

## **Different interactions of Hsp90 $\alpha$ and Hsp90 $\beta$ with different substrates**

**Taherian AA<sup>1\*</sup>, Krone PH<sup>2</sup>, Ovsenek N<sup>2</sup>**

1- Anatomical Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

2- Department of Anatomy and Cell Biology, University of Saskatchewan, Health Science Building, Saskatchewan, Canada.

Received July 3, 2011; Accepted November 21, 2011

### **Abstract:**

**Background:** The Hsp90 chaperone complex functions in assembly, folding and activation of numerous substrates. The two vertebrate homologues encoded by *hsp90 $\alpha$*  and *hsp90 $\beta$*  genes are differentially expressed in embryonic and adult tissues and during stress, however, it is not known if they possess identical functional activities in chaperone complexes. This question was addressed by examining potential differences between the Hsp90 isoforms with respect to both co-chaperone and substrate interactions.

**Materials and Methods:** Epitope-tagged proteins were expressed in mammalian cells or *Xenopus* oocytes and subjected to immunoprecipitation with an array of co-chaperones.

**Results:** Both isoforms were shown to participate equally in multi-chaperone complexes and no significant difference in co-chaperone distribution was observed. The substrates Raf-1, HSF1, Cdc37 and Mek interacted with both Hsp90 $\alpha$  and Hsp90 $\beta$ , and the relative patterns of these interactions were not affected by heat shock. The substrates kinases c-Src, CKIIB, Araf, and Erk interacted with both isoforms, however, significantly more Hsp90 $\alpha$  was recovered after heat shock.

**Conclusion:** The results demonstrate that the Hsp90 $\alpha$  and Hsp90 $\beta$  exhibit similar interactions with co-chaperones, but significantly different behaviors with respect to substrate interactions under stress conditions.

**Keywords:** Hsp90 $\alpha$ , Hsp90 $\beta$ , Heat shock, Chaperone

**\* Corresponding Author.**

**Email:** alt365@mail.usask.ca

**Tel:** 0098 912 812 4843

**Fax:** 0098 361 555 1112

**Conflict of Interests: No**

*Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences March, 2012; Vol. 16, No 1, Pages 42-50*

Please cite this article as: Taherian AA, Krone PH, Ovsenek N. Different interactions of Hsp90 $\alpha$  and Hsp90 $\beta$  with different substrates.  
*Feyz* 2012; 16(1): 42-50.

## واکنش متفاوت ایزوفرم‌های آلفا و بتای پروتئین حرارتی ۹۰ با سوبستراها مختلط

علی‌اکبر طاهریان<sup>۱\*</sup>، پاتریک کرون<sup>۲</sup>، نیک آوستنک<sup>۲</sup>

خلاصه:

سابقه و هدف: کمپلکس پروتئین حرارتی ۹۰ (HSP90) در فرآیند تولید ساختمان نهایی از قبیل چین‌خوردگی و فعال شدن پروتئین‌های بسیاری شرکت دارد. دو پروتئین هومولوگ HSP90 $\beta$  و HSP90 $\alpha$  در مهره‌داران وجود دارند. نحوه بیان آنها در شرایط نرمال و شرایط استرس با یکدیگر فرق می‌کند، اما در مورد تمایز عملکرد آنها هنوز کار زیادی انجام نگرفته است. در این کار تفاوت بین ایزوفرم‌های HSP90 در رابطه با کمپلکس چپرونی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: پروتئین علامت‌دار حرارتی ۹۰ آلفا و پروتئین حرارتی ۹۰ بتا در سلول‌های پستانداران و یا آسیت Xenopus به کمک تکنیک رسوب ایمنی (Immunoprecipitation) هر یک از کوچپرون‌ها را رسوب داده و رسوب هر یک از پروتئین‌های حرارتی ۹۰ آلفا و یا بتا به همراه چپرون‌های مربوطه با یکدیگر مقایسه گردیدند.

نتایج: نتایج مطالعه نشان داد که هر دو پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا و پروتئین حرارتی بتا به طور مساوی در کمپلکس چپرونی پروتئین حرارتی ۹۰ شرکت می‌کنند. سوبستراها Cdc37، MEK1، HSF-1، PAF-1 و CKIIB تأثیری بر این واکنش نداشت. سوبستراها کیناز A-Raf، c-Src، Erk و CKII با هر دوی پروتئین‌ها واکنش داده، ولی پس از استرس حرارتی واکنش قوی‌تری را با پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا نشان دادند.

نتیجه‌گیری: این نتایج نشان می‌دهد که اگرچه دو ایزوفرم مورد بررسی واکنش مشابهی با کوچپرون‌ها دارند، اما واکنش آنها با سوبستراها تحت تأثیر شوک حرارتی می‌باشد.

واژگان کلیدی: پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا، پروتئین حرارتی ۹۰ بتا، شوک حرارتی، چپرون

دوماهنامه علمی-پژوهشی فیض، دوره شانزدهم، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۱، صفحات ۴۵-۵۰

بخش عمده‌ای از پروتئین‌های سوبستراتی HSP90 از پروتئین‌های انتقال سیگنالی شرکت کننده در رشد و تکثیر سلولی و یا فاکتورهای نسخه برداری می‌باشد [۸،۷]. گیرنده‌های استروئیدی شناخته شده‌ترین سوبستراها ایزوپروتئین حرارتی ۹۰ می‌باشند. کمپلکس چپرونی پروتئین حرارتی ۹۰ برای بدست آوردن شکل نضایی نهایی گیرنده استروئیدی که آن را قادر به اتصال به هورمون استروئیدی و پاسخ به هورمون می‌کند، لازم می‌باشد. کمپلکس چپرونی پروتئین حرارتی ۹۰ به گیرنده استروئیدی چسبیده و به بلوغ نهایی پروتئین کمک می‌نماید. این کمپلکس در مراحل مختلف از پروتئین‌های مختلفی تشکیل شده است. اعضاء این کمپلکس چپرونی در مرحله حد وسط شامل HOP، HSP70، HSP90، FKBP51/52، Cyp40، P60، P48(HIP)، P23 و p23 و یکی از ایمونوفیلین‌ها می‌گردد [۸]. علاوه بر گیرنده‌های استروئیدی، فاکتور نسخه برداری HSF1 نیز از سوبسترات‌های شناخته شده HSP90 می‌باشد [۹]. HSF1 فعال-کننده اصلی پاسخ استرسی در سلول می‌باشد. تعدادی از مولکول‌های سیگنال سلولی که به وسیله کمپلکس پروتئین حرارتی ۹۰ چپرون می‌شوند عبارتند از: خانواده پروتئین‌های Raf، Src، [۸] Mek1/2، [۱۱،۱۰] (A-Raf, Raf-1, B-Raf)

مقدمه

پروتئین حرارتی ۹۰ در سلول‌های یوکاریوتیک به فراوانی بیان شده [۲،۱] و برای حیات سلول در تمام شرایط لازم می‌باشد. پروتئین حرارتی ۹۰ در سیتوپلاسم مرکز است و بخش کوچکی از آن نیز در هسته دیده می‌شود [۳]. پروتئین حرارتی ۹۰ به صورت دائم در سلول وجود داشته و دائم شدن برای فعالیت آن در داخل سلول ضروری می‌باشد. فعالیت HSP90 وابسته به ATP بوده و فعالیت ذاتی ATPase برای عملکرد صحیح پروتئین حرارتی ۹۰ در فرایند کمک به پروتئین‌های سوبسترا لازم می‌باشد [۴]. در زمان استرس، فعالیت چپرونینگ عمومی پروتئین حرارتی ۹۰ برای جلوگیری از چسبیدن انواعی از پروتئین‌ها به یکدیگر نشان داده شده است [۶،۵]. یکی از ویژگی‌های منحصر به فرد پروتئین حرارتی ۹۰ در بیان چپرون‌های سلولی، اختصاصیت سوبستراتی آن است.

<sup>۱</sup> استادیار، مرکز تحقیقات علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

<sup>۲</sup> گروه آناتومی و بیولوژی سلولی ملکولی، دانشگاه ساسکاچوان، کانادا

\*لشان نویسنده مسلم:

کاشان، کیلومتر ۵ بلوار قطب راوندی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات علوم تشریح

تلفن: ۰۹۱۲ ۸۱۲۴۸۴۳؛ دوچرخه: ۰۳۶۱ ۵۵۵۱۱۱۲؛

پست الکترونیک: alt365@mail.usask.ca

تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۳۰؛ تاریخ پذیرش: ۹۰/۸/۱۲

از پلاسمید pACTAG2 می‌باشد. پلاسمیدهای به دست آمده دارای HA-HSP90 $\alpha$ , HA-HSP90 $\beta$  و یا HA- پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا و حاصل از بیان پلاسمیدهای فوق پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا و پروتئین حرارتی ۹۰ بتا علامت دار شده با پرچم HA در ناحیه ۵' می‌باشند.

#### آسیت‌های *Xenopus Laevis*

Xenopus I, Inc., Dexter Mich., USA خریداری گردیدند. تمام آزمایشات طبق راهنمای دستورالعمل‌های کار و نگهداری از حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفته و به وسیله کمیته اخلاق دانشگاه ساساکاجوان تصویب گردید. آسیت‌ها به روش جراحی از قورباغه ماده خارج گردید و به کمک محلول بدون کلسیم (82.5 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5mM HEPES (pH 7.8), 10 mg/L of streptomycin sulfate, 10 mg/L فولیکول زدایی (حذف لایه چسبنده اطراف) و به صورت آسیت‌های منفرد آماده شدند. فولیکول زدایی در بافر OR-2 به مدت دو ساعت بر روی دستگاه به همزن افقی در درجه حرارت ۱۸°C انجام گرفت. فولیکول‌ها چندین بار به خوبی با بافر OR-2 شستشو داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در درجه حرارت ۱۸°C نگهداری شده تا ریکاوری گردد. آسیت‌های سالم مرحله VI انتخاب گردیده و به کمک دستگاه تزریق میکرونی (Narashige, IM300) (مقدار ۰/۵ nанوگرم از پلاسمید CMV-HA-HSP90 $\alpha$  و یا CMV-HA-HSP90 $\beta$  به داخل هسته آنها تزریق گردید. پس از نگهداری آسیت‌ها در ۱۸°C برای یک شب برای بیان پروتئین‌ها، گروهی از آنها برای شوک حرارتی در داخل پتری دیش به کمک پارافیلم سیلد شده و به مدت یک ساعت در داخل حمام آب گرم (33°C) قرار گرفتند. بلاعاصله بعد از این مرحله، استخراج پروتئین از گروه کنترل (در ۱۸°C) و شوک حرارتی (33°C) انجام گرفت. برای استخراج پروتئین از بافر C (50 mM Tris-HCl (pH 7.9), 20% (v/v) glycerol, 50mM KCl, and 0.1mM (20mM Tris pH 7.4, 5 mM (Bharadwaj 1999) IP EDTA, 5 mM EGTA, 100 mM NaCl, 50 µg/ml PMSF, 1 mM Iodo acetamide, 1µM pepstatin, 1mM 1, 10 phenanthroline, 50 nM okadaic acid, 0.5 mM Naorthovanadate, 50 mM KFl, and 4% Triton X-100, 10µg/ml aprotinin, 10µg/ml leupeptin and 2 mM DTT) برای استفاده در رسوب اینمنی از روش ذکر شده توسط Jing و همکاران [۲۰] استفاده گردید. برای هر آسیت مقدار ۱۰ میکرولیتر از بافر C و یا ۱۵ میکرولیتر از بافر IP اضافه گردیده، به کمک میکروبیت هموژن شده و به مدت ۱۰ دقیقه با نیروی

Cdk4, [۱۳] CKIIB [۱۴] به همراه تعدادی از سوبیستراهای پروتئین حرارتی ۹۰ دیده شده است [۱۵]. ایزوفرم‌های hsp90 $\alpha$  در مهره‌داران متکامل تر به وسیله دوزن HSP90 $\alpha$  و hsp90 $\beta$  [۱۷,۶] کد می‌گردد [۱۷,۶]. ترافد اسید آمینه HSP90 $\beta$  در مهره‌داران تقریباً ۸۱ درصد مشابه یکدیگر است [۱۸]. اگر چه هر دو ایزوفرم در شرایط نرمال بیان می‌شوند، اما انواع مختلف استرس از جمله استرس حرارتی بیان آنها را با درجات مختلفی افزایش می‌دهد. مثلاً در ماهی گورخر (Zebra fish) استرس حرارتی باعث افزایش زیاد بیان hsp90 $\alpha$  می‌گردد، در حالی که بیان hsp90 $\beta$  تغییر زیادی نمی‌کند [۱۹]. اگر چه هتروکمپلکس پروتئین حرارتی ۹۰ به طور گستره‌های مورد مطالعه قرار گرفته است، اما مقایسه عملکرد دو ایزوفرم HSP90 $\alpha$  و HSP90 $\beta$  در این هتروکمپلکس مشخص نیست. در مطالعه HSP90 $\beta$  پروتئین‌های علامت دار HA (Hemoglutanin, HA) پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا و پروتئین حرارتی ۹۰ بتا از گورخر ماهی Xenopus (Zebrafish) در سلول‌های NIH3T3 و آسیت‌های به منظور مقایسه فعالیت این دو پروتئین در دو سیستم مختلف می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها

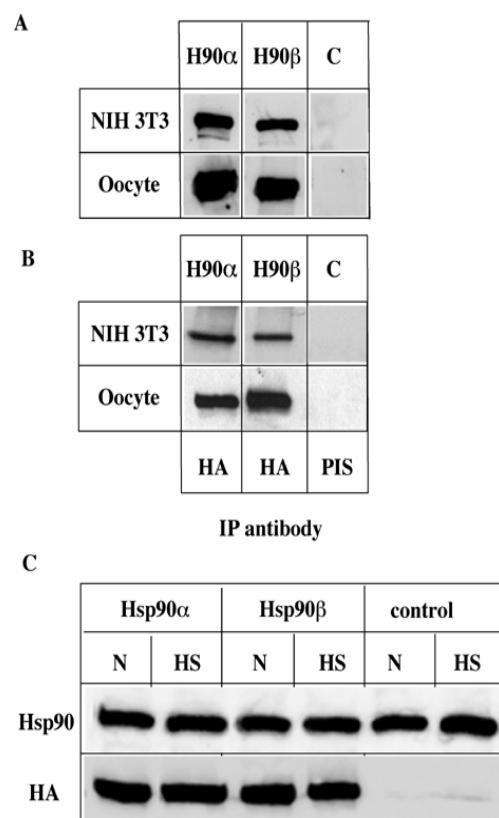
کلون کردن: برای کلون کردن ترافد کامل cDNA ژن-های پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا و بتای گورخر ماهی از پلاسمیدهای مربوطه (با شماره‌های دسترسی بانک ژنی به ترتیب Q90474 (AAC21566.1) استفاده گردید. در روش PCR از پرایمرهای (5'-CGGGGGATCCATGCCTGAGGCTCA CGAG CAG-3', 5'-GCCCGAATTCTTAGTCGACTTCCTC CATT CT-3') (5'CGGGGGATCCATGCCTGAAGAAAT GCGCCC-3', 5'GCCCGAATTCTTAATCGACTTCCTC CATGC-3') به ترتیب برای پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا و بتا استفاده گردید. محصول PCR در وکتورهای قابل بیان در سلول‌های یوکاریوتیک (pCMV) کلون گردید. با طراحی پرایمرها، هر دو cDNA های تکثیر شده از پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا و بتا در ناحیه ۵' دارای یک محل برش برای آنزیم BamH1 و در ناحیه ۳' دارای یک محل برش برای آنزیم EcoR1 بودند. محصول PCR با آنزیم‌های EcoR1 و BamH1 برش داده شده و سپس به داخل یک پلاسمید HA3-CMV برش داده شده با آنزیم‌های BamH1 و EcoR1 کلون گردید. پلاسمید HA3-CMV یک فرم تغییر یافته

ترانسفکت شدند و تا مرحله فراوانی سلولی ۹۰-۱۰۰ درصد استخراج پروتئین صورت گرفت. ترانسفکت کردن سلول ها به وسیله لیپوفکتمین پلاس (Invitrogen Life Technologies) و HA-HSP90 $\alpha$  و HA-HSP90 $\beta$  استفاده از پلاسمید های صورت گرفت. برای گروه کنترل از وکتور خالی pCMV استفاده گردید. سلول ها یا در ۳۷°C (گروه کنترل) و یا به مدت یک ساعت در انکوباتور ۴۲°C (گروه شوک حرارتی) نگهداری گردیدند. برای استخراج پروتئین از روش Anderson و همکاران [۲۱] استفاده گردید. در ابتدا سلول ها سه بار با PBS سرد آبکشی شدند و بر روی ظرف یخ قرار گرفتند. سپس برای هر بشقاب ۱۰۰ میلی-متری مقدار ۱ml از بافر سرد (50 mM Tris (pH RIPA 8), 150 mM NaCl, 0.1 % (w/v) SDS, 0.5 % sodium deoxycholic acid, 1% NP-40, 10µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin) and 10 µg/ml cocktail گردید. با یک پاروی کوچک سلول ها و بافر لیزکننده مخلوط شده و سپس به کمک یک سرنگ با سوزن ۵/۸ هموژنیزه شده و با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محصول فوکانی به لوله جدیدی منتقل گردیده و در فریزر ۷۰°C - ۷۰°C نگهداری گردید.

#### روش کار رسوب ایمنی

در رسوب ایمنی [۲۱] تمام مراحل بر روی یخ و یا در ۴°C صورت گرفت. تراکم پروتئین کلی نمونه ها به کمک کیت لوری (TP0300 lowry L.T sigma) صورت گرفت. برای پاک سازی اولیه محلول پروتئین کلی برای رسوب ایمنی مقدار ۱ml از پروتئین کلی با ۱ml ۲۰ از سوسپانسیون پروتئین جی (Sigma Cat N P-3296) ۳ میکروگرم از IgG نرمال موش مخلوط شده و به مدت ۲ ساعت در ۴°C با چرخش آرام نگهداری شد. پس از ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰ rpm، محصول فوکانی به لوله جدیدی منتقل گردید تا برای رسوب ایمنی مورد استفاده قرار گیرد. ابتدا کمپلکس آنتی بادی - پروتئین جی آماده گردید. برای هر آزمایش رسوب ایمنی مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از پروتئین جی (pre-swollen Protein G-sepharose داده شده و با ۵ میکروگروم از آنتی بادی و ۸۰۰ میکرو لیتر از بافر RIPA مخلوط گردیده و به مدت ۴ ساعت با حرکت آرام نگهداری گردید. سپس، نمونه ها به مدت ۲ دقیقه با دور ۱۰۰G سانتریفیوژ شده و رسوب با ۵۰۰ میکرو لیتر بافر RIPA شستشو داده شده، محصول کمپلکس آنتی بادی - پروتئین جی به ۸۰۰ میکرو لیتر پروتئین پاک سازی شده اضافه گردید و به مدت ۱ شب با حرکت آرام در ۴°C نگهداری گردید. سوپر ناتانت دور ریخته شده و رسوب با ۴ میکرو لیتر بافر لاملی (Laemmli buffer)

10000g سانتریفیوژ گردیدند.



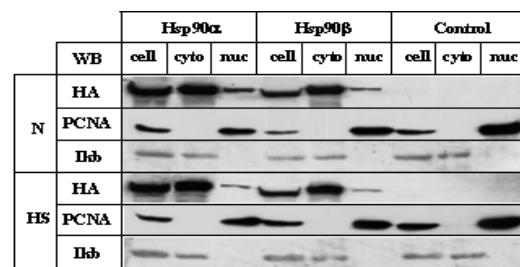
شکل شماره ۱- بیان پروتئین های حرارتی ۹۰ آلفا و بتای نشان دار شده با HA در آسیت ها و سلول های NIH3T3 . (A) برای بیان پروتئین های نشان دار، سلول ها با پلاسمید های HA-HSP90 $\alpha$  یا HA-HSP90 $\beta$  ترانسفکت شدند و به هسته آسیت ها مقدار ۱۵ نانو گرم از پلاسمید های فوق تزریق گردید. ۲۴ ساعت پس از بیان پروتئین سلول ها و یا آسیت ها بر روی سترن بلات با آنتی بادی ضد (A) شناسایی گردیدند. (B) رسوب ایمنی با آنتی بادی ضد HA انجام شده و سپس محصول رسوب ایمنی به روی سترن بلات با آنتی بادی ضد پروتئین حرارتی ۹۰ شناسایی گردید. (C) پروتئین های تولید شده پس از استرس حرارتی شناسایی گردیدند. نمونه های کنترل C، نمونه های ترانسفکت نشده و یا تزریق نشده می باشند.

کشت سلول های N1H3T3 سلول های N1H3T3 در محیط کشت DMEM (GIBCO Cat. No. 41500-034)، ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنسی سیلین و استریتو ماسین بود، و در انکوباتور مرتبط ۳۷°C با ۵ درصد CO<sub>2</sub> کشت داده شدند. سلول ها در مرحله فراوانی ۷۰-۷۵ درصد با پلاسمید های مورد نظر

بیان این پروتئین‌ها را در گروه‌های مختلف پروتئین‌های سلولی با آسیت نشان می‌دهد که به‌وسیله وسترن بلاط با آنتی‌بادی HA نشان داده شده است (شکل HA). در نمونه‌های کنترل (سلول‌های ترانسفکت نشده و یا آسیت‌های تزریق نشده) هیچ سیگنالی دیده نمی‌شود. شرایط بیان طوری تنظیم گردید که مقادیر مساوی از پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا و پروتئین حرارتی بتا علامت دار شده با پرچم HA در هر نمونه بیان گردد (شکل شماره ۱). رسوب اینمی (IP) نشان داد که آنتی‌بادی HA به‌طور اختصاصی پروتئین‌های حرارتی ۹۰ آلفا و بتا که با پرچم HA علامت‌دار شده‌اند (HA-90 $\beta$ , HA-HSP90 $\alpha$ ) هنوز نمی‌دانیم که آیا پروتئین‌های بیان شده با پروتئین‌های خود سلولی و یا آسیت فرم دایمر را تولید می‌کنند یا خیر. به‌دبیال بیان پروتئین، محل تمرکز داخل سلولی این پروتئین‌ها در آسیت‌ها در گروه کنترل (۱۸°C) و پس از شوک حرارتی (۳۳°C) مورد بررسی قرار گرفت. عمدۀ پروتئین‌های بیان شده در بخش سیتوپلاسمی دیده شد و مقدار کمی نیز در بخش هسته‌ای دیده شد (شکل شماره ۲). تفاوت مهمی در توزیع این پروتئین‌های بیان شده در گروه کنترل و شوک حرارتی دیده نشد؛ اگرچه یک کاهش کمی در بیان پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا در بعضی از آزمایشات دیده شد. نتایج وسترن بلاط نشان داد که پروتئین‌های بیان شده باعث افزایش مهمی در تراکم کلی پروتئین آسیت‌ها نمی‌گردد.

واکنش پروتئین‌های حرارتی ۹۰ آلفا و بتا با کوچپرون‌ها: در این مرحله واکنش پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا و پروتئین حرارتی ۹۰ بتا بیان شده در سلول‌ها با هر یک از کوچپرون‌های، KBP51, FkBP52, P60, P23, CyP40, HSP40, HSP70 مورد بررسی قرار گرفت. روش کار بدین ترتیب بود که هر یک از کوچپرون‌ها را به‌نهایی رسوب اینمی داده و مقدار پروتئین‌های حرارتی ۹۰ آلفا و بتا که همراه با کوچپرون‌ها رسوب داده شده است را با آنتی‌بادی ضد HA با وسترن بلاط مقایسه نمودیم. (شکل شماره ۳). نتایج نشان داد که هیچ تفاوت مهمی بین مقدار پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا و پروتئین حرارتی بتا رسوب داده شده به‌همراه هر یک از کوچپرون‌ها دیده نمی‌شود. هریک از کوچپرون‌ها تقریباً مقادیر مساوی از پروتئین‌های حرارتی ۹۰ آلفا و بتا را به‌همراه خود رسوب دادند؛ اگر چه تفاوت‌های جزیی در بعضی موقع دیده شد (شکل شماره ۳). در سلول‌های NIH3T3 به‌نظر می‌رسد که کوچپرون‌ها تمایل بیشتری به رسوب پروتئین حرارتی ۹۰ بتا در شرایط استرس حرارتی دارند، اما بهر حال در مجموع کوچپرون‌ها واکنش قوی با هر دو پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا و بتا را

مخلوط شده و در فریزر -۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. آنتی‌بادی‌های استفاده شده در این تحقیق عبارتند از: Casein kinase II $\beta$  (sc-12739), c-Src (sc-5266), I kB- $\alpha$  (sc-Santa Cruz 847), PCNA (sc-56) and Erk (sc-94) Mek (9122), phospho Mek (9121) and phospho Erk (9101) 40 (PA3-023), FKBP51 (PA-020), HSF1 (PA3-017); hsp70 (MA3-006), P23 (MA3-414) and Affinity BioReagents از شرکت Cdc37 (MA3-029) آنتی‌بادی‌های Hip (SPA-766), p60 (SRA-1500, SRA-1400) and HSF1 (SPA-901) FKB52 از شرکت Stressgen.

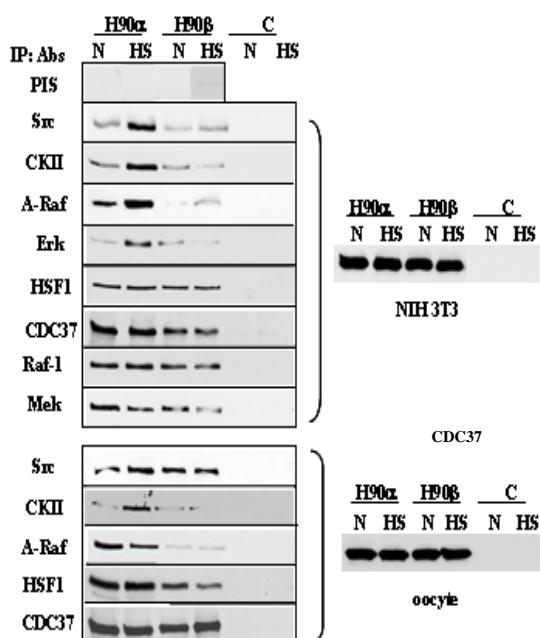


شکل شماره ۲- توزیع سلولی پروتئین‌های حرارتی ۹۰ آلفا و بتای نشان دار شده با HA در آسیت‌ها. آسیت‌ها با یکی از پلاسمیدهای فوق تزریق گردیدند و پس از ۲۴ ساعت بیان پروتئین به‌مدت یک ساعت در درجه حرارت کنترل (N) (۱۸°C) و یا در استرس حرارتی (HS) (۳۳°C) نگهداری شدند. سیتوپلاسم آسیت‌ها از هسته جدا سازی گردیده و پروتئین کلی هر بخش به‌روش وسترن بلاط با آنتی‌بادی‌های ضد HA، PCNA (مارکر سیتوپلاسمی) و I kB (مارکر هسته‌ای) مورد آزمایش قرار گرفتند.

آنالیز وسترن بلاط  
۱۰ میکروگرم از پروتئین کلی (تمام) به‌کمک SDS-PAGE جداسازی شده و پس از اتصال بر روی غشاء نیتروسولولزی با آنتی‌بادی‌های مربوط مجاور گردید [۹].

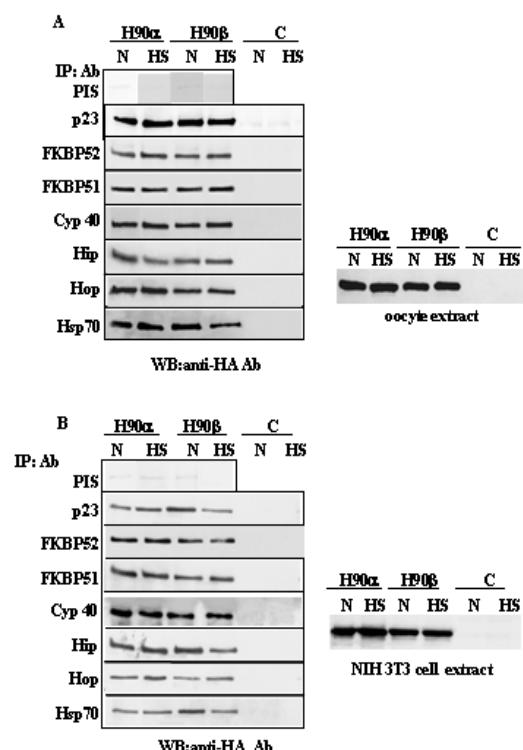
**نتایج**  
بیان پروتئین‌های حرارتی ۹۰ آلفا و بتا (HSP90 $\beta$ , HSP90 $\alpha$ ) در آسیت و بررسی محل بیان آنها در داخل سلول. هدف اصلی این مطالعه بررسی تفاوت احتمالی واکنش ایزوفرم‌های پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا و بتا (HSP90 $\beta$ , HSP90 $\alpha$ ) با کوچپرون‌ها بود. ابتدا هر یک از ایزوفرم‌ها به‌نهایی در سلول Xenopus یا آسیت‌های NIH3T3 بیان گردید. شکل شماره یک

شکل ۴ نشان می‌دهد که مقادیر مساوی از هر یک از ایزوفرم‌ها به همراه پروتئین‌های سوبستراتی MEK1، Cdc37، Raf1 و HSF1 رسوب نموده و واکنش هر یک از پروتئین‌های حرارتی ۹۰ آلفا و بتا با پروتئین‌های سوبستراتی فوق با استرس حرارتی تغییر نکرد. هر دو پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا و بتا با پروتئین‌های پروتئین حرارتی بتا با پروتئین‌های سوبستراتی فوق در شرایط نرمال و استرس حرارتی فرقی نمی‌کرد. در مقایسه مشاهده شد که پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا واکنش قوی‌تری را با پروتئین‌های سوبستراتی A-Raf1، c-Src، CKIIB، Erk و A-Ral واکنش نشان دادن. واکنش پروتئین حرارتی بتا با پروتئین‌های سوبستراتی فوق در شرایط نرمال و استرس حرارتی فرقی نمی‌کرد. در مقایسه مشاهده شد که پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا واکنش قوی‌تری را با پروتئین‌های سوبستراتی A-Raf1، c-Src، CKIIB، Erk و A-Ral دارد (شکل شماره ۴). این نتایج در آسیت‌های NIH3T3 و همین‌طور سلول‌های NIH3T3 دیده شد. واکنش A-Raf-1 در سلول‌های NIH3T3 پس از استرس حرارتی افزایش یافت، اما در آسیت Xenopus کاهش یافت. این نتایج نشان دهنده عملکرد متفاوت هتروکمپلکس چپرون حاوی پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا و کمپلکس چپرون حاوی پروتئین حرارتی بتا در انتخاب پروتئین‌های سوبستراتی می‌باشد.



شکل شماره ۴- واکنش پروتئین‌های حرارتی ۹۰ آلفا و بتا با سوبستراتها. پروتئین‌های کلی آسیت‌ها و یا سلول‌های NIH3T3 با یکی از آتنی بادی‌های ذکر شده در شکل، تحت آزمایش رسوب اینمی قرار گرفتند. محصول رسوب اینمی برای شناسایی پروتئین‌های نشان‌دار شده با HA بهروش و سترن بلاط مورد آزمایش قرار گرفت. مقادیر مساوی از نمونه‌های پروتئینی بهروش و سترن بلاط با آتنی بادی ضد HA مورد آزمایش قرار گرفتند تا از بیان نسبتاً مساوی پروتئین‌های نشان‌دار اطمینان حاصل گردد.

نشان دادند. برای پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا هیچ تفاوت مهمی در همراهی کوچپرون‌ها در آزمایشات رسوب اینمی در شرایط نرمال و یا استرس حرارتی دیده نشد. برعلاوه، نتایج مشابه‌ای در سلول NIH3T3 و آسیت‌های Xenopus به دست آمد (شکل شماره ۳).



شکل شماره ۳- واکنش پروتئین‌های حرارتی ۹۰ آلفا و بتا با کوچپرون‌ها. پروتئین‌های کلی آسیت‌ها و یا سلول‌های NIH3T3 با یکی از آتنی بادی‌های ذکر شده در شکل، تحت آزمایش رسوب اینمی قرار گرفتند. محصول رسوب اینمی برای شناسایی پروتئین‌های نشان‌دار شده با HA بهروش و سترن بلاط مورد آزمایش قرار گرفت. مقادیر مساوی از نمونه‌های پروتئینی بهروش و سترن بلاط با آتنی بادی ضد HA مورد آزمایش قرار گرفتند تا از بیان نسبتاً مساوی پروتئین‌های نشان‌دار اطمینان حاصل گردد.

این نتایج نشان داد که پروتئین‌های علامت‌دار شده با HA در هر یک از این سیستم‌ها بیان شده و در کمپلکس چپرونی پروتئین حرارتی ۹۰ شرکت می‌کنند و با اجزاء کلیدی این هتروکمپلکس واکنش می‌کنند. برای مقایسه واکنش پروتئین‌های حرارتی ۹۰ آلفا و بتا با پروتئین‌های سوبستراتی هتروکمپلکس پروتئین حرارتی ۹۰ در شرایط نرمال و استرس حرارتی از همان روش کار برای مقایسه‌ای واکنش هر یک از این پروتئین‌ها با پروتئین‌های سوبستراتی A-Raf-I، Raf-1، c-Src، Cdc37، Erk1/2، HSP70، Mek1، Cdk11B، Raf1، و A-Ral استفاده شد. نتایج نشان داده شده در

## بحث

این یافته‌ها پیشنهاد می‌کند یک توزیع غیرانتخابی از ایزوفرم‌های HSP90 در هتروکمپلکس HSP90 وجود دارد. دومین نتیجه-گیری عده این است که اگر چه هر دو پروتئین حرارتی  $\alpha$  آلفا و بتا با تعدادی از پروتئین‌های سوبستراتی در شرایط عادی واکنش می‌کنند، اما پروتئین حرارتی  $\alpha$  آلفا یک واکنش قوی‌تری را با بعضی از سوبستراتها در شرایط استرس حرارتی نشان می‌دهد. این واکنش در مورد ARaf، CKIIB، Erk، C-Src و c-Src دیده شد، ولی استثنایاً در مورد A-Raf در آسیت کاهش دیده شد. اهمیت واکنش قوی‌تر پروتئین حرارتی آلفا با تعداد به خصوصی از سوبستراتها این است که هیچ تفاوتی در واکنش نسبی هر یک از ایزوفرم‌ها با تعداد زیادی از پروتئین‌های سوبسترا یعنی MEK1، HSP70، Cdc37 و Rafl دیده نشد (شکل شماره ۴). آزمایشات رسوب ایمنی در سیستم آسیت‌ها تکرار گردید و مشاهدات عدمنا در دو سیستم مشابه بود. ذکر این نکته اهمیت دارد که نتایج حاصل ناشی از بیان بیشتر پروتئین حرارتی  $\alpha$  آلفا در شرایط استرس حرارتی نبود، چون بیان پروتئین علامت‌دار HA تحت کترل پرموتور قابل تحریک با استرس نبود. به‌حال، نتایج تفاوت عملکرد این ایزوفرم قابل تحریک (پروتئین حرارتی  $\alpha$  آلفا) را نشان می‌دهد. این اطلاعات پیشنهاد می‌کند که این ایزوفرم‌های مشابه که به‌ندرت در مطالعات بیوشیمیابی از یکدیگر تفکیک می‌گردند، ممکن است نقش‌های متفاوتی را در سلول داشته باشند. اهمیت دقیق این یافته‌ها و اهمیت نتایج عملکرد آن نیاز به بررسی‌های دقیق‌تری دارد. مکانیسم واکنش تقویت شده پروتئین حرارتی  $\alpha$  آلفا با ARaf، CKIIB، Erk، C-Src و C-Src هنوز شناخته شده نیست. مشاهدات تفاوت بالقوه‌ای را در عملکرد، تنظیم و یا نیازهای کوچپرونی برای این پروتئین‌ها در زمان استرس حرارتی نشان می‌دهد. واکنش بین پروتئین حرارتی  $\alpha$  و پروتئین‌های B-Raf، Raf-1 قبلاً گزارش شده است [۲۲]. این واکنش باعث حساسیت عملکرد Raf به جلداناپیسین می‌گردد [۲۳]. واکنش بین پروتئین حرارتی  $\alpha$  و Erk قبلاً در مطالعات رسوب ایمنی نشان داده شده است [۲۴]، و واکنش هر دو c-Src و v-Src با پروتئین حرارتی  $\alpha$  و اهمیت آن در فعالیت این دو پروتئین نیز نشان داده شده است [۲۵]. نتایج ما اطلاعات موجود را بدین ترتیب گسترش می‌دهد که یک واکنش تقویت شده از c-Src با پروتئین حرارتی  $\alpha$  بعد از استرس حرارتی به وجود می‌آید (شکل شماره ۴). هنوز مشخص نیست که اتصال پروتئین حرارتی  $\alpha$  آلفا به c-Src بعد از استرس حرارتی فعالیت کیناز را تحت تأثیر قرار می‌دهد و یا اینکه فعال شدن c-Src بعد از شوک حرارتی باعث اتصال آن به پروتئین حرارتی  $\alpha$  آلفا می‌گردد. یکی از اعضاء

این مطالعه اولین مقایسه سیستماتیک ایزوفرم‌های پروتئین حرارتی  $\alpha$  آلفا و بتا در رابطه با واکنش با کوچپرون‌ها می‌باشد. روش کار ما شامل بیان مقادیر کم پروتئین‌های علامت‌دار پروتئین حرارتی  $\alpha$  آلفا و یا پروتئین حرارتی بتا در دو مدل سلولی متفاوت و مقایسه واکنش آنها با کوچپرون‌ها در شرایط نرمال و استرس حرارتی بود. پروتئین‌های کوچپرون به‌کمک آنتی‌بادی ایزوفرم‌های پروتئین حرارتی  $\alpha$  آلفا و مربوط رسوب داده شده و ایزوفرم‌های پروتئین حرارتی  $\alpha$  آلفا و یا بتا که به‌همراه کوچپرون‌ها رسوب داده شده بودند، به‌کمک وسترن بلاست مقایسه گردیدند. علامت‌دار کردن پروتئین‌ها برای اجتناب از استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی پروتئین حرارتی  $\alpha$  آلفا و بتا به‌علت احتمال وجود واکنش متقابله (Cross reactivity) آنها برای ایزوفرم دیگر صورت گرفت. شرایط آزمایش طوری کترول شد که مقادیر مساوی از ایزوفرم‌ها در سلول‌های NIH3T3 و یا آسیت‌ها بیان گردد. هر دو ایزوفرم‌های بیان شده عدمنا در سیتوپلاسم مرمرک گردیدند و مقادیر کم‌تری در هسته دیده شدند. تفاوت مهمی در تمرکز داخل سلولی در شرایط نرمال و استرس حرارتی دیده نشد. بنابراین، پروتئین‌های بیان شده یک پراکنده‌گی داخل سلولی مشابه با پروتئین‌ها خود بیان را نشان دادند. هیچ‌یک از نتایج را نمی‌توان به تمرکز پروتئین‌های علامت‌دار شده در شرایط استرس حرارتی نسبت داد. یک نکته مهم این است که عده آزمایشات در دو سیستم متمایز Xenopus کشت سلولی پستانداران (NIH3T3) و آسیت‌های نتیجه-انجام گرفته است و نتایج مشابهی به‌دست آمده است. اولین نتیجه-گیری عده این است که پروتئین حرارتی  $\alpha$  آلفا و پروتئین حرارتی  $\alpha$  بتا به‌طور مشابه با اجزاء هتروکمپلکس چپرونی پروتئین حرارتی  $\alpha$  واکنش می‌کنند. نتایج رسوب ایمنی (IP) نشان داد که هر یک از پروتئین‌های HSP70، P23، HSP40، FKPB51، FKPB52، P60، CyP40 دادن (شکل شماره ۳ الف و ب). یکی دیگر از مشاهدات مهم این بود که استرس حرارتی تغییرات مهمی در واکنش پروتئین‌های حرارتی  $\alpha$  آلفا و بتا با کوچپرون‌ها ایجاد نکرد، بنابراین شرایط استرس ظاهراً تأثیری بر روند تشکیل کمپلکس چپرون پروتئین حرارتی  $\alpha$  در رابطه با نوع ایزوفرم ندارد. مهم‌تر از همه اینکه نتایج حاضر از مدلی حمایت می‌کند که در آن هر یک از پروتئین‌های حرارتی  $\alpha$  آلفا و بتا در فعالیت معمولی هتروکمپلکس پروتئین حرارتی  $\alpha$  شرکت می‌کنند و هیچ اختصاصیت واکنش با HOP، HSP70، HSP40 و یا هیچ‌یک از ایمونوفیلین‌ها ندارند.

سوبرترایب با پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا در شرایط استرس حرارتی، باعث گسترش بیشتر فهم ما راجع به واکنش پروتئین حرارتی ۹۰ با پروتئین‌های دیگر گردید.

### تشکر و قدردانی

این کار با حمایت مالی کنسول علوم و تحقیقات کانادا (Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Discovery) اهدا شده به دکتر Patrick Krone و حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی کاشان انجام گرفته است و بدین‌وسیله مراتب تقدیر و تشکر از هر دو موسسه به عمل می‌آید.

### References:

- [1] Hahn JS. The Hsp90 chaperone machinery: from structure to drug development. *BMB Rep* 2009; 42(10): 623-30.
- [2] Lai BT, Chin NW, Stanek AE, Keh W, Lanks KW. Quantitation and intracellular localization of the 85K heat shock protein by using monoclonal and polyclonal antibodies. *Mol Cell Biol* 1984; 4(12): 2802-10.
- [3] Langer T, Rosmus S, Fasold H. Intracellular localization of the 90 kDa heat shock protein (HSP90alpha) determined by expression of a EGFP-HSP90alpha-fusion protein in unstressed and heat stressed 3T3 cells. *Cell Biol Int* 2003; 27(1): 47-52.
- [4] Pearl LH, Prodromou C, Workman P. The Hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment. *Biochem J* 2008; 410(3): 439-53.
- [5] Lindquist S, Kim G. Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(11): 5301-6.
- [6] Craig EA, Gambill BD, Nelson RJ. Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol Rev* 1993; 57(2): 402-14.
- [7] Mahalingam D, Swords R, Carew JS, Nawrocki ST, Bhalla K, Giles FJ. Targeting HSP90 for cancer therapy. *Br J Cancer* 2009; 100(10): 1523-9.
- [8] Pratt WB, Morishima Y, Osawa Y. The Hsp90 chaperone machinery regulates signaling by modulating ligand binding clefts. *J Biol Chem* 2008; 283(34): 22885-9.
- [9] Bharadwaj S, Ali A, Ovsenek N. Multiple components of the HSP90 chaperone complex function in regulation of heat shock factor 1 In vivo. *Mol Cell Biol* 1999; 19(12): 8033-41.
- [10] Hagemann C, Gloger J, Anacker J, Said HM, Gerngras S, Kuhnel S, et al. RAF expression in human astrocytic tumors. *Int J Mol Med* 2009; 23(1): 17-31.
- [11] Hagemann C and Rapp UR. Isotype-specific functions of Raf kinases. *Exp Cell Res* 1999; 253(1): 34-46.
- [12] Yano A, Tsutsumi S, Soga S, Lee MJ, Trepel J, Osada H, et al. Inhibition of Hsp90 activates osteoclast c-Src signaling and promotes growth of prostate carcinoma cells in bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(40): 15541-6.
- [13] Vaughan CK, Gohlke U, Sobott F, Good VM, Ali MM, Prodromou C, et al. Structure of an Hsp90-Cdc37-Cdk4 complex. *Mol Cell* 2006; 23(5): 697-707.
- [14] Miyata Y, Yahara I. The 90-kDa heat shock protein, HSP90, binds and protects casein kinase II from self-aggregation and enhances its kinase activity. *J Biol Chem* 1992; 267(10): 7042-7.
- [15] Zhang T, Li Y, Yu Y, Zou P, Jiang Y, Sun D. Characterization of celastrol to inhibit hsp90 and cdc37 interaction. *J Biol Chem* 2009; 284(51): 35381-9.
- [16] Chen XS, Wu NH, and Shen YF. [Role of STAT1 on the regulation the human hsp90 alpha gene expression]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2001; 23: 356-60.
- [17] Rebbe NF, Hickman WS, Ley TJ, Stafford DW, Hickman S. Nucleotide sequence and regulation of a human 90-kDa heat shock protein gene. *J Biol Chem* 1989; 264(25): 15006-11.
- [18] Gupta RS. Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. *Mol Biol Evol* 1995; 12(6): 1063-73.
- [19] Krone PH, Sass JB. HSP 90 alpha and HSP 90 beta genes are present in the zebrafish and are differentially regulated in developing embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 204(2): 746-52.

خانواده سرین- ترئونین پروتئین کینازهای CKII بوده که یک کمپلکس چهارتایی از  $\alpha_2\beta_2$  و یا  $\alpha\alpha'\beta_2$  می‌باشد. پروتئین حرارتی ۹۰ به CKII چسبیده و مانع بهم چسبیده شدن این پروتئین‌ها به یکدیگر و در نتیجه باعث افزایش فعالیت کینازی آن می‌گردد [۲۶]. این امکان وجود دارد که پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا به فسفریلاسیون CKIIB کمک کرده و یا اینکه این کیناز یک نیاز بیشتری به چبرون شدن در شرایط استرس حرارتی را دارد.

### نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج ما با نشان دادن واکنش مساوی ایزوفرم‌های پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا و بتا با هتروکمپلکس چپرونسی پروتئین حرارتی ۹۰ و واکنش متمایز تعدادی از پروتئین‌های

- [20] Jing J, Chikvashvili D, Singer-Lahat D, Thornhill WB, Reuveny E, Lotan I. Fast inactivation of a brain K<sup>+</sup> channel composed of Kv1.1 and Kvbeta1.1 subunits modulated by G protein beta gamma subunits. *EMBO J* 1999; 18(5): 1245-56.
- [21] Anderson DH, Ismail PM. v-fps causes transformation by inducing tyrosine phosphorylation and activation of the PDGFbeta receptor. *Oncogene* 1998; 16(18): 2321-31.
- [22] Grbovic OM, Basso AD, Sawai A, Ye Q, Friedlander P, Solit D, et al. V600E B-Raf requires the Hsp90 chaperone for stability and is degraded in response to Hsp90 inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(1): 57-62.
- [23] da Rocha Dias S, Friedlos F, Light Y, Springer C, Workman P, Marais R. Activated B-RAF is an Hsp90 client protein that is targeted by the anticancer drug 17-allylamino-17-demethoxy-geldanamycin. *Cancer Res* 2005; 65(23): 10686-91.
- [24] Piatelli MJ, Doughty C, Chiles TC. Requirement for a hsp90 chaperone-dependent MEK1/2-ERK pathway for B cell antigen receptor-induced cyclin D2 expression in mature B lymphocytes. *J Biol Chem* 2002; 277(14): 12144-50.
- [25] Park S, Dong B, Matsumura F. Rapid activation of c-Src kinase by dioxin is mediated by the Cdc37-HSP90 complex as part of Ah receptor signaling in MCF10A cells. *Biochemistry* 2007; 46(3): 899-908.
- [26] Miyata Y, Yahara I. Interaction between casein kinase II and the 90-kDa stress protein, HSP90. *Biochemistry* 1995; 34(25): 8123-9.