

## مدل سازی پروتئین استرس گرمایی ۷۰ (HSP70) زنبورعسل به روش همولوژی مدلینگ و

## شبیه سازی ملکولی و اتصال آن به HSP40

الهام رضوان نژاد<sup>۱\*</sup>، صفا لطفی<sup>۱</sup> و آزاده بوستان<sup>۲</sup><sup>۱</sup> ایران، کرمان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، گروه بیوتکنولوژی<sup>۲</sup> ایران، اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی مغان، گروه علوم دامی

تاریخ پذیرش: ۹۸/۲/۱۱

تاریخ دریافت: ۹۷/۹/۲۱



## چکیده

استرس گرمایی یکی از مهمترین مشکلاتی است که تاثیر منفی بر روی مصرف غذا، نرخ رشد، شبکه عصبی، عملکرد سیستم ایمنی و همچنین نرخ مرگ و میر دارد. در شرایط استرس گرمایی، سنتز اکثر پروتئین‌ها به تاخیر می‌افتد اما پروتئین‌های استرس گرمایی (HSP) به طور سریع سنتز می‌شوند و نقش مهمی در زنده ماندن سلول‌ها دارند. از مهمترین آنها، HSP70 می‌باشد که ساختار کریستالوگرافی آن در زنبورعسل گزارش نشده و مدلسازی آن می‌تواند زمینه تشخیص مکانیسم عمل آن در مقابل تنش-های محیطی را در زنبورعسل فراهم نموده و هزینه‌های مربوط به تنش‌های محیطی را کم کند. همچنین HSP40 یک تنظیم کننده مکانیسم عمل HSP70 است. لذا، در این تحقیق مدلسازی کامل هر دو پروتئین صورت گرفت و در ادامه میانکنش پروتئین HSP70 و HSP40 با استفاده از نرم افزارهای مدلسازی در دو وضعیت مطالعه شد. ۱- مطالعه داکینگ دو پروتئین به صورت کور، که ساختار کامل هر دو پروتئین در داکینگ مورد استفاده قرار گرفت و نتایج آن نشان داد اتصال بین دو پروتئین در دو ناحیه اتفاق می‌افتد؛ HSP70 از ناحیه اسید آمینه های ۴۳۰-۴۰۰ و ۶۴۰-۶۲۰ به ترتیب با اسید آمینه های ۳۵۰-۳۳۰ و ۱۷۵-۱۶۵ در HSP40 متصل می‌شود. ۲- بر اساس مطالعات گذشته، داکینگ تنها در بخش محتمل برای اتصال صورت گرفت، برهمکنش بین ناحیه Jdomain از HSP40 با کل پروتئین HSP70، که نشان داد اسید آمینه های ۴۱-۲۸ از دمین J در HSP40 با یک شیار اسیدی از دمین ATPase در HSP70، میانکنش دارند. نتایج حاصل می‌تواند به فهم بهتر عملکرد دو پروتئین و طراحی داروهای ضد استرس کمک نماید.

واژه های کلیدی: پروتئین HSP70، پروتئین HSP40، استرس گرمایی، زنبورعسل، برهمکنش

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۴۳۳۷۷۶۶۱۰، پست الکترونیکی: e.rezvannejad@kgut.ac.ir

## مقدمه

سلول ضروری بوده و به زنده ماندن سلول در زمان استرس کمک می‌کنند (۱۳، ۲۹ و ۳۰). مطالعات مختلفی که بر روی موجودات متفاوت و الگوی بیان این پروتئین‌ها تحت شرایط استرس انجام شده است، نشان می‌دهد که پاسخ به استرس گرمایی محدود به برخی از موجودات نبوده و گستره وسیعی از حیات از *E. coli* تا *Homo sapiens* را در بر گرفته است (۲۸). همچنین ثابت شده است که علاوه بر

پروتئین‌های استرس گرمایی (HSPs= Heat-shock proteins)، نوعی از پروتئین‌های سلولی هستند که در شرایط نرمال محیطی در درون سلول وجود داشته اما سطح بیان آنها زمانی که سلول در شرایط استرس یا شوک قرار می‌گیرد افزایش می‌یابد (۲۶). دلیل نامیدن این نوع پروتئین‌ها به پروتئین‌های استرس گرمایی از آنجا ناشی می‌شود که این پروتئین‌ها برای نگهداری هومئوستازی در

محسوب می‌شود. زمانی که موجودات زنده در شرایط استرس گرمایی قرار می‌گیرند، سنتز اکثر پروتئینها به تاخیر می‌افتد اما پروتئین‌های استرس گرمایی به طور سریع سنتز می‌شوند.

با توجه به اهمیت پروتئین HSP70 در محافظت از سلول در برابر استرس‌های محیطی و نظر به اینکه تا کنون ساختار سه بعدی کریستالوگرافی این پروتئین در زنبور عسل مشخص نشده است، تعیین ساختار سه بعدی آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. وظیفه اصلی پروتئین HSP40 تنظیم عمل HSP70 در سلولهاست. چند روش برای این تنظیم مورد شناسایی قرار گرفته است و شامل اتصال پلی پپتیدهای مختلف به واسطه HSP40 به HSP70 و همچنین تاثیر بر روی فعالیت ATP آزی در HSP70 می‌باشد، به هر حال جفت شدن HSP40 به HSP70 به هر طریقی بر روی عمل HSP70 تاثیر می‌گذارد (۴؛ ۵). مطالعات کریستالوگرافی در برخی موجودات از جمله انسان و پروکاریوت‌ها در مورد محل اتصال نشان داده اند که اتصال HSP70 به HSP40 از دو ناحیه صورت می‌گیرد اولین محل که در تنظیم فعالیت ATP آزی HSP70 موثر است، اتصال دمین J در HSP40 (حاوی حدود ۷۵ اسید آمینه) به دمین ATP در HSP70 می‌باشد (۴؛ ۵). دومین محل اتصال در انتهای C هر دو چاپرون اتفاق می‌افتد که در زمان اتصال پروتئین‌های هدف به HSP70 برقرار می‌شود (۴؛ ۵؛ ۱۴). از آنجا که تا کنون در زنبور عسل هیچ مطالعه‌ای در مورد ساختار HSP70 و نحوه برهمکنش آن با HSP40 در زمان استرس‌های مختلف به ویژه استرس گرمایی صورت نگرفته است، لذا تحقیق حاضر به منظور مدل‌سازی ساختار سه بعدی پروتئین HSP70 در گونه *Apis.Melifera* برای شناسایی دمین‌های ساختاری و جایگاه‌های ویژه آن انجام گرفته و با توجه به اینکه HSP40 یک تنظیم‌کننده مکانیسم عمل HSP70 محسوب می‌شود تعیین مکانیسم عمل آن بر روی HSP70 و نحوه برهمکنش آنها مورد بررسی قرار می‌گیرد. انتظار می‌رود

شرایط استرس گرمایی، فاکتورهای متعدد محیطی و فیزیکی نیز در افزایش HSP‌های سلول نقش دارند (۳۳).

از جمله استرس‌های خارجی برای موجودات می‌توان به تغییر دما، شرایط اسمزی، مواد شیمیایی، فلزات سنگین، کاهش اکسیژن، تشعشعات رایواکتیو و همچنین به عفونت، تشکیل تومور، تقسیم و تمایز سلولی به عنوان استرس‌های داخلی اشاره نمود (۹ و ۱۳). علاوه بر این، شرایط آب و هوایی و وضعیت ژئوگرافی نیز نقش مهمی در میزان بیان پروتئین‌های استرس گرمایی در یک موجود زنده بازی می‌کنند (۱۲).

پروتئین‌های استرس گرمایی در اندازه‌هایی از ۲۷ تا ۱۱۰ کیلو دالتون وجود دارند و بر اساس وزن ملکولی و عملکردشان به پنج گروه تقسیم می‌شوند (۲۵). این پروتئین‌ها شامل HSP با وزن ملکولی پایین، HSP60، HSP70، HSP90 و HSP با وزن ملکولی بالا هستند (۱۷). گروه پروتئین‌های استرس گرمایی با وزن ملکولی پایین، یک خانواده بزرگ از چاپرونها (chaperon) هستند و دارای یک زنجیره ثابت در انتهای کربوکسیل خود می‌باشند که از ۹۰ اسید آمینه تشکیل شده و بعنوان زنجیره  $\alpha$ -کریستال نامگذاری شده است (۳). این دسته از HSPها، در هر دو گروه سلولهای پروکاریوت و یوکاریوت دارای وزن ملکولی ۱۵ تا ۴۲ کیلو دالتون هستند (۳۱).

ایران کشوری متنوع از نظر ارتفاع، بارش و اقلیم می‌باشد و لذا تغییرات دمایی در آن بسیار زیاد می‌باشد (۱). استرس گرمایی یکی از مشکلات ناشی از شرایط محیطی است که زنبور عسل را تحت تاثیر قرار می‌دهد و می‌تواند خسارتهایی را در هر سال به زنبورداران وارد نماید. استرس گرمایی بر روی میزان خروج زنبور از کندو تاثیر منفی گذاشته و در نتیجه بر میزان جمع‌آوری شهد و گرده، شبکه عصبی، عملکرد سیستم ایمنی و همچنین نرخ مرگ و میر آنها تاثیر منفی دارد. بنابراین استرس گرمایی تهدیدی جدی در صنعت زنبورداری بویژه در مناطق گرم جهان

مدل‌سازی پروتئین HSP40، HSP70 در *Apismellifera* بدون پیشنهاد اولیه الگو برای مدل‌کردن انجام شد.

مدل‌سازی با استفاده از سرور **I-TASSER**: مدل‌سازی

به روش همولوژی مدلینگ و به کمک پایگاه‌های اطلاعاتی I-TASSER (<https://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I->)

(TASSER) انجام شد. ساختار ایجاد شده بایستی حداقل انرژی را در وضعیت تمام اتم‌های خود داشته باشد. I-TASSER عنوان سرور شماره یک را برای پیش بینی ساختار پروتئین در آزمایش های CASP7، CASP8، CASP9، CASP10 و CASP11 (CASP: Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction) اختصاص داده است. این سرور همچنین در آزمایش CASP9 بعنوان بهترین سرور برای پیش بینی عملکرد پروتئین شناخته شده است (۲۷؛ ۳۶؛ ۳۸). در

پایگاه اطلاعاتی I-TASSER ابتدا یک هم ترازوی صورت می‌گیرد. این هم ترازوی به کمک آنالیز توالی اولیه در برنامه‌های SPARKS-X، FFAS-3D، MUSTER، HHSEARCH2، HHSEARCH1، Neff-PPAS، wdPPAS، pGenTHREADER، HHSEARCH و cdPPAS انجام می‌شود. خروجی این ده برنامه بصورت ده توالی هم تراز شده از ده پروتئین تعیین ساختار شده با توالی اولیه می‌باشد که پایگاه اطلاعاتی I-TASSER از این ده ساختار استفاده نموده و بر اساس نتایج هم ترازوی در این ده برنامه، پنج مدل پیش‌بینی می‌کند. ارزیابی کیفیت ساختاری این مدل‌ها بر اساس پارامترهای C-score می‌باشد.

مدل‌سازی ساختار در I-TASSER بر اساس ارزیابی کیفی موضعی ساختار (structurelocal quality) و بتا فاکتور (B-factor) نرمال شده، می‌باشد. کیفیت موضعی ساختار مدل-سازی شده به Z-score و بتا فاکتور (B-factor) نرمال شده بستگی دارد. به میزان انحراف فاصله بین یک رزیدو در مدل و ساختار طبیعی Z-score گفته می‌شود. ارزیابی مدل‌های ساخته شده بر اساس TM-score، RMSD و C-score می‌باشد که بر اساس هم‌ترازی الگو و تقارب پارامترهای

با این اطلاعات زمینه شناسایی جایگاه‌های اتصال با یون‌ها جهت مهار و یا افزایش فعالیت این چاپرون را در آینده فراهم نماید.

## مواد و روشها

**جستجوی پایگاه اطلاعاتی PDB**: به منظور بررسی میانکنش بین دو پروتئین HSP70 و HSP40 ابتدا وجود ساختار کریستالی آنها به روش آزمایشگاهی در زنبورعسل بررسی شد. به دلیل موجود نبودن ساختار سوم مبتنی بر داده های آزمایشگاهی در پایگاه اطلاعاتی PDB)

ساختار <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>، سوم این پروتئین‌ها با استفاده از یک روش مبتنی بر همولوژی مدلینگ تعیین شد.

به این منظور، در ابتدا توالی اسید آمینه آنها تهیه شد. که توالی پروتئینی HSP70 زنبورعسل (با کد شناسایی NP\_001153522.1 و با نام heat shock protein cognate 4 [Apismellifera] و همچنین توالی پروتئینی HSP40 زنبورعسل (با کد شناسایی XP\_016767139.1 و با نام dnaJ homolog subfamily A member 1 [Apismellifera]) از پایگاه داده بیوتکنولوژی (NCBI) به فرمت fasta تهیه شدند.

**آنالیز توالی و تهیه مدل:** توالی های تهیه شده از طریق ابزار Blast در پایگاه داده

NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) آنالیز شد و از این طریق توالی های مناسب با شباهت قابل قبول و همچنین E-Value پایین بدست آمد. با توجه به اینکه پروتئین *Apismellifera* HSP70 حدود ۶۵۸ اسید آمینه و *Apismellifera* HSP40 حدود ۳۹۹ اسید آمینه دارد اما هیچ پروتئینی در سایر گونه ها که درصد شباهت بالای توالی با دو پروتئین HSP مورد نظر داشته باشد و همچنین به طور کامل تعیین ساختار شده باشد، شناسایی نشد، در نتیجه

نرم افزارهایی که بدون در نظر گرفتن این بنیان ها و به صورت کاملاً کور (blind) داکینگ پروتئین ها را انجام می‌دهند از قابلیت اعتماد بسیار بالاتری برخوردار باشد. در واقع روش‌های داکینگ پروتئین ها را می توان به دو دسته روش های "abinitio" (از آغاز) و داده-محور تقسیم نمود. داکینگ داده-محور به این معناست که اطلاعات آزمایشگاهی به طور مستقیم طی فرایند داکینگ استفاده می‌شوند بنابراین نتایجی که از این روش ها به دست می آیند با نتایج به دست آمده در آزمایشگاه مطابقت دارد. HADDOCK در واقع یک روش داکینگ داده-محور است که پراستنادترین وب سرور داکینگ پروتئین-پروتئین در سطح جهان محسوب می شود (۸ و ۱۰).

لذا به منظور انجام فرایند داکینگ با استفاده از این وب سرور، علاوه بر فایل های PDB مربوط به هر پروتئین، بایستی بنیان های فعال هر دو پروتئین نیز در جایگاه‌های مورد نظر وارد شوند، سپس وب سرور HADDOCK به صورت اتوماتیک بنیان های غیرفعال را با توجه به بنیان های فعال وارد می نماید.

در تحقیق حاضر با توجه به اینکه داده های آزمایشگاهی به دست آمده تا به امروز محل دقیق میانکنش HSP70 و HSP40 را در زنبور عسل تعیین ننموده اند و در عین حال مطالعات آزمایشگاهی گذشته در برخی دیگر از موجودات یوکاریوت و پروکاریوت محل میانکنش HSP70 و HSP40 را، از ناحیه J domain نشان داده اند (۱۴؛ ۲۱؛ ۳۴)، لذا در تحقیق حاضر به منظور داک نمودن این دو پروتئین، دو وضعیت برهمکنش اجرا شد؛ در حالت نخست، تمام بنیان‌های فعال به دست آمده برای هر دو پروتئین در همه محل های مربوطه وارد شدند. اما در حالت دوم، به منظور داک نمودن این دو پروتئین، برای پروتئین HSP40 فقط بنیان‌های فعال به دست آمده در ناحیه J domain وارد شدند در حالی که برای HSP70 همه بنیان های فعال در نظر گرفته شدند.

ساختاری محاسبه می‌گردد. بهترین مدل از بین این پنج مدل بر اساس این پارامترها انتخاب شد (۲).

به منظور ارزیابی و مطالعه ساختاری مدل ساخته شده از نرم افزار Pymol استفاده شد.

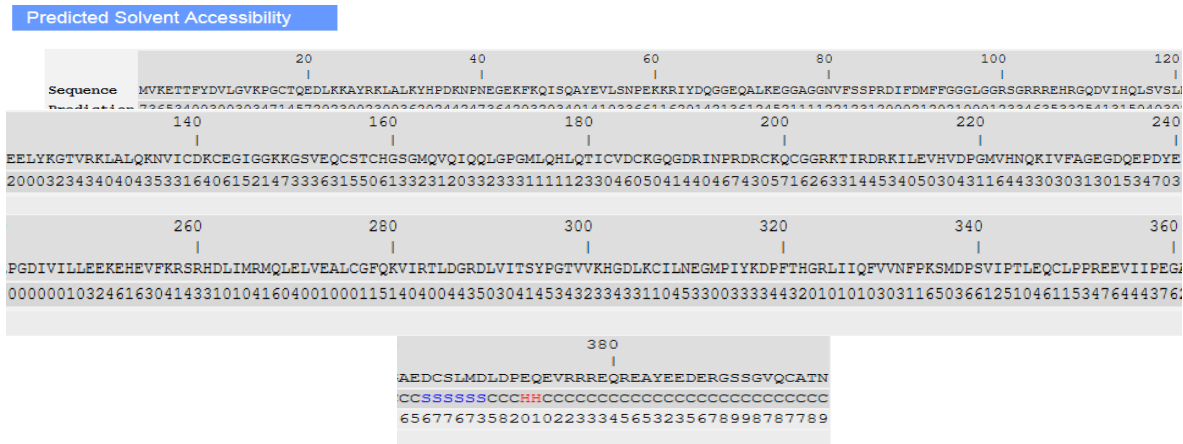
پیش بینی بنیان های درگیر در میانکنش دو پروتئین با استفاده از CPORT: با توجه به اینکه در این تحقیق از وب سرور HADDOCK برای بررسی میانکنش HSP70 و HSP40 استفاده گردید، بنیان های فعال که به طور مستقیم در میانکنش نقش دارند و بنیان های غیرفعال که بنیان های فعال را احاطه می نمایند با استفاده از سرور (۷) Consensus Prediction Of interface Residues (CPORT in Transient complexes) که از لینک [/http://milou.science.uu.nl/services/CPORT](http://milou.science.uu.nl/services/CPORT) قابل دسترسی است مشخص گردیدند. CPORT در واقع مجموعه ای از شش وب سرور پیش بینی کننده interface می باشد (۷). interface در واقع بنیان هایی از یک پروتئین است که به طور مستقیم و یا غیرمستقیم در میانکنش با سایر مولکول های زیستی نظیر پروتئین ها نقش دارد.

بررسی میانکنش HSP40 و HSP70 با استفاده از HADDOCK: به منظور بررسی میانکنش HSP40 و HSP70 از وب سرور HADDOCK 2.2 (۳۵) استفاده گردید. HADDOCK یک وب سرور داکینگ پروتئین-پروتئین است که از لینک [/http://milou.science.uu.nl/services/HADDOCK2.2](http://milou.science.uu.nl/services/HADDOCK2.2)

قابل دسترسی می‌باشد. این وب سرور به طور گسترده به منظور بررسی میانکنش های پروتئین-پروتئین مورد استفاده قرار می گیرد. از ویژگی‌های وب سرور HADDOCK این است که باید قبل از ران کردن فرایند داکینگ، بنیان های فعال دو پروتئین داک شونده مشخص و در جایگاه های مورد نظر وارد شوند، سپس نرم‌افزار، بنیان‌های غیرفعال را بر اساس بنیان‌های فعال وارد شده مشخص می نماید. همین موضوع موجب می‌شود که این نرم افزار نسبت به



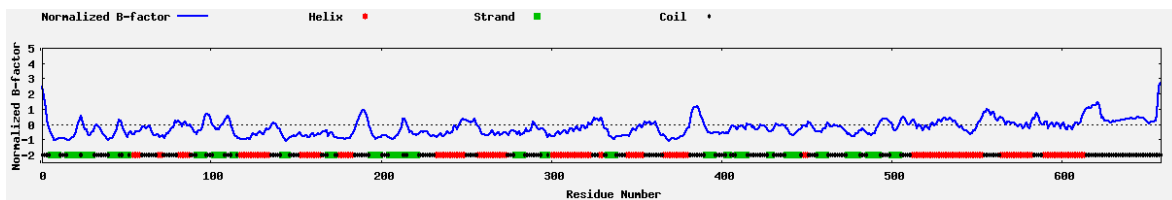




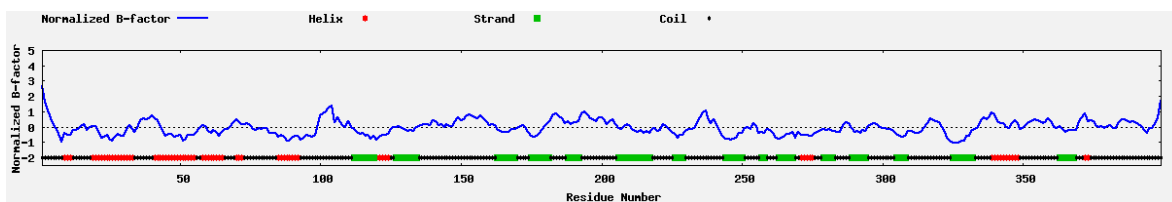
شکل ۴- پیش بینی میزان دسترسی بنیان‌های آمینواسیدی HSP40 به حلال

آزمایشات ساختاری برخوردارند. همانطور که مشاهده می‌شود تعداد اندکی از رزیدوها دارای بتا فاکتور بالاتر از ۲ بوده و درصد بالایی از رزیدوها بتا فاکتور آنها در این مدل منفی بوده و این ضریب اطمینان بالایی برای مدل ساخته شده فراهم می‌کند.

شکل‌های ۵ و ۶ به ترتیب پیش‌بینی B-factor نرمال شده را برای HSP40 و HSP70 توسط I-TASSER نشان می‌دهد. در واقع، B-factor نشان‌دهنده میزان تحرک گرمایی ذاتی بنیان‌ها و یا اتم‌ها در پروتئین است. رزیدوهایی با بتا فاکتور بالاتر از ۲ از پایداری کمتری در



شکل ۵- پیش‌بینی B-factor نرمال شده توسط I-TASSER برای بنیان‌های پروتئین HSP70



شکل ۶- پیش‌بینی B-factor نرمال شده توسط I-TASSER برای بنیان‌های پروتئین HSP40

Estimated RMSD =  $7.1 \pm 4.2 \text{ \AA}$   
همچنین درصد این پارامترهای برای بهترین مدل ساخته شده برای HSP40 بصورت زیر می‌باشد.

C-score = 1.89

Estimated TM-score =  $0.49 \pm 0.15$

Estimated RMSD =  $11.3 \pm 4.6 \text{ \AA}$

ارزیابی کیفیت ساختاری این مدل‌ها براساس پارامترهای C-score، TM-score و RMSD می‌باشد. درصد این پارامترهای برای بهترین مدل ساخته شده از HSP70 بصورت زیر می‌باشد.

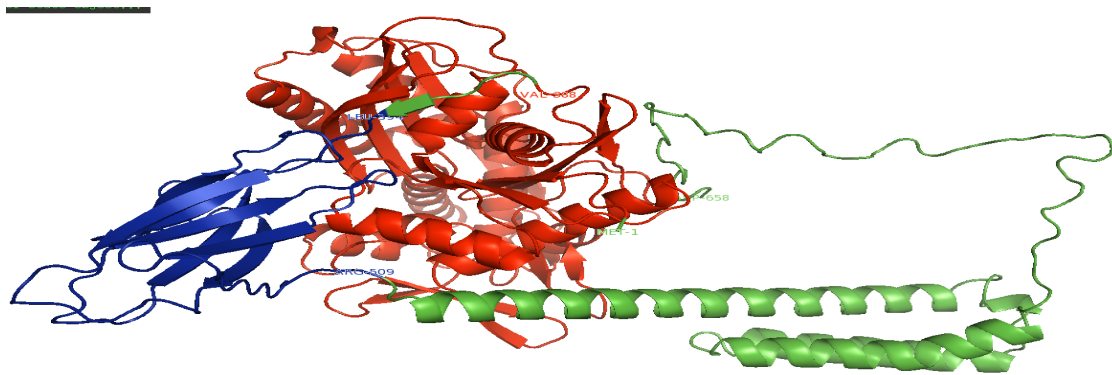
C-score = 0.37

Estimated TM-score =  $0.76 \pm 0.10$

TASSER مدل یک بیشترین میزان C-score (۰/۳۷) را دارا بود و بنابراین بهترین مدل در نظر گرفته شد. همچنین برای HSP40 نیز مدل یک بیشترین میزان C-score (۱/۸۹) را دارا بود و بهترین مدل شناخته شد.

در شکل های ۷ و ۸ بهترین مدل ایجاد شده توسط سرور I-TASSER از پروتئین HSP70 و HSP40 نمایش داده شده است.

در مجموع پنج مدل از پروتئین HSP70 و HSP40 توسط I-TASSER ساخته شد که بر اساس C-score بهترین مدل انتخاب گردید. در واقع درجه قابل اطمینان بودن یک مدل به صورت کمی توسط C-score اندازه گیری می‌شود و بنابراین مدلی با بالاترین میزان C-score بهترین مدل شناخته می‌شود. مقادیر C-score بین ۵- تا ۲ متغیر است. از بین پنج مدل ساخته شده برای HSP70 توسط I-



شکل ۷- بهترین مدل ساخته شده از HSP70 زنبور عسل توسط سرور I-TASSER. دامین های ATP (N-terminal یا Nucleotide binding domain) در رنگ قرمز و C-terminal در رنگ سبز بر اساس اطلاعات HSP70 انسانی



شکل ۸- بهترین مدل ساخته شده از HSP40 زنبور عسل توسط سرور I-TASSER. دامین (N-terminal) در رنگ قرمز

شناسایی شدند. همانطور که در اشاره شد بنیان های فعال متشکل از کلیه بنیان هایی است که به طور مستقیم در میانکشی این پروتئین ها با مولکول های دیگر (پروتئین ها، DNA و...) نقش دارند در حالی که بنیان

تعیین بنیان های فعال و غیرفعال B-باکس توسط CPORT قبل از بررسی میانکشی پروتئین های HSP70 و HSP40، بنیان های فعال و غیرفعال هر دو پروتئین با استفاده از



دست آمده برای این دو پروتئین را نمایش می دهد.

های غیرفعال در واقع بنیان‌هایی هستند که بنیان های فعال را احاطه می نمایند. شکل ۹ بنیان های فعال و غیرفعال به

**HSP70**

**Predicted residues (active residues in HADDOCK):**  
285, 286, 392, 393, 394, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 421, 427, 428, 429, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 449, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 473, 556, 613, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637,

**Surrounding residues (passive residues in HADDOCK):**  
171, 213, 216, 218, 220, 262, 283, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 379, 380, 389, 390, 391, 395, 400, 412, 413, 418, 419, 420, 422, 423, 425, 426, 441, 445, 446, 447, 448, 451, 452, 453, 454, 455, 458, 460, 475, 481, 482, 483, 491, 493, 494, 495, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 551, 552, 554, 555, 557, 559, 560, 561, 562, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 614, 615, 638, 639, 640, 641,

**HSP40**

**Predicted residues (active residues in HADDOCK):**  
36, 68, 157, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 268, 270, 271, 272, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 291, 295, 296, 297, 307, 309, 324, 329, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 341, 344, 345, 348, 349, 352, 356, 357, 361, 366, 367, 370, 384, 388, 395,

**Surrounding residues (passive residues in HADDOCK):**  
2, 4, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 65, 66, 67, 69, 70, 71, 72, 110, 111, 112, 154, 156, 158, 159, 160, 161, 183, 184, 185, 186, 187, 226, 255, 260, 261, 262, 264, 266, 281, 288, 289, 293, 298, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 308, 310, 311, 315, 322, 326, 328, 330, 338, 339, 340, 342, 343, 346, 347, 350, 351, 353, 354, 355, 358, 359, 362, 363, 364, 365, 368, 369, 372, 373, 375, 377, 381, 382, 383, 385, 386, 387, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 396, 397, 398,

شکل ۹- بنیان های فعال و غیرفعال پروتئینهای HSP70 و HSP40 پیش‌بینی شده با استفاده از سرور CPORT

Z-score=-1.8

HADDOCK-score=-251.4 +/- 9.7

در شکل ۱۰ نتایج حاصل از داکینگ هر دو حالت نمایش داده شده اند.

در نهایت فایل های PDB به دست آمده از HADDOCK با استفاده از نرم افزار LigPlot و وب سرور PIC مورد مطالعه قرار گرفت و اسیدآمینو های درگیر در میانکشن این دو پروتئین و انواع پیوندهای موجود مشخص گردیدند (شکل ۱۱).

نتایج بررسی اتصال Jdomain در HSP40 با HSP70 نشان داد که اسید آمینو های ۲۸-۴۱ که در انتهای هلیکس ۳ و هلیکس ۴ در J domain از HSP40 و 34HPD36 motif می باشند در تداخل دخیل هستند. همچنین یک شیار اسیدی شامل اسید آمینو های QTFTTYADNQPGLI و ATAGGVMT در دمین ATPase از HSP70 که در محدوده اسیدآمینو های ۴۰۰ تا ۴۳۰ قرار گرفته اند، در میانکشن نقش دارند.

**نتایج به دست آمده از HADDOCK**

همانطور که قبلا اشاره شد HADDOCK یک وب سرور داکینگ پروتئین- پروتئین است. خروجی HADDOCK که در واقع کمپلکس دو پروتئین داک شده به فرمت PDB می باشد، که بر اساس آن کمپلکس HSP70-HSP40 به صورت کلی و همچنین کمپلکس Jdomain در HSP40 با HSP70 که در اکثر مطالعات کریستالوگرافی به این اتصال اشاره شده است (۱۸ و ۲۳) مدلسازی شدند.

ارزیابی کیفیت کمپلکس ها و انتخاب بهترین آنها بر اساس میزان Z-score و HADDOCK-score از بین کلاستر های شبیه سازی شده انجام شد، که میزان این پارامترها برای بهترین داکینگ از کمپلکس HSP70-HSP40 به صورت زیر می باشد.

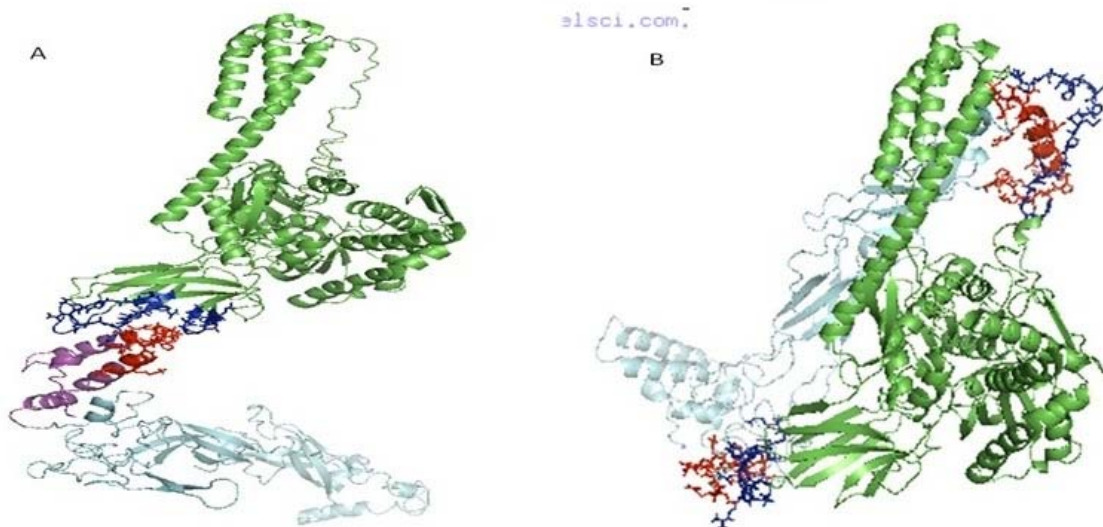
Z-score=-1.9

HADDOCK-score=-205.9 +/- 13.9

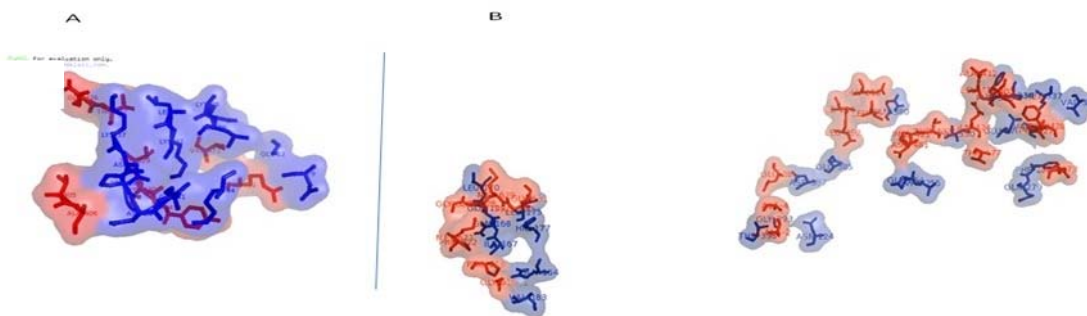
و برای کمپلکس HSP40-HSP70-Jdomain به صورت زیر می باشد.

۴۰۰ تا ۴۳۰ و ۶۲۰ تا ۶۴۰ به ترتیب با ناحیه اسید آمینه های ۳۳۰ تا ۳۵۰ و ۱۶۵ تا ۱۷۵ در HSP40 متصل می‌شود.

همچنین در حالت بررسی اتصال به صورت کور بین HSP40 با HSP70، HSP70 از دونا حیه اسید آمینه های



شکل ۱۰- کمپلکس HSP70-HSP40 به دست آمده از وب سرور HADDOCK: اتصال HSP70 به HSP40 از محل JdomainB. اتصال HSP70 به HSP40 بر اساس تمامی بنیان های فعال (HSP70 با رنگ سبز و HSP40 با رنگ آبی)



شکل ۱۱- اسید آمینه های درگیر در میان کنش دو پروتئین HSP40, HSP70 و انواع پیوندهای آنها با استفاده از وب سرور PIC. A: میان کنش HSP70 با HSP40 از محل Jdomain. B: میان کنش HSP70 با HSP40 بر اساس تمامی بنیان های فعال ( بنیان های HSP70 با رنگ قرمز و HSP40 با رنگ آبی)

اعضای خانواده Hsp40 به سه نوع I، II و III طبقه بندی می‌شوند. تمام انواع پروتئین Hsp40 حاوی دامنه J می‌باشند که حدود ۷۰ اسید آمینه را دارا می‌باشد. در پروتئین Hsp40 نوع I و II، دامنه J در N-terminus است. در اعضای خانواده Hsp40 نوع III، می‌توان آن را در هر موقعیت درون پروتئین یافت. همچنین در این دو نوع پروتئین بین دو دامنه J و C-terminal یک ناحیه غنی از FG وجود دارد.

### بحث

به منظور بررسی میان کنش دو پروتئین با استفاده از روش های محاسباتی قبل از هر چیز نیازمند ساختار سه بعدی دو پروتئین هستیم. در مورد هیچکدام از دو پروتئین مورد مطالعه در زنبور عسل داده های آزمایشگاهی تعیین ساختار وجود نداشت و به همین دلیل از ساختارهای به دست آمده به روش داکینگ بدین منظور استفاده گردید.

سرورها و نرم افزارهای تعیین ساختار پروتئین از اعتبار بسیار بالایی برخوردار است. ساختار دمین C-ترمینال HSP70 زنبورعسل که در I-TASSER مدل‌سازی شده دارای بخش کلاهیک آلفا هلیکسی می‌باشد. مشابه دمین N-ترمینال، الگوی ساختاری این بخش نیز شباهت بالایی با HSP70 انسانی داشته و از الگوی ساختاری مشابهی برخوردار است و پنج آلفا هلیکسی که در HSP70 انسانی گزارش شده در اینجا نیز قابل مشاهده است. همچنین، زیر دمین صفحات بتا ( $\beta$ SBD) نیز دارای الگویی مشابه است. این مدل نشان می‌دهد که موقعیت قرارگیری این دو زیر دمین نسبت به همدیگر تا حدودی در دو HSP انسانی و زنبورعسل متفاوت است و نسبت به قرارگیری آنها در HSP انسانی از هم دور شده‌اند. عمده دلیل آن به خاطر لویی است که این دو زیردمین را به هم وصل می‌کند. با توجه به سخت بودن مدل‌سازی ساختارهای ثانویه لوپ‌ها در پروتئین‌ها که می‌توانند حالت‌های مختلفی را بپذیرند موقعیت قرارگیری این دو زیر دمین در ساختار مدل‌سازی شده می‌تواند نسبت به هم متفاوت باشد. از طرفی هلیکس A و B در اینجا به هم چسبیده‌اند که علت آن وجود یک لوپ بسیار کوچک است که آن را به عنوان بخشی از آلفا هلیکس شناسایی نموده است (۱۱؛ ۲۳).

همانطور که در بخش روش تحقیق اشاره شد بنیان‌های فعال و غیرفعال پروتئین HSP70 و HSP40 با استفاده از وب سرور CPORT شناسایی شدند و در مرحله بعد از آن‌ها برای انجام داکینگ پروتئین-پروتئین استفاده گردید. با توجه به نتایج مطالعات گذشته بدست آمده از داده‌های آزمایشگاهی نقاط اتصال در HSP70 از دو ناحیه می‌باشد و شامل ناحیه N terminal و C terminal است (۲۱؛ ۳۲؛ ۳۷). HSP40 جهت اتصال به HSP70 به صورت دایمر عمل می‌کند و بعد از اتصال ناحیه C terminal آن به پروتئین‌های هدف و سپس برقراری اتصال بین پروتئین‌های بدون ساختار با HSP70، از ناحیه Jdomain خود به ناحیه ATPase از HSP70 متصل می‌شود تا فعالیت آن را

دامنه J از Hsp40 می‌تواند با دامنه ATPase از Hsp70 اتصال ایجاد کند و سپس فعالیت‌های ATP‌آزی Hsp70 را تحریک کند. علاوه بر این در زمان اتصال پروتئین‌های بدون ساختار توسط HSP40 به HSP70 اتصال دیگری بین انتهای C terminal از HSP70 به ابتدای C terminal از HSP40 صورت می‌پذیرد (۲۱).

ساختار پیش‌بینی شده برای دامنه J از HSP40 زنبورعسل نشان‌دهنده مطابقت با مطالعات کریستالوگرافی در HSP40 گاوی، Ecoli و مخمر است که نشان داده‌اند دامنه J آن دارای چهار زنجیره آلفا هلیکس و تعدادی اسیدآمین‌ها می‌باشد (۶؛ ۱۵؛ ۲۴).

پروتئین HSP70 شامل یک دامنه N-ATPase terminal (45 kDa)، یک دامنه اتصال سوپسترا (18kDa) که خود آن به زیر دمین صفحات  $\beta$  ( $\beta$ SBD) و یک کلاهیک آلفا هلیکسی ( $\alpha$ SBD) تقسیم می‌شود و انتهای کربوکسیل C-terminal (10 kDa) می‌باشد (۱۶).

مطالعات گذشته نشان می‌دهد که چارونهای HSP40 هیدرولیز ATP را با HSP70 تحریک می‌کنند و پروتئین HSP40 و HSP70 در تمام موجودات از انسان گرفته تا باکتری اشرشیاکلی نواحی حفاظت شده بسیاری دارد (۳۷).

مطالعات ساختار شناسی نشان داده‌اند که DnaJ در E. coli میزان هیدرولیز ATP توسط HSP70 را بیشتر از ۱۰۰۰ بار تحریک می‌کنند (۱۸؛ ۲۰). علاوه بر این، فعالیت چارونی DnaJ نیاز به توانایی ارتباط با DnaK از طریق دامنه J خود دارد (۱۸؛ ۲۳) و همچنین از طریق دامنه C خود با سوپستراها اتصال می‌یابد. DnaJ با شیوه‌های سریع و مداوم با سوپستراها ارتباط دارد (۲۳).

همانطور که در بخش‌های قبلی متن اشاره شد وب سرور I-TASSER بر اساس روش همولوژی مدلینگ ساختار پروتئین‌ها را تعیین می‌نماید و در مقایسه با سایر وب-

نتایج به دست آمده از این تحقیق اولین مرحله در شناسایی ساختار پروتئینی چاپرون های HSP70 و HSP40 زنبورعسل می‌باشد. این نتایج شباهت ساختاری مناسب بین HSP70 و HSP40 زنبورعسل و HSP70 و HSP40 انسان را نشان می‌دهد. از این رو می‌توان پیش بینی نمود که رفتار و عملکرد HSP40, HSP70 زنبورعسل می‌تواند مشابه با HSP40, HSP70 انسانی باشد و میان کنش‌هایی که HSP40, HSP70 انسانی با سایر پروتئین‌های سلولی برقرار می‌کند در زنبورعسل نیز وجود دارد. با توجه به مطالعات کم در زمینه HSP40 و HSP70 زنبورعسل از داده‌های مربوط به حوزه HSP40 و HSP70 انسانی می‌توان در بسیاری از فرضیات و عملکردهای زنبورعسل در زمان تنش‌ها استفاده نمود و در مرحله اول از این اطلاعات بصورت اولین احتمال استفاده نمود. داده‌های این پژوهش به عنوان نمونه می‌توانند در زمینه داروهای طراحی شده که در عملکرد با HSP70 و HSP40 انسانی می‌باشند و استفاده از همان داروها در حوزه زنبورعسل بسیار کمک کننده باشند. این داده‌ها می‌توانند به فهم چگونگی نحوه میان کنش HSP70 زنبورعسل با HSP40 کمک کرده و زمینه ساز روشن شدن نحوه فعالیت آن در درون سلول-های زنبورعسل در شرایط استرس باشد.

#### تقدیر و تشکر

این مقاله مستخرج از طرح شماره ۷/ص/۹۵/۴۰۷ پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان می‌باشد که بدین وسیله نویسندگان از آن دانشگاه تشکر می‌نمایند.

تحریک کند و تاخوردگی پروتئین مورد نظر اتفاق بیوفتد(۱۴).

Lu and Cyr (۱۹۹۸) بر اساس داده‌های آزمایشگاهی در پروکاریوتها نشان دادند که ترکیبی از دامنه J، ناحیه انگشت روی (Zn) و پایانه های کاربوکسیل محافظت شده برای Ydj1 برای همکاری با Hsp70 و تسهیل تاشوندگی پروتئین لازم است (۲۲). همچنین Tsai و همکاران (۱۹۹۶) نشان دادند که اتصال HSP40 به HSP70 برای تحریک فعالیت ATPase آن از ناحیه هلیکس های ۳ و ۲ دامنه J و اسیدآمینو های حفاظت شده بین این دو هلیکس می‌باشد (۳۴) که کاملاً منطبق بر نتایج بدست آمده از محل برهمکنش در تحقیق حاضر می‌باشد.

نتایج بدست آمده از بررسی برهمکنش بین HSP70 و HSP40 در حالت کور می‌تواند به این دلیل باشد که در بررسی انجام شده پروتئینهای بدون ساختار در مطالعه سه بعدی وجود ندارند، لذا دو چاپرون از محل‌هایی که بایستی به اینگونه پروتئین‌ها متصل شوند به یکدیگر متصل می‌شوند (اتصال در ناحیه اسید آمینو های ۴۰۰ تا ۴۳۰ از HSP70 با اسیدآمینو های ۳۳۰ تا ۳۵۰ در HSP40) و علاوه بر این اتصال در انتهای C terminal از HSP70 با ابتدای C terminal از HSP40 (ناحیه اسید آمینو های ۶۲۰ تا ۶۴۰ از HSP70 به ناحیه اسیدآمینو های ۱۶۵ تا ۱۷۵ در HSP40) که در زمان انتقال پروتئین‌های بدون ساختار توسط HSP40 به HSP70 به صورت کریستالوگرافی در مطالعات مختلف نشان داده شده است در مطالعه حاضر نیز قابل مشاهده است.

#### منابع

۲- لطفی، ص. مرتضوی، م. و ریاحی مدوار. ع. (۱۳۹۷). تعیین ساختار سوم پروتئین HMGB4 انسانی با استفاده از روش مبتنی بر هومولوژی مدلینگ. پژوهش‌های سلولی و مولکولی، ۳۱(۴)، ۶۱۲-۶۲۳

۱- زهری، ص.، اصغری، ع. دادخواه، م. (۱۳۹۲). تنوع جمعیت‌های زنبور عسل بر اساس نشانگرهای مورفولوژیکی و ریزماهواره (microsatellite) در استان اردبیل. پژوهش‌های سلولی و مولکولی، ۲۶(۴)، ۴۶۲-۴۷۱

- 3- Basha, E., Friedrich, K. L., & Vierling, E. (2006). The N-terminal arm of small heat shock proteins is important for both chaperone activity and substrate specificity. *J Biol Chem*, 281(52), 39943-39952. doi: 10.1074/jbc.M607677200
- 4- Bukau, B., Weissman, J., & Horwich, A. (2006). Molecular chaperones and protein quality control. *Cell*, 125(3), 443-451. doi: 10.1016/j.cell.2006.04.014
- 5- Chou, C. C., Forouhar, F., Yeh, Y. H., Shr, H. L., Wang, C., & Hsiao, C. D. (2003). Crystal structure of the C-terminal 10-kDa subdomain of Hsc70. *J Biol Chem*, 278(32), 30311-30316. doi: 10.1074/jbc.M304563200
- 6- Cupp-Vickery, J. R., & Vickery, L. E. (2000). Crystal structure of Hsc20, a J-type Co-chaperone from Escherichia coli. *J Mol Biol*, 304(5), 835-845. doi: 10.1006/jmbi.2000.4252
- 7- de Vries, S. J., and Bonvin, A. M. . (2011). CPOR: a consensus interface predictor and its performance in prediction-driven docking with HADDOCK. *PLoS one*, 6, e17695.
- 8- de Vries, S. J., Melquiond, A. S., Kastiris, P. L., Karaca, E., Bordogna, A., van Dijk, M., . . . Bonvin, A. M. (2010). Strengths and weaknesses of data-driven docking in critical assessment of prediction of interactions. *Proteins*, 78(15), 3242-3249. doi: 10.1002/prot.22814
- 9- Diamant, S., Eliahu, N., Rosenthal, D., & Goloubinoff, P. (2001). Chemical Chaperones Regulate Molecular Chaperones in Vitro and in Cells under Combined Salt and Heat Stresses. *Journal of Biological Chemistry*, 276(43), 39586-39591. doi: 10.1074/jbc.M103081200
- 10- Dominguez, C., Boelens, R., & Bonvin, A. M. J. (2003). HADDOCK: A Protein-Protein Docking Approach Based on Biochemical or Biophysical Information. *Journal of the American Chemical Society*, 125(7), 1731-1737. doi: 10.1021/ja026939x
- 11- Fan, C. Y., Lee, S., & Cyr, D. M. (2003). Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell Stress Chaperones*, 8(4), 309-316.
- 12- Feder, M. E. (1999). Organismal, Ecological, and Evolutionary Aspects of Heat-Shock Proteins and the Stress Response: Established Conclusions and Unresolved Issues. *American Zoologist*, 39(6), 857-864.
- 13- Feder, M. E., & Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol*, 61, 243-282. doi: 10.1146/annurev.physiol.61.1.243
- 14- Gebauer, M., Zeiner, M., & Gehring, U. (1997). Proteins interacting with the molecular chaperone hsp70/hsc70: physical associations and effects on refolding activity. *FEBS Letters*, 417(1), 109-113. doi: https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01267-2
- 15- Hennessy, F., Nicoll, W. S., Zimmermann, R., Cheetham, M. E., & Blatch, G. L. (2005). Not all J domains are created equal: implications for the specificity of Hsp40-Hsp70 interactions. *Protein Sci*, 14(7), 1697-1709. doi: 10.1110/ps.051406805
- 16- Jiang, J., Maes, E. G., Taylor, A. B., Wang, L., Hinck, A. P., Lafer, E. M., & Sousa, R. (2007). Structural basis of J cochaperone binding and regulation of Hsp70. *Mol Cell*, 28(3), 422-433. doi: 10.1016/j.molcel.2007.08.022
- 17- Joe, M. K., Park, S. M., Lee, Y. S., Hwang, D. S., & Hong, C. B. (2000). High temperature stress resistance of Escherichia coli induced by a tobacco class I low molecular weight heat-shock protein. *Mol Cells*, 10(5), 519-524.
- 18- Karzai, A. W., & McMacken, R. (1996). A bipartite signaling mechanism involved in DnaJ-mediated activation of the Escherichia coli DnaK protein. *J Biol Chem*, 271(19), 11236-11246.
- 19- Laskowski, R. A., & Swindells, M. B. (2011). LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J Chem Inf Model*, 51(10), 2778-2786. doi: 10.1021/ci200227u
- 20- Laufen, T., Mayer, M. P., Beisel, C., Klostermeier, D., Mogk, A., Reinstein, J., & Bukau, B. (1999). Mechanism of regulation of Hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(10), 5452-5457. doi: 10.1073/pnas.96.10.5452
- 21- Li, J., Qian, X., & Sha, B. (2009). Heat shock protein 40: structural studies and their functional implications. *Protein Pept Lett*, 16(6), 606-612.
- 22- Lu, Z., & Cyr, D. M. (1998). The conserved carboxyl terminus and zinc finger-like domain of the co-chaperone Ydj1 assist Hsp70 in protein folding. *J Biol Chem*, 273(10), 5970-5978.
- 23- Mayer, M. P., & Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 62(6), 670-684. doi: 10.1007/s00018-004-4464-6

- 24- Mokranjac, D., Bourenkov, G., Hell, K., Neupert, W., & Groll, M. (2006). Structure and function of Tim14 and Tim16, the J and J-like components of the mitochondrial protein import motor. *Embo j*, 25(19), 4675-4685. doi: 10.1038/sj.emboj.7601334
- 25- Moseley, P. L. (1997). Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism. *J Appl Physiol* (1985), 83(5), 1413-1417.
- 26- Robert, J. (2003). Evolution of heat shock protein and immunity. *Dev Comp Immunol*, 27(6-7), 449-464.
- 27- Roy, A., Kucukural, A., & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc*, 5(4), 725-738. doi: 10.1038/nprot.2010.5
- 28- Schlesinger, M. J. (1986). Heat shock proteins: the search for functions. *J Cell Biol*, 103(2), 321-325.
- 29- Sikora, A., & Grzesiuk, E. (2007). Heat shock response in gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol*, 58 Suppl 3, 43-62.
- 30- Sørensen, J. G., Kristensen, T. N., & Loeschcke, V. (2003). The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*, 6(11), 1025-1037. doi: 10.1046/j.1461-0248.2003.00528.x
- 31- Sun, W., Van Montagu, M., & Verbruggen, N. (2002). Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochim Biophys Acta*, 1577(1), 1-9.
- 32- Suzuki, H., Noguchi, S., Arakawa, H., Tokida, T., Hashimoto, M., & Satow, Y. (2010). Peptide-binding sites as revealed by the crystal structures of the human Hsp40 Hdj1 C-terminal domain in complex with the octapeptide from human Hsp70. *Biochemistry*, 49(39), 8577-8584. doi: 10.1021/bi100876n
- 33- Tomanek, L. (2002). The Heat-Shock Response: Its Variation, Regulation and Ecological Importance in Intertidal Gastropods (genus Tegula). *Integr Comp Biol*, 42(4), 797-807. doi: 10.1093/icb/42.4.797
- 34- Tsai, J., & Douglas, M. G. (1996). A conserved HPD sequence of the J-domain is necessary for YDJ1 stimulation of Hsp70 ATPase activity at a site distinct from substrate binding. *J Biol Chem*, 271(16), 9347-9354.
- 35- van Zundert, G. C., Rodrigues, J. P., Trellet, M., Schmitz, C., Kastiris, P. L., Karaca, E., Melquiond, A. S., van Dijk, M., de Vries, S. J., and Bonvin, A. M. (2016). The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. *Journal of molecular biology*, 428, 720-725.
- 36- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods*, 12(1), 7-8. doi: 10.1038/nmeth.3213
- 37- Young, J. C. (2010). Mechanisms of the Hsp70 chaperone system. *Biochem Cell Biol*, 88(2), 291-300. doi: 10.1139/o09-175
- 38- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 40. doi: 10.1186/1471-2105-9-40

## Modeling of heatstressprotein70 (HSP70) of honey bee by homology modeling and molecular simulation method and interaction to HSP40

Rezvannejad E.<sup>1</sup>, Lotfi S.<sup>1</sup> and Boustan A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I.R. of Iran

<sup>2</sup>Dept. of Animal Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R. of Iran

### Abstract

Heat stress is one of the most significant problems which has negative effect on feed intake, growth rate, neural network, immune function and mortality. In heat stress, the synthesis of proteins delayed but the heat stress proteins quickly are synthesized. They have important role in survival cell in stress conditions. Hsp70 is one of most important hsp<sub>s</sub>. Because of crystallographic structure of this protein is not determined in honey bee, structure modeling of honey bee hsp70 can identify the mechanism of action of this protein against environmental stresses and help to reduce costs associated with environmental stresses. HSP40 is as a regulator of the mechanism of HSP70. So, in the present study, 3d structure of two proteins and interaction of HSP70 and HSP40 was studied using simulation methods in two states: 1- To investigate the interaction between the two proteins in blind (whole 3d structure of proteins were used), this results show interaction between these proteins mainly is restricted to two regions. HSP70 is bound to the HSP40 from the amino acid region of 400-430 and 620-640, with the amino acid region of 330-350 and 165-175, respectively. 2- According to previous studies, docking is only possible in likely regions of the proteins. So, the interaction between J domain of HSP40 to HSP70 was investigated, in which the amino acids 28-41 of J domain are interacting to an acid groove in the ATPase domain of HSP70. The results could help to better understand the function of two proteins and to design new anti stress drugs.

**Key words:** HSP70 protein, HSP40 protein, Honeybee, Heat stress, Interaction