فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال چهارم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۵

شناسایی و آنالیز توالی cDNA کد کننده پروتئین شوک حرارتی ۹۰ کیلو دالتون (Hsp90) در ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*)

مریم ایزددوست کردمحله[۱]، حسین غفوری[۲]*، سجاد ساری‌خان[۳]، بهروز حیدری[۲،۴]

تاریخ دریافت: آذر ۹۵ تاریخ پذیرش: اسفند ۹۵

چکیده

پروتئین‌های شوک حرارتی (Hsp) گروهی مهم از چاپرون‌ها هستند که وظیفه اصلی آن‌ها نظارت بر تاخوردگی پروتئین‌های درون سلولی است. پروتئین Hsp90 یکی از مهم ترین پروتئین های شوک حرارتی هستند که در سلول بوفور دیده می شود (حدود ٪۲-۱ از کل پروتئین‌های سلول). همچنین Hsp90 در دیگر فعالیت های سلولی مانند کمپلکس پروتئین‌های مسیرهای انتقال پیام نقش دارند. در این پژوهش Hsp90 گونه *Rutilus frisii kutum* ماهی سفید دریای خزر که گونه بومی ایران است مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی که اطلاعاتی در مورد توالی ژن Hsp90 در ماهی سفید دریای خزر در دست نبود، توالی این ژن به کمک تکنیک PCR و توالی‌یابی محصول PCR از بافت کبد ماهی به دست آمد. نتایج نشان داد که این توالی همولوژی بالای ۹۷ درصد با Hsp90 گونه‌های *Cyprinus carpio* و *Gobiocypris rarus* داشت. طول کامل ژن Hsp90 مورد مطالعه ۲۱۸۱ نوکلئوتید مطابق با ۷۲۷ ریشه آمینو اسید به دست آمد.

واژگان کلیدی: *چاپرون، پروتئین شوک حرارتی، Hsp90*، Rutilus frisii kutum.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۲- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۳- مربی پژوهشی بخش بانک مولکولی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، تهران، ایران.
۴- استادیار گروه علوم دریایی، پژوهشکده حوضه آبی دریای خزر، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
* نویسنده مسئول: h.ghafoori@guilan.ac.ir

مقدمه

تاخوردگی صحیح پروتئین‌ها در سلول از جمله امور مهمی است که همواره باید با دقت تحت نظر گرفته شود. اگر این مرحله از تولید پروتئین دچار نقص شود، نتیجه آن، تولید پروتئین‌های غیرفعالی است که بر روی هم دیگر انباشته می‌شوند که خود باعث ایجاد اختلال در کار سلول می‌شود (Mortensen, 2005 Sorensen and). چاپرون‌ها، مولکول‌های پروتئینی هستند که نقش اصلی آن‌ها نظارت در انجام صحیح تاخوردگی پروتئین است. به این ترتیب که اگر با پروتئینی با ساختار سوم ناصحیح برخورد کردند، با اتصال به آن به تاخوردگی صحیح آن کمک کرده و از انباشته شدن آن جلوگیری می‌کنند (and Pockley, 2005 Henderson). پروتئین‌های شوک حرارتی(Hsp)[1]از جمله این چاپرون‌ها هستند (,.2012 Leach et al). این پروتئین‌ها که هم در یوکاریوت‌ها و هم در پروکاریوت‌ها یافت می‌شوند، دارای تنوع بالایی هستند مانند Hsp40، Hsp60 و Hsp90. با وجود این که همه آن‌ها در ایجاد پروتئین با تاخوردگی صحیح نقش دارند (Didenko et al., 2012) اما این نقش را با مکانیسم‌های متفاوتی به انجام می‌رسانند.

Hsp90 از جمله مهم‌ترین Hspها است، زیرا در حالت عادی حدود ٪۱-۲ از کل پروتئین‌های سلولی را در یوکاریوت‌ها تشکیل می‌دهد (Hall et al., 2014). این پروتئین، علاوه بر نقشی که در تاخوردگی پروتئین‌ها دارد، در امور مهم دیگری از جمله انتقال پیام و تغییرات ریختی سلول، حائز اهمیت است. این پروتئین که فعالیت آن وابسته به هیدرولیز ATP است، به وسیله کوچاپرون‌های متفاوتی که به آن متصل می‌شوند و عملکرد آن را افزایش می‌دهند، می‌تواند نقش خود را ایفا کند (Rehn et al., 2016).

Hsp90 دارای سه دُمین است. دمین انتهای N، که جایگاه اتصال کوچاپرون‌ها و ATP است، دمین میانی که به هیدرولیز ATP در دمین انتهای N کمک می‌کند و بالاخره دمین انتهای C که جایگاه جفت‌شدگی پروتئین است (Beebe et al., 2013). همان طور که ذکر شد، Hsp90 دارای قابلیت جفت شدن است، در واقع تنها در این صورت می‌تواند فعال شود. بعد از ایجاد ساختار هومودیمر، این پروتئین به شکل بسته درمی‌آید و در این صورت می‌تواند ATP را هیدرولیز کند.

1 Heat Shock Protein

از آنجا که Hsp90 دارای فعالیت گسترده در سلول است و نقش کلیدی در بقای آن ایفا می‌کند، همواره مورد توجه پژوهشگران قرار داشته است. تا کنون مطالعات ساختاری و عملکردی و پژوهش‌های دارویی فراوانی بر روی این پروتئین صورت پذیرفته است. برای مثال، از آنجا که این پروتئین نقش مهمی در القای آپاپتوز دارد (Hartson and Matts, 2012)، در مطالعات مربوط به سرطان دارای اهمیت ویژه‌ای است و به عنوان یک مولکول هدف در سلول‌های سرطانی از آن استفاده می‌شود. به علاوه، امروزه پژوهشگران در پی تولید و توسعه داروهایی هستند که با از کار انداختن عمل هیدرولیز ATP در Hsp90 سلول‌های سرطانی، مرگ آن سلول‌ها را تسهیل می‌کنند. این امر می‌تواند از طریق مولکول‌های مشابه ATP انجام شود، زیرا آن‌ها بعد از اتصال به دمین N پروتئین مذکور، ساختار بسته را در آن القا کرده و از فعالیت بیشتر آن جلو گیری می‌کنند (Hall et al., 2014). در پژوهش‌های صورت گرفته، دیده شده است که در انواع ماهی‌ها هم در صورت ایجاد شوک دمایی (هم در دمای پایین‌تر از حد معمول و هم بالاتر از دمای معمول زیستگاه هر گونه) و هم شوک‌های اکسیداتیو، میزان تولید تمامی Hspها به ویژه Hsp90 افزایش می‌یابد. در نتیجه فعالیت Hspها، نه تنها از بین رفتن ساختار طبیعی پروتئین‌های سلولی جلوگیری می‌شود بلکه، به تاخوردگی مجدد پروتئین‌های آسیب دیده و از بین بردن پروتئین‌های انباشته شده کمک می‌شود (Oksala et al., 2014). از این رو، پژوهش بر روی Hsp90 در ماهی‌ها حائز اهمیت است زیرا، داشتن اطلاعات بیشتر در مورد این پروتئین‌ها در ماهی‌ها به پرورش بهتر ماهیان و همچنین حفاظت بیشتر از آن‌ها در زیست‌بوم خود کمک می‌کند.

یکی از ملزومات پژوهش در مورد Hsp90، داشتن اطلاعات کافی درباره ساختمان و ساختار اولیه یا همان توالی آمینو اسیدی این مولکول است. این امر می‌تواند از طریق به دست آوردن توالی نوکلئوتیدی پروتئین ذکر شده انجام گیرد. در این پژوهش تلاش شده است که توالی نوکلئوتیدی Hsp90 در گونه *Rutilus frisii kutum* (ماهی سفید دریای خزر) که گونه بومی دریای خزر است، برای اولین بار مشخص شود. با در دست داشتن اطلاعات نوکلئوتیدی ژن این پروتئین امکان پژوهش‌های ساختاری و عملکردی آن در آینده فراهم می‌آید.

مواد و روش‌ها

ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) نر زنده (با وزن۳۰±۷۰۰ گرم) به تعداد ۵ قطعه از مرکز تکثیر، پرورش و بازسازی ذخایر ماهیان استخوانی شهید انصاری رشت تهیه شد. بافت کبد ماهی برای استخراج RNA جدا شد و در دمای منفی۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج RNA

به منظور استخراج RNA از بافت، از بافر TRIzol (Invitrogen، آمریکا) استفاده شد. مراحل کار بدین شکل بود که بعد از اضافه کردن ۱ میلی‌لیتر از بافر به ۵۰ میلی گرم بافت هموژنیزه شده، نمونه به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شد. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه شد، بعد از ۲-۳ دقیقه نگه‌داری در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ (Hettich، آلمان) شد و فازهای رویی، میانی و پایینی تشکیل شدند. فاز رویی که حاوی RNA بود، برای ادامه کار مورد استفاده قرار گرفت. در ادامه، به آن ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه نگه‌داری در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی بیرون ریخته شد و ۱ میلی‌لیتر اتانول ٪۷۵ به رسوب اضافه شد. بعد از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۷۵۰۰g، بار دیگر مایع رویی دور ریخته شد. رسوب بعد از خشک شدن در دمای اتاق، در ۵۰ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC حل شد. در نهایت RNA به دست آمده، توسط الکتروفورز ژل آگاروز ٪۱ مشاهده شد.

تولید cDNA و PCR

به منظور ساخت cDNA از RNA استخراج شده استفاده شد و مراحل کار بر اساس دستور العمل کیت خریداری شده از شرکت سازنده (cDNA Synthesis Kit Revertaid First Strand، Fermentas، آمریکا) دنبال شد.

پس از استحصال cDNA، از آن برای انجام PCR استفاده شد. برای انجام PCR، یک جفت آغازگر با استفاده از اطلاعات به دست آمده از هم‌ردیفی ژن hsp90 در چند گونه دیگر ماهی که توالی آن‌ها در NCBI موجود بود و از لحاظ تکاملی نزدیک به ماهی سفید دریای خزر بودند، به کمک نرم‌افزار Gene Runner طراحی شد. اطلاعات آغازگرها در جدول ۱ قابل مشاهده است.

جدول ۱: اطلاعات مربوط به آغازگرهای طراحی شده برای انجام PCR

آغازگر (′۳ → ′۵)	تعداد نوکلئوتیدها	دمای ذوب (درجه سانتی‌گراد)	توالی آغازگر
رفت	۲۱	۵۵	GTTGTGGACTCTGAAGATCGC
برگشت	۱۹	۵۰/۲	GCCTTCATGATCCTCTCAT

برای انجام PCR، ۰/۷ میکرولیتر از هر آغازگر (شرکت Macrogen، کره جنوبی) به همراه ۱ میکرولیتر cDNA و ۱۰ میکرولیتر Master Mix (شرکت TaKaRa، ژاپن) به میکروتیوب اضافه شد و به وسیله آب دو بار تقطیر به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسید. برای انجام PCR، دما و زمان دناتوراسیون اولیه به ترتیب ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ دقیقه تعیین شد. سپس همین دمای دناتوراسیون به مدت ۳۵ ثانیه اعمال شد و مراحل بعدی به ترتیب شامل، ۳۵ ثانیه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای اتصال[1] و ۱ دقیقه و ۲۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای مرحله طویل شدن[2] در نظر گرفته شد. این سه مرحله برای ۳۰ بار تکرار شدند و در نهایت با اعمال مرحله طویل شدن نهایی برای ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، PCR به اتمام رسید. در انتها برای اطمینان از نتیجه کار، مقدار ۴ میکرولیتر از محصول PCR در ژل آگاروز ٪۱ تزریق شد و مراحل الکتروفورز انجام شد. در نهایت با مقایسه نتیجه با مارکر DNA (SMBIO، تایوان) نتیجه تایید شد.

برای انجام TA کلونینگ، از وکتور pTZ57R/T استفاده شد که با انجام مراحل ذکر شده در کیت (Fermentas، آمریکا)، پس از وارد کردن ژن مورد نظر درون وکتور، سلول‌های DH5α به وسیله آن ترانسفورم شدند و بعد از کشت سلول‌ها در محیط Lauria-Bertani (NaCl ٪۱ و تریپتون ٪۱ و عصاره مخمر ٪۰/۵) با غلظت ٪۱، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ ساعت، تعداد کپی‌های بالایی از ژن درون وکتور حاصل شد.

در انتها توالی‌های به دست آمده به منظور تایید نهایی و همچنین تعیین توالی برای شرکت Macrogen ارسال شد. بعد از به دست آوردن

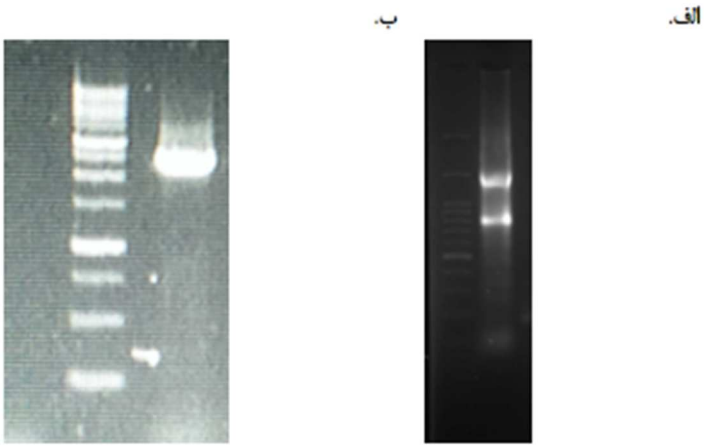
1 Annealing
2 Elongation

توالی، نتایج در پایگاه NCBI به وسیله BLAST مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

به منظور اطمینان از صحت cDNA تولید شده از RNA استخراج شده از کبد ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) نر (شکل ۱- الف) و همچنین اطمینان از این که آغازگرهای طراحی شده به درستی به منطقه مورد نظر از ژنوم متصل شده‌اند، پس از انجام PCR، محصول به وسیله الکتروفورز مشاهده شد. از آنجایی که انتظار می‌رفت طول محصول ۲۴۰۰bp باشد باید در ژل آگاروز باندی که نشان دهنده این طول ژن است، دیده شود. همانطور که در شکل ۱- ب دیده می‌شود، باند بسیار پررنگی در منطقه ۲۴۰۰bp حاصل شد و باند غیراختصاصی دیده نشد. این نتیجه نشان می‌دهد که با استفاده از آغازگرهای طراحی شده، در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد محصول PCR به دست آمده فاقد هر گونه محصول غیراختصاصی است.

به دست آمدن توالی نوکلئوتیدی و به دنبال آن توالی آمینو اسیدی پروتئین Hsp90 هدف نهایی کار بود این توالی در شکل ۲- الف دیده می‌شود. به دست آمدن این توالی به طور کامل، نشان دهنده این است که کلیه مراحل قبلی به درستی انجام پذیرفته است.



شکل ۱: تصویر ژل الکتروفورز آگاروز ٪۱. الف) نوار سمت چپ نشان دهنده DNA مارکر و نوار کنار آن نشان دهنده محل قرارگیری RNAهای استخراج شده است. نبودن باندهای غیراختصاصی نشان دهنده پایین بودن میزان آلودگی است. ب) محصول PCR در نوار سمت راست دیده می‌شود.

> *Rutilus frisii kutum* Heat shock protein 90

MPEEMRQDEEAETFAFQAEIAQLMSLIINTFYSNKEIFLRELISNASDALDKIRYESLTDPTKLDS
GKDLKIDIIPNVHDRTLTIIDTGIGMTKADLINNLGTIAKSGTKAFMEALQAGADISMIGQFGVG
FYSAYLVAEKVTVITKNNDDEQYAWESSAGGSFTVKVDNGEPIGRGTRVILHLKEDQTEYVEE
KRVKEVVKKHSQFIGYPITLFVEKERDKEISDDEAEEEKAEKEEKEEVEGEDKPKIEDVGSDDE
EDSKDKDKEKKKKIKEKYIDQEELNKTKPIWTRNPDDISNEEYGEFYKSLTNDWEDHLAVKHF
SVEGQLGVSRSFLYSRRAPFDLFENKKKKNNIKLYVRRVFIMDSCEELIPEYLNFIRGVVDSEDL
PLNISREMPLAGPPFNVIRKNIVKKCLELFAELAEDKENYKKFYDAFSKNLKLGIHEDSQNRKK
LSELLRYQSSQSGDEMTSLTEYVSRMKENQKSIYYITGESKDQVAHSAFVERVCKRGFEVLYM
TEPIDEYCVQQLKDFDGKSLVSVTKEGLELPEDEDEKKKMEEDKAKFENLCKLMEILDKKVEK
VTVSNRLVSSPCCIVTSTYGWTANMERIMKAQALRDNSTMGYMMAKKHLEINPDHPIMETLR
QKADVDKNDKAVKDLVILLFETALLSSGFSLDDPQTHSNRIYRMIKLGLGIDEDEDVPVEEPTSA
PAPEEIPPLEGDDDASRMEEVDStop

شکل ۲: توالی آمینو اسیدی پروتئین Hsp90 گونه *Rutilus frisii kutum*. توالی که زیر آن خط کشیده شده است، توالی نشان دهنده (Signature) را در تمامی Hsp90ها مشخص می‌کند. باقی مانده‌هایی که با رنگ زرد مشخص شده‌اند، دمین ATPase و باقی مانده‌هایی که با رنگ قرمز دیده می‌شوند، توالی اتصال به لیگاند را نشان می‌دهند.

بر اساس داده‌های به دست آمده از توالی‌یابی مشخص شد که این ژن از ابتدای نوکلئوتید شروع رونویسی تا انتهای کدون خاتمه شامل ۲۱۸۱ نوکلئوتید است و توالی آمینو اسیدی آن شامل ۷۲۷ باقی مانده آمینو اسیدی است. توالی ژن مورد نظر به منظور حصول اطمینان و همچنین بررسی‌های دقیق‌تر از جمله یافتن ژن‌های هومولوگ با بیشترین شباهت در گونه‌های دیگر مورد بررسی قرار گرفت که نتایج این بررسی در جدول ۲ دیده می‌شود. نتایج این بررسی‌ها نشان داد که از لحاظ ژنتیکی، این توالی بیشترین شباهت را با ژن hsp90 در گونه های *Cyprinus carpio* و *Gobiocypris rarus* دارد. همچنین شایان ذکر است که توالی به دست آمده دارای ٪۵۱/۳ باز G و C است و در پایگاه اطلاعاتی GenBank با کد دسترسی KX945368 ثبت شده است. در شکل ۲ توالی کامل باقیمانده‌های آمینو اسیدی پروتئین Hsp90 دیده می‌شود و نواحی مهم موجود در این توالی مشخص شده‌اند.

بررسی توالی باقی مانده‌های آمینو اسیدی پروتئین Hsp90 و مقایسه آن در سایر گونه‌ها نشان می‌دهد که این توالی تا حد زیادی حفاظت شده است و نواحی مختلف آن مانند دمین اتصال به لیگاند و ناحیه ATPase شباهت زیادی دارد. همچنین ناحیه‌ای تحت عنوان ناحیه مختص Hsp90 بدون هیچ گونه تغییر در تمامی آن‌ها وجود دارد (شکل ۳).

جدول ۲: اطلاعات به دست آمده از BLAST کردن و مقایسه اطلاعات توالی ژن hsp90 در گونه‌های مختلف

هم‌ردیفی	مقایسه طول ژن (نوکلئوتید)	همسانی (Identity) (٪)	درصد GC در گونه مقایسه شده (٪)
Rutilus frisii kutum/Cyprinus carpio	۲۱۸۱/۲۳۰۸	۹۷	۴۷/۹۶
Rutilus frisii kutum/Gobiocypris rarus	۲۱۸۱/۲۶۹۳	۹۶	۴۲/۴۸
Rutilus frisii kutum/Danio rerio	۲۱۸۱/۲۶۷۲	۹۱	۴۸/۹۳
Rutilus frisii kutum/Homo sapiens **(Hsp90 Alpha Isoform)**	۲۱۸۱/۲۰۲۱	۷۵	۴۱/۸۷

شکل ۳: نتایج بررسی توالی‌های اتصال به لیگاند در انتهای C. الف) توالی مخصوص Hsp90ها. ب) دمین ATPase. ج) گونه‌ای که با عدد ۱ نشان داده شده است *Rutilus frisii kutum*، گونه ۲ *Cyprinus carpio*، گونه ۳ *Danio rerio* (هر سه از خانواده کپورماهیان)، گونه ۴ *Gobiocypris rarus* و گونه ۵ انسان. همان گونه که در شکل مشخص است در توالی «الف» تنها یک مورد تفاوت و در توالی«ج» ۱۸ مورد تفاوت وجود دارد، اما در توالی «ب» هیچ گونه تفاوتی دیده نمی‌شود.

بحث

ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) مهم‌ترین ماهی استخوانی دریای خزر بوده، با توجه به ارزش غذایی بالا از اهمیت اقتصادی فراوانی برخوردار است. برای ایجاد شرایط صحیح در پرورش و تکثیر این ماهی، شناخت کامل فاکتورهای مولکولی مرتبط با سازگاری این جاندار، لازم و ضروری به نظر می رسد. پروتئین‌های شوک حرارتی نقش مهمی در سازگاری موجودات مختلف با شرایط تنشی دارند. از جمله فراوان‌ترین و مهم‌ترین این پروتئین‌ها Hsp90 است. ماهی‌ها مانند سایر موجودات همواره ممکن است در شرایطی قرار بگیرند که باعث ایجاد آسیب در سطح سلولی شود. از جمله این تنش‌ها تغییرات دمایی و استرس‌های اکسیداتیو است (Somero, 1992 and Dietz). در چنین شرایطی Hspهایی مانند Hsp90 با عملکرد خود به سایر پروتئین‌های سلولی کمک می‌کنند تا ساختار خود را حفظ کنند و از انباشتگی آن‌ها جلوگیری می‌کنند (Sorensen and Mortensen, 2005). در این پژوهش، پروتئین شوک حرارتی ۹۰ کیلودالتونی در ماهی سفید دریای خزر مورد بررسی قرار گرفت.

در اولین قدم، برای مطالعه پروتئین Hsp90 در ماهی سفید دریای خزر، ضروری بود تا توالی نوکلئوتیدی ژن بیان کننده این پروتئین و همچنین توالی آمینو اسیدی آن شناسایی و مشخص شود. بنابراین در مطالعه حاضر، هدف اصلی، به دست آوردن این دست اطلاعات بود که بر این اساس، توالی ۲۱۸۱ نوکلئوتیدی ژن مذکور به همراه توالی ۷۲۷ آمینواسیدی این پروتئین مشخص شد و همچنین اطلاعات به دست آمده از این توالی نشان دهنده همولوژی بالای این ژن با سایر کپورماهیان بود. در کل می توان گفت توالی بیان کننده این ژن تا حد زیادی در یوکاریوت‌ها حفاظت شده است. نتایج به دست آمده از این پژوهش، شباهت بالایی را بین این پروتئین و پروتئین مشابه در گونه‌هایی مانند *Cyprinus carpio* و *Gobiocypris rarus*

نشان داد. برای مثال با توجه به توالی آمینو اسیدی Hsp90 ماهی سفید دریای خزر، وزن مولکولی پیش‌بینی شده این پروتئین ۸۳/۰۸ کیلودالتون و pI آن ۴/۸۱ است و این مقدار برای *Gobiocypris rarus* به ترتیب ۸۳/۴ کیلودالتون و ۴/۹۰ است (Zhang et al., 2013). همچنین دیده شد که توالی آمینو اسیدی این پروتئین شباهت بالایی به توالی مشابه در ماهی گورخری (Zebrafish) دارد (۹۱٪) و می‌توان گفت که دلیل این شباهت این است که هر دوی آن‌ها از دسته کپورماهیان هستند. علاوه بر این شباهت بالای ۷۰ درصدی این توالی با توالی آمینو اسیدی Hsp90 در انسان نشان می‌دهد که این پروتئین دارای توالی ژنی حفاظت شده است. نکته جالب توجه این است که میزان همولوژی در ناحیه Signature Hsp90 (YSNKEIFLRE) تمامی گونه‌ها و انسان ۱۰۰٪ است که اهمیت این ناحیه را در عملکرد پروتئین به ویژه فعالیت ATPase نشان می‌دهد.

این اطلاعات راه را برای پژوهش‌های بعدی و کاربردی‌تر، مرتبط با این پروتئین، هموار کرده است. در مراحل بعدی می‌توان با کلون کردن ژن hsp90 این گونه در وکتور مناسب، آن را در میزبان *Escherichia coli* بیان کرد و پس از خالص‌سازی پروتئین نوترکیب مورد نظر، پژوهش‌های ساختاری و عملکردی بیشتری بر روی آن انجام داد.

به عنوان نتیجه‌گیری کلی، باید اشاره شود با توجه به این که عمده پراکنش ماهی سفید دریای خزر در دریای خزر مربوط به مناطق جنوبی و جنوب غربی این دریا است و همچنین از آنجایی که به عنوان یک ماهی اقتصادی ارزشمند برای کشور محسوب می‌شود، از این رو شناخت شاخص‌های مولکولی و بیوشیمیایی کلیدی این ماهی در مواجه با شرایط استرسی بسیار مهم است. بنابراین در این مطالعه توالی و ویژگی‌های آن مشخص شد و با دیگر گونه‌های ماهیان کپور و همچنین انسان مورد مقایسه و بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد شباهت‌های بسیار بالایی در دمین‌ها کلیدی همه موجودات مورد بررسی وجود داشت که نشان از اهمیت عملکردی این دمین‌ها دارد.

منابع

Beebe K., Mollapour M., Scroggins B., Prodromou C., Xu W., Tokita M. and Neckers L. 2013. Post-translational modification and conformational state of heat shock protein 90 differentially affect binding of chemically diverse small molecule inhibitors. Oncotarget, 4(7): 1065–1074.

Didenko T., Duarte A.M., Karagoz G.E. and Rudiger S.G. 2012. Hsp90 structure and function studied by NMR spectroscopy. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1823(3): 636–647.

Dietz T.J. and Somero G.N. 1992. The threshold induction temperature of the 90-kDa heat shock protein is subject to acclimatization in eurythermal goby fishes (genus *Gillichthys*). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 89(8): 3389–3393.

Henderson B. and Pockley G.A. 2005. Molecular Chaperones and Cell Signaling. Cambridge University Press, New York. 330P.

Hall J.A., Forsberg L.K. and Blagg B.S. 2014. Alternative approaches to Hsp90 modulation for the treatment of cancer. Future Medicinal Chemistry, 6(14): 1587–1605.

Hartson S.D. and Matts R.L. 2012. Approaches for defining the Hsp90-dependent proteome. Biochimica et Biophysica Acta, 1823(3): 656–667.

Leach M.D., Klipp E., Cowen L.E. and Brown A.J.P. 2012. Fungal Hsp90- A biological transistor that tunes cellular outputs to thermal inputs. Nature Reviews, Microbiology, 10(10): 693–704.

Oksala N.K.J., Ekmekci F.G., Ozsoy E., Kirankaya S., Kokkola T., Emecen G. and Atalay M. 2014. Natural thermal adaptation increases heat shock protein levels and decreases oxidative stress. Redox Biology, 3: 25–28.

Rehn A., Moroni E., Zierer B.K., Tippel F., Morra G., John C. and Buchner J. 2016. Allosteric regulation points control the conformational dynamics of the molecular chaperone Hsp90. Journal of Molecular Biology, 428(22): 4559–4571.

Sorensen H.P. and Mortensen K.K. 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Journal of Biotechnology, 115(2): 113–128.

Zhang X., Deng C., Xiong L., Gao X. and Liu Y. 2013. Cloning, expression of Hsp70 and Hsp90 from *Gobiocypris rarus* exposed to PCP. Hydraulic Enguneering II, 253–260.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 4, No. 4, Winter 2017

Identification and sequence analysis of cDNA encoding the 90-kDa heat shock protein (Hsp90) from the Caspian kutum *Rutilus frisii kutum*

Maryam Izaddoust Kordmahaleh[1], Hossein Ghafoori[2]*, Sajjad Sarikhan[3], Behrooz Heidari[2,4]

Received: December 2016 Accepted: March 2017

Abstract

Heat shock proteins (Hsp) are an important group of chaperones that are responsible for controlling proper protein folding in the cell. The heat shock protein 90 (Hsp90) are one of the most important members of them as they are the most abundant protein found in a cell (1-2% of total protein). Hsp90 is also responsible for other cellular tasks such as cell signaling. In the present study, the Hsp90 of the Caspian kutum *Rutilus frisii kutum* was investigated. Since there were no data available on the sequence of the desired gene, nucleotide sequence analysis of this protein was carried out using PCR technique after cDNA synthesis by using of RNA extracted from the fish liver tissue. The results showed high homology with some species such as *Cyprinus carpio* and *Gobiocypris rarus* (97% of sequence similarity). Data also showed that the desired protein has 727 amino acids and the gene encoding the protein includes 2181 nucleotides.

Key words: *Chaperone, Heat Shock Protein, Hsp90,* Rutilus frisii kutum.

1- M.Sc. Student in Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.
2- Assistant Professor in Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.
3- Molecular Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), ACECR, Tehran, Iran.
4- Assistant Professor in Department of Marine Sciences, Caspian Sea Basin Research Center, Rasht, Iran.
*Corresponding Author: h.ghafoori@guilan.ac.ir