Original Article

Different interactions of Hsp90α and Hsp90β with different substrates

Taherian AA[1*], Krone PH[2], Ovsenek N[2]

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 *hsp90α* and *hsp90β* 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 Hsp90α and Hsp90β, and the relative patterns of these interactions were not affected by heat shock. The substrates kinases c-Src, CKIIB, A-raf, and Erk interacted with both isoforms, however, significantly more Hsp90α was recovered after heat shock.
Conclusion: The results demonstrate that the Hsp90α and Hsp90β exhibit similar interactions with co-chaperones, but significantly different behaviors with respect to substrate interactions under stress conditions.

Keywords: Hsp90α, Hsp90β, 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 Hsp90α and Hsp90β with different substrates. ***Feyz*** 2012; 16(1): 42-50.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-06-08]

واکنش متفاوت ایزوفرم‌های آلفا و بتای پروتئین حرارتی ۹۰ با سوبستراهای مختلف

علی‌اکبر طاهریان[1*]، پاتریک کرون[2]، نیک آوسنک[2]

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 HSP90α، HSP90β 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: پروتین علامت‌دار حرارتی ۹۰ آلفا و پروتئین حرارتی۹۰ بتا در سلول‌های پستانداران و یا اُاُسیت Xenopus بیان گردید. به‌کمک تکنیک رسوب ایمنی (1mmnoprecipitaion) هر یک از کوچپرون‌ها را رسوب داده و رسوب هر یک از پروتئین‌های حرارتی ۹۰ آلفا و یا بتا به‌همراه چپرون‌های مربوطه با یکدیگر مقایسه گردیدند.

نتایج: نتایج مطالعه نشان داد که هر دو پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا و پروتئین حرارتی بتا به‌طور مساوی در کمپلکس چپرونی پروتئین حرارتی ۹۰ شرکت می‌کنند. سوبستراهای PAf-1، HSF-1، MEK1، Cdc37 با هر دو پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا و بتا واکنش داده و شوک حرارتی تأثیری بر این واکنش نداشت. سوبستراهای کیناز CKIIB، c-Src، A-Raf، و Erk 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 ۵۰-۴۲

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 متمرکز است و بخش کوچکی از آن نیز در هسته دیده می‌شود [۳]. پروتئین حرارتی ۹۰ به‌صورت دایمر در سلول وجود داشته و دایمر 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 [٤]. در زمان استرس، فعالیت چپرونینگ عمومی پروتئین حرارتی ۹۰ برای جلوگیری از چسبیدن انواعی از پروتئین‌ها به یکدیگر نشان داده شده است [٦،٥]. یکی از ویژگی‌های منحصر به‌فرد پروتئین حرارتی ۹۰ در بیان چپرون‌های سلولی، اختصاصیت سوبسترایی آن است.

بخش عمده‌ای از پروتئین‌های سوبسترائی HSP90 از پروتئین‌های انتقال سیگنالی شرکت کننده در رشد و تکثیر سلولی و یا فاکتورهای نسخه برداری می‌باشند [۸،۷]. گیرنده‌های استروئیدی شناخته شده‌ترین سوبستراهای پروتئین حرارتی ۹۰ می‌باشند. کمپلکس چپرونی پروتئین حرارتی ۹۰ برای به‌دست آوردن شکل فضایی 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. اعضا این کمپلکس چپرونی در مرحله حد وسط شامل HSP90،HSP70، FKBP51/52، Cyp40، (HOP) P60، P48(HIP) می‌گردد و کمپلکس بالغ شامل HSP90 مقدار کمی HSP70 و p23 و یکی از ایمونوفیلین‌ها می‌گردد [۸]. علاوه بر گیرنده‌های استروئیدی، فاکتور نسخه برداری HSF_1 نیز از سوبستراهای شناخته شده HSP90 می باشد [۹]. HSF_1 فعال‌کننده اصلی پاسخ استرسی در سلول می‌باشد. تعدادی از مولکول‌های سیگنال سلولی که به‌وسیله کمپلکس پروتئین حرارتی ۹۰ چپرون می‌شوند عبارتند از: خانواده پروتئین‌های Raf (A-Raf, Raf-1, B-Raf) [۱۱،۱۰]، Mek1/2 [۸]، Erk [۸]، Src

[1] استادیار، مرکز تحقیقات علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

[2] گروه آناتومی و بیولوژی سلولی ملکولی، دانشگاه ساسکاچوان، کانادا

*نشانی نویسنده مسئول:

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

تلفن: ۰۹۱۲ ۸۱۲۴۸۴۳ دورنویس: ۰۳۶۱ ۵۵۵۱۱۱۲

پست الکترونیک: alt365@mail.usask.ca

تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۱۲ تاریخ پذیرش نهایی: ۹۰/۸/۳۰

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-06-08]

[۱۲]، Cdk4 [۱۳]، و CKIIB [۱٤]. Cdc37 بـه‌همـراه تعـدادی از سوبستراهای پروتئین حرارتی ۹۰ دیده شده است [۱۵]. ایزوفرم‌هـای پروتئین حرارتی ۹۰ در مهره‌داران متکامل‌تر به‌وسیله دوژن *hsp90α* و *hsp90β* کد می‌گردد [۱۷،۱٦]. ترادف اسـید آمینـه HSP90α و HSP90β در مهره‌داران تقریبا ۸۱ درصد مشابه یکدیگر است [۱۸]. اگر چه هر دو ایزوفرم در شرایط نرمال بیان می‌شـوند، امـا انـواع مختلف استرس از جمله استرس حرارتی بیان آنها را بـا درجـات مختلفی افزایش می‌دهد. مـثلا در مـاهی گـورخر (Zebra fish) استرس حرارتی باعث افزایش زیاد بیـان *hsp90α* مـی‌گـردد، در حالی‌که بیـان *hsp90β* تغییـر زیـادی نمـی‌کنـد [۱۹]. اگـر چـه هتروکمپلکس پروتئین حرارتی ۹۰ به‌طور گسترده‌ای مورد مطالعـه قرار گرفته است، امـا مقایـسه عملکـرد دو ایزوفـرم HSP90α و HSP90β در این هتروکمپلکس مشخص نیست. در مطالعه حاضر پروتئین‌های علامت دار HA (Hemoglutanin, HA) پـروتئین حرارتـی ۹۰ آلفـا و پـروتئین حرارتـی۹۰ بتـا از گـورخر مـاهی (Zebrafish) در سلول‌های NIH3T3 و اُاُسیت‌هـای *Xenopus* بیان گردید. استفاده از دو سیستم مختلف برای بیان این پروتئین‌هـا به‌منظور مقایسه فعالیت این دو پروتئین در دو سیستم مختلف می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کلون کردن: برای کلون کردن ترادف کامـل cDNA ژن‌های پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا و بتای گورخر ماهی از پلاسـمیدهـای مربوطه (با شماره‌های دسترسی بانـک ژنـی بـه ترتیـب Q90474، AAC21566.1) استفاده گردید. در روش PCR از پرایمرهای

(5'-CGGGGGATCCATGCCTGAGGCTCA CGAG CAG-3',
5'-GCCCGAATTCTTAGTCGACTTCCTC CATT CT-3')
(5'CGGGGGATCCATGCCTGAAGAAAT GCGCCCA-3',
5'GCCCGAATTCTTAATCGACTTCCTC CATGC-3')

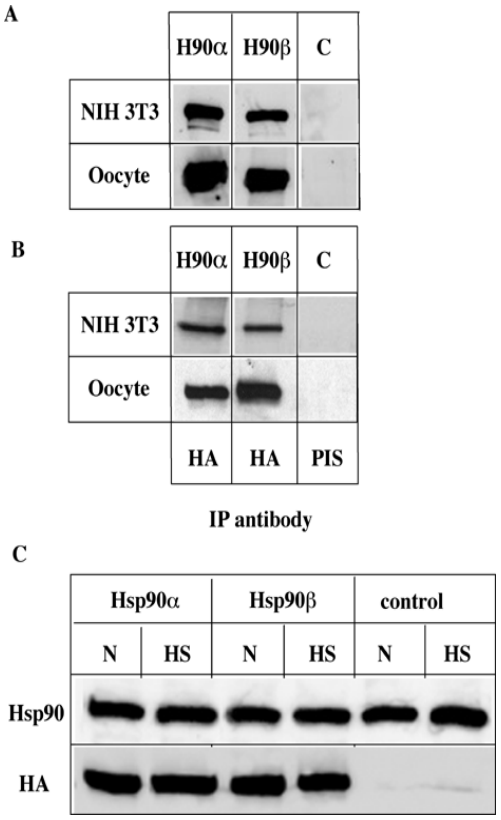
به‌ترتیب برای پـروتئین حرارتـی ۹۰ آلفـا و بتـا اسـتفاده گردیـد. محصول PCR در وکتورهای قابل بیان در سلول‌های یوکاریوتیک (pCMV) کلون گردید. با طراحی پرایمرها، هر دو cDNA های تکثیر شده از پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا و بتا در ناحیه '5 دارای یک محل برش برای آنزیم BamH1 و در ناحیه '3 دارای یـک محـل برش برای آنزیم EcoR1 بودند. محـصول PCR بـا آنـزیم‌هـای BamH1 و EcoR1 بـرش داده شـده و سـپس بـه‌داخـل یـک پلاسمید HA3-CMV برش داده شده با آنزیم‌هـای BamH1 و EcoR1 کلون گردید. پلاسمید HA3-CMV یک فرم تغییر یافته از پلاسمید pACTAG2 می‌باشد. پلاسمیدهـای بـه‌دسـت آمـده دارای HA-HSP90α , و یا HA- HSP90β می‌باشند. محصول حاصل از بیان پلاسـمیدهای فـوق پـروتئین حرارتـی ۹۰ آلفـا و پروتئین حرارتی۹۰ بتا علامت‌دار شده با پرچم HA در ناحیـه '5 می‌باشند.

اُاُسیت‌های *Xenopus Laevis*

قورباغـه‌هـا از موسـسه Xenopus I, Inc., Dexter Mich., USA خریداری گردیدند. تمام آزمایشات طبق راهنما و دستورالعمل‌های کار و نگهداری از حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفته و به‌وسیله کمیتـه اخـلاق دانـشگاه ساسـکاچوان تـصویب گردید. اُاُسیت‌ها به‌روش جراحی از قورباغه ماده خارج گردیـد و به‌کمک محلول بـدون کلـسیم OR-2 (82.5 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM NaH_2PO_4, 5mM HEPES (pH 7.8), 10 mg/L of streptomycin sulfate, 10 mg/L benzylpenicillin) فولیکول زدایی (حذف لایه چسبنده اطراف) و به‌صورت ااسیت‌های منفرد آماده شدند. فولیکول‌زدایـی در بـافر OR-2 به‌مدت دو ساعت بر روی دستگاه به هم‌زن افقی در درجه حرارت ۱۸°C انجام گرفت. فولیکول‌ها چندین بار به‌خوبی با بافر OR-2 شستشو داده شده و به‌مدت ۲٤ سـاعت در OR2 حـاوی ۱ mmol/L کلروکلسیم در درجه حرارت ۱۸°C نگهداری شده تا ریکاوری گردند. اُاُسیت‌های سالم مرحله VI انتخاب گردیده و به‌کمک دستگاه تزریق میکرونی (Narashige, IM300) مقدار ۰/۵ نانوگرم از پلاسمید CMV-HA-HSP90α و یـا CMV-HA-HSP90β به‌داخل هسته آنها تزریـق گردیـد. پـس از نگهـداری اُاُسیت‌ها در ۱۸°C برای یک شب برای بیان پروتئین‌ها، گروهی از آنها برای شوک حرارتی در داخل پتری دیش بـه‌کمـک پـارافیلم سیلد شده و به‌مدت یک‌ساعت در داخل حمام آب گـرم (۳۳°C) قرار گرفتند. بلافاصله بعد از این مرحلـه، اسـتخراج پـروتئین از گروه کنترل (در ۱۸°C) و شوک حرارتی (۳۳°C) انجـام گرفـت. برای استخراج پـروتئین از بـافر C (pH 7.9), 20% (v/v) glycerol, 50mM KCl, and 0.1mM EDTA (pH 8.0),) (50 mM Tris-HCl برای استفاده در ایمونوبلاتینگ و یـا از بـافر IP (Bharadwaj 1999) (20mM Tris pH 7.4, 5 mM 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 Na-orthovanadate, 50 mM KFl, and 4% Triton X-100, 10μg/ml aprotinin, 10μg/ml leupeptin and 2 mM DTT) برای استفاده در رسوب ایمنی از روش ذکر شـده توسـط Jing و همکاران [۲۰] استفاده گردید. برای هـر اُاُسـیت مقـدار۱۰ میکرولیتر از بافر C و یا ۱۵ میکرولیتر از بافر IP اضـافه گردیـده، به‌کمک میکروپیپت هموژن شده و به‌مـدت ۱۰ دقیقـه بـا نیـروی

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-06-08]

10000g سانتریفیوژ گردیدند.



شکل شماره ۱- بیان پروتئین‌های حرارتی ۹۰ آلفا و بتای نشان‌دار شده با HA در اُاُسیت‌ها و سلول‌های NIH3T3 . (A) برای بیان پروتئین‌های نشان‌دار، سلول‌ها با پلاسمیدهای HA-HSP90α یا HA-HSP90β ترنسفکت شدند و به هسته اُاُسیت‌ها مقدار ۱۵ نانوگرم از پلاسمیدهای فوق تزریق گردید. ۲٤ ساعت پس از بیان پروتئین سلول‌ها و یا اُاُسیت‌ها بروش وسترن بلات با آنتی‌بادی ضد HA (A) شناسایی گردیدند. (B) رسوب ایمنی با آنتی‌بادی ضد HA انجام شده و سپس محصول رسوب ایمنی به‌روش وسترن بلات با آنتی بادی ضدپروتئین حرارتی ۹۰ شناسایی گردید. (C) پروتئین‌های تولید شده پس از استرس حرارتی شناسایی گردیدند. نمونه‌های کنترل C، نمونه‌های ترنسفکت نشده و یا تزریق نشده می‌باشند.

کشت سلول‌های N1H3T3

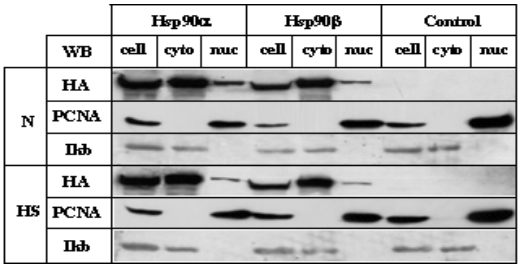
سلول‌های N1H3T3 در محیط کشت DMEM (GIBCO Cat. No. 41500-034), که دارای ۱۰ درصد FBS و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و استریتوماسین بود، و در انکوباتور مرطوب ۳۷°C با ۵ درصد CO_2 کشت داده شدند. سلول‌ها در مرحله فراوانی ۷۵-۷۰ درصد با پلاسمیدهای مورد نظر ترانسفکت شدند و تا مرحله فراوانی سلولی ۱۰۰-۹۰ درصد استخراج پروتئین صورت گرفت. ترانسفکت کردن سلول‌ها به‌وسیله لیپوفکتامین پلاس(Invitrogen Life Technologies) و استفاده از پلاسمیدهای HA-HSP90β و یا HA-HSP90α صورت گرفت. برای گروه کنترل از وکتور خالی pCMV استفاده گردید. سلول‌ها یا در ۳۷ °C (گروه کنترل) و یا به‌مدت یک‌ساعت در انکوباتور ٤۲°C (گروه شوک حرارتی) نگهداری گردیدند. برای استخراج پروتئین از روش Anderson و همکاران [۲۱] استفاده گردید. در ابتدا سلول‌ها سه بار با PBS سرد آبکشی شدند و بر روی ظرف یخ قرار گرفتند. سپس برای هر بشقاب ۱۰۰ میلی‌متری مقدار ۸۰۰µl از بافر سرد RIPA (50 mM Tris (pH 8), 150 mM NaCl, 0.1 % (w/v) SDS, 0.5 % sodium deoxycholic acid, 1% NP-40, 10µg/ml aprotinin, and 10 µg/ml leupeptin) اضافه گردید. با یک پاروی کوچک سلول‌ها و بافر لیزکننده مخلوط شده و سپس به‌کمک یک سرنگ با سوزن ۵/۸ هموژنیزه شده و با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm به‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محصول فوقانی به لوله جدیدی منتقل گردیده و در فریزر ۷۰°C- نگهداری گردید.

روش کار رسوب ایمنی

در رسوب ایمنی [۲۱] تمام مراحل بر روی یخ و یا در ٤°C صورت گرفت. تراکم پروتئین کلی نمونه‌ها به‌کمک کیت لوری (TP0300 lowry L.T siqma) صورت گرفت. برای پاک‌سازی اولیه محلول پروتئین کلی برای رسوب ایمنی مقدار ۸۰۰µl از پروتئین کلی با ۲۰ µl از سوسپانسیون پروتئین جی (Sigma Cat N P-3296) و ۳ میکروگرم از IgG نرمال موش مخلوط شده و به‌مدت ۲ ساعت در ٤ °C با چرخش آرام نگهداری شد. پس از ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰ rpm، محصول فوقانی به لوله جدیدی منتقل گردید تا برای رسوب ایمنی مورد استفاده قرار گیرد. ابتدا کمپلکس آنتی‌بادی- پروتئین جی آماده گردید. برای هر آزمایش رسوب ایمنی مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از پروتئین جی (pre-swollen Protein G-sepharose) با PBS شستشو داده شده و با ۵ میکروگروم از آنتی‌بادی و ۸۰۰ میکرولیتر از بافر RIPA مخلوط گردیده و به‌مدت ٤ ساعت با حرکت آرام نگهداری گردید. سپس، نمونه‌ها به‌مدت ۲ دقیقه با دور ۱۰۰۰G سانتریفیوژ شده و رسوب با ۵۰۰ میکرولیتر بافر RIPA شستشو داده شده، محصول کمپلکس آنتی بادی-پروتئین جی به ۸۰۰ میکرولیتر پروتئین پاکسازی شده اضافه گردید و به‌مدت ۱ شب با حرکت آرام در ٤°C نگهداری گردید. سوپر ناتانت دور ریخته شده و رسوب با ٤۰ میکرولیتر بافر لاملی (Laemmli buffer)

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-06-08]

مخلوط شده و در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. آنتی‌بادی‌های استفاده شده در این تحقیق عبارتند از: Casein kinase IIβ (sc-12739), c-Src (sc-5266), IkB-α (sc-847), PCNA (sc-56) and Erk (sc-94) از شرکت Santa Cruz، Mek (9122), phospho Mek (9121) and phospho Erk (9101) از شرکت Cell Signalling، Cyp-40 (PA3-023), FKBP51 (PA-020), HSF1 (PA3-017); hsp70 (MA3-006), P23 (MA3-414) and Cdc37 (MA3-029) از شرکت Affinity BioReagents و آنتی بادی‌های Hip (SPA-766), p60 (SRA-1500, FKBP52 (SRA-1400) and HSF1 (SPA-901) از شرکت Stressgen.



شکل شماره ۲- توزیع سلولی پروتئین‌های حرارتی ۹۰ آلفا و بتای نشان‌دار شده با HA در اُاُسیت‌ها. اُاُسیت‌ها 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 اُاُسیت‌ها از هسته جدا سازی گردیده و پروتئین کلی هر بخش به‌روش وسترن بلات با آنتی‌بادی‌های ضد HA ، PCNA (مارکر سیتوپلاسمی) و IkB (مارکر هسته‌ای) مورد آزمایش قرار گرفتند.

آنالیز وسترن بلات

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

نتایج

بیان پروتئین‌های حرارتی ۹۰ آلفا و بتا (HSP90β, HS90α) در اُاُسیت و بررسی محل بیان آنها در داخل سلول.

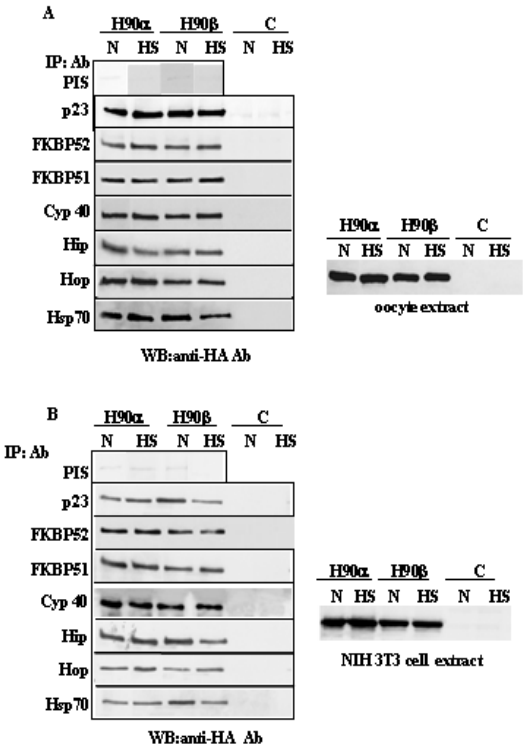
هدف اصلی این مطالعه بررسی تفاوت احتمالی واکنش ایزوفرم‌های پروتئین حرارتی ۹۰ (HSP90β,HSP90α) با کوچپرون‌ها بود. ابتدا هر یک از ایزوفرم‌ها به‌تنهایی در سلول NIH3T3 یا اُاُسیت‌های *Xenopus* بیان گردید. شکل شماره یک بیان این پروتئین‌ها را در گروه‌های مختلف پروتئین‌های سلول یا اُاُسیت نشان می‌دهد که به‌وسیله وسترن بلات با آنتی‌بادی HA نشان داده شده است (شکلHA). در نمونه‌های کنترل (سلول‌های ترانسفکت نشده و یا اُاُسیت‌های 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 ایمنی (IP) نشان داد که آنتی‌بادی HA به‌طور اختصاصی پروتئین‌های حرارتی ۹۰ آلفا و بتا که با پرچم HA علامت‌دار شده‌اند (HA-HSP90β, HA-HSP90α) را رسوب می‌دهد. ما هنوز نمی‌دانیم که آیا پروتئن‌های بیان شده با پروتئین‌های خود سلول و یا اُاُسیت فرم دایمر را تولید می‌کنند یا خیر. به‌دنبال بیان پروتئن، محل تمرکز داخل سلولی این پروتئین‌ها در اُاُسیت‌ها در گروه کنترل (۱۸°C) و پس از شوک حرارتی (۳۳°C) مورد بررسی قرار گرفت. عمده 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 بلات نشان داد که پروئین‌های بیان شده باعث افزایش مهمی در تراکم کلی پروتئین اُاُسیت‌ها نمی‌گردند.

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، HSP70، P23، HSP40، CyP40، P60، FkBP52، KBP51 مورد بررسی قرار گرفت. روش کار بدین ترتیب بود که هر یک از کوچپرون‌ها را به‌تنهایی رسوب ایمنی داده و مقدار پروتئین‌های حرارتی ۹۰ آلفا و بتا که همراه با کوچپرون‌ها رسوب داده شده است را با آنتی بادی ضد HA با وسترن بلات 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 کوچپرون-ها تقریبا مقادیر مساوی از پروتئین‌های حرارتی ۹۰ آلفا و بتا را به-همراه خود رسوب دادند؛ اگر چه تفاوت‌های جزیی در بعضی مواقع 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 به‌هر حال در مجموع کوچپرون‌ها واکنش قوی با هر دو پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا و بتا را

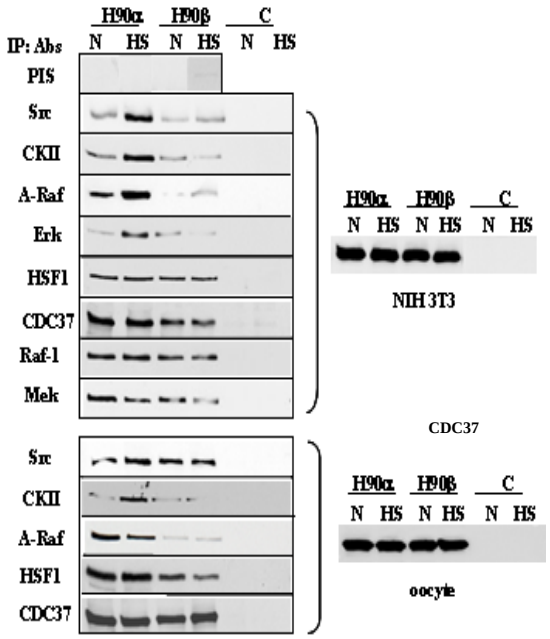
[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-06-08]

نشان دادند. برای پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا هیچ تفاوت مهمی در همراهی کوچپرون‌ها در آزمایشات رسوب ایمنی در شرایط نرمال و یا استرس حرارتی دیده نشد. به‌علاوه، نتایج مشابه‌ای در سلول NIH3T3 و اُاُسیت‌های *Xenopus* به‌دست آمد (شکل شماره ۳).



شکل شماره ۳- واکنش پروتئین‌های حرارتی ۹۰ آلفا و بتا با کوچپرون‌ها. پروتئین‌های کلی اُاُسیت‌ها و یا سلول‌های NIH3T3، با یکی از آنتی بادی‌های ذکر شده در شکل، تحت آزمایش رسوب ایمنی قرار گرفتند. محصول رسوب ایمنی برای شناسایی پروتئین-های نشاندار شده با HA به‌روش وسترن بلات مورد آزمایش قرار گرفت. مقادیر مساوی از نمونه‌های پروتئینی به‌روش وسترن بلات با آنتی‌بادی ضد HA مورد آزمایش قرار گرفتند تا از بیان نسبتا 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 سوبسترای هتروکمپلکس پروتئین حرارتی ۹۰ در شرایط نرمال و استرس حرارتی از همان روش کار برای مقایسه‌ای واکنش هر یک از این پروتئین‌ها با پروتئین‌های سوبسترایی HSP70، Erk1/2، Mek1، Cdc37، CkIIB، c-Src، Raf-I، و A-Ral استفاده شد. نتایج نشان داده شده در شکل ٤ نشان می‌دهد که مقادیر مساوی از هر یک از ایزوفرم‌ها به‌همراه پروتئین‌های سوبسترای MEK1، Cdc37، Raf1، و HSF1 رسوب نموده و واکنش هر یک از پروتئین‌های حرارتی ۹۰ آلفا و بتا با پروتئین‌های سوبسترای فوق با استرس حرارتی تغییر نکرد. هر دو پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا و بتا با پروتئین‌های Erk، CKIIB، c-Src، و A-Raf1 واکنش نشان دادند. واکنش پروتئین حرارتی بتا با پروتئین‌های سوبسترای فوق در شرایط نرمال و استرس حرارتی فرقی نمی‌کرد. در مقایسه مشاهده شد که پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا واکنش قوی‌تری را با پروتئین‌های سوبسترای Erk، CKIIB، c-Src، و A-Raf1 در شرایط استرس حرارتی دارد (شکل شماره ٤). این نتایج در اُاُسیت‌ها و همین‌طور سلول‌های NIH3T3 دیده شد. واکنش A-Raf-1 در سلول‌های NIH3T3 پس از استرس حرارتی افزایش یافت، اما در اُاُسیت *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 پروتئین-های سوبسترایی می‌باشد.



شکل شماره ٤- واکنش پروتئین‌های حرارتی ۹۰ آلفا و بتا با سوبستراها. پروتئین‌های کلی اُاُسیت‌ها و یا سلول‌های NIH3T3، با یکی از آنتی‌بادی‌های ذکر شده در شکل، تحت آزمایش رسوب ایمنی قرار گرفتند. محصول رسوب ایمنی برای شناسایی پروتئین-های نشان‌دار شده با HA به‌روش وسترن بلات مورد آزمایش قرار گرفت. مقادیر مساوی از نمونه‌های پروتئینی به‌روش وسترن بلات با آنتی‌بادی ضد HA مورد آزمایش قرار گرفتند تا از بیان نسبتا مساوی پروتئین‌های نشان‌دار اطمینان حاصل گردد.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-06-08]

بحث

این مطالعه اولین مقایسه سیستماتیک ایزوفرم‌های پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا و بتا در رابطه با واکنش با کوچپرون‌ها می‌باشد. روش کار ما شامل بیان مقادیر کم پروتئین‌های علامت‌دار پروتئین حرارتی ۹۰ 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 آنتی بادی مربوط رسوب داده شده و ایزوفرم‌های پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا و یا بتا که به‌همراه کوچپرون‌ها رسوب داده شده بودند، به‌کمک وسترن بلات مقایسه گردیدند. علامت‌دار کردن پروتئین‌ها برای اجتناب از استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا و بتا به‌علت احتمال وجود واکنش متقارب (Cross reactivity) آنها برای ایزوفرم دیگر صورت گرفت. شرایط آزمایش طوری کنترل شد که مقادیر مساوی از ایزوفرم‌ها در سلول‌های NIH3T3 و یا اُاُسیت‌ها بیان گردد. هر دو ایزوفرم‌های بیان شده عمدتا در سیتوپلاسم متمرکز 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 پراکندگی داخل سلولی مشابه با پروتئین‌های خود سلول 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 عمده آزمایشات در دو سیستم متمایز کشت سلولی پستانداران (NIH3T3) و اُاُسیت‌های *Xenopus* انجام گرفته است و نتایج مشابهی به‌دست آمده است. اولین نتیجه‌گیری عمده این است که پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا و پروتئین حرارتی ۹۰ بتا به‌طور مشابه با اجزاء هتروکمپلکس چپرونی پروتئین حرارتی ۹۰ واکنش می‌کنند. نتایج رسوب ایمنی (IP) نشان داد که هر یک از پروتئین‌های HSP70، P23، HSP40، CyP40، FKBP52, P60، و یا FKBP51 به‌همراه خود تقریبا مقادیر مساوی از پروتئین‌های حرارتی ۹۰ آلفا و بتا را رسوب دادند (شکل شماره ۳ الف و ب). یکی دیگر از مشاهدات مهم این بود که استرس حرارتی تغییرات مهمی در واکنش پروتئین‌های حرارتی ۹۰ آلفا و بتا با کوچپرون‌ها ایجاد نکرد، بنابراین شرایط استرس ظاهرا تأثیری بر روند تشکیل کمپلکس چپرون پروتئین حرارتی ۹۰ در رابطه با نوع ایزوفرم ندارد. مهم‌تر از همه اینکه نتایج حاضر از مدلی حمایت می‌کند که در آن هر یک از پروتئین‌های حرارتی ۹۰ آلفا و بتا در فعالیت معمولی هتروکمپلکس پروتئین حرارتی ۹۰ شرکت می‌کنند و هیچ اختصاصیت واکنش با HSP40، HSP70، HOP و یا هیچ‌یک از ایمونوفیلین‌ها ندارند. این یافته‌ها پیشنهاد می‌کند یک توزیع غیرانتخابی از ایزوفرم‌های HSP90 در هتروکمپلکس HSP90 وجود دارد. دومین نتیجه‌گیری عمده این است که اگر چه هر دو پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا و بتا با تعدادی از پروتئین‌های سوبسترابی در شرایط عادی واکنش می‌کنند، اما پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا یک واکنش قوی‌تری را با بعضی از سوبستراها در شرایط استرس حرارتی نشان می‌دهد. این واکنش در مورد CKIIB، Erk، ARaf، و c-Src دیده شد، ولی استثنائا در مورد A-Raf در اُاُسیت کاهش دیده شد. اهمیت واکنش قوی‌تر پروتئین حرارتی آلفا با تعداد به‌خصوصی از سوبستراها این است که هیچ تفاوتی در واکنش نسبی هر یک از ایزوفرم‌ها با تعداد زیادی از پروتئین‌های سوبسترا یعنی MEK1، Cdc37، HSP70 و یا Raf1 دیده نشد (شکل شماره ٤). آزمایشات رسوب ایمنی در سیستم اُاُسیت‌ها تکرار گردید و مشاهدات عمدتا در دو سیستم مشابه بود. ذکر این نکته اهمیت دارد که نتایج حاصل ناشی از بیان بیشتر پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا در شرایط استرس حرارتی نبود، چون بیان پروتئین علامت‌دار HA تحت کنترل پروموتور قابل تحریک با استرس نبود. به‌هرحال، نتایج تفاوت عملکرد این ایزوفرم قابل تحریک (پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا) را نشان می‌دهد. این اطلاعات پیشنهاد می‌کند که این ایزوفرم‌های مشابه که به‌ندرت در مطالعات بیوشیمیایی از یکدیگر تفکیک می‌گردند، ممکن است نقش‌های متفاوتی را در سلول داشته باشند. اهمیت دقیق این یافته‌ها و اهیمت نتایج عملکرد آن نیاز به بررسی‌های دقیق‌تری دارد. مکانیسم واکنش تقویت شده پروتئین حرارتی ۹۰ آلفا با CKIIB، Erk، A-Raf1، 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 ۹۰ و پروتئین‌های B-Raf، Raf-1 قبلا گزارش شده است [۲۲]. این واکنش باعث حساسیت عملکرد Raf به جلدانامایسین می‌گردد [۲۳]. واکنش بین پروتئین حرارتی ۹۰ و Erk قبلا در مطالعات رسوب ایمنی نشان داده شده است [٢٤]، و واکنش هر دو c-Src و v-Src با پروتئین حرارتی ۹۰ 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 ۹۰ بعد از استرس حرارتی به‌وجود می‌آید (شکل شماره ٤). هنوز مشخص نیست که اتصال پروتئین حرارتی ۹۰ 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 ۹۰ آلفا می‌گردد. یکی از اعضاء

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-06-08]

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 به‌هم 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 فسفوریلاسیون CKIIB کمک کرده و یا اینکه این کیناز یک نیاز بیشتری به چپرون 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 چپرونی پروتئین حرارتی ۹۰ و واکنش متمایز تعدادی از پروتئین‌های سوبسترایی 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 به‌عمل 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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-06-08]

[20] Jing J, Chikvashvili D, Singer-Lahat D, Thornhill WB, Reuveny E, Lotan I. Fast inactivation of a brain K+ 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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-06-08]