

RAPORT ANUAL DE ACTIVITATE 2011

PROIECT TE_127

IMAGISTICA BAZATA PE NANOPARTICULE DE SILICIU FLUORESCENTE - EVALUAREA TOXICITATII TISULARE DATORATE BIOACUMULARII IN VIVO PRIN ABORDARI BIOCHIMICE SI MOLECULARE

INTRODUCERE

Proteinele de soc termic (Hsp).

O serie de studii sugereaza faptul ca proteinele care se ataseaza de nanoparticule pot prezenta o distributie si functie alterata. Alterarea proceselor de pliere și degradare a proteinelor sintetizate la nivel celular pot duce la instalarea unor patologii deosebit de grave. Importanta proteinelor de soc termic in procesul de pliere al proteinelor se reflecta in faptul ca o serie de gene de soc termic sunt exprimate la un nivel ridicat in timpul dezvoltarii celulare.

Funcțiile proteinelor de soc termic afectează diverse aspecte ale fiziologiei pestelui, respectiv dezvoltarea și imbatranirea, fiziologia stresului și endocrinologia, imunologia, fiziologia ambientală, toleranța la stres și aclimatizarea (Basu et al., 2003). Anumite forme de factori de stres ambientali pot induce răspunsul proteinelor Hsp la peste. Astfel, creșterea expresiei proteinelor Hsp a fost pusă în evidență în țesuturi de pești expuși la efluenți industriali, hidrocarburi aromatice policiclice (Vijayan et al., 1998), diferite metale precum cupru, zinc și mercur (Sanders, 1993; Williams et al., 1996), pesticide (Hassanein et al., 1999) și arsenit (Grosvik and Goksoy, 1996). Răspunsul proteinelor Hsp poate varia în funcție de tipul de țesut (Smith et al., 1999; Rabergh et al., 2000), în funcție de familia de proteine Hsp (Smith et al., 1999) și în funcție de factorii de stres (Airaksinen et al., 2003; Iwama et al., 1998) și de asemenea sensibilitatea expresiei proteinelor Hsp poate varia în funcție de specie (Basu et al., 2002; Nakano and Iwama, 2002), stadiu de dezvoltare (Lele et al., 1997; Santacruz et al., 1997; Martin et al., 2001), și sezon (Fader et al., 1999).

Metaloproteinazele matriceale (MMPs) sunt proteinaze neutre sau alcaline dependente de calciu și zinc care au specificitate pentru componentele matricei extracelulare cum sunt colagenul și proteoglicanii. Aceste enzime sunt esențiale în turn-over-ul patologic al matricei extracelulare. S-a sugerat că degradarea proteolitică a matricei extracelulare este implicată în deteriorarea țesutului muscular post mortem. Aceste enzime sunt capabile să degradeze tipuri diferite de proteine extracelulare și să proceseze molecule bioactive. Anumii factori poluanți din mediu modulează activitatea metaloproteinazelor matriceale. MMPs sunt o familie de endopeptidaze calciu-dependente, ce conțin zinc, care sunt înrudite structural și funcțional. Ele sunt sintetizate ca zimogene sau pro-MMPs. Acestea necesită o etapă de activare înainte de a fi capabile să cliveze componentele matricei extracelulare (ECM). [Bode și Maskos, 2003].

MATERIALE ȘI METODE

Studiile de expresie genică. Peștii luați în studiu, din specia *Carassius sp.* au avut greutate de 90 ± 10 g și o lungime standard de 13 ± 2 cm și au fost aclimatizați la condițiile de laborator timp de 3 săptămâni înainte de începerea propriu-zisă a experimentului. Valorile medii ale indicilor de calitate ai apei au fost: temperatura 19 ± 2 °C, pH 7.4 ± 0.05 , oxigen dizolvat 6 ± 0.2 mg/L (aerare constantă) și taria apei CaCO_3 175 mg/L. Peștii au fost hrăniți pe perioada de dinaintea începerii experimentului cu granule în cantitate de 1% din greutatea corporală. Pe toată durata experimentului peștii nu au fost hrăniți. Pentru studiile de expresie genică peștii au fost injectați intraperitoneal cu o doză de 2mg de QD de Si/SiO₂ per kg/corp. Sacrificările s-au făcut după 7, 14 și 21 de zile după injectarea cu suspensia de QD. Pentru fiecare interval studiat, au existat câte un lot de martori neinjectați (n=3) și un lot de martori injectați cu NaCl 0,7% (n=3) și un lot de pești injectați cu QD (n=5). După sacrificare, țesuturile de interes pentru studiile de expresie genică (țesut muscular, hepatic și renal) au fost introduse direct în soluția de ARN Later (în raport de 1:10 țesut/ARN Later) și pastrate la -80°C pentru prelucrări ulterioare. Din

tesaturile astfel conservate s-a extras ARN total. Acesta a fost revers-transcris în ADNc cu care s-au realizat reacții PCR în vederea cuantificării expresiei genice.

Obținerea lizatelor tisulare totale și dozarea proteinelor. Tesaturile înghețate au fost dezghețate pe gheața și au fost omogenizate cu un omogenizator Potter-Elvehjem în soluție tampon Tris-EDTA 0.1 M, pH 7.4, la un raport de extracție de 1g/10ml. Apoi au fost centrifugate la 8,000xg pentru 30 minute la 4°C. Proteinele din extractele tisulare au fost determinate atât prin metodele Lowry [Lowry, 1951] și Bradford [Bradford, 1976].

Gelatin zimografia a fost folosită pentru detectarea gelatinazelor MMP-2 și MMP-9. Extractele proteice totale obținute au fost supuse electroforezei SDS-PAGE în gel de migrare de PAA 7,5% ce conține gelatina 0,1% sau 0,2%, la 90V, timp de 1,5 h. Concentrația proteinei a fost de 20-25 μg/godeu. MMPs separate în gel după masa lor moleculară, au fost activate în tampon Tris-HCl 0,05 M și CaCl₂ 0.013 M timp de 2h, la 37°C. Vizualizarea plăjilor de liza aparute datorită degradării gelatinei de către MMP se face prin colorarea cu Coomassie Blue, care evidențiază proteinele.

Extracția ARN total. Probele de țesut pastrate în RNA Later sunt dezghețate, și reactivul este îndepărtat. ARN total a fost extras cu un kit TRI Reagent (Sigma) (Chomczynski și Sacchi, 1987; Chomczynski, 1993). Din faza apoasă, ARN a fost precipitat cu izopropanol, spălat cu etanol și reluat în apă sau tampon Tris-HCl.

Reacția de revers-transcriere (RT). Pentru reacția de transcripție inversă s-a folosit ARN total și iScript revers transcriptaza (Bio-Rad). Pentru inițierea reacției este necesară prezența primerilor, ce pot fi secvențe aleatoare de șase nucleotide (*random hexameres*) ce se leagă întâmplător pe catena ARN matrice sau secvențe oligo (dT)₁₅₋₂₀ ce recunosc capetele 3' poli A ale ARNm.

Cuantificarea relativă a expresiei genice prin Real-time PCR Reacțiile s-au realizat pe un termocycler iCycler iQ (Bio-Rad) folosind un set de filtre de excitație/emisie specific pentru SYBR Green (490 nm λ_{exc} /530 nm λ_{em}). **Reactivi utilizați:** *IQ SYBR Green Supermix 2X* (Bio-Rad): 100mM KCl, 40mM Tris-HCl pH 8,4, nucleotide dATP, dCTP, dGTP, dTTP 0,4 mM fiecare, iTaq DNA polimeraza 50U/ml, 6mM MgCl₂, SZBR Green I, fluoresceina 20nM, stabilizatori. Primerii de amplificare au fost desemnați cu ajutorul programului *Beacon Designer (Premier Biosoft)* folosind secvențele de referință publicate în GenBank (Tabel 1).

Tabel 1. Primeri utilizați în reacțiile PCR. Dimensiunile fragmentelor amplificate sunt date în perechi de baze (pb).

Secvența ținta	Secvența Primer	Fragment amplificat (pb)	Temperatura de hibridizare
Primeri gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza	LEFT gatacacggagcaccaggtt RIGHT gccatcaggtcacatacacg	163	55.5
Primeri Hsp60	LEFT agaagcgcgtcaatgagatt RIGHT agcgcagtaaagcacatcct	237	54.5
Primeri Hsp90ab1	LEFT gagagcaaagaccaggttgc RIGHT tccagaccctctttgtgac	161	55.5

Modul de lucru. Din probele de ADNc rezultate în urma reacțiilor de revers transcriere s-au realizat diluții până la concentrațiile dorite de ADN, în volum final de 5 μl, în apă *MilliQ*. S-a realizat un amestec de reacție PCR, conținând, pentru fiecare probă, următorii reactivi (concentrații finale/reacție): amestec iQ SYBR Green Supermix 1x; primeri 400nM fiecare; H₂O *MilliQ* până la volum final de 20 μl. Câte 20 μl din acest amestec s-au distribuit în probele de 5 μl de ADNc. Acestea au fost incubate în *termocycler* (iCycler iQ)), cu următorul program general de amplificare: i) denaturare inițială – 95°C, 8min; ii) 45 cicluri de amplificare: denaturare - 30 sec. 95°C, hibridizare - 30 sec. 54°C, elongare și achiziția semnalului fluorescent – 30 sec 72°C; iii) program de determinare a curbei de topire: 80 de cicluri a 10 sec. fiecare, cu variația crescătoare din 0.5° în 0.5°C a temperaturii pornind de la de la 55° C.

REZULTATE SI DISCUTII

Gelatin zimografia. Tesaturile luate in studiu au fost cel renal, hepatic, tesutul muscular rosu si tesutul muscular alb. Protocolul a fost optimizat pentru fiecare tip de tesut in parte.

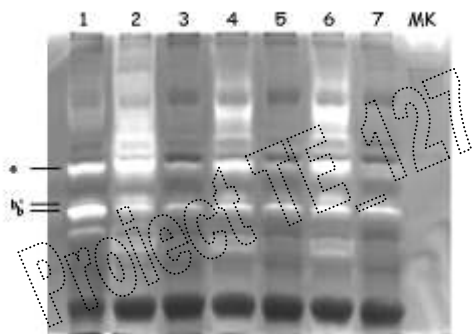


Figura 4. Gelatin zimograma pentru tesutul muscular alb, la 1, 3 si 7 zile dupa injectare. 20 µg proteina per godeu, gelatina 0,2%. Incubare la 37 °C peste noapte. 1 – martor neinjectat 1 zi, 2 – martor injectat 1 zi, 3 – individ experimental 1 zi, 4 – martor injectat cu NaCl 0.7% 3 zile, 5 – individ experimental 3 zile, 6 – martor injectat 7 zile, 7 – proba 7 zile, MK – marker de masa moleculara. a – MMP9, b’ – pro-MMP 2, b – MMP 9.

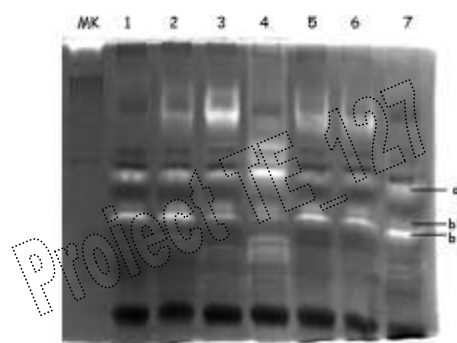


Figura 5. Gelatin zimografie pentru tesutul muscular alb, la 1 saptamana dupa injectare. 20 µg proteina per godeu, gelatina 0,2%. Incubare la 37 °C peste noapte. MK – marker de masa moleculara; 1,2 – Martori neinjectati; 3,4 – Martori injectati cu NaCl; 5,6,7 – indivizi injectati cu QD. a – MMP9, b’ – pro-MMP 2, b – MMP 9

In cazul tesutului muscular alb au fost realizate zimografiile atat pentru investigarea efectelor pe termen mediu (intervalele de interes au fost 1, 3 si 7 zile – figura 4) cat si pe termen lung (intervale de interes 7, 14 si 21 de zile – figurile 5, 6 si respectiv 7).

Pe termen mediu a fost pusa in evidenta o diminuare dependenta de timp a activitatii pro-MMP9. La nivelul MMP2 modificarile au fost mai subtile, si s-au referit in mod special la forma pro-MMP2 (figura 4). Pe termen lung, este observata de asemenea o diminuare a activitatii ambelor metaloproteinaze, pana la o disparitie aproape completa la 21 de zile dupa injectare (figura 7). Diminuarea activitatii MMP inca de la cele mai timpurii intervale de studiu poate constitui un raspuns initial la stress oxidativ, care este mentinut pe o perioada indelungata.

Evolutia activitatii metaloproteinazelor a fost urmatita pentru tesaturile renal, muscular rosu si hepatic pe intervalele 1, 3 si 7 zile dupa injectarea cu QD. In cazul tesutului renal au fost indentificate in special plajele de liza corespunzatoare pro-MMP 2 si MMP2, insa nu s-au observat variatii semnificative ale activitatii. In tesutul muscular rosu sunt foarte evidente activitatile gelatinolitice ale pro-MMP 2 si respectiv pro-MMP9, spre deosebire de formele enzimatiche, care nu apar la toti indivizii. Formele pro-enzimatiche nu sufera modificari importante la nici un interval studiat in tesutul muscular rosu. In cazul tesutului hepatic, cea mai puternica activitate proteinazica apartine MMP9, insa plajele de liza corespunzatoare acestei enzime nu apar consecvent la toti indivizii, fiind in acest caz necesare investigatii suplimentare.



Figura 6. Gelatin zimografia pentru tesutul muscular alb, la 2 saptamani dupa injectare. 20 μ g proteina per godeu, gelatina 0,2%. Incubare la 37 $^{\circ}$ C peste noapte. 1,2 – Martori neinjectati ; 3,4,5 – martori injectati cu NaCl, 5, 6, 7, 8, 9, 10 – indivizi injectati cu QD. a – MMP9, b' – pro-MMP 2, b – MMP 9

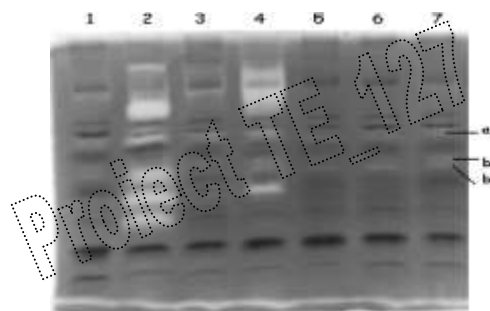


Figura 7. Gelatin zimografia pentru tesutul muscular alb, la 3 saptamani dupa injectare. 20 μ g proteina per godeu, gelatina 0,2%. Incubare la 37 $^{\circ}$ C peste noapte. 1,2 – Martori neinjectati ; 3,4 – martori injectati cu NaCl, 5, 6, 7 – indivizi injectati cu QD. a – MMP9, b' – pro-MMP 2, b – MMP 9a – MM2, b' – pro-MMP 9, b – MMP 9.

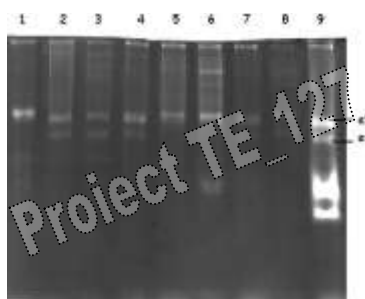


Figura 8. Gelatin zimografia pentru tesutul renal la 1, 3 si 7 zile dupa injectare. 20 μ g proteina per godeu, gelatina 0,2%. Incubare la 37 $^{\circ}$ C, 2h. 1, 4, 7 - martori injectati cu NaCl pentru intervalul 1, 3 si 7 zile ; 2, 3 – probe la 1 zi dupa injectare ; 5,6 –probe la 3 zile dupa injectare ; 8,9 –probe la 7 zile dupa injectare. a' – pro-MMP9 ; a – MMP9



Figura 9. Gelatin zimografia pentru tesutul muscular rosu la 1, 3 si 7 zile dupa injectare. 20 μ g proteina per godeu, gelatina 0,2%. Incubare la 37 $^{\circ}$ C, peste noapte. 1, 4, 7 - martori injectati cu NaCl pentru intervalul 1, 3 si 7 zile ; 2, 3 – probe la 1 zi dupa injectare ; 5,6 – probe la 3 zile dupa injectare ; 8,9 –probe la 7 zile dupa injectare. a' – pro-MMP2 ; a – pro-MMP9, a' – MMP9, b' – pro-MMP 2, b – MMP 2

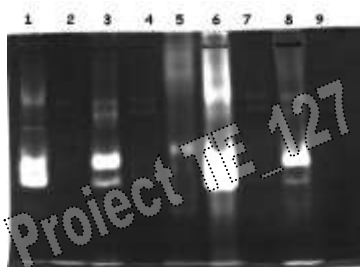


Figura 10. Gelatin zimografia pentru tesutul hepatic la 1, 3 si 7 zile dupa injectare. 20 μ g proteina per godeu, gelatina 0,2%. Incubare la 37 $^{\circ}$ C, 2h. 1, 4, 7 - martori injectati cu NaCl pentru intervalul 1, 3 si 7 zile ; 2, 3 – probe la 1 zi dupa injectare ; 5,6 –probe la 3 zile dupa injectare ; 8,9 –probe la 7 zile dupa injectare.

Studiile de expresie genica Graficele obtinute dupa prelucrarea datelor descriu doua situatii diferite in tesuturile analizate. In ficat si rinichi expresia HSP 90 este mult diminuata, in special in primul interval studiat (7 zile dupa injectare) (figurile 11 si 13). In ambele cazuri diferenta este foarte semnificativa statistic ($p \leq 0.01$). Dupa 14 zile de la injectarea QD expresia ARN m pentru HSP90 este mai apropiata de valoarea control, pentru ca la 21 de zile dupa injectare sa nu mai fie observabile diferentele intre indivizii expusi si cei martor. De regula, in cazul aparitiei unui stimul stresant (de exemplu stres oxidativ) au fost inregistrate crestere ale expresiei ARNm pentru HSPs, inclusiv ale celui pentru HSP90. Aceasta proteina chaperon este implicata in degradarea proteinelor ubiquitinate in cadrul proteasomului, dar are in acelasi timp un efect anti-apoptotic. HSP 90 este un reglator negativ al caiei apoptotice mitocondriale, ea actionand prin complexarea la nivel citosolic a Apaf-1 care inhiba formarea apoptozomului activ. Supraexpresia HSP 90 in cazul stresului oxidativ este asadar un raspuns adaptativ, cu rezultate benefice pentru celula. Astfel, chiar dacă la primele două intervale, nivelul ARNm pentru Hsp90 a scăzut comparativ cu cel al martorului, la 21 de zile dupa injectare este evidenta o revenire la normal a expresiei ARNm pentru HSP90, ceea ce indica adaptarea tesuturilor studiate si a organismului pestilor la prezenta QDs.

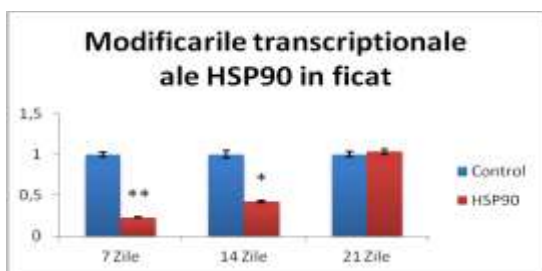


Figura 11. Modificarile transcriptionale ale genei HSP90.

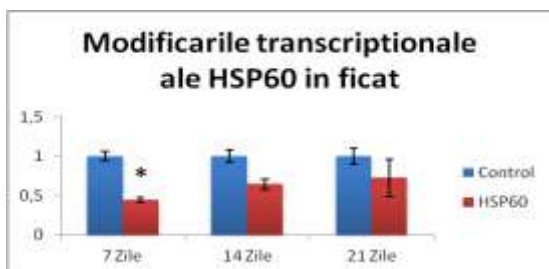


Figura 12. Modificarile transcriptionale ale genei HSP60.

In cazul expresiei HSP 60, tesutul renal si cel hepatic au raspunsuri diferite. Cresterea expresiei ARNm pentru Hsp 60 in rinichi observata dupa 7 zile este semnificativa, si indica un raspuns adaptativ foarte puternic la acumularea QD in acest tesut. Supraexpresia Hsp 60 in rinichi asigura protectia si desfasurarea proceselor celulare normale la acest nivel. La ultimul interval luat in studiu, nivelul de expresie al ARNm pentru Hsp 60 revine la cel al martorului, sugerand ca dupa 21 de zile de la injectarea QD, efectele induse de catre acestea se sting (figura 14).

In ficat, la primul interval studiat am observat o diminuare a expresiei ARNm pentru Hsp 60, ceea ce sugereaza ca tesutul hepatic este mai puternic afectat de prezenta QD (figura 12). Totusi, la urmatoarele intervale a fost inregistrata o crestere a expresiei ARNm pentru Hsp 60, pana la un nivel apropiat de cel al martorului. In mod similar cu modificarile observate in rinichi, tesutul hepatic, desi mai afectat, se adapteaza la efectele induse de QD.

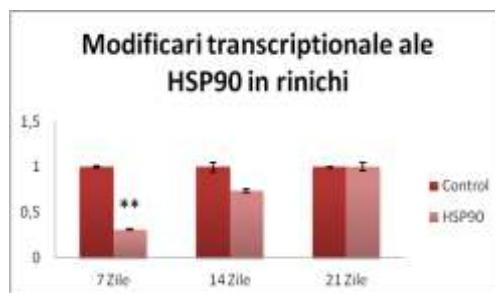


Figura 13. Modificarile transcriptionale ale genei HSP 90 in tesutul renal.



Figura 14. Modificarile transcriptionale ale genei HSP 60 in rinichi.

Expresia genica a Hsp27 si Hsp70 a ramas nemodificata in ambele tesuturi studiate, pentru toate intervalele de tratament. Aceste observatii sustin ipoteza ca QD de Si/SiO₂ au un potential promitator pentru utilizarea in studiile de imagistica *in vivo*, efectele lor negative asupra tesuturilor unde se acumuleaza preferential fiind moderate si nepersistente pe termen lung.

BIBLIOGRAFIE

- Airaksinen, S., Rabergh, C.M.I., Lahti, A., Kaatrasalo, A., Sistonen, L. and Nikinmaa, M. 2003. Stressordependent regulation of the heat shock response in zebrafish, *Danio rerio*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 134: 839-846.
- Amălinei Cornelia, Căruntu Irina Draga, Bălan Raluca Anca- *Biology of metalloproteinases*, *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 2007, 48(4):323–334
- Bansal, H., Bansal, S., Rao, M., Foley, K. P., Sang, J., Proia, D. A., Blackman, R. K., Ying, W., Barsoum, J., Baer, M. R. et al. (2010). Heat shock protein 90 regulates the expression of Wilms tumor 1 protein in myeloid leukemias. *Blood* 116, 4591-4599.
- Basu, N., Kennedy, C.J. and Iwama, G.K. 2003. The effects of stress on the association between Hsp70 and the glucocorticoid receptor in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 134: 655-663.
- Basu, N., Todgham, A.E., Ackerman, P.A., Bibeau, M.R., Nakano, K., Schulte, P.M. and Iwama, G.K. 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene*, 295: 173-183.
- Bode, W., Maskos, K., Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases, *Biological Chemistry*, 2003, 384, 863-872
- Bruner-Tran K. L., Eisenberg E., Yeaman G. R., Anderson T. A., McBEAN J., Osteen K. G., Steroid and cytokine regulation of matrix metalloproteinase expression in endometriosis and the establishment of experimental endometriosis in nude mice, *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(10):4782–4791.
- Buchner, J., Bose, S., Mayr, C., and Jakob, U. (1998). Purification and characterization of prokaryotic and eukaryotic Hsp90. *Methods Enzymol.* 290, 409-418.
- Carver, L. A., Jackiw, V. and Bradfield, C. A. (1994). The 90-kDa heat shock protein is essential for Ah receptor signaling in a yeast expression system. *J.Biol. Chem.* 269, 30109-30112.
- Chomczynski P., *Biotechniques*, 15, 532, 1993
- Chomczynski P., Sacchi N., *Anal. Biochem.*, 162, 156, 1987
- Chung H. W., Lee J. Y., Moon H. S., Hur S. E., Park M. H., Wen Y., Polan M. L., Matrix metalloproteinase-2, membranous type 1 matrix metalloproteinase, and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in ectopic and eutopic endometrium, 2002, 78(4):787–795.
- Curry T. E., Osteen Jr. K. G., The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle, *Endocr Rev*, 2003, 24(4):428–465.
- Ellis, R.J. and S.M. Vander Vies, 1991. Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.*, 60: 321-347.
- Fader, S.C., Yu, Z. and Spotila, J.R. 1999. Seasonal variation in Hsps (Hsp70) in stream fish under natural conditions. *Journal of Thermal Biology*, 19: 335-341.
- Folgueras A. R., Pendás A. M., Sánchez L. M., López-Otín C., Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies, *Int J Dev Biol*, 2004, 48(5–6):411–424.
- Fontaine, J.M., Rest, J.S., Welsh, M.J. and Benndorf, R. 2003. The sperm outer dense fiber protein is the 10th member of the superfamily of mammalian small stress proteins, *Cell Stress Chaperones*, 8: 62– 69.
- Franck, E., Madsen, O., van Rheede, T., Ricard, G., Huynen, M.A. and deJong, W.W. 2004. Evolutionary diversity of vertebrate small heat shock proteins. *Journal of Molecular Evolution*, 59: 792-805.
- Grosvik, B.E. and Goksoy, A. 1996. Biomarker protein expression in primary cultures of salmon (*Salmosalar*) hepatocytes exposed to environmental pollutants. *Biomarkers*, 1: 45-53.

- Hashizume K., Analysis of utero-placental-specific molecules and their functions during implantation and placentation in the bovine, *J Reprod Dev*, 2007, 53(1):1–11.
- Hassanein, H.M.A., Banhaway, M.A., Soliman, F.M., Abdel-Rehim, S.A., Muller, W.E.G. and Schroder, H.C.1999. Induction of Hsp70 by the herbicide oxyfluore in the Egyptian Nile fish, *Oreochromis niloticus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37: 78-84.
- Hightower, L. E., Sadis, S. E. and Takenaka, I. O. 1994. Interactions of vertebrate hsc70 and hsp70 with unfolded proteins and peptides. R.I. Morimoto, A. Tissieres and C. Georgopoulos (Eds.). *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: 109–208.pp.
- Hightower, L.E., Norris, C.E., Dilorio, P.J. and Fielding, E.1999. Heat shock responses of closely related species of tropical and desert fish. *American Zoologist*, 39:877-888.
- Iwama, G.K., P.T. Thomas, R.B. Forsyth and M.M. Vijayan, 1998. Heat shock proteins expression in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 8: 35-56
- Kappe, G., Franck, E., Verschuure, P., Boelens, W.C.Leunissen, J.A. and de Jong, W.W. 2003. The human genome encodes 10 alpha-crystallin-related small heat shock proteins: HspB1-10. *Cell Stress & Chaperones*,8: 53-61.
- L.Vargas-Parada , C. F. Solís and J. P. Lacleste, Heat shock and stress response of *Taenia solium* and *T. crassiceps* (Cestoda), *Parasitology* (2001), 122 : pp 583-588.
- Lele, Z., Engel, S. and Krone, P.H. 1997. Hsp47 and Hsp70 gene expression is differentially regulated in a stressandtissue specific manner in zebrafish embryos.*Developmental Genetics*, 21: 123-133.
- Liota, L.A and W.G. Stetler-Stevenson (1990) *Cancer Biology*,1,96-106.
- Martin E. Feder, Gretchen E. Hofmann heat-shock proteins,molecular chaperones,and the stress response:evolutionary and ecological, physiology, *Annu. Rev. Physiol.* 1999. 61:243–82
- Martin, C.C., Tang, P., Bernardo, G. and Krone, P.H. 2001.Expression of the chaperonin 10 gene during zebrafish development. *Cell Stress and Chaperones*, 6: 38-43.
- Matsumiya, T., Imaizumi, T., Yoshida, H., Satoh, K., Topham, M. K., and Stafforini, D. M. (2009). The levels of retinoic acid-inducible gene I are regulated by heat shock protein 90- α . *J. Immunol.* 182, 2717-2725.
- Molykutty John, Cynthia Jaworski, Zhengguang Chen, Saradha Subramanian, Wanchao Ma, Fang Sun, Dayu Li, Abraham Spector, Deborah Carper Matrix metalloproteinases are down-regulated in rat lenses exposed to oxidative stress. *Exp Eye Res.* 2004 Dec;79(6):839-46.
- Morimoto, R.I. and M.G. Santoro. 1998. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nature Biotech.* 16: 833–838.
- Nakano, K. and Iwama, G.K. 2002. The 70-kDa heat shock protein response in twointertidal sculpins *Oligocottus maculosus* and *Oligocottus synderi*: relationship of Hsp70 and thermal tolerance. *Comperative Biochemistry and Physiology*, 133: 79-94.
- Neckers, L., and Ivy, S. P. (2003). Heat shock protein 90. *Curr. Opin. Oncol.* 15, 419-424
- Nguyen, N., Francoeur, N., Chartrand, V., Klarskov, K., Guillemette, G., and Boulay, G. (2009). Insulin promotes the association of heat shock protein 90 with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor to dampen its Ca²⁺ release activity. *Endocrinology* 150, 2190-2196.
- Osteen K. G., Igarashi T. M., Bruner-Tran K. L., Progesterone action in the human endometrium: induction of a unique tissue environment which limits matrix metalloproteinase (MMP) expression, *Front Biosci*, 2003, 878–86
- Ovelgonne, J.H., Souren, J.E.M., Wiegant, F.A.C. and Van Wijk, R. 1995. Relationship between cadmiuminduced expression of heat shock genes, inhibition of protein synthesis and cell death. *Toxicology*, 99:19-30
- Overall C.M., O Kleifeld, Towards third generation matrix metalloproteinase inhibitors for cancer therapy, *British Journal of Cancer* (2006) 94, 941 – 946
- Patterson M. L., Atkinson S. J., Knäuper V., Murphy G., Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP–2,is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain, *FEBS Lett*, 2001, 503(2–3):158–16.
- Pfaffl Michael, W., A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR, *Nucleic Acids Research*, vol.29, no. 9, 2001
- Picard, D. (2002). Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1640-1648.
- Rabergh, C.M., Airaksinen, S., Soitomo, A., Bjorklund,H.V., Johansson, T., Nikinmaa, M. and Sistonen, L. , 2000. Tissue specific expression of zebrafish (*Danio rerio*) heat shock factor1 mRNAs in response to heat stress. *Journal of Experimental Biology*, 203: 1817-1824.
- Roberts RG. Cole CG. Hart KA. Bobrow M. Bentley DR (1989). Rapid carrier and prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Nucleic Acids Res* 17 : 811
- Ryan, J.A. and Hightower, L.E. 1994. Evaluation of heavy metal ion toxicity in fish cells using a combined stres protein and cytotoxicity assay. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13: 1231-1240.

- Sanders, B.M. 1993. Stress proteins in aquatic organisms:an environmental perspective. *Critical Reviews in Toxicology*, 23: 49-75.
- Santacruz, H., Vriza, S. and Angelier, N. 1997. Molecular characterization of a heat shock cognate cDNA of zebrafish, Hsc70 and developmental expression of the corresponding transcripts. *Developmental Genetics*,21: 223-233
- Smith, T.R., Tremblay, G.C. and Bradley, T.M. 1999.Characterization of the Hsp response of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 20: 279-292
- Stephanie Curran, Graeme I. Murray, Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis, *The Journal of Pathology*, Vol. 189, pp. 300–308, 1999.
- Te, J., Jia, L., Rogers, J., Miller, A., and Hartson, S. D. (2007). Novel subunits of the mammalian Hsp90 signal transduction chaperone. *J. Proteome Res.* 6, 1963-1973.
- Ternlicht M. D., Werb Z., How matrix metalloproteinases regulate cell behavior, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001, 17:463–516.
- Vijayan, M.M., Pereira, C., Kruzynski, G. and Iwama, G.K.1998. Sublethal concentrations of contaminant induce the expression of hepatic hsp70 in two salmonids.*Aquatic Toxicology*, 40: 101-108.
- VISSE R., NAGASE H., Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry, *Circ Res*, 2003, 92(8):827–839
- Welch, W.J., 1993.How cells respond to stress. *Sci. Am.*, 268:56-64.
- Williams, J.H., Farag, A.M., Stansbury, M.A., Young, P.A., Bergman, H.L. and Peterson, N.S. 1996.Accumulation of Hsp70 in juvenile and adult rainbow trout gill exposed to metal contaminated water and/or diet. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15:1324-1328