 3	
CKAP4_HUMAN	Cytoskeleton-associated protein 4	659 83	5 6	53 0	1.0 4	11 94	2.7 2	24	0.0 6	52 0	1.5 4	50 2	0.8 3	*	*	
DCD_HUMAN	Dermcidin	925 4	5 6	82 2	0.8 2	85	0.8 2	25	0.3 5	50 5	0.3 5	*	*	56	0.3 5	
DESM_HUMAN	Desmin	533 72	5 2	48 3	0.6 0	11 48	0.7 1	91	0.3 1	14 39	0.8 3	15 68	0.8 3	12 5	0.4 0	
G6PI_HUMAN	Glucose-6-phosphate isomerase	629 76	8 4	47 4	0.4 1	*	*	76 7	0.7 7	45 2	0.5 8	11 19	1.6 4	26	0.0 6	
K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10	587 92	5 1	10 48	2.6 1	24 41	2.1 9	33 5	0.2 8	98 3	1.5 0	27 82	2.1 9	*	2.6 1	
K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9	620 27	5 1	78 6	1.5 3	25 9	0.5 0	10 0	0.0 6	28 1	0.5 0	41 5	0.6 9	70	0.0 6	
K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	653 93	8 1	30 1	0.5 5	78 4	0.6 4	*	*	34 3	0.1 8	62 0	0.6 4	58 0	1.2 8	
K2C5_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 5	623 40	7 6	15 2	0.1 2	20 9	0.1 9	23 8	0.1 9	55 9	0.1 2	16 8	0.1 2	18 6	0.3 3	
K2C7_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 7	512 23	5 4	35 2	0.3 2	67 9	0.6 3	*	*	12 84	0.3 2	10 40	0.8 8	15 6	0.5 2	
K2C71	Keratin, type II cytoskeletal 71	572 56	6 3	29	*	42	*	20	*	37	*	*	*	54	*	
KPYM_HUMAN	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	577 69	7 9	12 65	3.1 3	27 12	6.2 0	41	0.1 3	27 41	6.2 0	20 88	4.2 9	29	0.0 6	
LS14B_HUMAN	Protein LSM14 homolog B	420 45	9 7	18	0.0 9	19	0.0 9	34	0.0 9	25	0.0 9	29	0.0 9	24	0.0 9	
PDIA3_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A3	542 31	5 7	15 68	3.8 4	28 18	4.8 5	13 0	0.3 7	25 97	4.5 0	30 02	3.8 4	15 6	0.2 9	
PTRF_HUMAN	Polymerase I and transcript release factor	434 50	5 5	48 5	1.7	12 06	3.4 4	*	*	10 01	1.9 3	13 15	2.7 6	65	0.0 9	
TBA1A_HUMAN	Tubulin alpha-1A chain	501 04	4 9	31 17	7.9 9	20 66	7.3 8	26 5	0.6 4	25 26	8.6 5	13 39	2.5 8	*	*	
TBA1B_HUMAN	Tubulin alpha-1B chain	501 20	4 9	36 18	7.9 9	22 60	7.3 8	30 1	0.6 4	25 86	8.6 5	14 64	2.5 8	97	0.2 4	
TBB2A_HUMAN	Tubulin beta-2A chain	498 75	4 8	28 50	7.5 7	20 19	3.5 0	66	0.3 3	23 33	4.1 9	10 83	1.3 6	*	*	
TBB3_HUMAN	Tubulin beta-3 chain	504 00	4 8	33 75	6.2 7	17 19	3.1 2	61	0.2 4	22 83	3.4 3	97 6	0.8 9	*	*	
TBB5_H	Tubulin beta	496	4	34	6.4	23	3.8	67	0.4	24	4.2	14	1.9	*	*	

UMAN	chain	39	.	53	9	66	7		3	02	3	48	4		
			8												
TBB6_H	Tubulin beta-6	498	4	20	3.5	13	2.6	34	0.1	15	2.3	53	0.4	*	*
UMAN	chain	25	.	80		95	3		5	95	8	9	3		
			8												
TCPB_H	T-complex	573	6	77	1.7	95	1.7	15	0.1	51	0.6	21	4.7	21	0.1
UMAN	protein subunit beta	1	21	.	3	1	7	1	7	3	0	5	89	4	3
			0												
TCPZ_H	T-complex	578	6	23	0.2	21	0.1	*	*	12	0.2	53	0.3	38	0.0
UMAN	protein subunit zeta	1	57	.	7	8	0	3		9	0	6	6		6
			3												
TRY1_H	Trypsin-1	240	7	*	*	12	0.3	33	0.3	14	0.3	10	0.3	23	0.4
UMAN		99	.			5	0	7	0	4	0	2	0	6	8
			7												
U17L1_HUMAN	Putative ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 17-like protein 1	595	7	33	*	38	*	27	*	25	*	47	*	24	*
		52	.							5					
			8												
UGPA_HUMAN	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	567	8	40	0.7	91	1.7	10	0.1	64	1.2	52	0.8	*	*
		74	.	9	7	2	5	6	3	6	8	3	8		
			2												

BAND 3

ACAP2_HUMAN	Arf-GAP with coiled-coil, ANK repeat and PH domain-containing protein 2	879	6	20	0.0	23	0.0	23	0.0	19	0.0	24	0.0	25	0.0
		73	.		4		4		4		4		4		4
ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1	417	5	15	0.2	55	0.1	15	0.5	13	0.1	44	0.5	22	0.4
		10	.	7	9		9	7	3	4	9	2	3	3	1
AHNK_HUMAN	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	628	5	85	0.1	48	0.0	93	0.1	77	0.1	81	0.1	63	0.0
		699	.	8	8	2	9	3	8	0	2	9	1		2
ALBU_HUMAN	Serum albumin	664	5	67	0.1	11	0.1	23	0.1	26	0.0	27	0.0	30	0.1
		29	.		6	6	1	9	6		5		5	3	6
AMPN_HUMAN	Aminopeptidase N	109	5	11	0.1	38	0.3	94	0.8	11	0.7	21	1.0	21	1.4
		340	.	9	8	7	5	9	1	45	0	48	7	99	4
ASAP2_HUMAN	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2	111	6	26	*	28	*	30	0.0	26	0.0	*	*	28	*
		581	.						3		3				
AT2B1_HUMAN	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	138	5	*	*	19	0.1	16	0.1	12	0.0	52	0.1	11	0.0
		668	.			0	1	8	1	9	5	1	4	5	5
AT2B3_HUMAN	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 3	134	5	78	0.0	11	0.0	13	0.0	77	0.0	29	0.0	11	0.0
		112	.		3	9	6	3	8		3	5	8	5	6
AT2B4_HUMAN	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4	137	6	11	0.0	22	0.1	30	0.1	15	0.0	37	0.1	25	0.1
		833	.	4	5	6	7	5	7	2	8	9	7	9	1
CLH1_HUMAN	Clathrin heavy chain 1	191	5	33	1.4	50	2.6	41	2.5	17	0.7	97	0.4	96	0.5
		361	.	50	7	69	7	86	4	58	3	6	6	6	4
CLH2_HUMAN	Clathrin heavy chain 2	186	5	85	0.2	11	0.4	13	0.3	61	0.2	32	0.1	25	0.1
		910	.	4	6	49	7	98	9	0	1	4	2	6	2
			6												

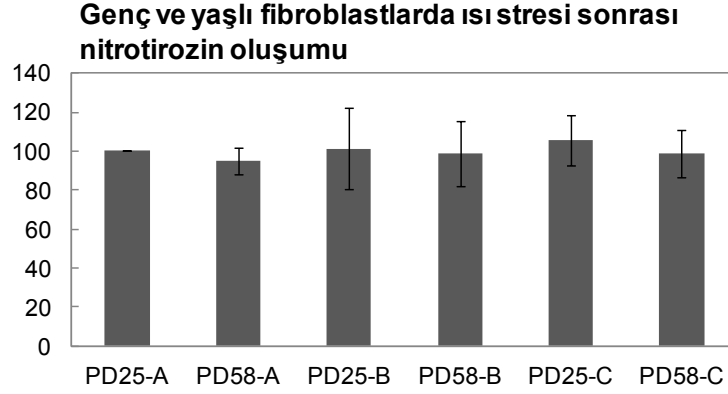
CO6A3_HUMAN	Collagen alpha-3(VI) chain	340597	6 . 2	12 33	0.3 2	91 5	0.2 5	70 8	0.3 0	15 4	0.0 5	18 4	0.0 7	10 1	0.0 3
COPA_HUMAN	Coatomer subunit alpha	138258	7 . 7	*	*	71	0.0 3	17 8	0.0 8	60 0	0.4 0	16 04	0.9 7	34 1	0.3 3
DCD_HUMAN	Dermcidin	9254	5 . 6	10 9	1.4 5	89	0.8 2	59	0.8 2	11 5	0.8 2	20 3	1.4 5	27	0.3 5
DESM_HUMAN	Desmin	53372	5 . 2	97	0.3 1	10 1	0.2 2	18 2	0.3 1	31	0.1 4	29 7	0.0	*	*
DHX9_HUMAN	ATP-dependent RNA helicase A	140869	6 . 4	*	*	51	0.0 3	96	0.0 3	51	0.0 5	95 4	0.8 0	18 5	0.0 8
DYHC1_HUMAN	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	532072	6 . 0	61	0.0 1	79 2	0.1 5	46 3	0.0 8	28 1	0.0 8	18 3	0.0 6	21 9	0.0 4
EEA1_HUMAN	Early endosome antigen 1	162368	5 . 6	79 4	0.5 6	14 83	1.0 4	99 4	0.9 1	14 7	0.0 7	*	*	85	0.0 5
EIF3A_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	166337	6 . 4	91 2	0.4 5	10 52	0.3 6	11 01	0.8 0	33 9	0.1 2	19 8	0.0 9	55	0.0 2
FAS_HUMAN	Fatty acid synthase	273254	6 . 0	62	0.0 4	81	0.0 1	34 4	0.1 3	78	0.0 3	37 6	0.1 4	26	0.0 1
FAS_HUMAN	Fatty acid synthase	273254	6 . 0	62	0.0 4	81	0.0 1	34 4	0.1 3	78	0.0 3	37 6	0.1 4	26	0.0 1
FLNA_HUMAN	Filamin-A	280433	5 . 7	*	*	66 99	1.4 3	26 14	0.7 9	36 52	0.7 9	97 4	0.2 3	12 10	0.3 1
FLNB_HUMAN	Filamin-B	277991	5 . 5	23 0	0.0 8	38 1	0.1 4	13 3	0.0 1	17 8	0.0 1	36	0.0 1	17 4	0.0 4
FLNC_HUMAN	Filamin-C	290841	5 . 7	97 0	0.2 4	23 72	0.4 5	91 8	0.2 7	14 90	0.2 5	42	0.0 3	44 3	0.1 0
G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35899	8 . 6	56	0.1	*	*	35	0.1	58	0.1 0	22	0.1 0	13 8	0.3 5
IQGA1_HUMAN	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	189001	6 . 1	13 21	0.5 3	21 65	0.7 4	12 00	0.7 1	10 08	0.5 6	14 96	0.8 1	13 08	0.6 8
IQGA3_HUMAN	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP3	184584	7 . 3	91	0.0 6	12 4	0.0 6	43	0.0 4	25	0.0 2	34	0.0 2	50	0.0 4
IQGA3_HUMAN	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP3	184584	7 . 3	91	0.0 6	12 4	0.0 6	43	0.0 4	25	0.0 2	34	0.0 2	50	0.0 4
K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10	58792	5 . 1	28 00	3.0 8	14 39	1.8 3	93 9	1.8 3	20 65	2.1 9	18 26	3.3 4	19 30	4.8 9
K1C14_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 14	51398	5 . 1	38 3	0.3 2	12 9	0.1 5	*	*	34 2	0.3 2	36 6	0.4 2	43 66	13. 03
K1C16_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 16	51105	4 . 5	38 3	0.3 2	15 2	0.2 3	19 3	0.3 2	34 2	0.3 2	25 0	0.2 3	38 60	17. 76
K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9	62027	5 . 1	76 6	1.3 9	29 6	0.5	40 6	0.8 9	30 6	0.5 0	17 28	1.8 4	13 71	37. 65
K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	65393	8 . 1	11 18	1.6 9	86 5	0.7 3	49 1	0.8 1	13 24	1.1 6	15 06	1.1 6	21 92	2.7 4
K2C3_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 3	64378	6 . 1	88	0.1 8	76	0.1 2	*	*	23 7	0.2 5	18 2	0.2 5	77 8	0.5 6

K2C4_H UMAN	Keratin, type II cytoskeletal 4	572 50	6 .3	30 9	0.1 3	20 1	0.1 3	13 0	01 3	12 7	0.1 3	28 7	0.1 3	24 5	0.2 1
K2C5_H UMAN	Keratin, type II cytoskeletal 5	623 40	7 .6	26 4	0.3 3	18 1	0.2 6	* 	* 	35 2	0.2 6	33 4	0.3 3	42 12	4.3 3
K2C6A_ HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 6A	598 77	8 .1	25 4	0.2 7	24 8	0.3 5	* 	* 	41 5	0.3 5	48 2	0.3 5	33 89	5.8 0
K2C6B_ HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 6B	598 99	8 .1	40 1	0.3 5	30 0	0.2 7	33 1	0.2 0	52 0	0.4 3	60 4	0.4 3	60 31	5.8 0
K2C7_H UMAN	Keratin, type II cytoskeletal 7	512 23	5 .4	34 2	0.4 2	20 9	0.2 7	20 6	0.2 3	11 2	0.4 2	14 5	0.3 2	36 9	0.4 2
K2C72_ HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 72	558 42	6 .5	87 	0.1 4	41 	0.0 7	25 	* 	33 	0.1 4	* 	* 	16 3	0.0 7
KPYM_ HUMAN	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	577 67	8 .0	59 	0.0 6	22 0	0.3 6	37 	0.1 3	96 	0.2 0	10 6	0.3 6	21 1	0.3 6
KRT84_ HUMAN	Keratin, type II cuticular Hb4	648 01	7 .7	* 	* 	40 	0.1 2	35 	0.0 6	10 9	0.2 5	73 	0.1 8	24 4	0.2 5
MYH10_ HUMAN	Myosin-10	228 727	5 .4	62 8	0.1 9	93 7	0.3 1	58 0	0.2 9	32 2	0.1 5	19 	0.0 3	98 	0.0 8
MYH11_ HUMAN	Myosin-113	227 199	5 .4	57 3	0.1 4	56 9	0.2 5	50 5	0.1 9	30 2	0.1 2	20 4	0.0 8	62 	0.0 5
MYH14_ HUMAN	Myosin-14	227 601	5 .5	44 7	0.0 7	38 2	0.1 4	38 6	0.1 0	20 5	0.0 7	11 2	0.0 3	* 	*
MYOF_ HUMAN	Myoferlin	234 561	5 .8	55 0	0.1 5	13 95	0.4 0	93 6	0.4 7	43 4	0.1 7	97 	0.0 3	* 	*
RRBP1_ HUMAN	Ribosome- binding protein 1	152 381	8 .7	16 8	0.1 3	76 	0.0 2	27 3	0.1 8	32 3	0.1 3	54 9	0.1 8	67 	0.0 5
RS27A_ HUMAN	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	941 2	9 .9	22 9	1.1 5	23 9	0.7 8	* 	* 	41 6	4.5 9	43 4	3.6 2	22 8	1.6 0
SPTB2_ HUMAN	Spectrin beta chain, brain 1	274 439	5 .4	23 1	0.1 	17 9	0.0 7	14 4	0.0 8	52 	0.0 3	34 	0.0 1	* 	*
SUMO2_ HUMAN	Small ubiquitin- related modifier 2	106 02	5 .3	20 3	0.3 7	14 5	0.3 7	70 	0.3 7	21 0	0.3 7	16 0	0.3 7	* 	*
TBA1B_ HUMAN	Tubulin alpha- 1B chain	501 20	4 .9	14 1	0.2 4	12 2	0.2 4	20 0	0.1 5	99 	0.2 4	12 6	0.3 3	39 	0.0 7
TLN1_H UMAN	Talin-1	269 599	5 .8	16 74	0.5 0	25 09	0.6 2	24 08	0.9 3	11 91	0.3 4	11 80	0.3 3	67 5	0.2 7
TSP1_H UMAN	Thrombospon din-1	127 414	4 .7	47 	0.0 3	66 	0.0 6	71 	0.0 9	57 4	0.4 3	86 8	0.6 8	43 3	0.1 8
UACA_H UMAN	Uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats	162 404	6 .6	16 2	0.0 2	92 	0.0 2	21 0	0.0 5	89 	0.0 2	77 	0.0 2	* 	*
UBR4_H UMAN	E3 ubiquitin- protein ligase UBR4	573 476	5 .7	* 	* 	16 9	0.0 2	44 	0.0 1	12 8	0.0 1	71 	0.0 1	47 	0.0 1
UGGG1_ HUMAN	UDP- glucose:glycop rotein glucosyltransf erase 1	172 924	5 .4	10 26	0.5 1	13 02	0.4 8	74 9	0.3 6	66 	0.0 2	* 	* 	30 	0.0 2
VIME_H UMAN	Vimentin	534 88	5 .0	12 09	3.6 8	13 95	2.8 3	10 40	3.0 9	10 37	2.5 8	91 7	1.7 4	38 1	1.0 9

Tablo 3. Genç ve yaşlı fibroblastlarda karbonile proteinlerin MALDI TOF MS ile analizi (*data yok)

	Access code	Protein ID	mW (Da)	pI	Score
PD: 25A					
BAND 1	TBB5_HUMAN	Tubulin beta chain	49639	4.8	94
	TBB2A_HUMAN	Tubulin beta-2A chain	49875	4.8	54
	VIME_HUMAN	Tubulin beta-2B chain	53488	5.0	67
	TBB2B_HUMAN	Tubulin beta-2B chain	49921	4.8	54
	TBB4B_HUMAN	Tubulin beta-4B chain	49799	4.8	33
BAND 2	VIME_HUMAN	Vimentin	53488	5.0	94
	ZN443_HUMAN	Zinc finger protein 443	77465	9.3	54
BAND 3	NDUA9_HUMAN	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial	38876	9.7	36
PD: 58A					
BAND 1	VIME_HUMAN	Vimentin	53488	5.0	67
	DICER_HUMAN	Endonuclease Dicer	218542	5.5	49
	PKH4B_HUMAN	Pleckstrin homology domain-containing family G member 4B	139580	6.3	113
	MLIP_HUMAN	Muscular LMNA-interacting protein	50398	6.0	47
	GLRX1_HUMAN	Glutaredoxin-1	11637	8.4	*
	ARL8A_HUMAN	ADP-ribosylation factor-like protein 8A	21402	7.6	23
PD: 25B					
BAND 1	CJ111_HUMAN	Uncharacterized protein C10orf111	17754	10.0	23
	CDY2_HUMAN	Testis-specific chromodomain protein Y 2	60486	9.1	39
BAND 2	EXPH5_HUMAN	Exophilin-5	222382	8.0	54
BAND 3	NKAPL_HUMAN	NKAP-like protein	46284	9.7	43
	KCQ1D_HUMAN	KCNQ1 downstream neighbor protein	7380	9.6	32
PD: 25B					
BAND 1	PSB8_HUMAN	Proteasome subunit beta type-8	22645	7.6	41
BAND 2	CD320_HUMAN	CD320 antigen	25553	4.6	33
BAND 3	UB6L2_HUMAN	Protein USP6-like 2	17709	7.8	24
	MKS1_HUMAN	Meckel syndrome type 1 protein	61993	9.2	*
	S15A4_HUMAN	Solute carrier family 15 member 4	67203	6.1	15
	CLHC1_HUMAN	Clathrin heavy chain linker domain-containing protein 1	27215	5.6	15
	PSB11_HUMAN	Proteasome subunit beta type-11	37652	8.6	20
	DNJB4_HUMAN	DnaJ homolog subfamily B member 4	58889	5.6	19
	FTCD_HUMAN	Formimidoyltransferase-cyclodeaminase	8437	9.1	16
	SVIP_HUMAN	Small VCP/p97-interacting protein	9456	8.2	15
	ELOF1_HUMAN	Transcription elongation factor 1 homolog	61993	9.2	14

6.7 ELISA Yöntemi ile Nitrotirozin Tayini Sonuçları



Şekil 17. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde protein nitrotirozin miktarlarına etkileri

*A: 37 °C'de 1 saat, B: 42 °C'de 1 saat, C: 42 °C'de 1 saat + 37 °C'de 3 saat

Kontrol örnekleri kıyaslandığında protein karbonil miktarlarının yaşlı hücrelerde genç hücrelere kıyasla değişmediği gözlenmektedir. Uygulanan ısı stresinin, hemen tayin edildiğinde protein karbonil miktarlarında genç hücrelerde az miktarda artışa neden olurken yaşlı hücrelerde anlamlı değişikliğe neden olmadığı gözlenmektedir. Hücrelerin ısı stresi sonrasında 3 saat normal koşullarda tutulmasının ardından tayin edildiğinde protein karbonil miktarlarının genç hücrelerde ve yaşlı hücrelerde kontrole kıyasla değişiklik olmadığı gözlenmektedir.

6.8 Proteomik Analiz

6.8.1 İki Boyutlu jel elektroforezi

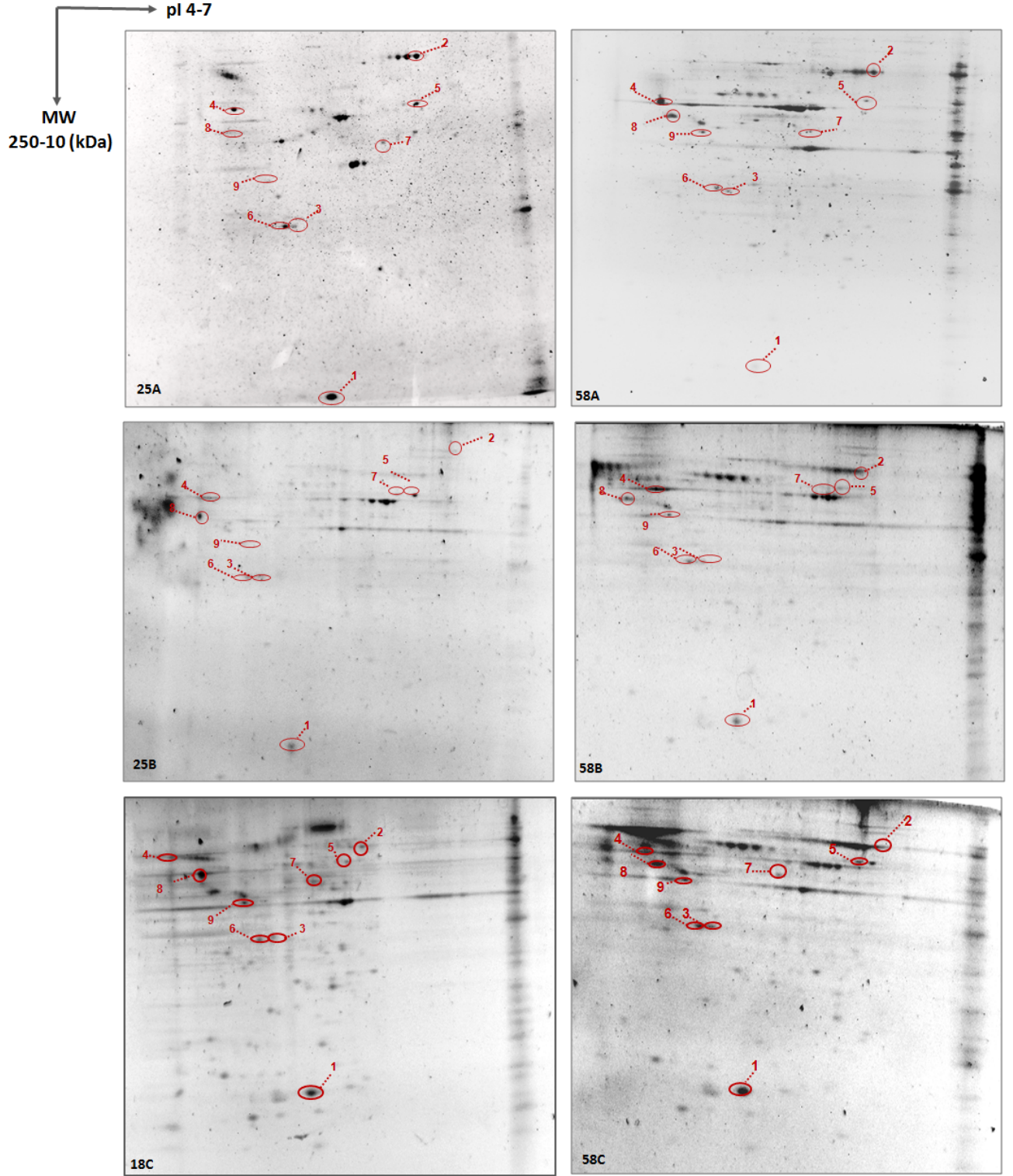
Genç ve yaşlı fibroblastlarda ısı şok etkisi ve ısı şok etkisi sonrası geri kazanım prosesi uygulanarak gerçekleşen protein ekspresyon değişimleri 2D-jel elektroforezi yöntemi ile her bir gruba ait protein haritaları çıkarılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 18'de görüldüğü gibi gruplar arası ekspresyonları değişen 9 adet protein spotu belirlenmiştir. Ekspresyon değişim değerleri Bio 2D-Software (Vilber Lourmat) ile analiz edilmiştir. Şekil 19' da her bir protein spotuna ait ekspresyon değişimleri gruplar arası karşılaştırmalar yapılarak değerlendirilmiştir.

6.8.2 Kütle Spektrometri Analizleri

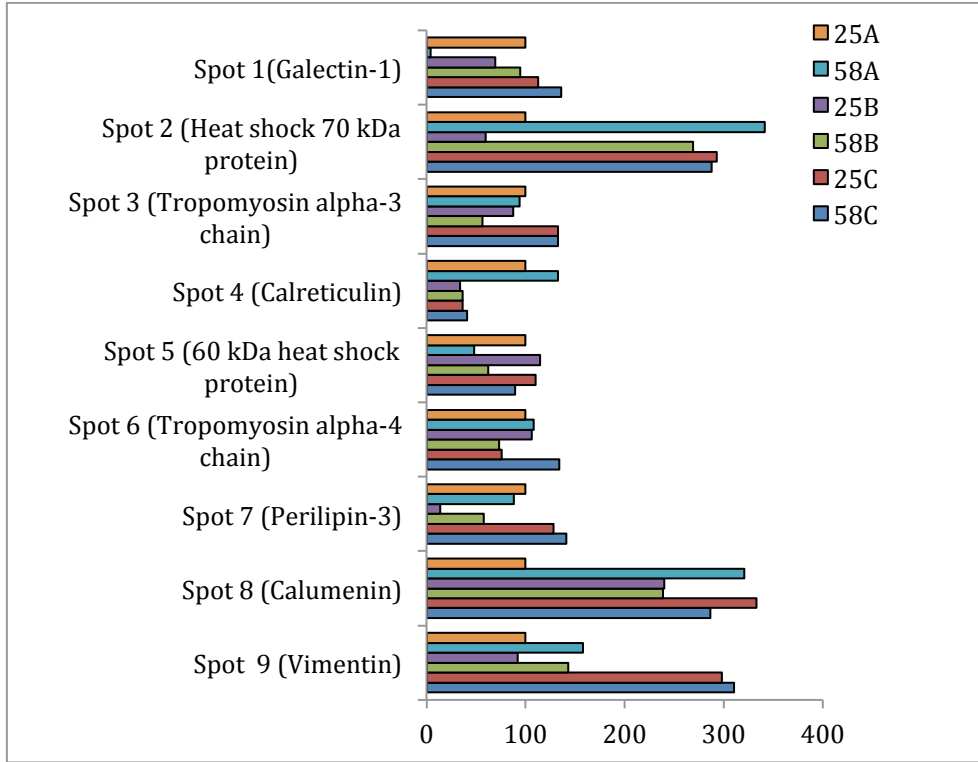
İki boyutlu jel elektroforezi sonrasında elde edilen protein spotlarından ekspresyon değişimi gösteren 9 adet protein spotunun MALDI TOF MS analizleri yapılmıştır.

Kütle spektrometrisi analizleri ile tanımlanan proteinler iki boyutlu jel üzerinde gösterilmiştir (Şekil 20).

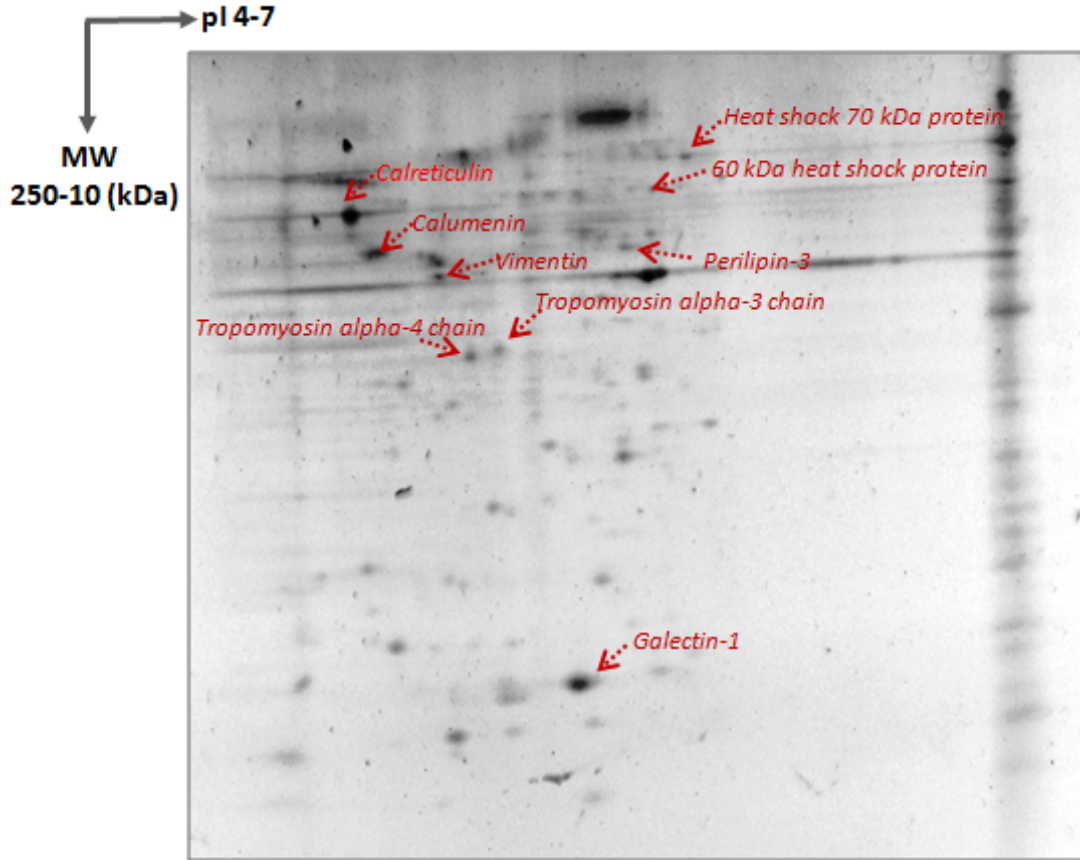
Tablo 4' de analizleri yapılan proteinlere ait spot numaraları, üyelik numaraları (Accession number, AN), protein adı, skor, izoelektrik noktalar (pI), moleküler ağırlıkları (MW) gösterilmiştir. Yapılmış olan analizler sonucunda belirlenen 9 adet protein spotu, "Galectin-1", "Heat shock 70 kDa protein", Tropomyosin alpha-3 chain", "Calreticulin, 60 kDa heat shock protein", "Tropomyosin alpha-4 chain", "Perilipin-3", "Calumenin", "Vimentin" olarak tanımlanmıştır.



Şekil 18. Her bir gruba ait total proteinlerin 2D-jel ile gösterimi. *A: 37 °C'de 1 saat, B: 42 °C'de 1 saat, C: 42 °C'de 1 saat + 37 °C'de 3 saat



Şekil 19. Ekspresyonu değişen proteinlerin dansitometrik analizleri

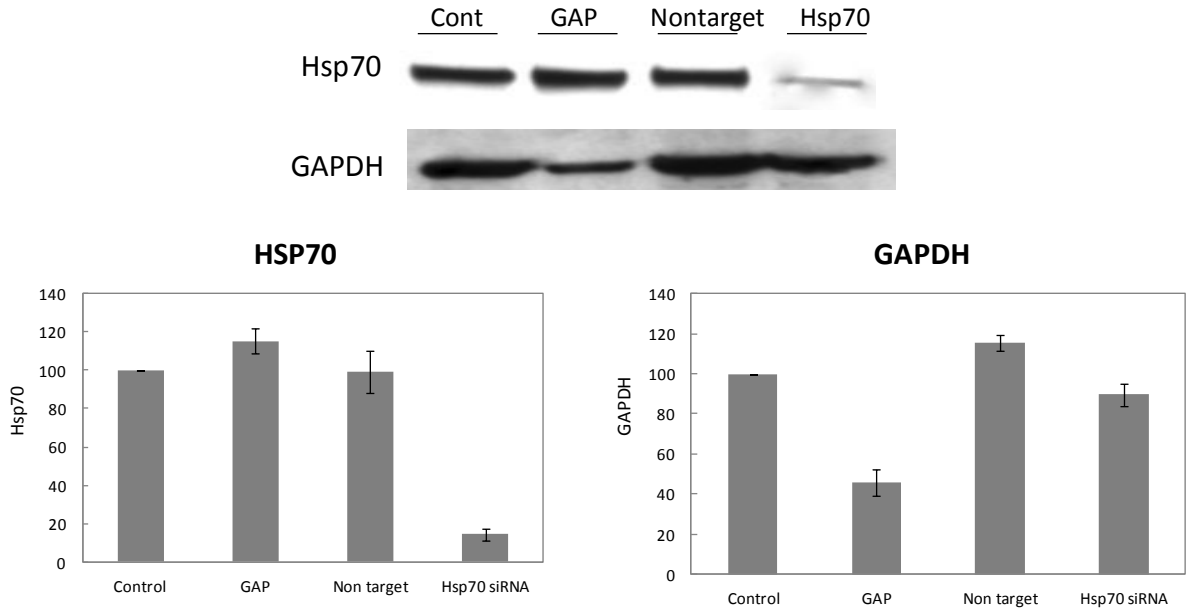


Şekil 20. Kütle spektrometrisi ile tanımlanan proteinlerin 2D-jelde gösterimi

Tablo 4. Kütle spektrometrisi analizleri ile belirlenen proteinler

Spot numarası	A.N.	Protein adı	Skor	pI	Mw (kDa)
1	P09382	Galectin-1	137	5.30	14
2	P11142	Heat shock 70 kDa protein	69	5,61	70,9
3	P06753-2	Tropomyosin alpha-3 chain	219	4,75	29
4	P27797	Calreticulin	151	4,29	48,1
5	P10809	60 kDa heat shock protein	95	5,24	61
6	P67936	Tropomyosin alpha-4 chain	235	4,69	28,5
7	O60664	Perilipin-3	122	5,30	47
8	O43852	Calumenin	56	4,46	37,1
9	P08670	Vimentin	61	5,05	53.6

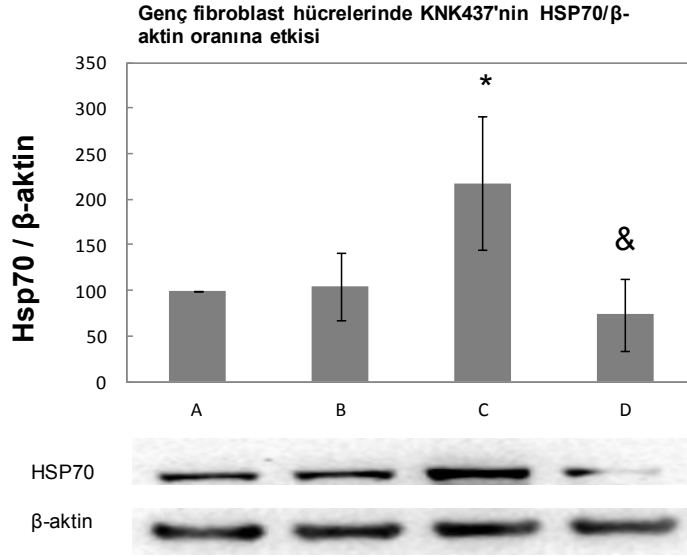
6.9 siRNA ile HSP70 susturulması



Şekil 21. Pozitif kontrol siRNA (GAPDH), negatif kontrol siRNA (non targeting) ve hedef siRNA transfeksiyonlarının kontrol örnekleri ile kıyaslanması. HSP70 siRNA uygulanmış hücrelerde kontrol ve negatif kontrole kıyasla HSP70 ekspresyonunda %90 oranında azalma gözlemlendi. GAPDH siRNA ile ise %50 susturma gerçekleştirildi.

6.10 KNK437 ile HSP70 İnhibisyonunun Isı Şoku ile Etkisi

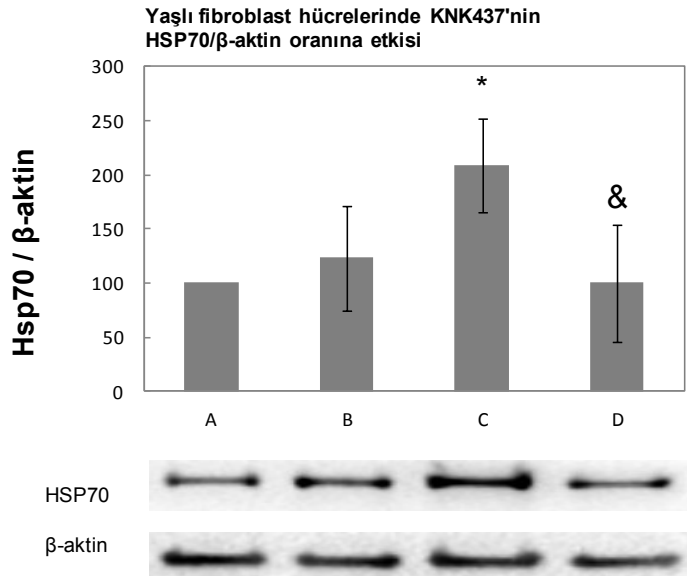
6.10.1 Genç Fibroblast Hücrelerinde KNK437 ile HSP70 İnhibisyonu



Şekil 22. PD25 olan genç hücrelerde HSP70 inhibitörü KNK437'nin HSP70 ekspresyonuna ve ısı şoku ile indüklenmesine etkisi. A: DMSO kontrol, B: KNK437 kontrol, C: DMSO + 1 saat ısı şok + 3 saat inkübasyon, D=KNK437 + 1 saat ısı şok + 3 saat inkübasyon

Sonuçlardan KNK437'nin genç hücrelerde özellikle ısı şoku ile indüklenen HSP70 ekspresyonunda azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. * $p<0.05$ A'ya kıyasla C; & $p<0.05$ C'ye kıyasla D.

6.10.2 Yaşlı Fibroblast Hücrelerinde KNK437 ile HSP70 İnhibisyonu



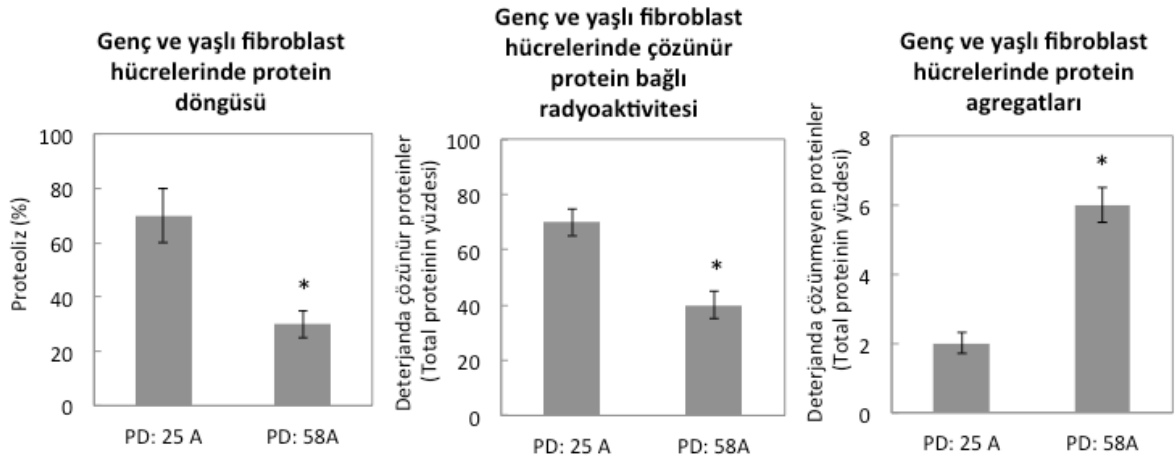
Şekil 23. PD58 olan yaşlı hücrelerde HSP70 inhibitörü KNK437'nin HSP70 ekspresyonuna ve ısı şoku ile indüklenmesine etkisi. A: DMSO kontrol, B: KNK437 kontrol, C: DMSO + 1 saat ısı şok + 3 saat inkübasyon, D=KNK437 + 1 saat ısı şok + 3 saat inkübasyon

Sonuçlardan KNK437'nin yaşlı hücrelerde özellikle ısı şoku ile indüklenen HSP70 ekspresyonunda azalmaya neden olduğu gözlenmiştir.

* $p < 0.05$ A'ya kıyasla C; $p < 0.05$ C'ye kıyasla D.

6.11 Sıvı Sintilasyon Metodu ile Protein Döngüsü Tayini

6.11.1 Genç ve Yaşlı Hücrelerde Sıvı Sintilasyon Metodu ile Protein Döngüsü Tayini

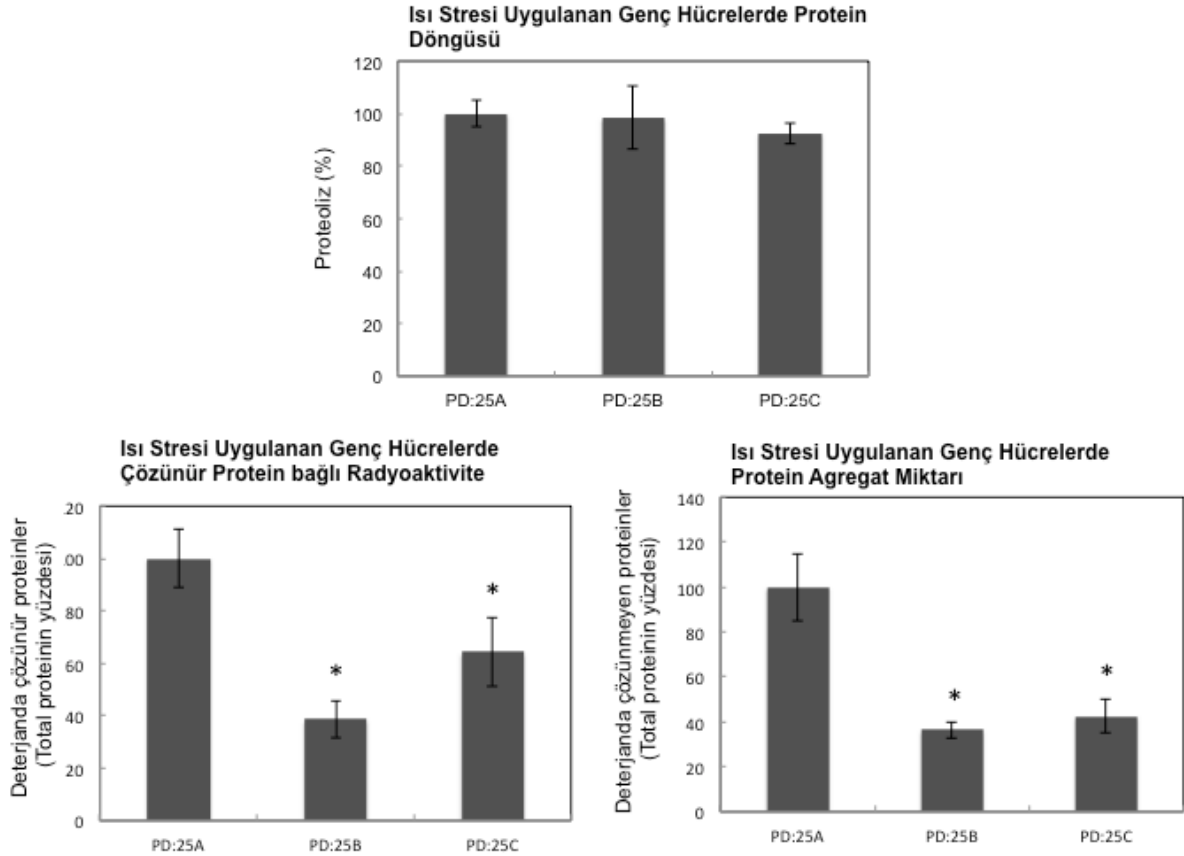


Şekil 24. Hücresel yaşlanmanın protein döngüsü ve protein agregat oluşumu üzerine etkileri

Hücrelerde pasaj numarası artışı ile yaşlanmanın proteolitik yıkımda ve çözünebilir protein miktarlarında anlamlı derecede azalmaya neden olduğu, çözünmeyen protein agregatlarında ise anlamlı derecede bir artışa neden olduğu gözlenmiştir.

* $p < 0.05$ 25A'ya kıyasla 58A.

6.11.2 Isı Stresi Uygulanan Genç Hücrelerde Sıvı Sintilasyon Metodu ile Protein Döngüsü Tayini

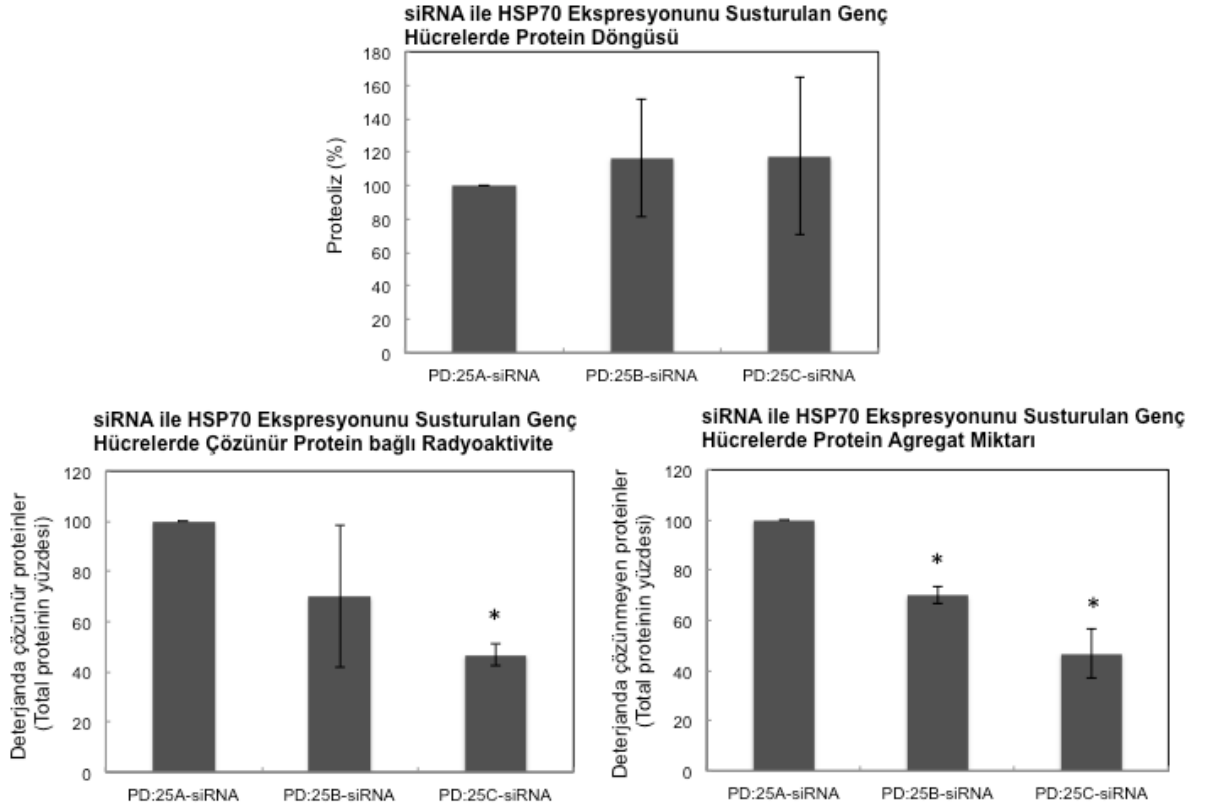


Şekil 25. PD25 olan genç hücrelerde ısı uygulamasının protein döngüsü, çözünür protein ve protein agregat miktarına etkisi. *A: 37 °C'de 1 saat, B: 42 °C'de 1 saat, C: 42 °C'de 1 saat + 37 °C'de 3 saat

Kontrol ile kıyaslandığında protein döngüsü olarak adlandırılan proteolizin her iki grupta da değişiklik göstermediği gözlemlendi. Çözünen proteinlerin her iki grupta da kontrole kıyasla azaldığı gözlemlendi. Protein agregatlarının da her iki grupta kontrole kıyasla azaldığı gözlemlendi.

*p<0.05 PD:25A'ya kıyasla.

6.11.3 siRNA ile HSP70 Ekspresyonunu Susturulan Genç Hücrelerde Sıvı Sintilasyon Metodu ile Protein Döngüsü Tayini

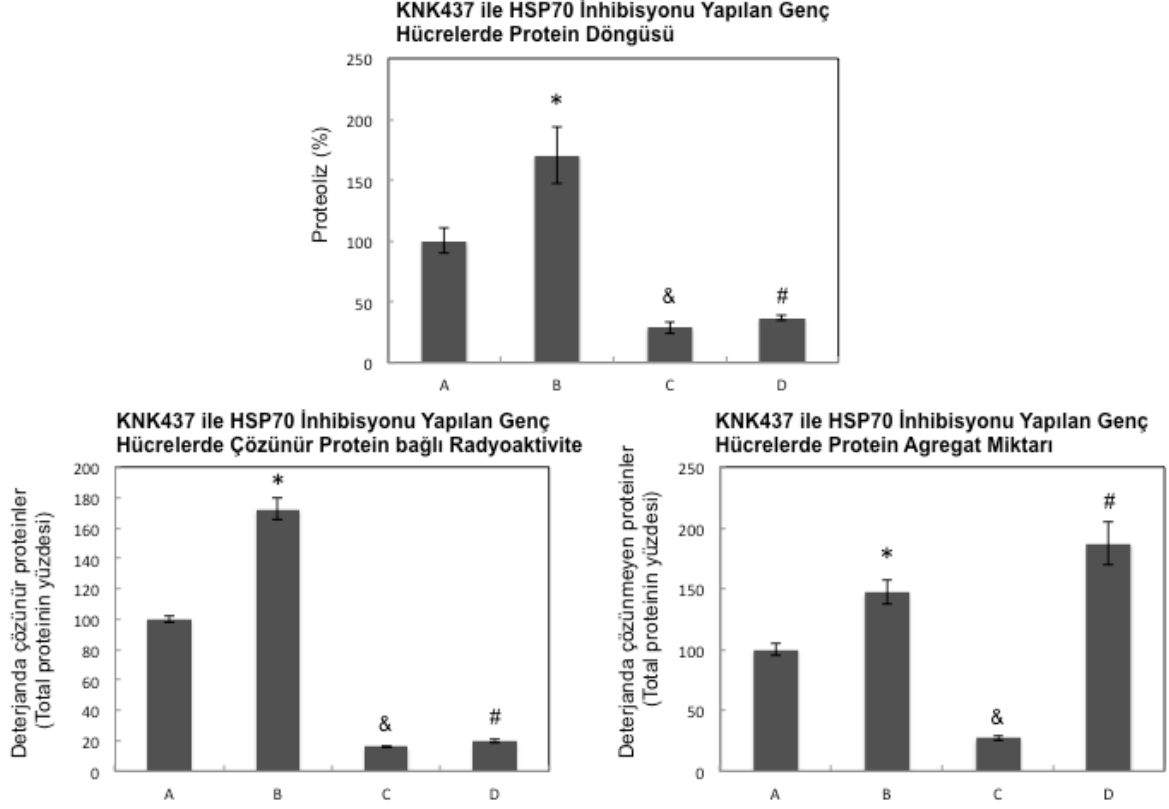


Şekil 26. PD25 olan genç hücrelerde siRNA ile HSP70 susturulmasının ardından ısı uygulamasının protein döngüsü, çözünür protein ve protein agregat miktarına etkisi. *A: 37 °C'de 1 saat, B: 42 °C'de 1 saat, C: 42 °C'de 1 saat + 37 °C'de 3 saat

Kontrol ile kıyaslandığında protein döngüsü olarak adlandırılan proteolizin her iki grupta da değişiklik göstermediği gözlemlendi. Çözünen proteinlerin sadece ısı uygulaması sonrası 3 saat normal koşullarda tutulan C grubunda kontrole kıyasla azaldığı gözlemlendi. Protein agregatlarının her iki grupta kontrole kıyasla azaldığı gözlemlendi.

*p<0.05 PD:25A'ya kıyasla.

6.11.4 KNK437 ile HSP70 İnhibisyonu Yapılan Genç Hücrelerde Sıvı Sintilasyon Metodu ile Protein Döngüsü Tayini



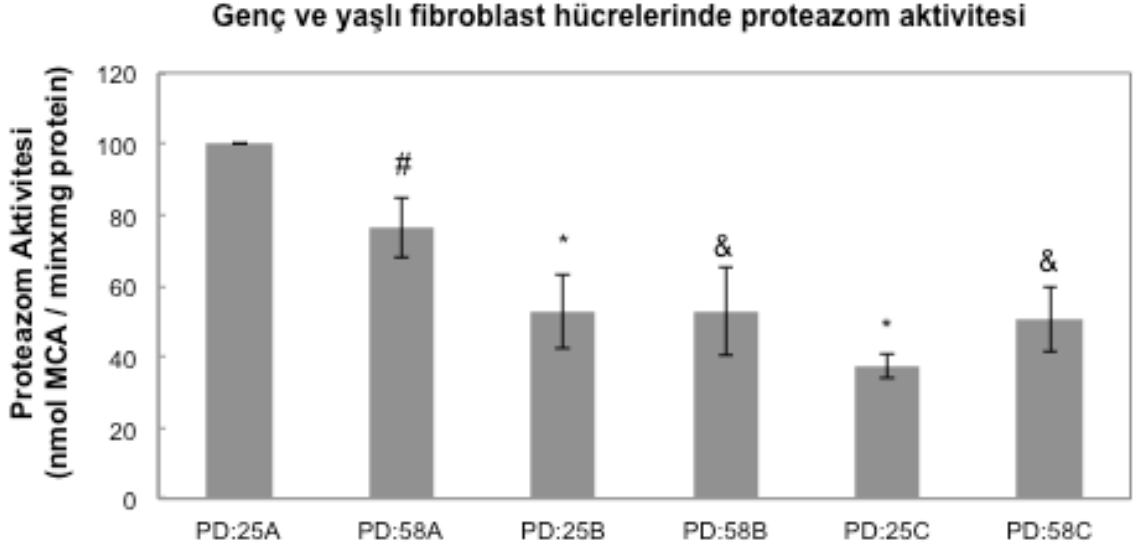
Şekil 27. PD25 olan genç hücrelerde KNK437 ile HSP70 İnhibisyonunun ardından ısı uygulamasının protein döngüsü, çözünür protein ve protein agregat miktarına etkisi. A: DMSO kontrol, B: KNK437 kontrol, C: DMSO + 1 saat ısı şok + 3 saat inkübasyon, D=KNK437 + 1 saat ısı şok + 3 saat inkübasyon

Kontrol ile kıyaslandığında protein döngüsü olarak adlandırılan proteolizin ve çözünen proteinlerin KNK437 uygulaması ile kontrole kıyasla arttığı gözlemlendi. C ve D gruplarında kontrole kıyasla azalma gözlemlendi. Protein agregatlarının KNK437 uygulaması ile kontrole kıyasla arttığı gözlemlendi. C grubunda kontrole kıyasla azalırken, D grubunda kontrole kıyasla arttığı gözlemlendi.

* $p < 0.05$ A'ya kıyasla; & $p < 0.05$ A'ya kıyasla; # $p < 0.05$ B'ye kıyasla.

6.12 Proteazom Aktivite Tayini

6.12.1 Isı Stresi Uygulanan Genç ve Yaşlı Hücrelerde Proteazom Aktivite Tayini



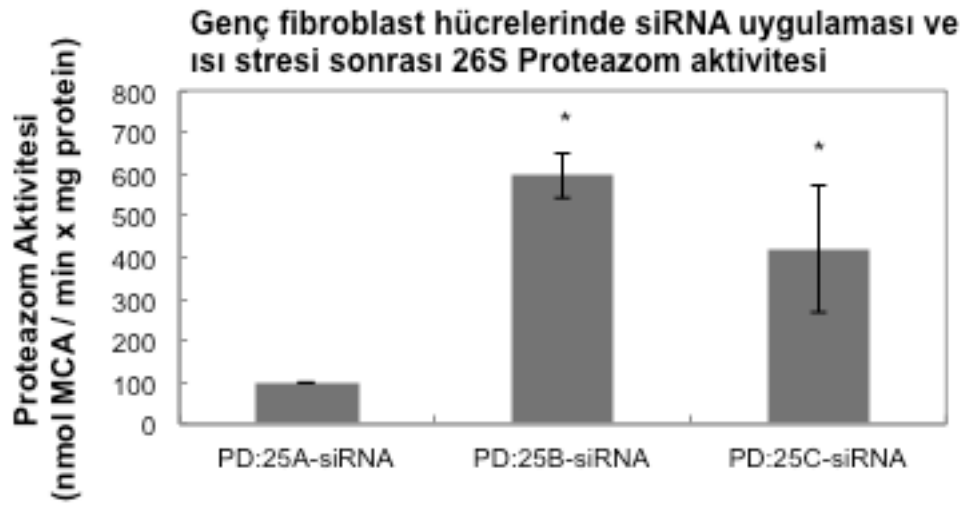
Şekil 28. Isı stresinin genç ve yaşlı fibroblast hücrelerinde proteazom aktivitesi üzerine etkileri

*A: 37 °C'de 1 saat, B: 42 °C'de 1 saat, C: 42 °C'de 1 saat + 37 °C'de 3 saat

Kontrol örnekleri kıyaslandığında proteazom aktivitesinin yaşlı hücrelerde genç hücrelere kıyasla azaldığı gözlenmektedir. Uygulanan ısı stresinin, hemen tayin edildiğinde proteazom aktivitesinde hem genç hem de yaşlı hücrelerde azalmaya neden olduğu gözlemlendi. Hücrelerin ısı stresi sonrasında 3 saat normal koşullarda tutulmasının ardından tayin edildiğinde proteazom aktivitesinde hem genç hem de yaşlı hücrelerde azalmaya neden olduğu gözlemlendi.

*p<0.05 PD:25A'ya kıyasla; &p<0.05 PD:58A'ya kıyasla; #p<0.05 PD:25A'ya kıyasla.

6.12.2 siRNA ile HSP70 Ekspresyonu Susturulan Genç Hücrelerde Proteazom Aktivite Tayini

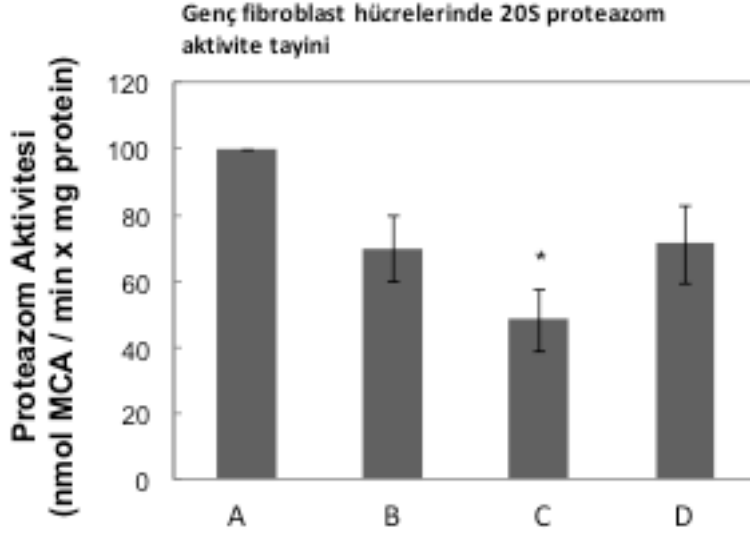


Şekil 29. PD25 olan genç hücrelerde siRNA ile HSP70 susturulmasının ardından ısı uygulamasının proteazom aktivitesi üzerine etkisi. *A: 37 °C'de 1 saat, B: 42 °C'de 1 saat, C: 42 °C'de 1 saat + 37 °C'de 3 saat

Kontrol ile kıyaslandığında proteazom aktivitesinde siRNA uygulaması sonrası artış gözlenmiştir. . Çözünen proteinlerin sadece ısı uygulaması sonrası 3 saat normal koşullarda tutulan C grubunda kontrole kıyasla azaldığı gözlemlendi. Protein agregatlarının her iki grupta kontrole kıyasla azaldığı gözlemlendi.

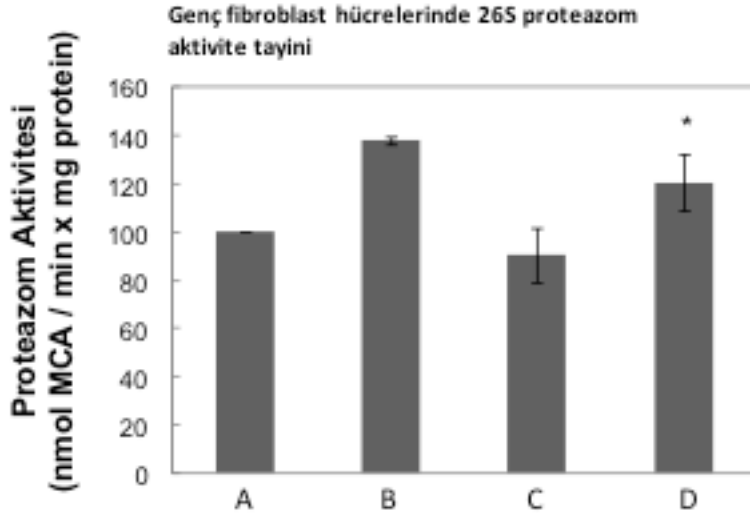
*p<0.05 PD:25A'ya kıyasla.

6.12.3 KNK437 ile HSP70 İnhibisyonu Yapılan Genç ve Yaşlı Hücrelerde Proteazom Aktivite Tayini



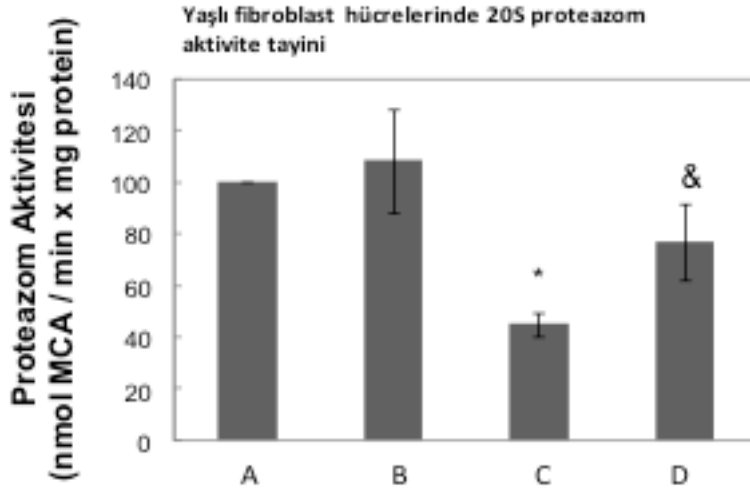
Şekil 30. PD25 olan genç hücrelerde HSP70 inhibitörü KNK437'nin 20S proteazom aktivitesi üzerine etkileri. A: DMSO kontrol, B: KNK437 kontrol, C: DMSO + 1 saat ısı şok + 3 saat inkübasyon, D=KNK437 + 1 saat ısı şok + 3 saat inkübasyon

20S proteazom aktivitesinin kontrol hücrelerinde KNK437 ile azaldığı gözlenmiştir. Isı stresi ile kontrole göre 20S aktivitesi azalmıştır. KNK437'nin ısı stresi hücrelerinde 20S aktivitesinde artışa neden olduğu gözlenmiştir.



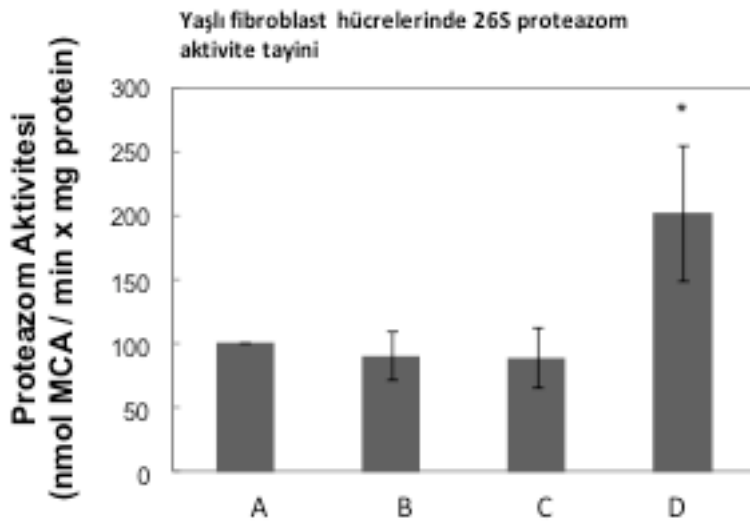
Şekil 31. PD25 olan genç hücrelerde HSP70 inhibitörü KNK437'nin 26S proteazom aktivitesi üzerine etkileri. A: DMSO kontrol, B: KNK437 kontrol, C: DMSO + 1 saat ısı şok + 3 saat inkübasyon, D=KNK437 + 1 saat ısı şok + 3 saat inkübasyon

26S proteazom aktivitesinin kontrol hücrelerinde KNK437 ile arttığı gözlenmiştir. Isı stresi ile kontrole göre 26S aktivitesinde değişiklik gözlenmemiştir. KNK437'nin ısı stresi hücrelerinde 26S aktivitesinde artışa neden olduğu gözlenmiştir.



Şekil 32. PD58 olan yaşlı hücrelerde HSP70 inhibitörü KNK437'nin 20S proteazom aktivitesi üzerine etkileri. A: DMSO kontrol, B: KNK437 kontrol, C: DMSO + 1 saat ısı şok + 3 saat inkübasyon, D=KNK437 + 1 saat ısı şok + 3 saat inkübasyon

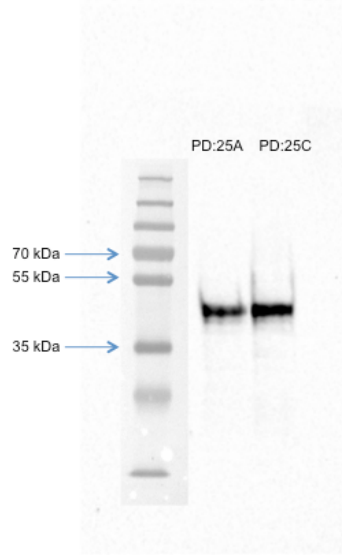
20S proteazom aktivitesinin kontrol hücrelerinde KNK437 ile değişmediği gözlenmiştir. Isı stresi ile kontrole göre 20S aktivitesinde azalma gözlenmiştir. KNK437'nin ısı stresi hücrelerinde 20S aktivitesinde artışa neden olduğu gözlenmiştir.



Şekil 33. PD58 olan yaşlı hücrelerde HSP70 inhibitörü KNK437'nin 20S proteazom aktivitesi üzerine etkileri. A: DMSO kontrol, B: KNK437 kontrol, C: DMSO + 1 saat ısı şok + 3 saat inkübasyon, D=KNK437 + 1 saat ısı şok + 3 saat inkübasyon 26S proteazom aktivitesinin kontrol hücrelerinde KNK437 ile değişmediği gözlenmiştir. Isı stresi ile kontrole göre 26S

aktivitesinde değişiklik gözlenmemiştir. KNK437'nin ısı stresi hücrelerinde 26S aktivitesinde artışa neden olduğu gözlenmiştir.

6.13 HSP40 İmmünpresipitasyonu



Şekil 34. PD:25 olan genç hücrelerde HSP40 immünpresipitasyonu. HSP40 çöktürülmesinin ardından HSP70 ve HSP27 antikoruna bağlandığında hiçbir bant gözlenmedi ve bu proteinlerin HSP40'a bağlanmadığı saptandı. *A: 37 °C'de 1 saat, C: 42 °C'de 1 saat + 37 °C'de 3 saat

7. TARTIŞMA/SONUÇ

Yaşlanma, hücre fonksiyonlarında ve fizyolojisinde değişiklikler ile karakterize olan oldukça komplike bir prosestir. Öne sürülen yüzlerce teorinin yanısıra yaşlanmada serbest radikal teorisi mekanizması açıklaması açısından önemli yer tutmaktadır (Harman, 1956). Bu teori, yaşlanma sürecinde birçok biyomolekülün oksidatif modifikasyona uğradığını kabul etmektedir. Diğer moleküllerin yanısıra, protein oksidasyonu yaşlanma esnasında önemli rol oynar. Yaşlanma esnasındaki protein oksidasyonunda başlıca problem, proteazomal sistem gibi yıkım mekanizmalarında meydana gelen aksama ve antioksidan savunmada oluşan azalma nedeniyle hasarlı proteinlerin akümüle olmasıdır (Grune vd., 1997; Matsubara ve Machado, 1991). Hücre içerisinde proteazomal degradasyon farklı mekanizmalar ile düzenlenmekte ve son yıllarda ısı şok proteinlerinin bu regülatörler arasında olduğuna inanılmaktadır (Grune vd., 2011).

Isı şok proteinleri (HSP) ekspresyonları stres durumunda artış gösteren ve organizmada yüksek oranlarda bulunan bir protein ailesidir. Isı şoku, reaktif oksijen türleri, ilaçlar veya inflamasyon gibi durumlarda ekspresyonları 3-4 kat artış göstermektedir (Garrido vd., 2001). Tüm fonksiyonları aydınlatılamamasına rağmen, HSP'lerin moleküler şaperonlar olarak aktivite gösterdikleri ve proteinlerin doğru katlanması, stres kaynaklı protein hasarının tamiri gibi önemli fonksiyonları olduğu bilinmektedir (Freeman vd., 2000).

HSP ailesi moleküler şaperon olarak HSP10, HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 ve HSP110 proteinlerini içeren genlerle kodlanmaktadır (Lindquist ve Craig, 1988). HSP10 ve HSP60 genellikle mitokondriyel proteinlerin doğru katlanarak agregasyonlarının önlenmesinde etkili olan şaperoninler olarak etki gösterirler (Calderwood, 2005). HSP70 ve HSP90, sitoplazmada katlanmamış polipeptid sekanslarına bağlanarak doğru katlanabilmelerini indükler (Mayer ve Bukau, 2005). Küçük HSP ailesinden olan HSP27 ise ATP bağımsız olarak hedef proteinlerin katlanmasından sorumludur.

Bütün organizmalar hafif ısı stresine yanıtta HSP ekspresyonunu gerçekleştirmektedir ve özellikle HSP 70'in yapısal sentezi termal stres için bir marker olarak kullanılabilir. Escherichia coli ile yapılan çalışmada, ısı şoku sırasında gerçekleşen agregasyonun E. coli HSP70 homolog DnaK ile önlendiği gösterilmiştir (Mayer ve Bukau, 2005). Sıçan dokularında, insan cildi ve insan hücrelerinde bulunan T lenfositlerde yaşlanma

sürecinde , strese karşı ısı şok proteinleri ile korunmada azalma olduğu tespit edilmiştir (Fargnoli vd., 1990; Pahlavani vd., 1995; Liu vd., 1989; Luce ve Cristofalo, 1992; Effros vd., 1994; Muramatsu vd., 1996; Deguchi vd., 1988)

Bu çalışmada, literatürde kabul gören 1 saatlik 42 °C'lik ısı uygulaması ardından ısı şok proteinlerindeki değişim ısı uygulamasının hemen ardından ve de 3 saatlik kurtarma (recovery) olarak adlandırılan normal hücresel şartlarda inkübasyonun ardından mRNA ve protein düzeyinde test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ışığında protein oksidasyon ürünleri olarak protein karbonil ve nitrozillenmesi test edilmiş ve karbonillenen proteinler kütle spektrometresi ile tayin edilmiştir. Ayrıca bu ısı uygulaması süresince ekspresyonları değişen proteinler iki boyutlu jel elektroforezi ile tayin edilerek, kütle spektrometresi ile belirlenmiştir. HSP70'in öncelikli öneminden dolayı HSP70 susturulması ve inhibisyonu ile sonuçlar doğrulanmıştır. En son olarak HSP70 ko-şaperonu olduğu bilinen HSP40, immünpresipitasyon yöntemi ile çöktürülmüştür.

Zayıf ısı uygulaması, ısı şok proteinlerine olan etkisi yanında hücrede hormesis olarak bilinen birçok metabolik yolakta önemli rol oynamaktadır. Uygulanan ısı stresi, HSP'lerde meydana getirdiği değişikliklerle protein kalite kontrolüne katkı sağlamakta ve bu yolların aydınlatılabilmesinde yardımcı olmaktadır (Rattan, 2004). Zayıf stresin, uygulanan koşulda hücre ölümüne neden olmaması deneylerin sağlıklı devamı açısından önem arz etmektedir. Deneylerimizde uygulanan ısı yoğunluğu ve sürelerde hücrelerde canlılık oranının %85-90'ın altına düşmediği gözlenerek, deneylere devam edilmiştir.

HSP27, özellikle protein agregatlarının akümüülasyonunda önemli rolü olan küçük HSP ailesinde bir proteindir (Lanneau vd., 2010). Birçok önemli transkripsiyon faktörünün ubikütilenmesini ve proteazomal yıkımını indüklemektedir (Parcellier vd., 2006). Küçük bir protein olması nedeniyle hem sitozolde hem de nükleusta aktivite gösterebilmektedir. HSP27 ile elde edilen sonuçlara bakıldığında, özellikle yaşlı hücrelerde ısı uygulaması sonrası protein ekspresyonunda anlamlı derecede azalma gözlenmiştir. Bu da HSP27'nin rolü düşünüldüğünde, stres ile protein akümüülasyonunun yaşlı hücrelerde genç hücrelere oranla artışına doğru orantılıdır.

HSP40, genellikle HSP70 ile ilişkili ko-şaperon olarak bilinen ve katlanmamış proteinleri bağlayarak HSP70'e transfer eden proteindir. Bunun yanı sıra, HSP70'e

bağlanmadığı durumlarda endoplazmik retikulum ile bağlantılı degradasyon ve kalite kontrol mekanizmasında da önemli rol oynar (Summers vd., 2009). Elde edilen sonuçlarda protein ekspresyonunun sadece 3 saatlik kurtarma prosedüründe genç hücrelerde artış gösterdiği gözlenmiştir. Yaşlı hücrelerde yine yaşlanma ile stres bağlantılı azalan degradasyonun nedenini doğrulayarak hiçbir artış gözlenmemiştir.

HSP47, özellikle kollajen katlanmasında önemli rolü olan bir şaperondur. Deride, kollajen sentezinde fibroblast hücrelerinin yer almasından dolayı, bu hücrelerde HSP47 miktarının oldukça yüksek olduğu bilinmektedir (Satoh vd., 1996). Elde edilen sonuçlarda ısı stresi ile sadece genç hücrelerde HSP47 düzeyinin artış gösterdiği, yaşlı hücrelerde bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Bu da cilt yaşlanmasında ve kollajen degradasyonundaki artışın yaşlılarda yüksek oranda olmasını açıklamaktadır. Bu kapsamda HSP47'nin rolünü araştırdığımız daha detaylı bir çalışmamız devam etmektedir.

HSP60, mitokondriyel protein kalite kontrolünden sorumlu olan bir şaperonindir ve subsratların katlanmasından sorumludur. Özellikle HSP70'den salındıktan sonra proteine bağlanır ve HSP60 disfonksiyonu mitokondriyel matrikste protein agregatlarının akümüle olmasına neden olur (Manning-Krieg vd., 1991; Ostermann vd., 1989). Elde ettiğimiz sonuçlarda, HSP60'ın sadece genç hücrelerde ısı uygulamasının hemen ardından indüklendiğini, yaşlı hücrelerde hiçbir değişiklik olmadığını göstermiştir.

HSP70, protein kalite kontrolünde ve döngüsünde hem normal hücre koşullarında hem de stres durumunda önemli rol oynamaktadır (Evans vd., 2010). Katlanmanın yanı sıra, protein yıkımında özellikle proteazomal degradasyonda önemi kanıtlanmıştır (Grune vd., 2011). Sonuçlarımız, HSP70'in yine sadece genç hücrelerde stresle aktive olduğunu ve yaşlı hücrelerde değişmediğini göstermektedir. Bu da yaşlı hücrelerde yıkımın azalışını açıklamaktadır. Bu kapsamda, HSP70 ayrıca inhibitör ve siRNA uygulamaları ile daha da ayrıntılı incelenmiştir.

HSP90, diğer HSP'lerin aksine katlanmamış proteine bağlanmak yerine proteinleri fonksiyonel katlanmış durumda tutmaktan sorumludur. Bu proteinler arasında birçok hücre yüzey reseptörleri, transkripsiyon faktörleri, protein kinazlar yer almaktadır. Isı stresi uygulamasının ardında, hem genç hem de yaşlı hücrelerde 3 saatlik kurtarma

inkübasyonu içeren grupta artış gösterdiğini gözlemledik. Yaşlı hücrelerdeki artışın, genç hücrelere oranla oldukça düşük olduğu saptandı.

Protein karbonilleri yan zincir oksidasyonu sonucu meydana gelen ve protein oksidasyonu göstergesi olarak sıklıkla kullanılan ürünlerdir. Protein karbonil oluşumunun yaşlılıkla bağlantılı olarak artış gösterdiği ve oluşan ürünlerin proteazomal degradasyonla uzaklaştırılmadığı durumda protein agregatları oluşumuna yol açtığı bilinmektedir. Protein karbonil tayininde ELISA metodu yerine spesifik proteinlerin karbonilasyonunu görmek adına oxy-blot metodu tercih edilmektedir. Oxy-blot metoduyla artışı gözlemlenen bantlar kesilerek hangi proteine ait olduğu saptanabilmektedir. Bu çalışmada da karbonilasyonu artan proteinler olarak HSP70, Tioredoksin domeyn içeren protein 5, HSP90, protein disülfid izomeraz, 26S proteazom altünite 2,4 ve 12, ATP sentaz alfa altünitesi, Hsc70 bağlantılı protein, glutatyon sentetaz, glutatyon redüktaz, HSP60 ve ubikütin karboksil terminal hidrolaz protein bulunmuştur. Bu proteinler özellikle protein oksidasyonunda savunma mekanizmalarındaki rollerinden dolayı ilgi çekici olmuştur. Protein karbonil oxy-blot sonucuna bakıldığında, ısı uygulamasının hemen ardından hem genç hem de yaşlı hücrelerde bir fark gözlenmezken, 3 saatlik kurtarma protokolünün ardından yaşlı hücrelerde azalma olduğu gözlenmiştir. Bu grupta HSP60'ın da düştüğü gözlenmiştir ki başka bir çalışmada elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir (Fink, 1998). HSP70, 90 ve 60da gözlenen karbonillenme bu proteinlerin neden artmadığını da açıklamaktadır.

Proteomik analiz, özellikle belirli stres, hastalık gibi koşullarda artış azalma gösteren ve bilinmeyen proteinleri tayin açısından önemli bir prosedürdür. Çalışmamızda, genç ve yaşlı hücrelerde, ısı stresine bağlı olarak ısı şok proteinleri ile ilişkili proteinlerin tanımlanması ve yaşlanma sürecinde ısı şok proteinlerinin proteom üzerine olan rolü incelenmiştir. Bu amaçla, ısı stresi uygulanmış genç ve yaşlı hücrelerden ekstrakte edilen proteinler iki boyutlu jel elektroforezi ile belirlenmiş ve kütle spektrometrisi ile ilgili protein spotlarının tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda, 2 ve 5 numaralı spotlar sırası ile HSP70 ve HSP60 protein olarak tanımlanmıştır. HSP70 ekspresyonları, yaşlı hücrelerde genç hücrelere göre artış göstermiştir. Isı şoku etkisi ile ekspresyonlarında düşüş gözlemlenmiş ve ısı şoku sonrası geri kazanım prosesinde, hem genç hemde yaşlı hücrelerde HSP70 ekspresyonlarında artış gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar western blot sonuçlarıyla da paralellik göstermektedir. HSP60 ekspresyonlarında, yaşlı hücrelerle karşılaştırıldığında genç hücrelerde artış

gözlemlenmiştir. Isı şoku etkisi ile ekspresyonlarında hem genç hücrelerde hemde yaşlı hücrelerde artış gözlemlenmiş ve ısı şoku sonrası geri kazanım prosesinde ekspresyonlarında tekrar artış gözlemlenmiştir. Galektin-1, protein/glikan ve protein/protein interaksiyonları yolu ile hücre adezyonu, göçü ve büyümesi için potansiyel regülatör olarak görev yapmaktadır. Kalretikulin apoptotik hücrelerde bir fagositoz kolaylaştırıcı olarak görev yapmaktadır. Fibroblast hücreleri ile yapılmış olan İki boyutlu jel temelli proteomik çalışmasında yaşlanmayla galektin-1 ve kalretikulin protein ekspresyonlarında artış gözlemlenmiştir (Ho vd., 2014). Hem in vivo hemde in vitro çalışmalar, kalretikulinin yaraların iyileşmesi için hücre göçünde ve dokuların yeniden oluşumu için ekstraselüler matriks üretiminde önemli rolü olduğunu kollejeni desteklediğini göstermektedir (Gold vd., 2006). Çalışmamızda 1 ve 4 numaralı spotlar sırasıyla galektin-1 ve galreticulin olarak tanımlanmıştır. Literatüre uygun olarak çalışmamızda, galektin-1 ve kalretikulin ekspresyonlarında, yaşlı hücrelerde genç hücrelere göre artış gözlemlenmiştir. Bunun yanında ısı şok etkisi ile genç ve yaşlı hücrelerinde galektin-1 ve kalretikulin ekspresyonlarında baskılanma gerçekleşmiştir. Yaşlanma prosesinde perilipin-3 ün rolü ile ilgili çok az bir bilgi bulunmaktadır. Çalışmalarda perilipin-3 ün, lipit damlalarının depolanmasında membrandan yağ asitlerinin taşınması biyogeneze katıldığı gösterilmektedir (Bulankina vd., 2009). Çalışmamızda 7 numaralı spot perilipin-3 olarak tanımlanmıştır. Yaşlı hücrelerde genç hücrelere göre perilipin-3 ekspresyonu artmaktadır. Isı şoku etkisi ile perilipin-3 ekspresyonu genç ve yaşlı hücrelerde artarken, ısı şoku sonrası geri kazanım prosesinde perilipin-3 ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir. Tropomiyosin hem kas hem de kas olmayan hücrelerde bulunan bir aktin bağlayıcı bir proteindir. Tropomiyosin kas hücrelerinde, kas kasılması sürecinde kalsiyum iyon akışına cevapta aktinin miyosine kooperatif olarak bağlanmasında rol oynamaktadır. Bunun yanında kas dışı hücrelerde aktin filamentlerinin modulator ve stabilizator rolü olduğu bilinmekte ancak tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır (Wang ve Coluccio, 2010; Cooley ve Bergtrom, 2001). Çalışmamızda 3 ve 6 numaralı spotlar sırasıyla “Tropomyosin alpha-3 chain” ve “Tropomyosin alpha-4 chain” olarak tanımlanmıştır. TA-3 ekspresyonu yaşlı hücrelerde artış göstermiştir. Isı şoku etkisi ile genç ve yaşlı hücrelerde ekspresyonları baskılanırken ısı şoku sonrası geri kazanım prosesinde TA-3 ekspresyonlarında tekrar artış meydana gelmektedir. TA-4 ekspresyonları, ısı şoku sonrası genç hücrelerde değişim göstermezken yaşlı hücrelerde baskılanmıştır. Isı şoku sonrası geri kazanım prosesinde yaşlı hücrelerde TA-4 ekspresyonları artmıştır. Ara filamentler, aktin mikrofilyamentler ve mikrotübüle ek olarak hücre iskeletinin en önemli yapı bileşenlerinden biridir. Vimentin hücre hareketi, kemotaktik göçü, ve yara

iyileşmesi gibi bir çok önemli bir hücre fonksiyonları için gereklidir. Belirlenmiş olan vimentin modifikasyonlarının biyolojik etkisi, ara filament sistemin yapısal bozulmaları nedeni ile fibroblastların kasılma kapasitelerindeki kayıplarla ilişkilendirilmiştir. Bunun sonucunda yaşlanma prosesini hızlandırılmasında etkili olduğu güçlü bir şekilde kanıtlanmıştır (Kueper vd., 2007). Çalışmamızda, 9 numaralı spot vimentin olarak tanımlanmıştır. Genç hücrelerle karşılaştırıldığında yaşlı hücrelerde vimentin ekspresyonları artış göstermiştir. Isı şoku uygulanmış genç hücrelerde vimentin ekspresyonlarında bir değişim gözlemlenmezken, ısı şoku uygulanmış yaşlı hücrelerde aekspresyonu önemli derecede artmıştır. Bunun yanında ısı şoku sonrası kazanım prosesinde hem genç hemde yaşlı hücrelerde vimentin ekspresyonları önemli düzeyde artış göstermiştir.

Elde edilen sonuçlar ve HSP70'in özellikle proteoliz, proteazomal degradasyon ve protein akümüasyonu yönündeki önemli rolü çerçevesinde HSP70 inhibe edilerek ve susturularak kullandığımız ısı uygulaması modelinde proteoliz, protein agregasyonu ve proteazomal aktivitedeki rolü saptandı. HSP70'in varlığı durumunda proteoliz ve proteazomal degradasyonda azalma gözlenirken, susturma ve inhibisyonu ile proteolizde ve proteazomal degradasyonda artış olduğu saptandı. Bu noktada elde edilen bu ilginç sonuçlar, HSP70'in proteinlerin hasar sonrası tekrar katlanması ya da yıkılmasına karar aşamasında önemli bir protein olduğu kanıtlanmış oldu. Bu durumda, HSP70'in proteinleri yıkıma değil de tekrar katlanmaya götürdüğü düşünüldü. Bu proste de HSP70'in hangi koşaperona bağlandığı önemli olduğundan, HSP40 immüpresipitasyonu yapıldı. HSP40 presipite edilerek HSP70 bağlandığında ise hiçbir bant gözlenemedi ve HSP70'in HSP40'a bağlanmadığı saptandı.

Bu projede elde edilen sonuçların ısı şok proteinleri açısından literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Sonuçlarla bir adet makale yayınlanmış, iki adet daha araştırma makalesi hazırlık aşamasındadır. Ayrıca projede görevli olan bursiyerlerin isteği üzerine, proje kapsamında yer almayan kollajenin ayrıntılı katlanma mekanizması, HSP90'nın proteazom ve otofajideki ayrıntılı rolü ve kanser hücreleri ve sağlıklı hücrelerde HSP'lerin farklı etkileri gibi konularda daha ayrıntılı olan çalışmalar başlatılmıştır.

8. KAYNAKLAR

Andersson, M., Sjöstrand, J., Karlsson, J.O. 1999. "Differential inhibition of three peptidase activities of the proteasome in human lens epithelium by heat and oxidation", *Exp Eye Res*, 69(1),129-38.

Arawaka, S., Machiya, Y., Kato, T. 2010. "Heat shock proteins as suppressors of accumulation of toxic prefibrillar intermediates and misfolded proteins in neurodegenerative diseases", *Curr Pharm Biotechnol*, 11(2), 158-66.

Arrigo, A.P., Simon, S., Gibert, B., Kretz-Remy, C., Nivon, M., Czekalla, A., Guillet, D., Moulin, M., Diaz-Latoud, C., Vicart, P. 2007. "Hsp27 (HspB1) and alpha B-crystallin (HspB5) as therapeutic targets", *FEBS Lett*, 581(19), 3665-74.

Bukau, B., Weissman, J., Horwich, A. 2006. "Molecular chaperones and protein quality control", *Cell*, 125(3), 443-51.

Bulankina, A.V., Deggerich, A., Wenzel, D., Mutenda, K., Wittmann, J.G., Rudolph, M.G., Burger, K.N., Höning, S. 2009. "TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets" *J Cell Biol*, 185(4), 641-55.

Buss, H., Chan, T.P., Sluis, K.B., Domigan, N.M., Winterbourn, C.C. 1997. "Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method", *FreeRadic. Biol. Med.* 23, 361-366.

Calderwood, S.K. 2005. "Evolving connections between molecular chaperones and neuronal function" *Int J Hyperthermia*, 21(5), 375–8.

Catalgol, B., Grune, T. 2009. "Protein pool maintenance during oxidative stress", *Curr Pharm Des*, 15(26), 3043-51.

Catalgol, B., Grune, T. 2009. "Turnover of oxidatively modified proteins: the usage of in vitro and metabolic labeling" *Free Radic Biol Med*, 46(1), 8-13.

Catalgol, B., Ziaja, I., Breusing, N., Jung, T., Höhn, A., Alpertunga, B., Schroeder, P., Chondrogianni, N., Gonos, E.S., Petropoulos, I., Friguet, B., Klotz, L.O., Krutmann, J., Grune, T. 2009. "The proteasome is an integral part of solar ultraviolet a radiation-induced gene expression", *J Biol Chem*, 284(44), 30076-86.

Ciocca, D.R., Calderwood, S.K. 2005. "Heatshock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications", *Cell Stress Chaperones*, 10(2), 86-103.

Conconi, M., Szveda, L.I., Levine, R.L., Stadtman, E.R., Friguet, B. 1996. "Age-related decline of rat liver multicatalytic proteinase activity and protection from oxidative inactivation by heat-shock protein 90", *Arch Biochem Biophys*, 331(2), 232-40.

Cooley, B.C., Bergtrom, G. 2001. "Multiple combinations of alternatively spliced exons in rat tropomyosin-alpha gene mRNA: evidence for 20 new isoforms in adult tissues and cultured cells" *Arch Biochem Biophys*, 390(1), 71-7.

Deguchi, Y., Negoro, S., Kishimoto, S. 1988. "Age-related changes of heat shock protein gene transcription in human peripheral blood mononuclear cells" *Biochem Biophys Res Commun*, 157(2), 580-4.

Doyle, S.M., Genest, O., Wickner, S. 2013. "Protein rescue from aggregates by powerful molecular chaperone machines", *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 14(10): 617-29.

Dreiza, C.M., Komalavilas, P., Furnish, E.J., Flynn, C.R., Sheller, M.R., Smoke, C.C., Lopes, L.B., Brophy, C.M. 2010. "The small heat shock protein, HSPB6, in muscle function and disease", *Cell Stress Chaperones*, 15(1), 1-11.

Effros, R.B., Zhu, X., Walford, R.L. 1994. "Stress response of senescent T lymphocytes: reduced hsp70 is independent of the proliferative block" *J Gerontol*, 49(2), B65-70.

Evans, C.G., Chang, L., Gestwicki, J.E. 2010. "Heat shock protein 70 (hsp70) as an emerging drug target" *J Med Chem*, 53, 4585-602.

Faassen, A.E., O'Leary, J.J., Rodysill, K.J., Bergh, N., Hallgren, H.M. 1989. "Diminished heat-shock protein synthesis following mitogen stimulation of lymphocytes from aged donors", *Exp Cell Res*, 183(2), 326-34.

Fargnoli, J., Kunisada, T., Fornace, A.J. Jr., Schneider, E.L., Holbrook, N.J. 1990. "Decreased expression of heat shock protein 70 mRNA and protein after heat treatment in cells of aged rats", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(2), 846-50.

Ferreira, M.B., Carlos, A.G. 2002. "Heat-shock proteins and atherosclerosis", *Allerg Immunol*, 34(6), 204-7.

Fink, A.L. 1998. "Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid" *Fold Des*, 3(1), R9-23.

Freeman, B.C., Michels, A., Song, J., Kampinga, H.H., Morimoto, R.I. 2000. "Analysis of molecular chaperone activities using in vitro and in vivo approaches" *Methods Mol Biol*, 99, 393-419.

Garrido, C., Gurbuxani, S., Ravagnan, L., Kroemer, G. 2001. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, 286(3), 433-42.

Ghayour-Mobarhan, M., Rahsepar, A.A., Tavallaie, S., Rahsepar, S., Ferns, G.A. 2009. "The potential role of heat shock proteins in cardiovascular disease: evidence from in vitro and in vivo studies", *Adv Clin Chem*, 48, 27-72.

Gold, L.I., Rahman, M., Blechman, K.M., Greives, M.R., Churgin, S., Michaels, J., Callaghan, M.J., Cardwell, N.L., Pollins, A.C., Michalak, M., Siebert, J.W., Levine, J.P., Gurtner, G.C., Nanney, L.B., Galiano, R.D., Cadacio, C.L. 2006. "Overview of the role for calreticulin in the enhancement of wound healing through multiple biological effects" *J Invest Dermatol Symp Proc*, 11(1), 57-65.

Grune, T., Catalgol, B., Licht, A., Ermak, G., Pickering, A.M., Ngoet, J.K. 2011. "HSP70 mediates dissociation and reassociation of the 26S proteasome during adaptation to oxidative stress" *Free Radic Biol Med*, 51(7), 1355–64.

Grune, T., Reinheckel, T., Davies, K.J. 1997. "Degradation of oxidized proteins in mammalian cells" *FASEB J*, 11(7), 526–34.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2007. "Measurement of reactive species. *Free Radicals in Biology and Medicine*", New York, Oxford University Press, Pp: 268.

Harman, D. 1956. "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry", *J. Gerontol.* 11, 298–300.

Heydari, A.R., Conrad, C.C., Richardson, A. 1995. "Expression of heat shock genes in hepatocytes is affected by age and food restriction in rats", *J Nutr*, 125(3), 410-8.

Ho, S., Marçal, H., Foster, L.J. 2014. "Towards scarless wound healing: a comparison of protein expression between human, adult and foetal fibroblasts" *Biomed Res Int*.

Hook D.W., Harding, J.J. 1997. "Molecular chaperones protect catalase against thermal stress", *Eur J Biochem*, 247(1), 380-5.

Jung, T., Catalgol, B., Grune, T. 2009. "The proteasomal system", *Mol Aspects Med*, 30(4), 191-296.

Jung, T., Höhn, A., Catalgol, B., Grune, T. 2009. "Age-related differences in oxidative protein-damage in young and senescent fibroblasts", *Arch Biochem Biophys*, 483(1), 127-35.

Kastle, M., Grune, T. 2012. "Interactions of the proteasomal system with chaperones: protein triage and protein quality control", *Prog Mol Biol Transl Sci*, 109, 113-60.

Kim, G., Meriin, A.B., Gabai, V.L., Christians, E., Benjamin, I., Wilson, A., Wolozin, B., Sherman, M.Y. 2012. "The heat shock transcription factor Hsf1 is downregulated in DNA damage-associated senescence, contributing to the maintenance of senescence phenotype", *Aging Cell*, 11(4):617-27.

Koren, J., Jinwal, U.K., Lee, D.C., Jones, J.R., Shults, C.L., Johnson, A.G., Anderson, L.J., Dickey, C.A. 2009. "Chaperone signalling complexes in Alzheimer's disease", *J Cell Mol Med*, 13(4), 619-30.

- Kueper, T., Grune, T., Prah, S., Lenz, H., Welge, V., Biernoth, T., Vogt, Y., Muhr, G.M., Gaemlich, A., Jung, T., Boemke, G., Elsässer, H.P., Wittern, K.P., Wenck, H., Stäb, F., Blatt, T. 2007. "Vimentin is the specific target in skin glycation. Structural prerequisites, functional consequences, and role in skin aging" *J Biol Chem*, 282(32):23427-36.
- Lanneau, D., Wettstein, G., Bonniaud, P., Garrido, C. 2010. "Heat shock proteins: cell protection through protein triage" *Scientific World Journal*, 10, 1543-52.
- Lee, Y.K., Manalo, D., Liu, A.Y. 1996. "Heat shock response, heat shock transcription factor and cell aging", *Biol Signals*, 5(3),180-91.
- Li, Z., Srivastava, P. 2004. "Heat-shock proteins", *Curr Protoc Immunol*, Appendix 1, Appendix 1T.
- Lindquist, S., Craig, E.A. 1988. "The heat-shock proteins" *Annu Rev Genet*, 22, 631–77.
- Liu, A.Y., Bae-Lee, M.S., Choi, H.S., Li, B.S. 1989. "Heat shock induction of HSP 89 is regulated in cellular aging", *Biochem Biophys Res Commun*, 162(3), 1302-10.
- Liu, A.Y., Lin, Z., Choi, H.S., Sorhage, F., Li, B. 1989. "Attenuated induction of heat shock gene expression in aging diploid fibroblasts" *J Biol Chem*, 264(20), 12037–4.
- Luce, M.C., Cristofalo, V.J. 1992. "Reduction in heat shock gene expression correlates with increased thermosensitivity in senescent human fibroblasts" *Exp Cell Res* Sep, 202(1), 9–16.
- Manning-Krieg, U.C., Scherer, P.E., Schatz, G. 1991. "Sequential action of mitochondrial chaperones in protein import into the matrix" *EMBO J*, 10, 3273-80.
- Matsubara, L.S., Machado, P.E. 1991. Age-related changes of glutathione content, glutathione reductase and glutathione peroxidase activity of human erythrocytes" *Braz J Med Biol Res*, 24(5), 449–54.
- Mayer, M.P., Bukau, B. 2005. "Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism" *Cell Mol Life Sci*, 62(6), 670–84.
- Mehlase, J., Grune, T. 2002. "Proteolytic response to oxidative stress in mammalian cells", *Biol Chem*, 383, 559-567.
- Muramatsu, T., Hatoko, M., Tada, H., Shirai, T., Ohnishi, T. 1996. "Age-related decrease in the inductability of heat shock protein 72 in normal human skin" *Br J Dermatol*, 134(6), 1035–8.
- Murshid, A., Eguchi, T., Calderwood, S.K. 2013. "Stress proteins in aging and life span", *Int J Hyperthermia*, 29(5):442-7.
- Niforou, K., Cheimonidou, C., Trougakos, I.P. 2014. "Molecular chaperones and proteostasis regulation during redox imbalance", *Redox Biology* 2 , 323–332.

Ostermann, J., Horwich, A.L., Neupert, W., Hartl, F.U. 1989. "Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis" *Nature*, 341, 125-30.

Ott, C., Grune, T. 2014. "Protein oxidation and proteolytic signalling in aging", *Curr Pharm Des*, 20(18), 3040-51.

Pahlavani, M.A., Harris, M.D., Moore, S.A., Richardson, A. 1996. "Expression of heat shock protein 70 in rat spleen lymphocytes is affected by age but not by food restriction", *J Nutr*, 126(9), 2069-75.

Pahlavani, M.A., Harris, M.D., Moore, S.A., Weindruch, R., Richardson, A. 1995. The expression of heat shock protein 70 decreases with age in lymphocytes from rats and rhesus monkeys. *Exp Cell Res*, 218(1), 310–8.

Parcellier, A., Brunet, M., Schmitt, E., Col, E., Didelot, C., Hammann, A. 2006. "HSP27 favors ubiquitination and proteasomal degradation of p27Kip1 and helps S-phase re-entry in stressed cells" *FASEB J*, 20,1179-81.

Rattan, S.I. 1998. "Repeated mild heat shock delays ageing in cultured human skin fibroblasts", *Biochem Mol Biol Int*, 45(4), 753-9.

Rattan, S.I. 2004. "Mechanisms of hormesis through mild heat stress on human cells" *Ann N Y Acad Sci*, 1019, 554-8.

Rea, I.M., McNerlan, S., Pockley, A.G., 2001. "Serum heat shock protein and anti-heat shock protein antibody levels in aging", *Exp Gerontol*, 36(2), 341-52.

Reinheckel, T., Sitte, N., Ullrich, O., Kuckelkorn, U., Davies, K.J., Grune, T. 1998. "Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress", *Biochem J*, 335, 637-42.

Satoh, M., Hirayoshi, K., Yokota, S., Hosokawa, N., Nagata, K. 1996. "Intracellular interaction of collagen-specific stress protein HSP47 with newly synthesized procollagen" *J Cell Biol*, 133(2), 469-83.

Sosnowska, D., Richardson, C., Sonntag, W.E., Csiszar, A., Ungvari, Z., Ridgway, I.A. 2013. "Heart That Beats for 500 Years: Age-Related Changes in Cardiac Proteasome Activity, Oxidative Protein Damage and Expression of Heat Shock Proteins, Inflammatory Factors, and Mitochondrial Complexes in *Arctica islandica*, the Longest-Living Noncolonial Animal", *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*.

Summers, D.W., Douglas, P.M., Ramos, C.H., Cyr, D.M. 2009. "Polypeptide transfer from Hsp40 to Hsp70 molecular chaperones" *Trends Biochem Sci*, 34, 230-3.

Verbeke, P., Clark, B.F., Rattan, S.I. 2000. "Modulating cellular aging in vitro: hormetic effects of repeated mild heat stress on protein oxidation and glycation", *Exp Gerontol*, 35(6-7),787-94.

Verbeke, P., Deries, M., Clark, B.F., Rattan, S.I. 2002. "Hormetic action of mild heat stress decreases the inducibility of protein oxidation and glycoxidation in human fibroblasts", *Biogerontology*, 3(1-2), 117-20.

Wang, C.L., Coluccio, L.M. 2010. "New insights into the regulation of the actin cytoskeleton by tropomyosin" *Int Rev Cell Mol Biol*, 281, 91-128.

Witt, S.N. 2010. "Hsp70 molecular chaperones and Parkinson's disease", *Biopolymers*, 93(3), 218-28.