مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۸، شماره ۱، بهار ۱۳۹۶

مطالعه تاثیر برخی شرایط حاد محیطی بر میزان بیان پروتئین Hsp70 نوترکیب کبد ماهی *Rutilus Frissi Kutum* در باکتری *E. coli*

امید صابری .M.Sc[1]، حسین غفوری .Ph.D[2,3*]

۱- گروه زیست شناسی، دانشگاه گیلان، پردیس دانشگاهی۲، رشت، ایران
۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۳- گروه علوم دریایی، پژوهشکده حوزه آبی دریای خزر، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: h.ghafoori@guilan.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۱۴

چکیده

هدف: هدف مطالعه حاضر بررسی بیان بهینه Hsp70 نوترکیب کبد ماهی *Rutilus Frissi Kutum* در باکتری *E. coli* می باشد.

مواد و روش‌ها: به‌منظور بررسی میزان بیان پروتئین Hsp70 نوترکیب، باکتری *E. coli* ترانسفورم شده در محیط LB در زمان‌های ۲، ۴، ۸، ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت، دماهای ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۷، ۴۵ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد، شرایط pH افراطی (۵ و ۹) و نیز در حضور فلزات سنگین همانند نقره، کبالت، آهن، کروم، جیوه، سرب، روی، کادمیوم، منگنز و نیکل کشت داده شد سپس با تهیه‌ی عصاره‌ی سلولی، میزان بیان Hsp70 با استفاده از SDS-PAGE ۱۲ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و رنگ آمیزی با کوماسی بلو صورت گرفت.

نتایج: بیان بهینه پروتئین Hsp70 نوترکیب در زمان ۴ و ۸ ساعت، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH برابر ۵ صورت گرفت. به‌علاوه در حضور نمک های فلزات منگنز و کبالت، به‌ترتیب بیشترین و کمترین میزان بیان پروتئین نوترکیب مشاهده شد. همچنین *E. coli* دارای Hsp70 در مقایسه با باکتری کنترل، نسبت به NaCl تحمل و رشد بیشتری دارد.

نتیجه گیری: همه نتایج حاصل از مطالعه نشان می‌دهد باکتری ترانسفورم شده در مقایسه با باکتری کنترل به‌دلیل دارا بودن Hsp70 نوترکیب در برابر شرایط حاد محیطی قادر به بقا بوده است. پروتئین Hsp70 نوترکیب با خاصیت چاپرونی خود از واسرشت شدن پروتئین های حیاتی جلوگیری کرد است. بنابراین شرایط رشد توصیف شده در این مطالعه می تواند برای تولید بهینه پروتئین Hsp70 نوترکیب در میزبان *E. coli* استفاده گردد.

واژگان کلیدی: Hsp70، *Rutilus Frissi Kutum* ، چاپرون، *E. coli*

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

همه‌ی موجودات زنده در برابر استرس‌های محیطی از خود پاسخ نشان می‌دهند. این پاسخ به کمک خانواده‌ی پروتئینی به‌نام پروتئین‌های شوک حرارتی می‌باشد که از باکتری‌ها تا پستانداران به‌شدت حفاظت شده‌اند (۱). این پروتئین‌ها به‌عنوان چاپرون‌های مولکولی عمل کرده و نقش عمومی آن‌ها کنترل کیفیت و تنظیم ساختار پروتئین‌ها در سلول‌ها می‌باشد. پروتئین‌های شوک حرارتی بر اساس وزن مولکولی مونومرهایشان به چند خانواده دسته بندی می‌شوند: Hsp40، Hsp60، Hsp70، Hsp90، Hsp100 و Hsp های کوچک. اگرچه که بیشتر آن‌ها به شکل الیگومر وجود دارند. بر اساس نوع میان‌کنش با پروتئین های سوبسترا (Substrate) نیز به سه دسته تقسیم می‌شوند: Holdase ها، Foldase ها و Disaggregase ها (۲). Hsp70 در مقایسه با سایر Hsp ها، یک هدف دارویی (Druggable target) مناسب است. Hsp90/Hsp70 تنها پروتئین شوک حرارتی است که به‌وسیله‌ی مهار فعالیت ATPase اش تنظیم می‌شود بنابراین هدف گیری Hsp70 یک استراتژی جذاب برای درمان سرطان است (۳ و ۴). اولین یافته‌های مطرح شده در ارتباط با مهار Hsp70، کاهش بیان این پروتئین از طریق مهار کردن فاکتور رونویسی کننده‌ی آن یعنی HSF1 (Heat-Shock Factor 1) می‌باشد (۴). پیشرفت های بیشتر در این زمینه منجر به طراحی مهار کننده‌های Hsp70 مانند -فنیل اتین سولفونامید (2-phenylethynesulfonamide) یا پیفیترین-μ و VER-155008 شده است. پیفیترین-μ با دمین اتصال به سوبسترا در Hsp70 میانکنش می‌دهد و از این طریق ارتباط بین Hsp با کوفاکتورهایش مانند Hsp40 و پروتئین‌های سوبسترا مانند p53 و Apaf-1(Apoptotic protease activating factor-1) را مختل می‌کند (۵). همچنین VER-155008 ترکیبی است که آنالوگ ATP بوده و به دمین اتصال به نوکلئوتید در Hsp70 متصل شده و در نتیجه به‌عنوان یک مهارکننده ی رقابتی ATP عمل کرده و از ارتباط آلوستریک بین دمین‌های Hsp70 جلوگیری می‌کند (۶). بیشتر چاپرون‌ها خاصیت ATPase دارند و با تمایل زیاد به بخش‌های هیدروفوب و در معرض پروتئین‌های تانخورده یا بد تاخورده متصل می‌شوند (۷) و به این ترتیب از تشکیل توده‌های پروتئینی غیرقابل برگشت و پایدار جلوگیری می‌کنند و همچنین تشکیل خود به‌خودی پروتئین‌های طبیعی را تسهیل می‌نمایند (۸). Hsp70 نقش اساسی را در متابولیسم پروتئین در شرایط طبیعی و استرسی بازی می‌کند. سطح بیان این پروتئین که القاپذیرترین عضو از خانواده‌ی چاپرون‌هاست با توانایی تحمل سلول به گستره‌ی وسیعی از استرس‌های طبیعی مثل شوک دمایی، استرس اسمزی، فلزات سنگین و التهاب مرتبط است (۹). پروتئین‌های این خانواده در محدوده وزنی ۶۸ تا ۷۴ کیلودالتون می‌باشند و تقریبا در تمام موجودات و اندامک‌ها یافت می‌شوند. در پستانداران و اغلب یوکاریوت‌ها این پروتئین‌ها در تمام اجزای سلولی نظیر سیتوزول، میتوکندری و شبکه اندوپلاسمیک وجود داشته و در اعمالی نظیر تا خوردن پروتئین‌ها، انتقال پروتئین‌ها از غشا و تجزیه پروتئین‌ها دخالت دارند. Hsp70 از نظر ساختمانی دارای ۳ دمین است: ۱) دمین انتهای N: این دمین دارای خاصیت ATPase می‌باشد و تغییرات شکل فضایی ایجاد شده توسط ATP را به بخش متصل شونده به C-ترمینال منتقل می‌کند. ۲) دمین اتصال به پروتئین: یک شیار در این دمین است که با آمینواسیدهای هیدروفوبیک میانکنش برقرار می‌کند که مطالعات پیشین نشان می‌دهد که عمق این شیار برای میانکنش تا هفت رزیدو کافی است. ۳) دمین انتهای C: این دمین غنی از ساختارهای آلفا هلیکس است که به عنوان یک درپوش (Lid) برای دمین اتصال به پروتئین عمل می‌کند، این درپوش در حالت اتصال به ATP باز است و پروتئین‌ها به‌راحتی اتصال و رها می‌شوند (۱۰). پروتئین‌های شوک حرارتی در سرطان‌های انسانی به‌طور وسیعی بیان می‌شوند و در

Archive of SID

www.SID.ir

تکثیر، تهاجم، متاستاز و آپوپتوزیس (Apoptosis) سلول‌های تومور نقش دارند. یکی از مکانیسم‌های مهم در کنترل سلول‌های سرطانی، القا آپوپتوزیس در آن‌ها می‌باشد. از آنجایی‌که پروتئین های Hsp70 و Hsp90 در جلوگیری از آپوپتوزیس در سلول های سرطانی اهمیت بسیار مهمی دارند، لذا مطالعه روی پروتئین Hsp70 می‌تواند به پیشرفت در این زمینه کمک کند. اولین قدم در این نوع مطالعات بررسی تاثیر ترکیبات بر Hsp70 خالص در محیط *In vitro* می باشد. لذا ایجاد شرایط بهینه برای تولید این پروتئین از نیازهای اساسی می باشد بنابراین در این پژوهش، به‌میزان بیان Hsp70 نوترکیب در شرایط استرسی مختلف شامل دما، فلزات سنگین و pH در باکتری میزبان *E. coli* پرداخته شد و شرایط بهینه برای تولید این پروتئین معرفی شد.

مواد و روش ها

Protein Marker (#SM0431) از شرکت Fermentas تهیه شد. IPTG و کانامایسین نیز از شرکت Biobasic خریداری شد. اکریل آمید، بیس اکریل آمید، EDTA، گلیسین، تریپتون، عصاره‌ی مخمر، سدیم کلراید، تریس، ایمیدازول و فلزات سنگین از شرکت مرک تهیه شد.

بیان Hsp70 نوترکیب در میزبان E. coli: جهت بیان پروتئین، باکتری *E. coli* دارای $pET28a^{+}$ – Hsp70 مورد استفاده قرار گرفت. توالی ژن hsp70 با شماره دسترسی KT380686 در پایگاه NCBI ثبت گردیده است. ۲۰ میکرولیتر از این باکتری به ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت لوریا برتانی مایع حاوی کانامایسین با غلظت ۵۰ mg/ml تلقیح شد. محیط به صورت شبانه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد هوادهی گردید. سپس ۱ میلی‌لیتر از باکتری به محیط کشت لوریا برتانی جدید دارای کاناماسین ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر انتقال و تا رسیدن به OD_{600}= 0.6 هوادهی شد. پس از آن با افزودن IPTG با غلظت ۰/۱ mM، بیان Hsp70 تحریک شده و بهینه بیان پروتئین در شرایط مختلف مورد بررسی قرار گرفت (۱۱).

تهیه عصاره سلولی از باکتری و بررسی میزان بیان Hsp70 نوترکیب تحت عوامل استرسی مختلف: سوسپانسیون باکتری‌های القا شده، به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۵۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. رسوب باکتری به‌دست آمده با افزودن بافر لیزکننده با pH ۷/۵ حاوی ایمیدازول ۵ mM، تریس ۵۰ mM و سدیم کلرید ۱۰۰ mM (هم حجم رسوب) به‌حالت سوسپانسیون درآمد. پس از آن سوسپانسیون باکتری تحت سونیکاسیون (شامل ۶ مرحله ۱۰ ثانیه‌ای با فواصل زمانی ۱۰ ثانیه) قرار گرفت. همچنین جهت جلوگیری از تخریب گرمایی، تمامی مراحل سونیکاسیون درون یخ انجام شد. سلول‌های لیز شده در ۹۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی به ویال جداگانه انتقال داده شد. به‌جهت آنالیز بیان این پروتئین، نمونه‌ها بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲٪ برده شد و به‌کمک روش رنگ آمیزی کوماسی بلو مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. لازم به‌ذکر است به‌منظور مشاهده و بررسی دقیق‌تر، پیش از روش SDS-PAGE نمونه‌ها تحت تیمار دمایی در ۸۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ ساعت قرار گرفتند.

تأثیر زمان بر بیان Hsp70 نوترکیب در میزبان E. coli: جهت بررسی اثر زمان بر بیان پروتئین شوک حرارتی ۷۰، پس از تلقیح باکتری *E. coli* دارای Hsp70 – $pET28a^{+}$ با IPTG با غلظت ۰/۱ mM، محیط کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در زمان های ۲، ۴، ۸، ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت هوادهی شد تا بیان Hsp70 نوترکیب در میزبان *E. coli* مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرد.

تأثیر دما بر بیان Hsp70 نوترکیب در میزبان E. coli: به‌منظور بررسی تأثیر دمای محیط کشت بر بیان این پروتئین در باکتری *E. coli* دارای Hsp70 – $pET28a^{+}$ ، پس از تلقیح با IPTG با غلظت ۰/۱ mM، محیط رشد باکتری در معرض دماهای ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۷،

Archive of SID
www.SID.ir

۴۵ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا مقدار بیان پروتئین Hsp70 نوترکیب تجزیه و تحلیل شود.

تاثیر pH های افراطی بر بیان Hsp70 نوترکیب در میزبان E. coli: به‌منظور بررسی اثر محیط اسیدی و قلیایی بر بیان این پروتئین، باکتری ترنسفورم شده به‌همان روش ذکر شده کشت داده شد. pH محیط‌های اسیدی و قلیایی به‌کمک محلول‌های HCl و NaOH با غلظت ۱M تنظیم شد. سپس سوسپانسیون باکتری به محیط کشت‌های با pH های ۵ و ۹ منتقل شد تا به 0.6 OD_{600}= برسد. در این مرحله با افزودن IPTG با غلظت ۰/۱ mM، بیان پروتئین Hsp70 نوترکیب تحت تاثیر pH های افراطی (۵ و ۹) در میزبان *E. coli* بررسی شد. لازم به‌ذکر است محیط کشت‌های با pH ۳ و ۱۲ نیز مورد مطالعه قرار گرفت که باکتری در این شرایط رشد نکرد.

تأثیر فلزات سنگین بر بیان Hsp70 نوترکیب در میزبان E. coli: همچنین بیان پروتئین در حضور فلزات سنگین (نقره، کبالت، آهن، کروم، جیوه، سرب، روی، کادمیوم، منگنز و نیکل) در محیط کشت باکتری بررسی شد. به این منظور از غلظت ۵۰ mM از نمک‌های فلزات نقره، کبالت، آهن، کروم، جیوه، سرب، روی، کادمیوم، منگنز و نیکل استفاده شد.

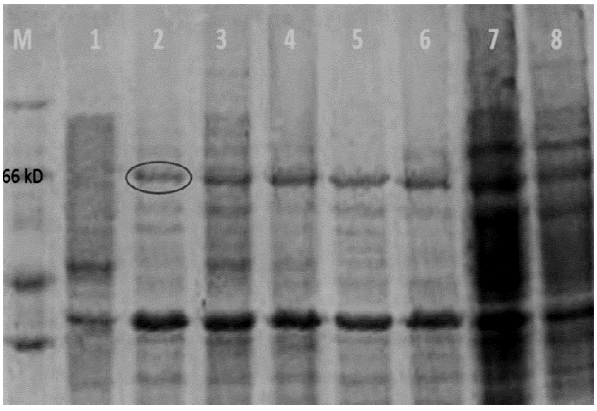
تحمل NaCl: برای انجام آزمون تحمل NaCl، باکتری E.coli دارای pET-28a+-Hsp70 در محیط کشت LB دارای کانامایسین با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تا رسیدن به OD۶۰۰ = ۰/۶ هوادهی شد. ۴ ساعت پس از اضافه شدن IPTG با غلظت نهایی ۰/۱ mM به محیط کشت باکتری، مقداری از باکتری 10^8 بار رقیق شده و در محیط کشت LA حاوی ۰/۵ M NaCl به‌صورت سفره‌ای کشت داده شد و به‌صورت شبانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد هوادهی شد.

از باکتری *E. coli* دارای pET-28a+ بدون Hsp70 به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

نتایج

همان‌گونه که اشاره شد، خانواده‌ی پروتئین‌های شوک حرارتی به انواع مختلفی مانند Hsp های کوچک، Hsp40، Hsp70، Hsp90 و Hsp110 طبقه بندی می‌شوند که در این بین Hsp70 نقش مهمی را در متابولیسم پروتئین در شرایط طبیعی و استرسی ایفاء می‌کند. در مطالعه حاضر سطح بیان این پروتئین در شرایط متفاوتی مانند زمان‌های مختلف، دماها و pH های متفاوت و انواع گوناگون فلزات سنگین مورد بررسی قرار گرفت.

در بررسی فاکتورهای مختلف ابتدا اثر زمان‌های مختلف بر میزان بیان پروتئین نوترکیب مورد بررسی قرار گرفت. Hsp70 نوترکیب در زمان‌های مختلف از ۲ تا ۴۸ ساعت تولید شده و در نهایت نتایج نشان داد که در زمان ۴و ۸ ساعت میزان بهینه‌ی بیان پروتئین به‌دست آمده است (شکل ۱).

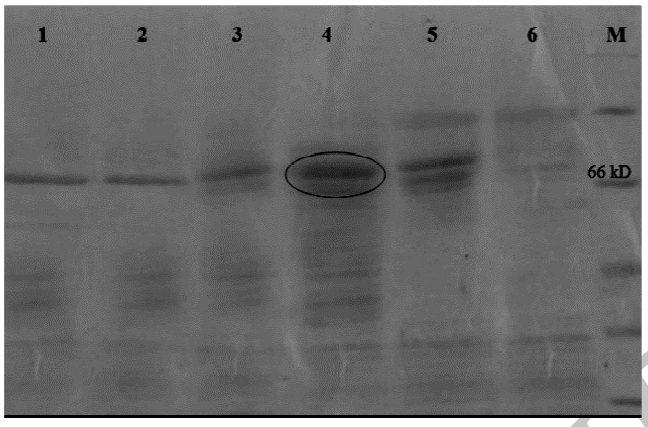


شکل ۱: بیان پروتئین Hsp70 نوترکیب در زمان‌های مختلف. M: مارکر پروتئین #SM0431 ۱: کنترل منفی: پروتئین استخراج شده از باکتری *E. coli* بدون Hsp70 طی ۴ ساعت تحت دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، بیان پروتئین شوک حرارتی ۷۰ در میزبان *E. coli* طی زمان‌های ۲: ۲ ساعت، ۳: ۴ ساعت، ۴: ۸ ساعت، ۵: ۱۲ ساعت، ۶: ۲۴ ساعت، ۷: ۳۶ ساعت، ۸: ۴۸ ساعت

Archive of SID

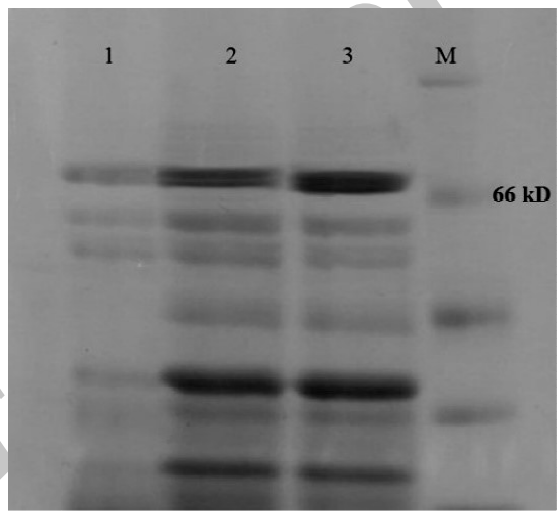
www.SID.ir

در مرحله‌ی بعد میزان بیان پروتئین در دماهای مختلف، که در مواد و روش‌ها به آن اشاره شده است، مورد مطالعه قرار گرفت و با توجه به نتایج در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بیشترین میزان بیان پروتئین مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۲: بیان پروتئین Hsp70 نوترکیب در دماهای مختلف. M: مارکر پروتئین#SM0431 . بیان پروتئین Hsp70 نوترکیب در میزبان *E. coli* تحت دماهای ۱: ۲۰، ۲: ۲۵، ۳: ۳۰، ۴: ۳۷، ۵: ۴۵ و ۶: ۵۰ درجه سانتی‌گراد. بیشترین بیان پروتئین Hsp70 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

همچنین تاثیر pH های مختلف بر میزان بیان پروتئین نشان داد که Hsp70 نوترکیب در ۵ pH بیشترین بیان را دارد. نتایج مربوط به pH های مختلف در شکل ۳ نشان داده شده است.

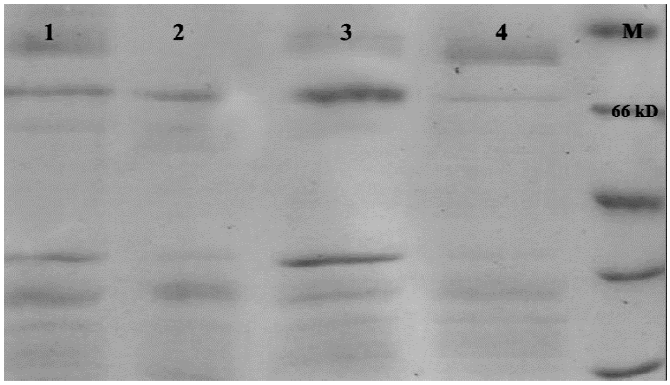


شکل ۳: بیان پروتئین Hsp70 نوترکیب در pH های مختلف. M: مارکر پروتئین #SM0431 . بیان پروتئین Hsp70 نوترکیب در میزبان *E. coli* در pH های ۱: ۹ pH ۲: ۷/۵ pH ۳: ۵ pH . همان‌طور که در شکل دیده می‌شود Hsp70 بیشترین بیان را در شرایط اسیدی (۵ pH) داشته است.

پس از بررسی میزان بیان در حضور عوامل زمان، دما و pH، از آن جایی‌که عوامل استرس‌زای محیطی مانند فلزات سنگین نیز بر متابولیسم پروتئین‌ها تأثیر می‌گذارند، بیان پروتئین Hsp70 نوترکیب در میزبان *E. coli* در حضور فلزات سنگین مورد مطالعه قرار گرفت. لازم به‌ذکر است در حضور فلزاتی از جمله جیوه، نیکل، کروم، کادمیوم، سرب و آهن، رشد باکتری *E. coli* ترانسفورم شده و نیز باکتری کنترل منفی مشاهده نشد. در حالی‌که، در حضور نمک های سولفات منگنز و کلرید کبالت در محیط کشت باکتری، به‌ترتیب بیشترین و کمترین میزان بیان پروتئین Hsp70 نوترکیب حاصل شد (شکل۴).

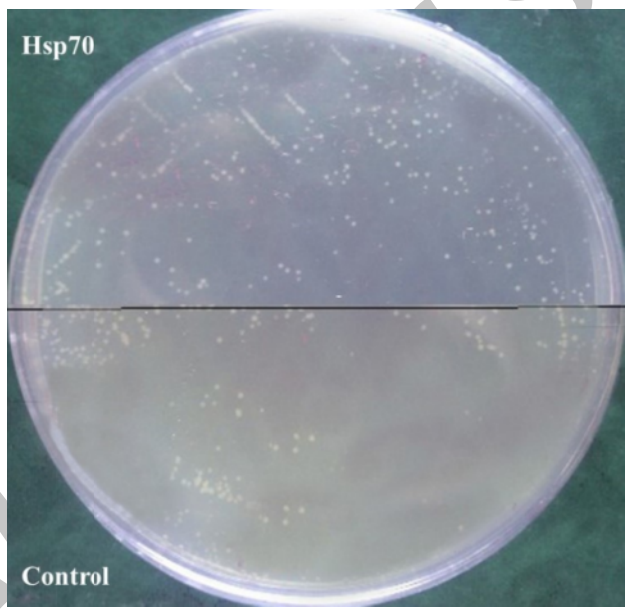
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴: بیان پروتئین Hsp70 نوترکیب در حضور فلزات سنگین. M: مارکر پروتئین SM0431#. بیان پروتئین Hsp70 نوترکیب در میزبان *E. coli* در محیط کشت حاوی نمک‌های ۱: نیترات نقره ۲: استات روی ۳: سولفات منگنز و ۴: کلرید کبالت . طبق شکل، این پروتئین در حضور سولفات منگنز حداکثر بیان را داشته است.

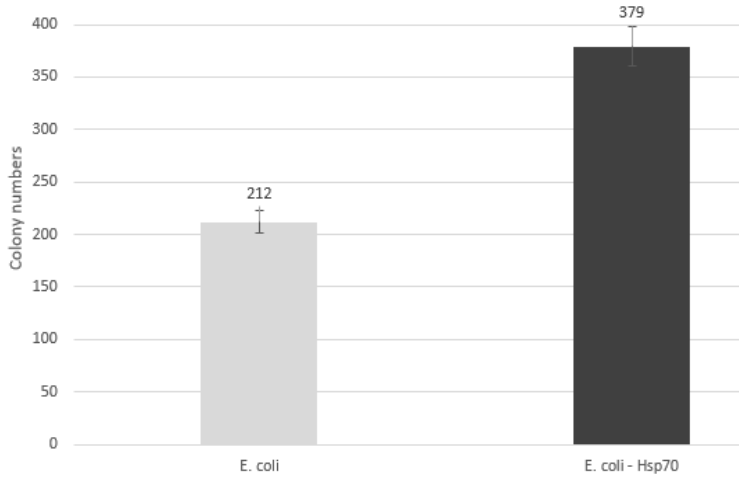
تحمل NaCl: میزان تحمل *E. coli* و *E. coli* دارای Hsp70 نسبت به NaCl با غلظت ۰/۵ مولار مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد *E. coli* دارای Hsp70 در مقایسه با *E. coli*، نسبت به NaCl تحمل و رشد بیشتری دارد (شکل ۵).



شکل ۵: کلونی باکتری ها در تحمل NaCl، کلونی‌های رشد کرده ی باکتری *E. coli*-Hsp70 و کنترل منفی در محیط کشت حاوی ۰/۵ M NaCl.

شمارش تعداد کلونی‌های رشد کرده روی محیط کشت دارای 0.5 NaCl مولار نشان می‌دهد باکتری دارای Hsp70 نوترکیب نسبت به باکتری کنترل ۱,۷۸ برابر بیشتر رشد کرده است (نمودار ۱). این نتیجه تایید کننده‌ی فعالیت موثر Hsp70 است.

www.SID.ir



نمودار ۱: نمودار تعداد کلونی‌های رشد کرده باکتری دارای Hsp70 نوترکیب و کنترل منفی. نتایج به‌وضوح نشان می‌دهد باکتری *E. coli* دارای Hsp70 نوترکیب در حضور 0.5 NaCl مولار رشد بیشتری را نشان می‌دهد. این موضوع تایید کننده‌ی عملکرد صحیح Hsp70 می‌باشد.

بحث

دسته وسیعی از استرس‌های محیطی منجر به القای تولید پروتئین‌های موسوم به شوک حرارتی می‌شوند که در این بین چاپرون‌های مولکولی در مواجهه‌ی سلول با استرس‌های محیطی نقش حیاتی را ایفا می‌کنند (۱۲). در این میان Hsp70 همراه با کوچاپرون خود یعنی Hsp40 به سایر پروتئین‌های سلولی کمک می‌کند تا کیفیت ساختار خود را حفظ کرده و بدین‌ترتیب موجب بقای سلول می‌شوند. ما در این پژوهش به بررسی اثر زمان، دما، pH و فلزات سنگین بر بیان پروتئین Hsp70 نوترکیب پرداختیم. نتایج ما در بررسی فاکتور زمان نشان داد که طی زمان های ۲ تا ۴۸ ساعت تغییر محسوسی در بیان این پروتئین دیده نمی‌شود به‌جز در ۴ و ۸ ساعت که این پروتئین کمی بیشتر بیان شده است. مطالعه Boone و همکاران (۱۳) نشان داد که بیان Hsc۷۰ (Heat Shock Cognate protein 70) در سلول های هپاتوسیت در ۲ ساعت تا ۴۸ ساعت، تغییر چندانی با هم ندارند.

مطالعه‌ی ما روی اثر دما بر بیان Hsp70 نوترکیب بیانگر این موضوع است که در دماهای پایین شرایط برای رشد باکتری و متعاقب آن بیان این پروتئین مطلوب نبوده است. در دماهای بالاتر از ۴۵ درجه سانتی‌گراد نیز به‌نظر می‌رسد که *E. coli* رشد کمی داشته است اما با آن‌حال، بیان هرچند کم Hsp70 به بقای باکتری در مقابله با دمای بالا کمک کرده است. پژوهشی که Lindquist (۱۴) انجام داد، نشان داد که Hsp70 دروزوفیلا در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد بیان بسیار کمی داشته و در دماهای بالاتر بیان Hsp70 هم افزایش می‌یابد به‌طوری‌که در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، این پروتئین شوک حرارتی به حداکثر میزان بیان خود می‌رسد. شواهد موجود نشان می‌دهد که در دماهای مطلوب برای رشد موجودات، پروتئین Hsp70 نیز بیان حداکثری دارد.

همچنین Soto و همکاران (۱۵) مطالعه‌ای را بر روی افزایش بقای *E. coli* ترانسقورم شده تحت استرس دمایی انجام دادند. در این پژوهش نشان داده شده که پروتئین نوترکیب Hsp17.5 اثر محافظتی بر بقای سلول و پایداری سایر پروتئین‌ها دارد. به‌طوری‌که در بررسی پروتئین‌های بیان شده به‌وسیله‌ی آنالیز SDS-PAGE ۱۲ درصد، میزان بیان پروتئین Hsp17.5 نوترکیب در باکتری ترانسفورم شده با pRSET-Hsp نسبت به باکتری کنترل به‌مراتب بیشتر بوده است. به‌همین ترتیب، Wang و همکاران (۱۶) به بررسی تاثیر شوک دمایی بر بیان Hsp70 نوترکیب حشره ی c-nigrum در میزبان *E. coli* پرداختند که آنالیز SDS-PAGE ۱۲ درصد نشان داد تحت استرس دمایی، میزان بیان پروتئین Hsp70 نوترکیب در باکتری حاوی ترانسفورم بیشتر از باکتری

Archive of SID

www.SID.ir

کنترل می‌باشد.. کنترل استرس سلولی ناشی از تغییرات pH، برای سلول‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است که بدین منظور سیستم هومئوستازی (Homeostasis) pH در نظر گرفته شده است که در برابر تغییرات pH القا پذیر می‌باشد. این سیستم‌ها منجر به تغییر در پمپاژ پروتون، کاهش تراواپذیری (Permeability) غشا، جلوگیری از آسیب به DNA و نیز تولید چاپرون‌ها می‌شوند. چندین گزارش به کمک ژل الکتروفورز پلی اکریل آمید دو بعدی نشان می‌دهد که تولید چاپرون‌هایی مانند DnaK و GroEL تحت استرس pH اسیدی القا می‌شوند (۱۹-۱۷). ما نیز در بخش دیگری از پژوهش به بررسی اثر pH اسیدی و قلیایی بر بیان این پروتئین نوترکیب پرداختیم. نتایج ما آشکارا نشان می‌دهد تحت شرایط اسیدی (pH=۵) که به محیط کشت باکتری القا می‌شود، میزان بیان پروتئین Hsp70 نوترکیب بیشتر شده است. همچنین مطالعه ای که Huesca و همکاران (۲۰) انجام دادند، نشان داد که پروتئین شوک حرارتی ۷۰ یک نقش محوری در سازگار شدن هلیکوباکتر پیلوری برابر pH اسیدی معده دارد و باعث حفاظت از سایر پروتئین‌های این باکتری تحت شرایط اسیدی می‌شود. قرار گرفتن سلول‌ها در معرض دماهای بسیار بالا، استرس اکسیداتیو و فلزات سنگین موجب دناتوره شدن پروتئین‌ها و توده‌ای شدن (Aggregation) آن‌ها می‌شود که در نهایت باعث القای پروتئین‌های شوک حرارتی مانند Hsp70 می‌شود که به نوبه‌ی خود مانع آپوپتوزیس و باعث بقای سلول می‌شود. به‌دلیل شرایط محیطی ماهی سفید دریای خزر که در معرض انواع استرس‌ها از جمله فلزات سنگین قرار می‌گیرد، در این پژوهش به بررسی اثر فلزات سنگین بر بیان پروتئین Hsp70 پرداخته شد. در ابتدا در حضور فلزاتی از جمله جیوه، کادمیوم و آهن با غلظت ۵۰ mM و طی تیمار ۴ ساعته و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رشد باکتری *E. coli* ترانسفورم شده و نیز باکتری کنترل منفی صورت نگرفت. این در حالی است که نتایج نشان داد در حضور فلزات منگنز و کبالت در محیط کشت باکتری، Hsp70 نوترکیب بیشترین و کمترین میزان بیان را در میزبان داشته است. اما مطالعه Mahmood و همکاران (۲۱) نشان داد که Hsp70 در حضور جیوه و کادمیوم بیان بسیار کمی دارد، به‌علاوه اینکه در حضور فلز روی، پروتئین شوک حرارتی ۷۰ بیان بیشتری دارد نسبت به زمانی‌که در معرض جیوه و کادمیوم قرار می-گیرد.

یکی از آزمون‌های تایید کننده‌ی فعالیت صحیح چاپرون‌ها در محیط *in vivo*، انجام آزمون تحمل به استرس نمکی می‌باشد. طی مطالعه ای که انجام شد، باکتری *E. coli* دارای $pET28a^{+} - Hsp70$ در شرایط استرس با NaCl ۰،۵ مولار قرار گرفت که در مقایسه با باکتری کنترل مقاومت بیشتری از خود نشان داد. مطالعه‌ای مشابه را Ghafoori و همکاران (۲۲) در انجام دادند که طی آن باکتری *E. coli* دارای $pET28a^{+} - DnaJ$ و باکتری کنترل به‌مدت ۷۲ ساعت تحت استرس NaCl ۰،۵ مولار و ۱ مولار قرار گرفتند. نتایج نشان داد تحت شرایط استرس NaCl ۰/۵ مولار و ۱ مولار، باکتری ترانسفورم شده نسبت به باکتری کنترل به‌ترتیب ۱،۸۵ و ۱،۳۶ برابر رشد کرد. همچنین Takalloo و همکاران (۲۳) تاثیر NaCl ۵۰۰ میلی‌مولار را بر مقاومت باکتری *E. coli* دارای $pET28a^{+}$ - Artemin مورد ارزیابی قرار دادند که نتایج آشکارا نشان داد باکتری ترانسفورم شده نسبت به باکتری کنترل تحت استرس نمکی رشد بیشتری دارد. این نتایج بر این نکته دلالت دارند که پروتئین‌های شوک حرارتی مانند Hsp70، DnaJ و آرتمین با خاصیت چاپرونی که دارند به بقای موجود زنده کمک می‌کنند به‌طوری‌که در پروتئین Hsp70، دمین اتصال به پروتئین با میان‌کنش با پروتئین‌های حیاتی سلولی که دناتوره شده یا بدتاخورده اند، موجب حفظ عمل‌کرد صحیح آن‌ها شده و به این ترتیب باعث بقای جاندار می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد باکتری *E. coli* ترانسفورم شده در مقایسه با باکتری کنترل به دلیل دارا بودن Hsp70 نوترکیب در برابر شرایط حاد محیطی قادر به بقا بوده است و بیشترین بیان پروتئین نوترکیب در زمان ۴ و ۸ ساعت، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH برابر ۵ صورت گرفت. پروتئین Hsp70 نوترکیب با خاصیت چاپرونی خود از واسرشت شدن پروتئین‌های حیاتی جلوگیری کرده و به این ترتیب موجب حفظ عملکرد باکتری ترانسفورم شده تحت استرس های محیطی می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از پژوهشکده حوزه آبی دریای خزر دانشگاه گیلان بابت حمایت پژوهشی طی قرارداد ۹۳۱۹۳۹۵۷۰۶ از پژوهش حاضر تشکر و قدردانی به عمل می آورد.

منابع

1. Pawar H R. Agrawal G. Ramneek Brah, Expression, purification and characterization of recombinant Heat Shock Protein 70 (HSP70) from sheep and goat species. Int j Curr Microbiol Appl Sci. 2013; 2(11): 440-452.

2. Lindquist S, Craig E. The heat-shock proteins. Annual review of genetics. 1988; 22(1): 631-677.

3. Powers MV, Jones K, Barillari C, Westwood I, et al. Targeting HSP70: the second potentially druggable heat shock protein and molecular chaperone? Cell Cycle. 2010; 9(8): 1542-1550.

4. Goloudina AR, Demidov ON, Garrido C. Inhibition of HSP70: a challenging anti-cancer strategy. Cancer letters. 2012; 325(2): 117-124.

5. Leu JJ, Pimkina J, Frank A. A small molecule inhibitor of inducible heat shock protein 70. Molecular cell. 2009; 36(1): 15-27.

6. Mayer MP, Schlecht R, Rüdiger S, Paal K, Laufen T, et al. Functional analysis of Hsp70 inhibitors. PloS one. 2013; 8(11): e78443.

7. Malyshev I. A General Description of HSPs, The Molecular Structure of HSP70 and The HSP70 Cycle, in Immunity, Tumors and Aging: The Role of HSP70. 2013; Springer. 1-13.

8. Mayer M, Bukau B.Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. Cellular and molecular life sciences. 2005; 62(6): 670.

9. Ying X P, Su X, Wu H X, et al. Cloning and expression of HSP70 gene of sipuncula Phascolosoma esculenta. Fish & shellfish immunology. 2010; 28(3): 461-466.

10. Stricher F, Macri C, Ruff M, Muller S, et al. HSPA8/HSC70 chaperone protein: structure, function, and chemical targeting. Autophagy. 2013; 9(12): 1937-1954.

11. Ausubel, Frederick M, et al. "Short protocols in molecular biology." 1992: 1-2.

12.Ellis, R.J. and S.M. Van der Vies, Molecular chaperones. Annual review of biochemistry. 1991; 60(1): 321-347.

13. Boone AN, Vijayan MM. Constitutive heat shock protein 70 (HSC70) expression in rainbow trout hepatocytes: effect of heat shock and heavy metal exposure. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 2002; 132(2): 223-233.

14. Lindquist S. Varying patterns of protein synthesis in Drosophila during heat shock: implications for regulation. Developmental biology. 1980; 77(2): 463-479.

15. Soto A, Allona I, Collada C, Guevara MA, et al. Heterologous expression of a plant small heat-shock protein enhances Escherichia coli viability under heat and cold stress. Plant Physiology. 1999; 120(2): 521-528.

16.Wang L, Yang S, Han L, Kuijun ZhaoK, et al. Expression profiles of the heat shock protein 70 gene in response to heat stress in Agrotis c-nigrum (Lepidoptera: noctuidae). Journal of Insect Science. 2015; 15(1): 9.

17. Foster JW, Hall HK. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of Salmonella typhimurium. Journal of bacteriology. 1991; 173(16): 5129-5135.

Archive of SID

www.SID.ir

18. Heyde M, Portalier R. Acid shock proteins of Escherichia coli. FEMS microbiology letters. 1990; 69(1-2): 19-26.

19. Hickey EW, Hirshfield IN. Low-pH-induced effects on patterns of protein synthesis and on internal pH in Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Applied and environmental microbiology. 1990; 56(4): 1038-1045.

20. Huesca M. Characterization of an Acidic-pH-Inducible Stress Protein (hsp70), a Putative Sulfatide Binding Adhesin, fromHelicobacter pylori. Infection and immunity.1998; 66(9): 4061-4067.

21. Mahmood K, et al. Synergistic effects of toxic elements on heat shock proteins. BioMed research international, 2014; 2014: 1-17.

22. Ghafoori H, Askari M, Sarikhan S. "Molecular cloning, expression and functional characterization of the 40-kDa heat shock protein, DnaJ, from Bacillus halodurans." Process Biochemistry. 2017; 54: 33-40.

23. Takalloo, Z. "Artemin protects cells and proteins against oxidative and salt stress." International journal of biological macromolecules. 2017; 95: 618-624.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Spring 2017; 8(1)

Study the effects of some acute environmental conditions on recombinant Hsp70 protein expression in *Rutilus Frissi Kutum* liver in *E. coli*

Saberi O, M.Sc.[1], Ghafoori H, Ph.D.[2,3*]

1. Department of Biology, University of Guilan, University Campus 2, Rasht, Iran
2. Department of Biology, Faculty of science, University of Guilan, Rasht, Iran
3. Department of Marine Sciences, The Caspian Sea Basin Research Center, University of Guilan, Rasht, Guilan, Iran

* Email corresponding author: h.ghafoori@guilan.ac.ir

Received: 6 Jun. 2017 Accepted: 5 Sep. 2017

Abstract

Aim: The aim of the present study was to investigate the optimal expression of Hsp70 recombinant *Rutilus Frissi Kutum* liver in *E. coli*.

Material and methods: To evaluating of expression level of recombinant Hsp70, transformed *E. coli* were cultured in LB medium at 2, 4, 8, 12, 24, 36 and 48 hours, 20, 25, 30, 37 and 50 °C, extreme pH (5 and 9) and in present of heavy metals e.g. mercury, cobalt, iron, zinc and etc. Expression of recombinant Hsp70 protein was determined by SDS-PAGE 12% analysis of *E. coli* extracts followed by staining with Coomassie Blue.

Results: Optimum expression of recombinant Hsp70 was obtained at 4 and 8 h, 37 °C and pH 5. Additionally, the maximum and minimum expression of this protein was achieved in present of manganese and cobalt respectively. The results further indicate that the survival of *E. coli* with Hsp70 was enhanced compared to the control cells.

Conclusion: All results reveal that transformed bacteria are able to survive against extreme environmental conditions compared to control sample, because of having recombinant Hsp70. This heat-shock protein protects vital proteins from denaturing by its chaperone property. So, growth condition described in this study can be used for optimizing production of recombinant Hsp70 in *E. coli* host.

Keywords: Chaperone, *E. coli*, Hsp70, *Rutilus Frissi Kutum*

Archive of SID

www.SID.ir